DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.018

重组人α-肿瘤坏死因子对移植至裸鼠后的增生性瘢痕的影响

谭文锋* (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,400038
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: 观察重组人α-肿瘤坏死因子(rhuTNF-α)对烧伤后增生性瘢痕组织胶原含量及组织形态学的影响。方法: 12只 BALB/c裸鼠,于背部体表移植人体烧伤后增生性瘢痕组织(2 cm× 2 cm)成活后,随机分为试验组及对照组。试验组在增生性瘢痕组织内注射生理盐水溶解的 rhuTNF-α 0.1 ml(500 ng/ml),每周 3次,对照组同法注射生理盐水,3周后测定瘢痕组织中胶原、羟脯氨酸及酸性粘多糖含量,同时观察组织形态学变化。结果: 局部注射 rhuTNF-α 后,增生性瘢痕组织中胶原、羟脯氨酸及酸性粘多糖含量显著降低。增生性瘢痕组织变平、缩小,胶原结节明显减少或消失。成纤维细胞粗面内质网显著减少,无扩张。结论: rhuTNF-α 能显著减少增生性瘢痕组织中胶原沉积,在增生性瘢痕治疗中可能有潜在应用价值。

关键词 肿瘤坏死因子-α;增生性瘢痕;灼伤 并发症
中图法分类号 R619.6

增生性瘢痕是人类特有的病理现象。烧伤后增生性瘢痕是大面积深度烧伤患者后期整形和功能康复治疗中面临的难题。迄今仍没有一种对不同部位、不同大小的增生性瘢痕都有确切疗效而又简便易行的满意疗法[1]。TNF-α 对体外培养的真皮成纤维细胞胶原代谢有显著影响。近年来,国外报道 TNF-α 与增生性瘢痕密切相关。TNF-α 对增生性瘢痕的影响的在体研究,迄今未见报道。本实验借助增生性瘢痕动物模型[2],探讨重组人α-肿瘤坏死因子(Recombinant human tumour necrosis factor-α, rhuTNF-α)局部应用对增生性瘢痕的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备与分组

单纯 T淋巴细胞缺陷(BALB/c-nu/nu品系)的裸鼠 16只,由国家医药管理局四川抗菌素工业研究所实验动物中心提供(实验动物合格证: 川实动管质第 95号)。雌雄不拘,鼠龄 2~3个月,体重 18~24 g。所有移植用增生性瘢痕均取自烧伤后整形患者,根据临床表现及病理观察证实为增生性瘢痕。本实验共选 5例瘢痕标本,平均形成时间为 6.8个月。将人体增生性瘢痕修剪成约 2 cm× 2 cm大小,厚度约 0.25~0.3 cm的表皮完整的组织块,移植于裸鼠上背部体表。手术方法参考文献[2,3]略作改进。本实验共移植成活裸鼠 12只,将同患者同部位的瘢痕移植成活的同批裸鼠,随机分成两组: 试验组和对照组各 6只。

1.2 药品及使用方法

采用第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室提供的 rhuTNF-α 冻干粉剂,每支 2万单位,比活性为 2×10⁷U/mg, -20℃保存。试验组每次注射 0.1 ml(500 ng/ml) rhuTNF-α,每周 3次,共 3周。每次注射 1个点,四个边轮流注射。对照组同法注射 0.1ml生理盐水。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 胶原含量测定[4] VG染色切片上,胶原纤维呈红色,肌肉呈黄色,细胞核呈蓝黑色。用空军工程研究所研制的 CMIA007型真彩色医学图像分析仪测定胶原含量。测试物镜放大 20倍情况下,分析仪可选择性计算测量框内胶原的面密度(阳性着色物面积占测量框面积之比),反映胶原含量。每张切片随机测试 5个区域,取均值。

1.3.2 羟脯氨酸含量测定[5] 采用美国 Beckman公司生产的高效氨基酸分析仪 6300黄金系统分离测定羟脯氨酸含量。

1.3.3 酸性粘多糖含量测定 AB染色切片上,酸性粘多糖呈蓝绿色。用图像分析仪测定酸性粘多糖含量,其测试方法与胶原含量测定相同。

1.3.4 形态学观察 观察术后瘢痕成活情况,用药 3周后取瘢痕组织标本,行 HE、VG和 AB染色,在光镜下观察组织结构变化,电镜下观察成纤维细胞形态及细胞器。

1.4 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 Student's t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 rhuTNF-α 对增生性瘢痕组织的影响见表 1

2.2 形态学观察

2.2.1 移植成活情况 移植裸鼠 16例,存活 12例。其中麻醉过深死亡 2例,包扎过紧呼吸抑制死亡 1例,感染致死 1例。

2.2.2 肉眼观察 存活瘢痕外观呈淡红或粉红色,有光泽和一定弹性;瘢痕四周与裸鼠皮肤连接好,无皱缩或翘起;高出周围皮肤 0.2~0.25 cm,表面无破溃。对照组: 3周后瘢痕颜色、大小、高度无明显变化。试验组: 3周后瘢痕颜色变白,面积缩小、高度降低均很明显。

2.2.3 光镜观察 对照组: 瘢痕表皮平薄,真皮层含大量胶

* 谭文锋,男,31岁,住院医师,博士研究生

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

原纤维束及成纤维细胞。胶原排列紊乱,呈结节或涡轮状,见图 1。可见少量单核细胞及淋巴细胞存在。真皮层肥厚。皮肤附件消失。微血管较多,呈闭塞或半闭塞状。试验组:表皮层部分角化不全。真皮层变薄,胶原结节或涡轮明显减少或消失,胶原纤维束排列与表皮趋于平行,见图 2。仍可见较多成纤维细胞。微血管无明显闭塞。

2.2.4　电镜观察　　对照组:瘢痕组织透射电子显微镜观察,可见成纤维细胞较多,外形不规则,有放射状伪足或星形凸起;核膜内陷呈锯齿状,胞体大,胞质量多,粗面内质网丰富并高度扩张,见图 3,提示成纤维细胞功能活跃。也可见少量线粒体,未见肿胀。试验组:成纤维细胞较少,多有明显伪足;胞体小,胞质量少,粗面内质网较少,无扩张,见图 4,提示成纤维细胞功能受抑制。

表 1　rhuTNF-α 对增生性瘢痕组织胶原、羟脯氨酸及酸性粘多糖含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The effect of rhuTNF-α on collagen, hydroxyproline and acidic mucopolysaccharide content of hypertrophic scar tissues ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Collagen	Hydroxyproline	Acidic mucopolysaccharide
Control	6	0.4036± 0.0135	44.8233± 3.9229	0.2559± 0.0098
Test	6	0.2306± 0.0214*	23.0250± 4.2826*	0.1135± 0.0125*

* : $P<0.01$ *vs* control



图 1　注射生理盐水 3周后,对照组增生性瘢痕组织中胶原纤维排列紊乱,呈结节状　(HE× 100)

Fig 1　Three weeks after injection of normal saline, collagen fibers in hypertrophic scar tissues in control group organized disorderly in the form of collagenous nodules (HE× 100)

图 2　注射 rhu-TNF-α 3周后,试验组增生性瘢痕组织中胶原结节消失,胶原纤维排列规则,于表皮层趋于平行　(VG× 100)

Fig 2　Three weeks after injection of rhu-TNF-α, collagen fibers in test group organized orderly, and parallel with epidermis layer (VG× 100)



图 3　注射生理盐水 3周后,对照组成纤维细胞粗面内质网丰富,明显扩张　(TEM× 20000)

Fig 3　Three weeks after injection of normal saline, the fibroblasts in control group have abundant rough endoplasmic reticula and dilated (TEM× 20000)

图 4　注射 rhuTNF-α 3周后,试验组成纤维细胞粗面内质网明显减少,无扩张　(TEM× 15000)

Fig 4　Three weeks after injection of rhuTNF-α, the number of rough endoplasmic reticulum of fibroblast in test group reduced markedly and without dilatation (TEM× 15000)

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

3 讨论

增生性瘢痕是人类皮肤深度损伤(特别是烧伤)愈合后的常见后遗症[1]。其形成机制至今尚不甚清楚。既往许多报道采用成纤维细胞培养作为研究手段,取得了许多有价值的资料。但成纤维细胞体外培养脱离了生物体,体内众多影响因素消失,故其结果只能为在体研究提供线索,而有赖于在体研究加以证实。因此,建立增生性瘢痕动物模型是至关重要的。1987年,Robb等[2]利用裸鼠的低排异特性,将人体增生性瘢痕移植于裸鼠背部体表。结果瘢痕成活且无排异现象,移植物维持原有结构特征。1989年 Kischer等[6]将人体增生性瘢痕移植于裸鼠皮下包埋,亦获成功。移植物观察长达 240 d,按体积减少计算其退变率仅每天 0.436%。国内刘宏亮等[3]率先报道将增生性瘢痕移植于裸鼠背部体表,获得成功。本实验共移植裸鼠 16只,瘢痕存活 12例,显示增生性瘢痕裸鼠移植模型是可行的。

TNF-α 对胶原代谢的影响,各家报道不尽相同。Thornton[7]报道离体培养的人肺和滑膜成纤维细胞,在 TNF-α浓度为 10~ 500 ng/ml范围内促进成纤维细胞增殖,而大于 500 ng/ml则对成纤维细胞表现为抑制或致死效应。另有离体研究报道 TNF-α可以通过抑制纤维连接蛋白的产生,增加胶原酶合成和前列腺素 E_2产生,从而促进蛋白酶产生,促进胶原酸性粘多糖的分解。近年来,有学者发现在增生性瘢痕中,抗 TNF-α单克隆抗体阳性染色的细胞较正常瘢痕显著减少,认为 TNF-α可能在正常伤口愈合中起重要作用,并提出了 TNF-α减少可能与增生性瘢痕形成相关的假设[8]。为排除 TNF-α阳性细胞减少可能是由于产生 TNF-α的细胞(巨噬细胞和活化 T细胞)的低功能活动或 TNF-α抑制剂的存在,Peruccio等[9]最近发现增生性瘢痕中 TNF-α mRNA的量显著减少,从而提出 TNF-α合成减少与增生性瘢痕形成有关。本实验采用重组人 α-肿瘤坏死因子局部注射,观察其对增生性瘢痕的影响。结果显示:rhuTNF-α不仅能有效降低增生性瘢痕组织中胶原含量,图像分析仪胶原相对定量测定与羧脯氨酸定量测定结果一致,而且 rhuTNF-α促使其组织结构发生明显变化,即胶原结节明显减少或消失,代之以胶原纤维与表皮面趋于平行的有序排列,而对照组无明显变化。增生性瘢痕中胶原沉积明显减少,推测可能与胶原蛋白合成减少有关,确切机制有待深入研究。

酸性粘多糖组成成分如透明质酸、硫酸软骨素等对胶原代谢有显著影响。Ruoslahti等[10]认为酸性粘多糖经特异粘合位点粘合于胶原上,控制胶原降解速度。而 Linares早就指出,酸性粘多糖能抑制胶原酶分解作用。本实验结果显示,试验组胶原含量显著减少,酸性粘多糖含量亦显著降低。

作者认为,局部注射 rhuTNF-α能有效减少移植于裸鼠背部体表的增生性瘢痕组织中的胶原沉积,可能在增生性瘢痕的治疗中有潜在价值。但由于试验组样本数量不大,且 rhuTNF-α注射存在发热、肌肉酸痛等诸多副作用,rhuTNF-α能否用于治疗增生性瘢痕,还需进一步研究确认。

参考文献

1 Kischer C W. The microvessels in hypertrophic scar, keloid and related lesions: a review. J Submicrosc Cytol Pathol, 1992, 24(2): 281

2 Robb E C, Waymack J P, Warden G D, *et al*. A new model for studying the development of human hypertrophic burn scar formation. J Burn Care Rehabil, 1987, 8(5): 371

3 刘宏亮,吴宗耀,王德怀.肥厚性瘢痕移植至裸鼠后的病理学观察.第三军医大学学报, 1994, 16(6): 434

4 方一心.免疫细胞化学与图象分析.见:蔡文琴,王伯 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994. 189~ 191

5 藤本大三郎.羟脯氨酸的定量应用氨基酸分析仪的定量测定.见:永井裕,藤本大三郎 编著.刘平译.肢原蛋白实验方法.上海:上海中医学院出版社, 1992. 54~ 55

6 Kischer C W, Pindur G, Shetlar M R, *et al*. Implants of hypertrophic scars and keloids into the nude mouse: the viability and morphology. J Trauma, 1989, 29(5): 672

7 Thornton S C, Por S B, Walsh B J, *et al*. Interaction of immune and connective tissue cells: I. The effect of lymphokine and monokine on fibroblast growth. J leudoc Biol, 1990, 47(4): 312

8 Castagnoli G, Stella M, Berthod G, *et al*. TNF production and hypertrophic scarring. Cell Immunol, 1993, 147(1): 51

9 Peruccio D, Castagnoli C, Stella M, *et al*. Altered biosynthesis of tumour necrosis factor (TNF) alpha is involved in postburn hypertrophic scars. Burns, 1994, 20(2): 118

10 Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycan as modulators of growth factor activities. Cell, 1991, 64(5): 867

(收稿: 1998-02-17;修回: 1998-06-16)

(编辑 仇玉福)

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

Effects of recombinant human tumor necrosis factor-α on hypertrophic scars transplanted to nude mice

Tan Wenfeng, Wu Zongyao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the effects of recombinant human tumor necrosis factor-α (rhuTNF-α) on the collagen content in and histomorphology of postburn hypertrophic scar tissues. **Methods**: Twelve nude mice with human postburn hypertrophic scar tissues (2 cm × 2 cm) transplanted on to their back and survived were randomized into the experimental group (EG) and the control group (CG). For animals in EG, 0.1 ml (500 g/ml) rhuTNF-α dissolved in normal saline was injected into the hypertrophic scar tissues for 3 times a week. For those in CG, only normal saline was injected in the same manner. The contents of collagen, hydroxyproline and acidic mucopolysaccharide in and the histomorphological changes of the hypertrophic scar tissues were determined 3 weeks later. **Results**: As compared with CG, in EG the contents of collagen, hydroxyproline and acidic mucopolysaccride were significantly decreased. After the injection of rhuTNF-α, the hypertrophic scar tissues became flatter and smaller. Collagenous nodules in hypertrophic scar tissues drastically decreased or disappeared. The number of rough endoplasmic reticulum in fibroblasts was markedly reduced and no dilatation was seen. **Conclusion**: rhuTNF-α can remarkably reduce collagen deposition in hypertrophic scar tissues, which suggests that rhuTNF-α may be of potential value in treating hypertrophic scars.

Key words tumor necrosis factor-α; hypertrophic scar; therapy; nude mouse

(上接 511页)

非毒性结合状态或随肠粘膜细胞脱落而排出体外。③ 锌剂对肝和脑中过量的铜尚有解毒作用。④ 锌剂诱导肠、肝细胞产生的金属硫蛋白是一种潜在的羟自由基清除剂。锌剂副作用小,仅见少数病人餐前服发生恶心、呕吐和腹泻。

我们坚持用硫酸锌治疗 5例 Wilson病患者,不仅临床症状和异常生化指标明显改善,而且能消除患者的颅脑影像学异常信号和 K-F环,这和 Huang等[3]报告一致。有报道用青霉胺治疗 Wilson病,3个月内用药者几乎全部缓解,2年后用药者效果差[4]。本组有 4例病程超过 3个月,其中例 4,2年 5个月。例 5,3年。例 2亦有 1年余。但坚持长期服硫酸锌,使病程长、病情危重者的临床症状和颅脑影像学等异常征象均获戏剧性改善;随访 2~5年无复发恶化。表明硫酸锌不仅能干预铜的异常代谢,而且可能逐渐驱除体内多年积蓄的铜,但亦有人认为口服锌剂不能阻止肝铜蓄积或反而使症状恶化[5]。我们推测可能与剂量或其它因素有关;另外肝铜增加可能是由于锌剂诱导肝细胞内金属硫蛋白合成,后者结合多量铜呈无毒性状态存在于肝细胞中,以后才随机体负铜平衡的建立,肝中积蓄铜才逐渐降低。

值得注意的是由于 Wilson氏病患者出生后即开始铜代谢障碍,铜渐进性沉积于脑、肝、角膜等器官,若延误诊断、病程延长,短期内不可能将多年沉积的铜驱出,即存在疗效与药物时间剂量关系。可见 Wilson氏病治疗成功的关键有 3点,首先尽早确诊,坚持长期治疗。其次尽早检出症状前患者,用锌剂长期预防性治疗。另外应避免停药,终生忌食高铜饮食。

关键词　肝豆状核变性;硫酸锌

中图法分类号　R742.4

参考文献

1 Bona I, Broussolle E, Neuschwander P, *et al*. Treatment of Wilson's disease with zinc. 5 cases. Rev Neurol Paris, 1993, 149(6~7): 393

2 陈　嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.锌孵育对肝豆状核变性离体培养细胞内铜、锌和金属硫蛋白代谢的影响.中国神经精神疾病杂志, 1996, 22(1): 13

3 Huang C C, Chu N S. Wilson's disease: resolution of MRI lesions following long-term oral zinc therapy. Acta Neurol scand, 1996; 93(2): 215

4 陈芷若,赵翕平,张贞浏.肝豆状核变性的早期诊断和治疗.中华神经精神科杂志, 1985; 18(4): 226

5 李乃忠,姚　莉,吕传真,等.青霉胺及锌剂治疗肝豆状核变性的疗效.临床神经科学, 1996; 4(2): 99

(收稿: 1997-08-15;修回: 1998-07-10)

(编辑　张大春)

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