DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.002

文章编号:1000-5404(2004)04-0283-04

论著

碱性成纤维细胞生长因子在P物质诱导肉芽组织成纤维细胞增殖中的作用

蒋 伟,王正国,赖西南,朱金明,朱佩芳 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨感觉神经肽P物质(substance P, SP)对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达的调控作用及其在SP促离体培养的肉芽组织成纤维细胞增殖中的作用。方法 采用MTT法测定SP对原代培养的肉芽组织成纤维细胞的促增殖作用;采用RT-PCR和Western blotting方法检测SP对成纤维细胞bFGF基因和蛋白表达的调控作用,观察时间及剂量-效应关系。结果 10^{-9}~10^{-5}mol/L的SP在体外对原代培养的肉芽组织成纤维细胞均具有明显的促增殖作用($P<0.01$),且具有明显的剂量依赖性($r=0.594$, $P<0.01$),bFGF抗体只能部分抑制这一作用(与对照组比较,$P<0.01$;与10^{-7}mol/L SP组比较,$P<0.05$)。10^{-7}mol/L SP可诱导成纤维细胞bFGF mRNA的表达,在作用后3,6 h与对照组相比,差异有非常显著性意义($P<0.01$);12 h后可检测到bFGF蛋白明显表达增强($P<0.01$),24 h达高峰,48 h后逐渐有所回落。SP在10^{-9}~10^{-5}mol/L范围内可显著促进成纤维细胞bFGF mRNA表达,在10^{-8}~10^{-5}mol/L范围可诱导bFGF蛋白的表达,均在10^{-7} mol/L剂量点达到峰值($P<0.01$)。结论 SP对肉芽组织成纤维细胞具有明显的促增殖作用,这种作用与其诱导内源性bFGF表达有关。

关键词:P物质;成纤维细胞生长因子;碱性;基因表达;创伤愈合;成纤维细胞
中图法分类号:R329.28;R341.43;R977.6 文献标识码:A

Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation of granulation tissue fibroblasts induced by substance P

JIANG Wei, WANG Zheng-guo, LAI Xi-nan, ZHU Jin-ming, ZHU Pei-fang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the regulatory effect of sensory neuropeptide substance P (SP) on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and the proliferation-promoting effect of bFGF on the *in vitro* cultured granulation tissue fibroblasts induced by SP. **Methods** The proliferation-promoting effect of SP on the cultured granulation tissue fibroblasts was observed by MTT. The regulatory effect of SP on the expression of fibroblast bFGF was determined by RT-PCR and Western blotting. The time- and dose-effect relations were also observed. **Results** SP had obvious proliferation-promoting effect on the primary cultured granulation tissue fibroblasts *in vitro* in a remarkable dose-dependent manner ($r=0.594$, $P<0.01$). However, bFGF antibody could partly exert its inhibitory effect. The expression of bFGF mRNA was more significant at 3 and 6 h after induction of SP at 10^{-7} mol/L, as compared with that of the control group ($P<0.01$). The expression of bFGF protein was markedly higher than that of the control group at 12 h, reached the peak at 24 h, and declined gradually at 48 h. SP at the concentrations of 10^{-9}—10^{-5} mol/L could significantly promote the expression of bFGF mRNA and that at 10^{-8}—10^{-5} mol/L could induce the expression of bFGF protein. Both the expression levels of bFGF mRNA and bFGF protein reached the peak when the concentration of SP was at 10^{-7} mol/L ($P<0.01$). **Conclusion** SP has a significant proliferation-promoting effect on the granulation tissue fibroblasts, which is correlated with bFGF mRNA expression of fibroblasts induced by SP.

Key words: substance P; fibroblast growth factor; basic; gene expression; wound healing; fibroblast

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G19990542O4)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects)(G19990542O4)
作者简介:蒋 伟(1969—),男,湖北省安陆市人,博士,助理研究员,主要从事创伤修复方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757458, E-mail:jtrauma@163.com
收稿日期:2003-06-23;修回日期:2003-12-15
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

很早以前，人们就发现周围神经损伤可导致伤口愈合延迟或不愈合，而使用神经肽P物质(substance P,SP)处理鼠皮肤伤口，可显著加快其愈合过程[1]。这些研究成果提示，外周神经可通过释放感觉神经肽，如SP等，参与伤口愈合的调控。而在创伤愈合过程中，由修复细胞自分泌和旁分泌的生长因子是创伤愈合的重要调控因素。但目前关于外周神经与伤口局部组织的相互作用的精细的调控过程和机制以及外周神经释放的感觉神经肽与伤口愈合细胞因子网络调控之间的关系尚不十分清楚，这二者之间是否存在某种联系呢？本课题组前期的研究表明，在大鼠皮肤全层切割伤模型中，局部组织中SP对成纤维细胞和内皮细胞碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达可能具有重要的调控作用，可能是SP调控伤口愈合的重要机制。鉴于在体实验中，影响细胞因子表达的因素很多，本研究采用体外原代肉芽组织成纤维细胞培养，探讨SP对成纤维细胞的促增殖作用及对bFGF表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞培养

健康雄性Wistar大鼠，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。参照朱旭东等[2]的方法稍作改进进行肉芽组织成纤维细胞原代培养。实验采用3～5代细胞。

1.2 SP促细胞增殖作用

采用MTT法检测。试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司，按说明书操作。在96孔培养板上接种3～5代成纤维细胞，5 000/孔，设无细胞对照组、正常对照组、SP 10^{-5}～10^{-9} mol/L组及SP 10^{-7}mol/L＋bFGF-Ab(10 μg/ml)组。每组设5个复孔，待细胞贴壁后加入SP，bFGF-Ab(购自美国Santa Cruz公司)提前30 min加入。采用全自动连续波长酶标仪(Bio-Rad，美国)比色，以吸光度值(A)表示细胞数量。

1.3 RT-PCR法检测bFGF mRNA的表达

1.3.1 总RNA提取与定量 将原代成纤维细胞接种于24孔培养板上，细胞贴壁后用含体积分数0.5% FCS的DMEM饥饿12 h，再经SP作用(分别选用 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L共5个剂量点和0、3、6、12、24 h共5个时间点)后，收集细胞提取细胞总RNA，用DV-640紫外分光光度计定量后分装，－70 ℃保存。

1.3.2 逆转录 逆转录试剂盒购自上海生工，按说明书操作。

1.3.3 PCR 引物由上海生工合成。β-actin上游5′-ATC ATG TTT GAG ACC TTC A-3′，下游5′-CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3′(318 bp)；bFGF上游5′-GCA GCA TCA CTT CGC TTC C-3′，下游5′-TGG AAG AAA CAG TAT GGC CTT CTG-3′(437 bp)。反应条件为：94 ℃预变性3 min，94 ℃ 45 s，60 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min 30个循环后，72 ℃延伸10 min。

1.3.4 PCR产物检测 采用1%琼脂糖电泳溴乙锭染色法，采用MIG凝胶分析系统检测。PCR特异条带以相对吸光度×面积表示，以各组的校正吸光度与其β-actin校正吸光度的比值表示(V值)。

1.4 Western blot法检测bFGF蛋白的表达

1.4.1 细胞浆蛋白的提取与定量 细胞用含0.5% FCS的DMEM饥饿12 h，再经SP作用(分别选用 10^{-9}、10^{-8}、10^{-6}、10^{-5} mol/L共5个剂量点和0、6、12、24、48 h共5个时间点)后，收集细胞，采用超声破碎法，提取细胞蛋白，采用考马斯亮蓝法定量后分装。－70 ℃保存。

1.4.2 电泳、转印、杂交及化学发光检测 按常规方法进行检测。每组实验重复4次。

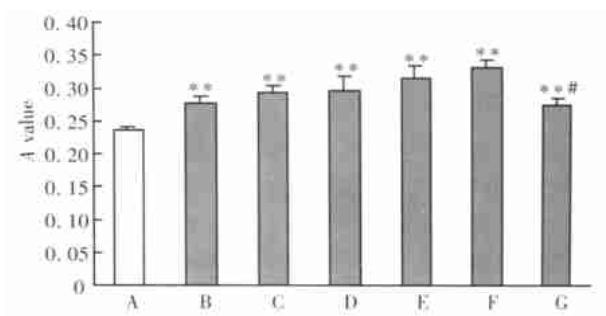
1.5 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用SPSS 10.0统计程序包，行单因素方差分析-均数间差别多重比较的LSD(least significant difference)检验及相关分析。

2 结果

2.1 SP对肉芽组织成纤维细胞的促增殖作用

SP可以剂量依赖性的方式促进肉芽组织成纤维细胞的增殖(r=0.594，P<0.01)，使用bFGF抗体可减弱这一作用(与SP 10^{-7} mol/L组比较，P<0.05)，但不能完全抑制SP的促细胞增殖作用(与对照组比较，P<0.01)，提示SP自身具有直接的促成纤维细胞增殖的作用，同时，还可通过诱导内源性bFGF的表达来促进细胞增殖(图1)。



A: Control group; B: SP at 10^{-9} mol/L group; C: SP at 10^{-8} mol/L group; D: SP at 10^{-7} mol/L group; E: SP at 10^{-6} mol/L group; F: SP at 10^{-5} mol/L group; G: SP at 10^{-7} mol/L ＋ bFGF-Ab 10 μg/ml group; **: P<0.01 vs A; #: P<0.05 vs D

图1 SP对肉芽组织成纤维细胞的促增殖作用及bFGF抗体的影响

Fig 1 Proliferation-promoting effect of SP on granulation tissue fibroblasts and bFGF antibody

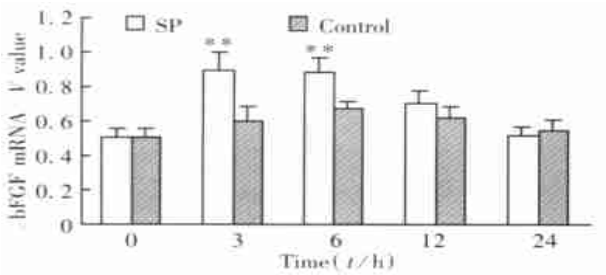
2.2 RT-PCR检测bFGF mRNA的时间-效应关系

应用 10^{-7}mol/L SP刺激成纤维细胞后，其促bFGF mRNA表达的效能与对照组相比，在SP作用3、6 h差异有非常显著性意义(P<0.01)，作用12 h后与对照组差异无显著性意义(图2)。

2.3 RT-PCR检测bFGF mRNA的剂量-效应关系

分别使用 10^{-9}～10^{-5} mol/L SP作用于成纤维细胞3 h后，SP在 10^{-9}～10^{-5} mol/L内均可以显著促进成纤维细胞bFGF mRNA表达，在 10^{-7} mol/L达到峰值，当浓度＞ 10^{-7} mol/L时，其促bFGF mRNA表达的效应强度有所降低(图3)。

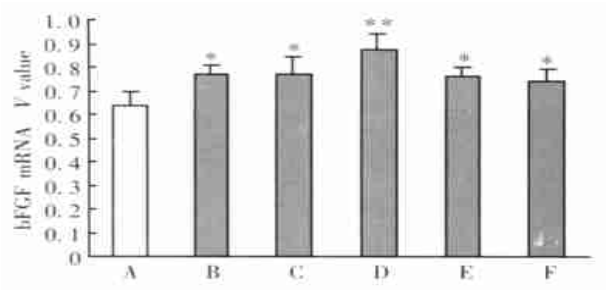
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



**: $P<0.01$, *vs* control group at the same time point

图 2　SP 对 bFGF mRNA 表达的时间-效应关系

Fig 2　Time-effect relationship of SP with bFGF mRNA expression



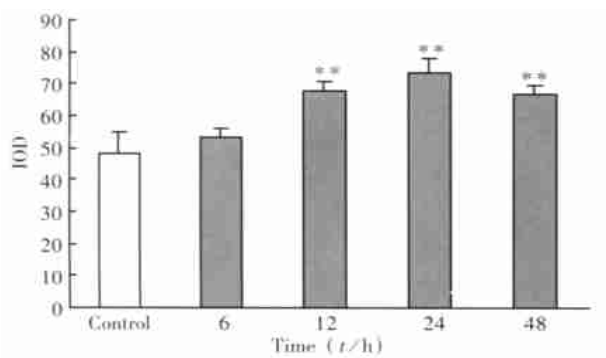
A: Control group; B: SP at 10^{-9} mol/L group; C: SP at 10^{-8} mol/L group; D: SP at 10^{-7}mol/L group; E: SP at 10^{-6}mol/L group; F: SP at 10^{-5} mol/L group. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* A

图 3　SP 对 bFGF mRNA 表达的剂量-效应关系

Fig 3　Dose-effect relationship of SP with bFGF mRNA expression

2.4　SP 对肉芽组织成纤维细胞 bFGF 蛋白表达调控的时间-效应关系

使用 10^{-7}mol/L SP 作用培养的肉芽组织成纤维细胞 12 h 后, 可检测到明显的 bFGF 蛋白表达($P<0.01$), 表达高峰出现在作用后 24, 48 h 有所回落, 但仍非常显著地高于对照组($P<0.01$)(图 4)。



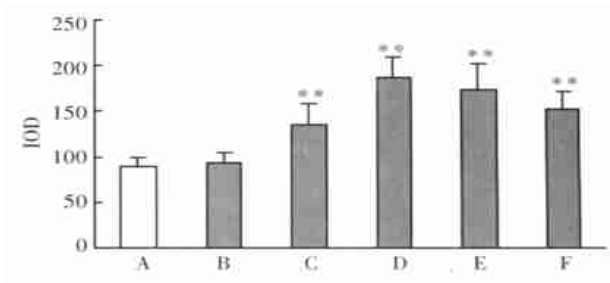
**: $P<0.01$, *vs* control group

图 4　SP 对 bFGF 蛋白表达调控的时间-效应关系

Fig 4　Time-effect relationship of SP with the regulation of bFGF protein expression

2.5　SP 对肉芽组织成纤维细胞 bFGF 蛋白表达调控的剂量-效应关系

分别使用 10^{-9}~10^{-5}mol/L 剂量的 SP, 作用培养的肉芽组织成纤维细胞 24 h 后, 在 10^{-8}~10^{-5} mol/L 剂量范围内 SP 均能非常显著地刺激 bFGF 蛋白表达, P 值均<0.01, 表达高峰出现在10^{-7}mol/L 剂量点(与 10^{-8}mol/L 组比较, $P<0.01$; 与 10^{-5} mol/L 组比较, $P<0.05$)。见图 5。



A: Control group; B: SP at 10^{-9} mol/L group; C: SP at 10^{-8} mol/L group; D: SP at 10^{-7}mol/L group; E: SP at 10^{-6}mol/L group; F: SP at 10^{-5} mol/L group. **: $P<0.01$, *vs* A

图 5　SP 对 bFGF 蛋白表达调控的剂量-效应关系

Fig 5　Dose-effect relationship of SP with the regulation of bFGF protein expression

3　讨论

创伤修复的现代概念认为, 创伤修复是由多种细胞、生长因子和细胞外基质相互作用的动态过程。在创伤愈合过程中, 由修复细胞自分泌和旁分泌的多种生长因子起着重要的调控作用。创伤愈合是以成纤维细胞增殖、迁移、肉芽组织形成、胶原分泌、创口胶原化瘢痕形成及改建为特点的过程, 成纤维细胞参与了创伤愈合的全过程, 在创伤愈合过程中起到重要作用。研究在创伤愈合过程中成纤维细胞的功能状态, 对于认识和促进创伤愈合具有重要意义。

由于神经肽在神经系统和损伤组织之间起着重要的桥接作用, 参与对修复细胞增殖、迁移、分化的调控[3], 而神经肽 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。在受到伤害性刺激时, SP 可逆向释放入损伤局部组织中, 启动神经源性炎症反应[4], 还可诱导肺成纤维细胞以及血管内皮细胞增殖[5,6]。因而, SP 被认为是周围神经参与局部伤口愈合的重要介导因子。bFGF 是成纤维细胞增殖的有丝分裂原, 还可促进成纤维细胞合成胶原蛋白, 并对其有趋化性刺激作用。本实验结果表明, SP 在体外对肉芽组织成纤维细胞具有显著的促增殖作用, 并表现出明显的剂量依赖特性且这种作用可部分地为 bFGF 抗体所阻断, 表明 SP 本身具有一定的促细胞增

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

殖作用,同时,诱导内源性bFGF的表达也是其促进细胞增殖的一个重要方面。但也有作者认为,SP是一种双向调节因子,没有直接的促细胞增殖作用,其本身对细胞而言是一种细胞增殖周期的感受态因子,其作用在于协助增进因子的促增殖作用[7]。由于bFGF也是细胞增殖的感受态因子,因此,SP对bFGF表达的调控作用在SP的促细胞增殖作用中起到何种作用尚需更加深入的研究。Zich等[6,8]的研究表明,SP在体外能诱导内皮细胞的增殖和迁移,在体内也可促进新生血管的形成。随后Marina等[9]证实这一作用是通过诱导内皮细胞分泌内源性bFGF实现的。

本研究结果提示外源性应用SP有助于提高伤口局部bFGF含量,从而加速伤口的愈合,但对剂量和时间的把握尚需更进一步的研究。同时,改善和调控创伤后神经功能状态,也将有助于促进伤口的愈合,这是一个新的研究思路和发展方向。

参考文献:

[1] Spevak S E, Shekhter A B, Hilse H, *et al*. Characteristics of the course of the wound process in spontaneously hypertensive rats and the effect of morphine, substance P and its fragments SP1-4[J]. Biull Eksp Biol Med, 1989, 107(6): 729-743.

[2] 朱旭东,张 艳,陈荣德. 肉芽组织修复细胞的简易培养方法[J]. 中国修复重建外科杂志[J], 1994, 8(3): 157.

[3] Evans A R, Junger H, Southall M D, *et al*. Isoprostamces, novel eicosanoids that produce nociception and sensitize rat sensory neurons[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(3): 912-920.

[4] Dunnick C A, Gibran N S, Heimbach D M. Substance P has a role in neurogenic mediation of human wound healing[J]. J Burn Care Rehabil, 1996, 17(5): 390-396.

[5] 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): 278-283.

[6] Zich M, Morbidelli L, Pacini M, *et al*. Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells[J]. Microvasc Res, 1990, 40(2): 264-278.

[7] Kahler C M, Herold M, Wiedermann C J. Substance P: a competence factor for human fibroblast proliferation that induces the release of growth-regulatory arachidonic acid metabolites[J]. J Cell Physiol, 1993, 156(3): 579-587.

[8] Ziche M, Morbidelli L, Masini E, *et al*. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P[J]. J clin Invest, 1994, 94(5): 2036-2044.

[9] Ziche M, Parenti A, Ledda F, *et al*. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF[J]. Circ Res, 1997, 80(6): 845-852.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2004)04-0286-01

食管癌术后胸内吻合口瘘的预防及护理

Prevention and nursing care of post-operative esophagogastrostomy anastomotic fistula inside thorax

唐佳玉, 黄宁静 (达州市中心医院外科, 达州 635000)

吻合口瘘是食管切除重建术后最严重的并发症之一,病死率可高达38.1%~53.0%[1]。我院胸外科1985-2000年手术治疗食管中下段癌1 739例,其中胸内食管、胃吻合1 217例,术后吻合口瘘14例(1.15%),死亡6例(瘘的42.8%),其余病人采取保守治疗后获痊愈出院,现报告如下。

1 临床资料

男12例,女2例,年龄44~65岁,平均56岁,均诊断为食管中下段癌。手工吻合822例,吻合口瘘9例(1.09%),吻合器吻合917例,吻合口瘘5例(0.54%)。早期瘘1例,中期瘘13例。

2 原因分析

术后3 d内发生的早期瘘多与吻合技术及手术操作失误有关。术后4~14 d发生的中期瘘发生率最高,占吻合口瘘的80%[2],与局部感染、术后处理不当、组织愈合能力低等因素有关。晚期瘘在术后2周以上,常与局部感染有关。本组病例多为中晚期食管癌,营养差,部分病人术前伴有感染,可能为发生原因。

3 预防

3.1 充分的术前准备

术前全面了解病人的全身情况,纠正贫血、低蛋白血症及水电解质紊乱。对有食管梗阻者,术前应冲洗食管,使用抗生素,加强口腔护理。

3.2 术后加强观察

监测基本生命体征的变化,尤其是呼吸及血氧饱和度的变化,指导调节输液速度,确定给氧方式和给氧浓度,必要时用呼

作者简介:唐佳玉(1963-),女,四川省达州市人,主管护师,主要从事外科临床护理和护理管理方面的研究。电话:(0818)2386630

收稿日期:2003-12-05;修回日期:2004-02-05

(下转290页)

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