

## • 基础研究 •

## 短波紫外线照射后大鼠皮肤羟脯氨酸含量的变化

索伟 马爱敏 王兴林 王德文

[摘要] 目的 观察大鼠皮肤伤口受不同剂量短波紫外线照射后组织中羟脯氨酸含量的变化,探讨紫外线照射对胶原蛋白合成的影响。方法 用 30 只 Wistar 雄性大鼠建立短波紫外线照射新鲜伤口的动物模型,在每只大鼠颈背部做 3 个直径 2 cm 的圆形皮肤全层伤口,其中 2 个分别接受为 15 MED(15 mJ/cm<sup>2</sup>) 和 60 MED(60 mJ/cm<sup>2</sup>) 短波紫外线照射,另 1 个作为对照不接受照射,然后采用化学法检测伤口肉芽组织中羟脯氨酸含量的变化。结果 15 MED 照射伤口在照射后 21—28 d 时羟脯氨酸含量高于对照( $P < 0.05$ );60 MED 照射伤口在 28 d 时羟脯氨酸含量显著增高,与 15 MED 照射伤口和对照之间的差异具有高度显著性意义( $P < 0.01$ )。结论 短波紫外线照射能促进伤口中羟脯氨酸的合成,从而增加胶原含量,促进伤口愈合;60 MED 短波紫外线照射的作用强于 15 MED。

[关键词] 短波紫外线;羟脯氨酸;胶原

**L-hydroxyproline changes in rats' skin induced by ultraviolet C irradiation** SUO Wei, MA Ai-min, WANG Xing-lin, et al. Department of Physiotherapy, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] **Objective** To investigate the L-hydroxyproline (L-Hyp) changes in rats' skin after exposed to different doses of ultraviolet C irradiation (UVC) and the effect of UVC radiation on collagen synthesis. **Methods** After the animal model was set up, each male Wistar rat was made three fresh skin wounds, and three skin wounds of rats were divided into the 15 MED UVC irradiation (15 mJ/cm<sup>2</sup>), 60 MED UVC irradiation (60 mJ/cm<sup>2</sup>) and control (without UVC irradiation). Then the chemistry method was utilized to research changes of L-Hyp contents of the granulation. **Results** From the 21st to the 28th day after UVC irradiation, contents of L-Hyp in the 15 MED group were higher than that in controls ( $P < 0.05$ ). While at the 28th day, L-Hyp level in the 60 MED group increased greatly and was higher than that in other two groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** UVC irradiation increases L-Hyp level in rat's wound skin, so it accelerates the collagen synthesis and is helpful to promote wound healing, and the effect of 60 MED dose is superior to that of 15 MED.

[Key words] ultraviolet C; L-hydroxyproline; collagen

中图分类号: R641, R392.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2003)11-0662-02

动物组织中的羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)主要存在于胶原蛋白中,在其他蛋白质中含量很少或不含。Seifter 等报道,大鼠组织胶原蛋白中的羟脯氨酸含量为 9.2 % (w/w)<sup>[1]</sup>。因此,不同组织中的羟脯氨酸含量可作为衡量其胶原组织代谢的重要指标。在创伤愈合过程中,胶原的合成和分泌是伤口愈合的决定性因素。所以,用化学法检测组织中羟脯氨酸的含量,既可反映胶原蛋白量的变化,也可反映创伤愈合的情况。化学法的基本原理如下:羟脯氨酸与氯胺-T 发生氧化反应,生成红至紫色的羟脯氨酸氧化产物吡咯,用分光光度计测量其 560 nm 的 OD 值,即可计算出羟脯氨酸的含量<sup>[2]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与仪器** Wistar 二级雄性大鼠 30 只,体重(200±20) g,购自军事医学科学院实验动物中心。KDY-01 型紫外线治疗仪由解放军总医院、北京科达光源电器公司联合制造,波长 230—280 nm,90 % 为

253.7 nm,表面功率 1 mW。

**1.2 创伤动物模型建立** 用 1 % 戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠后,剪去其颈背部毛,常规消毒,做 3 个直径 2 cm 的圆形皮肤全层伤口,各伤口中心之间距离为 2.5 cm;将 3 个伤口随机分为:①15 MED(minimal erythema dose,最小红斑量)组:照射剂量 15 mJ/cm<sup>2</sup>,照射 15 s;②60 MED 照射组:剂量为 60 mJ/cm<sup>2</sup>,照射 60 s;③自身对照组:不照射。在致伤后即刻、第 2 天及第 3 天进行伤口表面短波紫外线(ultraviolet C, UVC)局部照射,日增加照射剂量的 30 %。致伤后大鼠单笼喂养,饮食自取。观察伤口的愈合过程,在致伤后第 7、14、21、28、42 及 56 天取伤口的肉芽组织。

**1.3 检测方法<sup>[3]</sup>** 将取下的肉芽组织浸入无水乙醇脱水 24 h,氯仿脱脂 3—4 h,干燥后称重;将干燥的组织剪碎,置于 5 ml 安瓿中,加 2 ml 6 N 盐酸,酒精喷灯封口,125 ℃ 水解 3 h;将水解液稀释至 10 ml,过滤;取滤液 0.1 ml 加蒸馏水至 1.0 ml(空白管和标准管分别用蒸馏水和标准羟脯氨酸液代替);加入 0.25 M 柠檬酸缓冲液 0.5 ml 和 0.05 M 氯胺-T 溶液 1.0 ml,氧化 6 min;加 3.15 mol/L 过氯酸 1.0 ml,静置 5 min,终止氧化反应;加入 10 % β-DNAB 1.0 ml,于 80 ℃ 水浴中保温 15 min,充分显色;显色完全后,用分光光度计测 560 nm 处的 OD 值。

作者单位:1. 100853 北京市,解放军总医院理疗科(索伟、马爱敏、王兴林);2. 100853 北京市,军事医学科学院放射医学研究所(王德文)。作者简介:索伟(1972-),女,河北沧州市人,硕士,主治医师,主要研究方向:光生物学。

1.4 羟脯氨酸含量计算 肉芽组织中 Hyp 含量( mg/ g ) = ( 0.5 × A<sub>样</sub> / A<sub>标</sub> ) / m , 其中 A<sub>样</sub> 为样品管 560nm OD 值 , A<sub>标</sub> 为标准管 560nm OD 值 , m 为组织重量。

羟脯氨酸标准曲线绘制 : 分别取 10 mg/ ml 羟脯氨酸标准液 0.1 ml、0.3 ml、0.5 ml、0.7 ml 和 1.0 ml , 各加双蒸水至终体积为 1.0 ml , 一式 2 份 , 按上述方法测量不同 L-4-羟脯氨酸( mg ) 的 560nm OD 值。以 L-4-羟脯氨酸( mg ) 为横轴 , 560nm OD 值为纵轴 , 绘制直线回归图 , 即羟脯氨酸标准曲线。在本研究选定的条件下 , Hyp 标准曲线在 1—7 mg/ ml 的浓度范围内 , 符合 Lambert Beer 定律( 浓度再高则影响结果的线性 )。

1.5 统计学处理 所得数据以(  $\bar{x} \pm s$  ) 表示 , 进行 t 检验和相关分析。

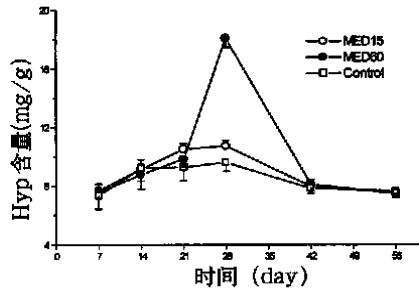
2 结果

大鼠皮肤伤口肉芽组织中 Hyp 含量的变化见附表及附图。

附表 大鼠皮肤伤口肉芽组织中 Hyp 含量( mg/ g ) 的变化

天数	组别		
	15 MED 照射组	60 MED 照射组	对照组
7	7.67 ± 0.46	7.55 ± 0.42	7.32 ± 0.89
14	9.11 ± 0.67	8.75 ± 0.99	9.21 ± 0.89
21	10.50 ± 0.39 <sup>a</sup>	9.82 ± 0.51	9.27 ± 0.94
28	10.72 ± 0.40 <sup>a,c</sup>	18.08 ± 0.62 <sup>b</sup>	9.58 ± 0.61
42	7.93 ± 0.48	8.08 ± 0.60	7.81 ± 0.19
56	7.56 ± 0.17	7.42 ± 0.27	7.61 ± 0.34

注 : 与对照组比较 , a : P < 0.05 ; b : P < 0.01 ; 与 60 MED 照射组比较 , c : P < 0.01。



附图 UVC 照射后 Hyp 含量变化曲线

3 讨论

临床上 , 适当剂量紫外线照射对皮肤浅层的急性感染性炎症、皮肤溃疡等能产生明显的抗感染、促进伤口愈合作用。在治疗慢性损伤时 , 紫外线照射能直接刺激新生组织的生长 , 增加组织张力 , 增加局部的血液循环和氧供 , 减轻水肿 , 抑制细菌生长。但大剂量紫外线照射则有严重的副作用 , 如胶原变性、伤口张力下

降、愈合延迟等<sup>[3]</sup>。

胶原分子是细胞外基质的结构性大分子蛋白质 , 由 3 条 α 肽链螺旋状缠绕而成 , 其螺旋部长度为 268—340 nm , 约含 1 000 个氨基酸 , 氨基酸顺序为“甘氨酸 + X + Y” , 3 肽单位循环延长形成链。肽链中的 X 和 Y 以脯氨酸和羟脯氨酸为多 , 约占 1/3<sup>[4]</sup>。到目前为止 , 共发现 19 种胶原 , 皮肤中大约可检测到 6 种胶原 , 其中 I 型、II 型胶原是皮肤胶原的主要类型 , 共同组成胶原原纤维 ( I 型是主体 , II 型包绕于外周 ) , 与皮肤的张力密切相关。在伤口愈合过程中 , 胶原不断由肉芽组织中的成纤维细胞合成、分泌 , 与基质其他成分聚合、交联而沉积 , 并不断改构、更新 , 以不断改善修复组织的结构和强度<sup>[5]</sup>。

通过羟脯氨酸分析 , 我们发现 , UVC 照射后随着伤口的愈合 , 肉芽组织中胶原总量逐渐增加 , 在伤后 28 d 达到峰值 , 此后逐渐下降 , 56 d 左右恢复到正常水平。60 mJ/ cm<sup>2</sup> 照射引起胶原总量在 28 d 时显著增加 , 而 15 mJ/ cm<sup>2</sup> 照射伤口在 21—28 d 时羟脯氨酸含量稍高于未照射伤口。但也有学者报道 , 57 mJ/ cm<sup>2</sup> UVC 照射并未引起皮肤胶原总量变化 , 认为大剂量 UVC 直接抑制脯氨酸羟化酶的活性 , 酶活性在短时间内的降低对胶原总量并未产生影响<sup>[6]</sup>。也有报道指出 , 大剂量紫外线可造成胶原过度沉积 , 伤口张力下降、收缩延迟、愈合减慢<sup>[7,8]</sup>。伤口愈合后如瘢痕组织过多 , 不利于组织的改建和皮肤弹性的恢复。因此 , 在临床治疗中紫外线照射剂量的选择十分重要。本研究结果显示 , 15 mJ/ cm<sup>2</sup> 和 60 mJ/ cm<sup>2</sup> 的照射剂量均能促进伤口中羟脯氨酸的合成 , 从而增加胶原含量 , 有助于伤口的愈合 , 而且 60 mJ/ cm<sup>2</sup> 的作用强于 15 mJ/ cm<sup>2</sup> , 这对临床工作有一定的指导作用。

[ 参考文献 ]

[ 1 ] Seifter E, Manner G, Crowley LV, et al. Enhancement by cultured fibroblasts of reparative collagen synthesis in rats[ J ]. Proc Soc Exp Biol Med, 1984, 146:8—10.

[ 2 ] Jamall I, Finelli V, Que-Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[ J ]. Anal Biochem, 1991, 112:70.

[ 3 ] 杨陟华, 朱茂祥, 龚诒芬, 等. 大鼠肺组织羟脯氨酸测定方法及其应用[ J ]. 军事医学科学院院刊, 1995, 19:44—49.

[ 4 ] 成军. 细胞外基质的分子生物学与临床应用[ M ]. 北京: 北京医科大学出版社, 1999:78—81.

[ 5 ] 付小兵, 王德文, 何俭, 等. 创伤修复基础[ M ]. 北京: 人民军医出版社, 1997:99—101.

[ 6 ] Johnston KJ, Oikarinen AI, Lowe NJ, et al. Ultraviolet radiation-induced connective tissue changes in the skin of hairless mice[ J ]. J Invest Dermatol, 1984, 82:587—590.

[ 7 ] Brantley SK, Davidson SF, Das SK, et al. A dose-related curve of wound tensile strength following ultraviolet irradiation in the hairless guinea pig[ J ]. Am J Med Sci, 1991, 302:75—81.

[ 8 ] Davidson SF, Brantley SK, Das SK. The effects of ultraviolet radiation on wound healing[ J ]. Br J Plast Surg, 1991, 44:210—214.

( 收稿日期 : 2003-04-25 )