

minus is cloned into mammalian expression vector pBPV. The pBPV-CGRP plasmid DNA is directly injected into the spontaneous hypertension rats (SHR) and results in the significant decrease of SHR's blood pressure during 3~22 days after injection. The percent of decrease

reaches more than 12%, even up to the top 24.42% on the 16th day. The effect can last for longer time and also be better than that of CGRP protein.

Key words calcitonin gene-related peptide, spontaneous hypertension rat, gene therapy

创伤渗出液对创伤成纤维细胞增殖的影响

陈荣德 张 艳 朱旭东

(第三军医大学外科研究所, 重庆 400042)

摘要 创伤后不同时期渗出液 (wound fluid, WF) 的质和量的变化, 在很大程度上反映伤口组织的愈合进程. 研究伤口不同天数的 WF 对小鼠伤口组织的成纤维细胞 (mouse wound fibroblast, mWf) 体外增殖能力的影响, 探讨伤口微环境 WF 在调控 mWf 的增殖规律. 用两种培养基进行检测: 1640 培养基-10% FCS (fetal calf serum 胎牛血清)-10% WF 或 1640-1% FCS-10% WF. 发现第 1、3、7 天的 WF 能刺激 mWf 增殖. 在高浓度 (10%) FCS 条件下, 9、11、15 天 WF 对 mWf 生长产生抑制作用. 而同一 WF 在低浓度 (1%) FCS 时导致 mWf 死亡. 结果提示, 在损伤后一周期间伤口微环境能刺激 mWf 增殖, 但伤后更长时间的 WF 使细胞生长受阻. 在创伤愈合晚期的微环境中可能存在一些生长抑制因子.

关键词 细胞增殖, 成纤维细胞, 创伤渗出液, 创伤愈合

学科分类号 Q641

随着创伤愈合进程的发展, 伤口微环境中各类细胞生长调控因子伴随质和量的动态变化, 从而对修复生长产生不同的作用, 伤口渗出液 (wound fluid) 综合反映伤口中各类细胞活动, 它基本上反映了伤口愈合进程的微环境. 本文通过检测伤后不同天数伤口渗出液对成纤维细胞生长的影响, 探讨伤口微环境各类细胞因子在调控修复细胞生长的变化规律, 提供临床用各类细胞生长因子治疗局部伤口的参考依据.

1 材料与方法

1.1 致伤动物与采集伤口渗出液

随机选取健康昆明小鼠 30 只, 雌雄各半, 体重 20~25 g, 分为 6 组. 麻醉、脱毛, 在无菌条件下, 于背部中央沿脊椎垂直方向切一深

达筋膜约 0.5~1 cm 的伤口, 钝性剥离创面上、下两侧的皮肤, 造成皮下囊袋, 放入两块已消毒的聚乙烯醇海绵 (四川维尼龙厂中心实验室特制), 缝合伤口, 伤后第 1、3、7、9、11、15 天后活杀小鼠, 取出海绵, 离心收集伤口渗出液, 过滤除菌, -20℃ 保存.

1.2 伤口成纤维细胞的培养

按本实验室建立的方法培养伤口修复细胞^[1], 约培养 7~9 d, 伤口成纤维细胞可生长融合成片.

成纤维细胞传代及分组. 生长融合成片的细胞, 经 0.25% 胰酶消化 30 s, 倾去消化液. 用 1640-1% FCS 将细胞调制成 1×10^4 个/ml 细胞悬液, 接种 100 μ l 细胞悬液到 96 孔培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 条件下孵育 12 h, 吸去

培养液, 加入 100 μ l 待测液, 按加入的孵育液不同, 将细胞分为两组: 高胎牛血清组, 待测液为 1640-10% FCS 和 1640-10% FCS-10% WF; 低胎牛血清组, 待测液为 1640-1% FCS 和 1640-1% FCS-10% WF.

1.3 细胞存活率及其生长测定

待测液与细胞孵育 48 h 后, 加入 0.5% 10 μ l 的 MTT (四甲基偶氮唑盐), 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h, 再加入 10 μ l 20% SDS, 37 $^{\circ}$ C 保温 18 h, 在酶标仪 (Bio-Rad450) 570 nm 处测定溶液的光吸收值, 同时, 将孵育 48 h 的细胞用苔盼蓝染色, 检测细胞存活率, 两种测定每种测液平行培育 5 份样品检测 ($n=5$).

2 结 果

致伤后不同天数伤口渗出液对成纤维细胞生长影响的测定结果见表 1. 在 1% FCS 时, 第 1、3、7 天伤口渗出液明显刺激细胞增殖 ($P<0.05$), 而在 10% FCS 条件下, 1、3、7 天 WF 促细胞增殖作用不明显 ($P>0.05$), 这可能由于有其他的大量生长因子存在. 在 1%, 10% FCS 条件下, 9、11、15 天 WF 对其细胞生长呈非常明显抑制作用 ($P<0.01$) (图 1). 苔盼蓝染色发现 1% FCS 时的 9、11、15 天 WF 对细胞生长的抑制作用与细胞死亡相关, 与 9、11、15 天 WF 孵育 48 h 的细胞存活率仅分别为 $33\% \pm 7\%$ 、 $31\% \pm 5\%$ 、 $41\% \pm 9\%$.

表 1 伤后不同天数伤口渗出液对成纤维细胞增殖的影响		
天数	A (1% 胎牛血清组)	A (10% 胎牛血清组)
1	$0.258 \pm 0.019^{1)}$	$0.328 \pm 0.014^{4)}$
3	$0.244 \pm 0.017^{1)}$	$0.324 \pm 0.024^{4)}$
7	$0.377 \pm 0.029^{2)}$	$0.325 \pm 0.033^{4)}$
9	$0.053 \pm 0.011^{3)}$	$0.099 \pm 0.012^{3)}$
11	$0.048 \pm 0.009^{3)}$	$0.104 \pm 0.008^{3)}$
15	$0.054 \pm 0.013^{3)}$	$0.118 \pm 0.013^{3)}$
空白	0.159 ± 0.016	0.320 ± 0.017

¹⁾与空白值比较有显著差异, 明显高于空白值 $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$; ³⁾与空白值比较有显著差异, 明显低于空白值 $P<0.01$; ⁴⁾与空白值比较无明显差异, $P>0.05$.

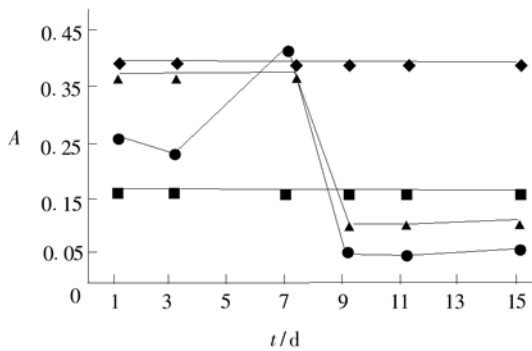


图 1 伤后不同天数伤口渗出液对成纤维细胞生长的影响比较

注: ■——■: 1% FCS 空白; ●——●: 1% FCS; ▲——▲: 10% FCS; ◆——◆: 10% FCS 空白.

3 讨 论

伤口渗出液在一定程度上反映了伤口微环境对愈合进程的影响. 研究通过测试小鼠致伤后不同天数伤口渗出液对成纤维细胞生长影响, 证明早期伤口微环境有利于修复细胞生长, 而晚期伤口微环境抑制细胞生长, 诱导细胞死亡, 反映了伤口愈合过程中细胞生长的生理调控机制.

来源于炎性细胞的多种生长因子是早期伤口微环境利于细胞生长的主要原因, 在其渗出液中已检测到 EGF、bFGF、PDGF、TGF $\alpha\beta$ 、IGF-1、IL-1 等, 其中 TGF α 、bFGF、PDGF、EGF、IGF-1 是成纤维细胞丝裂原, 而 IL-1 可以通过间接作用刺激成纤维细胞生长, 且这些因子在愈合早期渗出液中的含量较高^[2,3].

Desmouliere^[4]利用原位末端法证实伤口愈合后期功能活跃的修复细胞是以细胞凋亡形式消退的, 在某种意义上本研究从体外实验证明了 Desmouliere 的报道, 至于本文中提及的修复细胞是否以凋亡形式死亡尚待进一步研究.

生长抑制是细胞死亡的必需条件, 伤口微环境中参与修复细胞生长负调控的因子可能有 TGF- β 、TNF、IFN- β 等. TNF 可诱导 L929 成纤维细胞死亡; IFN- β 能抑制成纤维细胞合成蛋白质和 DNA, 与丝裂原 PDGF 孵育 6~8 h, 成纤维细胞可转录 IFN- β mRNA, 其高

水平可持续 12 h; 成纤维细胞通过自分泌介质反馈抑制自身生长可能是伤口愈合后期细胞生长抑制的机制之一; Manabu 报道 TGF- β 在体外明显抑制 5d 伤口成纤维细胞的生长^[5], 在 Cromack 的测定中, TGF- β 在伤口渗出液中约伤后 8~9 d 达到峰值, 这些研究提示: 伤口微环境中 TGF- β 量的积累及其他生长刺激因子水平量的下降可能导致伤口愈合过程中修复细胞生长终止的重要机制. 目前, 伤口愈合后期的细胞生长负调控的研究才开始起步, 有关生长抑制因子的作用机理有待深入研究.

参 考 文 献

- 1 朱旭东 (Zhu X D). 伤口修复细胞的简易培养方法. 中国修复重建外科杂志 (Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery), 1994, 8 (3): 157~158
- 2 Ono L. Evaluation of cytokine in donor site wound fluids. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1994, 28 (4): 369~372
- 3 Grayson L S. Quantitation of cytokine level in skin graft donor site wound fluid. Burns, 1993, 19 (5): 401~405
- 4 Desmouliere A. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. Am J Pathol, 1995, 146 (1): 56~60
- 5 Manabu F. The mitogenic activity of peritoneal tissue repair cell: control by growth factors. J Surg Res, 1989, 47 (1): 45~48

The Effect of Wound Fluid on the Proliferation of Wound Fibroblast. CHEN Rong-De, ZHANG Yan, ZHU Xu-Dong (The Research

Institute of Surgery, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China).

Abstract The change of quality and quantity of wound fluid during different stages could reflect the course of wound healing in a certain degree. The effect of WF taken from different post wounding days on the proliferation of mouse wound fibroblast (mWFB) was studied, and the regulatory role of wound microenvironment on the growth of mWFB was also investigated. It was performed in two kinds of culturing medium: 1640-1% FCS-10% WF. It was found that WF obtained from postwounding days 1, 3 and 7 could effectively stimulate the proliferation of mWFB, while, WF obtained from postwounding days 9, 11 and 15 with 10% FCS presented inhibitory effects on the proliferation of mWFB. However, the same WF with 1% FCS may induce death of mWFB. The results showed that wound microenvironment could stimulate the proliferation of mWFB within the first week after wounding, and that cell growth may be arrested by WF of the wound during the second week. These might be some growth inhibitory factors in the wound microenvironment of later stage during wound healing.

Key words cell proliferation, fibroblast, wound fluid, wound healing

(上接第 542 页, Continued from page 542)

Studies on the Techniques of Water Control in Enzymatic Esterification in Organic Solvent. CUI Yu-Min, WEI Dong-Zhi, YU Jun-Tang (State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China).

Abstract Water content is a crucial factor influencing the enzyme activity in organic solvent. The techniques of water control were investigated in the esterification of Naproxen

catalyzed by lipase from *Candida cylindracea* in isooctane/octanol system. The results demonstrated that the salt hydrate pair — $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{SO}_4$ had the capability of buffering water. The sensibility of enzyme to water was decreased by adsorbing the lipase on celite — an apolar carrier. In addition, Esterification could be improved effectively by adding molecular sieve to remove the byproduct-water.

Key words enzymatic reaction in organic solvent, esterification, naproxen, water control