DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.013
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)02-0115-03

论著

真皮组织瓣修复口内粘膜缺损后再生上皮角蛋白表达模式的实验研究

孙 远,熊 宇,李慧增 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 观察真皮瓣移植口内后再生上皮角蛋白表达模式的变化。方法 12只成年健康家犬的右侧颊粘膜人为造成缺损,以颈阔肌真皮瓣(PMDF)立即修复,免疫组化染色观察愈合过程中组织瓣表面上皮角蛋白CK10、CK19表达模式的变化。结果 真皮瓣转移后4周,再生上皮基底层及基底上层少量表达CK19;12周后再生上皮基本保持皮肤原有表达模式。结论 真皮瓣转移口内后表面的再生上皮维持表皮原有结构,未发生粘膜化改变。

关键词:真皮组织瓣;口内缺损;角蛋白;表达模式;家犬
中图法分类号:R322.991;R622.1;R781.5 文献标识码:A

Experimental study of the cytokeratin expression pattern of regenerated epithelia of dermal tissue flaps transferred for intraoral mucosal defect reconstruction

SUN Yuan, XIONG Yu, LI Hui-zeng (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes in cytokeratin expression pattern of the regenerated epithelia of dermal tissue flaps transferred for intraoral mucosal reconstruction. Methods Mucosal defects were made on the right buccal mucosa of 12 healthy adult dogs, and then were reconstructed immediately by pedicled platysma myodermal flaps (PMDF). Changes in the expression patterns of CK10 and CK19 of the epithelia on the flaps were observed by immunohistochemical staining. Results Low level of CK19 expression was found in the basal layer and the layers superior to the basal layer of the regenerated epithelia at 4 week after transferring the dermal tissue flaps. The expression pattern of keratin in PMDF was identical to that of the normal skin 12 weeks later. Conclusion The regenerated epithelia remain the original structure without mucosal changes.

Key words: dermal tissue flap; intraoral defect; cytokeratin; expression pattern

口内大面积粘膜组织缺损后临床常采用皮肤组织瓣修复,但因其毛发生长,皮纹存在,皮脂腺、汗腺分泌物等常常可导致患者不适。真皮瓣修复口内粘膜缺损后其表面迅速被一层类似口腔粘膜的再生上皮覆盖,较好地克服了上述缺陷[1]。目前对于真皮瓣表面再生上皮的性质及其是否发生粘膜化改变尚缺乏深入研究。本研究以免疫组化方法观察真皮瓣转移口内后再生上皮角蛋白(cytokerin, CK)表达模式的变化,并探讨其有无粘膜化改变。

1 材料与方法

1.1 动物模型

健康成年家犬12只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量12~15 kg,雌雄不限。3%戊巴比妥钠静脉麻醉(30 mg/kg)。按外科常规备皮、消毒,在右侧口角联合后方颊部沿颈阔肌行走方向分别设计蒂在后方约2.0 cm×2.0 cm的带蒂颈阔肌皮瓣,均匀削去表皮层至点状出血,使成为颈阔肌真皮瓣(platysma myo-dermal flap, PMDF)。右侧颊粘膜人为造成2.0 cm×1.5 cm缺损,深达肌层,以肌真皮瓣经隧道转移至口内立即修复。术中以0.1%甲硝唑100 ml和400×10^4 U青霉素静滴,术后1周内给予软食,并以青霉素80×10^4 U肌注2次/d,甲硝唑0.2 g口服4次/d。

1.2 实验方法

分别于术后1,2,4,8,12,24周观察创面并于远离前一时相点取材部位切取组织瓣与粘膜交界处约0.3 cm×0.3 cm×0.5 cm大小的组织块,立即置于4%多聚甲醛中固定,梯度乙醇脱水后低温石蜡包埋,连续切片,HE染色后光镜下观察。同时切取口角部正常皮肤、粘膜作为正常对照。于各时相点每个动物各选取3张切片,分别以小鼠抗人CK10、CK19(1∶100)单克隆抗体作为一抗,采用SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)行免疫组化染色。以正常皮肤、粘膜作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。光镜下观察。

作者简介:孙 远(1964-),男,北京市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事口腔颌面部战创伤及整形修复方面的研究,发表论文14篇。电话:(023)68754406

收稿日期:2003-06-05;修回日期:2003-12-14

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

2 结果

2.1 大体观察

真皮瓣移植后 1 周可见明显水肿，表面渗出明显，为一层淡黄色渗出物覆盖，其下为鲜红色肉芽组织；2 周时水肿较前消退，创面稍有收缩。大部分创面为一层菲薄、红润的新生上皮所覆盖，仍有较多肉芽组织；4 周时创面完全为再生上皮覆盖，再生上皮明显增厚，表面光滑，无皮纹，色泽红润，质地较周围颊粘膜坚韧，表面有少量毛发生长，创面轻度收缩；8 周以后再生上皮色泽较前变淡，呈粉红色，虽仍有少量毛发生长，但较转移前显著减少（图 1），其中有 1 例真皮瓣表面毛发完全消失；24 周时真皮瓣与周围正常粘膜相似，交界处不明显，但创面收缩明显。最终 PMDF 面积约为转移前的 60％左右。



图 1 PMDF 修复颊粘膜缺损术后 8 周，表面有一层粉红色再生上皮，毛发再生少

Fig 1 Pinkish regenerated epithelia with fewer hair on the surface of PMDF at 8 weeks after operation

2.2 免疫组化观察

正常皮肤角蛋白免疫组化染色示上皮角化层及部分颗粒层 CK10 强阳性表达，CK19 染色阴性；正常颊粘膜上皮基底层散在表达 CK19，而不表达 CK10。



图 2 PMDF 修复术后 8 周再生上皮基底细胞抗 CK19 单抗 IHC 染色可见散在棕黄色阳性染色细胞（→）（SABC× 100）

Fig 2 Some brownish yellow staining cells (anti-CK19) on the basal cells of regenerated epithelia of PMDF at 8 weeks after operation (SABC× 100)

PMDF 转移后，早期炎症反应剧烈，大量中性粒细胞浸润，创面逐渐被一层较薄的上皮组织覆盖，4 周开始创面完全被复层上皮覆盖，再生上皮明显增厚，8 周时基底层及上层少量表达 CK19（图 2）；12 周开始再生上皮表面出现不全角化。免疫组化染色示再生上皮基本保持皮肤原有表达模式：上皮浅层中 CK10 量中度至强阳性染色，表达强度随术后观察时间逐渐加深（图 3），未见 CK19 阳性表达。



图 3 PMDF 修复术后 24 周再生上皮浅层 CK10 强阳性染色（→）（SABC× 100）

Fig 3 Many strong positive (brownish yellow) staining cells (anti-CK10) on the surface of regenerated epithelia of PMDF at 24 weeks after operation (SABC× 100)

3 讨论

真皮瓣代替皮肤组织瓣用于移植修复口内大面积粘膜组织缺损后表面上皮化迅速可靠，再生上皮光滑、红润、毛发生长少，无皮纹，形态和质地接近正常口腔粘膜，较好地克服了皮肤组织瓣移植后毛发活跃生长、皮纹粗糙以及汗腺、皮脂腺分泌物存在等问题，是口腔颌面部大面积组织缺损较理想的修复材料之一[1]。目前对于真皮瓣移植口内后其再生上皮的性质及其是否发生粘膜化改变尚未见深入研究的报道。口腔上皮维持着粘膜组织形态结构的完整性，还具有防御、物质交换及润滑的作用。同时，上皮角朊细胞能分泌细胞因子，在局部防御中起着重要作用[2,3]。因此，研究真皮瓣修复口腔粘膜缺损后愈合过程中上皮成分的变化有重要意义。

角蛋白是一组几乎存在于所有上皮细胞中的中间丝蛋白，是上皮细胞的骨架成分。它具有高度的细胞和组织特异性，随细胞类型和分化程度的不同而表达类型有差异[4]，并可以作为鳞状上皮细胞的分化标志，同时因上皮分化程度、生长环境的变化或处于病理状态下，上皮的角蛋白组可分发生变化。在正常上皮中，其表达模式为：基底层为分子量较小的角蛋白，而棘细

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

胞层、颗粒层至角化层为分子量相对较大的角蛋白。CK10 角化标志蛋白, 其阳性表达 程度随着角化程度的增高而增强; CK19 是单纯上皮标志蛋白, 还可以散在表达于非角化鳞状上皮(如口腔粘膜)的基底层[5]。对比研究转移至口腔内组织瓣表面上皮中角蛋白的表达模式, 有助于了解组织瓣在口腔内, 其周围环境对上皮成分的影响, 可在一定程度上反映上皮细胞动力学及角蛋白代谢的改变, 揭示组织瓣转移至口内后的病理过程。

本研究观察到真皮瓣修复初期角蛋白表达模式似正常颊粘膜, CK10 阴性表达, CK19 散在表达于基底层及基底上层。随修复时间的延长, 其基底层中 CK19 逐渐减弱至消失, 上皮浅层 CK10 中度阳性表达。PMDF 再生上皮在愈合过程中角蛋白表达模式的变化提示: ①愈合初期创缘周围的粘膜上皮向创面爬行迁移, 可能共同参与了再生上皮的形成, 因此再生上皮与口腔粘膜上皮角蛋白表达模式相似; ②角蛋白的表达模式反映了上皮细胞的增殖动力学, 表达 CK19 的上皮细胞具有较强的增殖活力[6]。愈合初期, 基底层细胞增殖活跃, 细胞分化不成熟。随着修复时间的延长, 覆盖创面的再生上皮停止增生, 上皮进一步分化, 上皮浅层 CK10 呈阳性表达。

本研究表明真皮瓣表面的再生上皮仍然保持或接近皮肤的结构特点, 并未发生粘膜化, 但由于其克服了皮肤组织瓣的不足, 外观类似正常口腔粘膜, 是口腔颌面部大面积组织缺损较理想的修复材料之一。

参考文献:

[1] 李慧增, 熊　宇, 孙　远. 真皮瓣修复口内粘膜缺损的实验研究及临床应用[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(8): 921－923.

[2] Healy C M, Thornhill M H. Induction of adhesion molecule expression on blood vessels and keratinocytes in recurrent oral ulceration[J]. J Oral Pathol Med, 1999, 28(1): 5－11.

[3] Fujihashi K, Kato H, van Ginkel F W, *et al*. A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance[J]. Acta Odontol Scand, 2001, 59(5): 301－308.

[4] Izumi K, Terashi H, Marcelo C L, *et al*. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system[J]. J Dent Res, 2000, 79(3): 798－805.

[5] 聂敏海, 李秉琦, 曾光明, 等. 单层上皮细胞角蛋白在口腔粘膜癌变过程中的表达[J]. 华西口腔医学杂志, 1999, 17(3): 208－209.

[6] Kurokawa I, Nishijima S, Kusumot K, *et al*. Trichilemmoma: an immunohistochemical study of cytokeratins[J]. Br J Dermatol, 2003, 149(1): 99－104.

(编辑　张　宁)

(上接 114 页)

3　讨论

输血是大部份手术成功的保证。鉴于同种异体输血可能导致病毒感染, 溶血反应及免疫功能降低等诸多不良影响, 所以自体输血是目前广泛倡导的围手术期输血方式[1-2]。择期手术的患者只要符合自体输血的指征: Hb> 110 g/L; Hct> 0.34, 无严重心、肝、肾、脑功能损害的患者, 年龄在 11～65 岁均可考虑[3]。只要术前采血量控制适当不会对患者产生明显不良影响。本组 60 例自体输血无 1 人发生危险, 只有轻微的血流动力学改变, 但仍在正常值范围内。在采集过程中, 仅有 2 名患者出现轻度不适, 其余均无不良反应。回输时未出现任何输血反应, 52 名患者在围手术期仅靠自体血即可充分补足术中出血, 保证了手术的顺利进行和术后的良好恢复。

自体输血可避免或减少异体输血, 还可避免血型不合引起的溶血和因异体输血产生同种免疫引起的各种输血反应; 防止输血相关疾病的传染, 自体输血具有刺激造血机能的作用, 利于患者康复[4]。一些稀有血型患者(如 RhD 阴性患者), 寻找相同血源有一定困难, 给 RhD 阴性手术病人带来了诸多不便, 为了既能让患者尽快手术又能安全输血, 只要自身身体状态允许, 自体输血不失为上策。本组 60 例自体输血中的 2 名 RhD 阴性患者就得到了及时的手术治疗。在本组 8 名加输异体血的患者中, 有 5 名因距手术日期较近, 而未能充分备血, 如患者病情允许, 预计术中失血量不会特别大时, 手术日期应尽量安排在患者备足预用血后。自体输血尚可节约血源, 减少患者医疗经费支出。是值得推广的一种输血方式。

关键词: 自体输血; 外科手术

中图法分类号: R457.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 汪群英, 吕先萍. 自体输血在 RhD 阴性病人手术中的应用[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(2): 97－98.

[2] 孙成华, 唐中建, 杨海容. 回收式自体输血的临床应用[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(7): 845－846.

[3] 李　明, 赵乃莉. 自身输血近况[J]. 中国输血杂志, 1994, 7(1): 46－49.

[4] 吕　鹏. 围手术期自身输血[M]. 北京: 燕山出版社, 1997. 101－102.

(编辑　郭建秀)

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