DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.016


# 肌成纤维细胞凋亡与肥厚性瘢痕消退的关系

汪 琴* 吴宗耀 (第三军医大学附属西南医院康复理疗科) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨肥厚性瘢痕消退与细胞凋亡的关系。方法: 应用光镜、电镜、TUNEL技术和免疫组织化学染色对61例肥厚性瘢痕、20例非肥厚性瘢痕和8例正常皮肤进行细胞凋亡, α-SM-actin表达的分析。结果: 肥厚性瘢痕中大多数肌成纤维细胞表达α-SM actin;肥厚性瘢痕中存在细胞凋亡现象,肥厚性瘢痕消退过程中成纤维细胞数的减少与肌成纤维细胞凋亡增加相一致。结论: 细胞凋亡现象是肥厚性瘢痕退化过程中肌成纤维细胞减少的主要原因。促进肌成纤维细胞凋亡可能是肥厚性瘢痕治疗的新途径。

关键词 肥大性瘢痕;成纤维细胞;细胞凋亡
中图法分类号 R619.6

烧伤后肥厚性瘢痕是临床常见的的难治病症,一般要经历增厚、静止、消退三个阶段。其消退的机制不明。过去认为肥厚性瘢痕中成纤维细胞及其产物胶原纤维明显增多,认为此类瘢痕是增殖性瘢痕,因此主要从胶原代谢方面进行研究,试图阻止胶原的合成,但结果不甚满意。本研究通过对肥厚性瘢痕不同时期的细胞凋亡进行检测和比较,试图从成纤维细胞凋亡入手予以分析,以探讨肥厚性瘢痕消退的机制,并为其治疗开辟一条新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本

肥厚性瘢痕61例,取自本院烧伤整形患者,年龄2~40岁,平均23.13岁,参照文献[1]分为增厚期、成熟期各24例,消退期13例。病程为烧伤后4月~10年,各期平均病程分别为增厚期11.83个月,成熟期22.75个月,消退期39.85个月。同时选择20例非肥厚性瘢痕,取自骨科和普外科二次手术患者,年龄为3~38岁,平均25岁,其中早期(1.5个月内)瘢痕10例;晚期(1.5~3月)瘢痕10例。正常皮肤8例,取自乳癌手术患者胸部皮肤。以上标本均经10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片,厚度3~5μm。

另取4例肥厚性瘢痕(增厚期和成熟期各2例)立即取材,2.5%戊二醛固定,常规电镜制样,荷兰 PHILIPS透射电镜观察。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 染色方法

1.2.1.1 细胞凋亡检测(TUNEL法)[2] 切片脱蜡至水,5μg/ml蛋白酶K消化15 min,3%过氧化氢孵育10 min,滴加TUNEL反应液(Ⅰ、Ⅱ液以1:9混匀),孵育90 min,加POD转换剂,孵育30 min,DAB显色。细胞核呈棕色者为阳性。

1.2.1.2 免疫组化染色(S-P法) 一抗为抗α平滑肌肌动蛋白(α-SM actin)单克隆抗体(美国 Maxim公司产品),S-P试剂盒为 Dako公司产品,常规免疫组化染色,DAB显色。胞浆为棕色者即为阳性。

1.2.1.3 细胞凋亡与免疫组化双重染色 先行 TUNEL技术检测细胞凋亡,DAB显色;再作α-SM actin单克隆抗体免疫组化染色,AEC显色。结果显示凋亡细胞胞核呈棕色,α-SM actin阳性细胞胞浆着红色。以上3种染色中,均设阳性和阴性对照。

#### 1.2.2 结果判定

1.2.2.1 细胞凋亡 在高倍视野下随机计数1000个细胞中凋亡阳性细胞数,并求出凋亡阳性细胞数/100个细胞(即凋亡阳性细胞指数)。

1.2.2.2 免疫组化 根据阳性细胞所占面积和染色强度,分别记为: (-)无明显阳性反应细胞; (+)阳性细胞的面积<25%,呈浅棕色; (++)阳性细胞面积为25%~50%,呈棕色; (+++)阳性细胞面积>50%,呈深棕色。

### 1.3 统计学分析

计数资料采用 $\chi^2$检验,计量资料采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞凋亡检测,见表1

光镜下观察,在肥厚性瘢痕和非肥厚性瘢痕的表皮和真皮网状层中均可见胞核呈棕色着色的凋亡细胞,真皮层内阳性细胞主要为成纤维细胞,见图1。经观察计数显示,肥厚性瘢痕增厚期组凋亡阳性细胞数显著低于成熟期组和非肥厚性瘢痕早期组($P<0.01$),而肥厚性瘢痕成熟期组与非肥厚性瘢痕早期组相比凋亡阳性细胞数相差不显著($P>0.05$)。肥厚性瘢痕消退期组和非肥厚性瘢痕后期组成纤维细胞很少,主要表现为纤维化,两组成纤维细胞凋亡阳性细胞数明显减少。正常皮肤细胞凋亡仅见于表皮浅层,真皮成纤维细胞未见凋亡阳性细胞。

* 汪 琴 女,33岁,主治医师,讲师,硕士

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

表 1　肥厚性瘢痕与非肥厚性瘢痕凋亡阳性细胞数

**Tab 1　Apoptosis cell counts in HS and NHS**

| Group | *n* | Apoptosis cells | $\bar{x}\pm s$ |
|---|---|---|---|
| HSP | 24 | 1.0~ 14.8 | 6.64± 4.43 |
| HSM | 24 | 15.4~ 35.6 | 25.62± 5.70** |
| HSR | 13 | 1.0~ 3.6 | 2.10± 0.83** |
| NHSE | 10 | 13.8~ 36.6 | 22.18± 8.63** |
| NHSL | 10 | 1.0~ 3.2 | 1.80± 0.77** |

HS(P/M/R): hypertrophic scar (proliferation/maturity/regression); NHS(E/L): non-hypertrophic scar (early/late); ** : $P<0.01$ *vs* HSP

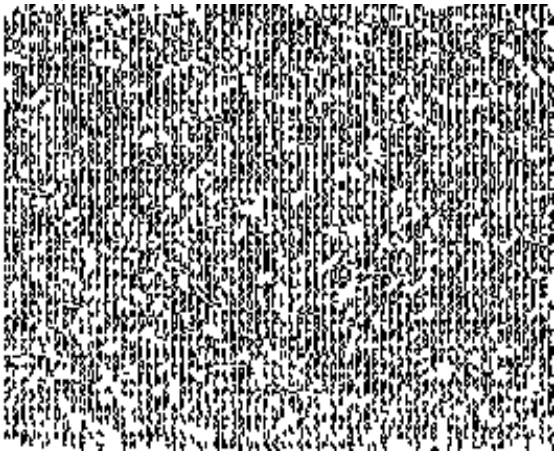


图 1　肥厚性瘢痕成熟期,见大量凋亡的成纤维细胞和血管内皮细胞　(TUNEL× 200)

**Fig 1　A lot of apoptosis cells of fibroblasts and endothelial cells in HSM**　(TUNEL× 200)

## 2.2　超微结构观察

肥厚性瘢痕中肌成纤维细胞呈长梭型,核膜内陷呈锯齿状,粗面内质网较丰富,部分扩张,见图 2 胞质内可见较多的肌微丝束,束内可见密体。个别细胞可见胞核染色质凝聚,体积变小,胞质内偶见凋亡小体。

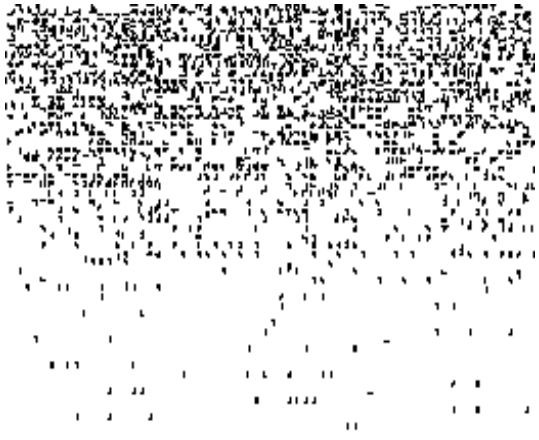


图 2　肥厚性瘢痕肌成纤维细胞胞核(**N**)呈锯齿状,核膜皱褶,胞质内见大量粗面内质网(**RER**)　(TEM× 4000)

**Fig 2　Myofibroblast which show serrated nuclear, puckered membrane and a lot of RER in cytoplasm in HS**　(TEM× 4000)

## 2.3　成纤维细胞平均细胞密度计数

在高倍视野下对 HE染色切片上成纤维细胞计数,每例观测 3个高倍视野(High power field, HPF),计算每例切片成纤维细胞数/HPF,求出各组均值。肥厚性瘢痕中,随着增厚期→成熟期→消退期的变化,其成纤维细胞数逐渐减少,经统计学处理,三期间成纤维细胞平均细胞密度均值相差非常显著($P<0.01$)。对肥厚性瘢痕增厚期和成熟期成纤维细胞凋亡阳性细胞数与其平均细胞密度进行相关性分析,显示两者呈负相关,相关系数 $r=-0.814$, $P<0.01$。肥厚性瘢痕与非肥厚性瘢痕、正常皮肤平均细胞密度比较见表 2。

## 2.4　α-SM actin染色

肥厚性瘢痕 α-SM actin染色显示血管平滑肌细胞均呈强阳性表达,肌成纤维细胞呈++和+++表达,见图 3。细胞凋亡与免疫组化双重染色显示凋亡标记阳性的肌成纤维细胞的胞浆均有不同程度的 α-SM actin表达。

表 2　肥厚性瘢痕与非肥厚性瘢痕、正常皮肤成纤维细胞细胞密度比较

**Tab 2　The fibroblast densities in HS, NHS and NS**

| Group | *n* | HPFs | Fibroblast counts | $\bar{x}\pm s$ |
|---|---|---|---|---|
| HSP | 24 | 72 | 194~ 360 | 289.45± 40.53 |
| HSM | 24 | 72 | 179~ 316 | 217.75± 30.15** |
| NHSE | 10 | 30 | 131~ 210 | 154.30± 24.43**## |
| HSR | 13 | 39 | 31~ 118 | 68.23± 24.44**##△△ |
| NHSL | 10 | 30 | 28~ 68 | 42.20± 11.25**##△△ |
| NS | 8 | 24 | 25~ 51 | 41.25± 8.83**## |

HS(P/M/R): hypertrophic scar (proliferation/maturity/regression); NHS(E/L): non-hypertrophic scar (early/late); NS(normal scar) ** : $P<0.01$ *vs* HSP; ## : $P<0.01$ *vs* HSM; △△: $P<0.01$ *vs* NHSE



图 3　肥厚性瘢痕增生期,显示大量成纤维细胞和血管平滑肌细胞 α-**SM actin**强阳性表达　(S-P× 200)

**Fig 3　A lot of fibroblasts and smooth muscle cells showed strong positive expression with α-SM actin in HSP**　(S-P× 200)

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

## 3 讨论

### 3.1 肌成纤维细胞是肥厚性瘢痕收缩致残的主要原因

肥厚性瘢痕的危害一方面是影响美容,另一方面是缺乏弹性,其三是收缩而致挛缩。肥厚性瘢痕的基本成分是成纤维细胞和排列紊乱的胶原纤维而非弹力纤维,因而僵硬,缺乏弹性,这是一致的认识。关于其收缩性则研究较少。70年代以来,人们注意到在正常伤口愈合过程中约70%的成纤维细胞分化为表达α-SM actin的肌成纤维细胞,其活动周期与伤口胶原合成和肉芽组织收缩过程一致,认为肌成纤维细胞是正常伤口收缩的原因[3]。本研究经电镜观察证实肥厚性瘢痕成纤维细胞中含有肌微丝,免疫组化染色也显示成纤维细胞胞浆呈强阳性的α-SM actin表达,提示肥厚性瘢痕中多数成纤维细胞亦分化为具有收缩能力的肌成纤维细胞,肌成纤维细胞是肥厚性瘢痕的主要细胞成分,因此作者认为肥厚性瘢痕致关节挛缩也是肌成纤维细胞作用的结果。

### 3.2 肌成纤维细胞凋亡不足和增加是肥厚性瘢痕产生和消退的原因

肥厚性瘢痕具有消退的趋势,但其机制仍不清楚。本研究通过细胞凋亡和α-SM actin免疫组化双重染色,显示肥厚性瘢痕中凋亡阳性的成纤维细胞均有不同程度的α-SM actin表达,提示肌成纤维细胞不仅是成纤维细胞的具有收缩表型的细胞,也是成纤维细胞的终末分化细胞,最后通过凋亡而消失。此外,本研究还发现,肥厚性瘢痕增厚期成纤维细胞数显著高于非肥厚性瘢痕早期组,但凋亡细胞数显著低于后者,因此成纤维细胞凋亡减少可能是肥厚性瘢痕增厚期成纤维细胞增加的原因。肥厚性瘢痕成熟期肌成纤维细胞凋亡阳性细胞数较增厚期显著增加,与成纤维细胞总数的减少成负相关,说明肥厚性瘢痕成熟过程中成纤维细胞数的减少乃由肌成纤维细胞凋亡所引起,其消退可能与肌成纤维细胞凋亡增多有关。

正常伤口愈合中也有类似的过程和发现。在正常伤口愈合并发展为瘢痕时,肉芽组织中细胞数的减少,尤其是肌成纤维细胞减少是创伤愈合的自然过程。Darby等[4]发现在伤口愈合的后期,许多肌成纤维细胞显示出与细胞凋亡一致的改变,并提出这种类型的细胞死亡可能是肌成纤维细胞消失的途径。Desmouliere等[5]的研究结果证实,当伤口愈合时表现为凋亡的肌成纤维细胞数目增加,支持上述假设,即肌成纤维细胞凋亡是肉芽组织演变成瘢痕的机制,并且认为在伤口愈合过程中凋亡现象的调节在瘢痕的形成和发展成病理性瘢痕时是重要的因素。因为当肉芽组织细胞没有被消灭时将会发展成病理性瘢痕。也有作者通过电镜检查推测肥厚性瘢痕成熟过程中成纤维细胞可能通过凋亡的方式而减少[6]。不过他们都仅仅是推测而已。

### 3.3 促进肌成纤维细胞凋亡对治疗肥厚性瘢痕的重要意义

肌成纤维细胞不仅导致肥厚性瘢痕挛缩的发生,亦是产生胶原的主要细胞之一[7]。本研究通过电镜观察证实肌成纤维细胞含有丰富的粗面内质网,说明它具有活跃的合成功能,可促进肥厚性瘢痕中胶原的积累。既然肌成纤维细胞凋亡的不足和增加是肥厚性瘢痕形成和消退的机制。那么采用一些方法促进肌成纤维细胞凋亡,减少肥厚性瘢痕肌成纤维细胞的过度积累,将降低胶原的产生,从而加速肥厚性瘢痕的消退过程,可能是治疗肥厚性瘢痕的一条新途径。

## 参考文献


1 Linares H A, Kischer C W, Dobrkovsky M, *et al*. The histiotypic organization of the hypertrophic scar in humans. J Invest Dermatol, 1972, 59(4): 323

2 张 开. TUNEL法细胞凋亡的组织化学鉴定法.日本医学介绍, 1995, 16(10): 469

3 Skalli O, Gabbiani G. The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive disease. In Clark RAF, Henson PM, ed. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Publishing Corporation, 1988. 373~402

4 Darby I, Skalli O, Gabbiani G. α-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Lab Invest, 1990, 63(1): 21

5 Desmouliere A, Redard M, Darby I, *et al*. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. Am J Pathol, 1995, 146(1): 56

6 Kischer C W. Contributions of electron microscopy to the study of the hypertrophic scar and related lesions. Scanning Microsc, 1993, 7(3): 921-930, discussion 930-931

7 Zhang K, Rekhter M D, Gordon D, *et al*. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. Am J Pathol, 1994, 145(1): 114


(收稿: 1998-09-05;修回: 1998-12-21)

(编辑 仇玉福)

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

# Relationship between apoptosis of myofibroblasts and regression of hypertrophic scar

Wang Qin, Wu Zonyao (Department of Rehabilitation Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

**Abstract** Objectve: To study the relationship between the regression of hypertrophic scar and the apoptosis of myofibroblasts. Methods: The counts of apoptotic cells and the expression of α-SM-actin were determined in 61 cases of hypertrophic scar, 20 cases of non-hypertrophic scar and 8 cases of normal skin with TUNEL technique, immunohistochemistry and electron microscopy. Results: α-SM-actin was expressed in the fibroblasts of hypertrophic scars and apoptosis was present in hypertrophic scars. The decrease of fibroblasts during the regresson of hypertrophic scars may be due to myofibroblastic apoptosis. Conclusion: Our data suggest that apoptosis might be the main cause to result in the decrease of fibroblasts in the regression of hypertrophic scars. Enhancement of myofibroblastic apoptosis might be a new method to treat hypertrophic scar.

**Key words** hypertrophic cicatrix; fibroblast; apoptosis

# 下颌骨骨髓瘤1例报告

# One case of myeloma of mandible

史文进* 杨 军 (第三军医大学附属西南医院口腔科) 重庆, 400038

下颌骨骨髓瘤(Myeloma)罕见。我科1997年5月曾收治1例,现报告如下。

## 1 临床资料

患者,女,67岁,退休护师。入院前15个月,患者因左下牙疼痛、左下颌区肿痛,在当地县医院作局部穿刺涂片,可疑大量肿瘤细胞和炎症细胞,经抗感染治疗,牙痛消失,左下颌区遗有一蚕豆大包块,质硬,无痛,未进一步治疗。10个月前,包块逐渐增大,无痛,在市医院作活检,病理诊断为"左下颌骨 Myeloma"。入院查,一般情况可,心肺腹无明显异常。专科检查见左下颌面部膨隆,表皮无红肿破溃,皮温不高,扪及一大小约9 cm× 8 cm × 6 cm包块,质硬,与下颌骨融合,前界达左口角,后界达下颌升枝后缘,上达颧弓下缘,下界超过左下颌骨下缘,包块几乎波及半侧下颌骨,口腔内粘膜完整,咬合关系基本正常,无松动牙,颌下淋巴结不大。查血常规见 WBC 2.8× $10^9$/L, RBC 3.2 × $10^{12}$/L, HGB 112 g/L, PLT 30× $10^9$/L,分类: N76%, L23%。查血见 IgG 5.62 G/L, IgA 0.07 G/L, IgM 0.23 G/L,血钙2.32 mmol/L。下颌骨 CT及平片显示:左侧下颌骨广泛性溶骨性骨质破坏。枕骨及1~ 3椎体均有明显骨质破坏。胸片示锁骨骨质疏松,右第8肋骨骨折。经病理科读片会诊,确诊为左下颌骨 Myeloma伴颈椎转移,患者出院化疗。

## 2 讨论

Myeloma是最常见的全身性骨肿瘤,并作为 B细胞肿瘤而来源于骨髓的浆细胞,好发于椎体、肋骨、骨盆、颅盖骨、股骨、肱骨[1~3],50~ 70岁男性多见,分为孤立性、多发性、孤立性髓外 Myeloma三种类型。临床表现为逐渐加强的骨疼痛,具特征性的是血浆内免疫球蛋白增多、骨变形,自发性骨折及神经症状,约10%出现血钙过多症或/和全身性淀粉样质沉积症。X线呈鼠咬状侵蚀。肉眼观病变骨髓腔内充满玻璃样质软、部分深红、部分灰白的肿瘤组织。对于孤立性 Myeloma,可手术切除,预后稍好,几年后播散;对于多发性 Myeloma,则联合化疗,预后不良。该病例经穿刺涂片及活检诊为左下颌骨 Myeloma 入院前曾行化疗,基本无效,遂要求手术治疗。入院后经全面查体,发现颈椎、锁骨、肋骨尚有多处病变,已失去手术机会。患者免疫球蛋白显著低于正常值,血钙正常,与文献[4]报道相反。

关键词 骨髓瘤;下颌骨
中图法分类号 R739.8

## 参考文献

1 [德]U. N.里德, H.魏 纳著.武忠弼 主译.病理学总论与各论.北京:人民卫生出版社,1989. 1012~ 1013
2 Rouwerberg J J, Simons A J. Cases report 383. Skelet Radiol, 1986, 15(5): 487
3 赵 暹,陈银霞. 35例骨髓瘤临床影像学分析.现代医用影像学,1997, 6(2): 51
4 徐 琼,尹秀玲,周伟华,等. 152例多发性骨髓瘤 M蛋白分型.中华血液学杂志,1997, 18(4): 217

(收稿: 1998-11-11;修回: 1999-02-01)
(编辑 王 红)

* 史文进,男,32岁,主治医师,讲师,硕士

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