

创伤后瘢痕形成机制及治疗的研究
The Study of Formation Mechanism and Treatment
of posttrauma scar

课题来源： 国家自然科学基金项目（81071564）

专 业 名 称	骨外科学
学 位 申 请 人	刘银平
指 导 教 师	黄 东 教授

答 辩 委 员 会 主 席	徐达传 教授
答 辩 委 员 会 成 员	邓国三 教授
	孙鸿涛 主任医师
	戚 剑 副主任医师
	张惠茹 副主任医师

论 文 评 阅 人	庞水发 教授
	李贵涛 教授

2012 年 4 月 10 日 广州

创伤后瘢痕形成机制及治疗的研究

硕士研究生：刘银平

指导教师：黄东教授

摘 要

研究背景

病理性瘢痕是创伤愈合后最常见的并发症之一，一直是外科修复领域研究的难点与热点。病理性瘢痕不但可以影响患者的容貌，而且产生的挛缩可导致不同程度的功能障碍，为该类患者后期治疗带来沉重经济和心理负担。其形成机制及防治一直是医学界研究的热点。目前其形成机制仍不清楚，尚无疗效确切的治疗方法。

多年来，众多学者从不同角度探讨增生性瘢痕的形成、消退机理，期望从中找到治疗瘢痕的突破口。目前较一致的看法是：①增生性瘢痕以细胞过度增殖和细胞外基质过度沉积为特征，其中成纤维细胞是主要的效应细胞；②增生性瘢痕在生物学层面主要表现为胶原代谢紊乱；③TGF- β 1/sm α d 信号通路与成纤维细胞的增殖、分化、迁徙、凋亡及胶原代谢等多种生理、病理过程密切相关。

成纤维细胞作为创伤愈合过程中的主要效应细胞，常常表现为过度增殖和功能活跃，从而引起一系列级联反应，造成创面修复失控，导致细胞外间质的过度沉积和创伤的过度愈合，形成病理性瘢痕。由此可见，成纤维细胞的功能异常在病理性瘢痕过度增生中扮演着重要的角色。Lekic 等认为它是创伤修复的工程师、建筑者和管理员。自 Convey 等于 1959 年培养瘢痕成纤维细胞获得成功以来，开始了体外研究瘢痕的新阶段，为从细胞水平上认识瘢痕异常增生的机理提供了有力的证据和资料。近年来，病理性瘢痕的基础研究不断深入，成纤维细胞与瘢痕的关系以及瘢痕增生和侵袭性生长机制已成为医学研究的热

点。但是, 瘢痕成纤维细胞的原代培养对于初学者仍较为困难, 失败率较高。因此, 建立高效的培养方法及对瘢痕成纤维细胞进行鉴定及活力测定显得尤为重要。

目前普遍的观点认为, 增生性瘢痕的形成在生物学层面主要表现为胶原代谢紊乱。较多的研究表明在瘢痕增生过程中, 胶原蛋白的大量合成和 I、III 型胶原纤维比例发生变化是形成增生性瘢痕的重要机制。胶原代谢紊乱与 MMPs、TIMPs 间的动态平衡以及 TGF- β /smad 信号通路的异常具有密切的关系。但是, 目前关于胶原在增生性瘢痕组织中的变化及其调控机制仍不清晰, 需进一步澄清。

MMPs和TIMPs间的动态平衡是影响胶原代谢的重要因素。但是在创伤后增生性瘢痕组织中, 胶原酶的变化说法不一。Ghahary等报道在体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞间质胶原酶mRNA表达水平明显低于正常皮肤成纤维细胞, 而两者的金属蛋白酶组织抑制因子表达无显著差异。国内赵焯德等研究证实 MMP-3 mRNA在HS组FB中表达水平低于正常组, 而且降解DNP-多肽(胶原酶底物)能力也明显降低; 同时将MMP-3基因转入HS成纤维细胞后, 提高了MMP-3表达水平, 促进了ECM降解, 得出了类似的结果。同样, 在对皮肤异常瘢痕的研究中发现, 异常瘢痕TIMP-1的表达明显高于正常组织。在肝和肾的纤维化病变中也发现TIMP-1表达增加, 可通过抑制MMPS的活性阻止过量的胶原降解。另外也存在较多与上述结果相反的报道。探索瘢痕组织内MMPs和TIMPs的变化规律及其影响因素, 可能为瘢痕形成机制提供线索。

SMADs介导的转化生长因子信号通路在增生性瘢痕胶原代谢中发挥着重要的作用。SMADs是信号从受体到核内的细胞内主要转导分子, 也是目前瘢痕增生研究最多、最为重要的信号分子。根据不同分型, 对成纤维细胞具有双向调控作用。目前大量研究已经证实, 其中Smad2/3是具有促进作用的因子, 而SAMD7是抑制性的中间作用分子。但是, 由于分子内部各种信号通路的相互作用, 对于Smad2/3 和SAMD7的变化规律及其影响因素仍是研究的重点。

虽然大量的研究工作针对HS的发病机制和治疗,并且取得了丰硕的成果,但是对于增生性瘢痕的治疗目前仍缺乏有效的方案。外科手术切除是增生性瘢痕最常用的治疗。尽管各方面的改进,如:“z”或“w”成形术局部减张,切除瘢痕的纤维部分,保留外层皮肤。但是,手术仍可能因愈合失控或再次创伤而导致瘢痕过量形成。本组因功能障碍及影响美观,均采用手术的方法进行治疗。手术标本用作本实验。大量的研究表明,灯盏花素可抑制纤维化病变进展,灯盏花素是否能抑制病理性瘢痕成纤维细胞的增生,尚未见文献报道。也有研究认为细胞凋亡与HS的形成、消退过程密切相关,通过调控成纤维细胞凋亡有望成为有效防治HS的新亮点。

本实验通过建立高效的瘢痕成纤维细胞原代培养方法,观察其生长规律,并对其进行生物学鉴定,首次探讨灯盏花素对瘢痕成纤维细胞增殖和凋亡的影响,希望寻找到有效治疗增生性瘢痕的药物。同时对瘢痕组织真皮层内影响胶原纤维代谢相关分子进行研究,挖掘其中重要分子的变化规律;为增生性瘢痕机制的阐明及治疗提供思路。

研究目的

- 1、寻求一种高效的瘢痕成纤维细胞体外原代培养方法。
- 2、了解瘢痕成纤维细胞生长过程中的形态学变化和鉴定方法。
- 3、了解病理性瘢痕组织形态学、分子生物学变化规律,更加深入地了解增生性瘢痕的形成机制。
- 4、从细胞学方面初步探讨灯盏花素对瘢痕成纤维细胞生长增殖及凋亡的影响,为寻找有效的天然药物提供理论依据。

研究方法

1、标本收集、

收集标本均来自广东省第二人民医院和广州市红十字会医院2011-06~2011-12 创伤性瘢痕手术患者标本 24 例,年龄 18~56 岁。标本的获取均征得患者的知情同意,并签订知情同意书。标本入选和排除标准:A、经临床医

生鉴定为瘢痕组织，并初步进行分类（增生性、瘢痕疙瘩）；B、排除垂体、肾上腺疾病、传染病、皮肤病及免疫性疾病患者，排除局部感染、溃疡患者；C、手术前未接受针对瘢痕的任何治疗。标本的获取均征得病人的同意，签知情同意书。

2、标本的处理、分组

组织切取后冷冻干燥法保存，均于 4 小时内进行实验。标本分三部分处理：一部分用于细胞原代培养，另一部分用 10%福尔马林甲醛溶液固定，用于形态学鉴定（如免疫组化等）；第三部分置于液氮中冻存备用（提取蛋白和 RNA 用于后续试验）。

选取同期因其他手术切除的正常皮肤组织 3 例作为正常对照组进行研究。

3、组织微粒法进行瘢痕成纤维细胞原代培养，总结和完善瘢痕成纤维培养的方法，并对建立的细胞系进行命名和记录相关资料；观察瘢痕成纤维细胞生长规律和生长特点，MTT 法绘制细胞生长曲线图；根据细胞形态以及 α -SMA 抗体的细胞免疫组化对瘢痕成纤维细胞进行鉴定。

4、对增生性瘢痕组织进行 HE 染色和 masson 三色染色观察其形态学特征，比较正常组织和瘢痕组织的差异性。

5、CollagenI, CollagenIII 的免疫组织化学染色，分析其在瘢痕组织内分布特点和表达量。

6、应用 RT-qPCR 技术检测病理性瘢痕组织真皮内 Collagen I, Collagen III, MMP-1, TIMP-1, SMAD3, SMAD7 基因表达情况，并与正常组织进行比较，分析其差异性；应用 Western Blot 技术检测 MMP-1、SMAD3、TIMP-1 蛋白在瘢痕组织内的表达。

7、使用 MTT 法检测不同浓度组瘢痕成纤维细胞增殖情况，绘制抑制率曲线图，并进行统计学分析各组差异性；使用流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测不同浓度灯盏花素对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响；半定量 RT-PCR 检测细胞 Collagen I 和 Collagen III mRNA 表达。

研究结果

1、瘢痕成纤维细胞形态学观察和鉴定

(1) 病理性瘢痕组织微粒在接种后大约 2~7 天, 少量细胞从组织周围放射状或者旋涡状爬出 (图 1-1a、b)。原代成纤维细胞呈梭形或不规则三角形, 胞质向外伸出多个长短不同的突起, 多呈放射状、编织状或漩涡状排列, 有时细胞排列紊乱, 有明显的交叉重叠现象并呈团块状。细胞免疫组化 α -SMA 染色显示细胞核呈类圆形或长椭圆。

(2) 病理性瘢痕成纤维细胞传代培养时, 成纤维细胞刚接种尚未贴壁时呈球形 (图 1-1c), 贴壁后细胞逐渐伸展, 呈梭形、长条形、多角形或不规则形 (图 1-1d)。2~3d 即呈汇合状态 (图 1-1e)。细胞密度低时细胞之间排列疏松, 有较大细胞间隙 (图 1-1e)。细胞密度高时, 细胞相互平行排列或呈放射状和漩涡状排列 (图 1-1f)。随着细胞代龄的增高, 细胞逐步出现老化现象, 镜下观察可见细胞体积变大、形状扁平, 过度伸展, 伸展末端细长有分支, 生长缓慢。

(3) 生长曲线显示: 瘢痕成纤维细胞接种后经过短暂的潜伏期, 开始增长的趋势, 于 6~8 天生长进入对数期, 10 天以后进入停滞期 (图 1-3)。

(4) α -SMA 细胞免疫组化染色, 出现较多阳性染色细胞的结果。结合其分离时的组织来源, 以及其长梭形、栅栏状、漩涡状生长的特点, 证实其为成纤维细胞。

2、瘢痕组织 HE 染色观察结果: (1) 正常皮肤成纤维细胞和微血管数目较少 (图 2-3a)。(2) 瘢痕组织内可见成纤维细胞和微血管增多, 微血管呈缩窄倾向 (图 2-3e)。真皮内见编织状排列的大片致密嗜伊红染同质性粗大胶原纤维, 排列紊乱, 无一定的方向, 胶原纤维相互交叉呈漩涡状或结节状分布, 结节中的胶原纤维较细, 各结节之间由粗大的胶原纤维束分隔, 粗大的胶原纤维束间可见分布有数量不等的成纤维细胞和小血管。(3) 瘢痕组织 (图 2-3b、d) 表皮厚度较正常表皮 (图 2-3a) 明显增厚。

3、Masson 三色染色观察发现: 瘢痕组织真皮层大量胶原纤维, 粗细不一,

显示真皮乳头层及附近血管增生,胶原纤维排列紊乱(图 2-4a);真皮网状层胶原纤维排列致密,近表皮处紊乱,近皮下组织处排列规则,较多血管分布,部分胶原纤维交叉形成胶原结节,以近乳头层处明显(图 2-4b)。

4、免疫组化结果(图)显示:瘢痕组织 I 型胶原抗体在真皮层的细胞间质中,主要分布于真皮网状层,较为粗大,交织成结节状,周围散在分布成纤维细胞和血管壁。III型胶原散在分布于真皮层的细胞间质中,以真皮乳头层分布较多,胶原束较细,排列疏松,走行方向不一,互相交织。血管壁上均有两种纤维的分布。

5、RT-qPCR 结果显示:瘢痕真皮组织和正常皮肤真皮组织内均可检测到 collagen I、collagen III、MMP-1、TIMP-1、SMAD3、SMAD7 的基因表达。与正常组织相比,瘢痕组织内 collagen I ($t=5.85$, $P<0.01$)、collagenIII ($t=4.515$, $P<0.05$)、MMP-1 ($t=-13.22$, $P<0.01$)、TIMP-1 ($t=2.52$, $P<0.05$)、smad7 ($t=-2.503$, $P<0.05$) 基因表达差异具有显著性;由图可见 collagen I、collagenIII、TIMP-1 表达较正常组织升高,而 MMP-1 表达较正常组织降低; Smad 3 ($t=-0.339$, $P>0.05$) 基因表达未见明显差异。(图 2-7, 表 2-1)

6、Western Blot 显示:这些样品中瘢痕真皮组织和正常皮肤真皮组织内均可检测到 MMP-1、TIMP-1、SMAD3 蛋白表达,但是表达量均低于正常组织。(图 2-9)

7、灯盏花素作用前后成纤维细胞形态未见明显变化;灯盏花素对体外培养 FB 生长增殖具有明显的抑制作用 ($F=3.309$, $P<0.01$)(表 3-1)。与对照组相比, (80、100、150) $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度(实验)组明显抑制瘢痕成纤维细胞生长($P<0.05$)。结合抑制率曲线可知,灯盏花素对瘢痕成纤维细胞的抑制作用呈剂量依赖性(图 1)。 $IC_{50}=123.5\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

8、流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测 FB 凋亡结果显示: IC_{50} 处瘢痕成纤维细胞凋亡率为 14.2050 ± 0.95553 , 未加药组瘢痕成纤维细胞凋亡率为 4.0220 ± 0.31412 , 两者相比差异具有统计学意义 ($t=-22.653$, $P<0.05$)。RT-PCR

结果显示随着灯盏花素浓度的升高,对瘢痕成纤维细胞 collagen I 和 collagen III mRNA 产生明显的影响,差异具有统计学意义。(如图 3-4,表 3-1)

结论

1、本研究改良了瘢痕成纤维细胞培养方法,减少了培养失败率,进一步补充了瘢痕成纤维细胞培养相关理论,为细胞培养提供一种高效方法。

2、瘢痕成纤维细胞和正常成纤维细胞形态上无明显的区别,可利用特异性标志 α -SMA 对其进行鉴别。

3、增生性瘢痕组织中 collagen I 和 collagen III 明显的增加, MMPs 表达减少,以及 TIMPs 表达增高,与创面愈合纤维瘢痕形成关系密切。

4、瘢痕增生过程中是多种信号通道、多因素相互作用的复杂过程。

5、灯盏花素可通过抑制瘢痕成纤维细胞的增殖,并且诱导其发生凋亡,在瘢痕的治疗方面存在较大的应用前景,为寻找有效治疗增生性瘢痕的药物提供了新的思路。

关键词 灯盏花素 增生性瘢痕 成纤维细胞 胶原纤维 细胞凋亡

The study of Mechanism and Treatment of Posttrauma Scar

Name: Liu Yin-ping

Supervisor: Huang Dong

ABSTRACT

Background:

Pathological scar , one of complications after skin trauma and post-operative, has a bad effect on the patient's appearance and psychological. Its mechanism and prevention has been the focus of the medical profession. There is no clear conclusion on its mechanism, prevention and treatment.

For many years, many scholars approach the problem from different perspectives on hyperplastic scar formation and regression, expect to find a breakthrough in the treatment of scar. A more consistent view are that: ①hypertrophic scar is characterized by excessive cell proliferation and extracellular matrix, in which fibroblasts are the major effector cells; ②The hypertrophic scar is mainly the result of collagen metabolism disorders at the biological level; ③TGF- β 1/smad signaling pathways are closely related with physiological and pathological procession of fibroblasts, such as proliferation, differentiation, migration, apoptosis and collagen metabolism and so on.

Fibroblasts ,as the major effector cells in the wound healing process, often shows excessive proliferation and active function, causing a cascade of reactions, out of control in wound repair, excessive deposition of extracellular matrix, the formation of pathological scar. Thus, the abnormal function of fibroblasts plays an important role

ABSTRACT

in pathological scar hyperplasia. Lekic et al. describes fibroblasts as engineers, builders and administrators of wound repair. Since Convey et al. cultured hypertrophic scar fibroblasts in 1959, it started a new stage of understanding of the mechanism of scar in vitro and the cellular level. In recent years, with the deepening basic research of pathological scar, relationship of fibroblasts and scar and mechanism of scar formation and invasive growth have become a hot topic of medical research. However, the primary culture of scar fibroblasts is still a more difficult for beginners for a high failure rate. Therefore, the establishment of efficient cultivation methods is particularly necessary for scar fibroblasts.

The prevailing view is that The hypertrophic scar is mainly the result of collagen metabolism disorders at the biological level. The excessive synthesis of collagen and collagen proportion change during the scar formation process is the important reason of hypertrophic scar. Collagen metabolism disorder has a close relationship with the dynamic balance of TIMPs and MMPs and TGF-beta signaling pathway. However, the changes of collagen and its regulation in hypertrophic scar is still unknown.

The dynamic balance between MMPs and TIMPs is an important factor affecting the metabolism of collagen. But there are different opinions on changes of collagenase. Ghahary et al reported that mRNA expression of MMP-1 in human scar fibroblast derived fibroblast collagenase was significantly lower than normal skin fibroblasts, while there was no significant difference in the mRNA expression of TIMP-1. Zhao et al. confirmed that MMP-3 mRNA expression level in the HS group was lower than the normal group, which reached the same results. Likely, in the study of abnormal skin scars, the expression of TIMP-1 was significantly higher than that of normal tissue. The same thing occurred in the liver and kidney fibrosis. In addition, many opposite conclusions were reported. It is possible to provide clues for the mechanism of scar formation by exploring the changes of MMPs and TIMPs in

the scar tissue and its related factors.

TGF- β 1/sm α d signaling pathways plays an important role in the collagen metabolism of hypertrophic scar. SMADs is the main transduction molecules from the receptor to the cell nucleus. Different Smad have two-way regulation on fibroblast. Numerous studies have confirmed that Smad2 / 3 is the promoting factor, while SMAD7 being the inhibitory role. However, variation and its influencing factors of Smad2/3 and SMAD7 is also the focus of the study because of the interaction of various signaling pathways.

Lots of work have been done for the pathogenesis and treatment of the HS and fruitful results have been achieved, but there still no effective or satisfactory treatment for HS so far. Surgical resection is the most common treatment for hypertrophic scar. Despite the improvements were done, Surgical resection may still be re-trauma healing and lead to excessive scar formation. This group have adopted surgical treatment due to the dysfunction and ugly appearance. The surgical specimens were used for this experiment. It was reported that breviscapine can inhibit fibrosis progression, but it has not been reported whether it can inhibit proliferation of pathological scar fibroblast. Other studies suggest that apoptosis is closely related to the formation of HS. And the regulation of fibroblast apoptosis is expected to become a new bright spot of the effective prevention and treatment of HS.

In this study, we observe the growth variation and biological identification in the establishment of efficient primary culture of scar fibroblasts, and firstly explore the impact of Breviscapine on proliferation and apoptosis of scar fibroblast, hope to find effective drugs for the treatment of hypertrophic scars. The metabolism of collagen fibers in the dermis layer of scar tissue related molecules, and tap one of the important molecular variation; to provide ideas for the clarification and treatment of mechanism of hypertrophic scar.

Objective:

1. Searching for an efficient method of scar fibroblasts culture in vitro.
2. Detecting the morphology, molecular biology of pathological scar, to understand formation mechanism of hyperplastic scar in depth.
3. To study the effects of Brevescapine on proliferation and apoptosis of cultured scar fibroblasts. It may be developed as a new drug for the treatment of pathological.

Methods:

1. Specimen collection

The 24 Traumatic scar specimens, age 18 to 56 years, was from the Second People's Hospital of Guangdong Province and Guangzhou Red Cross Hospital from 2011.06 to 2011.12. Access to specimens with the patient's informed consent, and signed informed consent. Inclusion and exclusion criteria of specimen : 1. The clinician identification of scar tissue, and a preliminary classification (hypertrophic, atrophic, keloid); 2. Without the pituitary, adrenal diseases, infectious diseases, skin diseases and autoimmune diseases, local infection, ulcer; 3. Receiving nothing treatment for the scar. Obtaining of specimens had the patient's informed consent, and signed the Informed Consent Form.

2. Specimen handling, grouping

Specimen was saved with freeze-drying method, and was used for primary culture within 4 hours. The specimens were divided into three parts: 1. Cells primary culture; 2. Fixed in 10% formaldehyde solution for morphological identification (eg, immunohistochemistry, etc.); 3. Frozen in liquid nitrogen alternate (extraction of protein and RNA). three normal skin used as normal controls

3. Primary culture of scar fibroblasts: Observing the scar fibroblasts growth regulation and the growth characteristics; Drawing cell growth curves by MTT assay; identification of scar fibroblasts.

4.Observing the differences morphological characteristics between hypertrophic scar and normal tissue by HE staining and masson trichrome staining.

5.Distribution characteristics and expression of Collagen I and Collagen III was analyzed in the scar tissue by immunohistochemical staining.

6.Gene expression of Collagen I , Collagen III, MMP-1 , TIMP-1, SMAD3, SMAD7 within the dermis is detected by RT-qPCR and the difference is compared between HS and the normal tissue. Protein expression of MMP-1, of SMAD3 and TIMP-1 by Western Blot technology.

7.Fibroblasts were cultured as an experimental model and the effect of breviscapine were studied. Cell proliferation was determined by MTT assay, and Apoptosis of cultured fibroblasts is induced by breviscapine at the IC50 with Annexin V/PI staining and flow-cytometry.

Results:

1. Morphology and identification of scar fibroblast

(1) A small number of cells climb out from HS organization in the shape of radial or spiral between two and seven days.(Fig 1-1a, b) Primary fibroblasts were in the shape of spindle-shaped or irregular triangle. Nuclei were round or oblong in α -SMA of Immunohistochemistry staining.

(2) It is spherical when the fibroblast has not been adherent in HS fibroblast subculture (Fig 1-1c), and then extended, showing spindle-shaped, long rectangular, polygonal or rules-shaped (Fig 1-1d). Cell was in the state of the convergence at 2 ~ 3d (Fig 1-1e). It is arranged loosely and in larger cell gap in Low cell density (Fig 1-1e) and arranged in parallel or radial and swirling arrangement in high cell density, (Fig 1-1f).

(3) Growth curve: After a short incubation period, Scar fibroblasts showed a gradually increasing trend growth in 6 to 8 days (Fig 1-3) and into the stagnation of

the number after 10 days.

(4) The results of α -SMA of Immunohistochemical staining is shown in fig 1-5. We can identify fibroblasts by positive staining cells and its morphology.

2. HE staining and Masson staining: 1. Fewer fibroblast and microvascular in normal skin (Fig 2-3a). 2. Increased fibroblast and microvascular can be seen in Scar tissue (Fig 2-3e). Thick collagen in dermis is disorganized, the collagen fiber was cross-cutting ,swirling, nodular, among which there are collagen fibers,vessels and fibroblast(Fig 2-3b, d). 3. Marked thickening of the epidermal Scar tissue is thicker than normal epidermis (Fig 2-3a).

3. Result of IHC: Collagen I is mainly distributed in the reticular dermis. The distribution of Collagen III is in the papillary dermis. Both of two fibers are found in the vessel wall.

4. RT-qPCR results: collagen I, collagen III, MMP-1 and TIMP-1, SMAD3, SMAD7 gene expression in dermal tissue of the scar and normal skin can be detected. Compared with normal tissue, gene expression of collagenI ($t=5.85$, $P<0.01$), collagenIII ($t=4.515$, $P<0.05$), MMP-1 ($t=-13.22$, $P<0.01$), TIMP-1 ($t=2.52$, $P<0.05$), smad7 ($t=-2.503$, $P<0.05$) were significant different in scar. We can see collagenI、 collagenIII、 TIMP-1 is increased and MMP-1 is decreased. There was no significant difference in gene expression of Smad 3 ($t=-0.339$, $P>0.05$) , and Smad7 ($p = 0.0629 > 0.05$).(Fig 2-7 and Tab 2-1).

5. Western blot: MMP-1 and TIMP-1, of SMAD3 can be detected in dermal of the scar tissue samples and normal skin. But with a lower Protein expression than normal tissue.(Fig 2-9).

6. In vitro , the proliferation of fibroblasts is significantly inhibited by breviscapine in the manner of dose-dependent($F=3.309$, $P<0.01$). Compared with the control group, proliferation of fibroblasts is significantly inhibited in the

concentration of 80,100,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($P<0.05$). Apoptosis rate of fibroblasts induced by breviscapine at the IC₅₀ is significantly increased.

7. The results of Flow cytometric Annexin V/PI double dyeing show apoptosis rate of experimental group is 14.2050 ± 0.95553 in IC₅₀, Apoptosis rate of control group is 4.0220 ± 0.31412 , a statistically significant difference in both ($t= 22.653$, $P < 0.05$). The results of RT-PCR show that with increasing of concentration, the scar fibroblasts collagen I and collagen III mRNA are influenced obviously, there is a statistically significant difference. (fig 3-4, tab 3-1)

Conclusion:

1. Establishing scar fibroblast cell lines and naming them, and complementing primary culture theory of scar fibroblast.

2. A better understanding of different fibroblasts between HS and normal skin is observed by observing the morphological changes during the growth process.

3. Collagen I and collagen III in the hypertrophic scar tissue increased significantly. The formation of HS is closely related with the reduced expression of MMPs, and increased expression of TIMPs.

4. The formation process of scar is a complex process of multiple signal paths, multi-factor interactions.

5. Breviscapine can significantly inhibit the proliferation and induce the apoptosis of cultured scar fibroblasts. It may be developed as a new drug for the treatment of pathological scar.

KEYWORDS: breviscapine; hypertrophic scar; fibroblasts; collagen apoptosis

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	i
第一部分 增生性瘢痕成纤维细胞的原代培养与鉴定	1
1 材料和方法	1
2 结 果	6
3 讨论	10
4 结论	12
参考文献:	12
第二部分 病理性瘢痕胶原代谢及其影响因素的研究	15
1 材料和方法	15
2 结果	22
3 讨论	31
4 结论	34
参考文献:	34
第三部分 灯盏花素对创伤性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡及 mRNA 表达的影响	36
1 材料和方法	36
2.结 果	39
3 讨 论	42
4 结论	44
参考文献:	44
全文总结	46

目 录

综 述	47
中英文缩略词对照表	58
攻读学位期间主要的研究成果	59
致 谢	60
学位论文原创性声明	61
统计学审稿证明	62

第一部分 增生性瘢痕成纤维细胞的原代培养与鉴定

增生性瘢痕是皮肤创伤及手术后最常见的严重并发症，严重影响着患者的外貌和心理。其机制及防治一直是医学界的研究热点，目前对其机制的研究尚无明确的结论。普遍的观点认为增生性瘢痕主要以成纤维细胞过度增殖和以胶原为主的细胞外基质过度合成、沉积为特征^[1]，成纤维细胞是参与创面修复的众多细胞中最为重要的细胞成分，起着重要的作用。Lekic 等^[2]认为，它是创伤修复的工程师、建筑者和管理员。成纤维细胞能合成细胞外间质的多种成分，常常表现为过度增殖和功能活跃，从而引起一系列级联反应造成创面修复失控^[3]，不断地合成和分泌大量的胶原并沉积于创面促进其愈合，最终导致创面过度纤维化而形成瘢痕^[4, 5]。自 Convey 等^[6]于 1959 年培养瘢痕成纤维细胞获得成功以来，建立了多种体外培养瘢痕成纤维细胞的方法，开始了体外研究瘢痕的新阶段，为在细胞水平上认识瘢痕形成异常增生机理提供了有力的证据和资料，使瘢痕形成机理及治疗的研究提高到一个新的水平。随着现代细胞生物学和分子生物学的迅猛发展，对其认识也不断丰富和深化。但是，瘢痕成纤维细胞的原代培养对于初学者仍较为困难，失败率较高。因此有必要建立更加完善和高效的培养方法，并且对其进行鉴别。

本实验旨在通过组织微粒贴壁^[7, 8]法对瘢痕成纤维细胞原代培养、传代培养、冻存和复苏培养和鉴定，了解瘢痕成纤维细胞生长过程中的形态学变化，了解增生性瘢痕成纤维细胞与正常皮肤来源的成纤维细胞的生物学差异。提供一种高效的体外培养瘢痕成纤维细胞的方法。为体外研究增生性瘢痕的形成机制及寻找切实有效的治疗靶点搭建良好平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

(1) RPMI 1640

GIBCO 公司

- | | |
|-------------------------------|--------------|
| (2) 10% FBS | 浙江天杭生物科技有限公司 |
| (3) 青霉素 100u/ml, 链霉素 100μg/mL | 广州外显子公司 |
| (4) 胰蛋白酶(Trypsin) | AMRESCO 公司 |
| (5) 二甲基亚砷(DMSO) | Sigma 公司 |
| (6) MTT | Sigma 公司 |
| (7) AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒 | BD 公司 |

1.1.2 实验仪器

- | | |
|------------------------------------|----------------------|
| (1) 超净工作台 | 博迅实业公司 |
| (2) CO ₂ 培养箱 | 日本 Sanyo 公司 |
| (3) 倒置显微镜、荧光显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| (4) 普通电冰箱 | 海尔冰箱 |
| (5) 96 孔细胞培养板、24 孔培养板、6 孔培养板、细胞培养瓶 | 美国 Corning Costar 公司 |
| (6) EL-800X 型酶标仪 | BIO-TEK 公司 |
| (7) 流式细胞仪 | FACS 公司 |

1.1.3 标本的收集

目前已经收集到标本 24 例（如表 1-1），分别来自广东省第二人民医院和广州市红十字会医院，标本入选标准为：A、经临床医生鉴定为瘢痕组织，并初步进行分类（增生性、瘢痕疙瘩）；B、排除垂体、肾上腺疾病、传染病、皮肤病及免疫性疾病患者，排除局部感染、溃疡患者；C、未接受任何治疗。标本的获取均征得病人的同意，签知情同意书，。手术前均未进行针对瘢痕的治疗。组织切取后放于无菌的容器中，均于 4 小时内进行实验。标本分四部分处理：一部分用于细胞原代培养，另一部分用 10%福尔马林甲醛溶液固定，用于形态学鉴定（如免疫组化等）；第三部分置于液氮中冻存备用（提取蛋白和 RNA 用于后续试验）。选取同期因其他手术切除的 3 例正常皮肤组织部分作为正常对照组。瘢痕增生时间的计算：伤口愈合开始，到获取标本时间为止。

表 1-1 瘢痕标本一般资料

病人	年龄 (岁)	性别	部位	来源	增生时间(月)	受伤原因
1	23	男	腹部	B	8	烫伤
2	29	女	面部	B	12	烫伤
3	15	女	左上肢	B	7	火焰烧伤
4	14	女	左腮窝	A	120	烧伤
5	29	女	面部	B	13	热水烫伤
6	20m	女	左足背	B	5	烫伤
7	37	男	右手背	B1	4	火焰烧伤
8	37	男	颈部	B2	5	火焰烧伤
9	37	男	左手	B3	6	火焰烧伤
10	39	男	颈部	B	12	烧伤
11	18	男	左膝	A	8	摔伤异物存留
12	42	男	左大腿	A	21	骨折术后
13	40	女	腹部	A	84	结扎术后瘢痕
14	32	女	腹部	A	288	膀胱切开术后
15	20	男	左踝部	A	3	骨折术后
16	23	男	左腕部	A	12	骨折术后
17	46	男	左腕部	A	24	骨折术后
18	19	女	左大腿	A	19	骨折术后
19	25	女	腹部	A	24	剖宫产术后
20	26	女	腹部	A	16	剖宫产术后
21	38	女	腋窝	A	24	腋臭术后
22	46	女	耳垂	A	36	瘢痕疙瘩切除术后
23	17	女	右肘部	A	72	烧伤
24	23	女	耳	A	12	外伤后瘢痕疙瘩

备注：A 为广东省第二人民医院；B 为广州市红十字会医院；B1、B2、B3 分别为同一个人不同时间不同部位获取的标本。

1.2 实验方法

1.2.1 瘢痕成纤维细胞培养

(一) 原代培养

1、在手术室无菌条件下，将切取的新鲜皮肤、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织，放入无菌手套，周围放有冰块的容器中，带回无菌工作间。

2、把组织块置于培养皿内，修除表皮和脂肪组织，用含 1%双抗的生理盐水反复冲洗后，眼科剪反复剪切组织块成 $(0.5\sim 1)\text{mm}^3$ 大小。用弯头吸管吸取组织块接种于 40ml 培养瓶瓶壁上，组织块间留约 0.3~0.5cm 的间距。

3、塞好瓶塞，放入 37℃电热恒温培养箱内 3.5 小时使培养的组织小块微干涸

4、从温箱中取出培养瓶，向瓶底轻轻注入含 RPMI1640+15%FBS 培养液 5ml,然后缓缓翻转培养瓶，让培养液慢慢覆盖附于瓶壁上的组织小块，置于 37℃温箱内培养。

5、一周后取出培养瓶，弃去瓶内培养液，生理盐水漂洗两次后加相同的培养液 5ml 继续培养。以后待细胞萌出后，同样方法每周换液两次。

(二) 传代培养

待原代培养细胞生长基本融合成片时即可传代。

1、吸出培养瓶内的培养液，生理盐水漂洗两次，向瓶内加入 0.5%的胰蛋白酶溶液少许以覆盖瓶底为度。

2、大约 1 分钟左右，镜下观察细胞胞质回缩，细胞间隙增大时立即吸出胰酶液，加入 RPMI1640 培养液终止消化。

3、用吸管吸取培养液轻轻反复吹打瓶壁细胞使之脱落形成细胞悬液，按 1: 3 比例分装传代，加入足量的 RPMI1640 培养液后置于 37℃恒温培养箱内培养

4、每周换液两次，待细胞融合成单层再次传代。本实验均在第 4~8 代进行。

(三) 细胞冻存与复苏

- 1、消化已生长成融合的单层细胞；
- 2、离心后吸去消化液；
- 3、加入冻存液悬浮细胞，调节细胞浓度为 1.5×10^6 个；
- 4、分装在 2ml 容积的细胞冻存管中，每管 1ml；
- 5、放置于 -70°C 冰箱过夜再转入液氮容器贮存。

取液氮容器中的细胞冻存管，迅速置于 37°C 水浴，连续晃动使之受热均匀。完全溶解后吸入离心管中，加 5ml 培养液，平衡后 2000rpm 离心 5min，弃上清，加 4~5ml 培养液悬浮细胞，转置培养瓶中， 37°C ，5% CO_2 条件培养，24d 时后换液一次，待细胞生长至一定数量后，常规传代培养。

(四) MTT 法绘制细胞生长曲线

收集对数期的瘢痕成纤维细胞，调整浓度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ ，接种于 96 孔培养板，每孔 $100\mu\text{L}$ ，5% CO_2 ， 37°C 孵育，分别于第 2、4、6、8、10、12 天，每孔加入 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 液 $20\mu\text{L}$ ，继续培养 4h，弃上清液，每孔加 $150\mu\text{LDMSO}$ 溶解，震荡。在酶标仪(492nm 波长)上检测各孔吸光度值 A。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷)，对照孔(细胞、培养基、MTT、二甲基亚砷) 对每个样品计数三次，取其平均值，每次测三个孔。

1.2.2 细胞免疫组化：每组设立 PBS 对照组

- 1、将培养的瘢痕成纤维细胞接种于培养板中的玻片上，经干预反应后，取出玻片，PBS 冲洗，乙醇和丙酮 1: 1 固定 15min，PBS 洗，3min×3 次；
- 2、切片常规脱蜡至水：在含 1%Triton X-100 的 0.01mol/L PBS 溶液(pH7.4)中孵育 20min。
- 3、加入 3% H_2O_2 室温孵育 15min，以灭活内源性过氧化物酶；然后用蒸馏水漂洗 3 次，再用 PBS 溶液漂洗 3 次，每次 3min。
- 4、10%山羊血清封闭，室温 30min；甩去多余液体，不洗；
- 5、加入 1:100 稀释的多克隆抗体， 4°C 过夜，取出片子，室温 20 min，PBS

溶液(pH7.4)洗 5min×3 次;

6、滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37℃ 30min, PBS 溶液(pH7.4)洗 5min×3 次;

7、滴加 SP 试剂, 37℃15-20min; PBS 溶液(pH7. 4)洗 5min×4 次: DAB 室温显色 5~10min, 在显微镜下掌握染色的程度, PBS 洗 10 分钟;

8、苏木素轻度复染, 乙醇梯度脱水(70%乙醇 1 次, 95%乙醇 2 次, 100%乙醇 4 次)透明、树脂封片、显微镜下观察。以 PBS 溶液代替一抗作阴性对照, 其它步骤相同, 结果为阴性。

1.3 统计学处理

所有计量资料均结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用spss13.0统计软件包进行统计学处理。

2 结果

2.1 显微镜下细胞形态学观察

病理性瘢痕组织微粒在接种后大约 2~7 天, 少量细胞从组织周围放射状或者旋涡状爬出(图 1-1a、b)。原代成纤维细胞呈梭形或不规则三角形, 胞质向外伸出多个长短不同的突起, 多呈放射状、编织状或漩涡状排列, 有时细胞排列紊乱, 有明显的交叉重叠现象呈团块状。细胞免疫组化 α -SMA 染色显示细胞核呈类圆形或长椭圆。

病理性瘢痕成纤维细胞传代培养时, 成纤维细胞刚接种尚未贴壁时呈球形(图 1-1c), 贴壁后细胞逐渐伸展, 呈梭形、长条形、多角形或不规则形(图 1-1d)。2~3d 即呈汇合状态(图 1-1e)。细胞密度低时细胞之间排列疏松, 有较大细胞间隙(图 1-1e)。细胞密度高时, 细胞相互平行排列或呈放射状和漩涡状排列(图 1-1f)。

随着细胞代龄的增高, 细胞逐步出现老化现象, 镜下观察可见细胞体积变大、形状扁平, 过度伸展, 伸展末端细长有分支, 生长缓慢。

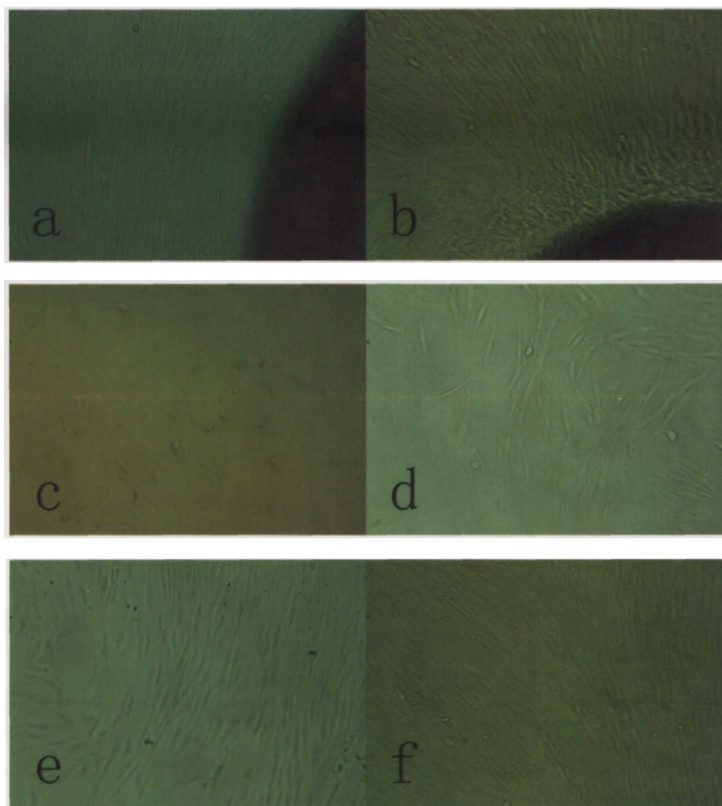


图 1-1 成纤维细胞形态学观察 abef $\times 200$, cd $\times 400$

Fig 1-1 morphology of fibroblast

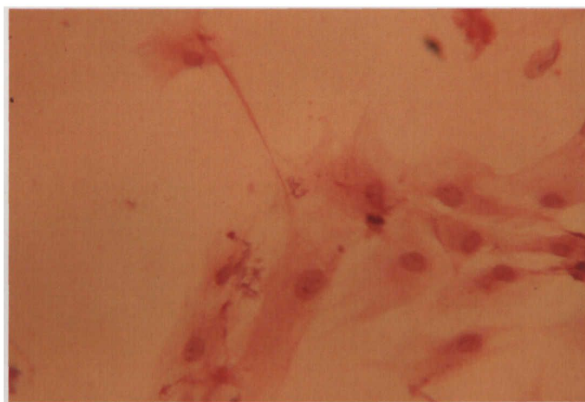


图 1-4 本研究采用了 IHC 染色对 α -SMA 进行染色，研究细胞中 α -SMA 的表达，进而验证细胞来源于瘢痕组织。研究表明， α -SMA 在成纤维细胞较高的阳性率。 $\times 400$

Fig 1-4 Higher alpha SMA expression in the fibroblasts with IHC.

2.2 成纤维细胞活性测量

对瘢痕成纤维细胞生长活性采用流式细胞仪 annexin FITC/PI 双染试剂盒测量，计算其活细胞比例(N=4)。结果显示活细胞比例为 92.44%±4.45%，表明细胞较高的生物活性。（图 1-2）

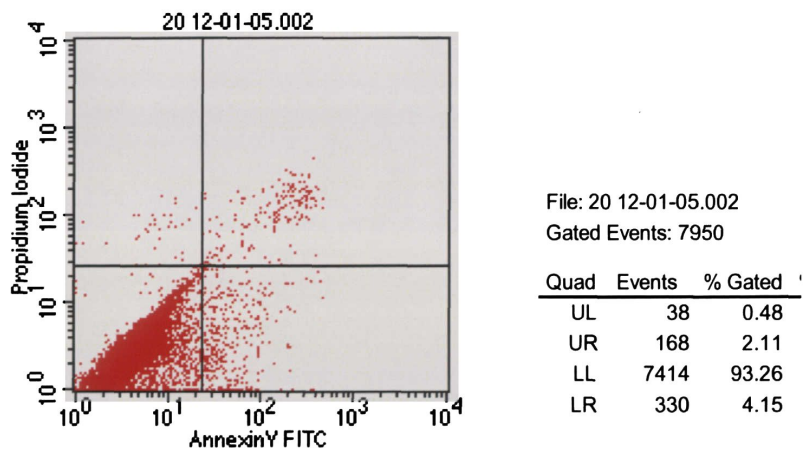


图 1-2 流式细胞仪 annexin FITC/PI 双染试剂盒检测活细胞比例

Fig 1-2 The survival rate of fibroblast

2.3 细胞生长曲线

MTT 法分别于 2、4、6、8、10、12 天测定细胞吸光度值，绘制细胞生长曲线，可见细胞接种后经过短暂的潜伏期后，呈逐渐增长的趋势，于 6~8 天时生长进入对数期，10 天以后进入停滞期（图 1-3）

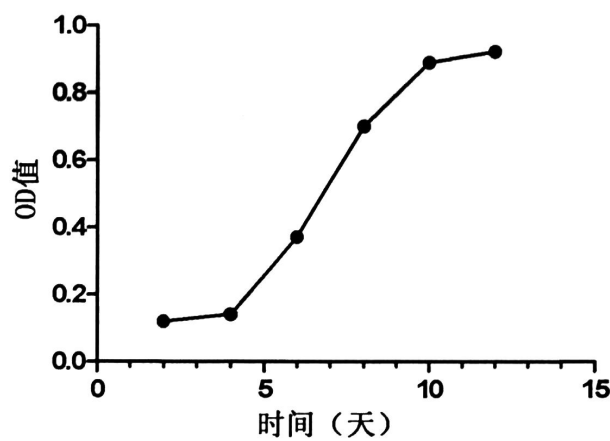


图 1-3 瘢痕成纤维细胞生长曲线图 (n=3)

Fig 1-3 Cell growth curves of fibroblasts

2.4 瘢痕成纤维细胞鉴定—细胞免疫组化 α -SMA 染色

我们使用 α -SMA 对瘢痕成纤维细胞进行鉴定，鉴定方法包括：细胞免疫组化（如 Fig 1-4），出现较多阳性染色细胞的结果。结合其分离时的组织来源，以及其长梭形、栅栏状、漩涡状生长的特点，证实其为成纤维细胞。

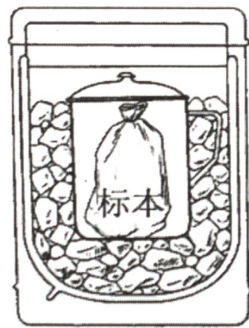


图 1-5 干燥冷藏法保存运送标本

Fig 1-5 Save and shipping specimens in Dry and cold condition

2.5 细胞命名

我们共培养 12 例，成功 3 例，建立三个瘢痕成纤维细胞系。（如表 1-2）

表 1-2 本实验瘢痕成纤维细胞系的命名
Tab 1-2 Nomenclature of scar fibroblast lines in this experiment

细胞系	细胞爬出 时间 (d)	年龄	性别	部位	增生时间	形成原因
Hlyp1	2	46	女	耳垂	36	瘢痕疙瘩切除术后
Hlyp2	3	18	男	左膝	8	摔伤异物存留
Hlyp3	5	37	男	右手背	4	火焰烧伤

3 讨论

3.1 培养过程注意事项

在成纤维细胞的培养方面，经过多次失败后的成功，总结了一套组织块法培养成纤维细胞的经验。我们采用上述方法进行原代培养，发现细胞最短可在 48 小时从组织周围爬出。田勇^[9]等报道瘢痕组织块在接种后第 6d 可见细胞爬出。而 Russell^[10]等认为瘢痕组织与正常皮肤的成纤维细胞在细胞生长率上无明显差异。郭冉^[11]发现多聚赖氨酸能促进瘢痕组织细胞贴壁，更利于成纤维细胞的游出。我们体会到培养时以下一些问题值得注意：

(1)首先取材时，干燥冷藏法保存运输（图 1-5），要在最短时间内作培养，不然会降低成纤维细胞活性，影响细胞培养的效果。

(2)切取组织块时需要将表皮和皮下脂肪组织剔除 原因：1、有报道认为表皮细胞及皮下脂肪细胞对成纤维细胞有抑制作用；2、成纤维细胞因被真皮网状层中纤维成分和皮下组织包裹而延长消化时间；3、另外有文献报道认为处于皮肤浅层的成纤维细胞增殖能力较强，但胶原蛋白合成能力较弱；而处于皮肤深层的成纤维细胞增殖能力较弱，胶原蛋白的合成能力较强^[12, 13]。因此，我们只要真皮比较靠外侧的部分进行培养。

(3) 组织贴壁时间的重要性 取到组织后须贴壁超过 3 小时以上，而且之后的 2~3 天内保持其贴壁，尽可能不要晃动培养瓶，最快 2~4 天就可以看到细胞从组织周围爬出。

(4) 细胞从组织周围长出以后生长速度很慢，有的呈放射状生长，有的呈团

状生长。对瘢痕成纤维细胞生长特性的观察结果显示,第 2~6 天为对数生长期,第 7~8 天进入生长停滞期^[14]。我们发现,在原代培养过程中,待细胞生长到一定量后应尽快传代,以确保细胞获得足够的营养以及生长空间,也可以减少细胞污染的可能性,提高培养成功率。

(5) 导致培养失败的最主要原因是污染,因此,我们在培养前无菌保存,标本获取后用生理盐水多次冲洗,操作过程严格按照操作规范,减少细胞污染的发生。

(6) 成纤维细胞系是通过原代、传代培养获得的,是有限细胞系,随着代龄的增加,细胞会逐渐出现衰老迹象。据报道人皮肤成纤维细胞在体外培养条件下,连续传代,一般最多能传 50 代,25 代以后其生物学性状变化较大^[15],并且大多数对数生长期细胞能保持二倍体核型,在形态和机能上与体内细胞相似,因此,实验中则多选用 3~10 代的生长状态良好的细胞^[16]。本实验中的瘢痕成纤维细胞连续传 10 代,其细胞形态及生长增殖状况未见明显改变,实验中选用 4~8 代对数生长期细胞进行后续实验。

3.2 瘢痕成纤维细胞的鉴定

以往采用波形蛋白作为成纤维细胞的特异性标志蛋白,同时辅以角质形成细胞的特异性蛋白 CK19 为阴性对照筛选成纤维细胞。近些年来,根据 Laura 等^[17]研究结果,推测 CD90 可能是增生性瘢痕成纤维细胞的特异标记,在皮肤或瘢痕成纤维细胞膜上异常表达,参与信号转导,并且可能和 α -SMA 的收缩功能有协同效应,在增生性瘢痕的发生、发展中起作用。我们依据以下原因将 α -SMA 作为鉴定瘢痕成纤维细胞的标志:

1、在瘢痕形成过程中,瘢痕成纤维细胞表型结构会发生相应变化,并表现出一些不同于正常皮肤来源 FB 的生物学特性。研究中发现,在皮肤创伤愈合中期 FB 被激活表达 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA),分化成为 (myofibroblasts, MFB),MFB 大量合成胶原纤维,引起整块肉芽组织的收缩。在伤口愈合后,MFB 发生凋亡,收缩停止,肉芽组织转化为成熟瘢痕;因此,

MFB 持续表达是造成增生性瘢痕的重要细胞因素。

2、在增生性瘢痕中,参与创面修复的FB中均可见 α -SMA的表达,伤后肉芽组织MFB占40%,创缘70%FB转化为MFB,1年内的增生期瘢痕组织,MFB高达96%。

3、 α -SMA是瘢痕组织收缩的关键分子。较多的研究认为MFB是创面肉芽收缩和纤维收缩性疾病主要的细胞,它的功能是产生力量和改变组织张力。

因此,正常皮肤组织只有血管平滑肌细胞表达 α -SMA,故阳性细胞出现在皮肤血管平滑肌,其他细胞表达几乎为零。肌成纤维细胞是瘢痕组织内最具有特征性的细胞。有学者把MFB当作创伤愈合的可靠标志和创面愈合过程中结缔组织重塑和纤维化的关键细胞。

4 结论

(1) 本研究对以往瘢痕成纤维细胞培养方法进行改良,可减少失败率,高效地进行成纤维细胞培养,建立了成纤维细胞系,并对其命名,进一步补充了瘢痕成纤维细胞培养相关理论。

(2) 通过对瘢痕成纤维细胞生长过程中的形态学变化的观察,进一步认识瘢痕成纤维细胞与正常皮肤来源的成纤维细胞的异同。

(3) α -SMA作为特征性标志可用于鉴别瘢痕成纤维细胞和正常成纤维细胞。

参考文献:

- [1] Slomp A E, Kirschner R E. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management[J]. Curr Opin Pediatr. 2006, 18(4): 396-402.
- [2] Lekic P, McCulloch C A. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue[J]. Anat Rec. 1996, 245(2): 327-341.
- [3] Alhady S M, Sivanantharajah K. Keloids in various races. A review of 175 cases[J]. Plast Reconstr Surg. 1969, 44(6): 564-566.

- [4] Ogawa R. Keloids as a serious disease such as malignancy[J]. *Plast Reconstr Surg*. 2008, 122(3): 993-994.
- [5] Robles D T, Moore E, Draznin M, et al. Keloids: pathophysiology and management[J]. *Dermatol Online J*. 2007, 13(3): 9.
- [6] Conway H, Gillette R W, Findley A. Observations on the behavior of human keloids in vitro[J]. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull*. 1959, 24: 229-237.
- [7] Bi D, Chen F G, Zhang W J, et al. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters[J]. *BMC Cell Biol*. 2010, 11: 46.
- [8] Bauer M, Su G, Beebe D J, et al. 3D microchannel co-culture: method and biological validation[J]. *Integr Biol (Camb)*. 2010, 2(7-8): 371-378.
- [9] 黄勇, 任林森, 岑瑛. 瘢痕成纤维细胞培养及其生物学行为的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*. 1998(6):17-19.
- [10] Russell S B, Trupin K M, Rodriguez-Eaton S, et al. Reduced growth-factor requirement of keloid-derived fibroblasts may account for tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, 85(2): 587-591.
- [11] 郭冉, 刘洁婷, 刘海峰, 等. 组织贴壁法原代培养人皮肤瘢痕成纤维细胞[J]. *牡丹江医学院学报*. 2010(1):31-33.
- [12] Harper R A, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro[J]. *Science*. 1979, 204(4392): 526-527.
- [13] Azzarone B, Macieira-Coelho A. Heterogeneity of the kinetics of proliferation within human skin fibroblastic cell populations[J]. *J Cell Sci*. 1982, 57: 177-187.
- [14] Russell J D, Witt W S. Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue[J]. *Plast Reconstr Surg*. 1976, 57(2): 207-212.
- [15] Heckman C A, Vroman L, Pitlick A. The nature of substrate-attached materials

in human fibroblast cultures: localization of cell and fetal calf serum components[J]. Tissue Cell. 1977, 9(2): 317-334.

[16] 商庆新, 关文祥, 张涤生, 等. 疤痕成纤维细胞的培养和生长动力学研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志:379-382.

[17] Koumas L, Smith T J, Feldon S, et al. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes[J]. Am J Pathol. 2003, 163(4): 1291-1300.

第二部分 病理性瘢痕胶原代谢及其影响因素的研究

病理性瘢痕，包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩，是创伤过度反应的结果，不仅严重影响美观，而且后期较易发生挛缩导致组织或器官移位变形，如果瘢痕位于关节附近，常引起关节功能发生障碍。尽管大量的研究工作针对 HS 的发病机制和治疗，并且取得了丰硕的成果，但其发生机制尚未完全阐明。为了更深入的了解增生性瘢痕与正常皮肤组织的区别，为增生性瘢痕的部分机制提供有价值的实验依据，并丰富相应的理论，探索预防和减少瘢痕的治疗靶点。本实验对收集的标本进行形态学、分子生物学的研究，以期获得对增生性瘢痕更好的理解，提供更有质量的信息。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

- | | |
|--|--------------------------|
| 1、载玻片、盖玻片、石蜡切片 | 解放军第四五八医院病理科提供 |
| 2、山羊封闭血清、苏木精染液 | 外显子生物技术有限公司 |
| 3、Masson 三色染色试剂盒 | 福建迈新生物技术有限公司 |
| 4、免疫组化二抗：collagen III（克隆系：HWD1.1） | 北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| collagen I 二抗（产品编号：BA0325） | 武汉博士德生物技术有限公司 |
| 5、免疫组化一抗：二步法通用型抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒(编号：GK500705) | 基因公司 |
| 6、cDNA 第一链合成试剂盒 | BestBio-贝博 |
| 7、SYBR premix Ex Taq II（DRR081S） | Takara |
| 8、Western blot 二抗：MMP-1, TIMP-1, SMAD3 单克隆抗体 | santa cruz Biotechnology |
| 9、Trizol | invitrogen 公司 |
| 10、多聚甲醛 | 博士德公司 |

11、引物合成

上海生工生物有限公司

引物序列:

- Smad3: 上游引物: 5' - CCATCTCCTACTACGAGCTGAA-3' ,
下游引物: 5' - CACTGCTGCATTCTGTTGAC-3' , 长度为 149bp;
- Smad7: 上游引物: 5' - CAGCTCAATTTCGGACAACAAGA-3' ;
下游引物: 5' -GTACACCCACACACCATCCAC-3' , 长度为 494bp;
- MMP-1: 上游引物: 5' - GGGAGATCATCGGGACAAC-3'
下游引物: 5' - GGGCCTGTTGAAAAGCAT-3' , 长度为 72bp;
- TIMP-1: 上游引物: 5' -ACCACCTTATACCAGCGTTATGA-3'
下游引物: 5' -GGTGTAGACGAACCGGATGTC-3' , 长度为 96bp;
- collagen I: 上游引物: 5' -CATGCCGTGACTTGAGACTCA-3'
下游引物: 5' -AGGCGCATGAAGGCAAGTT-3' , 长度为 292bp;
- Collagen III: 上游引物: 5' -CGAGCTTCCCAGAACATCACA-3'
下游引物: 5' -TTCGTGCAACCATCCTCCA -3' , 长度为 170bp;

1.2 主要仪器

- 1、XK96 型微量振荡器 姜堰市新康医疗器械有限公司)
- 2、飞鸽牌 AnkeTDL-50B 离心机、超速离心机
上海安亭科学仪器厂
- 3、手提式压力蒸汽灭菌器 上海华线医用核子仪器有限公司
- 4、电热恒温水温箱 上海医疗器械七厂
- 5、美的电磁炉 广东美的集团有限公司
- 6、实验室专用超纯水机 重庆利迪现代水技术设备有限公司

1.3 实验方法

1.3.1 HE 染色

- 1、烤片 2h。
- 2、二甲苯替代品洗涤片子 15min×2 次。

- 3、100%乙醇洗涤片子 5min×2 次。
- 4、80%乙醇 5min。
- 5、蒸馏水 5min。
- 6、苏木精液染色 5min。
- 7、流水稍洗去苏木精液。
- 8、1%盐酸乙醇水化。
- 9、水洗 10-30s。
- 10、蒸馏水过洗 1-2s。
- 11、0.5%伊红液染色 1-3min。
- 12、蒸馏水稍洗 1-2s。
- 13、80%乙醇稍洗 1-2s。
- 14、95%乙醇洗涤两次，每次 2-5s。
- 15、无水乙醇 5-10min。
- 16、石炭酸二甲苯 5-10min。
- 17、二甲苯替代品洗涤三次，每次 2min。
- 18、中性树胶封固。

1.3.2 I、III 型胶原纤维的免疫组化实验 (IHC) 检测

1. 新切片在 70℃的烤箱中烤 2 小时固定。
2. 二甲苯脱蜡：(3 缸：5min/缸)。
3. 水化：在 4 缸梯度酒精中(100%、95%、75%、50%)，2min/缸，过纯水，甩片。
4. 3% H_2O_2 室温 10min 消除内源性 H_2O_2 活性，过纯水，甩片。
5. EDTA (50×, PH8.0) 微波炉高火加热 5min 至沸腾。
6. 将片子放入 EDTA 中，中低火加热 20min，保持沸腾状态。
7. 自然冷却，吸纸擦干周围水分，用 Marker 笔将组织圈出来。
8. PBS 漂洗，5min×3 次。

9. 5-10%正常山羊血清封闭 (blocking solution) 室温孵育 10-20min, 倾去, 甩片, 勿洗。滴加一适一抗工作液 4℃过夜。
10. 取出片子, 室温 20 min, PBS 漂洗, 5min×3 次, (湿盒放入 37℃孵育箱预热) 甩片。
11. 滴加二抗, 37℃孵育 30min。
12. PBS 漂洗, 5min×3 次。
13. DAB 显色 5-10min。自来水冲洗, 阻断显色。
14. 复染: 苏木素复染 2min, 自来水冲洗, 阻断复染。自然晾干。
15. 二甲苯透明, 5min×2 次。
16. 吹风机吹干或自然晾干片子。
17. 封片: 滴加一滴 (20μl) 的中性树脂, 用盖玻片封片。

1.3.3 瘢痕组织的 Masson 三色染色实验

1. 新切片在 70℃的烤箱中烤 2 小时固定。
2. 二甲苯脱蜡: (3 缸: 5min/缸)。
3. 水化: 在 4 缸梯度酒精中(100%、95%、75%、50%), 2min/缸, 过纯水, 甩片。
4. 3% H_2O_2 室温 10min 消除内源性 H_2O_2 活性, 过纯水, 甩片。
5. 滴加一滴 (100μl) masson 复合染液 (A 液) 染色 5min, 蒸馏水中冲掉染液。
6. 滴加一滴 (100μl) 磷钼酸 (C 液) 染色 5min, 甩干。
7. 滴加一滴 (100μl) 苯胺蓝 (D 液) 染色 5min, 蒸馏水中稍冲。
8. 滴加一滴 (100μl) 分化液 (B 液)。
9. 观察染色情况 (染色均一、中间和边缘的染色要均匀)
10. 分化 30-60 sec (2 次)。
11. 95%、100%的酒精脱水 (各 2 min)。
12. 封片: 滴加一滴 (20μl) 的中性树脂, 用盖玻片封片。
13. 观察方法: 胶原纤维、黏液、软骨、神经纤维呈蓝色; 肌肉、弹力纤维呈红

色；神经轴索呈粉红色；纤维素呈紫红色；红血球呈橘红色，细胞核呈蓝褐色。

1.3.4 TGF β 信号通路相关分子 RT-qPCR

1.3.4.1 瘢痕组织总 RNA 的提取 (Trizol 法)

- 1、匀浆化：50-100Mg 组织用 1mL Trizol 匀浆，匀浆组织置于 15℃到 30℃，20min。
- 2、分离：每 mL Trizol 加 0.2mL 氯仿，盖紧，用手剧烈震荡 15S，15 度到 30 度，孵育 3min，2-8 度，12000rpm 离心 8min (RNA 位于上层水相)
- 3、RNA 沉淀，将上层水相转移到一个新的 EP 管中，每 mL Trizol 匀浆组织加 0.5mL 异丙醇，15 度到 30 度，孵育 10min (2-8 度，12000rpm 离心 8min)。
- 4、RNA 洗涤：小心弃去上清，75%酒精洗涤沉淀，每 1ml Trizol 至少加 1ml 75% 酒精，震荡混匀，2-8 度，5000rpm,2min。
- 5、RNA 重新溶解：晾干 RNA 沉淀，至乙醇挥发完全，加 15uLRnse-free Water, 零下 20 度保存。
- 6、用紫外分光光度计测总 RNA 的纯度和浓度，1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。OD260/OD280 的比值大于 1.8, 说明较纯，无蛋白质污染。5s rRNA, 18s rRNA 和 28s rRNA 条带，三条条带完整可证明总 RNA 抽提比较完整。

1.3.4.2 cDNA 的合成 (RNA 逆转录)

- | | |
|--------------------------|-----|
| 1、RNA 变性：Oligo dT primer | 1uL |
| dNTP mixturn(10um) | 2ul |
| 模板 RNA | 5ul |
| Rnse-free Water | 6ul |
- 5Min, 65℃, 迅速冷却至 4℃放于冰上。
- | | |
|----------------------------------|-----|
| 2、变性退火反应液：5×primerscript2 buffer | 4ul |
| Rnase inhibitor | 1ul |
| primerscript2 RNase | 1ul |

3、PCR 反应：42℃，50min；95℃，5min；4℃，5min。产物零下 20℃保存。

4、引物设计

根据文献报道 smad3、smad7、MMP-1、TIMP-1 序列，按照引物设计原则采用 Prime5.0 在线设计引物。

以 cDNA 为模板，进行 RT-qPCR 检测。

1.3.4.3 荧光定量 PCR 扩增：（每个样品重复 3 次）

1. 待测样本按以下反应体系进行：

2×SYBR premix Ex Taq II (DRR081S)	12.5μl
上游引物 F (10pmol/μl)	1μl
下游引物 R (10pmol/μl)	1μl
cDNA	2μl
ddH2O	8.5μl
总体积：	25μl

2. 反应条件为：95℃预变性 2 分钟，然后 95℃变性 30 秒，55℃退火 45 秒，72℃延伸 45 秒，共 40 循环。最后一个循环，PCR 产物在 72℃放置 10min，终止反应。

3. 公式

$\Delta C_{T \text{ 处理组}} = \text{处理组样本基因均值 } C_T - \text{处理组内参基因均值 } C_T$

$\Delta C_{T \text{ 对照组}} = \text{对照组样本基因均值 } C_T - \text{对照组内参基因均值 } C_T$

$\Delta \Delta C_T = C_{T \text{ 处理组}} - C_{T \text{ 对照组}}$

倍数 = $2^{-(\Delta \Delta C_T)}$

1.3.5 TGFβ 信号通路相关分子 Western blot 蛋白检测

1、蛋白质的提取

- (1) 用干净的剪刀将组织减碎，置于 1.5mL 的离心管中。
- (2) 加入适量的裂解液 (RPIA: PMSF: Cocktail=100:1:2)
- (3) 在液氮中碾磨组织，尽量使其足够碎，4 度放置 30min。

(4) 12000rpm, 5min, 取上清于一新的离心管中, 每 0.5mL 的上清中加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液, 混匀。

(5) 上样前将蛋白质样品于沸水中 5min, 使蛋白质变性。

2、SDS—PAGE电泳

(1) 玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。

(2) 先将配置好的 10%的分离胶(体积为总体积的 2/3)注入玻璃板缝隙中水封当水和胶之间有一条折射线时, 倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干, 再往玻璃板缝隙中注入 4%的浓缩胶(体积为总体积的 1/3)。

(3) 待到浓缩胶凝固后, 两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。

(4) 用水冲洗一下浓缩胶, 将其放入电泳槽中。

(5) 加样, 往梳孔中加入适量的变性好的蛋白质。

(6) 电泳: 90V, 30min;120V,3h。

3、转膜

(1) 准备 6 张 7.0cm-8.3cm 的滤纸和 1 张 7.3cm-8.6cm 的硝酸纤维素膜。切滤纸和膜时一定要戴手套, 将切好的硝酸纤维素膜置于水上浸 2 h 才可使用。

(2) 在加有转移液的搪瓷盘里放入转膜用的夹子、两块海绵垫、一支玻棒、滤纸和浸过的膜。

(3) 将夹子打开使黑的一面保持水平。在上面垫一张海绵垫, 用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。在垫子上垫三层滤纸, 一手固定滤纸一手用玻棒擀去其中的气泡。

(4) 将玻璃板撬掉剥胶, 除去小玻璃板后, 将浓缩胶轻轻刮去, 避免把分离胶刮破。小心剥下分离胶盖于滤纸上, 用手调整使其与滤纸对齐, 轻轻用玻棒擀去气泡。将膜盖于胶上, 要盖满整个胶并除气泡。在膜上盖 3 张滤纸并除去气泡。最后盖上。

(5) 将夹子放入转移槽槽中, 要使夹的黑面对槽的黑面, 夹的白面对槽的红面。电转移时会产热, 在槽的一边放一块冰来降温。一般用 60V 转移 2 h。

4、免疫反应

(1) 将膜用 TBS 从下向上浸湿后, 移至含有封闭液的平皿中, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1h。

(2) 将一抗用 TBST 稀释至适当浓度, 将抗体溶液加到保鲜膜上; 从封闭液中取出膜, 用滤纸吸去残留液后, 将膜蛋白面朝下放于抗体液面上, 室温下孵育 1~2h 后, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗两次, 每次 10min; 再用 TBS 洗一次, 10min。

(3) 同上方法准备二抗稀释液并与膜接触, 室温下孵育 1~2h 后, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗两次, 每次 10min; 再用 TBS 洗一次, 10min, 进行化学发光反应。

5、化学发光, 显影, 定影

(1) 将 A 和 B 两种试剂在保鲜膜上等体积混合; 1min 后, 将膜蛋白面朝下与此混合液充分接触; 1min 后, 将膜移至另一保鲜膜上, 去尽残液, 包好, 放入 X-光片夹中。

(2) 在暗室中, 将 1×显影液和定影液分别到入塑料盘中; 在红灯下取出 X-光片, 打开 X-光片夹, 把 X 光片放在膜上, 关上 X-光片夹, 开始计时, 1~5min, 曝光完成后, 取出 X 光片, 迅速浸入显影液中显影, 显影时间一般为 1~2min (20~25℃), 显影结束后, 马上把 X 光片浸入定影液中, 定影时间一般为 5-10min, 用自来水冲去残留的定影液后, 室温下晾干。

1.3.6 统计学处理

所有计量资料均结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 spss13.0 统计软件包进行统计学处理。两样本总体均数比较采用 Student's t 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 标本资料统计

从 2011 年 5 月~2012 年 2 月我们收集来自广东省第二人民医院和广州红十

字会医院的 24 个接受瘢痕切除手术治疗的病人, 平均年龄为 (28.19 ± 11.39) 岁, 小于 30 岁病人占 70%。男 10 例, 女 14 例。造成瘢痕原因的分析中, 发现手术造成瘢痕与烧伤、创伤后瘢痕数量相当, 各 12 例。瘢痕发生部位, 本组发生在耳部占 8%, 四肢关节部位占 30%, 四肢非关节部位 26%, 腹部占 21%, 面颈部占 16%。

表 2-1 HS 标本一般情况统计表

Tab 2-1 General Information of the sample

年 龄	性 别		瘢痕增生时间				瘢痕原因	
	男	女	<3 月	3~6 月	6~12 月	12~	手术	烧伤创伤
28.19 \pm 11.39	10	14	1	4	7	10	12	12

2.2 瘢痕临床表现

增生性瘢痕患者表现为瘢痕明显高于周围正常皮肤, 形状不规则, 高低不平, 局部增厚变硬, 表面呈红色、潮红或紫红并伴有不同程度的瘙痒 (图 2-2b), 瘢痕挛缩严重者可致关节畸形、功能受影响 (图 2-2c)。

2.3 增生性瘢痕组织形态学观察

2.3.1 HE 染色显示

瘢痕组织 HE 染色观察结果: 1、正常皮肤成纤维细胞和微血管数目较少 (图 2-3a)。2、瘢痕组织内可见成纤维细胞和微血管增多, 微血管呈缩窄倾向 (图 2-3e)。真皮内见编织状排列的大片致密嗜伊红染同质性粗大胶原纤维, 排列紊乱, 无一定的方向, 胶原纤维相互交叉呈漩涡状或结节状分布, 结节中的胶原纤维较细, 各结节之间由粗大的胶原纤维束分隔, 粗大的胶原纤维束间可见分布有数量不等的成纤维细胞和小血管。3、瘢痕组织 (图 2-3b、d) 表皮厚度较正常表皮 (图 2-3a) 明显增厚。

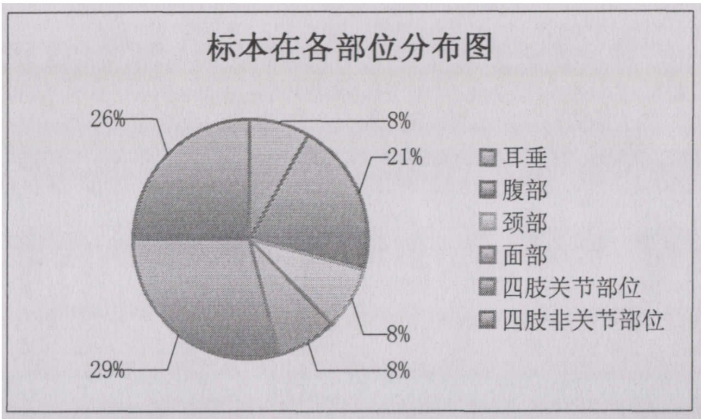


图 2-1 所取标本在全身各部位的分布

Fig 2-1 The distribution of the sample in the body

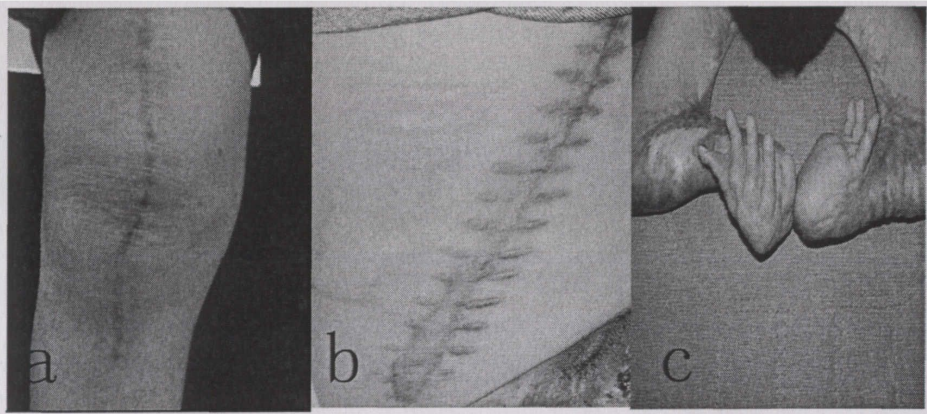


图 2-2 正常伤口愈合 (a) 与增生性瘢痕外观 (b、c)

Fig 2-2 Normal wound healing (a) and Hyperplastic scar appearance (b、c)

2.3.2 Masson 三色染色

Masson 三色染色观察发现：瘢痕组织真皮层大量胶原纤维，粗细不一，显示真皮乳头层及附近血管增生，胶原纤维排列紊乱（图 2-4a）；真皮网状层胶原纤维排列致密，近表皮处紊乱，近皮下组织处排列规则，较多血管分布，部分胶原纤维交叉形成胶原结节，以近乳头层处明显（图 2-4b）。

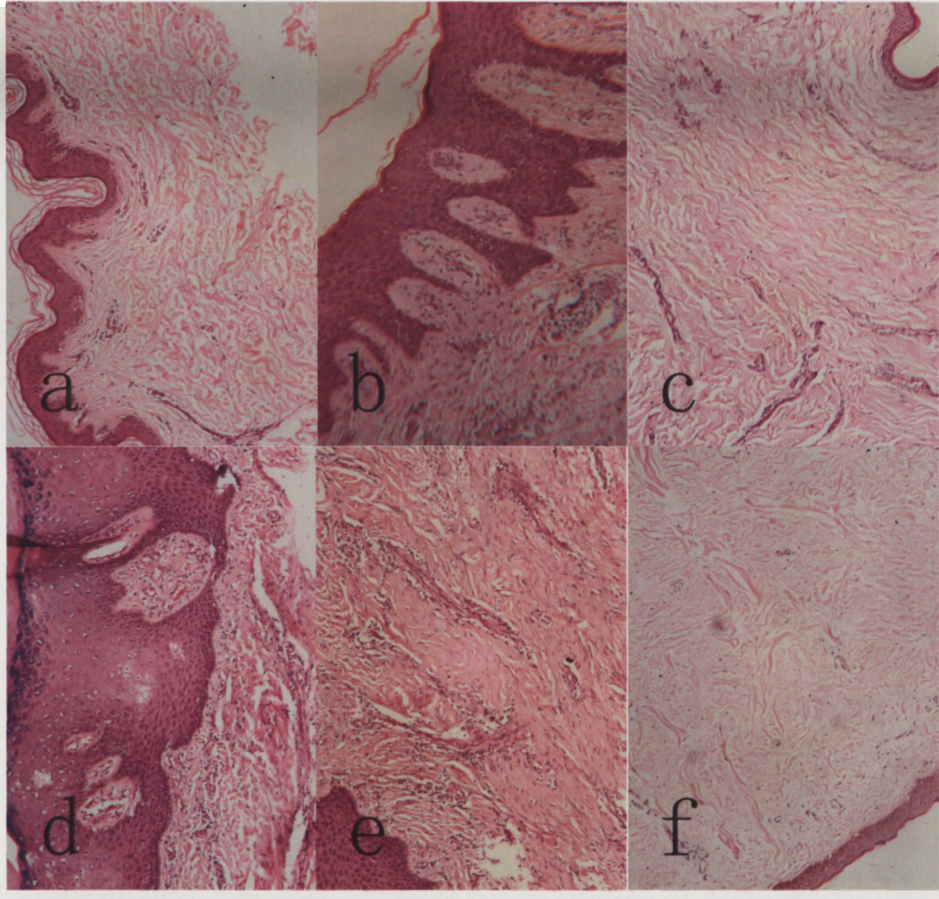


图 2-3 为瘢痕组织的石蜡切片 (b、c、d、e、f) 和正常组织石蜡切片, abde \times 400, cf \times 200

Fig 2-3 The paraffin section of the scar tissue (b c d e f) and normal tissue paraffin

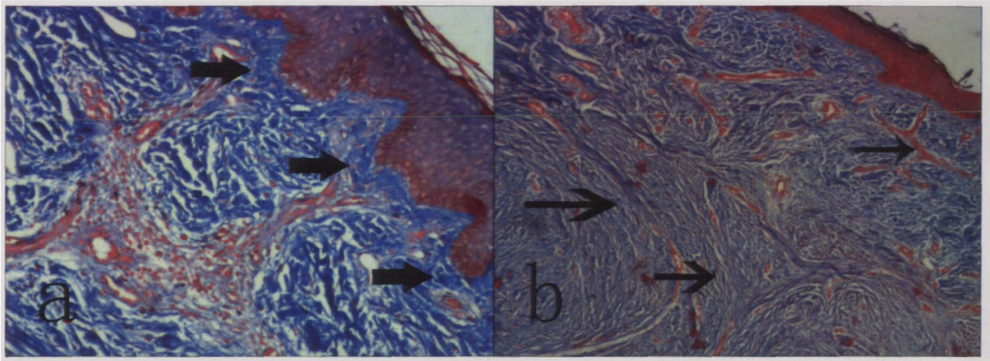


图 2-4 为人瘢痕组织的石蜡切片，研究采用 Masson 染色对石蜡切片进行处理，检测瘢痕组织层次和其中胶原纤维的表达及分布。A×400；B×200

Fig 2-4 Express and distribution the collagen fiber in paraffin section of the scar tissue with Masson dyeing .

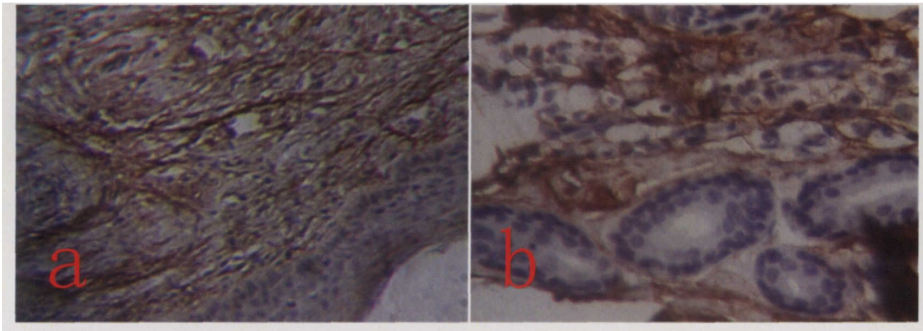


图 2-5 III型胶原抗体在真皮层的细胞间质中的表达特点 ab×200

Fig 2-5 the expressions characteristics of Collagen I in the dermis

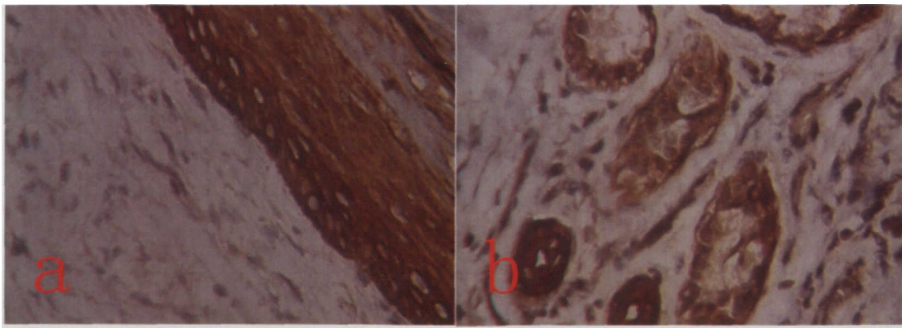


图 2-6 I 型胶原抗体在真皮层的细胞间质中的表达特点 ab×200

Fig 2-6 The expressions characteristics of Collagen I in the dermis

2.3.3 I、III型胶原免疫组化

免疫组化法测定最示：瘢痕组织 I 型胶原抗体在真皮层的细胞间质中，主要分布于真皮网状层，可见大量棕黄色，较为粗大，交织成结节状，周围散在分布成纤维细胞和血管壁（图 2-5）。III 型胶原散在分布于真皮层的细胞间质中，以真皮乳头层分布较多，胶原束较细，排列疏松，走行方向不一，互相交织。血管壁上均有两种纤维的分布（图 2-6）。

2.3.4 RT-qPCR 检测组织内 collagen I、collagen III、MMP-1、TIMP-1、SMAD3、SMAD7 的基因表达

采用 β -actin 作为内参照，反应结束确认溶解曲线和扩增曲线后（图 2-8），通过计算相对量 $2^{-\Delta CT}$ 比较正常组织和瘢痕组织 collagen I、collagen III、MMP-1、TIMP-1、SMAD3、SMAD7 基因表达的差异。RT-qPCR 结果显示：瘢痕真皮组织和正常皮肤真皮组织内均可检测到 collagen I、collagen III、MMP-1、TIMP-1、SMAD3、SMAD7 的基因表达。与正常组织相比，瘢痕组织内 collagen I ($t=5.85$, $P<0.01$)、collagen III ($t=4.515$, $P<0.05$)、MMP-1 ($t=-13.22$, $P<0.01$)、TIMP-1 ($t=2.52$, $P<0.05$)、smad7 ($t=-2.503$, $P<0.05$) 基因表达差异具有显著性；由图可见 collagen I、collagen III、TIMP-1 表达较正常组织升高，而 MMP-1 表达较正常组织降低；Smad 3 ($t=-0.339$, $P>0.05$) 基因表达未见明显差异。（图 2-7，表 2-2）

图 2-2 瘢痕组织和正常组织各基因表达

Tab 2-2 Expression of different gene expression between the scar tissue and normal tissue

组织 mRNA	正常组织 $2^{-\Delta CT}$	瘢痕组织 $2^{-\Delta CT}$	t 值	P 值
collagen I	0.0069 \pm 0.0017	0.0183 \pm 0.0046	5.85	0.000
collagen III	0.111 \pm 0.017	0.186 \pm 0.038	4.515	0.000
MMP-1	0.289 \pm 0.037	0.107 \pm 0.021	-13.22	0.000
TIMP-1	0.00011 \pm 0.000078	0.0013 \pm 0.0012	2.52	0.019
SMAD3	0.0237 \pm 0.0026	0.0214 \pm 0.017	-0.339	0.738
SMAD7	0.0767 \pm 0.0168	0.0535 \pm 0.0184	-2.503	0.022

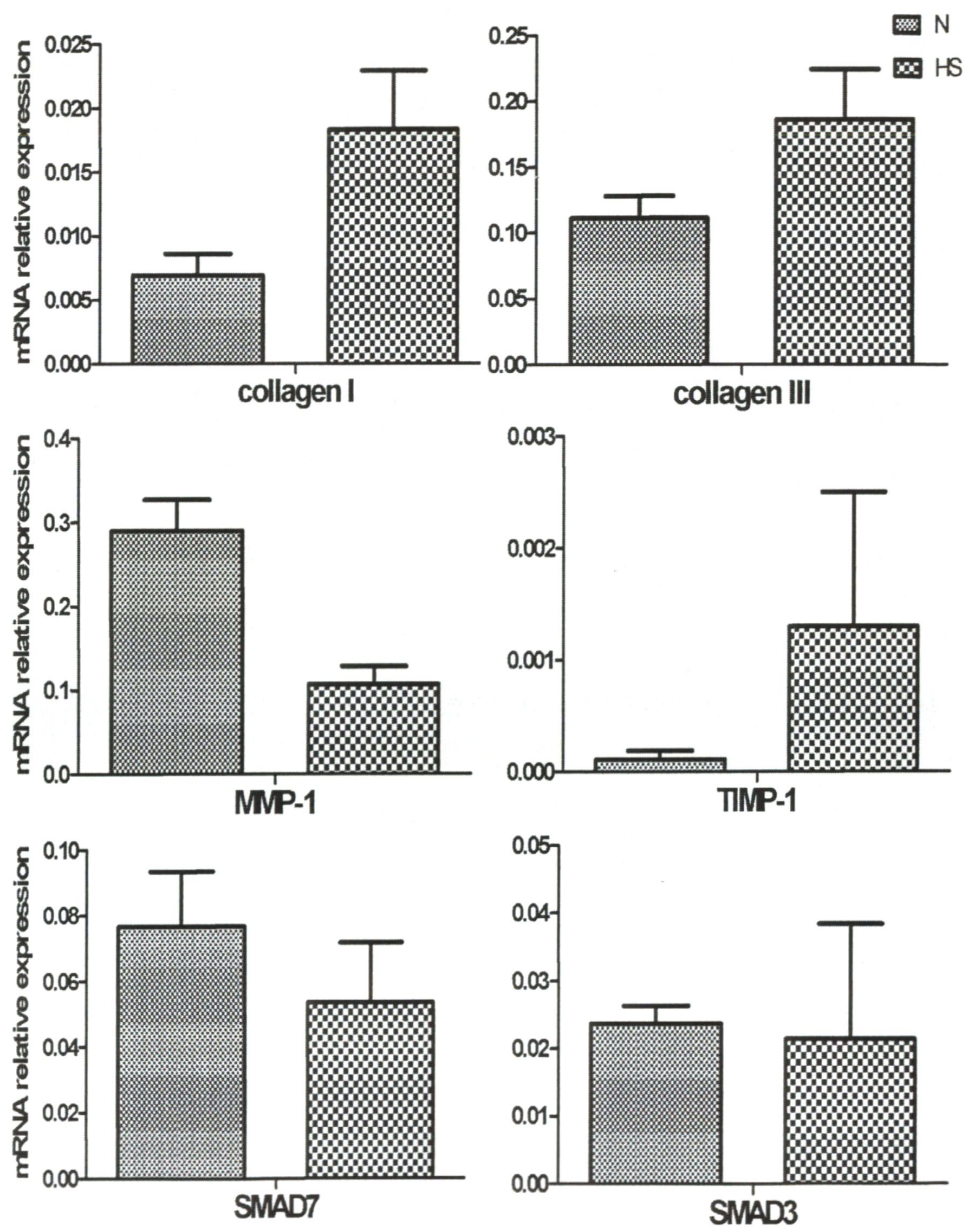


图 2-7 瘢痕组织和正常组织各基因表达的比较

Fig 2-7 Comparison of different gene expression between the scar tissue and normal tissue

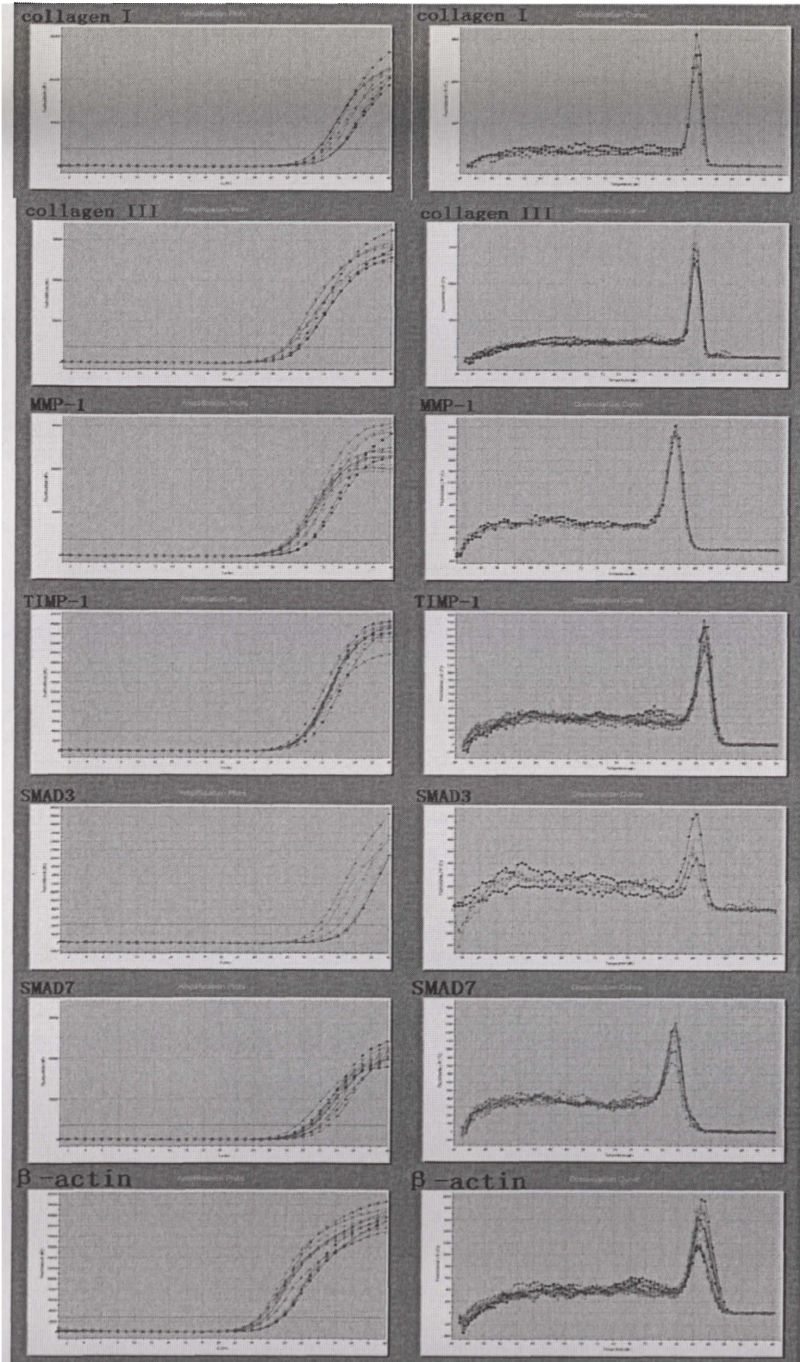


图 2-8 各基因及内参的扩增曲线和溶解曲线
Fig 2-8 Melt curve and Amplification curve of each gene

2.3.5 western blot 检测组织内 MMP-1、TIMP-1、smad3 表达

为进一步检测目的基因翻译后在蛋白水平的变化，我们采用 Western blot 对 MMP-1、TIMP-1、SMAD3 蛋白表达量进行检测。结果如图：这些样品中瘢痕真皮组织和正常皮肤真皮组织内均可检测到 MMP-1、TIMP-1、SMAD3 蛋白表达，但是表达量均低于正常组织。

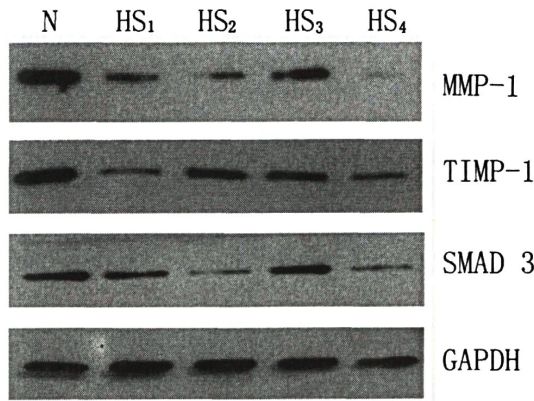


图 2-9 western blot 结果
Fig 2-9 The result of western blot

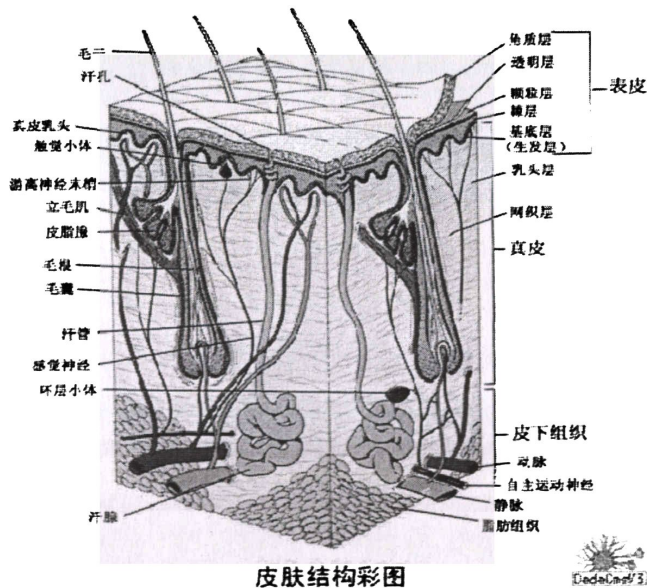


图 2-10 皮肤组织结构图（来源于网络）
Fig 2-10 Skin organization structure

3 讨论

对于增生性瘢痕的治疗目前仍缺乏有效的方案。外科手术切除是增生性瘢痕最常用的治疗。早在 1844 年有学者就利用手术切除来治疗瘢痕，明显改善了病损部位的外观和功能。尽管较多的临床研究减少瘢痕复发率，如：“z”或“w”成形术局部减张，切除瘢痕的纤维部分，保留外层皮肤。但是，手术仍可能因再次创伤、愈合失控而导致瘢痕过量形成。本组因功能障碍及影响美观，均采用手术切除的方法进行治疗。手术标本用作本实验。

3.1 流行病学资料

有一些研究报道病理性瘢痕存在着明显的性别趋势，一个关于北欧人群的报道中显示，男性发生率为 24%，女性发生率为 53%^[1]。然而另一个关于黑色人种的研究认为性别之间没有明显的不同^[2]。对于中国人的研究认为男女之间发病率是相同的，女性发病率(76.74 %)，男性发病率 (72.05%)^[3]，本研究中所取标本男女比例相等。从年龄来看，瘢痕更易发生在小于 30 岁的人，10-20 岁是发病高峰，特别是这些处于青春期的的人群和孕妇等具有较高激素水平的人群具有更高发病率^[4]，另有研究认为老年人发展瘢痕的机会非常低，由于他们的低代谢率和比较低的皮肤张力^[5]。本组病例小于 30 岁病人占 70%，与上述研究得出相似的结果，但是由于本组纳入研究的样本量小，有必要进一步研究年龄是否和瘢痕的形成有关系。有文献报道瘢痕最常出现的部位是胸部，其次是肩部和上臂，耳垂以及面颊等，临床上增生性瘢痕多具有明显的诱因，如：创伤、烧伤、手术、感染、异物及机体局部代谢失调等均可引起瘢痕。瘢痕较易发生在切口张力较高的部位，其发病与切口张力大小和张力方向有关；另外，创伤部位、遗传及患者家族史等也与瘢痕的形成有密切关系；增生性瘢痕还易发生在肤色深的人种和处于生长发育期的青少年。本组发生在四肢关节部位占 30%，四肢非关节部位 25%，腹部占 21%，面颈部占 17%，在研究中认为部位不是主要的导致瘢痕形成的因素。

总之，本研究由于样本量较小，不足以证实各个部位发生率的高低，有待

进一步的收集样本，进行大样本的研究。本研究仅仅想提供相关的一些数据，有利于参考。

3.2 正常皮肤真皮组织结构

真皮位于表皮和皮下脂肪组织之间，由中胚叶分化而来。内含胶原纤维、弹力纤维、网状纤维和无定形基质。其中，胶原纤维为真皮的主要成分，约占95%。真皮分为两部分，上部的乳头层和下部的网状层，两层间无截然界限。乳头层较薄，组织疏松，胶原纤维较细，排列紧密，走行方向不一，亦不互相交织。乳头层内有浅层血管网、淋巴管网、神经末梢和 Meissner 小体等。网状层胶原纤维较粗，排列较疏松，交织成网状，与皮肤表面平行者较多，内含较大的血管和淋巴管、神经以及附属器、肌肉等结构。I 型胶原主要存在于网状层，具有高度机械稳定性，III型胶原主要分布在乳头层，薄而疏松，有助于表皮固定于真皮上。（图 2-10）

3.3 瘢痕组织胶原代谢平衡及影响因素

目前普遍认为增生性瘢痕的形成在生物学层面主要表现为胶原代谢紊乱。胶原代谢紊乱与 MMPs 和 TIMPs 间的动态平衡以及 TGF- β 信号通路具有密切的关系。

胶原作为细胞外基质的主要组成成分，是皮肤主要的结构和功能蛋白，决定皮肤的应力强度等生物力学特性。较多的研究认为在瘢痕增生过程中胶原蛋白大量的合成并且比例发生变化形成增生性瘢痕^[6, 7]。本研究通过 HE 染色和 Masson 三色染色显示胶原纤维较正常组织明显增加，且排列紊乱，形成胶原结节的特征性结构；同时，血管及成纤维细胞增生较正常组织明显增多，表皮明显增厚。关于表皮增厚的原因目前尚未见相关研究，我们推测可能与创伤后某种因素激发了表皮细胞增生及角质蛋白的大量形成有关。免疫组化结果显示瘢痕真皮组织内 I、III 型胶原纤维大量增生，结合 RT-qPCR 结果，以及 HE 和 Masson 胶原纤维染色结果，证实了以往认为瘢痕增生是胶原纤维大量沉积的结果。但是，关于胶原在增生性瘢痕组织不同增生时间以及不同年龄、不同性别之间的

变化,有待于收集到更多标本后,进一步研究。

MMPs和TIMPs间的动态平衡是影响胶原代谢的重要因素。但是在创伤后增生性瘢痕组织中,胶原酶的变化说法不一。Ghahary等^[8]报道在体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞间质胶原酶mRNA 表达水平明显低于正常皮肤成纤维细胞,而两者的金属蛋白酶组织抑制因子表达无显著差异。国内赵烨德等^[9]研究证实MMP-3 mRNA在HS组FB中表达水平低于正常组,而且降解DNP-多肽(胶原酶底物)能力也明显降低;同时将MMP-3 基因转入HS成纤维细胞后,提高了MMP-3表达水平,促进了ECM 降解,得出了同样的结果。同样,在对皮肤异常瘢痕的研究中发现,异常瘢痕TIMP-1的表达明显高于正常组织。在肝和肾的纤维化病变中也发现TIMP-1表达增加,通过抑制MMPS的活性阻止过量的胶原降解的情况。另外也存在较多与上述结果相反的报道。在我们的实验中发现: RT-qPCR结果: TIMP-1均较正常组织增高,但是MMP-1基因表达较正常组织降低。同时, western blot结果也同样证实瘢痕样本较正常组织的MMP-1蛋白表达是降低的。因此我们初步推测MMPs表达减少,酶活性降低,以及TIMPs表达增高,与创面愈合纤维瘢痕形成关系密切。但是,瘢痕组织内胶原酶升降可能会受到某种中间因素的影响还不成定论,需要进一步深入的研究。

SMADs介导的转化生长因子信号通路在增生性瘢痕胶原代谢中发挥着重要的作用^[10-12]。SMADs是信号从受体到核内的细胞内主要转导分子,也是目前瘢痕增生研究最多、最为重要的信号分子。根据不同分型,对成纤维细胞具有双向调控作用,其中Smad2/3是膜受体和靶基因之间相联系的桥梁, Inagaki等^[13]认为smad3的启动是纤维化病变的关键环节。国内刘波等^[14]利用SiRNA-Smad3特异性沉默瘢痕成纤维细胞Smad3基因, I型胶原明显降低,认为SMAD2/3是TGF β 信号通路中具有促进作用的因素。Smad7是TGF- β 信号转导途径中主要的抑制性调控蛋白之一,现已证实smad7 表达为TGF- β 1 自身和其它信号途径所诱导,是细胞中TIBR I型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白,能通过与Smad2、3竞争结合TIBR I型受体,阻止R-smad的磷酸化;还能阻止smad2、3 复合物形成,

促进其分解。在瘢痕研究中, Yu H等^[15]发现smad7 mRNA 含量明显降低; Saika等^[16]发现注入Smad7基因和敲除Smad3基因后的老鼠角膜瘢痕疙瘩生成明显减少。但是, 本实验未发现明显的SMAD3和SMAD7 的变化, 我们推测可能与瘢痕胶原纤维增生的多种信号通道、多因素相互作用有关系。

4 结论

(1) 增生性瘢痕组织中 collagen I 和 collagen III 明显的增加。

(2) MMPs 表达减少, 以及 TIMPs 表达增高, 与创面愈合纤维瘢痕形成关系密切。

(3) 瘢痕增生过程中是多种信号通道、多因素相互作用的复杂过程。

参考文献:

- [1] Elliot D, Cory-Pearce R, Rees G M. The behaviour of presternal scars in a fair-skinned population[J]. Ann R Coll Surg Engl. 1985, 67(4): 238-240.
- [2] Munro K J. Hypertrophic and keloid scars[J]. J Wound Care. 1995, 4(3): 143-148.
- [3] Li-Tsang C W, Lau J C, Chan C C. Prevalence of hypertrophic scar formation and its characteristics among the Chinese population[J]. Burns. 2005, 31(5): 610-616.
- [4] Alhady S M, Sivanantharajah K. Keloids in various races. A review of 175 cases[J]. Plast Reconstr Surg. 1969, 44(6): 564-566.
- [5] Rockwell W B, Cohen I K, Ehrlich H P. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review[J]. Plast Reconstr Surg. 1989, 84(5): 827-837.
- [6] Birkedal-Hansen H, Moore W G, Bodden M K, et al. Matrix metalloproteinases: a review[J]. Crit Rev Oral Biol Med. 1993, 4(2): 197-250.
- [7] 雷涛, 高建华, 张进华, 等. 瘢痕疙瘩组织中胶原的形态学分析[J]. 中华医学美学美容杂志. 2002(3):30-32.
- [8] Ghahary A, Shen Y J, Nedelec B, et al. Collagenase production is lower in post-burn hypertrophic scar fibroblasts than in normal fibroblasts and is reduced

- by insulin-like growth factor-1[J]. *J Invest Dermatol.* 1996, 106(3): 476-481.
- [9] 赵烨德, 刘宁飞, 何清濂, 等. 瘢痕成纤维细胞的MMP-3 mRNA表达及其基因转染[J]. *第二军医大学学报.* 1998(3):1-4.
- [10] Hu M, Sabelman E E, Cao Y, et al. Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003, 67(1): 586-592.
- [11] Shah R, Selby S T, Yokley B, et al. TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study[J]. *Tissue Antigens.* 2009, 74(1): 50-56.
- [12] Chin G S, Liu W, Peled Z, et al. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts[J]. *Plast Reconstr Surg.* 2001, 108(2): 423-429.
- [13] Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, et al. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells[J]. *J Cell Physiol.* 2001, 187(1): 117-123.
- [14] 刘波, 果磊. SiRNA-Smad3沉默人瘢痕疙瘩成纤维细胞中Smad3对纤维连接蛋白及I型胶原表达的影响[J]. *重庆医科大学学报.* 2010(4):522-526.
- [15] Yu H, Bock O, Bayat A, et al. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006, 59(3): 221-229.
- [16] Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, et al. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model[J]. *Arch Ophthalmol.* 2007, 125(5): 647-654.

第三部分 灯盏花素对创伤性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡及 mRNA 表达的影响

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是各种严重创伤后严重的并发症之一。虽然大量的研究工作针对 HS 的发病机制和治疗,并且取得了丰硕的成果,但至今仍无令人满意的治疗方法^[1]。大量的研究表明,灯盏花素可抑制纤维化病变进展,灯盏花素是否能抑制病理性瘢痕成纤维细胞的增生,尚未见文献报道。也有研究认为细胞凋亡与 HS 的形成、消退过程密切相关^[2],通过调控成纤维细胞(FB)凋亡有望成为有效防治 HS 的新亮点。因此,本实验从细胞学方面初步探讨灯盏花素对 FB 生长增殖及凋亡的影响,为寻找有效的天然药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

- | | |
|--|--------------|
| (1) RPMI 1640 | GIBCO 公司 |
| (2) 10% FBS | 浙江天杭生物科技有限公司 |
| (3) 青霉素 100u/ml, 链霉素 100 μ g/mL | 广州外显子公司 |
| (4) 胰蛋白酶(Trypsin) | AMRESCO 公司 |
| (5) 二甲基亚砜(DMSO) | Sigma 公司 |
| (6) MTT | Sigma 公司 |
| (7) AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒 | BD 公司 |
| (8) 灯盏花素临用前用 RPMI1640 配制所需浓度的混悬液(国药准字: 43020998) | 湖南恒生制药有限公司 |
| (9) GoTaq® GreenMaster Mix (M7122) | Promega |

1.2 主要仪器

- | | |
|-------------------------|---------------|
| (1) 超净工作台 | 博迅实业公司 |
| (2) CO ₂ 培养箱 | 日本 Sanyo 公司 |
| (3) 倒置显微镜、荧光显微镜 | 日本 Olympus 公司 |

- | | |
|------------------------------------|----------------------|
| (4) 普通电冰箱 | 海尔冰箱 |
| (5) 96 孔细胞培养板、24 孔培养板、6 孔培养板、细胞培养瓶 | 美国 Corning Costar 公司 |
| (6) EL-800X 型酶标仪 | BIO-TEK 公司 |
| (7) 流式细胞仪 | FACS 公司 |

1.3 实验方法

1.3.1 灯盏花素对瘢痕成纤维细胞增殖的影响

收集 4~8 代对数期的瘢痕成纤维细胞, 调整浓度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 $100\mu\text{L}$, $5\%\text{CO}_2$, 37°C 孵育, 培养 24h 至细胞单层铺满孔底, 弃上清液。实验分组: 对照组(未加药组)、实验组(灯盏花素 $1\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $3\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $10\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $20\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $40\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $100\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、 $150\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组)。每组设 6 个复孔, 灯盏花素作用 24h 后, 显微镜下观察成纤维细胞形态学改变, 然后加入 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 液 $20\mu\text{l}$, 继续培养 4h, 弃上清液, 每孔加 $150\mu\text{LDMSO}$ 溶解, 震荡。在酶标仪(492nm 波长)上检测各孔吸光度值 A, 计算 IC_{50} 。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔(细胞、培养基、MTT、二甲基亚砜) 对每个样品计数三次, 取其平均值。抑制率=(空白组 OD 值-试验组 OD 值)/空白组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.3.2 灯盏花素对瘢痕成纤维细胞凋亡的影响

将分离培养的瘢痕成纤维细胞接种于 6 孔培养板, 设对照组和 IC_{50} 灯盏花素实验组, 各组均设 6 个复孔, 药物作用时间为 24h, 细胞收集到 2ml 的离心管中, 每样本细胞数为 $3 \times 10^6/\text{mL}$, $700\text{r}/\text{min}$ 离心 5min, 弃去培养液。用孵育缓冲液洗涤 1 次, $700\text{r}/\text{min}$ 离心 5min。用 $100\mu\text{L}$ 的标记溶液重悬细胞, 室温下避光孵育 12min。用 $700\text{r}/\text{min}$ 离心 5min 沉淀细胞孵育缓冲液洗 1 次。加入荧光(SA-FLOUS)溶液 4°C 下孵育 20min, 避光并不时振动。流式细胞仪分析: 流式细胞仪激发光波长用 488nm , 用一波长为 515nm 的通带滤器检测 FITC 荧光, 另一波长大于 560nm 的滤器检测 PI。结果判断: 在双变量流式细胞仪的散点图上,

左下象限显示活细胞，为(FITC-/PI-)；右上象限是非活细胞，即坏死细胞，为(FITC+/PI+)；而右下象限为凋亡细胞，显现(FITC+/PI-)。

1.3.3 RT-PCR 检测灯盏花素对成纤维细胞 collagen I 和 collagen III mRNA 表达水平的影响

(1) 瘢痕成纤维细胞 RNA 提取和逆转率同前。

(2) cDNA PCR 反应：

2×GoTaq® GreenMaster Mix	12.5μl
上游引物 F (10pmol/μl)	1μl
下游引物 R (10pmol/μl)	1μl
cDNA	2μl
ddH2O	8.5μl
总体积：	25μl

预变性：95℃	5min;	
变性：95℃	30s	} 40cycle
退火：55℃	50s	
延伸：72℃	30s	
延伸：72℃	10min	

(3) 琼脂糖凝胶电泳

反应结束后，取 PCR 扩增产物 5μL，经 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5μg/mlEB 电泳 60v，电泳 60min，然后在紫外灯下观察，凝胶成像系统扫描，photoshop 灰度值计算。

1.4.4 统计学方法

结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 spss13.0 统计软件，完全随机设计的多个总体均数使用单因素方差分析，两两比较用最小显著差法(LSD 法) 检验；两样本总体均数间比较使用 t 检验。

2. 结果

2.1 灯盏花素对瘢痕成纤维细胞增殖的影响

灯盏花素作用前后成纤维细胞形态未见明显变化；灯盏花素对体外培养 FB 生长增殖具有明显的抑制作用 ($F=3.309, P<0.01$)(表 1)。与对照组相比, (80、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)浓度组明显抑制瘢痕成纤维细胞生长 ($P<0.05$)。结合抑制率曲线可知, 灯盏花素对瘢痕成纤维细胞的抑制作用呈剂量依赖性(图 1)。 $IC_{50}=123.5\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

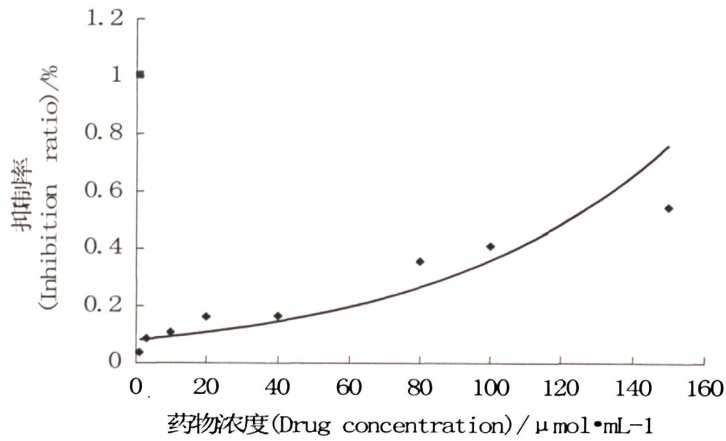


图 3-1 灯盏花素对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的抑制呈剂量依赖性作用

Fig.3-1 Inhibition of breviscapine on cell proliferation of scar fibroblast by dose-dependent manner.

表 3-1 灯盏花素对增生性瘢痕成纤维细胞抑制作用. $\bar{x} \pm s, n=6$

Tab 3-1 Effect of breviscapine on cellular proliferation of scar fibroblast in different groups.(Mean \pm SD, n=6)

实验分组	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	吸光度/A492	抑制率/%
Group of Experiments	Drug concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	Absorbancy/A492	Inhibition ratio/%
对照组	0	0.9782 \pm 0.2187	——
control Group			
	1	0.9420 \pm 0.2630	0.036974
	3	0.8940 \pm 0.1578	0.086046
	10	0.8725 \pm 0.3603	0.108026
	20	0.8123 \pm 0.1473	0.16272
加药组	40	0.8166 \pm 0.1075	0.165173
experimental group	80	0.6292 \pm 0.2313*#	0.356756
	100	0.5766 \pm 0.2540*#%	0.41053
	150	0.4440 \pm 0.2435*#% @&	0.54609
F	——	3.309	——
P	——	0.007	——

注: * vs 0, $P<0.05$; # vs 1, $P<0.05$; % vs 3, $P<0.05$;
@ vs 10, $P<0.05$; & vs 20, $P<0.05$.

2.2 流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测 FB 凋亡

流式细胞结果显示: IC50 处瘢痕成纤维细胞凋亡率为 14.2050 \pm 0.95553, 未加药组瘢痕成纤维细胞凋亡率为 4.0220 \pm 0.31412, 两者相比差异具有统计学意义 ($t=-22.653$, $P<0.05$).

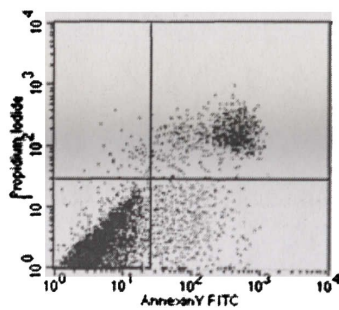


图 3-2 对照组 凋亡率为 4.13%
Fig.3-2 Apoptosis rate is 4.13% in control group

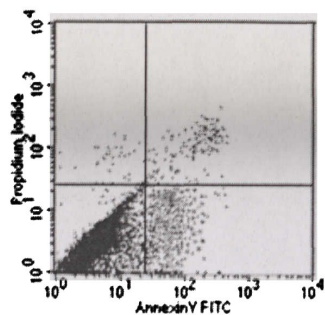


图 3-3 IC50 处 凋亡率为 13.5%
Fig.3-3 Apoptosis rate is 13.5% in IC 50 point

表 3-2 灯盏花素对瘢痕成纤维细胞凋亡的影响

Tab 2-2 Effect of Breviscapine on apoptosis of scar fibroblast in vitro

实验组	对照组	t	P
14.205± 0.956	4.022 ±0.314	22.653	0.000

2.3 灯盏花素对细胞 collagen I 和 collagen III mRNA 的影响

RT-PCR 结果显示：随着灯盏花素浓度的升高，对瘢痕成纤维细胞 collagen I 和 collagen III mRNA 产生明显的影响，差异具有统计学意义。（如图 3-4，表 3-1）

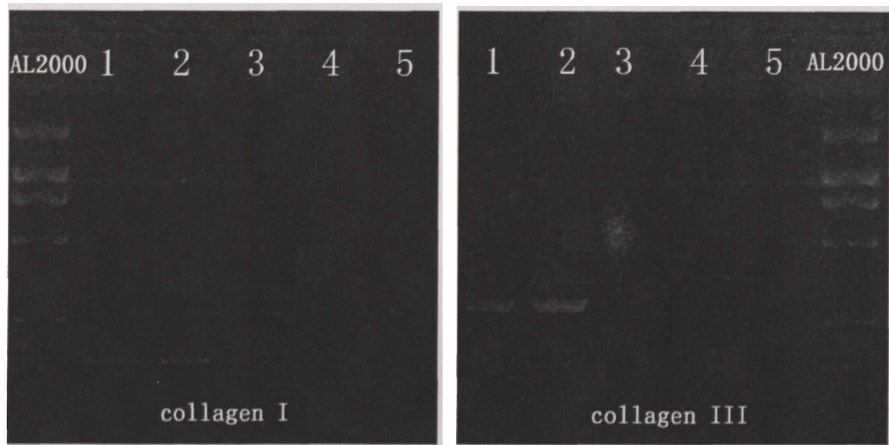


图 3-4 灯盏花素对成纤维细胞 collagen mRNA 表达 RT-PCR 结果（1、2、3、4、5 代表的浓度为：0、20、80、100、150； n=3）

Fig 3-4 RT-PCR results of Effect of breviscapine on cellular Collagen III and Collagen I of scar fibroblast.(1,2,3,4,5 represents a concentration of 0,20,80,100,150; n = 3)

第三部分 灯盏花素对创伤性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡及 mRNA 表达的影响

表 3-2 灯盏花素对增生性瘢痕成纤维细胞 I、III 型胶原 mRNA 的影响. $\bar{x} \pm s, n=6$

Tab 3-1 Effect of breviscapine on cellular Collagen III and Collagen I of scar fibroblast in different groups.(Mean \pm SD, n=3)

实验分组	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	Collagen III RT-PCR	Collagen I RT-PCR
Group of Experiments	Drug concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	灰度值	灰度值
对照组 control Group	0	88.17 \pm 2.16	78.42 \pm 1.81
	20	77.92 \pm 4.40*	73.42 \pm 5.02
加药组 experimental group	80	21.87 \pm 1.87*#	35.18 \pm 3.27*#
	100	16.88 \pm 1.81*##	21.92 \pm 1.74*##
	150	14.03 \pm 0.45*##	19.35 \pm 0.95*##
<i>F</i>	—	631.87	279.521
<i>P</i>	—	0.000	0.000

注: * vs 0, $P<0.05$; . # vs 20, $P<0.05$; % vs 80, $P<0.05$.

3 讨论

3.1 灯盏花素药理作用研究现状

灯盏花素(breviscapine)是从菊科飞蓬属植物短茎飞蓬全草灯盏细辛中提取出的一类黄酮类成分, 分布于我国云南及广西等地。已有研究表明, 灯盏花素混合物中有 9 种单体物质, 包括黄芩黄素、东莨菪内酯、柚皮素、山奈黄素、芹菜(苷)配基、黄色黄素、咖啡酸、原儿茶酸和灯盏花乙素等, 但是, 普遍的观点认为灯盏花素的药理活性成分是灯盏乙素, 结构式鉴定为 5, 6, 4-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸甙。在临床研究发现其主要功能包括扩张微血管、改善微循环、提高心肌功能和心脑血管供血、降低血粘度、抑制血小板聚集、防栓及溶栓、降低血脂和降血糖、抗缺血再灌注损伤、改善肾功能、改善脑功能、提高记忆力及延衰老等。

3.2 灯盏花素对增生性瘢痕的治疗作用的初步研究

增生性瘢痕的发病机制尚未完全阐明, 传统的治疗手段如手术切除、类固醇激素、抗代谢药、免疫抑制剂和放射疗法、压力疗法等, 均因疗效不确切、易复发或严重的全身副作用而限制了临床应用, 故缺乏理想的治疗方法。最近应用活血化瘀类中药提取成分治疗增生性瘢痕取得长足的发展^[3]。

从病理学角度来看, 病理性瘢痕的特征是大量细胞增生和过度的胶原沉积。成纤维细胞作为创面愈合的主要修复细胞之一, 它在创面修复过程中活化、增殖、分化以及合成细胞外基质的异常直接导致病理性瘢痕的形成, 其功能状态是影响病理性瘢痕发生、发展以及转归的主要因素之一。因此, 抑制成纤维细胞的增殖, 减少细胞外基质的产生可能成为治疗瘢痕的一种方法。

已有较多的研究表明灯盏花素对组织纤维化及其相关疾病有普遍性预防及治疗作用^[4]。周俭平等^[5]通过对小鼠成纤维细胞增殖实验研究显示, 灯盏细辛黄酮 Z-1, Z-2 在抑制胶原合成方面有显著作用, Z-1 对于成纤维细胞的增殖有显著抑制作用。柴文成等^[6, 7]通过系列实验研究证实, 灯盏花素对小鼠肺成纤维细胞具有明显的抑制作用, 认为灯盏花素能通过降低转化生长因子 $\beta 1$ 含量, 减少 HA 的合成, 有效地抑制肺纤维化, 阻止肺纤维化进程。杜钢军等^[8, 9]在肝纤维化病变的研究中, 也认为灯盏花素可通过干预 TGF- β 信号传导, 保护肝纤维化; 同时也证实灯盏花素能促进阿霉素诱导的 K562 细胞凋亡。何蔚等^[10]在灯盏花素对异丙肾上腺素引起的大鼠心肌肥厚和纤维化研究中, 也证实了灯盏花素的保护作用。

本实验通过形态学观察, 发现灯盏花素作用前后形态未见明显变化, 说明灯盏花素对增生性瘢痕成纤维细胞并无直接细胞毒作用。通过对 MTT 结果显示灯盏花素对瘢痕成纤维细胞增殖明显的抑制作用并且呈剂量依赖性。本实验应用 Annexin V/PI 双染法对凋亡细胞进行流式细胞仪检测, 该方法可灵敏的检测早期凋亡细胞。本实验结果表明, 加药组凋亡指数明显升高, 与未加药组相比, 差异具有显著性。另外, Edwards CA 等认为胶原合成的量与 FB 的生物合成活

性有直接关系,与细胞数无关。而国内谢举临等证实 bFGF 在促进 FB 增殖的情况下,无相应地胶原合成的增加,从而得出了相同的结果。本实验 RT-PCR 结果同样也显示随着浓度的升高灯盏花素对瘢痕成纤维细胞 collagen I 和 collagen III mRNA 产生明显的抑制作用,结合 MTT 结果显示的灯盏花素可明显的抑制成纤维细胞的活性,因此结论与上述结果相似。

我们总结以上实验结果可以初步得出结论,灯盏花素可通过抑制成纤维细胞增殖、促进其凋亡、对 collagen I 和 collagen III mRNA 产生影响,提示灯盏花素有可能成为抗增生性瘢痕的可行药物,对纤维化疾病的防治具有潜在的应用前景。但灯盏花素通过何种机制抑制 FB 增殖及诱导 FB 发生凋亡,仍需进一步研究。

4 结论

灯盏花素可通过抑制瘢痕成纤维细胞的增殖,并且诱导其发生凋亡,对 collagen I 和 collagen III mRNA 产生影响,在瘢痕的治疗方面存在较大的应用前景,为寻找有效治疗增生性瘢痕的药物提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Yagmur C, Akaishi S, Ogawa R, et al. Mechanical receptor-related mechanisms in scar management: a review and hypothesis[J]. Plast Reconstr Surg. 2010, 126(2): 426-434.
- [2] Luo S, Benathan M, Raffoul W, et al. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions[J]. Plast Reconstr Surg. 2001, 107(1): 87-96.
- [3] 柴文成,李永春,王洪新,等. 中药当归治疗肺间质纤维化的实验研究[J]. 中国药理学通报. 2003(7).
- [4] Ma J, He B, Li N, et al. Intervention by azithromycin on bleomycin-induced lung injury in rats and its mechanisms[J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2002, 25(7): 392-395.

- [5] 周俭平, 张俊平, 刘福堂, 等. 植物黄酮对成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 中国药学杂志. 1999(10):22-23.
- [6] 柴文成, 李颖, 张海林, 等. 灯盏花素对肺纤维化大鼠肺组织中TGF- β 1及透明质酸含量的影响[J]. 中国药理学通报. 2010(12):1613-1616.
- [7] 柴文成, 翟声平, 武素琳, 等. 灯盏花素对实验性肺纤维化大鼠的干预作用[J]. 中国药理学通报. 2008(1).
- [8] 杜钢军, 王梅, 林海红, 等. 灯盏花素的肝纤维化保护作用[J]. 河南大学学报(医学版). 2009(3):170-173.
- [9] 杜钢军, 林海红, 许启泰. 灯盏花素促进阿霉素诱导的K562细胞凋亡[J]. 中国药理学通报. 2007(8):1043-1047.
- [10] 何蔚, 曾繁典. 灯盏花素对异丙肾上腺素引起大鼠心肌肥厚和纤维化的保护作用[J]. 中国药理学通报. 2005(12):1514-1517.

全文总结

1、本研究改良了瘢痕成纤维细胞培养方法，减少了培养失败率，进一步补充了瘢痕成纤维细胞培养相关理论，为细胞培养提供一种高效方法。

2、瘢痕成纤维细胞和正常成纤维细胞形态上无明显的区别，可利用特异性标志 α -SMA 对其进行鉴别。

3、增生性瘢痕组织中 collagen I 和 collagen III 明显的增加，MMPs 表达减少，以及 TIMPs 表达增高，与创面愈合纤维瘢痕形成关系密切。

4、瘢痕增生过程中是多种信号通道、多因素相互作用的复杂过程。

5、灯盏花素可通过抑制瘢痕成纤维细胞的增殖，并且诱导其发生凋亡，在瘢痕的治疗方面存在较大的应用前景，为寻找有效治疗增生性瘢痕的药物提供了新的思路。

综 述

压力治疗增生性瘢痕形成的分子机制研究进展

瘢痕形成是真皮组织损伤的一种自然修复反应，但瘢痕异常增生则会导致病理性瘢痕。临床上把皮肤病理性瘢痕增生性病变局限于伤区范围之内者称为“增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)”。据研究报告中国人HS发生率为74.67%，随着人民生活水平的提高，HS极大地影响着病人的身心健康。迄今为止仍没有一种治疗方法能将其完全治愈。大量文献报道压力疗法是目前最有效的治疗，而且自从发现压力疗效以来，作为一线的治疗和预防瘢痕的手段受到医生和患者青睐。但是压力疗法的研究大部分来源于临床经验总结，关于瘢痕的形成机制以及压力治疗的相关机制尚不透彻。鉴于该原因，我们从对压力治疗瘢痕的分子机理进行综述，为进一步研究瘢痕的分子机理和寻找分子靶向治疗奠定基础。

1 瘢痕形成细胞分子生物因素

1.1 成纤维细胞 (fibroblast, FB)在增生性瘢痕形成中的作用

成纤维细胞是参与创面修复的众多细胞中最重要的细胞成分，其主要来源于真皮乳头层、血管周围、创面基底、边缘未分化的间充质细胞或处于静止状态的纤维细胞、血细胞^[1]等。在增生性瘢痕组织中，FB 数量增多，除了强大的合成并分泌胶原纤维能力，还具有较强的细胞生长刺激因子等细胞因子的自分泌能力，从而降低了对外界生长刺激因子的依赖性而保持较强的增殖能力；有研究证实 HS 的 FB 可在低营养状态下生长，在低血清环境中，正常皮肤 FB 出现细胞凋亡，但增生性瘢痕 FB 出现程度较轻的细胞凋亡^[2]。FB 细胞外基质的合成能力、强大的自分泌功能以及低营养需求的特性，对阐明瘢痕发生发展具有重要的意义。

在瘢痕形成过程中，根据组织微环境，成纤维细胞表型结构会发生相应变化，

并表现出一些不同于正常皮肤来源 FB 的生物学特性。研究发现：创伤后 FB 大量增殖、迁移至伤口内合成并分泌细胞外基质及细胞因子；在愈合中期部分 FB 转化为肌成纤维细胞（myofibroblast, MFB），引起整块肉芽组织的收缩；愈合后，MFB 发生调亡，收缩停止，肉芽组织转化为成熟瘢痕。这些表型的改变使创面得以愈合，但同时也是病理性瘢痕形成的根源。

MFB 是形态介于 FB 和平滑肌细胞之间，具有合成胶原纤维和收缩功能双重特性，贯穿瘢痕形成、发展始终的重要细胞。TGF- β 的作用下，HS 中 FB 被启动表达 α -平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA），并分化成为 MFB^[3,4]。参与创面修复的 FB 中均可见 α -SMA 的表达，一年内的增生期瘢痕组织 MFB 高达 96%。但是，MFB 在创伤愈合中所发挥的作用还不十分明确。以往认为胶原纤维是引起瘢痕组织收缩的主要原因，但后来的研究证实，胶原纤维不具有收缩能力，而引起收缩的关键分子是具有收缩性质的 α -SMA。另外，MFB 具有强大的分泌胶原纤维和纤维连接蛋白等与瘢痕密切相关的 ECM 以及其它多种生物活性物质的能力；电镜下可见到 MFB 发达的粗面内质网和高尔基体以及正常 FB 所没有的分泌小泡。因此，可推断伤口以病理性瘢痕形式愈合与 MFB 的持续表达以及特殊的性能有密切关系，MFB 是结缔组织重塑和纤维化的关键细胞^[5]。据此，笔者认为控制增生性瘢痕的关键环节之一是控制 FB 向 MFB 的转化，从而消除或者减轻引起患者功能障碍的瘢痕挛缩。

1.2 胶原和增生性瘢痕关系

目前普遍的观点认为瘢痕形成是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和降解减少的结果^[6]，而胶原作为 ECM 的主要成分，在瘢痕的形成和发展中起主要的作用。有研究证实在瘢痕组织内胶原蛋白的合成能力极大地增强，它们的数量、组成比例与瘢痕组织的成熟、塑形、挛缩等过程密切相关^[7]。在正常皮肤组织中，胶原主要以 I、III 型胶原纤维的形式存在，其中 I 型胶原纤维直径粗大，是构成皮肤的主体。已有较多的研究显示创伤愈合早期 III 型胶原与 I 型胶原之比较高，以后逐渐以 I 型胶原为主，最后 I 型胶原占创面总胶原的 80-90

%，形成增生性瘢痕。据此认为胶原比例倒置以及 I 型胶原增多是形成增生性瘢痕的重要原因^[8]。

在增生性瘢痕的发生发展中，胶原的变化存在时间调控机制。I、III 胶原在伤后几个月开始下降，数月后即保持较为稳定的水平。国内有研究认为 HS 三个病程（6~12 月，13~24 月，大于 24 月）胶原含量和比例无显著差异，认为 6 月后 HS 即处于相对稳定的水平，推断胶原的变化发生在 6 个月之内，即胶原合成的时间调控主要位于创面修复阶段^[9]。其变化的确切时间以及相关的调控机制目前还不清楚，需要进一步研究。

另外，胎儿无瘢痕愈合的研究为人类增生性瘢痕的研究提供了广阔的思路。胎儿伤口愈合中胶原蛋白的代谢及排列均表现出与成年皮肤及瘢痕组织不同的特征。和早期胎儿伤口愈合无新合成胶原的观点^[10]相反，目前已经证实胎儿伤口新生胶原沉积，而且较高的胶原沉积效率；由于胎儿较强的 III 型胶原的合成能力，促使胶原最终以正常网状排列完成修复^[11]。杜国强^[12]等认为胎儿伤口愈合中 III 型胶原可能通过改变胶原纤维内部及纤维间的交联影响胶原纤维的排列，作为 I 型胶原的模板，调整或诱导 I 型胶原完成正常网状结构的重新排列。对于 I 型和 III 型胶原各自以及相互间的作用值得进一步研究，这是瘢痕形成的关键，也是获得瘢痕机制研究进展的突破点。胎儿无瘢痕愈合的方式，为成年人瘢痕治疗提供极佳的模型，为瘢痕的治疗指明了方向。

1.3 MMP 系列对瘢痕形成的影响

MMPs 和 TIMPs 按 1:1 形成复合物，两者间的动态平衡在创面愈合及瘢痕发生、发展中起着重要的作用^[13, 14]。正常皮肤中 MMPs 的表达极少，酶处于很低的水平；皮肤损伤后 MMPs 的表达与活性开始增加，并随着成纤维细胞大量增殖，胶原合成增加，MMPs 的表达与活性很快达到高峰；随后，在生长因子刺激下，成纤维细胞大量合成和分泌 ECM 的同时，也分泌 MMPs；在 MMPs 和其它蛋白水解酶作用下 ECM 重塑；此后 MMPs 明显降低并趋于正常。由此可见，MMPs 参与创伤修复的全过程，在瘢痕的形成和发展中起着重要的作用。

关于增生性瘢痕中胶原酶的变化目前尚无统一的认识。Ghahary等^[15]报道体外培养的人增生性瘢痕FB间质胶原酶mRNA表达水平明显低于正常。国内赵烨德等^[16]也证实MMP-3mRNA在增生性瘢痕FB中较低的表达水平,并将MMP-3基因转入HS成纤维细胞后, MMP-3表达水平升高,促进了ECM降解,得出了相似的结论。但是80年代初有人报道增生性瘢痕FB有着更强的MMPs表达能力,认为瘢痕组织内ECM的降解不但没有降低,反而有所提高。Abergel R等也认为在增生性瘢痕中胶原酶的活性高于正常皮肤,结合瘢痕组织胶原的降解减少,推测可能与胶原酶抑制因子抑制酶的活性,或增多的4-硫酸软骨素对胶原的包裹阻止了胶原酶对胶原的降解有关。上述两种因子的变化也被认为是压力治疗瘢痕的重要机理^[17]。因此可以推断,HS除了过量的胶原合成与沉积外,还存在着胶原降解代谢调控的失常,HS的形成可能与胶原的合成增加大于降解而导致胶原大量沉积有关。总之,瘢痕组织内胶原酶升降的调控可能受某些中间因素的影响还不成定论,需要进一步的研究。

目前已有的关于胶原调控机制包括胶原酶合成,如成纤维细胞、肥大细胞等的分泌;胶原酶或其非活性前体与抑制物相结合形成的复合体,经激活后发挥作用;可逆性或不可逆性抑制因子对胶原酶及其启动因子的抑制作用;胶原酶及其复合体被细胞吞噬和清除。上述任一环节失控,胶原合成与分解代谢就会失衡,胶原代谢就会发生障碍。随着研究的深入,MMPs的表达及活性在基因水平和翻译水平的调节也有了很大的进展,如已经发现多种原癌基因的表达产物能与基因特异位点结合,刺激MMPs的转录;一些细胞因子可增加MMPs的表达,而另外一些则会抑制其表达。虽然相关的机制还不是很清楚,但是这些研究丰富了瘢痕形成的理论基础,为瘢痕的靶向治疗提供了切入点。

1.4 信号通路在增生性瘢痕的作用

信号通路在细胞的各种变化中起着关键作用,同样在增生性瘢痕中,Smad介导的转化生长因子信号通路在增生性瘢痕发生发展中起重要作用。鉴于近年来的一系列研究成果已使转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)超

家族的信号转导机制得到阐明（见图 1）。哺乳动物中 TGF β 主要以 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 三种形式存在，它们具有相似的生物活性，可诱导体内各种组织纤维化反应。较多的研究显示 TGF- β 1 及其信号传导通路在成纤维细胞增殖、分化，胶原代谢中发挥着重要的作用，是伤口过度愈合中最重要的角色。^[18-20]

TGF- β 1 促进瘢痕愈合只有通过活化的 TGF- β 1 与受体结合，将胞外信号传递入胞核才能发挥作用。因此，中介分子 Smads 作为信号从受体到核内的细胞内主要转导分子，在增生性瘢痕等纤维化病变的形成过程中所起的作用引起了众多学者的关注。Smads 根据不同分型，对成纤维细胞产生双向调控作用，其中 Smad2、Smad3 是膜受体和靶基因之间相联系的桥梁，Smad7 是 TGF- β 1 转导途径中主要的抑制性调控蛋白之一。

Inagaki 等^[21]认为 smad3 的启动是纤维化病变的关键环节。国内陈伟等^[22]认为胎儿皮肤伤口无瘢痕愈合可能与 TGF- β 和其下游信号 Smads 的低表达有关。近年来，干扰 RNA 技术的发展，刘波等^[23]利用 SiRNA-Smad3 特异性沉默原代培养的人瘢痕成纤维细胞 Smad3 基因，I 型胶原明显降低，其合成不能被 TGF- β 1 诱导。由此可见，Smad3 通过直接或与其它转录因子协同影响靶基因的转录，可介导 TGF- β 的生物学效应，参与细胞的增殖、分化、炎症反应以及胶原合成等调节，在创伤愈合、瘢痕形成以及后期组织塑形过程中具有重要的作用，smad3 可作为瘢痕治疗的重要靶点。

Smad7 是 TGF- β 信号转导途径中主要的抑制性调控蛋白之一，Schiller 等^[24]研究发现 Smad7 可阻止 Smad3 形成复合物和 Smad3 磷酸化。现已证实 smad7 表达为 TGF- β 1 自身和其它信号途径所诱导，是细胞中 TIBR I 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白，能通过与 Smad2、3 竞争结合 TIBR I 型受体，阻止 R-smad 的磷酸化；还能阻止 smad2, 3 复合物形成，促进其分解。在瘢痕研究中，Yu H 等^[25]发现 smad7 mRNA 含量明显降低；Saika 等^[26]发现注入 Smad7 基因和敲除 Smad3 基因后的老鼠角膜瘢痕疙瘩生成明显减少。据此笔者认为可通过尝试提高 smad7 在细胞内表达的方法治疗瘢痕。

2 压力治疗增生性瘢痕的研究现状

压力疗法具有相当悠久的历史,早在1607年就有学者发现持续对手瘢痕加压可促进手功能的恢复,18世纪60年代Cronin也发现颈部加压可防止瘢痕挛缩,后来Larson和它的同事发现穿弹力衣的部位不会发展瘢痕,并通过进一步的研究证实了这一结果。从此以后,压力疗法一直是临床上治疗瘢痕的一线手段。据统计压力治疗在60-85%的病人获得成功^[27],但是压力对瘢痕的治疗都是基于临床经验,其临床效果还没有被科学的证明。一般认为压力治疗效果最明显的阶段是烧伤后瘢痕增生活跃期,当超过6个月效果就不明显,需要每天持续18-24小时,压力维持在24-40mmHg之间,直到瘢痕成熟才能产生效果,如果弹力衣过早的释放则有可能出现治疗效果的反弹。但对于确切有效的压力数据尚存在争议,结合正常皮肤毛细血管压力25mmHg的水平,有研究显示压力疗法的有效压力应在10-35mmHg之间。另有学者却认为压力应大于25mmHg才能对增生性瘢痕产生有效的抑制作用,但在这种高压下,患者不能忍受长期的压力治疗。另有研究则认为压力在15mmHg左右,患者容易接受长期治疗,且治疗效果好,是最佳的压力值^[28]。所以对于基础研究应该结合压力大小、持续时间、患者耐受等方面的因素才能有实际意义。

压力疗法的作用机制目前还不是十分明确,尚缺乏一个合理设计,大样本的关于压力作用前后对比的离体和在体研究。综合文献所述,目前压力疗法的研究包括:压力可引起的潜在皮肤毛细血管闭塞使得瘢痕组织处于缺氧状态^[29],减低了瘢痕组织的新陈代谢,使成纤维细胞不能制造胶原纤维,导致胶原纤维的合成减少;Costa等^[30]发现加压治疗通过诱导细胞凋亡,使表达 α -平滑肌肌动蛋白的肌成纤维细胞减少;缺氧也激活了瘢痕组织中的胶原蛋白酶,加速了瘢痕组织中胶原纤维的分解;瘢痕局部血流量的减少导致了 α -2巨球蛋白的减少,引起胶原酶的增加;过度缺氧还会导致成纤维细胞降解和硫酸软骨素-4的降低,增加胶原纤维的降解^[17]。另外,压力降低了瘢痕组织水解,增加了肥大细胞的稳定性和减少了新生血管和细胞外基质的产生,但是在硅胶治疗的机理研究中

发现肥大细胞的增加导致瘢痕组织的成熟,肥大细胞的作用有待进一步研究^[17]; PG在创面愈合中的确切生物学功能及其自我调控机制尚不清楚,一般认为体内创伤炎症时PG介导合成、分泌一系列促纤维化因子,促进瘢痕的过度增生,但是有研究表明,HS组织中前列腺素E2(PGE2)含量较正常瘢痕组织明显减少^[31]。当压力作用于细胞时,细胞形态、内部结构、细胞器、细胞质以及各种因子均会发生相应变化,最终导致细胞内信号传导,化学递质释放,从而导致细胞不同的病理生理反应,目前尚缺乏这方面深入的研究。

综合各研究结果,压力治疗在各种治疗方法中,比较能减低烧伤后瘢痕增生,从而使瘢痕较早成熟及稳定下来。但是压力疗法在临床上仍面临一些问题,对儿童发育不利及产生一些致命的并发症;对于成人由于压力分布不均,偶尔会出现皮肤溃疡,且关节活动及体表不平可妨碍治疗。因此在未来,需要更进一步的实验研究,去找出最理想的压力来预防及治疗不同部位、不同严重程度以及不耐成熟阶段的增生性瘢痕;压力疗法的分子生物学机制仍有待于进一步阐明。

3 总结

总之,目前,瘢痕研究虽然取得了丰硕的成果,但是由于研究条件的差别及其本身调控机制的复杂性,产生了很多矛盾的研究结果,关于人类瘢痕形成以及压力治疗瘢痕的机制尚未完全清晰,因此限制了从根本上对瘢痕的发生、发展进行控制。未来,从不同角度探讨HS和K的发病机制,将为HS和K的最终根治提供新的思路和线索。在瘢痕形成前和形成尚未成熟的阶段控制瘢痕组织增生,尽量去除各种造成瘢痕增生的因素,防止瘢痕对机体造成的各种畸形和功能障碍。压力因其作为非侵入性治疗瘢痕方面的优势,随着细胞及分子水平研究的深入,压力治疗机制的揭示将不仅促进对瘢痕形成机制的了解,而且可为增生性瘢痕分子靶向治疗提供突破口。

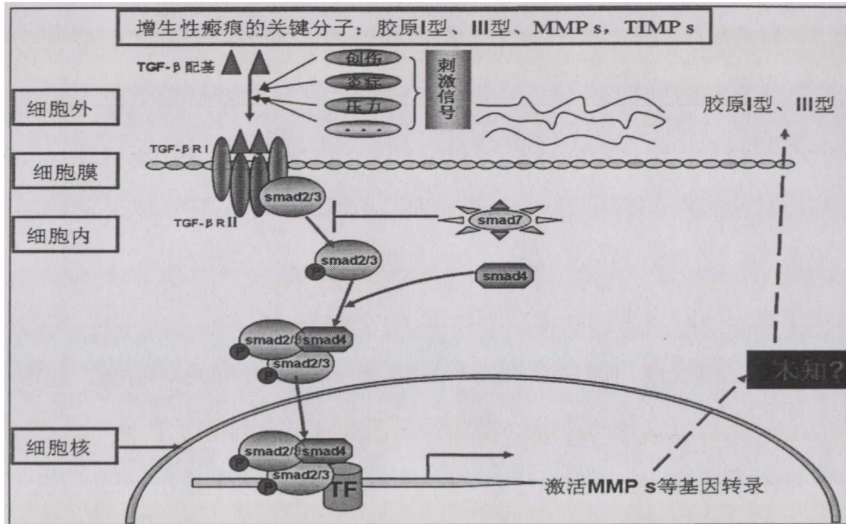


图 1 TGF- β 信号通路及其待研究的领域: 外界压力引起TGF- β 信号通路的变化, 信号通路变化的各个关键点分子变化和未知的调控

Fig 1 TGF- β signaling pathways and areas of research: TGF- β signaling pathways changes caused by outside pressure. The key signaling pathways molecular changes and unknown control.

参考文献:

- [1] Bucala R, Spiegel L A, Chesney J, et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair[J]. Mol Med. 1994, 1(1): 71-81.
- [2] 关宝祥, 徐少骏, 鲍卫汉. 异常瘢痕成纤维细胞在低血清及白介素1 β 作用下的细胞凋亡研究[J]. 中华整形外科杂志. 2001(5).
- [3] van Beurden H E, Von den Hoff J W, Torensma R, et al. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair[J]. J Dent Res. 2005, 84(10): 871-880.
- [4] Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression[J]. J Pathol. 2004, 204(4): 386-395.

- [5] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. *Wound Repair Regen*. 2005, 13(1): 7-12.
- [6] Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka S G, et al. Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilization[J]. *Fertil Steril*. 2001, 76(1): 98-101.
- [7] Birkedal-Hansen H, Moore W G, Bodden M K, et al. Matrix metalloproteinases: a review[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993, 4(2): 197-250.
- [8] 雷涛, 高建华, 张进华, 等. 瘢痕疙瘩组织中胶原的形态学分析[J]. *中华医学美学美容杂志*. 2002(3):30-32.
- [9] 邱林, 金先庆, 向代理, 等. 不同年龄烧伤患者增生性瘢痕的胶原构成及影响因素的研究[J]. *中华烧伤杂志*. 2003(4):48-52.
- [10] Nath R K, Parks W C, Mackinnon S E, et al. The regulation of collagen in fetal skin wounds: mRNA localization and analysis[J]. *J Pediatr Surg*. 1994, 29(7): 855-862.
- [11] Vogel K G, Trotter J A. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro[J]. *Coll Relat Res*. 1987, 7(2): 105-114.
- [12] 杜国强, 王敏. 无瘢痕愈合过程中胶原代谢演变的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*. 2007(5):280-283.
- [13] Subramaniam K, Pech C M, Stacey M C, et al. Induction of MMP-1, MMP-3 and TIMP-1 in normal dermal fibroblasts by chronic venous leg ulcer wound fluid*[J]. *Int Wound J*. 2008, 5(1): 79-86.
- [14] Beidler S K, Douillet C D, Berndt D F, et al. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy[J]. *Wound Repair Regen*. 2008, 16(5): 642-648.

- [15] Ghahary A, Shen Y J, Nedelec B, et al. Collagenase production is lower in post-burn hypertrophic scar fibroblasts than in normal fibroblasts and is reduced by insulin-like growth factor-1[J]. *J Invest Dermatol*. 1996, 106(3): 476-481.
- [16] 赵烨德, 刘宁飞, 何清濂, 等. 瘢痕成纤维细胞的MMP-3 mRNA表达及其基因转染[J]. *第二军医大学学报*. 1998(3):1-4.
- [17] Brissett A E, Sherris D A. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids[J]. *Facial Plast Surg*. 2001, 17(4): 263-272.
- [18] Hu M, Sabelman E E, Cao Y, et al. Three-dimensional hyaluronic acid grafts promote healing and reduce scar formation in skin incision wounds[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003, 67(1): 586-592.
- [19] Shah R, Selby S T, Yokley B, et al. TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study[J]. *Tissue Antigens*. 2009, 74(1): 50-56.
- [20] Chin G S, Liu W, Peled Z, et al. Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts[J]. *Plast Reconstr Surg*. 2001, 108(2): 423-429.
- [21] Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, et al. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells[J]. *J Cell Physiol*. 2001, 187(1): 117-123.
- [22] 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 等. 增生瘢痕中转化生长因子基因的表达[J]. *中华外科杂志*. 2002(1).
- [23] 刘波, 果磊. SiRNA-Smad3沉默人瘢痕疙瘩成纤维细胞中Smad3对纤维连接蛋白及 I 型胶原表达的影响[J]. *重庆医科大学学报*. 2010(4):522-526.
- [24] Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and

- gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing[J]. *J Dermatol Sci*. 2004, 35(2): 83-92.
- [25] Yu H, Bock O, Bayat A, et al. Decreased expression of inhibitory SMAD6 and SMAD7 in keloid scarring[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006, 59(3): 221-229.
- [26] Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, et al. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model[J]. *Arch Ophthalmol*. 2007, 125(5): 647-654.
- [27] Niessen F B, Spauwen P H, Schalkwijk J, et al. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review[J]. *Plast Reconstr Surg*. 1999, 104(5): 1435-1458.
- [28] Giele H, Liddiard K, Booth K, et al. Anatomical variations in pressures generated by pressure garments[J]. *Plast Reconstr Surg*. 1998, 101(2): 399-406, 407.
- [29] Kischer C W, Shetlar M R, Shetlar C L. Alteration of hypertrophic scars induced by mechanical pressure[J]. *Arch Dermatol*. 1975, 111(1): 60-64.
- [30] Costa A M, Peyrol S, Porto L C, et al. Mechanical forces induce scar remodeling. Study in non-pressure-treated versus pressure-treated hypertrophic scars[J]. *Am J Pathol*. 1999, 155(5): 1671-1679.
- [31] Reno F, Grazianetti P, Cannas M. Effects of mechanical compression on hypertrophic scars: prostaglandin E2 release[J]. *Burns*. 2001, 27(3): 215-218.

中英文缩略词对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
HS	Hypertrophic SCAR	增生性瘢痕
Fb	Fibroblast	成纤维细胞
MMP	Matrix Metalloproteinase	基质金属蛋白酶
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase	组织型基质金属蛋白酶抑制剂
TGF β	Transforming growth factor	转化生长因子 β
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐
DAB	Diaminobenzidine	3,3'-二氨基联苯胺
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
SABC	Strep-avidin biotin peroxidase complex	链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合体
HE	hematoxylin and eosin	苏木素-伊红
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化
α -SMA	Alpha-smooth muscle actin	α -平滑肌肌动蛋白
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
RT-qPCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	反转录聚合酶链反应
SPSS	statistical package for social science	社会科学统计软件包

攻读学位期间主要的研究成果

- [1] 刘银平, 黄东. 压力治疗增生性瘢痕的分子机制研究进展[J]. 广东医学. 2011(22):3001-3004.
- [2] 刘银平, 黄东, 吴伟炽, 等. 灯盏花素对增生性瘢痕成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床解剖学杂志. 2012(30)2:218-220.
- [3] 刘银平, 黄东, 吴伟炽等 两种方法修复指端缺损的比较分析. 广东医学. 已定稿.
- [4] 黄东, 刘银平, 吴伟炽, 等. 急诊多指再造26例[J]. 中华显微外科杂志. 2012, 34(6):503-505.
- [5] 吴伟炽, 刘银平, 黄东, 等. 第二足趾移植塑形再造全长手指12例[J]. 中华显微外科杂志. 2011, 34(03).
- [6] 林浩, 黄东, 刘银平, 等. 桡神经损伤的急诊外科修复 中国医疗前沿 (投稿)
- [7] 林浩, 刘银平, 黄东, 等. 仅吻合一条血管的指尖部组织块再植研究. 实用手外科杂志. 已定稿.
- [8] 黄永军, 黄东, 林浩, 刘银平等. 负压封闭引流装置在急诊修复四肢软组织撕脱或缺损伴骨外露的治疗体会[J]. 中国医疗前沿. 2011(16):35-36.
- [9] 吴伟炽, 牟勇, 葛军委, 刘银平等. 第2足趾末节移植再造示中环指指尖的疗效分析. 实用手外科杂志2011,25(1) 1671-2722.

致 谢

寒来暑往，春秋几度，在广东省第二人民医院的三年学习时间已接近尾声，成功的完成了一些事情，顺利的走过一段旅程之后，总发现离不开老师、同学、朋友和亲人的鼓励与帮助，感谢总是发至肺腑。首先衷心的感谢我的导师黄东教授，无论是课题的设计，论文、标书的写作，他都倾注了大量的心血。我的每一篇论文，都经过了老师多次的细心修改；他对医疗科研工作一丝不苟的作风、孜孜不倦的敬业精神，深深地感染了我，无时无刻的鞭策着我不断进步。导师的谆谆教诲，不仅使我在学业上取得了长足的进步，更使我懂得了许多做人的道理。他永远是我人生中学习的榜样。

特别感谢中山大学肿瘤研究所李江超博士，对我实验的物质支持和技术指导；感谢广东省第二人民医院整形美容科孙中生主任、广州市红十字会医院整形外科谢有富主任，是他们的协助，为本实验提供了大量标本。同时，感谢每一位为本实验无私捐献标本的患者，感谢他们为人类医学事业献身自己、回馈社会的心。

感谢广东省第二人民医院创伤骨科江奕恒老师、吴伟炽老师、黄国英老师对我临床实践的悉心指导和无私帮助，让我积累了许多临床知识和技能；感谢郭红娟护士长和全体护士对我临床实践的配合和指教，对我生活的关心和帮助。你们的亲切、热情让我感觉到了家的温暖，在这三年里与你们结下的友谊是我一生的宝贵财富。

感谢各位师兄和师弟对我工作、生活的关心和帮助，在一起共同奋斗的日子美好而难忘，同窗之间的友谊永远长存。

最后，在即将完成硕士学业之际，特别感谢我的家人，正是他们的爱鼓励着我、支持着我渡过人生中这最为难忘的求学生涯。

衷心感谢所有参与本实验，对本实验提供无私帮助的人，谢谢！

南方医科大学 学位论文原创性声明

本人郑重声明:所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外,本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。除与外单位合作项目将予以明确方式规定外,本研究已发表与未发表成果的知识产权均归属南方医科大学。

本人承诺承担本声明的法律效果。

作者签名: 刘锦华

日期: 2012 年 5 月 2 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定,同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅。本人授权第一军医大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于(请在以下相应方框内打“√”):

- 1、保密□, 在____年解密后适用本授权书。
- 2、不保密√。

作者签名: 刘锦华

日期: 2012 年 5 月 2 日

导师签名: 苏小

日期: 2012 年 5 月 2 日

统计学审稿证明

编号: M12-0610

研究生毕业论文统计学审稿证明

兹有硕士研究生 刘银平 的论文(编号: M12-0610)
《创伤后瘢痕形成机制及治疗的研究》中有关统计学方面的
内容, 经我系审定合格, 特此证明。

南方医科大学基础医学系
主任签字

