DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.029
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
1064 2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)09-1064-03

水化作用对瘢痕增生影响的细胞学研究

樊东力[1],李荟元[2],肖光夏[3] ([1]第三军医大学附属西南医院整形美容外科,重庆 400038;[2]第四军医大学西京医院全军整形外科中心,西安 710032;[3]第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观测水化作用对成纤维细胞的影响,探索其作用机制。方法 以表皮细胞与成纤维细胞分层培养为研究模型,采用放射免疫、免疫组化及图像分析等方法,观测对表皮细胞水化处理后成纤维细胞形态、胶原合成及细胞因子表达的影响。结果 采用水化处理后,成纤维细胞胶原合成、TGF-β1、TGF-β(RI)和α-SM actin阳性表达水平明显下降。结论 通过对表皮细胞的水化,可抑制成纤维细胞的胶原合成。

关键词:水化作用;成纤维细胞;瘢痕
中图法分类号:R322.991;R619.6 文献标识码:A

Cytological study on effects of hydration on hypertrophic scaring *in vitro*

FAN Dong-li, LI Hui-yuan, XIAO Guang-xia (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and the mechanism of hydration on the morphology and functions of cultured fibroblasts. Methods Keratotic epidermic cells and fibroblasts were cocultured in a layered combined cultivation system (Millicell-PCF culture medium, Sigma) as a new cytologic model of hypertrophic scar. After keratotic epidermis was cultured in different media, the changes of fibroblast morphology, collagen metabolism and cytokine expression were observed. Results The expressions of TGF-β1, TGF-β(RI) and α-SM actin were significantly decreased after hydration. Conclusion Collagen synthesis of fibroblasts can be inhibit by hydration on keratotic epidermis.

Key words: hydration; fibroblasts; scar

硅凝胶膜对瘢痕增生具有防治作用,并已在临床广泛应用,但其作用机制尚不十分清楚。许多学者认为水化作用、低分子硅油在其作用机制中可能起着十分重要的作用[1]。增生性瘢痕的成纤维细胞与正常细胞相比,对细胞因子的反应发生变化,细胞大大提高了对TGF-β1、TGF-β(RI)及α-SM actin的表达,并使细胞具有平滑肌细胞样的收缩能力[2]。本实验采用表皮细胞与成纤维细胞分层混合培养的方法,观测水化作用、低分子硅油对增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成、细胞因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 成纤维细胞与表皮细胞的混合培养

细胞培养采用自行设计的方法进行。标本取材于伤后6~12月的增生性瘢痕组织。细胞培养采用Millicell-PCF培养皿(Sigma公司)。该培养皿是由Millicell-PCF半透膜分隔的上下套叠的内外两个培养皿组成,半透膜均匀分布着直径12.0 μm大小微孔,细胞因子及其代谢产物均可通过这些微孔在上下培养皿中交换。上层培养皿培养角化的复层表皮细胞,下层培养皿培养单层的成纤维细胞。

首先,采用组织块培养法获得增生性瘢痕的表皮细胞及成纤维细胞。成纤维细胞用培养瓶进行传代培养二、三代后,液氮保存。表皮细胞待其融合成膜片后用细胞刮勺将其取出,剪成1 mm×1 mm左右大小的细胞膜片移植于Millicell-PCF双层培养皿内层培养皿的Millicell-PCF膜上,37 ℃孵箱内放置10~15 min,使其附壁,加入含15%FCS的DMEM/F12培养液适量,继续培养,待细胞完全覆盖培养皿底部,再培养7~10 d,形成2~3层的复层上皮后,把复层表皮细胞内部培养皿表面的培养液移走,仅在外层培养皿中加入含15%FCS的DMEM/F12培养液,使表皮细胞在空气与培养液的临界面培养7~9 d,每1~2 d更换下层培养液1次,复层表皮细胞即逐步角质化,与上皮相似。

将复苏传代2次的增生性瘢痕成纤维细胞以2×10^5的细胞密度接种在铺有盖玻片的外层培养皿底部,加入含10% FCS的DMEM培养液,每2 d换液1次,将分离培养的表皮细胞与成纤维细胞的培养皿上下叠合在一起,仅在外层培养皿内加入1 ml含10%FCS的DMEM培养液,然后再将上下套叠的内外两个培养皿放入一个35 mm的玻璃培养皿内就形成一个表皮细胞与成纤维细胞复合立体培养系统,即可用于实验。

1.2 实验方法

在增生性瘢痕细胞模型的内层培养皿表面加入Hanks平衡盐水、硅油、液体石蜡等,共分5组,每组8例。①水化组(Hydration, HD组):加入0.8 ml Hanks平衡盐水溶液用于模仿水化环境;②硅油组(Silicone oil, SO组)加入0.8 ml 20 mm^2/s的医用级硅油;③液体石蜡组(Liquid paraffin, LP组)加入0.8ml医用液体石蜡;④空气对照组(Air control, AC组):维持系统的表皮细胞在空气与液体的界面环境下培养;⑤空白对照组(Blank control, BC组):内层培养皿没有表皮细胞,仅下层培养皿有单一的成纤维细胞培养。

1.3 观测指标及方法

1.3.1 细胞形态学观察 采用倒置显微镜观察对比各组实

作者简介:樊东力(1964-),男,湖南省资兴市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事增生性瘢痕防治及生物材料应用等方面的研究。电话:(023)68754695

收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-07-03

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

验因素作用后成纤维细胞形态学变化等。

1.3.2　成纤维细胞内胶原合成测定　　每组 8 皿, 采用[^{3}H]脯氨酸渗入法测定标本的 cpm 值。

1.3.3　培养上清液中Ⅲ型前胶原放免测定　　每组 8 皿, 施加各种实验因素后收集培养上清液, 用 hPCⅢ放射免疫分析试剂盒(重庆市肿瘤研究所)测定各样本 hPCⅢ含量。

1.3.4　免疫组化　　采用 TGF-β_1(工作浓度 1∶200)、TGF-α RI(工作浓度 1∶200)兔抗人多克隆抗体(北京中山公司)和 α-SM actin 兔抗人即用型单克隆抗体(福州迈新公司)对不同组别的细胞玻片(每组 8 例)采用 S-P 免疫组化检测试剂盒(北京中山公司)按说明进行细胞化学染色。空白对照: 用 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行, 其它步骤不变。

1.3.5　图像分析　　采用 Mias 图像分析系统, 每例切片随机观测 3 个视野, 测定出目标区域阳性细胞的面密度, 并求出各组均值。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用华西医科大学 PEMS 医用统计软件包作 t 检验。

2　结果

2.1　细胞形态学观察

各组经过实验因素处理后, 成纤维细胞的形态均无明显差异, 细胞排列呈条索状或网状。

2.2　成纤维细胞内胶原合成测定

HD 组的胶原合成水平最低, 与其它各组相比有显著性差异($P<0.01$)。SO 组及 LP 组的胶原合成也明显低于 AC 组及 BC 组, 各组的胶原合成水平以 BC 组最高, 且明显高于 AC 组, 均有显著性差异($P<0.01$), 见表 1。

表 1　细胞内胶原含量($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Content of collagen in fibroblast($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	cpm
Hydration(HD)	1 294.66±118.76※
Silicone oil(SO)	1 694.17±86.93△
Liquid paraffin(LP)	1 882.5±34.29△
Air control(AC)	2 497.25±135.04△
Blank control(BC)	3 159.58±69.93☆

※: $P<0.01$ *vs* other groups; △: $P<0.01$ *vs* BC; ☆: $P<0.01$ *vs* AC

2.3　培养上清液中Ⅲ型前胶原放免测定

各组上清液 hPCⅢ含量以 HD 组最低, BC 组最高, 与其它各组对比均有显著性差异, SO 组及 LP 组的 hPCⅢ含量也明显低于 AC 组及 BC 组, AC 组的 hPCⅢ含量还较 BC 组降低, 均有显著性差异($P<0.01$), 见表 2。

表 2　培养上清液 **hPCⅢ**含量测定($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The content of hPCⅢ in culture media($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	The content of hPCⅢ(μg/L)
HD	171.09±15.11※
SO	216.79±15.29△
LP	215.58±14.53△
AC	242.88±15.75☆
BC	318.08±13.26

※: $P<0.01$ *vs* other groups; △: $P<0.01$ *vs* BC、AC; ☆: $P<0.01$ *vs* BC; Abbrevations same as in Tab 1

2.4　免疫组化

各组中培养成纤维细胞均显示 TGF-β_1、TGF-β(RI)和 α-SM actin 阳性表达。在 HD 组中成纤维细胞 TGF-β1、TGF-α(RI)阳性细胞表达较其它各组明显减弱, 而 BC 组表达最强, SO 组与 LP 组的阳性细胞表达无明显差异, 但较 AC 组、BC 组明显减少。α-SM actin 阳性表达 HD 组、SO 组、LP 组较 BC 组明显降低($P<0.01$), 图像分析结果如表 3 所示。

表 3　各组细胞免疫组化阳性细胞的面密度($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Density of area of immunohistochemical positive cells($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Density of area		
	TGF-β_1	TGF-β(RI)	α-SM actin
HD	0.0981±0.0135※	0.0662±0.0062※	0.0162±0.0037△
SO	0.1478±0.0209△	0.1203±0.0244△	0.0155±0.0038△
LP	0.1313±0.0239△	0.1104±0.0173△	0.0196±0.0045△
AC	0.2161±0.0384☆	0.1410±0.0215☆	0.0297±0.0045☆
BC	0.3028±0.0406	0.2203±0.0335	0.0422±0.0079

※: $P<0.01$ *vs* other groups; △: $P<0.01$ *vs* BC、AC, ☆: $P<0.01$ *vs* BC; Abbrevations same as in Tab 1

3　讨论

成纤维细胞在合成和调整细胞外基质成分中起着十分重要的作用, 在不同的生理及病理状态下, 因组织内微环境的变化而表现出不同的结构和功能, 即异质性(Heterogeneity)[4,5]。增生性瘢痕的成纤维细胞与正常细胞相比, 对细胞因子的反应发生变化, 细胞大大提高了对 TGF-β_1 的反应敏感性, 细胞的形态也发生改变, 由多边形变成长梭形, 并使 α-平滑肌肌动蛋白的表达增高, 具有平滑肌细胞样的收缩能力[5]。

本研究发现, 通过对表皮细胞进行水化后, 成纤维细胞 TGF-β_1、TGF-β(RI)表达阳性细胞数量较其他各组明显减少, 没有与表皮细胞共同培养的空白对照组的表达最强, 硅油组、液体石蜡组表达无明显差别, 但较空白对照组降低。这一结果表明通过对表皮细胞的水化可以强化对成纤维细胞 TGF-β_1、TGF-β(RI)表达下调的影响。硅油、液体石蜡等对表皮细胞、成纤维细胞的影响无明显区别, 则说明在硅凝胶膜对瘢痕影响过程中, 是水化作用发挥着关键性的作用, 而非硅胶膜中的硅酮物质在瘢痕的防治过程中发挥作用。在本研究中发现没有与表皮细胞共同培养的成纤维细胞的 TGF-β_1、TGF-β(RI)表达较其他各组明显增强, 这表明: 表皮细胞能够抑制成纤维细胞对 TGF-β_1、TGF-β(RI)的表达, 而 TGF-β(RI)的表达的减少则表明细胞对 TGF-β_1 的反应敏感性的降低。

通过水化处理后, 成纤维细胞内胶原合成水平降低, Ⅲ型前胶原分泌减少, 这与成纤维细胞 TGF-β_1、TGF-β(RI)的表达减少密切相关, 提示: 水化作用对成纤维细胞的影响有可能是通过对细胞因子表达的调控来实现的。

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

目前研究认为瘢痕的挛缩与瘢痕内的肌成纤维细胞的数量有密切关系,肌成纤维细胞是导致瘢痕挛缩的主要动力细胞[6]。在本研究中,表皮细胞与成纤维细胞共同培养的各组的α-SM actin表达明显低于成纤维细胞单纯培养组,表明表皮细胞具有抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞的表型转化的作用。

参考文献:

[1] Poston J. The use of silicone gel sheeting in the management of hypertrophic and keloid scars[J]. J Wound Care, 2000, 9(1): 10-16.
[2] Younai S, Venters G, Vu S, *et al*. Role of growth factors in scar contraction: an *in vitro* analysis[J]. Ann Plast Surg, 1996, 36(5): 495-501.
[3] Garner W L, Karmiol S, Rodriguez J L, *et al*. Phenotypic differences in cytokine responsiveness of hypertrophic scar versus normal dermal fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 1993, 101(6): 875-879.
[4] Lee H G, Eun H C. Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: implication to wound healing[J]. J Dermatol Sci, 1999, 21(3): 176-182.
[5] Younai S, Venters G, Vu S, *et al*. Role of growth factors in scar contraction: an *in vitro* analysis[J]. Ann Plast Surg, 1996, 36(5): 495-501.
[6] 李永林. 瘢痕挛缩机理的研究和生物学治疗进展[J]. 国外医学:创伤与外科基本问题分册, 1997, 18(1): 7-9.

(编辑 冷怀明)

《军事医学科学院院刊》征稿、征订启事

《军事医学科学院院刊》是由军事医学科学院主办的国内外公开发行的综合性医学学术类期刊。本刊以刊登军事医学及相关学科的创新性学术论著为主,选登部分研究简报、技术方法及有一定指导意义的文献综述。内容涉及放射医学、微生物学与流行病学、药理学与毒理学、药物化学、基础医学、卫生学与环境医学、卫生装备、临床医学及生物高新技术等领域。欢迎广大从事医学科研、教学及临床医疗工作者积极投稿并订阅(详细稿约请参见:http://www.jsyxkxyyk.periodicals.net.cn)。

本刊已被国家科委中国科技信息所确定为中国科技论文统计源期刊,被中国科技引文数据库确定为核心期刊,被北京大学图书馆主编的《中文核心期刊要目总览》第1、第2版及2000年版确定为医学综合类核心期刊。本刊已被国内大多数检索性期刊收录,并被美国化学文摘数据库(CA)收录。

本刊为双月刊,大16开,80页,铜版纸印刷,每期订价10元。邮发代号18-106。

地址:北京太平路27号一所《院刊》编辑部 邮编:100850
电话:(010)66931131 E-mail:yuankan@nic.bmi.ac.cn

《生命科学》征稿、征订启事

《生命科学》1988年创刊,原刊名为《生物科学信息》,内部发行;1992年更名为《生命科学》,公开发行,ISSN 1004-0374,CN31-1600/Q,大16开,64页,双月刊,定价:9.00元,邮发代号:4-628。本刊是由国家自然科学基金委员会生命科学部、中国科学院生命科学与生物技术局、中国科学院生物学部、中国科学院上海生命科学研究院共同主办的全国性、公开发行的学术性综合类期刊,中国科学院上海生命科学研究院出版。

《生命科学》是以评述、综述、研究简讯(动态)等形式报道国内外生命科学研究的发展趋势、学术动态和研究成果,重点报道生命科学范围内的评述性或综述性文章和国家自然科学基金资助的与生命科学有关的项目介绍、研究进展、管理经验和问题咨询,同时也报道该领域的研究动态、研究成果、科学家介绍、研究机构介绍和书评等内容。特别是每年的第6期全文刊载国家自然科学基金委员会生命科学部当年资助项目。

《生命科学》荣获第二届上海市优秀科技期刊评比一等奖。被中国学术期刊(光盘版)、中国期刊网、中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国生物学文献数据库及中国生物医学文献光盘数据库收录。欢迎订阅、欢迎投稿、欢迎发布广告。

地址:上海市岳阳路319号 邮编:200031
电话:(8621)64336650-2056 传真:(8621)64375762
E-mail:cbls@mail.slas.ac.cn 网址:http://www.slas.ac.cn

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