

# 辐射对伤口巨噬细胞调节成纤维细胞增殖的影响及苯妥因钠的作用

宋述强\* 程天民

(\*广州军区广州总医院临床药理科 510010)

(第三军医大学防原医学教研室、复合伤研究室 重庆 630038)

巨噬细胞(macrophage MΦ),在创伤愈合中起重要的作用,它除了能清除创伤局部的受损细胞、纤维蛋白等基质成分和病原体以外,还释放多种生长因子如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子-β(TGF-β)等调控组织修复<sup>[1]</sup>。而创面的修复最终是以成纤维细胞(Fibroblast FBS)的增殖与胶原的合成完成的<sup>[2]</sup>。本实验直接从大鼠切口获取MΦ和FBS,通过体外共同培养,研究MΦ对FBS增殖的调节作用,以及电离辐射全身照射、局部照射后的影响和苯妥因钠的作用。

## 材料与方 法

### 1. 动物

Wistar大鼠:雄性,218±23.5g,四川省中药研究所提供。

### 2. 试剂

培养液:DMEM培养基(Gibco公司),含5%的胎牛血清;<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR);中国科学院原子能研究所;胰酶;Sigma公司。苯妥因钠(Phenytoin sodium PS);江苏省盐城制药厂。

### 3. 创伤模型

大鼠分三大组,即创伤对照组(Control Wound CW),全身辐射创伤组(Systemic radiation wound SRW),局部辐射创伤组(Local radiation wound LRW),每组又分生理盐水对照组(Control)和PS用药组。SRW组大鼠装在一特制的笼子,在离<sup>60</sup>Co源1.0米处接受γ射线6Gy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2×8cm<sup>2</sup>的皮肤皱折,在离<sup>60</sup>Co源1.0米处接受γ射线20Gy的照射,这样背部皮肤形成4×8cm<sup>2</sup>的局部辐射区域。正常大鼠和辐射

后(不超过4h)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7cm的全皮层切口,将10个直径1.0cm,厚0.4cm的聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol PVA)海绵置入切口皮下后缝合<sup>[3]</sup>。PVA海绵置入前经流水漂洗过夜,而后煮沸30min消毒,置入时先浸入无菌的生理盐水(对照)或10mg/ml的PS(1.0ml/10个海绵)。

### 4. 伤口MΦ和FBS的收集<sup>[3]</sup>

在伤后3、5、8、13天,取出PVA海绵,从中收集MΦ和FBS。实验用FBS从伤后第8天的PVA海绵中收集,一般经培养传3—5代。

### 5. MΦ功能测定(伤后第5天的MΦ)

MΦ吞噬功能以其吞噬中性红能力测定,其值以酶联检测仪测540nm处的OD值表示<sup>[4]</sup>。MΦ释放肿瘤坏死因子-α(TNFα)和白介素-1(IL-1)的测定分别用L929细胞毒活性法<sup>[5]</sup>和小鼠胸腺细胞增殖法测定<sup>[6]</sup>,结果分别以对L929细胞毒的百分率和<sup>3</sup>H-TdR的掺入率(cpm值)表示。

### 6. 伤口FBS增殖的测定

每组各取第三代FBS1×10<sup>5</sup>,培养24h,加入<sup>3</sup>H-TdR9.25×10<sup>4</sup>Bq,继续培养18h,洗涤两次后用含0.25%胰酶的培养液重新悬浮细胞,将细胞收集于玻璃纤维素膜(上海虹光49号)上,测定<sup>3</sup>H-TdR掺入量,表示FBS的增殖能力。

### 7. MΦ对伤口FBS增殖的调节作用<sup>[7]</sup>

取1×10<sup>5</sup>FBS加入培养板预先培养4小时后,分别加入同组的、不同相的MΦ2×10<sup>5</sup>个,培养24h,再加入<sup>3</sup>H-TdR9.25×10<sup>4</sup>Bq,继续培养18h,洗涤两次后用含0.25%胰酶的培养液重新悬浮细胞,将细胞收集于玻璃纤维素膜(上海虹光49号)上,测定<sup>3</sup>H-TdR掺入量,表示FBS的增殖活性。

## 结 果

### 1. 正常伤口MΦ对FBS增殖的调节

表1 辐射后伤口成纤维细胞(FBS)增殖、巨噬细胞功能、以及巨噬细胞调节成纤维细胞增殖的变化及苯妥因钠的作用

(每组动物数  $n=5$ , \*\* $P<0.01$  SRW 和 LRW 组中对照组与 CW 组中对照组比较; \*\* $P<0.01$  同组中 PS 与对照组比较)

	成纤维细胞与巨噬细胞共同培养后 FBS 增殖(cpm值)	成纤维细胞单独培养的增殖活性(cpm 值)	巨噬细胞功能		
			MΦ 吞噬功能(OD 值)	TNF(L 929 细胞毒%)	IL-1(cpm值)
CW	对照	6728±415	0.36±0.02	30.1±1.4	2854±216
	PS	9824±384**	0.49±0.03**	46.3±1.7**	4487±266**
SRW	对照	3897±327**	0.22±0.04**	15.6±1.5**	1225±183**
	PS	6174±327**	0.35±0.03**	26.7±1.5**	2037±245**
LRW	对照	4654±264**	0.30±0.05	28.6±2.5	3141±302
	PS	6528±278**	0.42±0.03**	42.7±1.3**	4283±196**

正常伤口 3、5、8、13 天的 MΦ ( $2 \times 10^5$ ) 与 FBS ( $1 \times 10^4$ ) 共同孵育后, FBS 增殖活性分别为  $3675 \pm 323$ 、 $6728 \pm 415$ 、 $5274 \pm 286$ 、 $2893 \pm 346$  (cpm 值), 第 5、8 天的 MΦ 作用明显高于第 3、13 天的作用。

## 2. 辐射对伤口 MΦ 调节 FBS 增殖的影响及 PS 的作用

全身辐射和局部辐射后, 伤后 5 天的 MΦ 与 FBS 共同孵育后, FBS 增殖活性都显著的下降, 而 PS 作用后, FBS 的增殖活性都有显著的提高(表 1)。

## 3. CW 组、SRW 组、LRW 组伤口 FBS 增殖能力的比较

与 CW 组比较, 伤口第 8 天 FBS 增殖能力在 LRW 组明显降低, 而 SRW 组无明显差别。局部应用 PS 后, CW 组、SRW 组、LRW 组 FBS 的  $^3\text{H-TdR}$  掺入量与非用药的各组比较无显著差别(表 1)。

## 4. CW 组、SRW 组、LRW 组伤口 MΦ 功能比较

SRW 组第 5 天伤口 MΦ 吞噬功能及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 的释放与 CW 组比较都显著的下降, 而 LRW 组 MΦ 功能无明显降低。PS 对各组的 MΦ 功能都明显加强(表 1)。

## 讨 论

MΦ 在创伤愈合中的不同阶段可分泌不同种类或不同含量的介质, 对 FBS 的增殖起抑

制或加强的作用<sup>[7,8]</sup>。实验结果表明, 伤口 MΦ 调节 FBS 的增殖, 在第 5、8 天的 MΦ 刺激 FBS 增殖的作用最明显, 在创伤初期和后期, MΦ 的此作用较弱。我们注意到 FBS 在与 MΦ 共同培养后的增殖水平比 FBS 单独培养的增殖水平低, Fukasawa 等的实验中也有此现象, 并认为是由于 MΦ 同时还释放有许多 FBS 增殖的负调节因子的原因<sup>[7]</sup>。

在核爆炸和平时核事故时的复合伤患者及进行放疗和化疗的癌症病人, 辐射是影响创伤愈合的重要因素, 无论全身辐射还是局部辐射都明显延迟创伤愈合<sup>[9]</sup>。我们的实验结果表明, 6 Gy 全身辐射和 20 Gy 局部辐射, MΦ 对伤口 FBS 增殖的调节能力都明显下降, 但两者的机理并不一样。局部辐射并不影响机体造血系统, 伤口 MΦ 的功能无明显影响, 但可直接损害 FBS, 我们的实验表明在局部辐射创伤组, FBS 的增殖能力明显下降, 这与大多数研究结果一致<sup>[10]</sup>。因此, 在 MΦ 和 FBS 共同培养后, FBS 的增殖活性比未辐射组低。在 6 Gy 全身辐射时, 局部皮肤受照射量更小, 对伤口局部 FBS 的增殖并无明显影响, 但由于造血系统受抑, 伤口炎症反应减轻, MΦ 的吞噬功能、TNF  $\alpha$  和 IL-1 的释放都明显下降, 使其对 FBS 增殖的调节能力下降。

苯妥因钠是一抗癫痫、抗心律失常药, 近来的研究表明它能缩短创面愈合时间、促进肉芽组织生长、降低创面细菌污染, 对多种病因

如战伤、烧伤以及麻风病引起的皮肤溃疡都有显著的疗效<sup>[11]</sup>。本实验结果表明 PS 对正常伤口 MΦ 调节 FBS 增殖的能力及 MΦ 的功能都明显提高,也能部分逆转局部辐射和全身辐射的影响。但 PS 局部应用后的各组伤口 FBS 在体外的增殖并无明显增加, Vijayasingham 等体外研究也证实 PS 对皮肤 FBS 的增殖和胶原合成并无直接作用<sup>[12]</sup>。PS 能增强各组伤口 MΦ 的吞噬功能和炎性介质的释放,说明苯妥因钠增强 MΦ 调节 FBS 增殖能力与其对 MΦ 的作用有关。

### 摘 要

实验以大鼠背部置入聚乙烯醇海绵的切口伤为模型,直接从切口获取 MΦ 和成纤维细胞 (FBS),通过体外共同培养,研究了电离辐射全身照射、局部照射对 MΦ 调节 FBS 增殖的影响,以及苯妥因钠 (PS) 的作用。结果表明 6 Gy 全身辐射和 20 Gy 局部辐射后,伤口 MΦ 调节伤口 FBS 增殖的能力都显著的下降,但局部辐射使伤口 FBS 的增殖能力显著的下降,而全身辐射使伤口 MΦ 的功能明显的下降; PS 能增强 MΦ 功能及其调节 FBS 增殖的能力,同时部分逆转局部辐射和全身辐射的影响。说明全身辐射和局部辐射都造成伤口 MΦ 调节 FBS

增殖能力的降低,但两者机制不同; PS 能通过加强 MΦ 功能部分逆转局部辐射和全身辐射的这种影响。

**关键词:** 辐射 巨噬细胞 成纤维细胞  
苯妥因钠

### 参 考 文 献

- [1] Cromack, D. T., et al., 1990, *J. Trauma.*, 30: s 129—133.
- [2] Ehrlich, H. P., 1988, *Eye.*, 2 (pt 2): 149—153.
- [3] Mateo, R. B., et al., 1994, *Am. J. Physiol.*, 226: R 1840—1844.
- [4] 陆正武等, 1994, *基础医学与临床*, 14: 351—354.
- [5] Flick, D. A., et al., 1984, *J. Immunol. Methods.*, 68: 167—175.
- [6] 杨四旬等, 1989, *上海免疫学杂志*, 9: 363—365.
- [7] Fukasawa, M., et al., 1987, *J. Surg. Res.*, 43: 513—520.
- [8] Rodgers, K. E., et al., 1992, *J. Surg. Res.*, 53: 542—548.
- [9] Vegesna, V., et al., 1993, *Radiat. Res.*, 135: 421—433.
- [10] Rudolph, R., et al., 1988, *Plast. Reconstr. Surg.*, 82: 669—674.
- [11] Smith, B., et al., 1988, *Int. J. Dermatol.*, 27: 528—530.
- [12] Vijayasingham, S. M., et al., 1991, *Br. J. Dermatol.*, 125: 136—139.

## THE EFFECT OF IRRADIATION ON THE MODULATORY ACTIVITIES OF FIBROBLASTS PROLIFERATION BY WOUND MACROPHAGES; THE ACTION OF PHENYTOIN SODIUM

SONG Shu Qiang CHENG Tian Min

(The Third Military Medical University, Department of Radiation Medicine, Chongqing 630038)

### ABSTRACT

Macrophages (MΦ) and fibroblasts (FBS) were obtained from the polyvinyl alcohol sponges which were implanted in a rat dorsal incision. The modulation of FBS proliferation by MΦ, and the effect of irradiation and phenytoin sodium (PS) on that were investigated by the co-culture of FBS and MΦ. It was found that the modulatory activities of FBS proliferation by MΦ were decreased by systemic irradiation and local irradiation. The ability of FBS proliferation was decreased by local irradiation, and the function of MΦ was decreased by systemic irradiation. PS increased the modulatory activities and reversed the effect of irradiation on it. The results indicated that both systemic and local irradiation impaired the modulatory ability of MΦ to FBS proliferation in different way, PS increased the modulatory ability of MΦ to FBS proliferation by improving the function of MΦ.

**Key words:** Irradiation Macrophage Fibroblast Phenytoin sodium