

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.001

抑郁复合皮肤创伤对创面微血管及成纤维细胞生长的影响*

周明芳¹,程天民²,冯正直^{3△}(第三军医大学:1. 护理学院临床护理学教研室;2. 军事预防医学院全军复合伤研究所;
3. 心理学院,重庆 400038)

摘要:目的 观察抑郁复合皮肤创伤对创面新生微血管及成纤维细胞生长的影响。方法 根据建模方法将 144 只 SD 大鼠随机分为单创组、创伤复合抑郁组、抑郁复合创伤组,每组 48 只,制备抑郁模型。分别采用 CD34、Vimentin 抗体行免疫组织化学标记血管内皮细胞及成纤维细胞,高倍显微镜下计数。结果 伤后第 3 天单创组和创伤复合抑郁组大鼠的创面微血管数显著高于抑郁复合创伤组($P < 0.05$),第 21 天时各组间微血管计数无显著差异;伤后第 3 天抑郁复合创伤组创面成纤维细胞虽少于单创组和创伤复合抑郁组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);创伤后第 18~21 天,3 组间成纤维细胞数量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 抑郁复合皮肤创伤时,创面肉芽组织中微血管及成纤维细胞的生长合成可被显著抑制,使伤口愈合延缓。

关键词:抑郁;成纤维细胞;微血管;创面愈合

中图分类号:R264

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)02-0145-03

Effect of depression combined with skin injury on wound capillary angiogenesis and fibroblast growth*

Zhou Mingfang¹,Cheng Tianming²,Feng Zhengzhi^{3△}(1. Department of Clinic Nursing of Nursing College, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
2. Institute of Combined Injury; 3. Psychology College, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of depression combined with skin injury on wound capillary angiogenesis and fibroblast growth. Methods Totally 144 Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into 3 groups; simple wound group, depression combined wound group, wound combined depression group, 48 mice in each of the 3 groups. Immunohistochemical staining was used to label vascular endothelial cell and fibroblast with CD34 and Vimentin antibody respectively, then counted by the high resolution microscope. Results Compared with other 2 groups, the number of micro vascular and fibroblast in the wound granulation tissue were lower in depression combined with mechanical skin injury group at the first stage(3 days after injury)($P < 0.05$), and faded more slowly in the later stage(at the 21st day)($P > 0.05$). There was significant difference between 3 groups in the number of fibroblast during the 18th day and 21st day($P < 0.05$). Conclusion Depression combined with skin injury could significantly inhibit the capillary angiogenesis and fibroblast growth in the wound granulation tissue, thereby delaying wound healing.

Key words: depression; fibroblast; microvessel; wound healing

创面愈合是一个复杂的生物学过程,离不开多种组织和修复细胞、细胞外基质及各种调控因素的参与,机体需在维护其自身内环境稳定的同时,通过自身的再生能力使其表面连续性和完整性得以修复^[1-2]。肉芽组织的形成是创面愈合的关键步骤之一,其质量的好坏直接影响着创面的修复愈合程度及其预后,而肉芽组织的本质是丰富的成纤维细胞以及大量的微血管。通过对新生微血管以及成纤维细胞的观察可以评价皮肤创面的愈合情况。笔者前期研究已经证实,抑郁可显著降低创面组织羟脯氨酸的合成,减少胶原纤维的沉积^[3],延缓大鼠皮肤的创面愈合^[4],但未对肉芽组织中微血管及成纤维细胞的变化情况进行观察。因此,本研究拟动态观察抑郁复合皮肤创伤条件下,大鼠创面组织中新生微血管及成纤维细胞的消长情况,为进一步揭示抑郁影响创面愈合的可能机制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 雄性大鼠 144 只,体质量 170~200 g,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,根据建模方法随机分为单纯皮肤创伤组(单创组)、创伤复合抑郁

组和抑郁复合创伤组,每组 48 只。

1.1.2 主要仪器和试剂 普通切片机、Olympus 光学显微镜、显微照相系统、1%戊巴比妥钠、10%中性福尔马林、CD34 多克隆抗体(武汉博士德公司)、Vimentin 抗体、DAB 显色试剂盒、SP 免疫组织化学试剂盒(北京中杉生物技术公司)等。

1.2 方法

1.2.1 模型的制备 抑郁模型的制备参照文献^[5]进行,包括电击足底(36 V 交流电,每隔 1 min 刺激 1 次,每次刺激 10 s,共 20 次)、45 °C 热刺激或 4 °C 冰水游泳 5 min(创伤复合抑郁组不接受冰水游泳)、水平摇晃 15 min、夹尾 1 min、禁食 24 h、禁水 24 h、束缚 24 h、昼夜颠倒等共 9 种刺激,每日 1 种,共 18 d。为使刺激具有不可预见性,随机安排刺激顺序及刺激时间。皮肤创伤制备方法如下:麻醉并剃净大鼠背部正中毛发,用自制圆形不锈钢打孔器切除其背部直径 2.2 cm 全层皮肤。抑郁复合创伤组在完成 18 d 的慢性刺激后,于第 19 天行皮肤造创;创伤复合抑郁组则在制备皮肤创伤后次日开始接受随机安排的慢性刺激 18 d。

1.2.2 创面组织微血管、成纤维细胞计数方法 选取 8 个时

* 基金项目:军队“十一五”科技攻关项目(06G076)。 作者简介:周明芳(1972—),副教授,博士,主要从事战创伤护理、母婴护理方向研究。 △ 通讯作者, Tel: (023)68752269; E-mail: fzz@mail.tmmu.com.cn。

相点,分别为伤后 1、3、5、7、10、14、18、21 d,取创缘与正常交界处皮肤组织,10%中性福尔马林固定标本后行石蜡包埋切片。分别采用 CD34、Vimentin 抗体行免疫组织化学标记。微血管判断方法:独立的典型血管内皮细胞着色但尚未形成管腔者、与邻近微血管或其他组织分界清楚的任一染成棕黄或棕褐色的单一内皮细胞或内皮细胞簇,作为一条微血管计数。低倍显微镜下随机选择 5 个血管内皮细胞、成纤维细胞染色密集区域,然后在高倍视野下计数所选 5 个区域,取均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

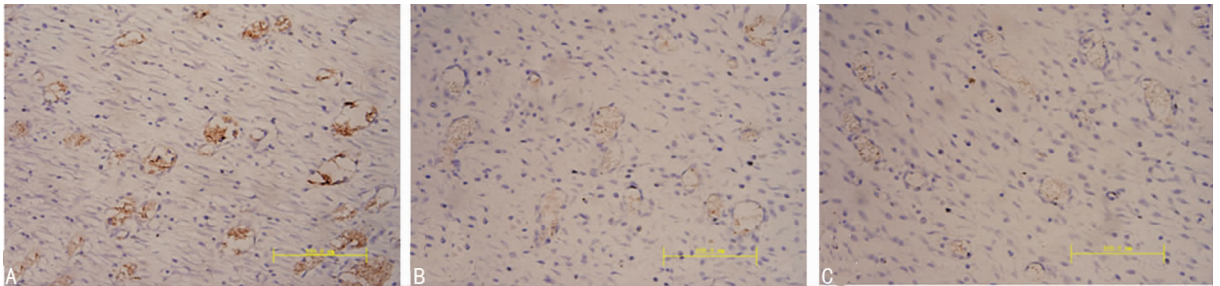
2.1 创面局部微血管数比较 CD34 抗体免疫组织化学检测显示,伤后第 3 天起,单创组和创伤复合抑郁组创面微血管数即显著高于抑郁复合创伤组 ($P < 0.05$);而创伤复合抑郁组与单创组在伤后 7 d 内差异无统计学意义 ($P > 0.05$),该两组间微血管计数在伤后第 10 天呈现差异有统计学意义 ($P < 0.01$);各组创面微血管生长达高峰的时相点为伤后 14 d,其

中,以单创组最多,抑郁复合创伤组最少。其后的微血管消退速度以创伤复合抑郁组和抑郁复合创伤组较慢,单创组较快;3 组的微血管数在伤后第 21 天比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1,图 1。

表 1 各组创面微血管计数结果 ($\bar{x} \pm s$, 个/高倍视野)

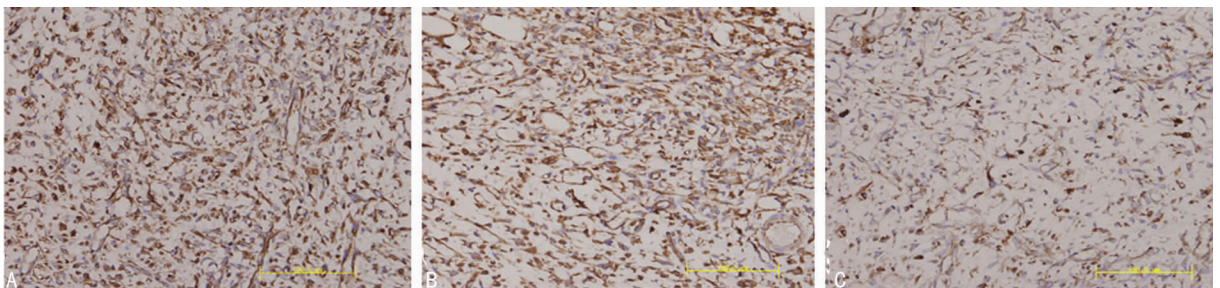
时间	单创组 (n=48)	创伤复合抑郁组 (n=48)	抑郁复合创伤组 (n=48)
第 3 天	5.00 ± 1.41	5.33 ± 1.03 ^d	3.17 ± 0.75 ^b
第 5 天	9.33 ± 1.86	9.00 ± 2.00 ^d	6.17 ± 1.17 ^b
第 7 天	14.00 ± 1.41	12.50 ± 1.87 ^e	9.33 ± 1.03 ^c
第 10 天	18.33 ± 1.51 ^a	15.33 ± 1.75 ^d	12.67 ± 1.21 ^c
第 14 天	24.17 ± 1.72 ^a	19.67 ± 2.07	17.67 ± 1.75 ^c
第 18 天	14.33 ± 2.42	13.50 ± 2.51	10.83 ± 1.47 ^b
第 21 天	7.33 ± 1.97	7.50 ± 2.17	5.33 ± 1.63

^a: $P < 0.01$,与创伤复合抑郁组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与单创组比较;^d: $P < 0.05$,^e: $P < 0.01$,与抑郁复合创伤组比较。



A: 单创组; B: 创伤复合抑郁组; C: 抑郁复合创伤组。

图 1 CD34 抗体免疫组织化学检测创伤后 10 d 各组创面微血管生长情况 ($\times 400$)



A: 单创组; B: 创伤复合抑郁组; C: 抑郁复合创伤组。

图 2 Vimentin 免疫组织化学检测创伤后 7 d 各组创面成纤维细胞生长情况 ($\times 400$)

表 2 各组创面成纤维细胞计数结果 ($\bar{x} \pm s$, 个/高倍视野)

时间	单创组 (n=48)	创伤复合抑郁组 (n=48)	抑郁复合创伤组 (n=48)
第 3 天	24.00 ± 5.69	23.33 ± 6.25	16.17 ± 4.92
第 5 天	340.00 ± 64.80	319.67 ± 72.55 ^e	217.67 ± 54.16 ^c
第 7 天	796.17 ± 87.51	682.00 ± 108.42 ^f	395.50 ± 94.81 ^d
第 10 天	1 277.50 ± 141.26 ^a	1 056.83 ± 107.13 ^f	733.33 ± 128.73 ^d
第 14 天	731.67 ± 66.19	786.50 ± 61.78 ^f	1 071.00 ± 89.55 ^d
第 18 天	258.67 ± 72.88 ^a	377.50 ± 62.27 ^e	519.00 ± 81.98 ^d
第 21 天	23.33 ± 6.71 ^b	128.17 ± 41.91 ^e	79.17 ± 25.87 ^c

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与创伤复合抑郁组比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P < 0.01$,与单创组比较;^e: $P < 0.05$,^f: $P < 0.01$,与抑郁复合创伤组比较。

2.2 创面成纤维细胞计数结果 Vimentin 免疫组织化学检测显示,3 组大鼠伤后第 1 天,创面局部均未见明显成纤维细胞增殖;伤后第 3 天,单创组和创伤复合抑郁组创面局部成纤维细胞数虽多于抑郁复合创伤组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);伤后第 5~10 天,此差异进一步增大,单创组和创伤复合抑郁组成纤维细胞数显著多于抑郁复合创伤组,而单创组和创伤复合抑郁组间在伤后第 10 天才出现显著差异 ($P < 0.05$);伤后第 18~21 天,3 组间成纤维细胞数量比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2,图 2。

3 讨论

3.1 抑郁复合皮肤创伤对创面微血管生长的影响 良好的血运是创面修复得以顺利进行的必要条件,血管发生是创面愈合过程的中心环节之一。新生微血管作为肉芽组织的重要组成

成分,在创面愈合过程中有着非常重要的作用^[6]。创面愈合过程中,组织所需的氧气和营养物质不仅需由新生微血管提供,同时,它还通过促进巨噬细胞、血管内皮细胞等分泌促血管生长因子,从而缩短创面愈合时间,加快创面愈合速度^[7]。血管内皮细胞标记物 CD34 目前被广泛应用于血管内皮细胞的标记^[8-10]。因此,本研究中的新生血管标记采用 CD34 多克隆抗体进行检测,结果表明:各组创面新生肉芽组织中的毛细血管数自伤后 3 d 起均有增加,但以抑郁复合创伤组增加最少;各组创面微血管生长高峰时间为伤后 14 d,同样,以抑郁复合创伤组最少,单创组最多;其后,各组肉芽组织中微血管数量逐渐减少,与单创组比较,其余两组的微血管消退速度相对较慢。出现这一现象的原因,可能是由于单创组的创面愈合速度短于创伤复合抑郁组及抑郁复合创伤组。在伤后 18 d 左右,单创组的创面已基本愈合完毕,肉芽组织逐渐发展为正常皮肤组织,过剩的毛细血管网退化之以正常小血管,而创伤复合抑郁组及抑郁复合创伤组尚处在创面愈合过程中,局部组织仍需得到更多血液供给。

3.2 抑郁复合皮肤创伤对创面成纤维细胞增殖的影响 成纤维细胞作为肉芽组织的主要成分细胞,同微血管一样,在创面愈合过程中扮演着重要角色^[11]。有学者称其为创面修复的建造师、工程师和管理员,它既可分化为肌成纤维细胞,通过收缩创面、分泌细胞外基质蛋白和多种生长因子参与创面修复,也可生成胶原纤维、弹性纤维和网状纤维,并分泌胶原酶等参与肉芽形成和创面修复后的组织改建过程^[12-13]。因此,成纤维细胞一直是创面修复领域的研究热点^[14-15]。本研究结果表明,自伤口愈合起始阶段,单创组和创伤复合抑郁组大鼠创面局部成纤维细胞数量就高于抑郁复合创伤组。而与单创组及创伤复合抑郁组伤后 10 d 创面成纤维细胞增殖达高峰的时间相比,抑郁复合创伤组则推后了 4 d,至伤后 14 d 才达高峰,增长速度显著慢于其余两组。伤口愈合早期,成纤维细胞数量在创伤复合抑郁组和单创组间未出现差异的原因,可能是由于刺激时间较短,尚不足以造成大鼠的抑郁状态所致。随着刺激次数增加及刺激时间的延长,大鼠逐渐出现抑郁,创面成纤维细胞的变化才得以体现。

创面愈合是炎性细胞、修复细胞及细胞外基质等多因素共同参与的复杂的生物学过程^[1-14]。本研究结果初步证实抑郁复合皮肤创伤可使创面微血管及成纤维细胞的生长受到抑制,这可能是抑郁造成创面愈合困难的重要原因之一,但对于确定其影响创面愈合的机制,还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 严龙宗,陈斌.慢性创面愈合的细胞治疗[J].中国组织工程研究,2013,17(46):8096-8101.
- [2] 付小兵,程飏,盛志勇.有关创伤修复与组织再生的现代认识[J].中国危重病急救医学,2002,14(2):67-68.

- [3] 周明芳,程天民,冯正直.抑郁对大鼠创面愈合过程中胶原含量的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(13):1293-1295.
- [4] 周明芳,程天民,冯正直.抑郁复合皮肤创伤对大鼠创面愈合的影响[J].创伤外科杂志,2007,9(6):537-539.
- [5] 周明芳,冯正直,程天民.慢性应激抑郁复合皮肤创伤对大行为及体重的影响[J].创伤外科杂志,2007,9(2):154-156.
- [6] 刘继松,方勇,姚敏,等.重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子对烫伤大鼠创面愈合及新生血管化的影响[J].蚌埠医学院学报,2012,37(1):17-19.
- [7] Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, et al. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(1):8-12.
- [8] Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, et al. Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9:95-102.
- [9] Muhammadnejad S, Muhammadnejad A, Haddadi M, et al. Correlation of microvessel density with nuclear pleomorphism, mitotic count and vascular invasion in breast and prostate cancers at preclinical and clinical levels[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(1):63-68.
- [10] 徐敏,李洁华,许丹,等.EphA2、CD34、D2-40 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及其与临床病理的关系[J].重庆医学,2011,40(11):1055-1059.
- [11] 刘倩,吴小翎,罗红春.MMP-2 在胃癌组织中的表达及其与微血管生成和淋巴结转移的关系[J].重庆医学,2012,41(13):1262-1265.
- [12] Li B, Wang JH. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement[J]. J Tissue Viability, 2011, 20(4):108-120.
- [13] Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population; the central role of fibroblasts in creating a unique tissue[J]. Anat Rec, 1996, 245(2):327-341.
- [14] 陈君,卓桑,秦海洗.复方愈伤散对糖尿病大鼠创面愈合影响的实验研究[J].广西中医药大学学报,2013,16(3):1-3.
- [15] Feng Z, Wagatsuma Y, Kikuchi M, et al. The mechanisms of fibroblast-mediated compaction of collagen gels and the mechanical niche around individual fibroblasts[J]. Biomaterial, 2014, 35(28):8078-8091.

(收稿日期:2014-08-18 修回日期:2014-10-17)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体,包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本,样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平,随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测,则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值,样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值,样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则,即需要采用随机的抽样方法,保证总体中每个个体被选取的机会相同。