

表 1 不同时期瘢痕组织中 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达评分 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 瘢痕形成时间  | 标本数 | bcl-2                     | Bax                     | VEGF                    |
|---------|-----|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1~4 个月  | 10  | 5.20 ± 1.00 <sup>ab</sup> | 5.1 ± 1.4 <sup>ab</sup> | 4.5 ± 1.2 <sup>ab</sup> |
| 5~8 个月  | 10  | 4.20 ± 1.50 <sup>a</sup>  | 3.8 ± 0.6 <sup>a</sup>  | 4.0 ± 0.9 <sup>a</sup>  |
| 9~12 个月 | 10  | 3.30 ± 0.10               | 2.7 ± 1.8 <sup>b</sup>  | 2.5 ± 1.2 <sup>b</sup>  |

注: VEGF 为血管内皮生长因子; 正常皮肤组织 (10 例) 中 bcl-2 为 (3.2 ± 0.8) 分, Bax 为 (2.5 ± 0.5) 分, VEGF 为 (2.0 ± 0.8) 分; 与正常皮肤组织比较, a: P < 0.01; 与 5~8 个月瘢痕比较, b: P < 0.01

### 3 讨论

本研究观察到, 在 9~12 个月瘢痕组织中 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达虽高于正常皮肤, 但其差异无统计学意义。因此我们推测一般瘢痕的成熟期可能为 8 个月左右。3 个时间段瘢痕的 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达水平均随瘢痕成熟而递减, 其中 bcl-2 的表达始终较 Bax 高, 说明瘢痕组织的增生与 bcl-2 过度表达有关; 随着瘢痕组织的成熟与软化, bcl-2 的表达逐渐降低。研究表明, 瘢痕处于增生期时其 bcl-2 的表达水平比衰退期明显升高<sup>[5]</sup>, 这与我们的研究结果相符。Bax、VEGF 在 3 个时间段的瘢痕中均呈阳性表达, 且各时间段的表达差异均有统计学意义 (P < 0.01), 故瘢痕组织细胞的凋亡亦随着瘢痕组织的成熟与软化逐渐减少, 最终 bcl-2、Bax 的表达水平接近于正常皮肤。而 VEGF 与 bcl-2 的表达变化趋势一致, 说明在抗凋亡系统启动的同时 VEGF 基因编码的蛋白产物也在增加, 并通过旁分泌或自分泌的方式与其受体

结合, 促进了微小血管的形成。我们认为, VEGF 作为多功能细胞因子通过某种机制调节成纤维细胞的增殖活性, 并参与了抗凋亡系统的启动, 最终在瘢痕形成中发挥着非常重要的作用。但 bcl-2 与 VEGF 之间是否存在内在的必然联系及其联系途径如何, 尚需进一步研究。难治性瘢痕与瘢痕组织中 VEGF 的表达有一定关系, 在常规应用促成纤维细胞凋亡药物不能显效或效果不明显时, 可选择抑制微小血管增生的方法, 如放射治疗及激光治疗等。

### 参考文献

- [1] Desmouliere A, Redard M, Darby L, et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 1995, 146 (1): 56-66.
- [2] 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 等. 皮肤溃疡伤口中 Bax 和 bcl-2 蛋白含量的变化及其与溃疡发生的关系. *现代康复*, 2001, 5(12): 54-55.
- [3] 岳毅刚, 蒋常文, 李佩英, 等. 血管内皮生长因子抗体靶向血管治疗对增生性瘢痕 I 型胶原蛋白表达的影响. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(6): 427-430.
- [4] 李晓芳, 赵柏程, 杨竹林, 等. bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 在增生性瘢痕中的表达及意义. *医学临床研究*, 2006, 23(8): 1239-1241.
- [5] 汪琴, 吴宗耀. 肥厚性瘢痕细胞凋亡检测及其相关调控因素的研究. *中华烧伤杂志*, 2001, 17(1): 25-28.

(收稿日期: 2007-06-04)

(本文编辑: 张红)

## 三种方法制作人脱细胞真皮基质的生物学特性比较

孙红 车鹏程 戚孟春 闫博

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

鼠抗人 I、III 型胶原蛋白抗体, 鼠抗人波形蛋白抗体, 鼠抗人结蛋白抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; dispase II、I 型胶原酶、噻唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司。

#### 1.2 脱细胞真皮基质 (ADM) 的制备

选取健康人全厚皮肤 (厚约 3 mm, 供者知情同意) 分为对照组, 不行任何处理; 高渗盐-NaOH 组, 参照文献 [1], 采用高渗盐去除皮肤表皮, 经戊二醛交联, 再以 NaOH 溶液消蚀; 高渗盐-十二烷基硫酸钠 (SDS) 组, 参照文献 [2], 用高渗盐去除皮肤表皮, 室温下用 5 g/L SDS 浸泡并振荡 1 h; dispase II-Triton X-100 组, 采用 2.5 g/L dispase II 去除皮肤表皮, 室温下用体积分数 0.5% Triton X-100 浸泡并持续振荡 24 h。各组标本洗涤, 冷冻干燥, 打孔器制片, 消毒备用。

#### 1.3 检测指标

##### 1.3.1 大体及组织病理学观察 大体观察各组皮肤外

观。标本均用体积分数 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片。取部分标本以 HE 染色并于光学显微镜下观察; 余下标本用生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶法染色, 抗体选用鼠抗人 I、III 型胶原蛋白抗体, 鼠抗人结蛋白抗体 (一抗), 鼠抗人波形蛋白抗体 (一抗), 一抗于 4 °C 下过夜, 于光学显微镜下观察。

**1.3.2 细胞毒性试验** 采用 DMEM 培养液提取后 3 组 ADM 浸提液。将成纤维细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔加 100 μl 浸提液 (体积分数 100.0%、90.0%、50.0%、25.0%、12.5%), 每种浓度 3 孔。培养 48 h 后, 每孔加入 15 g/L MTT 溶液 20 μl, 37 °C 继续孵育 4 h。终止培养后每孔加入 100 μl 二甲亚砜, 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tec 公司) 测定吸光度 (A) 值, 取平均值表示。计算细胞的相对增殖率 (RGR) 和评定细胞毒性分级。RGR (%) = (试样 A 值 - 空白 A 值) ÷ (阴性 A 值 - 空白 A 值) × 100%。细胞毒性: RGR ≥ 100% 时为 0 级, RGR 75% ~ 99% 时为 1 级, RGR 50% ~ 74% 时为 2 级, RGR 25% ~ 49% 时为 3 级, RGR 1% ~ 24% 时为 4 级, RGR = 0 时为 5 级。

**1.3.3 细胞计数及相容性实验** 吸取 0.1 ml NIH 3T3 细胞悬液 (浓度为 1.0 × 10<sup>7</sup> 个/ml), 接种于高渗盐-NaOH 组、

作者单位: 063000 唐山, 华北煤炭医学院病理学教研室 (孙红); 华北煤炭医学院附属医院整形科 (车鹏程、戚孟春、闫博)

高渗盐-SDS 组、dispase II-Triton X-100 组 ADM 上, 24 h 后计算每孔贴壁细胞数(接种细胞数-游离细胞数)。更换培养液, 分别于接种后 1、3、7 d 取材、固定、HE 染色, 采用丙酮、丙酮-二甲苯(1:2, 2:1)、二甲苯溶液湿润后以中性树脂封固<sup>[3]</sup>, 光学显微镜下观察 3 组 ADM 表面 NIH 3T3 细胞生长情况。

#### 1.4 统计学处理

部分数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SAS 软件行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 大体观察

高渗盐-NaOH 组 ADM 外观呈乳黄色半透明, 韧性好、拉伸强度大、可塑形; 高渗盐-SDS 组、dispase II-Triton X-100 组 ADM 呈白色或乳白色。光学显微镜下, 仅见高渗盐-SDS 组残留少许细胞碎片, 其余 2 组 ADM 内未见细胞。

### 2.2 组织学观察

各组均能够表达 I、III 型胶原蛋白, 结蛋白和波形蛋白呈阴性表达。

### 2.3 细胞毒性试验

ADM 浸提液的体积分数为 100.0%、90.0%、50.0%、25.0%、12.5% 时, 高渗盐-NaOH 组的 RGR 分别为 88.7%、85.0%、90.0%、88.5%、99.0%, 其细胞毒性均为 1 级; 高渗盐-SDS 组的 RGR 分别为 86.0%、86.4%、90.0%、88.5%、89.0%, 细胞毒性均为 1 级; dispase II-Triton X-100 组的 RGR 分别为 44.0%、54.0%、75.0%、85.0%、92.0%, 细胞毒性分别为 3、2、1、1、1 级。

### 2.4 细胞相容性实验及细胞计数

NIH 3T3 细胞与高渗盐-NaOH 组复合培养 24 h 后, 细胞贴壁数为  $(3.7 \pm 0.4)$  个/孔, 多于高渗盐-SDS 组  $[(2.4 \pm 0.6)$  个/孔,  $P < 0.05$ ,  $t = 3.844$ ]。接种后 1 d, 高渗盐-NaOH 组细胞贴附 ADM 生长, 第 3 天细胞逐渐增殖, 至 7 d 时 ADM 表面可见较多的细胞(图 1); 接种后 1 d, 高渗盐-SDS 组少量细胞贴附 ADM 生长, 至 7 d 时 ADM 表面细胞减少, 可见坏死细胞的固缩核(图 2); dispase II-Triton X-100 组接种后各时相点细胞变圆回缩, 并有细胞已脱离 ADM 而死亡, 3 次重复实验均出现同样的现象, 未见贴附细胞。

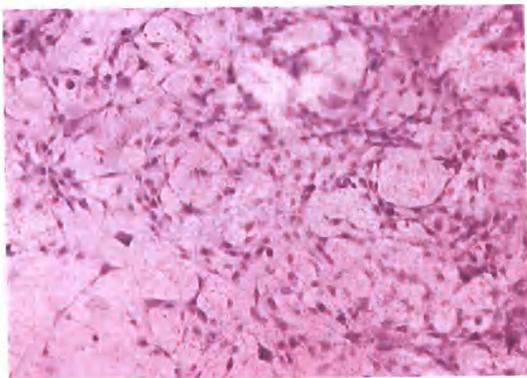


图 1 接种后 7 d, 高渗盐-NaOH 组脱细胞真皮基质表面可见较多的梭形细胞 HE × 200

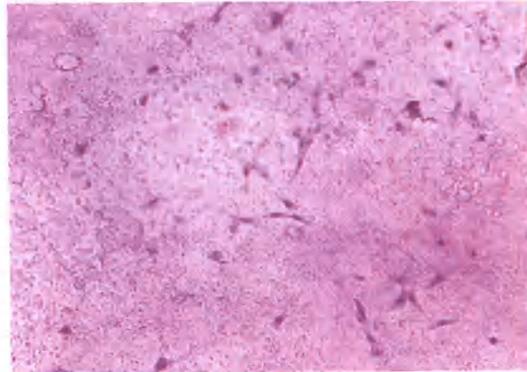


图 2 接种后 7 d, 高渗盐-十二烷基硫酸钠组脱细胞真皮基质表面有少量细胞 HE × 200

## 3 讨论

人 ADM 的常用制备方法是高渗盐-SDS 法<sup>[2]</sup>和 dispase II-Triton X-100 法。近年来, ADM 的制备方法渐趋完善, 可使其表现出非常低的抗原性和高度稳定性, 并且保存了真皮的天然结构, 这一内在的生物学特性使其成为组织修复和替代的生物学材料<sup>[4]</sup>。本研究表明, 3 种方法制备的 ADM I、III 型胶原蛋白均呈阳性表达, 能有效保留胶原成分。高渗盐-SDS 法能够有效地移除表皮, 保留较多基底膜成分, 但胶原纤维间有细胞碎片残留; 高渗盐-NaOH 消蚀法和 dispase II-Triton X-100 法能够完全脱尽细胞, 结蛋白、波形蛋白的表达为阴性。按照医疗器械生物学评价规定<sup>[5]</sup>对比 3 种方法制备的 ADM 的细胞毒性: 高渗盐-NaOH 消蚀法、高渗盐-SDS 法制备的 ADM 细胞毒性为 1 级; dispase II-Triton X-100 法制备的 ADM 细胞毒性  $\geq 1$  级, 这可能与 Triton X-100 为非离子型去垢剂, 有一定的细胞毒性有关。细胞相容性实验表明, NIH 3T3 细胞能够在高渗盐-NaOH 消蚀法制备的 ADM 表面贴附、增殖, 主要原因在于制备该基质所用的试剂易通过洗涤去除, 获得的 ADM 无细胞毒性, 且以其为支架进行细胞培养有较大优势。可见高渗盐-NaOH 消蚀法制备的 ADM 能够保留真皮内的有效基质成分, 免疫原性低, 细胞毒性符合医疗器械生物学评价的有关要求, 值得在临床推广应用。

## 参考文献

- [1] 孙红, 车鹏程, 戚孟春. 改良人脱细胞真皮基质对成纤维细胞 I 型前胶原 mRNA 表达的影响. 中华烧伤杂志, 2006, 22(4): 309-310.
- [2] Callcut RA, Schurr MJ, Sloan M, et al. Clinical experience with Alloderm: a one-staged composite dermal/epidermal replacement utilizing processed cadaver dermis and thin autografts. Burns, 2006, 32(5): 583-588.
- [3] 肖仕初, 杨珺, 刘志国, 等. 组织块 HE 染色法观察脱细胞真皮基质上接种细胞的生长情况. 中华烧伤杂志, 2005, 21(1): 64.
- [4] 毛志刚, 青春, 陆树良. 细胞外基质成分及空间形态结构对成纤维细胞生物学行为的影响. 中华烧伤杂志, 2005, 21(3): 238-240.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 16886.5-2003 医疗器械生物学评价第 5 部分: 体外细胞毒性试验. 北京: 中国标准出版社, 2003.

(收稿日期: 2007-03-02)

(本文编辑: 莫愚)