

· 实验研究 ·

针刀松解法对移植于裸鼠的人皮肤增生性瘢痕组织中成纤维细胞的影响

唐 岩^① 聂芳菲* 陈东明 赵 霞 李 枫^① 毕振伍^① 唐军民^①

(北京大学第三医院成形科, 北京 100191)

【摘要】 目的 观察针刀松解法对移植于裸鼠皮下人增生性瘢痕成纤维细胞增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA)、I、Ⅲ型胶原、bcl-2 和 bax 的作用, 探讨其对移植于裸鼠皮下的人增生性瘢痕组织中成纤维细胞生物学特性的影响。 **方法** 取 6 例人增生性瘢痕组织, 削去瘢痕表皮及皮下组织, 将每例增生性瘢痕组织分成重约 0.2 g 的 3 块, 每只裸鼠移植 1 块, 共移植于 18 只裸鼠背部皮下, 建立增生性瘢痕裸鼠动物模型。移植后 10 d 在瘢痕组织内分 3 点分别注射生理盐水 0.1 ml (对照组)、注射 0.1 mg/ml 曲安奈德 0.1 ml (曲安奈德组)、将小针刀刺进瘢痕组织内, 在瘢痕内向四周切割剥离至瘢痕周边 (针刀松解组) 进行治疗, 每组 6 只。治疗后 14 d 取材, 利用 HE 染色计数分析各组成纤维细胞的含量; 免疫组织化学染色检测各组 PCNA、I、Ⅲ型胶原、bcl-2 和 bax 表达阳性成纤维细胞数的变化。 **结果** HE 染色结果: 与对照组成纤维细胞数量 (913.33 ± 148.95) 个/ mm^2 相比, 曲安奈德组 (853.33 ± 62.82) 个/ mm^2 和针刀松解组 (863.33 ± 75.28) 个/ mm^2 均降低, 但是差异无显著性 ($P > 0.05$)。免疫组织化学染色结果: 曲安奈德组和针刀松解组 PCNA、I、Ⅲ型胶原蛋白阳性的成纤维细胞数量减少, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 组 bcl-2 和 bax 阳性的成纤维细胞数量以及 bcl-2/bax 比率差异无显著性 ($P > 0.05$)。 **结论** 针刀松解法具有抑制移植于裸鼠皮下人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖和分泌合成的能力; 针刀松解对增生性瘢痕成纤维细胞中 bcl-2 和 bax 表达及其比率没有影响。

【关键词】 针刀松解法; 裸鼠; 增生性瘢痕; 成纤维细胞

中图分类号: R-332

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2012)01-0075-04

Effect of Small Needle-knife Therapy on the Fibroblasts in Human Hypertrophic Scar Tissues Transplanted into Nude Mice

Tang Yan, Nie Fangfei*, Chen Dongming*, 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 the biological characteristics of fibroblasts of the hypertrophic scar tissues subcutaneously transplanted into nude mice by detecting the expressions of PCNA, collagen type I and Ⅲ, bcl-2 and bax in the fibroblasts. **Methods** To establish the animal model of hypertrophic scar on nude mice, 6 samples of hypertrophic scar tissues without cuticle were respectively divided into three pieces and transplanted subcutaneously into the back of 18 nude mice. Ten days after the operation, the mice were treated with saline (control group), 0.1 mg/ml triamcinolone (triamcinolone group), or small needle-knife (small needle-knife group), respectively ($n = 6$ in each). After 14-day treatment, pathological changes and the number of the fibroblasts positively expressed PCNA, I collagen, Ⅲ collagen, bcl-2 and bax in the hypertrophic scar tissues were detected by HE staining and immunohistochemistry. **Results** HE staining showed that, compared with the control group (913.33 ± 148.95)/ mm^2 , the number of fibroblast were reduced in the triamcinolone (853.33 ± 62.82)/ mm^2 and small needle-knife groups (863.33 ± 75.28)/ mm^2 , but no significant difference was found among the groups ($P > 0.05$). Immunohistochemistry indicated that, in the triamcinolone and small needle-knife groups, the number of fibroblast that were positively stained with PCNA, and I and Ⅲ collagen were significantly lower than those in the control ($P < 0.05$), while the number and the bcl-2/bax ratios of the fibroblast positively stained with bcl-2 and bax were not significant different among the three groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Small needle-knife therapy can inhibit the proliferating, synthesizing and secreting abilities of the fibroblasts in hypertrophic scar tissues transplanted into nude mice. It has no influence on the expressions of bcl-2 and bax in the fibroblasts in human hypertrophic scar tissues, nor on the bcl-2/bax ratios.

【Key Words】 Small Needle-knife therapy; Nude Mice; Hypertrophic Scar; Fibroblast

* 通讯作者, E-mail: nff527@163.com

① (北京大学医学部组织胚胎学教研室, 北京 100191)

针刀松解法是一种微创性手术疗法,目前主要用于治疗多种慢性软组织损伤性疾病^[1-3]。瘢痕形成是机体创伤修复的必然产物,瘢痕形成的主要细胞——成纤维细胞过度增殖并合成大量的胶原等细胞外基质,是增生性瘢痕发生的主要机制。2009 年本课题组研究结果表明小针刀疗法可使移植于裸鼠皮下的人皮肤增生性瘢痕组织中主要的细胞外基质成分 I、Ⅲ型胶原蛋白含量降低^[4]。本实验进一步观察针刀松解法对人皮肤增生性瘢痕成纤维细胞增殖、分泌合成及细胞凋亡的影响,为针刀松解法用于瘢痕治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备^[4]和实验分组

18 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提供,许可证号 SYXK(京)2006-0025],6~8 周龄,体重 15~20 g,雌性。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)。

无菌条件下将增生性瘢痕组织保存于组织培养液中,削去瘢痕表皮和皮下组织,4℃保存备用。每只裸鼠按 60 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,切开裸鼠背部皮肤 0.5 cm,将每例增生性瘢痕组织切成 3 块,每块约 0.2 g,共移植于 18 只裸鼠背部皮下,切口缝合,分笼饲养。移植后 10 d,随机分为对照组、曲安奈德组、针刀松解组,每组 6 只。对照组,在瘢痕组织内分 3 点注射生理盐水 0.1 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;针刀松解组:将小针刀刺进瘢痕组织内,在瘢痕内向四周切割剥离至瘢痕周边。3 组均于治疗 14 d 后取出背部的移植物,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度 5 μm。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 曲安奈德注射液,昆明积大制药有限公司生产;鼠抗人增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen,PCNA)单克隆抗体、鼠抗人 I、Ⅲ型胶原单克隆抗体、鼠抗人 bcl-2 和鼠抗人 bax 单克隆抗体、免疫组化 SP 试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 组织病理学染色和计数方法 ①HE 染色:常规苏木精-伊红(HE)染色。②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),检测裸鼠人皮肤增生性瘢痕组织中 PCNA、I、Ⅲ型胶原、bcl-2

和 bax 的表达,微波修复抗原,一抗孵育 4℃过夜,磷酸盐缓冲液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,中性树胶封片。③计数方法:光学显微镜下观察,应用武汉产带格式显微测微尺的目镜,在放大 400 倍的条件下,每样本检测 10 个视野,分别记录各组成纤维细胞的数量及 PCNA、I、Ⅲ型胶原、bcl-2 和 bax 阳性的成纤维细胞的数量,按细胞数/mm²=细胞总数/n÷N÷0.005 的公式进行计数分析。式中 n=视野数,N=例数,0.005=格式目镜测微尺的面积。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计学软件分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。3 组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 曲安奈德和针刀松解法对移植于裸鼠的人皮肤增生性瘢痕成纤维细胞数量的影响

HE 染色光镜下观察,3 组成纤维细胞均呈扁平状,胞质弱嗜碱性,胞核较大,扁卵圆形。经统计学分析,3 组间成纤维细胞的数量差异无显著性($P > 0.05$),见表 1。

2.2 曲安奈德和针刀松解法对移植于裸鼠的人皮肤增生性瘢痕成纤维细胞 PCNA、I、Ⅲ型胶原、bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示,PCNA、I、Ⅲ型胶原、bcl-2 和 bax 蛋白在移植于裸鼠的人皮肤增生性瘢痕成纤维细胞的胞质中均有表达,呈棕黄色细密颗粒(图 1~3)。与对照组相比,曲安奈德组和针刀松解组 PCNA、I、Ⅲ型胶原阳性的成纤维细胞数量显著减少($P < 0.05$),而曲安奈德组和针刀松解组间差异无统计学意义($P > 0.05$);3 组凋亡相关因子 bcl-2 和 bax 阳性的成纤维细胞数量差异无显著性($P > 0.05$),见表 1。bcl-2/bax 比率在对照组为 1.40 ± 0.19 ,曲安奈德组为 1.29 ± 0.21 ,针刀松解组为 1.27 ± 0.12 ,3 组间差异无显著性($F = 0.93$, $P = 0.415$)。

3 讨论

细胞增殖和凋亡是有机体活动的重要特征和生理过程,是生命过程中不可缺少的组成内容,两者贯穿于生物的全部生命活动中。创伤愈合过程中成纤维细胞的过度增殖及凋亡决定着瘢痕组织的发展和转归^[4,5]。烧伤后增生性瘢痕的发病率为 30%~91%,手术后为 40%~94%^[6]。各种瘢痕的形成常

表 1 对照组、曲安奈德和针刀松解组中阳性染色成纤维细胞的数量($\bar{x} \pm s$)						个/mm ²
组别	HE 染色	PCNA	I 型胶原	Ⅲ 型胶原	bcl-2	bax
对照组 ($n=6$)	913.33 ± 148.95	806.67 ± 81.65	843.33 ± 87.10	863.33 ± 112.01	506.67 ± 45.02	386.67 ± 104.82
曲安奈德组 ($n=6$)	853.33 ± 62.82	403.33 ± 124.85 *	303.33 ± 105.39 *	313.33 ± 65.32 *	606.67 ± 131.86	496.67 ± 87.10
针刀松解组 ($n=6$)	863.33 ± 75.28	413.33 ± 76.59 *	236.67 ± 58.54 *	343.33 ± 106.89 *	566.67 ± 90.04	526.67 ± 104.82
<i>F</i> 值	0.585	33.872	90.066	60.956	1.657	3.310
<i>P</i> 值	0.569	0.000	0.000	0.000	0.224	0.065

* 与对照组相比, $P < 0.05$

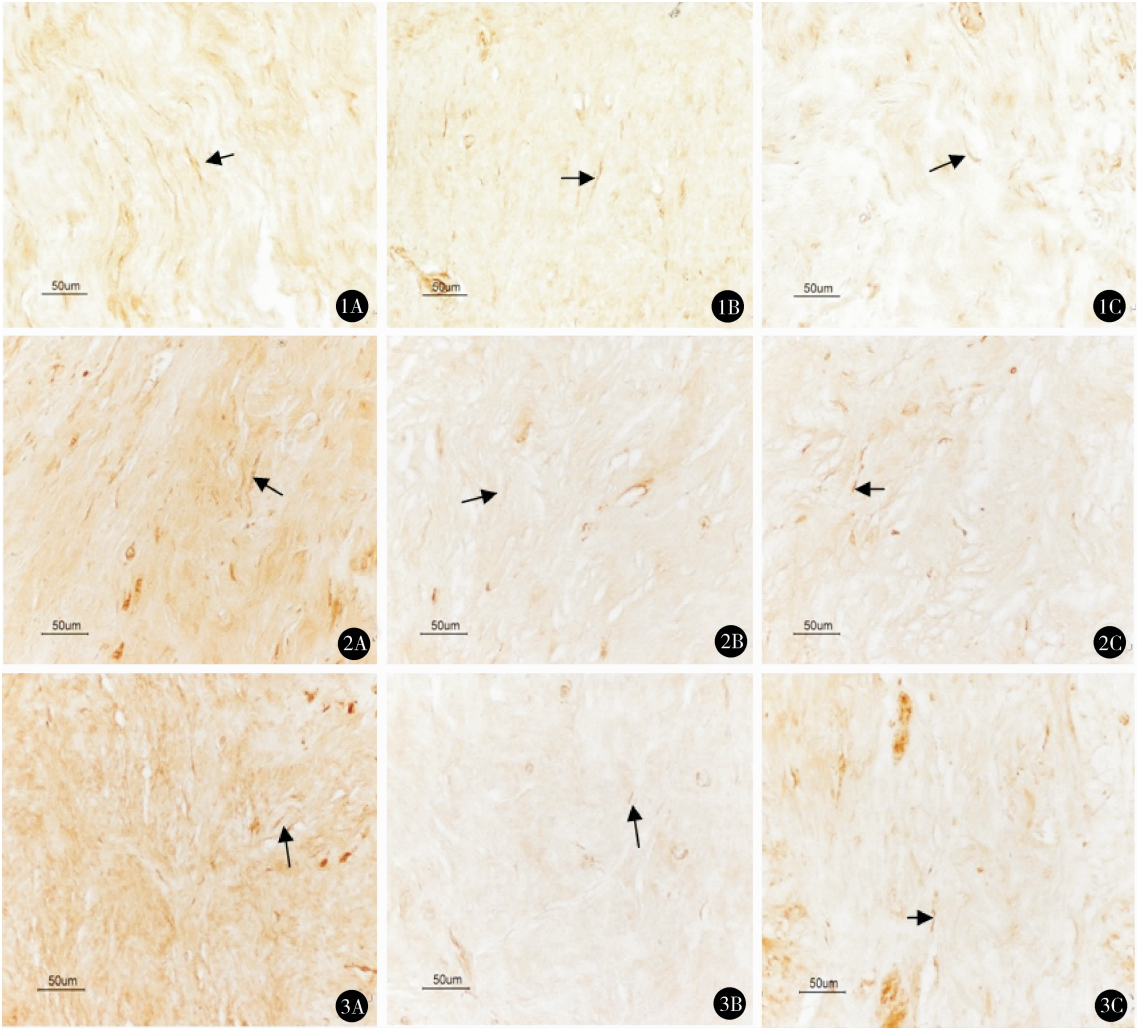


图 1 对照组 (A)、曲安奈德组 (B) 和针刀松解组 (C) 中 PCNA 阳性的成纤维细胞呈梭形, PCNA 阳性的棕黄色颗粒分布于其细胞质中 免疫组织化学染色 ×200 图 2 对照组 (A)、曲安奈德组 (B) 和针刀松解组 (C) 中 I 型胶原阳性的成纤维细胞呈梭形, I 型胶原阳性的棕黄色颗粒分布于其细胞质中 免疫组织化学染色 ×200 图 3 对照组 (A)、曲安奈德组 (B) 和针刀松解组 (C) 中Ⅲ型胶原阳性的成纤维细胞呈梭形,Ⅲ型胶原阳性的棕黄色颗粒分布于其细胞质中 免疫组织化学染色 ×200

常会严重影响人体的美观和机体的功能,给病人带来很大痛苦。虽然治疗方法很多,但效果均不是十分满意,是整形外科面临的难题之一^[5,6]。增生性瘢痕是人体对创伤产生过度愈合反应的结果,以成纤维细胞增殖旺盛并分泌大量细胞外基质,导致胶原的过量合成和沉积为特征。本实验以临床上用于

治疗瘢痕增生的曲安奈德为阳性对照,观察针刀松解对移植于裸鼠皮下增生性瘢痕成纤维细胞中 PCNA、I、Ⅲ 型胶原及 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响,探讨针刀松解对增生性瘢痕成纤维细胞增殖、分泌合成及细胞凋亡的影响,为针刀松解用于治疗瘢痕提供理论依据。

PCNA 是一种相对分子量为 32 736 ~ 35 712 的核蛋白,直接参与 DNA 的合成,是细胞增殖的一种标志,能确切反映细胞的生长速度及状态,作为衡量组织细胞增殖水平的指标在多种疾病的研究中广泛应用^[7]。增生性瘢痕组织中 PCNA 明显高于正常皮肤,表明瘢痕的发生与瘢痕组织中细胞过度增殖有关^[8],PCNA 可用来判断瘢痕组织的增生程度,为增生性瘢痕的诊断、治疗及其效果评价提供客观的依据。本研究结果表明,与对照组相比,曲安奈德组和针刀松解组中成纤维细胞的数量均降低,但是无统计学差异($P > 0.05$)。针刀松解和曲安奈德治疗后移植于裸鼠皮下的增生性瘢痕 PCNA 阳性成纤维细胞的数量显著低于对照组($P < 0.05$),提示针刀松解和曲安奈德治疗未能直接影响成纤维细胞的数量,但均抑制了瘢痕成纤维细胞的增殖活力。

I、Ⅲ型胶原蛋白,是增生性瘢痕组织中主要的细胞外基质成分,由成纤维细胞过多的合成^[9],其阳性染色反应了成纤维细胞合成和分泌 I 型或Ⅲ型胶原蛋白。经针刀松解和曲安奈德治疗后移植于裸鼠皮下的增生性瘢痕中 I、Ⅲ型胶原蛋白阳性成纤维细胞的数量均显著少于对照组($P < 0.05$),提示针刀松解和曲安奈德治疗均抑制了增生性瘢痕组织中成纤维细胞过度合成和分泌胶原的能力。

细胞凋亡的数学模型认为,bcl-2 家族之促凋亡和抑凋亡成员的比率直接决定了线粒体外膜各种通道的开放程度,形成细胞凋亡调控的枢纽。故有学者认为 bcl-2/bax 比率是调控细胞死亡的关键,在外界因素刺激下,细胞的生死最终取决于 bcl-2 和 bax 2 种调控因子的平衡结果^[11]。增生性瘢痕的发生可能与 bcl-2 蛋白过度表达和 bax 表达降低,使细胞凋亡受阻有关^[12]。本研究 3 组间 bcl-2、bax 以及 bcl-2/bax 比率均无统计学差异,提示针刀松解和曲安奈德局部注射未能改变 bcl-2 和 bax 阳性表达的成纤维细胞数而影响其凋亡,但两者能否通过线粒体以外的凋亡途径调控成纤维细胞的凋亡进而起到治疗增生性瘢痕的作用需要进一步研究。

针刀松解法目前在临床上主要用于治疗肌肉、肌腱、筋膜和韧带的慢性损伤引起的疼痛。小针刀可直接切开松解病变软组织的粘连、瘢痕,恢复软组织的动态平衡,达到治疗目的。增生性瘢痕作为皮肤组织创伤修复的平衡被打乱的结果,针刀松解法对其可能具有相似的治疗机制。成纤维细胞亚型肌成纤维细胞的持续存在,可导致组织的修复失控(如形成增生性瘢痕或其他器官的纤维化病变)。机械张力对细胞增殖和基因表达的调节可能是影响肌成纤维细胞转归的重要因素。表现为只要组织局部存在机械张力,细胞的增殖和生物合成就会继续;

一旦张力缓解,即使是在生长因子持续存在的情况下,细胞也会转化为非增殖型,并开始退化^[12]。本实验结果证实,针刀松解法对增生性瘢痕成纤维细胞的增殖及合成分泌功能具有抑制效应,提示小针刀通过缓解局部组织的机械张力,可能使成纤维细胞从增殖型的肌成纤维细胞转化为非增殖型的成纤维细胞。此外,通过针刀松解、减张等作用可能改善了组织缺血缺氧的状态,从而限制了成纤维细胞的过度增殖和旺盛分泌^[13];针刀松解还可能通过调节多种炎性细胞因子,减轻局部炎症反应,从而使刺激成纤维细胞增殖和分泌合成的因素消除^[13]。

总之,本研究初步显示了针刀松解对增生性瘢痕组织中成纤维细胞功能状态的影响,为针刀松解治疗增生性瘢痕或某些纤维化病变提供了理论依据,但这其中更详细的机制还有待进一步证实。

参考文献

- 1 张爱娜.小针刀治疗慢性软组织损伤疗效观察.中国当代医药,2010,17(34):109-110.
- 2 秦 谊,刘清国,覃蔚岚,等.针刀松解法对兔膝关节关节炎模型行为学和形态学的影响.中医药大学学报,2010,33(1):64-67.
- 3 李 枫,陈东明,乔晋琳,等.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.中国微创外科杂志,2009,9(11):1038-1041.
- 4 汤苏阳,李春伶,李冬梅,等.苦参碱对瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的影响.中国临床康复,2004,8(35):8040-8041.
- 5 Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, et al. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. Lab Invest, 2008, 88(12):1278-1290.
- 6 Bloemen MC, van der Veer WM, Ulrich MM, et al. Prevention and curative management of hypertrophic scar formation. Burns, 2009, 35(4):463-475.
- 7 向生光,胡维新.增殖细胞核抗原 PCNA 在 DNA 修复中的作用.生命的化学,2009,29(4):472-475.
- 8 Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol, 2007, 127(5):526-537.
- 9 Song R, Bian HN, Lai W, et al. Normal skin and hypertrophic scar fibroblasts differentially regulate collagen and fibronectin expression as well as mitochondrial membrane potential in response to basic fibroblast growth factor. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(5):402-410.
- 10 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”.中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393-395.
- 11 陈 伟,付小兵,孙同柱,等. Bax 和 Bcl-2 在增生性瘢痕中的表达特征及其意义.创伤外科杂志,2002,4(5):276-278.
- 12 刘英开,陆树良.力学刺激对肌成纤维细胞转归的影响.中华创伤杂志,2002,18(11):703-704.
- 13 乔晋琳,汲广成,李金牛,等.针刀干预对 L₃ 横突综合征模型大鼠成纤维细胞增殖的影响.中国组织工程研究与临床康复,2009,13(11):2013-2018.

(收稿日期:2011-07-27)

(修回日期:2011-09-16)

(责任编辑:李贺琼)