·论著·

不同表皮对成纤维细胞增殖及胶原含量的影响

陈静　王甲汉

【摘要】 **目的**　了解不同表皮对成纤维细胞(Fb)增殖的影响,并探寻其机制。 **方法**　将 10 例增生期瘢痕患者自身的正常皮肤 Fb + 正常表皮、瘢痕 Fb + 瘢痕表皮进行非接触性共同培养,另培养不加表皮的瘢痕 Fb,将这 3 个培养体系依次设为 A、B、C 组;另将 10 例成熟期瘢痕患者的皮肤同法培养,也建立 3 个培养体系依次为 D、E、F 组。检测各组 Fb 培养 72 h 后的细胞数量、培养上清液中Ⅰ型与Ⅲ型胶原含量及其比值的变化。 **结果**　C 组与 A 组、F 组与 D 组比较,均表现为细胞数显著升高,培养上清液中Ⅰ、Ⅲ型胶原含量上升,Ⅰ型与Ⅲ型胶原比值下降($P<0.05$);B 组与 C 组比较,培养上清液中Ⅲ型胶原含量增高,Ⅰ型与Ⅲ型胶原的比值下降($P<0.05$),细胞数和Ⅰ型胶原含量两组相近;E 组与 F 组比较,细胞数显著降低且上清液中Ⅰ、Ⅲ型胶原含量下降($P<0.05$),两者比值无明显变化。B 组与 A 组、E 组与 D 组比较,细胞数及Ⅰ、Ⅲ型胶原含量均显著增高($P<0.05$),Ⅰ型与Ⅲ型胶原的比值均显著下降(A、B 组为 2.20 ± 0.27、1.16 ± 0.21,D、E 组为 2.18 ± 0.14、1.93 ± 0.26,$P<0.05$)。 **结论**　正常表皮可能通过产生某些活性物质调节 Fb 增殖及胶原合成,在防止瘢痕增生中发挥重要作用。

【关键词】 表皮;　成纤维细胞;　细胞增殖;　胶原

Influence of epidermis from different sources on the proliferation and collagen content of fibroblasts

CHEN Jing, WANG Jia-han. Department of Burns and Plastic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

【Abstract】 **Objective**　To investigate the influence of epidermis from different sources on the proliferation and metabolism of fibroblasts (Fb), and to explore its cause. **Methods**　In a co-culture system, normal Fb (A group) and cicatrical Fb(B group) from 10 patients with scar during proliferative stage were co-cultivated with own normal skin epidermis (NSE), respectively, without direct contact. In control groups(C group), cicatrical Fb was cultured alone. Normal Fb and cicatrical Fb from 10 patients with scar during maturation period were co-cultured with own normal skin epidermis as mentioned above, and divided into D, E and F groups. The cell number of FB, the amount of type Ⅰ and Ⅲ procollagen (PCⅠ, PCⅢ) in the supernatants and the PCⅠ to PCⅢ ratio were determined. **Results**　To compare the C with A group and the F with D group, Fb in C and F groups exhibited increased cell number and PCⅠ, PCⅢ amounts($P<0.05$), and decreased ratio of PCⅠ to PCⅢ($P<0.05$). To compare the B with C group, PCⅢ contents in the cell supernatant was increased($P<0.05$), and the ratio of PCⅠ to PCⅢ decreased in B group($P<0.05$), there were no obvious difference in Fb cell number and the amount of PCⅠ contents between B and C group. To compare the E with F group, the cell number of Fb, as well as PCⅠ and PCⅢ contents in cell supernatant were obviously decreased in E group($P<0.05$), but no obvious decrease was observed in the ratio of PCⅠ and PCⅢ. To compare the B with A group and the E with D group, the cell number and the PCⅠ and PCⅢ contents in B and E groups were evidently increased, while the ratio of PCⅠ to PCⅢ decreased markedly(2.20 ± 0.27 vs 1.16 ± 0.21 in A, B group, $P<0.05$; 2.18 ± 0.14 vs 1.93 ± 0.26 in D, E group, $P<0.05$). **Conclusion**　Normal epidermis may play an important role in preventing hypertrophic scar by producing some bioactive substances.

【Key words】 Epidermis;　Fibroblasts;　Cell proliferation;　Collagen

瘢痕性修复是皮肤损伤达深层真皮后创面自行愈合的结果。只要皮肤损伤不伤及真皮深层(如浅Ⅱ度烧伤),创面可在 2 周内再上皮化而无瘢痕形成;如果皮肤创伤严重导致完整表皮在 2 周内无法重新形成,创面成纤维细胞(Fb)将活化、增殖,形成肉芽创面并最后转化为瘢痕组织,后者还将在一定时间内继续增大。随着时间延长,瘢痕表皮层结构逐渐接近正常表皮,瘢痕也趋于平坦、颜色变白。这些现象提示,皮肤表皮可能发挥着调节 Fb 增殖代谢的作用,推测正常表皮结构的长时间缺乏应该是体表瘢痕形成的首要因素。2005 年笔者曾提出利用预处理表皮预防外科切口瘢痕增生的一种较为有效

作者单位:510515　广州,南方医科大学南方医院烧伤科

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

的方法[1]。为进一步阐明表皮在不同瘢痕形成中的作用，笔者观测了体外环境下不同表皮对 Fb 增殖及胶原含量的影响。

1　对象与方法

1.1　组织来源

选择笔者单位增生期瘢痕和成熟期瘢痕患者各 10 例，取每例患者整形术中切除的瘢痕及正常皮肤备用（患者知情同意）。无菌条件下完整切下瘢痕组织及正常皮肤的表皮，制成 0.5 cm × 0.5 cm 的小皮片，用 Hank 液清洗后置入 DMEM 培养液（美国 Gibco 公司）中，于 4 ℃保存。组织块法培养去除表皮的 Fb，并传代至第 6 ~ 8 代待用。

1.2　复合培养体系及实验分组

复合培养体系：在传统 6 孔培养板的孔内加入 1 个底壁为微孔膜（孔径 0.4 μm）的小杯（美国 Millipore 公司），微孔膜允许小分子物质通过，而细胞成分被隔离。复合培养时调整 Fb 终浓度为 1.0×10^5 个/ml，按 1 ml/孔接种于该体系内，37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养 24 h 后换液，小杯内加入待用的表皮片共同培养。

在上述复合培养条件下，将 10 例增生期瘢痕患者的正常皮肤 Fb 和瘢痕 Fb 分别与自身正常和瘢痕表皮片共同培养，另培养不加表皮片的瘢痕 Fb。将这 3 个培养体系依次设为 A、B、C 组。将 10 例成熟期瘢痕患者的皮肤同法培养，也建立 3 个培养体系依次设为 D、E、F 组。

1.3　检测指标

1.3.1　不同表皮对 Fb 增殖的影响　共同培养 72 h 后，移去小杯，按常规方法对 Fb 行锥虫蓝染色，于显微镜下计数。

1.3.2　不同表皮对 Fb 各型胶原含量的影响　共同培养 72 h 后，收集细胞上清液，参照放射免疫试剂盒（重庆肿瘤研究所）说明书，利用 SN-682 型放射免疫 γ 计数仪（上海核辐光电仪器有限公司）测定样本中Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量，计算两者的比值。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 8.0 统计软件行方差分析，多样本均数间行两两比较。

2　结果

2.1　不同表皮对 Fb 增殖的影响

C 组与 A 组、F 组与 D 组比较，均表现为 Fb 数量显著升高；与 C 组比较，B 组细胞数量无明显变化；与 F 组比较，E 组的细胞数量显著降低。B 组与 A 组、E 组与 D 组比较，细胞数量显著增高（$P < 0.05$）。见表 1。

表 1　不同表皮对成纤维细胞增殖及各型胶原含量的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	细胞数量（$\times 10^5$ 个）	Ⅰ型胶原（μg/L）	Ⅲ型胶原（μg/L）	Ⅰ型胶原/Ⅲ型胶原
A 组	10	3.5 ± 0.6	142 ± 58	65 ± 21	2.20 ± 0.27
B 组	10	4.4 ± 0.4[a]	211 ± 65[a]	184 ± 79[ab]	1.16 ± 0.21[ab]
C 组	10	4.3 ± 0.7[a]	199 ± 748[a]	116 ± 63[a]	1.71 ± 0.19[a]
D 组	10	3.2 ± 0.4	133 ± 758	62 ± 27	2.18 ± 0.14
E 组	10	3.8 ± 0.6[cd]	166 ± 958[cd]	86 ± 38[cd]	1.93 ± 0.26[c]
F 组	10	4.3 ± 0.4[c]	204 ± 55[c]	112 ± 36[c]	1.83 ± 0.53[c]

注：检测胶原含量时每例患者样本设 3 个复孔，每孔重复测定 4 次；A ~ C、D ~ F组的样本分别取自增生期瘢痕、成熟期瘢痕患者，A ~ C 和 D ~ F 组均依次为正常皮肤成纤维细胞 + 正常表皮培养、瘢痕成纤维细胞 + 瘢痕表皮培养、瘢痕成纤维细胞单独培养组；同类样本之间与 A 组比较，a：$P < 0.05$；与 C 组比较，b：$P < 0.05$；与 D 组比较，c：$P < 0.05$；与 F 组比较，d：$P < 0.05$

2.2　不同表皮对 Fb 各型胶原含量的影响

C 组与 A 组、F 组与 D 组比较，细胞上清液中Ⅰ、Ⅲ型胶原含量上升，Ⅰ型与Ⅲ型胶原比值降低；与 C 组比较，B 组细胞上清液中Ⅲ型胶原含量增高、Ⅰ型与Ⅲ型胶原的比值下降（$P < 0.05$），Ⅰ型胶原含量无明显变化；与 F 组比较，E 组细胞上清液中Ⅰ、Ⅲ型胶原含量下降（$P < 0.05$），但两者的比值无明显变化。B 组与 A 组、E 组与 D 组比较，前者Ⅰ、Ⅲ型胶原含量均显著升高（$P < 0.05$），Ⅰ型与Ⅲ型胶原的比值显著下降（$P < 0.05$）。见表 1。

3　讨论

随着对瘢痕形成机制的深入研究，目前人们已认识到众多细胞和分子可影响 Fb 的功能，并互为因果、共同影响，构成错综复杂的作用网络，在瘢痕形成的不同阶段发挥重要作用[2]。

表皮毗邻真皮，对生理状态下真皮 Fb 数目、功能的相对稳定发挥重要调控作用。研究结果表明，表皮细胞能合成多种细胞因子调节 Fb 合成胶原[3]，在瘢痕增生阶段，角质形成细胞处于激活状态[4]。创面愈合过程中，伤口如果没有表皮覆盖，Fb 将会持续增殖并大量合成细胞外基质，而刃厚皮片、培养表皮片移植能有效预防瘢痕增生[5,6]。但并非所有表皮的作用都相同。如原始创面深度完全一致，行网状植皮术后表皮覆盖处瘢痕增生不明显，而皮片衔接部位瘢痕增生却非常显著。分析原因可能是前者为移植表皮，而后者为自身增殖形成的表皮。浅

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究　Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

Ⅱ度创面的新生表皮因具有与正常皮肤表皮相同的结构和功能，可有效抑制创面 Fb 过度增殖。增生性瘢痕的逐渐萎缩平坦，笔者推测与瘢痕表皮结构逐渐趋于正常而发挥对瘢痕 Fb 的调控作用有关。

正常皮肤中胶原以Ⅰ、Ⅲ型为主，Ⅲ型占总胶原的 10% ~20%。Ⅰ型胶原存在于成熟组织中，而Ⅲ型是一种新合成的胶原，Ⅰ、Ⅲ型胶原比值降低表示新生胶原增加[7]。本研究结果表明，与自体瘢痕 Fb 无表皮共培养相比，正常皮肤 Fb 与正常表皮共同培养后，Fb 数量、胶原含量均降低，Ⅰ型与Ⅲ型胶原比值增高。说明将两者共同培养，能降低 Fb 的增殖速度和胶原合成能力，尤其是Ⅲ型胶原的合成受到明显抑制，这应该是其抑制瘢痕形成的主要机制。但同样条件下，B 组不但没有表现出与 A 组相同的作用，Ⅲ型胶原的合成反而增加，成为增生性瘢痕早期不断增大的“帮凶”。这点在郭树忠等[8]的研究中亦得到证实，他们观察到瘢痕角质形成细胞上清液可促进 Fb 增殖。E 组的作用虽不如 D 组，但与 F 组比较，对 Fb 的增殖也具有一定的抑制作用，这与成熟期瘢痕组织的临床表现相吻合。

本研究采用复合培养体系，目的是了解完整表皮对 Fb 的影响。不同表皮的细胞成分相同，不同的可能是细胞层次和组合。复合培养体系避免了细胞与表皮片的直接接触，因此表皮对 Fb 的作用应与其产生的某些活性物质有关，这些物质通过微孔膜可能对下层 Fb 的增殖代谢产生了影响。

参考文献

[1] Chen J, Wang JH, Zhuang HX. Inhibitory effects of local pretreated epidermis on wound scarring: a feasible method to minimize surgical scars. Burns, 2005, 31(6): 758 - 764.

[2] 鲁开化，李荟元. 烧伤后病理性瘢痕防治研究的思考. 中华烧伤杂志，2004，20(2)：65 - 66.

[3] Garner WL. Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. PlastReconstr Surg, 1998, 102(1): 135 - 139.

[4] Machesney M, Tidman N, Waseem A, et al. Activated keratinocyte in the epidermis of hypertrophic scar. Am J Pathol, 1998, 152(5): 1133 - 1141.

[5] Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. Br J Plast Surg, 2002, 55(3): 185 - 193.

[6] 陈璧，贾赤宇，徐明达，等. 自体皮源奇缺条件下瘢痕挛缩畸形的晚期临床修复. 中华烧伤杂志，2003，19(6)：361 - 364.

[7] 陈新龙，余明星，陈文山，等. 烧伤创面成纤维细胞周期、羟脯氨酸和胶原比例动态变化. 中华外科杂志，2000，38(2)：148 - 150.

[8] 郭树忠，张琳西，王臻，等. 培养的正常和瘢痕角质形成细胞上清液对瘢痕成纤维细胞增殖和胶原合成的影响. 中华整形外科杂志，2002，18(2)：83 - 85.

（收稿日期：2006 - 08 - 16）
（本文编辑：赵敏）

·病例报告·

小儿手指电烧伤并发破伤风一例

海恒林　李华涛　戴海华　李强　吴胜刚

患儿男，8 岁，电接触烧伤左手腕及小指。伤后在当地诊所治疗，创面涂湿润烧伤膏，未注射破伤风抗毒素（TAT）。伤后 5 d 患儿出现面部肌肉痉挛、张口困难、四肢强直及角弓反张等症状。伤后 7 d 转入笔者单位。查体：患儿意识清楚，体温 37.8 ℃、脉搏 128 次/min、呼吸 30 次/min，苦笑面容，张口困难，腹肌紧张，四肢强直及角弓反张，左手腕及小指创面分别为 0.8 cm × 0.6 cm、0.6 cm × 0.5 cm，有分泌物，异味明显。清创时见坏死组织已分离，基底达深筋膜层。血常规及肝、肾功能检查均在正常范围。血气分析示：pH 7.24，剩余碱 -9.5 mmol/L。血厌氧菌培养阴性。创面细菌培养为金黄色葡萄球菌。诊断：左手腕及小指电烧伤，总面积 1% TBSA、Ⅲ度；全身型破伤风。入院后立即肌内注射人破伤风免疫球蛋白 3000 U。入院当天患儿因严重喉痉挛而窒息，紧急行气管切开及呼吸机辅助呼吸后生命体征恢复。氯丙嗪、异丙嗪各 12.5 mg、盐酸哌替啶 25 mg 加入 50 g/L 葡萄糖注射液 250 ml 中静脉滴注，每 12 小时 1 次，并用青霉素和甲硝唑抗感染。给予留置胃管，鼻饲肠内营养液。清除创面坏死组织，用体积分数 3% 过氧化氢冲洗并湿敷创面。治疗 7 d 患儿面部、双上肢肌痉挛基本消失，项部、腹部及双下肢肌痉挛减轻，12 d 后症状消失。创面坏死组织脱落，有新鲜肉芽组织生长，创面缩小，刮拭肉芽组织后用新鲜异体皮覆盖。治疗 14 d 后，创面愈合。气管置管 16 d 拔管。治疗 22 d 患儿痊愈出院。

讨论　小面积深度烧伤处理不当，可造成适于厌氧菌生长的环境而发展为破伤风。笔者认为烧伤后应常规肌内注射 TAT 1500 U。湿润烧伤膏抗感染效果不确定，对于电烧伤创面应谨慎使用。破伤风分为局部型和全身型，对于全身型患者应尽早行气管切开，以预防因喉痉挛或呼吸肌痉挛产生窒息危及生命。对于破伤风患者在抗生素的应用上，笔者建议仍以青霉素和甲硝唑为首选。破伤风梭菌感染后通常使用大剂量的 TAT，因 TAT 能中和血液中的游离毒素，但其不能抑制破伤风梭菌的繁殖，也不能逆转已与神经细胞结合的毒素。在本例患儿的救治中，笔者采用人破伤风免疫球蛋白 3000 U 一次性肌内注射，取得了较好的效果。

（收稿日期：2006 - 08 - 18）
（本文编辑：张红）

作者单位：313000　浙江湖州，解放军第九十八医院烧伤整形科

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?