

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.06.005  
文章编号: 1005-8982(2017)06-0023-04

## 罗哌卡因对皮肤损伤愈合及 GM-CSF 表达的影响\*

伍小敏, 蔡放, 王宏法, 王文元, 沈社良, 胡双飞  
(浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014)

**摘要:目的** 观察罗哌卡因对皮肤损伤小鼠皮肤愈合及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)表达的影响。**方法** 将小鼠随机分为实验组(罗哌卡因)和对照组(生理盐水),两组小鼠创面进行 Masson 染色,测定 GM-CSF 浓度和羟脯氨酸水平,记录创面的愈合率和愈合时间。**结果** 第 5 天,实验组绿染胶原纤维沉积量较对照组多;第 10 天,实验组较对照组创缘上皮增生明显。实验组小鼠第 5 天 GM-CSF 含量高于对照组 ( $P < 0.05$ )。实验组小鼠创面愈合时间短于对照组 ( $P < 0.05$ )。实验组大鼠第 5 天和第 10 天创面愈合比例高于对照组 ( $P < 0.05$ )。实验组大鼠第 5 天和第 10 天创面羟脯氨酸水平高于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 罗哌卡因局部浸润可以促进小鼠全层皮肤损伤的愈合,其机制可能与局部浸润罗哌卡因能够促进 GM-CSF 的表达有关。

**关键词:** 局部浸润;罗哌卡因;皮肤愈合;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子  
**中图分类号:** R614 **文献标识码:** A

## Effect of local infiltration of Ropivacaine on healing of full-thickness skin lesion and expression of GM-CSF in mice\*

Xiao-min Wu, Fang Cai, Hong-fa Wang, Wen-yuan Wang, She-liang Shen, Shuang-fei Hu  
(Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of Ropivacaine on the healing of skin and the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in mice with skin injury. **Methods** The mice were randomly divided into experimental group (Ropivacaine group) and control group (saline group). The wounds of mice in the two groups were stained by Masson staining. The concentrations of GM-CSF and hydroxyproline were determined. The wound healing rate and healing time were recorded. **Results** On the 5th day, the amount of green-stained collagen fibers in the experimental group was larger than that in the control group. On the 10th day, hyperplasia of margin epithelium in the experimental group was more obvious than that in the control group. The level of GM-CSF in the experimental group was significantly higher than that in the control group on the 5th day ( $P < 0.05$ ). The wound healing time in the experimental group was shorter than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The wound healing ratio and the hydroxyproline level of the wound in the experimental group were higher than those in the control group on the 5th and the 10th day ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Local infiltration of Ropivacaine can promote the healing of full-thickness skin lesions in mice, and the mechanism may be related to the promotion of GM-CSF expression.

**Keywords:** local infiltration; Ropivacaine; skin healing; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

术后镇痛有多种模式,伤口浸润镇痛不良反应少,局部麻醉药物中毒的发生率低,价格低廉,操作简单,在临床中被广泛应用<sup>[1-2]</sup>。但是有研究发现,局部麻醉药物有引起软骨溶解的风险<sup>[3]</sup>。其是否影响伤

口愈合尚不清楚。多种炎症因子参与伤口愈合,局部麻醉药物具有抗炎作用<sup>[4-5]</sup>。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 作为生长因子,具有多种功能,在创

收稿日期:2016-11-16

\* 基金项目:浙江省自然科学基金 No:LY15H090014)

面修复过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。本研究罗哌卡因是否对伤口 GM-CSF 的表达及创面愈合产生影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂

雄性、清洁级、6 周龄、昆明小鼠购自浙江大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(浙)2010-0177,体重 24~32 g。罗哌卡因 规格:75 mg/10 ml,无锡阿斯利康有限公司),二喹啉甲酸 bichononic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、鼠 GM-CSF 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 实验试剂盒购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分组** 42 只小鼠按照随机数字法分为实验组 (罗哌卡因) 和对照组 (生理盐水), 每组 21 只小鼠。

**1.2.2 小鼠全层皮肤损伤模型的复制** 两组小鼠采用戊巴比妥钠麻醉成功后, 固定到实验台上, 硫化钠脱去背部毛并消毒, 实验组小鼠皮下注射罗哌卡因 (1 ml/kg), 对照组小鼠皮下注射等量生理盐水, 给药后 10 min, 在小鼠背部以脊柱为中线切除全层皮肤 (约 1 cm×1 cm) 至深筋膜, 创面不缝合不包扎。

**1.2.3 制备标本** 分别在建模后第 5 和第 10 天每组选择 7 只小鼠处死, 处死后采用透明膜法测量创面面积, 取包括部分正常创缘的小鼠创面组织标本, 部分用于测定 GM-CSF 水平, 部分用于 Masson 染色, 部分用于羟脯氨酸测定。

**1.2.4 Masson 染色** 将两组小鼠组织在甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片切成 4 μm 厚切片, 脱蜡至水后 Masson 染色, 醋酸水溶液冲洗, 加入磷钨酸 5 min, 醋酸水溶液冲洗, 亮绿染色液染色, 醋酸水溶液冲洗, 染色后细胞核被染成蓝黑色, 胶原纤维被染成绿色, 神经、纤维素、肌肉被染成红色。

**1.2.5 小鼠创面 GM-CSF 测定** 采用 ELISA 法测定创面组织中 GM-CSF 浓度, 具体操作步骤按照鼠 GM-CSF ELISA 试剂盒说明书进行, 小鼠创面组织蛋白量采用 BCA 法进行测定, GM-CSF 浓度用 GM-CSF 的 ELISA 测定值 /BCA 蛋白定量测定值表示。

**1.2.6 小鼠创面愈合率测定** 小鼠处死后采用透明膜法测量创面面积, 计算创面愈合率, 创面愈合率 = [创面初始面积 - 处死时创面面积] / 创面初始面积 × 100%。

**1.2.7 小鼠创面组织羟脯氨酸测定** 羟脯氨酸可反应胶原蛋白沉积量, 称取 10 mg 组织块, 碱性水解液水解, 将 PH 值调整为 6.0~6.8, 紫外分光光度计测定 550 nm 波长处吸光度值, 再将吸光度值转化为羟脯氨酸。

**1.2.8 小鼠创面愈合时间** 每组取 7 只小鼠, 观察并记录创面完全愈合时需要的时间, 创面完全愈合的标准为肉眼看到创面完全上皮化。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用两独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

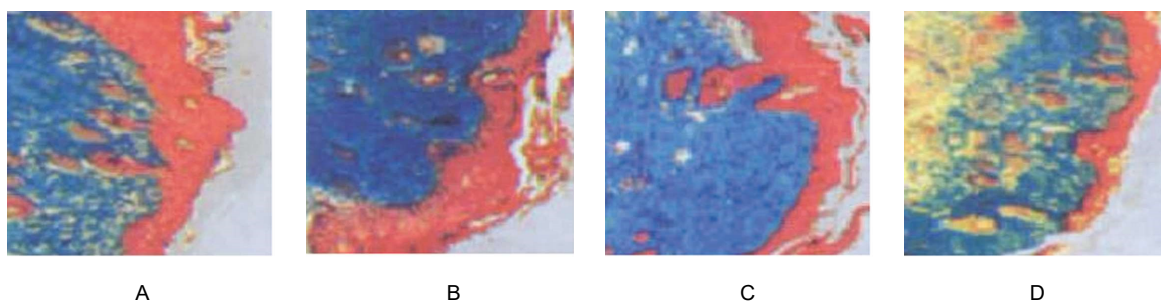
## 2 结果

### 2.1 两组小鼠的创面比较

第 5 天, 实验组和观察组小鼠创面均见绿染胶原纤维沉积, 其中实验组绿染胶原纤维沉积量较对照组多。第 10 天, 两组小鼠创面均出现上皮化, 其中实验组较对照组创缘上皮增生明显。见附图。

### 2.2 两组小鼠的创面 GM-CSF 含量比较

实验组小鼠第 5 天 GM-CSF 含量与对照组比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 实验组小鼠第 5 天 GM-CSF 含量高于对照组。第 1 和第 10 天, 两组小鼠创面 GM-CSF 含量比较, 差异无统计



A: 第 5 天实验组小鼠创面可见绿染胶原纤维沉积; B: 第 10 天实验组小鼠创面可见上皮化; C: 第 5 天对照组小鼠创面可见绿染胶原纤维沉积, 沉积量少于实验组; D: 第 10 天对照组小鼠创面可见上皮化, 创缘上皮增生没有实验组明显

附图 两组小鼠创面比较 (Masson 染色 × 40)

学意义  $P>0.05$ )。见表 1。

### 2.3 两组小鼠的创面愈合时间比较

实验组小鼠创面愈合时间为  $(16.86 \pm 1.12)$  d, 对照组小鼠创面愈合时间为  $(20.93 \pm 1.67)$  d, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=5.107, P=0.000$ ), 实验组小鼠创面愈合时间短于对照组。

### 2.4 两组小鼠的创面愈合率比较

两组大鼠第 5 天和第 10 天创面愈合比例比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 实验组大鼠第 5 天和第 10 天创面愈合比例高于对照组。第 1 天, 两组小鼠创面愈合比例比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 2。

### 2.5 两组小鼠创面的羟脯氨酸水平比较

两组大鼠第 5 天和第 10 天创面羟脯氨酸水平比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 实验组大鼠第 5 天和第 10 天创面羟脯氨酸水平高于对照组。第 1 天, 两组小鼠创面羟脯氨酸水平比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 3。

表 1 两组小鼠创面 GM-CSF 含量比较

( $n=7, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 5 天	第 10 天
实验组	0.093± 0.011	0.291± 0.060	0.297± 0.054
对照组	0.102± 0.014	0.184± 0.024	0.276± 0.047
$t$ 值	0.695	4.321	0.619
$P$ 值	0.783	0.001	0.548

表 2 两组小鼠创面愈合率比较 ( $n=7, \%, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 5 天	第 10 天
实验组	33.24± 0.97	54.75± 1.17	86.76± 2.13
对照组	32.12± 0.85	41.23± 1.45	75.68± 1.57
$t$ 值	0.587	19.046	13.254
$P$ 值	0.873	0.000	0.000

表 3 两组小鼠创面的羟脯氨酸水平比较

( $n=7, \mu \text{g/mg}, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 5 天	第 10 天
实验组	1.14± 0.11	2.53± 0.32	3.74± 0.53
对照组	1.12± 0.09	1.68± 0.16	2.68± 0.30
$t$ 值	0.846	6.107	4.639
$P$ 值	0.748	0.000	0.001

## 3 讨论

伤口愈合包括 3 个时期: 炎症期、粒化增殖期、重塑期。<sup>①</sup> 在伤口愈合炎症期, 被激活的血小板发生

级联反应, 释放趋化因子和生长因子, 白细胞游走杀灭细菌, 角化细胞游走进行表皮再植<sup>[8-9]</sup>。<sup>②</sup> 在伤口愈合粒化增殖期, 产生胶原蛋白, 生成上皮和肉芽组织, 内皮细胞增殖迁移, 形成新的血管, 促进细胞外成分及胶原的分泌, 成纤维细胞增长, 成纤维细胞释放胶原蛋白, 胶原戴白和成纤维细胞的交联增强伤口的张力。<sup>③</sup> 在伤口愈合重塑期, 细胞通过凋亡的方式死亡, 伤口组织影响赖氨酰化氧的分泌和胶原束的大小, 影响胶原蛋白间的交联, 伤口愈合的各个时期互相交融。在皮肤受到损伤后均会发生炎症反应, 炎症反应在伤口愈合中发挥启动作用, 为创面修复的起始阶段<sup>[10-11]</sup>。巨噬细胞和中性粒细胞是炎症反应的主要细胞, 局部麻醉药物能够抑制白细胞迁移, 降低炎症介质水平, 具有明显的抗炎作用, 局部麻醉药物局部给药通过周围神经末梢释放神经肽类物质及组织损伤后的固有细胞参与炎症反应, 罗哌卡因作为局部麻醉药物的一种, 也具有抗炎作用<sup>[12-14]</sup>。

GM-CSF 已成为放疗伴白细胞缺乏患者及严重感染伴免疫功能低下患者的重要治疗方法。其能够刺激造血祖细胞分化增殖和成熟, 并诱导多种细胞的增殖和分化。GM-CSF 可以被成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、树突状细胞、角质化细胞等多种创面修复细胞成分分泌, 可能为创面修复过重中的重要生长因子<sup>[15-16]</sup>。为探讨罗哌卡因对皮肤愈合及 GM-CSF 表达的影响, 本文复制小鼠全层皮肤损伤模型, 观察罗哌卡因对皮肤愈合及 GM-CSF 表达的影响, 通过 Masson 染色观察创面再上皮化程度和胶原纤维沉积情况, 通过组织羟脯氨酸水平测定观察胶原蛋白的沉积量, 结果发现, 罗哌卡因可增加绿染胶原纤维沉积量, 促进创缘上皮增生, 促进创面组织 GM-CSF 分泌, 缩短创面愈合时间, 增加创面愈合率, 增加创面羟脯氨酸水平。本研究结果表明, 罗哌卡因对皮肤愈合具有促进作用, 其机制可能与罗哌卡因能够促进创面组织 GM-CSF 分泌有关:<sup>④</sup> GM-CSF 诱导内皮细胞的迁移和增殖, 促进新生血管形成, 为组织修复提供细胞成分;<sup>⑤</sup> GM-CSF 通过对巨噬细胞、成纤维细胞、朗罕细胞的趋化作用使各种炎症细胞在创面区浸润, 形成肉芽组织, 为创面修复提供必要条件;<sup>⑥</sup> GM-CSF 促进内皮细胞和人角质化细胞迁移和增殖, 加速再上皮化。在伤口愈合过程中, 巨噬细胞和中性粒细胞参与炎症反应, 罗哌卡因作为局部麻醉药物具有抑制炎症反应的作用, 能够减少炎症介质, 抑制白细胞迁移。罗哌卡因还可通过周围

神经末梢释放神经肽类物质参与炎症反应,罗哌卡因的局部浸润使切口处 P 物质浓度增加,P 物质浓度的增加促进成纤维细胞核角蛋白细胞释放细胞因子,GM-CSF 由成纤维细胞、巨噬细胞等分泌,因此罗哌卡因促进 GM-CSF 分泌可能与增加局部 P 物质浓度有关,具体机制需进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] EDMONDSON M A. Local, regional, and spinal anesthesia in ruminants[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2016, 32(3): 535-552.
- [2] HSU G L, ZAID U X, HSIEH C H, et al. Acupuncture assisted local anesthesia for penile surgeries[J]. *Transl Androl Urol*, 2013, 2(4): 291-300.
- [3] WIATER B P, NERADILEK M B, POLISSAR N L, et al. Risk factors for chondrolysis of the glenohumeral joint: a study of three hundred and seventy-five shoulder arthroscopic procedures in the practice of an individual community surgeon[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(7): 615-625.
- [4] AHRENS J, LEFFLER A. Update on the pharmacology and effects of local anesthetics[J]. *Anaesthesist*. 2014, 63(5): 376-386.
- [5] 张蔚青, 万政佐. 持续切口灌注罗哌卡因术后镇痛对局部炎症反应的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(4): 430-432.
- [6] YUAN L, MINGHUA C, FEIFEI D, et al. Study of the use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hydrogel externally to treat residual wounds of extensive deep partial-thickness burn[J]. *Burns*, 2015, 41(5): 1086-1091.
- [7] CHUNG J, KIM M H, YOON Y J, et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on glial scar formation after spinal cord injury in rats[J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21(6): 966-973.
- [8] ANTONIO N, BØNNELYKKE-BEHRNDTZ M L, WARD L C, et al. The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer[J]. *EMBO J*, 2015, 34(17): 2219-2236.
- [9] ZHANG M, JIANG S K, TIAN Z L, et al. CB2R orchestrates fibrogenesis through regulation of inflammatory response during the repair of skeletal muscle contusion[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 3491-3502.
- [10] LEAL E C, CARVALHO E, TELLECHEA A, et al. Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(6): 1638-1648.
- [11] de SILVEIRA VASCONCELOS M, GOMES-ROCHETTE N F, de OLIVEIRA M L, et al. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L) in mice[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(12): 1648-1655.
- [12] GRAY A, MARRERO-BERRIOS I, GHODBANE M, et al. Effect of local anesthetics on human mesenchymal stromal cell secretion[J]. *Nano Life*, 2015, 5(2): 1550001-1550014.
- [13] TATEUCHI R, SAGAWA N, SHIMADA Y, et al. Enhancement of the 1-octanol/water partition coefficient of the anti-inflammatory indomethacin in the presence of lidocaine and other local anesthetics[J]. *J Phys Chem B*, 2015, 119(30): 9868-9873.
- [14] KRISHNAMOORTHY V, CHUNG L. Bench-to bedside: the use of local anesthetics to attenuate inflammation in acute respiratory distress syndrome[J]. *Int J Crit Illn Inj Sci*, 2014, 4(2): 98-100.
- [15] HUANG G, SUN T, ZHANG L, et al. Combined application of alginate dressing and human granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotes healing in refractory chronic skin ulcers[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(6): 1772-1776.
- [16] BALDELLI C M, RUELLA M, SCUDERI S, et al. A short course of granulocyte-colony-stimulating factor to accelerate wound repair in patients undergoing surgery for sacrococcygeal pilonidal cyst: proof of concept[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(9): 1101-1109.

(童颖丹 编辑)