DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.002

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0756-03

5 Gy全身照射对大鼠伤口巨噬细胞的抑制效应及W_{11}-a_{12}的促愈作用

舒崇湘[1],程天民[1],李树楠[2] ([1]第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;[2]云南大理医学院药理学教研室,大理 671000)

提 要:目的 研究大鼠全身5 Gy照射对伤口巨噬细胞(MΦ)功能的影响及W_{11}-a_{12}的促愈作用。方法 采用^{60}Co γ射线全身照射复合皮肤创伤模型,观察了MΦ酵母-补体复合物玫瑰花环形成试验、吞噬功能和分泌纤维粘连蛋白(FN)、转化生长因子β1(TGFβ1)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的功能。结果 大鼠5 Gy全身照射复合皮肤创伤后第3、5天伤口内巨噬细胞C_{3b}受体表达、吞噬功能,合成与分泌FN、TGFβ1、bFGF的功能均显著受到抑制,但抑制效应的程度不同,MΦ的吞噬功能的抑制重于其分泌功能,分泌TGFβ1功能的抑制重于分泌bFGF的功能。W_{11}-a_{12}能显著逆转辐射对MΦ功能的抑制效应。结论 伤口MΦ功能受抑是合并放射损伤后伤口难愈的主要原因,增强MΦ功能是W_{11}-a_{12}促愈作用的一个途径。

关键词:放射损伤;创伤愈合;巨噬细胞;纤维粘连蛋白;生长因子
中图法分类号:R392.12;R818 文献标识码:A

Inhibitory effect of whole body irradiation and healing promotion effect of W_{11}-a_{12} macrophage of wound in rats

SHU Chong-xiang, CHENG Tian-min, LI Shu-nan (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of 5 Gy whole body irradiation on wound macrophages and the promoting effect W_{11}-a_{12} on these cells. Methods Two full-thickness skin incised wound were inflicted on both sides of the back of the animals after the rats received 5 Gy gamma ray whole body irradiation. The phagocytic activity, zymosan-complement rosettes, the percentages of immunopositive macrophages of fibronectin(FN), transforming growth factor β1(TGFβ1) and basic fibroblasts growth factor(bFGF) in the wound were observed. Results The phagocytic activity, zymosan-complement rosettes, secreting of FN, TGFβ1, bFGF in wound macrophages were all inhibited on the 3rd day, 5th day after irradiation, but the degree of inhibition was more or less different. The inhibition of phagocytic activity was more obvious than that of secreting function, and TGFβ1 secreting function was impaired more apparently than that of bFGF. W_{11}-a_{12} enhanced the phagocytic activity, the expression of C_{3b} receptor, the secretion of FN, TGFβ1 and bFGF by macrophages in both simple and radiation-impaired wound. Conclusion The inhibition of macrophage function is mainly responsible for the healing deficits of radiation-impaired skin wound, W_{11}-a_{12} could promote radiation-impaired wound healing by means of activating phagocytic activity directly and up-regulate positive feed back to cell by way of increasing secretion of FN, TGFβ1, bFGF of wound macrophages.

Key words: radiation injury; wound healing; macrophage; fibronectin; growth factor

巨噬细胞(Macrophages, MΦ)在创伤愈合过程中起重要作用,它不仅能清除创面局部的受损细胞、纤维蛋白和病原体,而且还能合成和分泌纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)等细胞外基质和转化生长因子(Transforming growth factor β, TGFβ)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblasts growth factor, bFGF)等多种细胞生长因子直接参与和调控组织修复。合并全身放射损伤后创伤难愈的重要因素之一就是局部MΦ数量减少和功能降低,但伤口局部MΦ功能状态的研究尚欠深入[1],多元醇类化合物W_{11}-a_{12}能有效促进此类创伤愈合,但其促愈机制还不清楚[2]。因此,本实验以大鼠背部植入聚乙烯醇(PVA)海绵的切口为模型,观察了全身5 Gy照射对伤口MΦ功能的影响及W_{11}-a_{12}的作用,以期对此类创伤难愈及W_{11}-a_{12}的促愈的机制有进一步的了解。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054205);重庆市科委院士基金资助课题(98-5081)
作者简介:舒崇湘(1958-),男,安徽省石台县人,博士,副教授,主要从事放射损伤复合创伤方面的研究,发表论文20篇,现在附属大坪医院野战外科研究所放疗科。电话:(023)68757346
收稿日期:2000-11-20;修回日期:2001-04-10

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与分组 40只雄性Wistar健康成年大鼠,体重(200±20) g,由本校实验动物中心提供。实验动物设单纯创伤组(单伤组)和全身辐射复合创伤组(复合伤组)。各组设3、5 d两时相点,每个时相点动物数均为10只。

1.1.2 药品 实验所用的药品多元醇类化合物W_{11}-a_{12}原药由云南大理医学院药理教研室提供。用生理盐水溶液配制成100 mg/ml的W_{11}-a_{12}贮存液,-20 ℃保存备用。

1.1.3 PVA海绵 PVA海绵由附属大坪医院野战外科研究所朱旭东博士惠赠。PVA海绵切成直径约1.0 cm、厚0.4 cm大小,经流水漂洗过夜,再用蒸馏水漂洗,然后煮沸30 min消毒,分别浸入无菌的生理盐水和5 mg/ml W_{11}-a_{12}生理盐水液浸24 h

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

后使用。

1.2　实验致伤模型

① 照射: ^{60}Co γ 射线一次性全身照射, 距离 1 m, 照射量率为 1.21～1.14 Gy/min, 总剂量为 5 Gy。②创伤: 大鼠背部去毛, 麻醉后固定, 局部碘酒、酒精消毒, 在背部两侧纵向切两个长约 4 cm 的全层皮肤切口(切至皮下筋膜层), 一侧皮下植入对照 PVA 海绵, 另一侧植入含 W_{11}-a_{12}的 PVA 海绵, 然后缝合切口。复合伤组先照射, 后创伤。

1.3　观察指标与方法

1.3.1　标本制备　伤后第 3、5 天处死动物, 伤口表面经碘酒、酒精消毒后, 剪开伤口, 取出 PVA 海绵。① 按 Albina 等[3] 方法收集纯化伤口 MΦ。用 2% 台盼蓝检查细胞活力(细胞活力> 96%), 细胞涂片、染色, 确定巨噬细胞纯度> 90%。计数, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml。②取巨噬细胞, 直接涂片, 晾干, 用丙酮固定, −20 ℃保存备用。

1.3.2　MΦ 酵母-补体复合物(Zymosan-complement, ZC)玫瑰花环形成试验　按文献[4] 的方法操作, Wright-Giemsa 染色, 以一个 MΦ 周围附有 3 个或 3 个以上的酵母颗粒为一个花环, 镜检 200 个 MΦ, 计算花环形成率。

1.3.3　巨噬细胞吞噬功能测定　按 Ballart 等[5] 法进行, Giemsa染色, 镜检计数 200 个细胞, 计算吞噬率。

1.3.4　伤口中巨噬细胞 FN、$TGF\beta_1$、bFGF 免疫组化染色　① FN 免疫组化染色按 Sigma 公司 EAP 染色试剂合操作说明书进行。②bFGF 和 $TGF\beta_1$ 免疫组化染色按 ZXMED 公司 SPTM 试剂盒操作说明书进行。③光镜镜检: 在细胞涂片上镜检计数 200 个细胞, 计算免疫细胞化学阳性反应 MΦ 的百分率。

1.4　统计学处理

同体对照与用药所得的数据, 按个别比较法作 t 检验; 非同体各组间实验数据用 SPMR 医学统计软件中的 PDA-2 程序作单因素方差分析及 t 检验。

2　结果

2.1　伤口 MΦ ZC 玫瑰花环形成的变化及 W_{11}-a_{12}的作用

复合伤组 MΦ ZC 玫瑰花环形成率在伤后第 3、5 天显著降低($P<0.01$); 两伤用药组均显著高于未用药组($P<0.01$), 但复合伤用药组仍低于单伤用药组($P<0.01$); W_{11}-a_{12}对复合伤组增加作用的幅度略大于单伤组, 见表 1。

2.2　伤口 MΦ 吞噬率的变化及 W_{11}-a_{12}的作用

复合伤组伤口 MΦ 吞噬功能在伤后第 3、5 天分别为单伤组的 55.9% 和 49.4%, 显著降低($P<0.01$)。两伤类用药组均显著高于未用药组($P<0.01$), 复合伤用药组增高的幅度更大, 分别增高 19.3%(3 d)和 30.3%(5 d), 但仍显著低于单伤用药组($P<0.01$), 见表 1。

2.3　伤口 MΦ 分泌 FN 功能的变化及 W_{11}-a_{12}的作用

FN 阳性的 MΦ 细胞数于复合伤组在伤后第 3、5 天分别为单伤组的 78.7% 和 75.7%, 显著降低($P<0.01$), 两伤类用药组均比其对照组增高($P<0.01$), 且复合伤组增高的幅度更大些, 见表 2。

2.4　伤口 MΦ 分泌 bFGF 和 $TGF\beta_1$ 功能的变化及 W_{11}-a_{12}的作用

伤后第 3、5 天复合伤 $TGF\beta_1$ 阳性的 MΦ 细胞数分别为单伤组的 71.4% 和 68.1%, bFGF 分别是单伤组的 80.0% 和 71.7%, 均显著降低($P<0.01$); 两伤用药组 $TGF\beta_1$ 和 bFGF 均显著高于未用药组($P<0.01$), 复合伤组增高的幅度略高于单伤组, 见表 3。

表 1　全身照射对伤口 MΦ ZC 玫瑰花环形成率和吞噬率的影响及 W_{11}-a_{12}的作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of whole-body irradiation and W_{11}-a_{12} on the percentage of MΦ forming ZC rosettes and phagocytosis($\bar{x}\pm s$)

Group	The percentage of MΦ forming ZC rosettes(%)		The percentage of MΦ phagocytosis(%)	
	3 d(n=7)	5 d(n=7)	3 d(n=7)	5 d(n=7)
Simple injury				
Control	76.50±2.88	75.67±5.87	45.33±2.16	41.83±2.32
Medication	88.17±3.87 **	87.37±3.65 **	58.50±3.27 **	53.33±3.27 **
Combined injury				
Control	56.83±4.54 ##	52.00±3.58 ##	25.33±2.58 ##	20.67±3.44 ##
Medication	68.83±3.31 **##	64.17±3.76 **##	39.00±9.20 **##	34.33±3.14 **##

**: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* simple injury

表 2　全身照射对伤口 FN 阳性 MΦ 数的影响及 W_{11}-a_{12}的作用(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of whole-body irradiation and W_{11}-a_{12} on the percentage of immunopositive macrophage of FN(%, $\bar{x}\pm s$)

	3 d(n=7)	5 d(n=7)
Simple injury		
Control	86.00±3.22	82.17±3.76
Medication	99.00±1.55 **	94.67±2.34 **
Combined injury		
Control	67.67±5.20 ##	62.17±4.12 ##
Medication	82.33±3.14 **##	79.33±4.03 **##

**: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* simple injury

表 3　全身照射对伤口 $TGF\beta_1$ 和 bFGF 阳性 MΦ 数的影响及 W_{11}-a_{12}的作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of whole-body irradiation and W_{11}-a_{12} on the percentage of immunopositive macrophage of $TGF\beta_1$ and bFGF($\bar{x}\pm s$)

Group	The percentage of immunopositive MΦ of $TGF\beta_1$(%)		The percentage of immunopositive MΦ of bFGF(%)	
	3 d(n=7)	5 d(n=7)	3 d(n=7)	5 d(n=7)
Simple injury				
Control	59.33±4.18	64.17±3.43	76.00±4.43	80.17±4.07
Medication	70.67±3.61 **	76.17±3.87 **	91.83±4.45 **	94.83±3.49 **
Combined injury				
Control	42.33±4.80 ##	43.67±4.84 ##	60.83±5.11 ##	57.50±4.93 ##
Medication	53.83±3.92 **##	60.50±5.79 **##	74.33±5.89 **##	74.17±5.31 **##

**: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* simple injury

3　讨论

创伤局部免疫效应细胞主要有嗜中性粒细胞、单核巨噬细胞和淋巴细胞等。其数量和功能与创伤局部是否易发生感染密切相关, 而在这些免疫细胞中, MΦ 具有至关重要的作用。大鼠 6 Gy 照射后伤口中 MΦ 数量减少, 吞噬中性红功能降低[1], 本实验发现: 大鼠 5 Gy 全身照射后第 3、5 天, 伤口中 MΦ 吞噬酵母多糖-补体复合物功能显著降低, FN 免疫细胞化学染色反应阳性的 MΦ 明显减少。说明辐射不仅使伤口 MΦ 的吞噬杀菌功能降低, 而且也使其分泌 FN 的功能下降。FN 具有免疫粘附和免疫调理功能。由此可见, 伤口巨噬细胞吞噬和分泌 FN 的功能降低是合并放射损伤后伤口易发生感染的重要因素。

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

FN 在创伤修复过程中具有重要作用。FN 与其它基质相互作用形成立体结构对细胞起支持作用，并为肌成纤维细胞提供支架与系带作用而参与创面收缩，它对成纤维细胞(Fobroblasts，FB)、表皮细胞和血管内皮细胞有趋化作用，促进其游走和铺展，调节其增殖、分化、细胞因子及整合素受体的表达。最近的研究表明，FN 是细胞赖以生存的因子，能使细胞内 bcl-2 表达增加，阻止 FB 和内皮细胞的凋亡[6]。因而合并放射损伤后，伤口 MΦ 分泌 FN 的功能降低，一是直接影响创面的愈合，二是其对伤口细胞的正反馈调节作用减弱，使细胞进入伤口和增殖降低，凋亡增加，从而间接影响伤口愈合。

在创伤愈合的过程中巨噬细胞释放多种细胞生长因子调控创伤组织的修复。在众多的细胞因子中，$TGF\beta_1$ 和 bFGF 的作用处于引人注目的地位。然而，$TGF\beta_1$ 和 bFGF 在创伤愈合中的作用有所不同。$TGF\beta_1$ 的主要作用是对炎细胞、FB 等具有趋化作用，促进 FB、表皮细胞的游走和增殖，促进胶原、弹性蛋白、FN 的合成，抑制其降解，调节细胞因子的合成与分泌[7,8]。bFGF 也具有促进 FB、表皮细胞的游走和增生作用，但它能增加细胞外基质金属蛋白酶的表达，其主要功能是促进新生血管形成[9,10]。Broadley 等报道，用 bFGF 抗体中和消除伤口中 bFGF，几乎可完全阻断伤口中的血管形成。本实验发现，大鼠 5 Gy 全身照射后第 3、5 天，伤口中 $TGF\beta_1$ 和 bFGF 免疫细胞化学染色反应阳性的 MΦ 明显减少。说明辐射抑制了伤口中 MΦ 合成和分泌 $TGF\beta_1$ 和 bFGF 的功能，其后果是对炎症反应细胞的趋化作用减弱、对肉芽组织形成的刺激作用减轻，新生血管形成减少，再上皮化延迟，加重伤口愈合的延迟效应，使愈合的质量更差。

电离辐射对伤口 MΦ 的吞噬与分泌，以及对不同物质的分泌功能的效应是不同的。放射损伤后伤口 MΦ 吞噬功能降低的幅度大于其分泌功能；而对分泌 $TGF\beta_1$ 的功能抑制作用幅度大于其分泌 FN、bFGF。为何存在这些差异，还有待进一步阐明。

MΦ 吞噬和分泌功能有赖于 MΦ 表面受体的介导，MΦ 表面 C_{3b} 受体能识别由血清 C_{3b} 包被的细菌、霉菌等病原微生物。当 MΦ C_{3b} 受体与 C_{3b} 包被的微生物结合后，MΦ 被激活、吞噬这些微生物，并通过一系列细胞内信息传递引起呼吸爆发，释放一些酶类和自由基起杀菌作用。上述任一环节障碍均可导致 MΦ 的吞噬杀菌障碍。本研究发现：5 Gy 照射后第 3、5 天大鼠伤口中 MΦ ZC 玫瑰花环形成率显著降低，说明放射损伤对伤口中 MΦ C_{3b} 受体表达具有抑制作用。这可能是 MΦ 吞噬功能降低的一个重要原因，然而比较受体表达与吞噬功能变化，发现 MΦ 吞噬功能损伤更重，提示还有与 MΦ 激活有关的其它环节也受到损伤，如我们在另一研究中发现伤口 MΦ 阴离子和钾离子通道活动发生了抑制性变化。

W_{11}-a_{12}是从美洲大蠊体内提取的一种特殊的多元醇类化合物，用于单纯创伤和合并放射损伤后创面有明显促愈效果，能显著提高单伤和复合伤伤口愈合速度与愈合质量[1-3]、增加这两伤类伤口中炎细胞、成纤维细胞和毛细血管的数量，使表皮反应范围扩大，表皮增生反应厚度显著增加。本实验进一步发现：W_{11}-a_{12}能显著提高单伤和复合伤伤口 MΦ 吞噬、C_{3b} 受体的表达和分泌 FN、$TGF\beta_1$、bFGF 的功能，且对单伤组伤口 MΦ C_{3b} 受体的表达和分泌 FN、$TGF\beta_1$、bFGF 等几种成分的增加幅度几乎相同，对 MΦ 吞噬率的增加幅度较大；对复合伤组增加幅度由大到小的顺序是 MΦ 吞噬率、分泌 $TGF\beta_1$、bFGF 和 FN。由此可见，W_{11}-a_{12}增强 MΦ 吞噬功能和 C_{3b} 受体的表达及通过增强 MΦ 分泌 FN、$TGF\beta_1$、bFGF 的功能而加强对细胞正反馈调节效应是其促愈作用的重要途径。综合几项指标的变化，W_{11}-a_{12}对复合损伤的促愈效果，大致可达到补偿放射损伤对愈合的延缓效应。

参考文献：

[1] 宋述强，程天民. 电离辐射对伤口巨噬细胞功能的影响及苯妥英钠的促愈作用[J]. 中华医学杂志，1997，77(1)：54—56.

[2] 舒崇湘，程天民. 康复新对单纯皮肤创面和合并全身放射损伤时的促愈作用[J]. 第三军医大学学报，1999，21(2)：164—168.

[3] Albina J E，Mills C D，Henry W L，*et al*. Temporal expression of different pathways of l-argrinine metabolism in healing wounds[J]. J Immunol，1990，144(10)：3 877—3 880.

[4] Rivero I，Abaca H E，Valles R，*et al*. A simple method to detect complement receptors using baker's yeast：YC rosettes[J]. Scand J Immunol，1979，9(1)：9—14.

[5] Ballart I J，Estevez M E，Diez R A. Comparison of Candida killing activity measured by chemiluminescence and cytomorphological methods in human phagocytes[J]. J Immunol Methods，1987，97(2)：263—268.

[6] Fukai F，Mashimo M，Akiyama K，*et al*. Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide[J]. Exp Cell Res，1998，242(1)：92—99.

[7] Lopez-Armada M J，Gomez-Guerrero C，Egido J. Receptors for immune complexes activate gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells：role of TGF-β[J]. J Immunol，1996，157(5)：2 136—2 142.

[8] Schmid P，Kunz S，Cerletti N，*et al*. Injury induced expression of $TGF\beta_1$ mRNA is enhanced by exogenously applied TGFβs[J]. Biochem Biophy Res Commun，1993，194(1)：399—406.

[9] Uria J A，Balbin M，Lopez J M. Collagenase-3(MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor[J]. Am J Pathol，1998，153(1)：91—101.

[10] Price G F，Tarpley J E，Yanugihara D，*et al*. Platelet-derived growth factor(BB homdimo)，Transforming growth factor-β_1 and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing，neovessel and matrix formation and cessation of repair[J]. Am J Pathol，1992，140(6)：1 375—1 388.

（编辑 陈聪连）

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