

小针刀对移植于裸鼠的人皮肤增生性瘢痕组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白的影响

李 枫^① 陈东明^{*} 乔晋琳^② 孙东杰 唐 岩^① 唐军民^① 赵 霞 毕振伍^① 梁艳清^③

(北京大学第三医院成形科, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨小针刀对移植于裸鼠皮下人增生性瘢痕真皮组织 I、Ⅲ型胶原蛋白的作用。 **方法** 将 6 例人无表皮的增生性瘢痕组织分别移植于 24 只裸鼠背部皮下, 建立增生性瘢痕裸鼠动物模型。术后 10 天, 分为对照组、0.1 mg/ml 曲安奈德组、0.2 mg/ml 曲安奈德组和小针刀组, 每组 6 只, 14 天取材, 利用免疫组织化学染色检测 I、Ⅲ型胶原蛋白的变化。 **结果** I、Ⅲ型胶原分布于各组成纤维细胞的胞浆及组织中。图像分析结果, 0.1 mg/ml 曲安奈德组和 0.2 mg/ml 曲安奈德组 I、Ⅲ型胶原含量 (0.09 ± 0.03 , 0.11 ± 0.05 ; 0.12 ± 0.02 , 0.11 ± 0.01) 低于对照组 (0.17 ± 0.04 , 0.19 ± 0.03) ($P < 0.05$); 小针刀组 I、Ⅲ型胶原含量 (0.12 ± 0.02 , 0.12 ± 0.02) 与曲安奈德组差异无显著性 ($P > 0.05$)。 **结论** 小针刀可降低移植于裸鼠皮下增生性瘢痕真皮组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白的含量。

【关键词】 小针刀; 裸鼠; 增生性瘢痕; 胶原纤维

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2009)11-1038-04

Effect of Small Needle-Knife on Collagens I and Ⅲ in Transplanted Human Skin Hypertrophic Scar Tissues in Nude Mice

Li Feng, Chen Dongming*, Qiao Jinlin, et al. * Department of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To discuss the effect of small needle knife therapy on collagens I and Ⅲ in the hypertrophic scar tissues that was subcutaneously transplanted into nude mice. **Methods** Six samples of human hypertrophic scar tissues without cuticle were subcutaneously transplanted into the back of 24 nude mice to create the animal models of hypertrophic scar. Ten days after of the operation, the mice were divided into control, 0.1 mg/ml triamcinolone, 0.2 mg/ml triamcinolone, and small needle-knife groups with 6 mice in each. Specimens of the scar tissues were collected in 14 days for immunohistochemistry to detect the collagen I and Ⅲ. **Results** In all the groups, collagens I and Ⅲ distributed extensively in the cytoplasm of fibroblast and tissues. Image analysis showed that the concentration of collagens I and Ⅲ in 0.1 mg/ml and 0.2 mg/ml triamcinolone groups were significantly lower than those in the control (0.09 ± 0.03 , 0.11 ± 0.05 and 0.12 ± 0.02 , 0.11 ± 0.01 vs. 0.17 ± 0.04 , 0.19 ± 0.03 , $P < 0.05$), but similar to that in the small needle-knife group (0.12 ± 0.02 , 0.12 ± 0.02 , $P > 0.05$). **Conclusions** Small needle-knife therapy can reduce the concentration of collagens I and Ⅲ in transplanted hypertrophic scar tissues in nude mice.

【Key Words】 Small Needle-knife; Nude Mice; Hypertrophic Scars; Collagen Fibre

增生性瘢痕是人体对创伤的一种过度的愈合反应, 是导致以成纤维细胞异常增殖, 胶原大量合成, 胶原过度沉积为组织学特点的皮肤纤维增生性疾病^[1,2]。因此, 从抑制胶原代谢的方面寻找治疗和预防瘢痕增生的方法具有重要的意义。小针刀疗法是在现代西医外科手术疗法和中医针刺疗法基础上

发展起来的一种微创性手术疗法, 在治疗多种慢性软组织损伤性疾病方面取得了令人满意的结果^[3-5]。2007 年李森恺^[6]报道小针刀对瘢痕有治疗的作用, 但其作用机制尚待探讨。本实验拟观察小针刀治疗对移植于裸鼠的人皮肤增生性瘢痕组织胶原合成的影响, 为针刀疗法提供实验依据。

* 通讯作者

① (北京大学医学部组织胚胎学教研室, 北京 100191)

② (海军总医院康复理疗科, 北京 100037)

③ (广东医学院组织胚胎教研室, 广州 524023)

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 裸鼠及病理瘢痕标本的来源 24 只清洁级裸鼠 (BALB/c - nu/nu 品系, 北京大学医学部实验动物中心), 6 ~ 8 周龄, 体重 15 ~ 20 g, 雌性。实验前裸鼠单笼喂养, 室温 (25.0 ± 1.0)℃, 湿度 50% ~ 70%, 饮用水 pH 值 6.0 ~ 6.5, 维持无菌饲养环境。增生性瘢痕标本 6 例, 取自北京大学第三医院成形外科及积水潭医院整形外科未经任何治疗的增生性瘢痕患者切除的组织 (患者签署知情同意书)。均病理切片证实已成熟稳定。

1.1.2 主要试剂和仪器设备 曲安奈德注射液 (昆明积大制药有限公司), 批号 060311, 用生理盐水分别配成 0.1 mg/ml 和 0.2 mg/ml 两种浓度溶液; DMEM 培养液 (Dulbecco ' Modified Eagle Medium) (Sigma); 鼠抗人 I、Ⅲ型胶原单克隆抗体、试剂盒、二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制备^[7,8]及分组 将 6 例人增生性瘢痕组织分别置于 DMEM + 双抗 (青霉素 1 × 10⁶ U/L、链霉素 1 × 10⁶ U/L) 组织培养液中, 削去瘢痕表皮和皮下组织, 4℃ 保存备用。每只裸鼠按 60 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 切开裸鼠背部皮肤 0.5 cm, 将每例增生性瘢痕组织切成 4 块, 约 0.2 g/块, 移植于 4 只裸鼠背部皮下, 切口缝合, 分笼饲养, 共 24 只。

1.2.2 实验分组 移植后 10 天, 随机分为 4 组, 每组 6 只。①对照组: 瘢痕组织内分 3 点注射生理盐水 0.1 ml; ② 0.1 mg/ml 曲安奈德组: 瘢痕组织内分 3 点注射 0.1 mg/ml 曲安奈德 0.1 ml; ③ 0.2 mg/ml 曲安奈德组: 瘢痕组织内分 3 点注射 0.2 mg/ml 曲安奈德 0.1 ml; ④小针刀组: 移植于裸鼠背部瘢痕组织为小针刀进针点, 术者左手拇指与示指按压移植物, 右手持小针刀, 以垂直于皮肤进针, 刺进瘢痕组织内, 在瘢痕内向四周切割剥离至瘢痕周边, 出针后将乙醇棉球放在针眼上数秒, 防止出血。4 组均于治疗 14 天后取出背部的移植物, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化物酶法 (streptavidin-proxidase method, S-P 法), 显示裸鼠人皮肤增生性瘢痕组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白, 微波柠檬酸抗原修复, 一抗 (1: 200) 4℃ 过夜, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照。DAB 显色系统显色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.3 图像分析

应用医学图像分析系统 (Medicine Image Analysis System, MIAS) (北京航空航天大学) 在目镜 × 10, 物镜 × 20 条件下, 将所取标本免疫组化图像采集并输入图像分析系统进行图像分析。每样本选取 5 个视野, 测定每一个视野中 I 和Ⅲ型胶原蛋白阳性反应的光密度, 以平均光密度值代表组织中 I 和Ⅲ型胶原蛋白的表达水平。

1.4 统计学处理

采用 Primer 统计学软件中 One way analysis of variance 进行多组均数间的比较、Student-Newman-Keuls test 进行多组之间两两比较, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 移植于裸鼠皮下增生性瘢痕的组织学特点

裸鼠模型术后全部存活, 切口愈合好, 无感染、破溃和排斥反应, 移植 10 天裸鼠的背部移植处均可触及 1 个皮下结节, 推动结节感植入物与皮肤结合较紧, 但与底部的肌肉组织结合较疏松。光镜观察, 治疗 14 天时, 各组均可见植入物周围有包膜, 包膜内有血管。瘢痕组织中胶原纤维呈致密状态, 排列紊乱, 可见成纤维细胞、淋巴细胞和微血管 (图 1)。

2.2 曲安奈德、小针刀对移植于裸鼠皮下增生性瘢痕 I、Ⅲ型胶原蛋白的影响

I、Ⅲ型胶原在对照组及实验各组的增生性瘢痕成纤维细胞 (FB) 的胞浆、微血管和基质中表达, 呈棕黄色 (图 2, 3)。图像分析结果显示, 0.1 mg/ml 和 0.2 mg/ml 曲安奈德组 I、Ⅲ型胶原蛋白含量低于对照组 ($P < 0.05$); 小针刀组 I、Ⅲ型胶原蛋白含量与曲安奈德组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 4 组移植于裸鼠皮下增生性瘢痕组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白含量 (OD 值) 的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	I 型胶原	Ⅲ型胶原
对照组①	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.03
0.1 mg/ml 曲安奈德组②	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.02
0.2 mg/ml 曲安奈德组③	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.01
小针刀组④	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02
<i>F</i> , <i>P</i> 值	5.15, 0.008	18.22, 0.000
<i>q</i> ₁₋₂ , <i>P</i> 值	5.333, <0.05	8.083, <0.05
<i>q</i> ₁₋₃ , <i>P</i> 值	4.000, <0.05	9.238, <0.05
<i>q</i> ₁₋₄ , <i>P</i> 值	3.333, <0.05	8.083, <0.05
<i>q</i> ₂₋₃ , <i>P</i> 值	-, >0.05	-, >0.05
<i>q</i> ₂₋₄ , <i>P</i> 值	2.000, >0.05	-, >0.05
<i>q</i> ₃₋₄ , <i>P</i> 值	-, >0.05	1.155, >0.05

3 讨论

增生性瘢痕 (hypertrophic scar, HS) 是组织创伤

后一种病理修复的结果,其特征是成纤维细胞过度增殖和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积。迄今为止,HS 的发生机制还不完全清楚,它的防治一直是困扰国内外创伤外科和整形外科的难题之一^[1,2]。2007 年李森恺报道小针刀对瘢痕有治疗的作用^[6],但其作用机制尚需进一步探讨。本实验以临床上用于治疗瘢痕的曲安奈德为对照,观察小针刀对移植于裸鼠皮肤增生性瘢痕组织中 I、III 型胶原蛋白的作用,探讨小针刀治疗对增生性瘢痕胶原过度沉积的影响,为小针刀治疗瘢痕提供理论依据。

质激素受体复合物,进入细胞核内与靶基因启动子 (promoter) 序列的糖皮质激素反应元件或负性皮质激素反应成分结合,引起转录增加或减少,通过 mRNA 影响介质蛋白质的合成分泌影响^[9]。本实验经 0.1 mg/ml 和 0.2 mg/ml 曲安奈德治疗后,移植于裸鼠皮下的增生性瘢痕成纤维细胞和细胞外基质中 I、III 型胶原蛋白含量比注射生理盐水组下降的结果提示,曲安奈德可能引起细胞转录减少,改变成纤维细胞合成分泌功能性蛋白质的水平,抑制瘢痕组织中胶原的过度合成。相关的研究成果也证实曲安奈德对瘢痕确实有抑制作用^[1,2,5]。

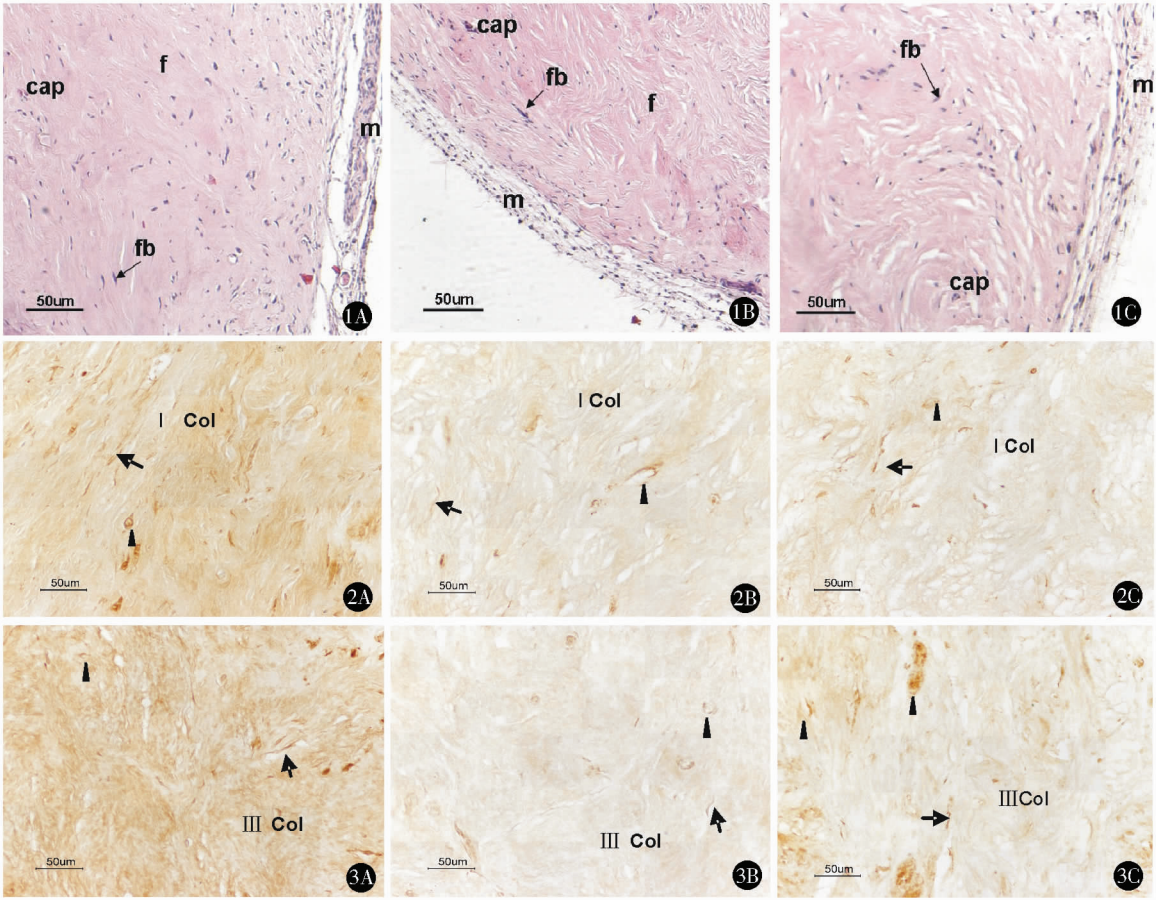


图 1 移植于裸鼠皮下的人真皮增生性瘢痕的组织学变化 (HE 染色 ×200)。在移植 10 天并治疗 14 天时光镜观察,可见植入物有包膜包裹,表面圆而光滑,包膜上有丰富的小血管。瘢痕的真皮组织胶原纤维呈致密状态,排列紊乱,细胞和血管数量较少。m. 包膜;fb. 成纤维细胞;cap. 毛细血管;f. 胶原纤维。A. 对照组; B. 0.1 mg/ml 曲安奈德组; C. 小针刀组 图 2 小针刀对移植于裸鼠皮下的人增生性瘢痕 I 型胶原蛋白的影响 (免疫组织化学染色 ×200)。↑ I 型胶原 + 成纤维细胞; ▲ I 型胶原 + 微血管; Col. I 型胶原 + 胶原纤维。A. 对照组; B. 0.1 mg/ml 曲安奈德组; C. 小针刀组 图 3 小针刀对移植于裸鼠皮下的人增生性瘢痕 III 型胶原蛋白的影响 (免疫组织化学染色 ×200)。↑ III 型胶原 + 成纤维细胞; ▲ III 型胶原 + 微血管; Col. III 型胶原 + 胶原纤维。A. 对照组; B. 0.1 mg/ml 曲安奈德组; C. 小针刀组

曲安奈德是一种作用较强的中长效糖皮质激素,具有较强的抗炎、抗过敏及抗纤维增生的作用,局部注射的方法将药物直接注入病灶,使药效得到更好的发挥^[5,9]。该药与成纤维细胞胞质内的特异性糖皮质类固醇受体结合形成活化的皮质激素 - 皮

临床上用于治疗瘢痕的皮质类固醇激素局部注射治疗增生性瘢痕虽取得较好的疗效,但在治疗后出现局部血管扩张、萎缩、色素脱失及妇女月经改变等不良反应^[10]。小针刀疗法是一种微创性松解术,具有对人体组织的损伤小,不易引起感染等特点。

2004 年陈茂义^[4]报道通过小针刀对局部病变软组织的切割、剥离使软组织的粘连、瘢痕和挛缩松解,在恢复软组织的力学动态平衡状态的同时,也改善了局部的微循环,消除肌肉紧张、痉挛,促进炎症致痛物质的清除,解痉止痛,在治疗多种慢性软组织损伤性疾病方面取得了令人满意的结果^[3~5]。本实验中小针刀组 I、Ⅲ型胶原蛋白的含量比注射生理盐水组低,与曲安奈德组相比无显著性差异的结果表明,小针刀疗法对增生性瘢痕组织中 I、Ⅲ型胶原蛋白有一定的抑制作用,能够减轻增生性瘢痕胶原过度沉积的特征,针刀疗法是否通过松解,改善瘢痕局部微循环,使增生性瘢痕组织中胶原蛋白含量降低,尚待进一步的探讨。

参考文献

- 1 Haverstock BD. Hypertrophic scars and keloids. Clin Podiatr Med Surg, 2001, 18(1): 147.
- 2 李 旋, 刘达恩. 病理性瘢痕的临床治疗研究进展. 中国康复医学杂志, 2007, 22(10): 953 - 954.
- 3 朱汉章. 小针刀疗法. 北京: 中国中医药出版社, 1992. 2 - 6.
- 4 陈茂义. 针刀治疗颈椎病的机理及临床疗效分析. 湖南中医药导报, 2004, 10(6): 75 - 76.
- 5 吴胜积. 小针刀配合曲氨奈德治疗跟痛症 103 例观察. 中西医结合与祖国医学, 2008, 12(1): 50 - 51.
- 6 李森恺. 针刀医学在整形美容外科临床中的应用. 科学之友, 2007, 4B: 246 - 247.
- 7 金培生, 岑 瑛, 刘晓雪, 等. 病理性瘢痕裸鼠模型的建立. 中华烧伤杂志, 2007, 23(2): 126 - 129.
- 8 Morris D, Wu L, Zhao I, et al. Acute and chronic animal models for dermal scarring: quantitative study. Plast Reconstr Surg, 2004, 100(3): 674.
- 9 李 瑞. 药理学. 上海: 复旦大学出版社, 2005. 498 - 503.
- 10 鲍卫汉. 实用瘢痕学. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 301 - 305.

(收稿日期: 2009 - 07 - 27)

(修回日期: 2009 - 09 - 10)

(责任编辑: 王惠群)