DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.003
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1704 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1704-04

创伤愈合过程中伤口组织内SP、NO和NOS表达变化及其可能作用

魏 立,赖西南,王正国,王丽丽,吴国萍,陈 菁 (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)

提 要:目的 探讨创伤愈合过程中周围神经末梢分泌的P一物质(SP)与一氧化氮(NO)及一氧化氮合成酶(NOS)在创伤愈合过程中的作用及其相互间可能的关系。方法 采用鼠背部皮肤全层切割伤模型,动物分为实验组和人工去感觉神经(对照)组,其中实验组分别于伤后1、3、6、9、12 d切取伤口组织,应用免疫组化测定SP的表达并测定伤口组织中NO及NOS含量。对照组则利用大剂量辣椒素皮下注射人工毁损感觉神经以阻止SP的分泌后以同样的方法进行实验。结果 实验组伤口愈合情况明显好于对照组。实验组伤后第1天时,SP表达在伤缘皮肤毛囊及皮脂腺细胞。伤后第3天时肉芽组织中SP有明显的表达,以后逐渐降低;伤口组织中NO及NOS含量于伤后第1天从较低水平逐渐升高,至第6天时达最高,然后明显降低。对照组伤口组织中SP、NO/NOS含量于伤后始终处于较低的水平。结论 创伤愈合中,SP及NO/NOS在创伤愈合过程中能促进伤口的愈合,且SP可能部分地通过刺激NO/NOS的活性而产生作用。

关键词:创伤;伤口愈合;神经肽;P一物质;一氧化氮;一氧化氮合成酶
中图法分类号:R34;R394.2;R640.2 文献标识码:A

Expressions of SP and NO/NOS during wound healing and their possible roles

WEI Li, LAI Xi一nan, WANG Zheng一guo, WANG Li一li, WU Guo一ping, CHEN Jing (Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the roles of substance P secreted from periphery nerve endings and nitric oxide (NO)/nitric oxide synthase (NOS) during wound healing and their possible relationship. Methods A total of 50 Wistar rats were randomly divided into 2 groups: the experiment group and the control group. In the experiment group, a whole depth skin on the back of the rats was cut off to make a wound, and the tissues of wound edge and granulation tissues were taken at 1, 3, 6, 9, and 12 d after injury, respectively. In the control group, capsaicin was injected subcutaneously into the skin on the back of the rats to destroy the sensory nerve to prevent the secretion of SP, and then the same method as used in the experiment group was employed. The expression of SP in the granulation tissues was detected by immunohistochemistry. NO and NOS were also detected. Results The wound of rats in the experiment group was healed more rapidly than that in the control group. In the experiment group, immunohistochemical staining of SP was located on the hair follicles and sebaceous glands at 1 d, but the staining of SP was obvious at 3 d in the granulation tissues, and then decreased gradually; NO/NOS levels increased from a relatively low level from 1 d after injury and reached the peak at 6 d, and then decreased obviously. In the control group, however, immunohistochemical staining of SP was faint without obvious change, and NO/NOS levels showed the same tendency during the wound healing process. Conclusion During wound healing, SP and NO/NOS may promote the healingprocess, and the role of SP may be attained partly by stimulation of the production of NO/NOS.

Key words: trauma; wound healing; neuropeptide ; substance P; nitric oxide; nitric oxide synthase

人们已经发现感觉神经末梢分泌的感觉神经肽P物质(substance P, SP)与伤口的愈合有密切的关系,同时也发现一氧化氮(NO)及一氧化氮合成酶(NOS)也参与了伤口愈合的过程。本实验观察了鼠皮肤全层切割伤伤口组织SP、NO含量以及NOS活性的变化,并预先局部注射大剂量辣椒素(capsaicin)以人工毁损感觉神经,从而阻断SP的分泌后再进行相同的实验,以探讨SP与NO/NOS在创伤愈合过程中的作用及它们之间可

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054204)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China(G1999054204)

作者简介:魏 立(1973一),男,四川省眉山县人,硕士,主治医师,主要从事创伤愈合方面的研究。现在成都军医学院第47医院外二科,成都 610500。电话:(028)83016951

收稿日期:2003一06一27;修回日期:2004一04一05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

能存在的关系。

1　材料和方法

1.1　动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠 50 只，体质量 250～300 g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。所有动物于实验前 2 d 以 10 g/L 的 Na_2S 行背部脱毛，随机分为实验组和辣椒素注射（对照）组，每组各 25 只动物。每组又分为伤后 1、3、6、9、12 d 共 5 个时相点，每个时相点各 5 只动物。脱毛 2 d 后实验组动物直接在背部脱毛区作皮肤全层切口，取除约 1 cm × 1 cm 之皮肤块。对照组则于脱毛 2 d 后于背部脱毛区域注射辣椒素（capsaicin）（Sigma，溶剂为乙醚：Tween80：等渗盐水 = 1∶1∶8的比例配制而成，辣椒素浓度为 10 mg/ml）溶液，注射剂量为 50 mg/kg，每天 1 次，连续 3 d。7 d 后按照与实验组相同的方法进行致伤。伤口均以庆大霉素纱条覆盖，无菌敷料包扎。动物均单笼喂养，自由进食、水。

1.2　灌注及取材

动物麻醉后开胸暴露心脏，直视下插管至升主动脉。先用冷等渗盐水约 150 ml 快速灌洗，再按先快后慢的原则灌注 40 g/L的多聚甲醛约 200 ml，全程灌注时间约 1 h。伤后第 1 天切取伤缘皮肤，伤后 3～9 d 则取伤口中的肉芽组织，固定于与上述相同的多聚甲醛溶液中 2 h，然后置于 20 g/L 蔗糖溶液中，4 ℃冰箱中过夜。取出后于恒冷（－20 ℃）切片机上行冰冻切片。用于检测 NO 和 NOS 的组织标本的取材部位同前，但实验鼠不灌注固定，切取的组织标本保存于液氮中待测。

1.3　免疫组化

SP 抗体及免疫组化 SABC 试剂盒购自武汉博士德公司。免疫组化染色按使用说明书进行。对照实验采用 PBS 替代一抗，其余步骤相同。阳性着色为棕黄色颗粒。

1.4　NO 及 NOS 活性测定

NO 和 NOS 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。实验方法及结果计算均按试剂盒内说明书进行，组织匀浆蛋白测定采用 Folin-酚法。

1.5　图像分析

采用 MIG2000 综合图像分析系统对切片进行图像分析，所有切片均在同一放大倍数（×400）、同一光强度下分析。每个指标 5 张切片，各测相同面积。测量指标为平均吸光度（A）。

1.6　统计学方法

计量资料以数据 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS10.0 统计软件进行组间比较。

2　结果

2.1　伤口愈合情况

实验组愈合情况良好，肉芽明显，色泽鲜艳，到伤后第 9 天时伤口已明显收缩，到伤后第 12 天时伤口已基本愈合。而对照组则伤口愈合明显延迟，肉芽生长不良，可见较多量黄白色组织充填其中，与实验组相比，伤后第 9 天时伤口收缩不明显，到伤后第 12 天时伤口收缩仍较差。见表 1。

表 1　伤后不同时间伤口面积（mm^2，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Area of the wound after injury at different time points（mm^2，$\bar{x} \pm s$）

Group	Time after injury(d)					
	0	1	3	6	9	12
Experiment	123.51±8.32	120.65±7.78	96.31±7.44*	70.66±7.26*	53.02±6.78*	34.57±5.90*
Control	125.22±6.73	119.30±7.85	111.70±5.88	92.28±4.92	78.35±4.17	69.38±6.93

*：$P < 0.01$，*vs* control

2.2　SP 免疫组化

伤后第 1 天时 SP 免疫组化阳性着色主要存在于伤缘皮肤毛囊以及皮脂腺细胞，伤后第 3 天及以后，肉芽组织中着色在成纤维细胞和毛细血管壁，见图 1、2。实验组与对照组相比，各时相点表达量的差异有显著性意义。见表 2。

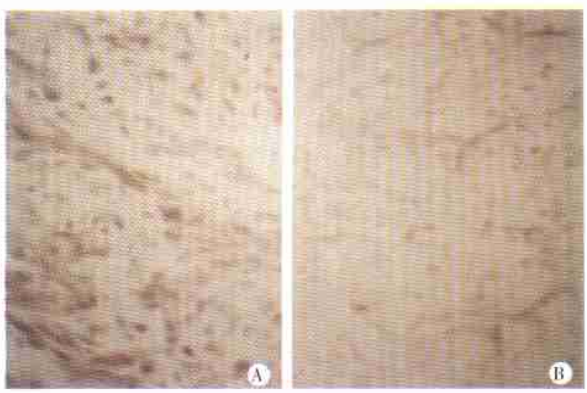


图 1　伤后第 3 天，实验组肉芽组织中成纤维细胞 SP 明显阳性着色（A），对照组着色程度明显降低（B）（SABC × 400）

Fig 1　IHC staining of SP of the fibroblast of the granulation tissues in the experiment group (A) was stronger than that of the control group at 3 d after injury(B)　(SABC × 400)

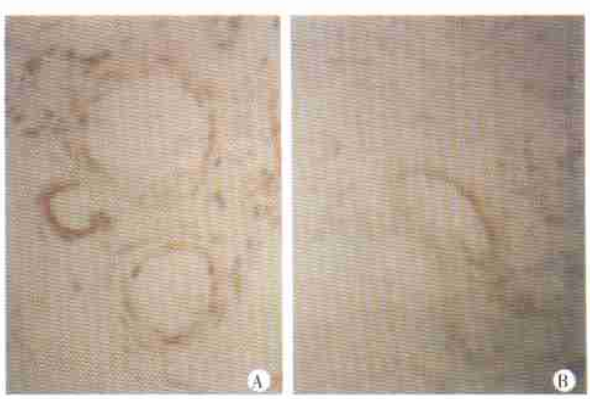


图 2　伤后第 12 天，实验组肉芽组织成纤维细胞仅有微弱的 SP 阳性着色（A），对照组仅在毛细血管壁有较弱的阳性着色（B）（SABC × 400）

Fig 2　At 12 d after injury, only faint IHC staining of SP of the fibroblast of the granulation tissues in the experiment group (A), while in the control group the IHC staining appeared only on the wall of the capillary (B)　(SABC × 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 SP免疫组化图像分析结果($A, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of immunochemical staining of SP (A, $\bar{x} \pm s$)

Method	Group	Number	Time after injury(d)				
			1	3	6	9	12
Immunohistochemistry	Experiment	25	0.364±0.030**	0.479±0.047**	0.372±0.040**	0.361±0.044*	0.259±0.022
	Control	25	0.239±0.016	0.255±0.013	0.251±0.026	0.234±0.023	0.228±0.034

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

2.3 NO含量及NOS活性的变化

伤后第1天时,伤缘皮肤组织NO含量为(42.29±9.01)μmol/g。伤后第3天肉芽组织中NO含量为(50.68±9.87)μmol/g,随后明显升高,伤后第6天时明显高于伤后第3天。伤后第9天时其含量降低,伤后第12天时进一步下降至约为伤后第3天时的水平。而对照组伤后肉芽组织NO的含量均明显低于实验组,在各时相点均只有实验组相应时相点的一半左右。NOS活性在伤后组织中的变化趋势与NO的变化趋势相似。实验组伤后第6天时其活性水平最高,伤后肉芽组织中NOS活性明显高于对照组相应时相。见表3、4。

表3 伤后组织中NO含量(μmol/g, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 NO content in the wound tissues after injury(μmol/g, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after injury(d)				
	1	3	6	9	12
Experiment	42.29±9.01*	50.68±9.87*	88.44±6.82*	62.28±8.82*	49.88±6.00*
Control	24.74±5.79	33.58±4.26	39.96±8.42	27.76±4.92	26.99±8.49

*: $P<0.01$, *vs* control

表4 伤后组织中NOS活性(U/mg, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 NOS activity in the wound tissues after injury(U/mg, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after injury(d)				
	1	3	6	9	12
Experiment	4.07±0.10**	4.35±0.87**	7.18±1.64*	5.47±0.59*	5.00±0.28*
Control	2.66±0.76	2.85±1.23	3.01±0.98	2.54±1.06	1.85±0.73

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$, *vs* control

3 讨论

SP是广泛分布于中枢和周围神经系统,具有多种生物活性的小分子多肽。它主要在脊髓背根神经节合成,且多存在于Aδ类痛觉和无髓鞘的C型纤维,向上移行至脊髓后角,向下移行至感觉神经的神经末梢。在受到伤害刺激时,SP主要作为疼痛递质向上传递至中枢神经系统,并且逆向在损伤组织局部释放,启动神经源性炎性反应。已往有实验表明SP可直接促进内皮细胞、成纤维细胞的DNA合成和细胞增殖[1,2],并能促进新生血管的形成[3,4]。

NO是一种气体性信息分子,其生成受NOS控制。在创伤愈合过程中NO通过扩张血管、促进血管新生、促进细胞增殖和胶原合成,发挥促愈合的调控作用。许多实验显示组织中高含量的NO可以改善糖尿病溃疡、骨折的愈合质量和速度[5,6]。以药物抑制NO的产生或敲除NOS基因,可能导致伤口组织中的多种生长因子的产生减少[7],引起伤口愈合的障碍。

本实验表明伤后3 d在肉芽组织中毛细血管壁及成纤维细胞有大量的SP阳性着色,在伤后6、9 d时稳定于稍低的水平,伤后第12天伤口基本愈合的时候又出现明显的下降。愈合组织NO含量及NOS活性升高滞后于SP峰值。预注射辣椒素后SP的免疫阳性染色减弱,同时NO及NOS的产生也表现出了明显的抑制,并伴有伤口愈合质量的下降。据此,我们推断伤后NO及NOS的升高可能至少部分地与SP等神经肽的激发有关,进而参与伤口愈合的过程。

有实验表明SP在伤口愈合的各个阶段均有明显作用,而NO可能只在愈合后期有一定的作用,两者之间并无明确的关系[8]。但也有一些实验表明在创伤愈合的过程中SP和NO可能存在相互的作用。首先,有研究表明,在神经系统中NO与SP关系密切[9-11]。并且SP引起的血管渗透性增加,可能是继发的NO生成增加的结果[11],而应用NOS抑制剂L-NAME可以明显降低SP引起的血管扩张和蛋白渗出,并且这种抑制作用是非剂量依赖性的。这说明SP在创伤愈合过程中的作用可能至少部分地是通过NO来实现的[12]。同时,NO通过环氧化酶2途径可以引起痛觉神经SP的释放[13],提示在伤口愈合过程中NO还可能通过反馈作用的方式来增强SP的作用。

此外,由于NO可能与多种生长因子的产生有关,而且我们前期的实验表明SP也可能与生长因子的表达有关[14]。因此,SP在创伤愈合中的作用是否部分地通过NO刺激多种生长因子的表达来实现是一个有趣的问题,值得进行深入的研究。

参考文献:

[1] Nillson J, Von Euler A M, Dalsgaard C J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K[J]. Nature, 1985, 315(6014): 61-63.

[2] Harrison N K, Dawes K E, Kwon O J, *et al*. Effects of neuropeptides on human lung fibroblast proliferation and chemotaxis[J]. Am J Physiol, 1995, 268(2 pt 1): L278-L283.

[3] Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, *et al*. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells[J]. Micro-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

vasc Res, 1990, 40(2): 264 – 278.

[4] Walsh D A, Ho D E, Mapp P I, *et al*. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma[J]. Histochem J, 1996, 28(11): 759 – 769.

[5] Witte M B, Kiyama T, Barbul A. Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes[J]. Br J Surg, 2002, 89(12): 1594 – 1601.

[6] Baldik Y, Talu U, Altinel L, *et al*. Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rats[J]. Clin Orthop, 2002, (404): 343 – 352.

[7] Most D, Efron DT, Shi H P, *et al*. Characterization of incisional wound healing in inducible nitric oxide synthase knockout mice[J]. Surgery, 2002, 132(5): 866 – 876.

[8] Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F. Substance P and nitric oxide mediate would healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation[J]. Neurosci Lett, 1995, 200(1): 17 – 20.

[9] Kopp U C, Cicha M Z, Smith L A, *et al*. Nitric oxide modulates renal sensory nerve fibers by mechanisms related to substance P receptor activation[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 281(1): R279 – 290.

[10] Aimar P, Pasti L, Carmignoto G, *et al*. Nitric oxide-producing islet cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa[J]. J Neurosci, 1998, 18(24): 10375 – 10388.

[11] 魏 立, 赖西南, 王正国, 等. 创伤愈合中周围神经末梢分泌的 P 物质与表皮生长因子及其受体表达的关系[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(8): 488 – 491.

[12] Klede M, Clough G, Lischetzki G, *et al*. The effect of the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine-methyl ester on neuropeptide-induced vasodilation and protein extravasation in human skin[J]. J Vasc Res, 2003, 40(2): 105 – 114.

[13] Morioka N, Inoue A, Hanada T, *et al*. Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 beta-induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms[J]. Neuropharmacology, 2002, 43(5): 868 – 876.

[14] Suzuki T, Wada S, Tomizawa N, *et al*. A possible role of nitric oxide formation in the vasodilatation of rabbit ear artery induced by a topically applied Capsaicin analogue[J]. J Vet Med Sci, 1998, 60(6): 691 – 697.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)19-1707-01

22 例腰椎间盘突出症术后早期并发症分析

Analysis of the postoperative complications after lumber vertebral protrusion surgery: a report of 22 cases

张 东, 王群波, 李 智 (四川省达州市中心医院骨科, 达州 635000)

1 临床资料

1994 年 5 月至 2004 年 3 月, 我院共行 950 例腰椎间盘突出症手术治疗, 其中男性 401 例, 女性 549 例, 年龄 21 ~ 65 岁, 平均 48 岁, 其中腰 4,5 椎间盘突出症 462 例, 腰 5 骶 1 椎间盘突出症 425 例, 腰 4,5 腰 5 骶 1 均突出者 63 例, 男女比例无显著差异, 多发于 40 岁以上。在入院治疗的 950 例病人中, 术后未能正常出院及出院 3 个月内再次入院治疗的患者共 22 例, 其中术后腰痛。腿痛不缓解或加剧者共 12 例, 术后双下肢出现感觉障碍、肌力下降、腹股沟平面以下不全瘫共 3 例, 术后出现切口部包块和脑膜刺激征 1 例, 术后切口窦道形成 2 例, 术后大小便障碍、会阴麻木 4 例。

2 讨论

椎间盘突出术后腰痛、腿痛不缓解或加剧的原因有以下几方面: ①椎间盘感染, 多发于术后 7 ~ 20 d, 突然出现, 有时伴有下肢痉挛, 疼痛剧烈, 不能翻身活动。有资料报道腰椎间盘摘除术后感染率为 0.8%, 我院统计为 0.4%。②椎间盘突出复发, 多与早期下床活动或早期干重体力活有关。发病有明显的诱因, 起病急, 症状多与术前相似, 本组 5 例中有 4 例为术后 1 周内自行出院并马上参加体力劳动而致, 经 CT 证实后行再次手术摘除突出的椎间盘而治愈。③神经根管狭窄, 由于术中只行椎间盘切除而未扩大狭窄的侧隐窝及神经根管, 以及术中摘除椎间盘不完整, 部分椎间盘及切除椎板时掉下的碎骨块残留在神经根管内, 导致神经根受压, 本组 3 例经过再次手术探查后症状消失。

术后出现腹股沟平面以下截瘫, 本组中 3 例患者在术后即出现双足下垂, 足趾肌力 0 级, 双侧腹股沟平面以下感觉缺失, 双侧大腿及小腿肌力 1 级, 小便不能自解, 手术采用麻醉方式均为胸 12 腰 1 棘突间隙硬膜外腔麻醉。根据术后感觉、运动平面分析, 考虑为麻醉穿刺损伤所致。在诊断明确后立即给予恢复神经类药物治疗, 并被动活动双下肢, 配合针灸、理疗, 3 例患者双下肢肌力恢复到 IV 级, 痛觉恢复, 小便可自解, 但其中 1 例足下垂未恢复。

术后椎管内感染, 出现脑膜刺激征: 腰椎间盘手术中常出现硬脊膜破裂, 及时修补并不影响术后恢复。部分患者可能因破口小, 术中未发现, 或因破口偏前方而修补困难, 当时未修补, 术后出现脑脊液漏, 在切口局部形成约胡桃大小包块。本组 1 例出现头痛、高热、谵语、昏迷、项强直等脑膜刺激征, 经穿

(下转 1713 页)

作者简介: 张 东(1968 –), 男, 四川省巴中市人, 主治医师, 主要从事临床骨科方面的研究。电话: (0818)2390789

收稿日期: 2004 – 07 – 12; 修回日期: 2004 – 09 – 21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net