DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.024

电离辐射对伤口液中细胞因子变化的影响及苯妥英钠的作用

宋述强* 程天民 林 远 (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

提 要 目的:研究电离辐射全身照射和局部照射对大鼠伤口液中细胞因子变化的影响及苯妥英钠的作用。方法:以大鼠背部置入聚乙烯醇海绵的切口伤为模型,收集伤口液,以生物活性法分别测定其中细胞因子 TNFα、IL-1 TGFβ、PDGF的活性水平。结果:6 Gy全身辐射后3 d 5 d 8 d,伤口液中细胞因子 TNFα、IL-1 TGFβ、PDGF的活性水平明显下降,20 Gy局部辐射后伤口液中 TNFα、IL-1的活性水平在第3天或3 d 5 d,以及 IL-1、TGFβ的活性水平在第13天明显升高;苯妥英钠对非辐射组和辐射组伤口液中的细胞因子水平都有明显的提高。结论:全身辐射造成愈合延迟与伤口局部细胞因子水平的下降有关,而局部辐射后细胞因子水平增加的意义有待探讨;苯妥英钠能提高伤口液中细胞因子的水平而有利于创伤愈合。

关键词 电离辐射;细胞因子;苯妥英钠;创伤愈合
中图法分类号 R852.7

细胞因子在创伤愈合过程中起着重要的调控作用。创伤局部内源性细胞因子的变化及其意义已有不少报道,但对一些难愈性创伤局部细胞因子的变化却少有研究。在战时核爆炸与平时核事故时的放烧复合伤伤员中,创伤愈合明显延迟,其创伤局部细胞因子的改变还不清楚。苯妥英钠能缩短创面愈合时间、促进肉芽组织生长、减少创面细菌污染,对多种难愈性的创面都有显著的疗效[1,2],其作用机制还有待进一步研究。本实验以伤口液中 TNFα、IL-1、PDGF、TGFβ的活性水平为观察内容,旨在研究全身辐射和局部辐射对伤口液中细胞因子的影响及苯妥英钠的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大鼠:雄性,(218±23.5)g,四川省中药研究所提供。

1.2 试剂

DMEM培养基:Gibco公司;^{3}H胸腺嘧啶核甙(^{3}H-TdR):中国科学院原子能研究所;苯妥英钠(Phenytoin sodium, PS):江苏省盐城制药厂。

1.3 创伤模型[3]

大鼠分3大组,即单纯创伤组(Simple wound, SW),全身辐射合并创伤组(Total radiation and wound, TRW),局部辐射合并创伤组(Local radiation and wound, LRW)。每组又分生理盐水对照组和 PS用药组。TRW组大鼠装在一特制的笼子,在离^{60}Co源1.0 m处接受γ射线6 Gy的照射,LRW组大鼠预先麻醉后固定在一特制的铅盒子里,背部皮肤从铅盒中间裂缝拉出固定,形成2 cm×8 cm的皮肤皱折,在离^{60}Co源1.0 m处接受γ射线20 Gy的照射,这样背部皮肤形成4 cm×8 cm的局部辐射区域。正常大鼠和辐射后(不超过4 h)的大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,在无菌条件下背部切开长约7 cm的全皮层切口,将10个直径1.0 cm,厚0.4 cm的聚乙烯醇(Polyviny alcohol, PVA)海绵置入切口皮下后缝合。PVA海绵置入前经流水漂洗过夜,而后煮沸30 min消毒,置入时先浸入无菌的生理盐水(对照)或10 mg·ml^{-1}的 PS(1.0ml/10个海绵)。

1.4 伤口液的收集[3]

在伤后3 d 5 d 8 d 13 d,取出 PVA海绵,离心,取上清-70℃保存待测。每只动物能收集到伤口液0.6 ml~0.9 ml。

1.5 伤口液各项指标的测定

伤口液中 TNFα的活性用 L929细胞毒法测定[4],结果以活性单位表示;IL-1的活性以 IL-1依赖的胸腺细胞增殖法测定[5],结果以^{3}H-TdR的掺入量表示;TGFβ的活性用 CCL-64细胞生长抑制法测定[6],结果通过标准曲线算出其含量;PDGF的活性用3T3细胞生物法测定[7],结果以活性单位表示。

1.6 统计

用 SPSS医用统计程序软件作双因素方差分析和组间均数比较。

2 结果

2.1 辐射对伤口液中 TNFα、IL-1水平的影响及苯妥英钠的作用

双因素方差分析的结果显示:在不加苯妥英钠的情况下,与 SW组的 TNFα或 IL-1水平相比,TRW组显著下降,LRW显著增高,在同一 SW、TRW、LRW组中,加苯妥英钠组与不加苯妥英钠组有显著增高,见表1。

* 宋述强,男,33岁,主治医师,博士,现在广州军区总医院临床药理科 广州,510010

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

表 1 电离辐射全身和局部照射对伤口液中 TNF-α 和 IL-1水平的影响及苯妥英钠的作用 (n= 6)

Tab 1 Effects of radiation and phenytoin sodium (PS) on the changes of TNF-α and IL-1 in wound fluid(n= 6)

Group	TNF-α (u/ml)				IL-1(· min⁻¹)			
	3	5	8	13	3	5	8	13
SW								
no PS	27.8± 3.6	12.6± 2.8	20.3± 4.5	15.6± 3.8	2817± 267	4234± 526	3162± 413	2123± 384
with PS	31.4± 4.2	18.8± 2.4#	26.3± 3.2#	16.4± 2.7	3358± 423	5614± 617##	4368± 586##	2642± 482
TRW								
no PS	16.8± 3.4**	6.2± 3.0**	13.2± 2.6*	18.3± 4.4	1834± 345**	2794± 382**	2387± 304**	2283± 316
with PS	28.6± 3.8	14.5± 3.2##	19.6± 2.8#	17.6± 3.4	2217± 462	3847± 453#	3258± 313#	2437± 408
LRW								
no PS	35.4± 3.5**	20.6± 3.2*	16.4± 4.2	18.7± 3.6	3626± 357*	4521± 602	3024± 455	4107± 526**
with PS	30.6± 2.8#	17.9± 3.5	18.4± 3.7	14.2± 4.2	3281± 378	5452± 522##	4119± 434##	3882± 349

*: P <0.05,**: P < 0.01 *vs* SW;#: P <0.05,##: P <0.01 *vs* the corresponding group with no PS

TRW组伤口液中 TNF-α和 IL-1水平在伤后 3 d 5 d 8 d明显降低; LRW组中 TNF-α的水平在伤后的第 3天、第 5天有明显升高, IL-1的水平在伤后第 3天、13天有较明显的升高;苯妥英钠对 SW组和 TRW组 TNF-α水平在伤后 5 d 8 d都明显的升高作用,对 3个组伤后 5 d 8 d的 IL-1水平都有明显增加,但对 LRW组中伤后第 3天的 TNF-α水平有降低的作用。

2.2 辐射对伤口液中 TGF-β和 PDGF水平的影响及苯妥英钠的作用

TRW组的 TGF-β水平在伤后 5 d 8 d明显降低, LRW组的 TGF-β水平在伤后 3 d 5 d 8 d无明显变化,伤后 13 d有明显的升高。苯妥英钠对单纯创伤组伤后 5 d 8 d, TRW组 3 d 5 d 8 d和 LRW组 3 d 5 d的 TGF-β水平都有明显的增高作用,见表 2

双因素方差分析的结果显示:在不加苯妥英钠的情况下,与 SW组的 TGF-β水平相比, TRW组显著下降, LRW显著增高,在同一 SW、TRW、LRW组中,加苯妥英钠组与不加苯妥英钠组有显著增高。

DGF主要出现在伤后 3 d 5 d,在伤后 8 d 13 d其活性已很低(因此部分时相点由于难以测出而未测), TRW组的 PDGF水平在伤后 3 d 5 d明显下降, LRW组的 PDGF水平并无明显下降,苯妥英钠对 3个组中的 PDGF水平都有较明显的提高作用,见表 2

表 2 电离辐射全身和局部照射对伤口液中 TGF-β和 PDGF水平的影响及苯妥英钠的作用 (n= 6)

Tab 2 Effects of radiation and phenytoin sodium (PS) on the changes of TGF-β and PDGF in wound fluid(n= 6)

Group	TGF-β (ng/ml)				PDGF(u/ml)			
	3	5	8	13	3	5	8	13
SW								
no PS	1.2± 0.5	6.1± 0.8	8.5± 1.2	5.7± 0.9	14.5± 3.6	6.3± 3.2	2.3± 1.1	0.8± 0.4
with PS	1.5± 0.6	9.4± 1.4##	13.3± 2.4##	7.1± 2.1	23.6± 6.2##	11.8± 4.1#	3.4± 1.5	–
TRW								
no PS	0.9± 0.4	2.4± 0.5**	3.9± 0.8**	4.5± 1.3	4.4± 1.6**	3.8± 2.5**	–	–
with PS	1.3± 0.3#	5.3± 1.2##	7.4± 1.6##	6.8± 1.5	8.1± 2.7##	5.3± 3.4	–	–
LRW								
no PS	1.6± 0.4	8.6± 2.3	10.6± 3.2	9.8± 2.6*	15.9± 5.5	7.8± 3.5	–	–
with PS	2.8± 0.5##	11.2± 3.5#	11.9± 2.8	8.1± 2.4	25.3± 7.1##	10.7± 5.6	–	–

–: no determination;*: P <0.05,**: P <0.01 *vs* SW;#: P <0.05,##: P <0.01 *vs* the corresponding group with no PS

3 讨论

伤口液是组织细胞修复的微环境,含有多种细胞因子,如 TNF-α、IL-1 TGF-β和 PDGF等,对组织修复细胞起直接的调控作用[8]。我们已在伤口液中检测到 TNF-α、IL-1 TGF-β、PDGF等因子的活性,但其变化规律不尽相同。正常伤口液中出现最高峰值的时间是: TNF-α和 PDGF在伤后第 3天, IL-1在伤后第 5天, TGF-β在伤后 8 d。除了这几种因子外,伤口液中还含有许多其它因子以及一些蛋白酶如胶原酶胰蛋白酶等,共同调节创伤愈合过程[8]。

大鼠受到 6 Gy辐射后,造血系统严重受抑,致使伤口局部炎症反应减轻,巨噬细胞的吞噬功能及其释放炎性介质都明显降低[9];同时由于全身辐射后造成全身衰竭、恶病质、营养不良等现象,机体出现严重的负氮平衡,使得伤口局部组织修复细胞同样出现蛋白质合成减少,分解增加,因此我们看到伤口液中 TNF-α、IL-1 TGF-β、PDGF等的水平在创伤早期都

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

有不同程度的下降。这可能是全身辐射后愈合延迟的重要原因之一。

在大鼠 20 Gy局部照射合并创伤后,伤后早期 TNF-α(伤后 3 d 5 d)、IL-1(伤后 3 d)的水平明显增加,随后基本恢复,在伤后 13 dIL-1、TGF-β 又增加显著。这可能由于局部大剂量的照射是一个较强的致炎因素,使伤口局部炎症介质释放增加。但局部辐射同时也损害皮肤 FBS、上皮细胞等,局部辐射后的创伤愈合也明显延迟。许多研究结果还证明,在伤口局部单独应用 IL-1、TGF-β 等因子并不能加速局部辐射所致愈合延迟的伤口愈合,TGF-β 剂量过大相反能阻碍伤口愈合[10]。因此,局部辐射后伤口愈合后期部分生长因子水平增高对于创伤愈合的意义还有待进一步研究。

在伤口局部应用 PS后,非辐射组和辐射组伤口液中细胞因子 TNF-α、IL-1、TGF-β、PDGF的水平都有明显的升高。由于实验中 PS只给药 1次,在伤后 13 d细胞因子的水平升高差别不显著。PS使细胞因子水平增高的机制可能是两方面的,首先 PS能抑制胶原酶的合成与释放[1,2],使细胞因子的破坏减少;其次,PS可增加伤口局部巨噬细胞的数量,并刺激巨噬细胞释放细胞因子[8]。细胞因子的增加,有利于加速创伤愈合。

在局部辐射合并创伤组创伤初期,苯妥英钠对早期升高的细胞因子(TNF-α、IL-1)水平有所降低,这可能与苯妥英钠能抑制脂质过氧化物的形成,调节前列腺素的代谢,降低溶酶体酶和其它胞浆酶的释放等,从而降低炎症反应有关[1,2]。但总的来讲,苯妥英钠对局部辐射合并创伤后的伤口液中细胞因子的水平都有不同程度的提高,尤其是在伤后 5 d 8 d,这些作用使苯妥英钠对局部辐射所致的愈合延迟也有较好的应用前景。

参考文献

1 Smith B, Moore M, Jain K. Topical phenytoin and wound healing: report of the first internation conferences on the use of phenytoin in dermatology. Int J Dermatol, 1988; 27: 528

2 Pendse A K, Sharma A, Sodani A *et al*. Topical phenytoin in wound healing. Int J Dermatol, 1993; 32: 214

3 Pricolo V E, Caldwell M D, Mastrofranceso B *et al*. Modulutory activites of wound fluid on fibroblast proliferation and collagen synthesis. J Surg Res, 1990; 48: 534

4 Flick D A, Gifford G E. Comparsion of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. J Immunol Methods, 1984; 68: 167

5 杨四旬,李晓玉.一种简便实用的 IL-1测定方法.上海免疫学杂志, 1989; 9: 363

6 虞冠华,许祥裕,丁树标.转化生长因子-β 的测定.上海免疫学杂志, 1995; 12: 116

7 Antoniades H N. Human platelet-derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separetion of their reduced subunits. Proc Natl Acad Sci, 1981; 78: 7314

8 Pierce G F, Mustoe T A. Pharmcologic enhancement of wound healing. Ann Rev Med, 1995; 46: 467

9 宋述强,程天民.电离辐射对伤口巨噬细胞的影响及苯妥英钠的促愈合作用.中华医学杂志, 1997; 77: 54

10 Vegesna V, McBride W H, Taylor J M G *et al*. The effect of interleukin-1B or transforming growth factor-β on radiation-impaired murine skin wound healing. J Surg Res, 1995; 59: 699

(收稿: 1997-03-21;修回: 1998-01-15)

(编辑　冷怀明)

Effects of irradiation on changes of cytokines in wound fluid and role of phenytoin sodium in wound healing in rats

Song Shuqiang, Cheng Tianmin, Lin Yuan (Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the effects of irradiation on changes of cytokines in wound fluid and role of phenytoin sodium in wound healing. **Methods**: After the wound fluid was collected by polyvinyl alcohol sponges implanted in dorsal incision of rats, the activity of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor β (TGF-β) and platelet-derived growth factor (PDGF) in the wound fluid were determined by bioassay. **Results**: The levels of TNF-α, IL-1, TGF-β and PDGF in the wound fluid were significantly decreased in 6 Gy-total-radiated rats on the 3rd and 5th d or 3rd, 5th and 8th d after injury. The levels of TNF-α and IL-1 on the 3rd or 3rd and 5th d and those of IL-1 and TGF-β on the 13th d after injury were increased in 20 Gy-local-radiated rats. No matter whether the rats were radiated or not, topical phenytoin sodium significantly increased the levels of cytokines in the wound fluid. **Conclusion**: One of the important mechanisms for prolonged wound healing by total irradiation is the decrease of cytokines in the wound fluid and phenytoin sodium can promote wound healing through increasing the levels of the cytokines.

Key words irradiation; cytokine; phenytoin sodium; wound healing; rat

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