

• 基础研究 •

糖尿病大鼠全层皮肤缺损创面愈合过程中皮肤神经末梢再生的研究

程颢 刘宏伟 陈葵 李勤 孙同柱 付小兵 盛志勇

【摘要】 目的 观察糖尿病大鼠与正常大鼠全层皮肤缺损创面愈合过程中神经末梢的再支配情况与创面愈合的关系。**方法** 非糖尿病大鼠($n=12$)与糖尿病大鼠($n=12$)制成相同的全层皮肤缺损创面愈合模型。于伤后3d、7d和14d采取创面皮肤标本,用组织病理HE和SP抗体免疫组织化学染色技术检测创面肉芽再生与再上皮化情况,并对肉芽创面内周围神经末梢再生情况进行观察。**结果** 糖尿病大鼠全层皮肤缺损创面愈合的时间延长,其周围神经末梢的数量较正常组明显减少,再生速度缓慢,肉芽组织中微血管和胶原形成的能力明显降低。**结论** 糖尿病大鼠创面的愈合障碍与神经组织再生延迟相关。

【关键词】 伤口愈合;糖尿病;神经末梢;再生

Regeneration of nerve fibers in skin during healing of full-thickness wound in diabetic rats

CHENG Biao*, LIU Hongwei, CHEN Kui, et al

* Department of Plastic Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, China

【Abstract】 Objective To compare the reinnervation during healing of excisional full-thickness skin wound between diabetic and non-diabetic rats. **Methods** Full-thickness skin wounds were created in diabetic rats ($n=12$) and normal Wistar rats ($n=12$). Skin samples were obtained from rat back wound sites on 3, 7 and 14 after wounding. The HE staining method and immunohistochemical technique using antibodies against substance P (SP) were used to examine granulation and reepithelialization of the wounds. An analysis was performed to determine nerve fiber number and nerve lengths (NLs) of the epidermis and the dermis and the nerves surrounding sweat glands in skin. **Results** Wounds of normal Wistar rats showed significantly faster in healing than those of diabetic group, the quality of epithelialization was better in normal rats than in diabetic rats. SP immunoreaction positive fibers in the epidermis and dermis of skin from diabetic rats were less than those in normal rats. The rate of regeneration of peripheral nerve was slower in diabetic rats than that in normal rats. The formation of the capillary and the collagen in granulation tissue was decreased in diabetic rats. **Conclusion** The disorder of peripheral nerve regeneration is related to impaired wound healing in diabetic rats.

【Key words】 heal, wound; diabetes mellitus; nerve ending; regeneration

糖尿病患者出现感觉功能障碍常常诱发肢体的慢性溃疡,造成临床治疗中许多患者难以愈合,最终不得不截肢。因此,了解皮肤内感觉神经的营养作用,特别是对皮肤创面愈合的影响及相关机制的研

究越来越受到人们的重视^[1]。本实验通过建立糖尿病大鼠全层皮肤缺损愈合模型,观察创区内感觉神经纤维再支配情况,了解神经纤维再支配与创面修复之间的生物学意义。

收稿日期:2007-03-27

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(2005CB522603);国家自然科学基金面上项目(30570575;30770702);广东省自然科学基金资助项目(06019692);全军医学科学技术研究“十一五”计划项目(06MB160)

作者单位:510010 广州市,解放军广州军区总医院整形外科(程颢、陈葵、李勤);510630 广州市,暨南大学第一附属医院整形外科(刘宏伟);100037 北京市,解放军总医院第一附属医院全军创伤修复重点实验室(孙同柱、盛志勇);100853 北京市,解放军总医院基础医学所(付小兵)

作者简介:程颢,男,1967年5月生,江苏省徐州市人,医学博士,副主任医师。Tel:13798008797, E-mail: chengbiaocheng@sohu.com

通讯作者:付小兵, E-mail: fuxb@cgw.net.cn, Tel:010-66867394

1 材料与方法

1.1 动物与分组 Wistar 大鼠 12 只,雌雄各半,体重 200~250 g,购自中国医学科学院动物研究所(许可证号:SCXK11-00-0006)。糖尿病大鼠模型由中国医学科学院药物所制备(附模型报告)。将实验动物分成两组:(1)糖尿病大鼠损伤组($n=12$);(2)无糖尿病的损伤组(正常大鼠对照组, $n=12$)。实验前 1 周投放实验室喂养,自由饮水与摄食。实验当日禁食,在麻醉条件下背部净毛,面积 $9.0\text{cm} \times 8.0\text{cm}$,待消毒后用特制致伤器(打孔器)在大鼠背中部脊柱两侧各旁开 1.5cm 处,由上至下各切割 2 个圆形创面,直径 1.8cm,面积 2.54cm^2 ,深至皮下,止血后备用。伤后每天换药 1 次,至伤后 d14。每次换药时将纱布揭开,创面无菌处理后,用无菌纱布包扎,单笼喂养,自由饮水与摄食。分别在伤后 3 d、7 d 和 14 d 切取创面组织标本。

1.2 标本处理 所有标本制成 $1.0\text{cm} \times 1.0\text{cm}$ 组织块,置 4%多聚甲醛溶液中固定 1 h 后,用 PBS 洗脱 3 次,脱水透明后,石蜡包埋组织,分别制成 5.0 和 $15.0\text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片, 4°C 保存备用。

1.3 常规组织病理染色和免疫组织化学染色 $5.0\text{ }\mu\text{m}$ 石蜡切片入二甲苯 2 次,各 10 min。无水乙醇 2 次,各 5 min。95%、80%、70%乙醇及蒸馏水各 2 min 脱脂,苏木素液染色 2 min,10%盐酸乙醇分化 3~5s,自来水冲洗碱化至细胞核呈蓝色。再入蒸馏水 20 min。梯度乙醇 70%、80%、95% 各 2min。伊红染液中 5 min。95%乙醇分色 3~5 s,梯度脱水,树胶封固。创面胶原的 Van Gieson's (VG)特染:组织标本脱腊入水,用 Weigert's 铁苏木素液染 10 min,流水冲洗,51%盐酸乙醇迅速分化,流水冲洗 10 min,VG 染 2 min,95%乙醇分化后梯度脱水、透明,封片。

$15.0\text{ }\mu\text{m}$ 石蜡切片脱蜡,3%过氧化氢孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗,0.01%PBS 浸泡,进行抗原热修复,抗体 P 物质(substance P, SP)购自 Santa Cruz Biotech 公司,工作浓度 1:3000。按免疫组织化学试剂盒(购于北京中山生物技术有限公司)说明书操作进行免疫组织化学显色。再行苏木精复染,脱水、透明、封片,光学显微镜观察结果。

1.4 阳性判定标准 切片 HE 胶原的 VG 特染后,采用 Altavilla's 法评分^[2]。见表 1。

1.5 组织学观察 采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告管理系统对 SP 阳性神经末梢的多少进行定量分析,每张切片随机选 5 个高倍镜视野($\times 400$),测定每个视野下阳性反应的平均光密度。以每例 5 个视野平均光密度的平均值作为该例的测定值。

1.6 统计学处理 对各组免疫组织化学阳性反应的平均光密度值作单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 动物模型的稳定性 对实验大鼠血糖水平的监测,显示大鼠血糖水平一直维持在 $21.23 \sim 24.60\text{ mmol/L}$,致伤前后不同时间各组间无显著性差异,符合模型制作标准。

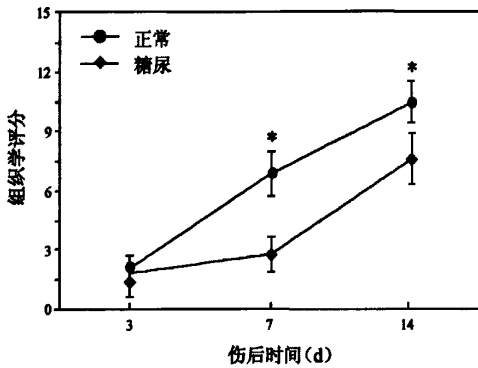
2.2 非糖尿病大鼠与糖尿病大鼠创面愈合情况 切片 HE 和胶原的 VG 染色显示,非糖尿病大鼠伤后 3 d,创区边缘皮肤内中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润明显,仅有适量的表皮和真皮组织,以及少量的毛细血管和肉芽组织再生。7d 时,成纤维细胞生长活跃、数量多,毛细血管数量显著增加,胶原纤维沉积明显,真皮和表皮增加。伤后 14d,非糖尿病大鼠的创面收缩,创面基本愈合,已完全再上皮化,同时表皮层次较多,肉芽组织较厚。糖尿病大鼠创面伤后 3d,中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞在

表 1 创面的组织学评分

评分	表皮和真皮的再生	肉芽组织厚度	血管形成情况
1±	少量的表皮与真皮组织	薄的肉芽组织	每个部位 1~2 个新形成的毛细血管;严重的水肿、出血和凝血块和血栓
2±	适量的表皮和真皮组织	适量的肉芽组织	每个部位 3~6 个新形成毛细血管;中等程度水肿、出血,偶见充血和纤维素沉积,未见凝血块
3±	完整地真皮和表皮再生	厚的肉芽组织	每个部位 7~10 个新形成毛细血管;中等程度的间质水肿和充血,未见血栓和出血
4±		极厚的肉芽组织	在创缘新形成和结构完成的毛细血管>10 个,垂直于表皮;轻度的水肿

注:根据显微镜下被染成蓝紫色纤维样组织为阳性。用血清替代一抗作阴性对照,无阳性标记的组织

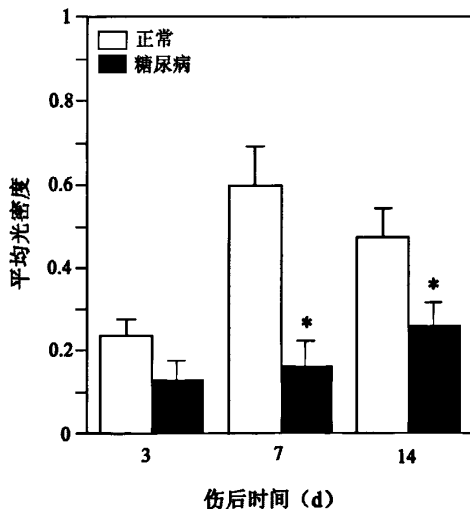
创缘部浸润少于正常对照组,仅有少量的真、表皮再生和极薄的肉芽组织。愈合 d7,成纤维细胞生长活跃,但毛细血管数量显著少于非糖尿病大鼠,胶原纤维的排列较正常大鼠零乱。伤后 14 d,糖尿病大鼠的创面收缩,虽然基本完成再上皮化,但是表皮层薄,肉芽组织含量少于正常大鼠损伤组($P<0.05$;图 1)。



正常大鼠损伤组 vs 糖尿病大鼠损伤组, * $P<0.05$

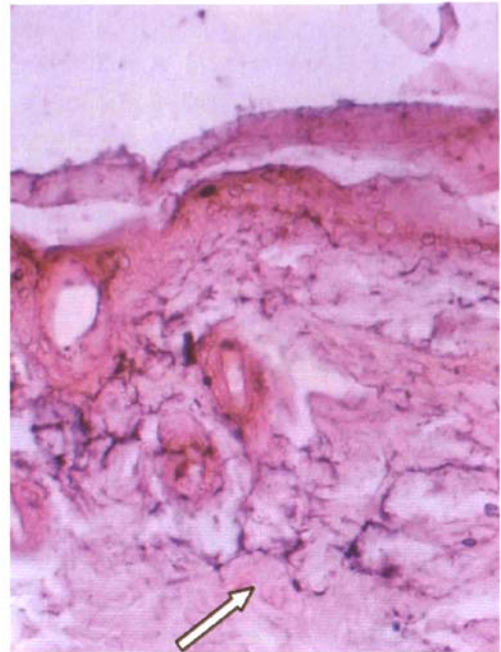
图 1 组织病理学染色,Altavillas 法半定量评估愈合情况

免疫组织化学染色显示:非糖尿病大鼠伤后 3 d,创缘与创基深部有 SP-样免疫反应阳性的纤维样结构。7 d 时,创基深层和创缘真皮深层部分,特别是皮脂腺、毛囊周围有大量 SP 阳性染色的神经纤维组织缠绕,并开始向肉芽组织浅层生长。伤后 14 d,愈合部分组织深层有大量的神经纤维再生,部分接近表皮组织。糖尿病大鼠伤后 3 d,创基和创缘真皮内的 SP 样免疫反应阳性的纤维极少。7 d 时,深层 SP-阳性纤维样组织仍罕见。直至伤后 14 d,皮肤内有少量 SP-免疫反应阳性表达的纤维样组织($P<0.05$;图 2~4)。



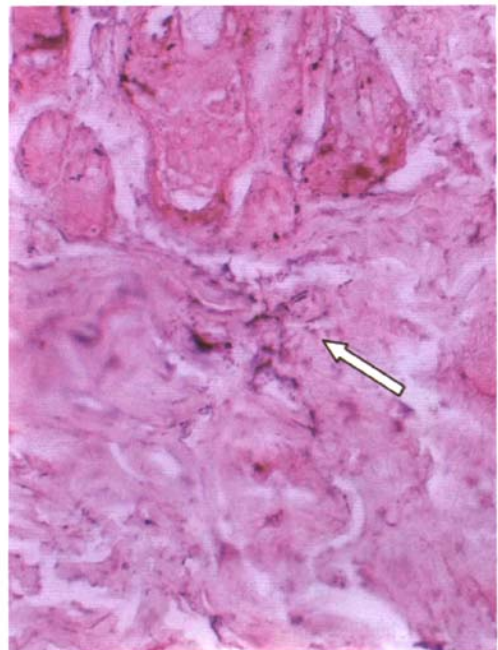
正常大鼠损伤组 vs 糖尿病大鼠损伤组, * $P<0.05$

图 2 SP 阳性神经纤维和末梢的定量分析示意图



白色箭头所指方向为 SP 免疫反应阳性的神经纤维

图 3 正常大鼠全层皮肤缺损创面愈合 14d,愈合部位 SP-免疫阳性表达的情况(免疫组化染色,15 μ m, $\times 200$)



白色箭头所指方向为 SP 免疫反应阳性的神经纤维

图 4 STZ 诱导糖尿病大鼠全层皮肤缺损创面愈合 14 d,愈合部位 SP-免疫阳性表达明显少于正常对照组(免疫组化染色,15 μ m, $\times 200$)

3 讨论

皮肤中主要的神经纤维有交感类的神经纤维、

C 类和 A δ 纤维,从背根神经节发出,最终支配皮肤(包括表皮)。其中释放的神经肽是非神经类组织与中枢、周围神经联系的关键。SP 具有改变周围内皮细胞形状和平滑肌细胞的松弛作用,导致毛细血管的裂隙和经典式的血管扩张作用,并对神经源性的炎症产生影响。神经源性炎症可导致肥大细胞的脱颗粒、骨髓源细胞的趋化作用、成纤维细胞和内皮细胞的增殖、细胞因子的合成,以及炎症细胞、内皮细胞和角质形成细胞黏附分子的表达。因此,神经肽对维持正常皮肤的功能和损伤性反应具有重要意义^[3]。由于糖尿病鼠出现神经损害,其炎症性反应、细胞增殖与迁移和血管形成发生障碍。其中炎症反应是创面愈合过程中不可或缺的步骤,也是神经系统对皮肤愈合的影响作用之一^[4,5]。因此,如果改善感觉神经末梢的支配,是否会通过 SP 等神经肽的作用改善糖尿病患者皮肤的营养及相关病理生理变化值得进一步探索。

SP 是发现最早的神经肽 普遍存在于神经系统中。作为一种神经递质,SP 在创伤后由感觉神经末梢释放到周围组织中,是神经系统调控伤口愈合的重要介质。参与了神经源性炎症反应的发生、发展。当电刺激感觉神经或局部化学刺激皮肤时,可以引起皮肤的血管扩张和血浆蛋白外渗。SP 还能增强巨噬细胞和白细胞的吞噬活性;可直接刺激中性粒细胞的趋化运动,并能加强其吞噬杀菌作用。总之,SP 在损伤后的炎症反应中对细胞增殖及组织修复有重要的调节作用。同时,含 SP 的感觉性神经末梢具有双向传导功能,一方面在向中枢传递受刺激信息时起递质作用;另一方面,在局部释放 SP 及其他肽类物质时起调质作用^[6]。而有学者报道,糖尿病外周神经病变后,大鼠背根神经节、坐骨神经 SP 发生相应变化。感觉神经 SP 的表达变化对观察糖尿病周围神经病变有一定作用^[7]。因此,本实验将 SP 作为观察周围神经系统对糖尿病大鼠愈合影响的重点对象。

糖尿病神经性病变具有传导速度减慢和轴突萎缩的特点,可能与轴突神经微丝的损伤有关。神经微丝是轴突的重要结构,在神经性病变中十分重要。链脲霉素(streptozotocin, STZ)诱发的糖尿病神经性病变与神经微丝结构的改变密切相关^[8]。当 STZ 处理大鼠 8 周后,免疫组织化学检测大鼠足垫有髓鞘神经纤维神经微丝的重链蛋白和髓磷脂碱蛋白阳性的髓鞘较非糖尿病大鼠减少 50%^[9]。同时,STZ 处理鼠后肢,所造成糖尿病鼠皮肤神经支配减

少与糖尿病患者的皮肤神经再支配类型相似^[10,11]。故笔者选用此模型研究神经肽在其中可能充当的角色,从神经角度探讨周围神经支配对愈合的影响。

本研究显示,应用 STZ 造成糖尿病大鼠并制成全层皮肤缺损的创面模型,同样出现周围神经末梢损害,SP 的释放减少。在该模型愈合中,观察到炎症细胞的浸润、成纤维细胞的活性以及角质形成细胞迁移发生障碍,导致胶原沉积、微血管形成减少,愈合时间明显延长。同时,SP 能通过生长因子刺激皮肤成纤维细胞的增殖和表皮细胞的迁移。因此,笔者推测,STZ 诱导的糖尿病大鼠愈合障碍可能与不正常的炎症细胞(包括中性粒细胞、巨噬细胞等)浸润有关。另外,胶原的沉积一方面为神经再生提供支架,再支配神经影响炎症细胞和(肌)成纤维细胞迁移、分化增殖与凋亡,胶原的分泌,参与修复组织预后的重塑与改建。另一方面胶原会对神经纤维进行缠绕,阻止其生长导致神经肽类的分泌障碍,有害于损伤后的重塑调节,两者之间关系相辅相成^[12]。本研究还发现,糖尿病真皮再生时,侧支发芽的神经不易进入表皮,表皮神经难以再生,成熟受到影响。

参考文献

- [1] 付小兵,程飏. 重视神经、内分泌与免疫机制在皮肤修复与再生中作用的研究. 中国修复重建外科杂志, 2006,20:331-335.
- [2] Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. Diabetes, 2001, 50: 667-674.
- [3] Gibran NS, Jang YC, Isik FF, et al. Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. J Surg Res, 2002, 108: 122-128.
- [4] Souza BR, Cardoso JF, Amadeu TP, et al. Sympathetic denervation accelerates wound contraction but delays reepithelialization in rats. Wound Repair Regen, 2005, 13: 498-505.
- [5] Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, et al. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. Diabetes Care, 2004, 27: 1974-1979.
- [6] 虞琴. P 物质与神经系统. 宜春学院学报(自然科学), 2006,18:86-88.

(下转第 421 页)

者舒张末期左室内径、收缩末期左室内径、室间隔厚度、左室后壁厚度均有轻微下降,但无统计学显著差异;正是这些改变导致左室心肌重量降低 17%、左室心肌重量指数降低 18%,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.05$);而对照组无明显变化。左室收缩功能指标缩短分数两组均无显著改变;舒张功能指标治疗组显著上升($P<0.05$),对照组研究前后无显著差异。

3 讨论

血液透析患者是心血管疾病的高危人群,左室肥厚与尿毒症患者死亡率之间密切相关,有左室肥厚者是无左室肥厚者的 8 倍,易发生心力衰竭、心律失常、脑血管意外,是影响尿毒症患者预后与存活的重要因素^[4]。

近年来随着对左室肥厚研究的不断深入,发现血循环中和心脏局部肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活与心肌肥厚有密切关系^[2]。血管紧张素Ⅱ的致肿瘤样增生作用,在心脏引起心肌细胞及间质纤维细胞增生与肥大,在阻力血管引起血管平滑肌增生与肥大,在肾脏引起肾小动脉硬化等。抑制 RAAS 的降血压药物,ACEI 和 ARB 对心血管能产生保护作用。有研究报道,ACEI 或 ARB 能减轻终末期肾脏病维持性血液透析患者的左室重量^[5,6],然而,在这些研究中,左室重量的降低都伴随着血压的下降。本研究发现,长期予以小剂量的 ACEI 苯那普利对透析患者血压无明显影响,但能降低他们的左室肥厚。推测其可能的原因与局部 RAAS 抑制有关,患者心脏重量减轻至少有一部分与血压改变无明显相关性。

本研究提示,在维持性血液透析患者中,长期小剂量的

苯那普利能降低左室重量,对血压无显著影响,这说明 ACEI 除了降低压力负荷使心肌肥大减轻外,还有逆转左室肥厚的作用。

参考文献

- [1] Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, et al. Excerpts from the United States Renal Data System 2004 annual data report; atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45: A5-A7.
- [2] Struthers AD, MacDonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 663-670.
- [3] Diamond JA, Phillips RA. Hypertensive heart disease. *Hypertens Res*, 2005, 28: 191-202.
- [4] Wanic-Kossowska M, Lehmann P, Czekalski S. Left ventricular hypertrophy in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. *Pol Arch Med Wewn*, 2002, 107: 539-546.
- [5] Paoletti E, Cassottana P, Bellino D, et al. Left ventricular geometry and adverse cardiovascular events in chronic hemodialysis patients on prolonged therapy with ACE inhibitors. *Am J Kidney Dis*, 2002, 40: 728-736.
- [6] Shibasaki Y, Masaki H, Nishiue T, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist, losartan, causes regression of left ventricular hypertrophy in end-stage renal disease. *Nephron*, 2002, 90: 256-261.
- [7] 田东华,于国平,赵明,等.神经生长因子对糖尿病大鼠脊根神经节、坐骨神经 P 物质变化的影响. *解放军医学杂志*, 1998, 23: 420 - 422.
- [8] Zochodne DW, Sun HS, Cheng C, et al. Accelerated diabetic neuropathy in axons without neurofilaments. *Brain*, 2004, 127: 2193-2200.
- [9] Christianson JA, Ryals JM, Johnson MS, et al. Neurotrophic modulation of myelinated cutaneous innervation and mechanical sensory loss in diabetic mice. *Neuroscience*, 2007, 145: 303-313.
- [10] Christianson JA, Riekhof JT, Wright DE. Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice. *Exp Neurol*, 2003, 179: 188-199.
- [11] Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: is there irreparable damage? *Diabetes*, 2005, 54: 830-837.
- [12] 程飏,付小兵,盛志勇.局部应用碱性成纤维细胞生长因子对烫伤创面愈合及周围神经纤维再生的影响. *中华外科杂志*, 2006, 44: 198-199.

(上接第 407 页)