维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0521－04

胶原构成与不同年龄增生性瘢痕形成的研究

邱 林，金先庆，向代理，傅跃先，田晓菲

(重庆医科大学儿科学院烧伤整形科，重庆 400014)

【摘 要】目的：通过观察不同年龄正常皮肤(NS)、增生性瘢痕(HTS)胶原构成、比例，初步探讨各年龄阶段 HTS 形成的可能机理及条件。方法：采用 SABC 免疫组织化学方法观察胎儿、1～19 岁(儿童青少年组)、20～50 岁(成年组)、>60 岁(老年组)正常皮肤和 1～19 岁、20～50 岁 HTS 中Ⅰ、Ⅲ型胶原含量和比例。结果：①胎儿组Ⅲ型胶原含量高于Ⅰ型胶原，其余组为Ⅰ型胶原高于Ⅲ型胶原；正常皮肤Ⅰ/Ⅲ型胶原比例随年龄增加呈上升趋势。HTS 组织的Ⅰ/Ⅲ型胶原比例明显高于正常皮肤(NS)，1～19 岁 HTS 组Ⅰ/Ⅲ型胶原比例较 20～50 岁 HTS 组增高，平均为 6.48，3.76；HTS 组各病程之间Ⅰ/Ⅲ型胶原比例无差异。结论：Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量和比例决定着皮肤的正常结构，Ⅰ，Ⅲ型胶原比例的失调与不同年龄 HTS 的形成有着密切关系。

【关键词】瘢痕；肥大性；胶原；免疫组化

【中国图书分类法分类号】R644 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－08－20

A study on collagen constitute and formation of hypertrophic scar in different age periods

QIU Lin, et al

(*Department of Burns and Plastic Surgery, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of hypertrophic scar formation in different age periods. *Methods*: The expression of type I and type Ⅲ collagen of hypertrophic scar in different age periods was measured with immunohistochemistry which was divided into two groups 1～19 years old and 20～50 years old, and the same measure was adopted in normal skin divided into four groups - fetal, 1～19, 20～50, and more than 60 years old. The quantities of type I and type Ⅲ collagen and the ratios were analyzed. *Results*: ①The ratio of type Ⅰ/type Ⅲ collagen of normal skin had a guadually increasing tendency. ②The ratio of type Ⅰ/type Ⅲ collagen of HTS was increasing compared with normal skin(NS), and relative quantities of type I collagen of HTS was significantly increasing. The ratio of type Ⅰ/type Ⅲ collagen of HTS in group of 1～19 year old was highter than that in the group of 20～50 year old. *Conclusion*: Normal structure of the skin is decided by quantities and ratio of type I and type Ⅲ collagen. The formation of hypertrophic scar in different age periods relates to maladjustment of the ratio of type I and type Ⅲ collagen. Collagen synthesis and regulation of its constitute are finished after about six months. They keep relatively stable within 6 month to 2～3 years.

【Key words】Hypertrophic scar; Type I collagen; Type Ⅲ collagen; Immunohistochemistry

增生性瘢痕(HTS)是由于胶原为主的细胞外基质(ECM)过度合成以及其降解减少所引起，其特征性的结构为：胶原纤维排列紊乱，形成涡轮状或结节状的胶原结节，其内含有大量的成纤维细胞和致密排列紊乱的胶原纤维；增生性瘢痕的发生与人种、年龄有着密切的关系，青少年时段的发生率明显较高。研究表明[1]皮肤组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维组比例的改变将直接导致其生物学行为的异常。本实验通过比较不同年龄的正常皮肤与 HTS 胶原的含量和比例，初步探讨各年龄阶段 HTS 形成的可能机理及条件为各年龄阶段 HTS 的针对性治疗提供理论依据。

作者介绍：邱 林(1968－)，女，讲师，
主要研究方向：瘢痕成因及应用基础研究。

1 材料和方法

1.1 标本选择及分组

正常皮肤(NS)标本共 20 例。男 9 例，女 11 例，流产胎儿皮肤 5 例。分为四组：胎儿组、1～19 岁、20～50 岁、大于 60 岁组。烧伤后增生性瘢痕(HTS)本共 30 例，男 18 例，女 12 例。HTS 分为两组：1～19 岁组和 20～50 岁组；病程分为

维普资讯 http://www.cqvip.com

烧伤创面愈合后 6 月～12 月、13～24 月及大于 24 月。瘢痕经病理切片证实,临床表现:瘢痕局部瘙痒、高出皮面,呈红褐色,局限于皮损区,表面无破溃,质地硬,弹性差。无全身系统性纤维化病史,术前 1 年内未使用过激素类药物,瘢痕局部未经放射或注射治疗及其它外用药物治疗。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化法 采用 SABC 法,标本用 4% 多聚甲醛 + 0.1% DEPC 固定 24h,石腊包埋,切片,Ⅰ型和Ⅲ型胶原多抗和 SABC 试剂盒为武汉博士德公司产品,稀释度 1:100,抗原修复采用酶消化法,用 PBS 液代替一抗做阴性对照。

1.2.2 图像分析 采用 Tiger920G 图像分析软件系统,对免疫组织化学切片结果进行分析。结果使用切片阳性面积所占测量面积的百分比表示,每张切片随机选择 5 个视野,取平均值。

1.3 统计学处理

所获资料用 SAS 6.12 统计软件作统计处理,所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,Q 检验。

2 实验结果

2.1 Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组化形态学结果观察

HTS 真皮层的细胞间质中可见到呈黄色的大量的、较为粗大的Ⅰ型胶原阳性信号,成纤维细胞和血管壁上也有少量黄色阳性信号(图 1)。空白对照无阳性信号。NS 真皮层细胞间质中可见到较多的黄色Ⅰ型胶原阳性信号,成纤维细胞和血管壁上几乎没有阳性信号(图 2)。

HTS 真皮层的细胞间质中可见到散在分布、呈黄色相对较少的Ⅲ型胶原阳性信号,阳性胶原束较细小,成纤维细胞和血管壁上也有少量黄色阳性信号,空白对照无阳性信号(图 3)。NS 真皮层细胞间质中可见到排列较密集的黄色Ⅲ型胶原阳性信号,成纤维细胞和血管壁上几乎没有阳性信号(图 4)。

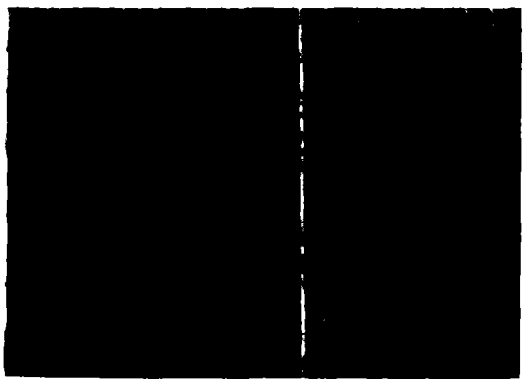


图 1 HS 组织Ⅰ型胶原免疫组化真皮层中可见到呈黄的大量的、较为粗大的阳性信号 SABC×200



图 2 NS 组织Ⅰ型胶原免疫组化真皮层中可见到较多的黄色阳性信号 SABC×200



图 3 HS 组织Ⅲ型胶原免疫组化真皮层可见到呈黄色散在分布的较少的阳性信号,胶原束较细小 SABC×200



图 4 NS 组织Ⅲ型胶原免疫组化

2.2 Ⅰ、Ⅲ型胶原的半定量分析

表 1 正常皮肤Ⅰ、Ⅲ型胶原图像分析结果(阳性面积 $\bar{x} \pm s$,%)

	胎儿组 ($n=5$)	1～19 岁组 ($n=5$)	20～50 组 ($n=5$)	>60 岁组 ($n=5$)
Ⅰ型	16.6±1.53	28.6±2.51	29.5±1.97	24.3±1.41
Ⅲ型	19.7±1.35	22.7±1.56	21.2±1.34	15.8±2.24
Ⅰ/Ⅲ	0.84*	1.26*	1.39*	1.54*

(1)四组Ⅰ型胶原做方差分析($P>0.05$),差异无显著性意义。Ⅲ型胶原差异无显著性意义($P>0.05$)。

(2)从胎儿组到老年组Ⅰ、Ⅲ型胶原的比例呈逐渐上升趋势,四组Ⅰ/Ⅲ相比($P<0.05$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 增生性瘢痕组Ⅰ、Ⅲ型胶原图像分析结果(阳性面积百分比 $\bar{x}\pm s$,%)

组别	例数	胶原类型	NS	瘢痕形成时间(月)		
				6～12	12～24	>24
1～19 岁	15	Ⅰ	28.6±2.51	53.6±3.26*	55.3±2.46*	49.4±3.80*
		Ⅲ	22.7±1.56	8.12±0.82*	8.85±1.21*	7.48±0.82*
		Ⅰ/Ⅲ	1.26	6.60☆	6.25☆	6.60☆
20～50 岁	15	Ⅰ	29.5±1.97	46.4±2.31*	48.6±2.50*	45.0±2.39*
		Ⅲ	21.2±1.34	12.5±2.40*	13.3±1.73*	11.5±1.69*
		Ⅰ/Ⅲ	1.39	3.71☆	3.65☆	3.91☆

*:与相同年龄 NS 组相比 $P<0.05$ ☆:与相同病程的Ⅰ/Ⅲ相比 $P<0.05$

3 讨 论

胶原是 ECM 中的主要成分,在 HTS 和人体皮肤组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原纤维是最主要的构成部分。Ⅰ型胶原粗大,是构成皮肤的主体,Ⅲ型胶原细小、是皮肤中网状纤维的主要部分,其含量越高纤维束越细,从形态学上可见胶原纤维直径与Ⅲ型胶原的比例呈负相关[2],正常皮肤的Ⅰ、Ⅲ型胶原比例在发育过程中呈协调表达,Ⅰ、Ⅲ型胶原的正常比例维持着皮肤的正常组织结构。在对胎儿的无瘢痕愈合研究中证实,胎儿真皮层以Ⅲ型胶原为主,其相对含量明显高于成年皮肤,随着孕龄增大,皮肤外伤后,出现由无瘢痕→过度期瘢痕→瘢痕的过程[3]。HTS 的形成过程中,Ⅰ型胶原纤维的增加和Ⅲ型胶原的减少都起着至关重要的作用,粗大的Ⅰ型胶原是瘢痕组织的病理基础。实验结果表明,胎儿的Ⅲ型胶原相对含量增高,Ⅰ/Ⅲ型胶原的比例明显低于其它各组,胎儿皮肤弹性好而张力差,儿童青少年组和成人组Ⅰ、Ⅲ型胶原含量相对增高,皮肤弹性好、张力良好,老年组Ⅰ、Ⅲ型含量则减低,但Ⅰ/Ⅲ型胶原比例却有增加,皮肤弹性及张力均减低,正常皮肤Ⅰ/Ⅲ型胶原的比例随年龄增高呈逐渐上升的趋势,与先前研究基本吻合。HTS 组Ⅰ型胶原含量较 NS 组增加显著,Ⅲ型胶原明显减少,1～19 岁 HTS 组Ⅰ型胶原含量增加更为明显,该组Ⅰ、Ⅲ型胶原的比例高于 20～50 岁 HTS 组,平均分别为 6.48、3.76,提示愈合过程中由于Ⅰ型胶原增加、粗大Ⅰ型胶原占据愈合创面的主体,Ⅲ型胶原网状纤维的减少和结构改变,使Ⅰ/Ⅲ型胶原的比例失调,促进愈合的创面质地变得坚硬而弹性减低,最终导致增生性瘢痕的形成。儿童青少年年龄阶段Ⅰ/Ⅲ型胶原比例的失衡更为显著,可能是儿童青少年年龄阶段增生性瘢痕易发因素之一,这种不同年龄Ⅰ/Ⅲ型胶原比例差异的形成,推测可能与胶原合成或降解因素的改变有关。与胶原合成和降解有关的因子较多,较为肯定的有转化生长因子 β_1(TGF-β_1)、胶原酶及金属蛋白酶组织抑制剂($TIMP_1$)等。TGF-β_1 是纤维化疾病中导致 ECM 沉积的主要调节因子之一,它不仅通过增加Ⅰ、Ⅲ型胶原基因的表达促进胶原合成,而且还通过增加 $TIMP_1$ 和其它抑制因子合成和减少胶原酶的合成而阻止胶原的降解。zhou[4]等在培养液中加入外源性 TGF-β_1 后,HTS 成纤维细胞的增殖及合成Ⅰ型胶原的能力明显高于正常成纤维细胞,而瘢痕组织中 TGF-β_1mRNA 表达明显增高[5],证实 TGF-β_1 在 HTS 的形成中起着重要的调控作用。胶原酶和 TIMP,是与瘢痕胶原降解有关的主要酶类成分,TIMP-1 与胶原酶结合成复合体,从而抑制胶原酶的活性,Ghahary[6]等证实增生性瘢痕成纤维细胞胶原酶 mRNA 表达和活性明显降低,$TIMP_1$ 的表达增高,胶原降解不足导致胶原纤维的过度聚集而促使增生性瘢痕的形成。综上所述,不同年龄Ⅰ/Ⅲ型胶原比例的差异可能与以上各种因素的变化均有联系,其相关性将另文讨论。

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%,McGrouther[7]等证实,Ⅰ、Ⅲ型胶原在愈合创面的真皮表达较多,Ⅲ型胶原在伤后几月内开始下降,数月后即保持较为稳定的水平,说明创面愈合过程中胶原的合成及降解具有时间调控。我们实验发现:不同病程(6～12 月,13～24 月,>24 月)HTS 中胶原的含量和比例无显著差异,提示 HTS 的形成过程中Ⅲ型胶原的下降、Ⅰ型胶原的上升通常在 6 月内完成,HTS 成熟后Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量和比例即处于一相对稳定的状态,胶原合成的时间调控主要位于创面修复阶段。在皮肤纤维化疾病的研究中,发现Ⅰ、Ⅲ型前胶原的合成和 mRNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

的表达均有明显升高,Zhang[10]等也观察到 HTS 比 NS 组织中的Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 表达高 3～4 倍,但Ⅰ/Ⅲ型胶原 mRNA 却几乎相同,这种与 HTS 组织中Ⅰ/Ⅲ型胶原比例明显增高的差异的形成,推测在胶原的基因转录和蛋白翻译水平还存在调节因素,其机理有待进一步探讨。实验结果表明 HTS 组织中失调的胶原比例与年龄有着密切关系,提示在预防和减轻儿童青少年的 HTS 的形成中,通过采用减少Ⅰ型胶原在组织中含量和调控失衡的构成比例的措施,阻止或减轻Ⅰ、Ⅲ型胶原的比例失调,可能取得更良好的效果,如间质胶原酶特异性作用于Ⅰ型胶原的前 α_1 和前 α_2 位点,使其长度降解至 3/4 和 1/4,更易于被金属蛋白酶进一步降解,其效果有待实验和临床的证实。

参 考 文 献

[1] Di Cesare PE, Cheung DT, Perelman N, et al. Alternation of collagen compoition and cross - linking in keloid tissues [J]. Matrix, 1990; 10(3): 172 - 178.

[2] Linares HA. From wound to scar[J]. Burns, 1996; 22(5): 339 - 352.

[3] 冯国平,孙广慈,管正玉,等. 胎兔伤口无瘢痕愈合的形态学和胶原构成研究[J]. 中华整形外科杂志, 2001; 17(4): 239 - 241.

[4] Zhou LJ, Ono i, Kaneko F. Role of transforming growth factor beta$_1$ in fibroblasts derived from normal and hypertrophic scarred skin[J]. Arch Dermatol Res, 1997; 298(11): 646 - 652.

[5] 武继祥,陈德英,吴宗耀. 增生性瘢痕中 TGF - β 和胶原酶、TIMP - 1mRNA 表达的定量研究[J]. 中华整形外科杂志, 2000; 16(1): 34 - 36.

[6] Ghahary A, Shen YJ, Nedelec B, et al. Collagenase production is lower in post - burn hypertrophic scar fibroblasts and is reduced by insulin - like growth factor - 1[J]. J Invest Dermatol, 1996; 106(3): 476 - 481.

[7] McGrouther DA. Hypertrophic or keloid scars[J]? Eye, 1994; 8(Pt 2): 200 - 203.

[8] Tsutomu Ohtsuka, Noriyuki Koibuchi, Hiroya Sakai Akio Yamakage, et al. Quantitative analysis of a_1(Ⅰ) and a 1(Ⅲ) procollagen mRNA expression in systemic sclerosis skin tissue - an in situ hybridization study[J]. Arch Dermatol Res, 1999; 291(11): 575 - 582.

[9] Sondergaard K, Heichendorff L, Risteli L, et al. Deleuran B Increased levels of type Ⅰ and Ⅲ collagen and hyalaronan in SSc skin[J]. Br J Dermatol, 1997; 136(1): 47 - 53.

[10] Zhang LQ, Luato M, Muona P, et al. Normal and hypertrophic scars: quantification and localization of messenger RNAs for type Ⅰ, Ⅲ and IV collagens[J]. B J Dermatol, 1994; 130(4): 453 - 459.

(上接第 505 页)

[6] Li WD, Ran GX, Teng HL, et al. Dynamic effects of leflunomide on IL - 1, IL - 6 and TNF - alpha activity produced from peritoneal macrophages in adjuvant arthritis rats[J]. Acta Pharmacoi Sin, 2002; 23(8): 752 - 756.

[7] Siemasko KF, Chong A, Williams JW, et al. Regulation of B cell function by the immuno - supressive agent leflunomide [J]. Transplantation, 1996; 619(4): 635 - 642.

[8] Smolen SJ, Kalden RJ, Scott LD, et al. Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazme in active rheumatoid arthritis: a double - blind, randomized, multicentre trial[J]. Lancet, 1999; 353(9149): 259 - 266.