基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1351-04

# 大鼠皮肤创伤愈合过程中 SP 的表达及其死后稳定性的实验研究

黄 海,蒋 朴,李 虹,王全芳,邓世雄
(重庆医科大学基础医学院法医学教研室 法医学与生物医学信息研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨大鼠皮肤切创愈合过程中感觉神经肽 P 物质(Substance P,SP)表达变化规律及法医学意义。方法:建立大鼠皮肤切创模型后,应用免疫组化方法,观察大鼠皮肤创伤后不同时间点 SP 的表达变化及其死后稳定性,每个免疫组化染色切片样品在 400 倍率下分别随机观察 5 个不同的视野,测定 SP 阳性细胞率,取其平均值,试验数据采用 Excel 和 SPSS13.0 分析软件进行方差分析,各组间两两比较采用 LSD-$t$ 检验。结果:生前造创组于皮肤切创后 1 h,SP 即在中性粒细胞有阳性表达,伤后 4 d 达峰值,以后开始下降,持续至伤后 8 d,SP 在损伤区及其周围皮肤组织中表达明显高于正常对照组($P<0.05$)。死后伤组与正常对照组 SP 仅在表皮,皮脂腺,汗腺上皮细胞呈弱阳性表达,相比较无明显差异。死后稳定性各组在不同温度环境下各时间点 SP 表达与死后即刻比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:在皮肤创伤愈合过程中 SP 的表达变化具有时序性规律,且死后受环境温度影响较小,其稳定性较好,可望作为法医学损伤时间推断的一个参考指标。

【关键词】P 物质;法医病理学;皮肤切创;死后稳定性;免疫组织化学;损伤时间推断
【中国图书分类法分类号】D919.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

# A study on the expression and the postmortem stability of SP in incised rat skin healing

*HUANG Hai, et al*
(*Department of Forensic Medicine, Lab of Forensic Medicine and Biomedical Information, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression regulation of Substance P (SP) during incised rat skin healing processs and its significance in forensic medicine. *Methods*: Using immunohistochemistry technique and image analysis system to study the dynamic expression and the postmortem stability of SP at different time during incised rat skin healing processs. Counting each slide for SP-positive cell rate from 5 different zones randomly choosed under 400 × microscope, then calculating a mean value. Performing LSD-t test. *Results*: Positive stain of SP was detected in the neutrophil cells 1h after injury and the SP-positive rate reached maximum on the 4th day, then it began to decrease. The expression of SP in the damage zone and the surrounding skin tissues was significantly higher than the normal control group for 8 days after injury ($P<0.05$); Weak SP-expressions, which have no obviously changes, in the epidermic cells, sweat gland cells and endothelial cells were detected in the postmortem injury groups and normal control groups. No significant differences of SP-expressions were found among each subgroups of postmortem stability group under the environment of −20℃, 4℃ and 30℃ degree, compare to the time immediately after death ($P>0.05$). *Conclusion*: The SP-expression during incised rat skin healing processs is time-dependent, and the SP is quite stable after death. So SP may be used as a useful reference marker to estimate the time since injury.

作者介绍:黄 海(1980- ),男,硕士,
研究方向:法医病理学。
通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong1963@163.com。

【Key words】Substance P; Forensic pathology; Incised skin injury; Postmortem stability; Immunohistochemistry; Wound age estimation

initial flush with UW solution in heart procurement[J]. Heart Lung Transplant, 2002,21(3):383-390.
[13] Sawatari K, Kadoba K, Bergner K A, et al. Influence of initial reperfusion pressure after hypothermic cardioplegic ischemia on endothelial modulation of coronary tone in neonatal lamb; impaired coronary vasodilator response to acetylcholine[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1991, 101(5):777-782.
[14] 张 新,乔晨晖,张伟华.低温停搏液灌注压力对猪冠状动脉内皮及平滑肌功能的影响[J].第三军医大学学报,2006,28(20):2077-2079.

(责任编辑:张学颖)

P 物质（Substance P，SP）是第一个被发现的脑肠肽物质，是速激肽家族中重要的神经肽类物质之一，亦是与损伤修复关系最为密切的一种神经肽，广泛分布于中枢和外周神经系统。在创面愈合过程中 SP 能够通过对炎性细胞的趋化作用，可以促使其释放多种细胞因子并参与炎症反应。SP 还具有免疫调节功能及促进肉芽组织成纤维细胞的增殖作用。国内外研究结果证明 SP 与创伤愈合有着密切关系，且在其中发挥着重要的调控作用。目前在法医学实践中关于 SP 在皮肤损伤愈合过程中的表达情况与损伤时间的关系国内外均少见报道，本实验通过建立大鼠皮肤创伤模型，应用免疫组织化学方法，观察 SP 在皮肤创伤后不同时间点表达的变化规律及其死后稳定性，为损伤时间的推断探讨一个新的参考指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物分组 健康清洁级 SD 大鼠 102 只（重庆医科大学实验动物中心提供），雌雄不限，体重为（220 ± 20）g，随机分为生前造创组（30 只）、死后造创组（9 只）、正常对照组（3 只）和死后稳定性组（60 只）4 组。

1.1.2 主要试剂 兔抗鼠 SP 多克隆抗体（BA0126）、即用型 SABC 免疫组化试剂盒（SA1022）、DAB 显色剂等均购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 动物模型建立

①生前造创组：动物于造创前背部剪毛，用 3% 水合氯醛按 0.8 ml/100 g 剂量腹腔注射麻醉大鼠。常规消毒后用无菌手术刀做一与脊柱平行的长约 2 cm 切口，深达肌肉；创面自然止血，不包扎、不施药，保持伤口干燥。将大鼠置无菌室单笼饲养，给予消毒的食物和水。分别于伤后 0、0.5、1、6、12、24 h、2 d、4、6、8 d 共 10 个时间点断颈处死，取损伤部位皮肤检材。②死后造创组：大鼠断颈处死后在背部行长约 2 cm 切口，深达肌肉，分别于伤后 0、0.5、1 h 共 3 个时间点取损伤部位皮肤检材。③正常对照组：处理同实验组，但不行造创手术，大鼠断颈处死后取材。④死后稳定性组：同样方法作大鼠背部切创及伤后处理，伤后 6 d 断颈处死，分别置于 -20℃、4℃、30℃温度环境中。其中 -20℃和 4℃组，分别于 12 h、1 d、2、3、4、5、6、7 d 各取材 3 只；30℃组共 12 只大鼠，分别于 12 h、1 d、2、3 d 时间点各取材 3 只。

### 1.3 常规病理学切片染色

取材后均放入 4% 多聚甲醛 -PBS 中固定 12 h，石蜡包埋，常规切片（厚度为 5 μm）。HE 染色按常规方法进行；免疫组织化学染色步骤，DAB 显色均按试剂盒说明书进行，苏木素复染。阴性对照组用 PBS 代替一抗，未见非特异性染色。

### 1.4 SP 阳性细胞计数与统计分析

光学显微镜（×400）下随机选择 5 个视野，计数中性粒细胞、单核细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞，计算每个视野中阳性细胞与此 4 种细胞的比值。数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS for windows 13.0 软件进行方差分析，各组间两两比较采用 LSD-$t$ 检验，$P<0.05$ 具有显著性意义。

## 2 结 果

### 2.1 HE 染色

生前造创组伤后 0.5~1 h，创缘真皮毛细血管扩张、充血，见少量中性粒细胞，以中性粒细胞为主，组织间水肿；伤后 6~12 h 真皮毛细血管明显扩张、充血，可见大量炎性细胞，以中性粒细胞为主，组织间水肿明显；伤后 1 d，肉芽组织开始形成并向创口长入，炎性细胞以中性粒细胞为主。伤后 2 d 成纤维细胞开始增生，炎性细胞以单核 - 巨噬细胞为主；伤后 4~8 d，肉芽组织逐渐成熟纤维化，炎性细胞逐渐减少至消失，创口基本愈合。

正常对照组及死后造创组未见上述改变。

死后稳定性组在 4℃、-20℃环境下 12 h~6 d，皮肤创伤部位及其周围组织结构没有发生明显变化，死后 6、7 d 可见部分细胞核固缩、碎裂，但组织结构较清楚；在 30℃环境下死后 12 h 可见损伤部位组织细胞开始自溶，3 d 时创伤周缘组织细胞自溶，以致边缘结构不清。

### 2.2 免疫组织化学染色观察及统计学分析

正常对照组和死后造创各组在少量毛囊、皮脂腺、汗腺、血管内皮细胞呈弱阳性表达。

生前造创组：伤后 0.5 h，在创缘周围中性粒细胞中可见少量的 SP 阳性表达。12 h 组大部分中性粒细胞呈 SP 阳性着色，创伤底部坏死组织与真皮层交界处呈强阳性表达。伤后 1~2 d 创口附近的阳性细胞数增多，部分中性粒细胞呈阳性。伤后 4 d SP 阳性率达到峰值（见图 3），主要在大量增生的成纤维细胞、单核巨噬细胞和毛细血管壁内皮细胞表达，之后缓慢下降并持续维持在较高水平，至伤后 8 d，仍可见较强的阳性表达。经统计学方差分析，除 0 h 组外，各组与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），0.5 h~4 d 各时间点相邻两组之间相比均具有显著差异，其中 4 d 组与其他各时间组相比均有显著差异（$P<0.05$），见表 1、图 1。

**表 1 创伤后不同时间点 SP 阳性细胞表达百分率**

| 伤后时间 | 例数（只） | SP 阳性细胞率（$\bar{x} \pm s$）% |
|---|---|---|
| 0 h | 3 | — |
| 0.5 h | 3 | 4.08 ± 0.62 |
| 1 h | 3 | 7.48 ± 1.19 |
| 6 h | 3 | 16.69 ± 1.49 |
| 12 h | 3 | 24.17 ± 2.52 |
| 1 d | 3 | 32.09 ± 4.61 |
| 2 d | 3 | 39.79 ± 3.24 |
| 4 d | 3 | 65.16 ± 2.94 |
| 6 d | 3 | 47.64 ± 4.07 |
| 8 d | 3 | 42.67 ± 3.93 |

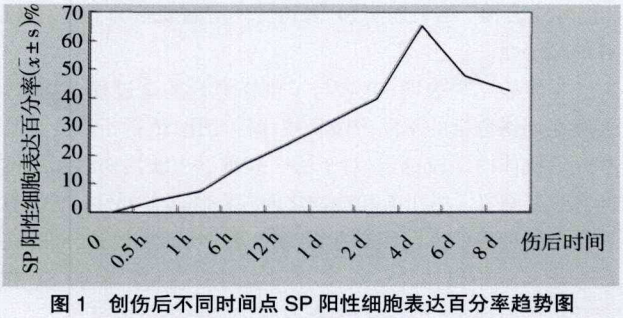



图 1 创伤后不同时间点 SP 阳性细胞表达百分率趋势图

死后稳定性组各时间点 SP 阳性细胞比率($\bar{x}\pm s$)见表 2。-20℃和 4℃环境中，各时间点阳性表达与死后即刻比较无明显差异($P>0.05$)，各相邻组间比较亦无显著性差异($P>0.05$)。30℃环境中，随着死亡时间延长，各时间点表达呈缓慢下降趋势，但与死后即刻比较以及各相邻组间比较均无显著性差异($P>0.05$)，3 d 时仍可见阳性表达。死后 2 d -20℃、4℃、30℃ SP 免疫组化染色见图 4、5、6。

## 3 讨 论

SP 在神经系统和损伤组织之间起着桥接作用，对修复细胞的增殖、迁移、分化进行调控[1]。皮肤中的 SP 主要来源于感觉神经纤维末梢，SP 通过神经激肽受体(Neurokinin receptor，NKR)发挥其生物学效应。NKR 有 3 种，NKR-1、NKR-2和 NKR-3，其中 NKR-1 与 SP 的亲和力明显高于其他两种受体，且在皮肤内成纤维细胞、血管内皮细胞、角质形成细胞中均有表达[2]。有研究表明，上述细胞也可分泌 SP，通过自分泌或旁分泌方式作用于修复细胞[3]。当机体受到各种刺激时，SP 可逆向释放到局部组织中[2]。在炎症早期，SP 对单核细胞和巨噬细胞具有趋化作用，内源性 SP 和 NKR-1 可以通过 TNF-α 机制，促进粒细胞的聚集和白细胞向炎性组织内浸润[4]。在创伤愈合中晚期，周围神经末梢释放的 SP 可以通过增加局部表皮生长因子及其受体的基因表达，加快创面愈合速度[5]。

表 2 死后各组 SP 阳性细胞表达百分率($\bar{x}\pm s$)%

| 死后时间 | -20℃ | 4℃ | 30℃ |
|---|---|---|---|
| 12 h | 47.37 ± 2.42 | 47.46 ± 1.96 | 47.19 ± 4.63 |
| 1 d | 47.83 ± 1.49 | 46.83 ± 4.19 | 45.16 ± 3.78 |
| 2 d | 46.67 ± 3.14 | 47.13 ± 2.34 | 43.75 ± 2.77 |
| 3 d | 47.06 ± 3.35 | 46.89 ± 2.08 | 40.63 ± 3.57 |
| 4 d | 46.67 ± 3.97 | 46.37 ± 3.15 | - |
| 5 d | 45.83 ± 1.53 | 45.73 ± 2.38 | - |
| 6 d | 46.15 ± 2.61 | 45.57 ± 3.79 | - |
| 7 d | 45.61 ± 1.78 | 45.16 ± 2.43 | - |

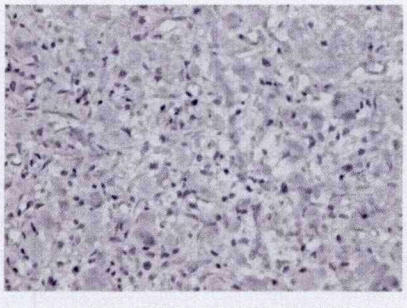


图 2 生前造创组 4 d PBS 阴性对照，未见非特异性着色(SABC × 200)



图 3 生前造创组 4 d SP 在皮肤损伤区内的表达(SABC × 400)

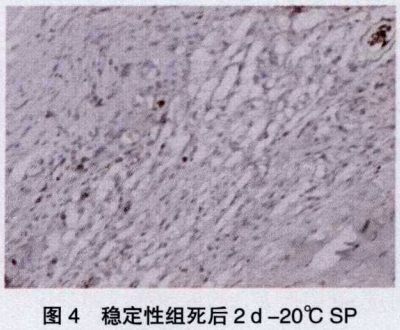


图 4 稳定性组死后 2 d -20℃ SP 的表达(SABC × 400)

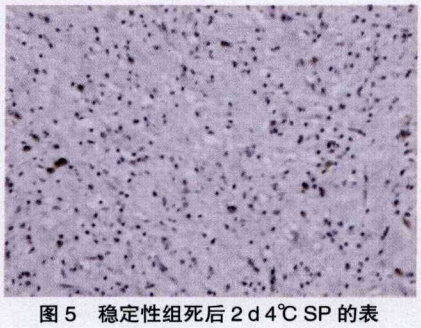


图 5 稳定性组死后 2 d 4℃ SP 的表达(SABC × 400)



图 6 稳定性组死后 2 d 30℃ SP 的表达(SABC × 400)

本研究利用免疫组化方法检测 SP 在大鼠皮肤创伤愈合过程中的动态变化中发现，在正常对照组及死后伤组 SP 仅在表皮细胞及毛囊，皮脂腺，汗腺上皮细胞，血管内皮细胞中呈弱阳性表达。感觉神经末梢于创伤即刻释放 SP 到创伤周围组织[6]，但本实验创伤即刻组未观察到 SP 阳性细胞的明显表达，与正常对照组相比较无差异。我们认为 SP 感觉神经末梢释放 SP 到细胞间质中，需与表达 NKR mRNA 的细胞表面受体结合而进入细胞内发挥其生物学活性，因此可以观察到细胞间质有 SP 阳性信号，而 SP 阳性细胞则延迟出现。伤后 0.5 h 以后在创缘组织内 SP 开始呈阳性表达，中性粒细胞是首先到达创伤部位的炎症细胞，发挥抗感染作用，并通过分泌细胞因子参与对修复细胞的调控[7]。这些提示创伤早期 SP 阳性表达部分来源于中性粒细胞。Simeonidis 等[8]研究发现单核巨噬细胞可以表达 SP 及其受体，并通过自分泌的形式调节生物学功能，并在 IL-1β 的作用下，增加 NKR-1 在基因和蛋白水平的表达。在本实验中我们发现伤后 12 h 单核巨噬细胞开始游出浸润，而 SP 阳性细胞也显著增多，结果与 Simeonidis 的研究结果基本相符，说明单核巨噬细胞在 SP 的作用下参与创伤中晚期的炎症反应。在伤后 4 d SP 表达达到高峰，之后炎细胞逐渐消失，在 6~8 d SP 仍维持在较高水平上，说明在创伤晚期 SP 阳性细胞主要来自成纤维细胞，对创伤愈合发挥重要作用，并对后期的瘢痕修复阶段仍起着重要作用。陈静[9]等研究也发现 SP 可以促进肉芽组织成纤维细胞(Granulation tissue fibroblast，GTF)增殖，且创面 SP 的含量与创面损伤程度及愈合能力关系密切。本实验通过对生前创伤组各时间点皮肤 SP 表达的阳性细胞进行统计学分析，发现其表达变化有一定的时间规律，在损伤后即开始表达，并逐渐上升，至 4 d 时表达最强($P<0.05$)，其后缓慢下降，并维持在较高水平，至 8 d 时仍可见阳性表达。

SP 死后稳定性研究结果显示，在 30℃环境中，SP 的表达在各时间点与死后即刻比较及各时间点与相邻组间比较差异不显著($P>0.05$)，至 3 d 时仍呈阳性表达。分析其原因可能是 SP 为小分子多肽，主要由中性内肽酶降解，由于在较高温度环境中内肽酶受组织自溶及溶酶体酶的影响降解加速，导致 SP 降解减慢所致。4℃、-20℃环境中，12 h~7 d 各时间点 SP 阳性表达强度与死后即刻比较、各时间点与相邻组间比较均无显著性差异($P>0.05$)，在低温环境下内肽酶活性受抑制，对 SP 的降解作用减弱，以致死后在低温环境下 7 d 仍可检出 SP。结果表明 SP 表达受环境温度影响不大，有较好的稳定性。

本实验结果表明 SP 参与了创伤愈合的全过程，其表达强度在创伤愈合的不同阶段呈规律性变化，值得指出的是其在死后机体内比较稳定，对于法医病理学皮肤损伤时间的推断有重要意义。由于人和动物之间存在种属差异性，SP 的表达是否因种属的不同而有差异尚需进一步研究讨论，同时在法医学实践中机体死后受多种环境因素的共同影响，SP 在死后机体内稳定性的影响因素有待进一步研究探讨。

## 参 考 文 献

[1] Altun V, Hakvoor T E, van Zuijlen P P M, et al.Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars A 7-month follow-up study of 22 patients[J].Burns, 2001, 27(2001): 717-722.

[2] Kawana S, Liang Z, Nagano M, et al.Role of substance P in Stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice[J].Dermatol Sci, 2006, 42(1): 47-54.

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

[4] Costa S K, Yshii L M, Poston R N, et al.Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF-a in the cutaneous microvasculature [J].Neuroimmunol, 2006, 171(1): 99-109.

[5] Lai X N, Wang Z G, Wei L, et al.Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing[J].Chin J Traumatol, 2002, 5(3): 176-179.

[6] Gillitzer R, Goebeler M.Chemokines in cutaneous wound healing[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2001, 69(4): 513-521.

[7] 郭相杰，高彩荣.过敏性猝死法医学诊断的研究现状[J].山西医科大学学报，2006，37(6)：661-663.

[8] Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A, et al. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-κB site on its promoter[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(5): 2957-2962.

[9] 陈 静，王甲汉，庄洪兴，等.神经肽 P 物质与烫伤创面愈合关系的实验研究[J].中华烧伤杂志，2005，21(2)：119-121.

(责任编辑：关蕴良)