DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.021
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0899-03

论著

人皮肤移植增生性瘢痕裸鼠模型的建立

杨东运,李世荣,李 钢,刘剑毅,陈艳清,毕 胜,戴 霞 (第三军医大学西南医院整形外科,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种具有人增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)的组织学特性,且能反映HS发展规律的HS动物模型,为HS的实验和临床研究提供重要手段。方法 在裸鼠背部做2.0 cm×1.5 cm的全层皮肤缺损创面,移植人的全厚皮肤,并移植裸鼠的自体皮肤做对照。皮片存活后不给予烧伤,观察皮片干痂脱落后瘢痕增生的情况,然后进行增生瘢痕的组织学检查,并用PCR技术对其DNA进行扩增,鉴定其组织来源。结果 60只裸鼠中有54只出现明显的、持续的瘢痕增生(90.0%),增生的瘢痕色红质硬,明显高出皮面,组织学检查可见大量的胶原沉积和炎细胞浸润,PCR结果显示该瘢痕可以扩增出与正常人皮肤组织及人HS组织同等大小的特异性PCR产物。结论 该模型制作简单,所产生的瘢痕增生明显,增生持续时间长,大体外观和组织学特点都和人的HS相似,且可观察自创面愈合至增生性瘢痕形成的全过程,是一种较为理想的HS动物模型。

关键词:增生性瘢痕;动物模型;裸鼠
中图法分类号:R-332;R364.31;R622.1 文献标识码:A

Establishment of a nude mouse model for study of human hypertrophic scar

YANG Dong-yun, LI Shi-rong, LI Gang, LIU Jian-yi, CHEN Yan-qing, BI Sheng, DAI Xia (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an ideal animal model for the human hypertrophic scar in nude mice for providing an important tool for the experimental and clinical studies of hypertrophic scar. Methods Normal human skin grafts (2.0 cm×1.5 cm) were applied to the lesions created by whole thickness skin excision in the back of nude mice. No burn injury was made after the survival of the skin graft. After skin graft rejection, the development of scar proliferation was examined morphologically both in gross appearance and histology. DNA of the hypertrophic scar was amplified for the identification of tissue source by PCR. Results Development of hypertrophic scar was found in 54 out of all the 60 cases (90.0%). The scars were extremely similar to human hypertrophic scars both in gross appearance and histology. PCR results showed that specific PCR products with the identical size of human skin tissues and human hypertrophic scars were amplified. Conclusion Obvious hypertrophic scars, resulted from the easily established model, are similar to human hypertrophic scars both in gross appearance and histology. The whole progress from wound-healing to scar formation can be studied in the model, so this model is an ideal one for the studies of human hypertrophic scars.

Key words: hypertrophic scar; animal model; nude mouse

长期以来人们一直都在进行建立增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)动物模型的尝试,前期我们将人的全厚皮片移植于裸鼠背部,待皮片存活后给予深Ⅱ度烧伤,创面愈合后观察到了类似人HS的瘢痕增生。但实验中我们偶然观察到,个别没有烧伤的皮片表面逐渐干痂,脱落后也会产生非常明显的瘢痕增生。为此我们进行了以下实验,探讨不进行烧伤而建立HS动物模型的可能性,并对其发生机制进行分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

4~6周龄裸鼠65只,体质量18~23 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,为单纯T淋巴细胞缺陷(BALB/c-nunu品系),雌雄不拘。人的全厚皮肤来源于腹壁整形和巨乳整形术切除的皮肤,术前征得患者同意。

1.2 实验方法

1.2.1 人全厚皮片的制备 将手术切除的人全厚皮肤去除多余的皮下脂肪,修剪成2.0 cm×1.5 cm的皮片,用生理盐水浸透的纱布包裹,放入无菌器械盒内备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000175)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000175)
作者简介:杨东运(1970-),男,河南省桐城县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事增生性瘢痕方面的研究。电话:(023)66765970
收稿日期:2004-01-13;修回日期:2004-03-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2 皮片移植 裸鼠随机分段，1组为模型组，共60只，另1组为对照组，共5只。速眠新肌注麻醉（长春农牧大学兽医研究所，用生理盐水稀释10倍，麻醉剂量为5～10 ml/kg）后，剪除裸鼠背部全层皮肤约2.0 cm×1.5 cm，然后模型组移植人的全厚皮片，对照组移植裸鼠的自体皮片，分别打包加压包扎，术后10 d拆线。观察皮片的变化以及皮片脱落后瘢痕增生的情况，并行组织学检查。

1.2.3 瘢痕大体形态及组织学观察 观察记录皮片干痂脱落后瘢痕增生的大体情况，并切取皮片移植后4个月的瘢痕组织，测量瘢痕厚度，然后石蜡包埋，行HE染色，光镜下观察瘢痕的组织学特点，并与正常皮肤作对照。

1.2.4 用PCR技术对模型瘢痕的DNA进行扩增，并与正常人皮肤和鼠皮肤以及人的HS做对比，以明确瘢痕的组织来源。为防止实验过程中样品DNA污染而产生假阳性结果，实验同时采用阴性控制体系即在PCR反应体系中不加任何DNA作为对照。

2 结果

2.1 移植皮片的变化

拆线时（术后10 d）两组移植皮片均存活良好，色泽红润，质地柔软（图1）。模型组移植的人全厚皮片约15 d后开始变硬，颜色由粉红变褐黄进而变黑，边缘翘起，逐渐脱落，平均39 d后皮片脱落1/2，78 d后皮片完全脱落。对照组皮片长期存活，与周围鼠皮不易区分。

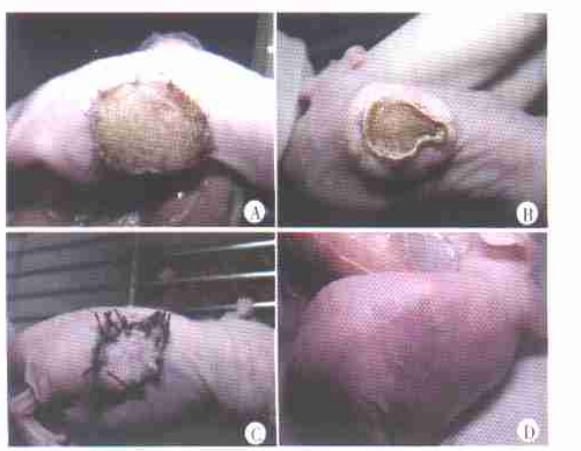


图1 人全厚片移植后**10 d**，色泽红润，质地柔软（**A**），皮片逐渐干痂变硬，色泽加深，边缘脱落，平均**39 d**后脱落**1/2**（**B**），鼠自体全厚片移植后**10 d**，色泽红润，质地柔软（**C**），皮片长期存活，与周围鼠皮不易区分（**D**）

Fig 1 Human skin graft at 10 d after xenotransplantation (A); Human skin graft at 39 d after xenotransplantation (B); Nude mice skin graft at 10 d after autotransplantation (C); Nude mice skin graft at 15 d after autotransplantation (D)

2.2 增生瘢痕的大体特点（图2）

模型组人全厚皮片边缘开始脱落后，局部以瘢痕愈合，瘢痕逐渐隆起，明显高于周围正常组织，且瘢痕充血明显，质地很硬。本组60只裸鼠中有54只出现明显的、持续的瘢痕增生（90.0%），术后5个月左右增生达到高峰，平均最高增生厚度为0.32 cm（最高者达0.51 cm），6个月后部分瘢痕开始萎缩变软，并有不同程度的挛缩，但大部分瘢痕8个月后仍明显高于皮面。瘢痕增生持续时间平均135 d，最长者已达305 d。对照组未见有明显的瘢痕增生。



图2 瘢痕明显高出皮面，且充血明显，质地很硬[皮肤移植后**120 d**时（**A**），瘢痕萎缩变软，并有不同程度的挛缩，但仍明显高于皮面皮肤移植后**7**个月（**B**）]

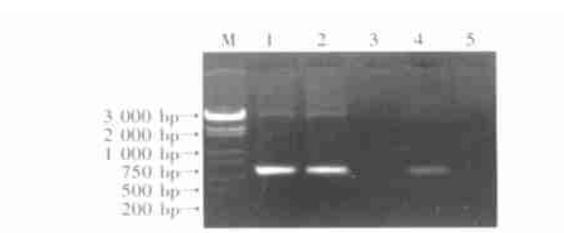
Fig 2 Excessive scar proliferation at 120 d after operation (A), Atrophy of scar at 7 months after operation (B)

2.3 增生瘢痕的组织学特点

模型组增生期真皮层明显增厚，真皮乳头层、网状层界限不清，胶原纤维致密，胶原束排列紊乱，真皮深层呈水平向排列，浅层则呈结节或漩涡状分布，其间细胞成分及微血管增多，细胞核分裂相多见。消退期瘢痕真皮层明显变薄，胶原纤维变细，致密度降低，其间细胞成分和血管数目减少。对照组可见大量的毛囊等皮肤附件，真皮乳头层和网状层界限较明显，胶原纤维排列疏松，细胞成分及血管数目少。

2.4 瘢痕的组织来源（PCR，见图3）

以DNA为模板的PCR检测显示，运用正常人皮肤组织及人HS组织DNA，均可通过扩增出300 bp左右PCR产物，与此同时，应用模型瘢痕组织DNA作模板，同样可以扩增出同等大小的特异性PCR产物，但PCR产物产量明显低于以正常人皮肤组织及人HS组织DNA组，实验结果同时显示裸鼠正常皮肤DNA模板组则未能扩增出相应的PCR产物。



M: Marker; 1: Normal human skin tissue; 2: Human hypertrophic tissue; 3: Normal mouse skin tissue; 4: Hypertrophic tissue of the model; 5: Negative control

图3 PCR结果

Fig 3 PCR results

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

HS 是人类皮肤真皮损伤愈合后出现的一种特有的病理现象, 由于缺少理想的 HS 动物模型[1], 关于 HS 发病机制和临床治疗的研究受到很大限制, 因此, 建立一种理想的 HS 动物模型具有非常重要的意义。

前期工作中我们将人的全厚皮片移植于裸鼠背部, 待皮片存活后给予深 II 度烧伤, 创面愈合后观察到了类似人 HS 的瘢痕增生[2]。但实验中我们又观察到, 个别没有烧伤的皮片表面逐渐干痂, 脱落后会产生更为明显的瘢痕增生。这一现象有两点引起了我们的注意: ①根据现有文献, 裸鼠是 T 细胞免疫缺陷的突变小鼠, 在其体表进行人类皮肤移植不会发生排斥, 移植的人皮片会保持原有特性长期存活[3,4], 而我们在裸鼠背部移植人的全厚皮片后却发生了类似于迟发性异种移植排斥反应(delayed xenotransplantation rejection, DXR)的变化; ②移植的人皮片脱落后, 继发创面产生了类似于人 HS 的瘢痕增生。为此我们进行了进一步的实验, 一方面探讨在裸鼠背部移植人的全厚皮片后不进行烧伤而建立 HS 动物模型的可能性, 并对其发生机制进行分析, 另一方面探讨皮片移植后逐渐干痂脱落的原因。为了叙述的方便, 我们将该模型产生的瘢痕称为 AHS, 即 Analog of hypertrophic scar, 或 Athymic hypertrophic scar, 而人的 HS 成为 HHS, 即 Human hypertrophic scar。

我们移植的人全厚皮片拆线时(术后 10 d)色泽红润, 质地柔软, 说明移植的皮片存活良好。但从移植后约 15 d 开始, 皮片从边缘到中央逐渐变硬, 颜色也由粉红变褐黄进而变黑, 边缘翘起, 逐渐脱落, 平均 39 d 后皮片脱落 1/2 ~ 78 d 后皮片完全脱落, 这一过程与文献[5]报道的异体皮肤移植的排斥反应非常相似, 只是皮片的存活时间延长。对照组裸鼠自体皮肤移植长期存活, 则从反面证明了人皮肤移植于裸鼠后发生了排斥反应。关于人皮肤移植于裸鼠后发生排斥反应的研究我们另有报道, 我们认为, 该排斥反应的发生可能与以下几个方面的原因有关: ①皮肤的抗原性强; ②裸鼠体内并非没有 T 淋巴细胞, 胸腺也并非淋巴细胞发育成熟的唯一场所; ③裸鼠体内非 T 细胞依赖的排斥反应代偿性增强[6]。移植的全厚皮片边缘开始脱落后, 局部以瘢痕愈合, 所产生的 AHS 与 HHS 非常相似, 表现为瘢痕隆起, 明显高处于皮面(平均最高增生厚度为 0.32 cm), 且充血明显, 质地很硬。另外, 该 AHS 还有两个显著的特点: ①发生率高, 模型组 60 只裸鼠中有 54 只出现明显的瘢痕增生, 发生率高达 90.0%; ②增生持续时间长, 瘢痕增生持续时间平均 135 d, 最长者已达 305 d, 这些特点都非常适合于进行 HS 发生机制以及临床防治方面的研究。

AHS 的组织学检查发现, 真皮层明显增厚, 真皮乳头层、网状层界限不清, 胶原纤维致密, 胶原束排列紊乱, 这些足以说明该组织是瘢痕而不是正常皮肤。胶原纤维呈结节或漩涡状分布, 其间细胞成分及微血管增多, 细胞核分裂相多见, 又说明该瘢痕增生活跃。AHS 的上述组织学特点与 HHS 相同, 用其进行 HHS 的相关研究具有很好的代表意义。

以 DNA 为模板的 PCR 检测显示, 应用模型瘢痕组织 DNA 作模板, 可以扩增出与正常人皮肤组织及人 HS 组织 DNA 组同等大小的特异性 PCR 产物, 但 PCR 产物产量明显低于后者, 而裸鼠正常皮肤 DNA 模板组则未能扩增出相应的 PCR 产物。说明模型瘢痕中有人源性 DNA, 但其 PCR 产物产量相对低下, 考虑是因为所加样 DNA 中不单有人源性 DNA 还有鼠源性 DNA。

AHS 产生的原因可能很复杂, 我们推测如下: ①人皮肤表皮及真皮浅层含细胞多, 抗原性强而被排斥, 真皮深层细胞少, 抗原性弱而得以部分存活, 存活的真皮中的成纤维细胞在长期慢性炎症的刺激下功能状态发生改变, 大量增殖并合成大量的胶原等细胞外基质, 从而导致瘢痕的持续增生。②存活的人真皮中的成纤维细胞等分泌某些生物活性因子, 促进鼠的成纤维细胞大量增殖并合成大量的胶原等细胞外基质, 从而导致瘢痕的持续增生。AHS 的机制有待于进一步的深入研究, 明确其机制将有助于揭示 HHS 的防病机制, 并最终为 HHS 临床防治提供帮助。

综上所述, 该模型产生的瘢痕增生明显, 增生持续时间长(平均 135 d), 具有 HHS 的遗传学、组织学特点, 能够观察 HS 形成的全过程, 而且具有较好的可控性和可比性, 是一种较理想的 HS 动物模型。

参考文献:

[1] 杨东运, 李世荣. 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩动物模型的研究现状[J]. 中华整形外科杂志, 2003, 19(1): 60－61.

[2] 杨东运, 李世荣, 李　钢, 等. 新型增生性瘢痕裸鼠动物模型的建立[J]. 中华烧伤杂志, 2004, 20(2): 82－84.

[3] Gilhar A, Etzioni A. The nude mouse model for the study of human skin disorders[J]. Dermatology, 1994, 189(1): 5－8.

[4] Robb E C, Bechmann N, Plessinger R T, *et al*. Storage media and temperature maintain normal anatomy of cadaveric human skin for transplantation to full-thickness skin wounds[J]. J Burn Care Rehabil, 2001, 22(6): 393－396.

[5] 阎文柱, 刘素伟, 周桂芬, 等. 延长异体皮肤存活期的实验研究[J]. 锦州医学院学报, 1998, 19(3): 10－12.

[6] 常雅萍, 王树和, 王　炯, 等. 秘灵王对 Swiss 鼠与裸鼠免疫功能的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(6): 606－608.

(编辑　郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net