文章编号:1000-5404(2008)03-0183-03

论著

增生性瘢痕成纤维细胞 P 物质表达的研究

朱剑武,赖西南,王正国,王丽丽,甯交琳,莫立稳 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:**目的** 研究 P 物质(substance P, SP)在人增生性瘢痕体外培养的成纤维细胞的表达情况及其与正常皮肤之间的差异,探讨增生性瘢痕组织 SP 表达增高的原因。**方法** 以酶消化法体外培养成人增生性瘢痕以及正常皮肤的成纤维细胞,将 SP(终浓度为 10^{-7} mol/L)加入培养液中刺激成纤维细胞,分别于刺激前和刺激后 1、3、6、12、24 h 采用 RT-PCR 检测细胞内 SP 基因的表达情况,ELISA 检测培养液中 SP 浓度。正常皮肤对照组及瘢痕对照组除不应用 SP 外,余处理均相同。**结果** 未受 SP 刺激时,人增生性瘢痕及正常皮肤体外培养的成纤维细胞均能分泌一定浓度的 SP,两者之间差异有统计学意义($P<0.01$)。SP 刺激后,正常皮肤体外培养的成纤维细胞 SP 基因和蛋白表达均在 1 ~ 3 h 内达到高峰,随后迅速下降,24 h 后仍高于其正常水平;而增生性瘢痕体外培养的成纤维细胞 SP 基因和蛋白表达在 3 ~ 6 h 内达到高峰,随后缓慢下降,24 h 后仍高于其正常水平。两种成纤维细胞 SP 的分泌差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 外源性 SP 可诱使成纤维细胞内 SP 的分泌增加,而增生性瘢痕与正常皮肤成纤维细胞 SP 的分泌情况有明显差异。

关键词:P 物质;增生性瘢痕;成纤维细胞
中图法分类号:R329.26;R394.2;R619.6 **文献标识码**:A

Expression of substance P in cultured hypertrophic scar fibroblasts

ZHU Jian-wu, LAI Xi-nan, WANG Zheng-guo, WANG Li-li, NING Jiao-lin, MO Li-wen (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the differential expression of substance P (SP) in normal and hypertrophic scar fibroblasts *in vitro* and the reason of its high expression in the latter. **Methods** The normal and hypertrophic scar fibroblasts were isolated by enzyme digestion and cultured. SP with a final concentration of 10^{-7} mol/L were added into the cell culture media, and those without SP stimulation served as control. Before and 1, 3, 6, 12 and 24 h after SP stimulation, the SP expressions in the media of 4 groups were detected by RT-PCR and its concentrations was measured by ELISA. **Results** Without SP treatment, the fibroblasts from normal and hypertrophic scar excreted certain with significant difference between them ($P<0.01$). In presence of SP, the gene and protein expression of SP of normal fibroblasts reached a peak level in 3 to 6 h, and then decreased rapidly to normal level in 24 h. For the fibroblasts from hypertrophic scar, the SP showed similar tendency with normal group after SP treatment, but kept a high level in 24 h. There were significant difference between the normal fibroblasts and the ones from hypertrophic scar after SP treatment ($P<0.01$). **Conclusion** SP can induce the secretion of SP in fibroblasts, and SP secreted by normal and hypertrophic scar fibroblasts *in vitro* was statistically significant.

Key words: substance P; hypertrophic scar; fibroblasts

神经肽 P 物质(substance P, SP)是一种主要由感觉神经末梢分泌的神经递质,参与了创伤愈合的全部生理过程,在瘢痕增生中起重要作用[1]。已有研究证实,多种细胞因子均可以自分泌和/或旁分泌的方式作用于细胞本身,调节细胞功能[2,3]。而皮肤组织中的成纤维细胞、表皮细胞、血管内皮细胞亦可分泌 SP,且细胞表面有 SP 受体表达[4]。成纤维细胞是增生性瘢痕的主要组成细胞,目前尚不清楚瘢痕组织成纤维细胞 SP 的分泌情况,及其与正常皮肤之间的差异。本实验将 SP(终浓度为 10^{-7} mol/L)作用于瘢痕组织体外培养的成纤维细胞,分别检测其 SP 基因以及蛋白表达情况,并与正常皮肤的 SP 分泌情况进行比较,以探讨增生性瘢痕中 SP 表达增高的原因。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522600)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522600)
作者简介:朱剑武,男,重庆市人,博士研究生,实习研究员,主要从事神经肽与创伤修复方面的研究。电话:(023)60608007
通信作者:赖西南,电话:(023)68757574,E-mail:laixinan@163.com
收稿日期:2007-03-07 修回日期:2007-04-20

1 材料与方法

1.1 标本来源

增生性瘢痕(hypertrophic, HS)标本6例,男性3例,女性3例,年龄18~30岁,均取自于第三军医大学西南医院整形美容外科烧伤后8~18个月的HS手术患者。临床表现为瘢痕明显高出皮肤,色红,可见明显毛细血管扩张,质硬,表面无破溃及感染,瘢痕增生局限于皮损区,伴有瘙痒和疼痛症状,局部未行任何治疗。正常皮肤标本6例,取自第三军医大学西南医院泌尿外科包皮环切手术患者。

1.2 主要试剂

S-P ELISA试剂盒购自BPB公司,S-P RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,S-P购自美国Sigma公司,DMEM培养基、胰蛋白酶为Gibco公司产品。PCR引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 成纤维细胞的培养和SP刺激

参照文献[5]的方法进行。将手术获取的标本用无菌PBS漂洗3次,去除表皮和皮下脂肪,并剪碎。37 ℃、0.25%的胰酶振荡消化2 h。加入小牛血清中和胰酶后,过滤除去组织碎片,1 000 r/min离心10 min,弃上清。加入DMEM培养液,吹打混匀后接种于培养瓶,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育,每周更换2次培养液。待成纤维细胞长满瓶底,胰酶消化后传代。细胞传至第4~6代,用无血清的DMEM培养液饥饿细胞24 h后,换含终浓度为10^{-7} mol/L的SP以及2%小牛血清的成纤维细胞培养液1.5 ml,分别于刺激前(0 h)和刺激后1、3、6、12、24 h吸取培养液,-80 ℃保存待测。细胞总RNA提取依照Tripure试剂操作说明进行,随后-80 ℃保存待用。除正常皮肤组和HS组加入SP刺激外,另设正常皮肤对照组(不加SP,余处理相同)。

1.4 SP基因表达情况检测

反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测SP mRNA的表达量,以β-actin作为内参照,分别与目的基因于同一系统中共扩增。PCR引物见表1,操作按TaKaRa试剂说明书进行。按说明配制逆转录反应混合液,99 ℃变性30 min,5 ℃反应5 min。反应产物于-20 ℃保存备用。按说明配制PCR反应体系,94 ℃变性5 min后,每个PCR循环94 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延长60 s,共35个循环。扩增产物经1.8%琼脂糖凝胶电泳。凝胶拍照后,经Gel Doc 2000凝胶图像分析系统分别测定各样本SP mRNA和β-actin mRNA的面积条带平均灰度值(平均灰度值=平均光密度值×条带面积),计算各样本SP mRNA的平均表达强度:R=SP mRNA平均灰度值/β-actin平均灰度值。

表1 β-actin mRNA和SP mRNA的RT-PCR引物序列与扩增片段长度

基因	引物序列	产物长度
β-actin	上游5′-GTCCTGTGGCATCCACGAAAC-3′	500 bp
	下游5′-GCTCCAACCGACTGCTGTCA-3′	
SP	上游5′-GACAGCGACCAGATCAAGGAGGAA-3′	251 bp
	下游5′-ACCGAATACTTTCCTCACGTTACG-3′	

1.5 SP蛋白表达情况检测

酶联免疫吸附法(ELISA)检测培养液中SP的蛋白浓度以反映成纤维细胞SP的蛋白表达情况。操作按BPB SP ELISA试剂盒说明进行检测。将100 μl样品及50 μl酶标记溶液加入空白微孔中,37 ℃孵育反应60 min后充分清洗5次,再加入底物A、B液各50 μl,37 ℃下避光孵育反应15 min后终止反应,于波长450 nm的酶标仪上读取各孔的吸光度值D(450),根据标准曲线,计算样品中SP浓度。

1.6 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件对SP mRNA、SP蛋白的表达行单因素方差分析和配对资料t检验。

2 结果

2.1 成纤维细胞的培养

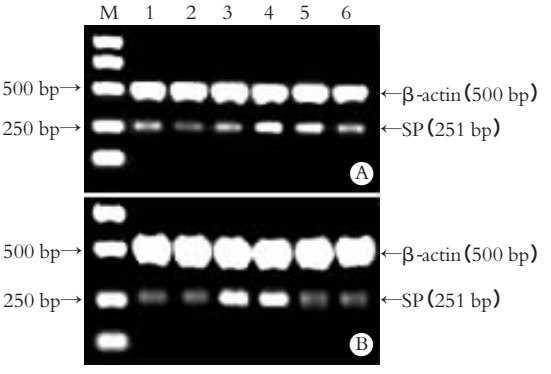
原代培养的HS和正常皮肤的成纤维细胞体外生长过程相似,在形态学上没有明显差别,均为典型的长梭形细胞,细胞核呈类圆形或长椭圆形,细胞质向两极突起,长短不一,细胞生长无序,随着细胞分裂加快,细胞呈平行排列或行成涡形,见图1。



图1 体外培养的增生性瘢痕成纤维细胞 (倒置显微镜×100)

2.2 SP mRNA表达情况

提取的总RNA在紫外分光光度仪上定量均在400 μg/μl以上,其D(260)/D(280)值均在1.73~1.98。应用10^{-7} mol/L SP刺激成纤维细胞后,我们观察到HS以及正常皮肤体外培养的成纤维细胞内SP mRNA的表达均明显上调,但正常皮肤的成纤维细胞内SP mRNA表达在刺激后1~3 h达到高峰,而HS的成纤维细胞内SP mRNA表达在刺激后3~6 h达到高峰,见图2。Gel Doc 2000凝胶图像分析结果见表2。



A:正常皮肤;B:增生性瘢痕

M:DNA标准(DL 2000);1-6:分别为刺激0、1、3、6、12、24 h

图2 10^{-7}mol/L SP刺激后正常皮肤及HS成纤维细胞内SP mRNA的表达

表2 不同刺激时间增生性瘢痕及正常皮肤SP mRNA表达的变化($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常皮肤	0.284±0.046	0.435±0.052[a]	0.634±0.064[a]	0.527±0.053[a]	0.451±0.056[a]	0.311±0.045
增生性瘢痕	0.377±0.048[c]	0.325±0.056[c]	0.374±0.063[d]	0.676±0.067[bd]	0.604±0.063[bd]	0.391±0.053[c]
皮肤对照	0.279±0.038	0.282±0.043	0.291±0.047	0.295±0.042	0.301±0.048	0.299±0.051
瘢痕对照	0.379±0.041	0.380±0.043	0.384±0.048	0.387±0.039	0.385±0.051	0.392±0.049

a:$P<0.01$,与皮肤对照组比较;b:$P<0.01$,与瘢痕对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与正常皮肤组比较

2.3　SP 蛋白表达情况

HS 的成纤维细胞能分泌一定浓度的 SP[(0.132 ± 0.028) nmol/L]，与正常皮肤的分泌量[(0.056 ± 0.025) nmol/L]相比，差异显著($P < 0.01$)。应用 10^{-7} mol/L SP 分别刺激成纤维细胞后，我们观察到 HS 以及正常皮肤体外培养的成纤维细胞 SP 蛋白的分泌量均明显上调，与各自的对照组均有明显差别($P < 0.05$)。但正常皮肤的成纤维细胞 SP 的分泌在刺激后 1 ~ 3 h 达高峰[(0.489 ± 0.022) nmol/L]，而 HS 的成纤维细胞内 SP 的分泌在刺激后 3 ~ 6 h达高峰[(0.367 ± 0.026) nmol/L]，但 24 h 后仍维持在一个浓度较高的水平，与正常皮肤在各时相点均有显著性差异($P < 0.05$)。

3　讨论

SP 是神经肽的一种，是广泛存在于中枢和外周神经系统的一大类细胞外信使分子。本研究表明，在非刺激条件下，瘢痕组织和正常皮肤成纤维细胞均能表达一定量的 SP，且有明显的差异($P < 0.01$)。而给予 10^{-7} mol/L 的 SP 刺激后，两种成纤维细胞 SP 基因和蛋白表达水平均明显上调，说明外源性的 SP 对细胞自身 SP 的表达有明显影响。这一发现与以往在体实验[6]结果一致。以辣椒素预先耗竭感觉神经末梢，阻断神经末梢释放 SP 后，致伤鼠皮肤肉芽组织成纤维细胞 SP 表达明显较感觉神经功能完整的皮肤低。皮肤组织中的成纤维细胞可分泌 SP，且其表面有 SP 受体表达，这说明外源性的 SP 可以通过成纤维细胞表面 SP 受体来影响细胞本身 SP 的表达。

另外，本实验结果显示，正常皮肤组织成纤维细胞 SP 表达水平在 1 ~ 3 h 迅速升高，在 3 h 达到高峰，随后迅速下降；而 HS 组织成纤维细胞 SP 表达水平在 1 ~ 6 h 缓慢升高，在 6 h 达到高峰，随后缓慢下降，24 h 后仍高于正常皮肤，与正常皮肤有明显差异($P < 0.05$)。这说明 HS 组织与正常皮肤的成纤维细胞对同一浓度的 SP 刺激的反应性有明显差异[7]。目前的研究证实，成纤维细胞存在不同表型即异质性[8]，主要表现在结构和功能的差异。吴义方等[9]的研究发现 HS 成纤维细胞与正常皮肤成纤维细胞在细胞形态和结构上均有明显差别。Tchetina 等[10]研究表明，HS 成纤维细胞 TGF-β_1 及Ⅱ型胶原分泌能力明显强于正常皮肤成纤维细胞 相反，胶原酶分泌能力低于正常皮肤成纤维细胞。Hathaway 等[11]研究证实，HS 组织的成纤维细胞分泌的胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP-3)显著高于正常皮肤的成纤维细胞，在成纤维细胞增殖和向肌成纤维细胞转化的过程中起重要作用。本实验结果显示，HS 和正常皮肤成纤维细胞的“异质性”除表现在两种细胞未受细胞外信号刺激时某些细胞因子的基础表达上，还表现在受刺激后细胞因子表达的差异，即对同一细胞因子刺激的反应差异上。

已有研究证实，外源性的 SP 可刺激成纤维细胞的增殖，血管的发生和胶原的合成，在创伤愈合及瘢痕增生中起非常重要的作用[12]。HS 组织中 SP 含量明显高于正常皮肤[13]，感觉神经末梢较正常皮肤增多，其释放的 SP 也增多。而 HS 组织成纤维细胞的细胞特性发生改变，神经末梢释放的 SP 又会引起 HS 成纤维细胞更高水平的 SP 释放，这可能是 HS 组织中 SP 表达增高的重要原因。而成纤维细胞 SP 分泌增加，进而引起成纤维细胞胶原的合成和分泌增加，可能是瘢痕增生的重要机制之一，这为今后通过神经肽防治瘢痕增生提供新的理论基础。

参考文献：

[1] 李荟元. 周围神经和神经肽与创伤修复及瘢痕增生[J]. 中国美容医学，2003，12(4)：444 - 447.

[2] 张世红，赵　晏. P 物质的免疫调节作用[J]. 生理科学进展，2002，33(3)：235 - 238.

[3] 陈　亮，李世荣，丛　林. P 物质对增生性瘢痕中肥大细胞组胺释放的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：841 - 843.

[4] Steinhoff M，Stander S，Seeliger S，*et al*. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation[J]. Arch Dermatol，2003，139(11)：1479 - 1488.

[5] 李　□，李世荣，刘剑毅，等. 结缔组织生长因子体外促进人增生性瘢痕成纤维细胞转分化的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：775 - 777.

[6] 赖西南，王丽丽，魏　立，等. 皮肤创面成纤维细胞内源性生长因子蛋白质表达与感觉神经的关系[J]. 中华皮肤科杂志，2004，37(10)：578 - 580.

[7] 谢　锋，王喜梅，牛扶幼，等. 增生性瘢痕组织中细胞外信号调节激酶和增殖细胞核抗原蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(6)：1036 - 1038.

[8] Eyden B. Fibroblast phenotype plasticity：relevance for understanding heterogeneity in“fibroblastic”tumors[J]. Ultrastruct Pathol，2004，28(5 - 6)：307 - 319.

[9] 吴义方，利天增，吴　强，等. 增生性烧伤瘢痕成纤维细胞的超微结构研究[J]. 电子显微学报，2004，23(2)：112 - 115.

[10] Tchetina E V，Squires G，Poole A R. Increased type Ⅱ collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions[J]. J Rheumatol，2005，32(5)：876 - 886.

[11] Hathaway C L，Arnold A M，Rand R P，*et al*. Differential Expression of IGFBPs by Normal and Hypertrophic Scar Fibroblasts[J]. J Surg Res，1996，60(1)：156 - 162.

[12] Burssens P，Steyaert A，Forsyth R，*et al*. Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation，angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing[J]. Foot Ankle Int，2005，26(10)：832 - 839.

[13] 丛　林，李世荣，徐友奇. 增生性瘢痕 P 物质含量的放射免疫测定[J]. 中华整形烧伤外科杂志，1998，14(6)：401 - 403.

（编辑　吴培红）