

不同年龄烧伤患者增生性瘢痕的胶原构成及影响因素的研究

邱林 金先庆 向代理 傅跃先 田晓菲

【摘要】 目的 观察不同年龄患者增生性瘢痕(HS)胶原构成及相关因素的变化,并探讨其规律。方法 HS患者30例,按年龄分为1~19岁组和20~50岁组,取患者对侧部位的正常皮肤(NS)作对照组。采用原位杂交、链酶亲和素-过氧化物酶复合物免疫组织化学方法(SABC)及图像分析法,观察胶原比例和转化生长因子 β_1 (TGF β_1)、胶原酶(MMP-1)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIM-1)的变化。结果 1~19岁HS组I/III型胶原比例平均为6.48,20~50岁HS组为3.76,但两个年龄组各病程之间I/III型胶原比例均无明显差异。1~19岁HS组TGF β_1 呈高表达,与20~50岁HS组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。TIMP-1mRNA表达各年龄组之间无明显差别,HS组的表达显著高于NS组,MMP-1的表达明显低于TIMP-1,与NS组MMP-1的表达比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。结论 (1)HS中TGF β_1 的表达与年龄呈负相关,TGF β_1 的高表达促使I/III型胶原比例增高甚至比例失调。(2)高表达的TIMP-1通过抑制MMP-1的表达促使HS形成,其表达与年龄无明显相关性。

【关键词】 瘢痕,肥大性; 转化生长因子 β ; 胶原; 胶原酶类; 金属蛋白酶类组织抑制剂

Study on the collagen constitution of hyperplastic scar in different ages and its influencing factors QIU Lin, JIN Xian-qing, XIANG Dai-li, FU Yue-xian, TIAN Xiao-fei. Department of Burns and Plastic Surgery, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400014 P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the collagen constitution of hyperplastic scar (HS) in different ages and the change of relative factors. Methods Thirty cases with HS were divided into two groups according to patients' age: group 1 (1-19 years, A) and group 2 (20-50 years, B). The normal skin (NS) from corresponding age of volunteers was employed as control group. The changes in TGF β_1 , collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1 β) and the collagen ratio were observed by means of in situ hybridization technique and SABC (Strept-Avidin-Biotin complex) immunohistochemistry and image analysis. Results The ratio of type I to type III collagen in A group was 6.48 in average and 3.76 in B group, but there was no evident difference in the ratio during the disease process in both groups. The expression of TGF β_1 in A group was much higher than that in B group ($P < 0.01$). The TIMP-1 mRNA expression showed no difference among all age groups in HS patients, but it was much higher than that in NS group. The MMP-1 expression was evidently lower than TIMP-1 expression, and there was no difference in MMP-1 expression compared with NS group. Conclusion (1) The TGF β_1 expression in HS patients was negatively correlated with age, and the increased expression of TGF β_1 produced an increase ratio of type I to type III collagen. (2) High level expression of TIMP-1 led to the formation of HS by inhibiting MMP-1 expression, and the expression was not related to age.

【Key words】 Hyperplastic scar; Transforming growth factor β ; Collagen; Collagenase; Tissue inhibitor of metalloproteinase

烧伤及其他原因导致的皮肤损伤愈合后出现的瘢痕增生,是继发于创伤愈合过程中一系列复杂的病理生理改变,是皮肤损伤后组织过度修复的结果^[1],其发病机制尚不明了。有研究报道,增生性瘢痕(hyperplastic scar, HS)的发生与年龄、人种有密切关系,在青少年时段的发生率显著增高。本实验对不同年龄HS的胶原含量及其影响因素进行了观察,试图寻找差异的规律性,为干预、调控瘢痕的生长过程提供新的思路。

资料与方法

一、标本来源及实验分组

选择深II度烧伤创面愈合后6个月的HS患者30例,其中男18例,女12例,年龄1~50岁。按年龄将患者分为两组:1~19岁组和20~50岁组,平均年龄分别为:7.4岁、38.8岁,取患者瘢痕对侧部位的正常皮肤(normal skin, NS)作对照组。HS每组分3个病程:烧伤创面愈合后6~12月、13~24月和大于24月,经病理切片证实。病例无全身系统性疾病,术前1年内未使用过激素类药物,瘢痕局部未

作者单位:400014 重庆医科大学儿科医院烧伤整形科

经放射或注射治疗及其他外用药物治疗。标本于手术时获取,分成两部分:一部分石蜡包埋用于免疫组化染色,一部分液氮保存用于原位杂交。

二、检测方法

1. 链酶亲合素-过氧化物酶复合物免疫组织化学法(SABC): 所用 I、III 型胶原多克隆抗体和 SABC 试剂盒为武汉博士德公司产品,抗体稀释度为 1:100。TGFβ₁ 多克隆抗体为美国 Santa cruz 公司产品。将瘢痕组织用石蜡包埋后切片,抗原修复采用酶消化法,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

2. 原位杂交: 胶原酶(MMP-1)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)寡核苷酸探针购于武汉博士德公司,其片段长度分别为:1 500 bp 和 600 bp。用以针对人的 MMP-1 寡核苷酸探针序列: 1. 5'-TTGTA GTAGT TTTCC AGGTA TTTCC AGACT-3' 2. 5'-CAT-CA GGCAC CCCAC ACCTG GGCTT CTTCA-3' 3. 5'-CCTAA ATGTA GTTAT AGCAT CAAAG GTTAG-3' 和 TIMP-1 寡核苷酸探针序列: 1. 5'-ACAGC AACAA CAGGA TGCCA GAAGC CAGGG-3' 2. 5'-TCTCC AT-GGC TGGGG TGTAG ACGAA CCGGA-3' 3. 5'-ACAAG CAATG AGTGCCACTC TGCAG TTTGC-3'。取液氮保存的 HS、NS 标本,冷冻切片 20 μm 厚,用体积分数 4% 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS + 体积分数 0.1 % DEPC 室温固定 40 min,按原位杂交步骤预杂交过夜,杂交。同时作阴性对照。细胞内棕黄色颗粒为阳性标志。

3. 图像半定量分析: 采用重庆大学 Tiger 920G 图像分析软件系统,对结果进行分析。(1) SABC 法检测胶原: 每张切片随机选择 5 个视野,计算阳性标志面积所占测量面积百分比的平均数。(2) TGFβ₁ 的免疫组化 MMP-1、TIMP-1 原位杂交结果: 切片视野选择同上,每个视野计数 200 个细胞中阳性表达的细胞数,计算百分率,取平均数,以下列公式表示: 阳性细胞率(%) = (阳性表达细胞数/所测细胞总数) × 100%。

四、统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所获资料用 SAS 6.12 统计软件处理,采用方差分析, Q 检验和 t 检验。

结 果

1. SABC 法检测 I、III 型胶原含量结果: (1) 在 HS 真皮层的细胞间质中,可见大量棕黄色、较为粗大的 I 型胶原阳性颗粒,成纤维细胞和血管壁上亦可见到(图 1)。NS 组织中 I 型胶原阳性表达分布

与 HS 基本相同,但成纤维细胞和血管壁上几乎看不到阳性表达的 I 型胶原(图 2)。(2) HS 真皮层的细胞间质中可见到散在分布的 III 型胶原阳性表达,阳性胶原束较细,在成纤维细胞和血管壁上有少量分布(图 3)。NS 组织中 III 型胶原阳性表达的分布与 HS 基本相同,阳性胶原束较多、排列较密集(图 4)。

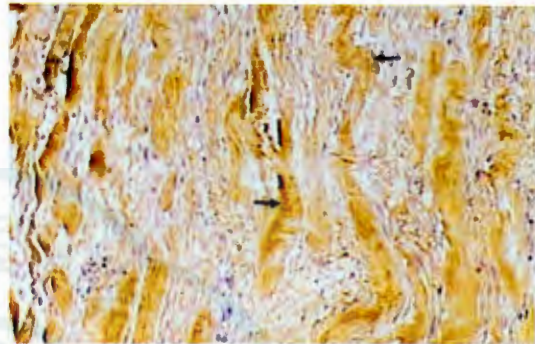


图 1 HS 组织 I 型胶原免疫组化染色,真皮层中可见到大量棕黄色、较为粗大的阳性颗粒 SABC × 200

Fig 1 Identification of Type I collagen in hypertrophic scar (HS) by immunohistochemical test, which exhibited as mass and coarse yellowish positive signals within dermal layer SABC × 200

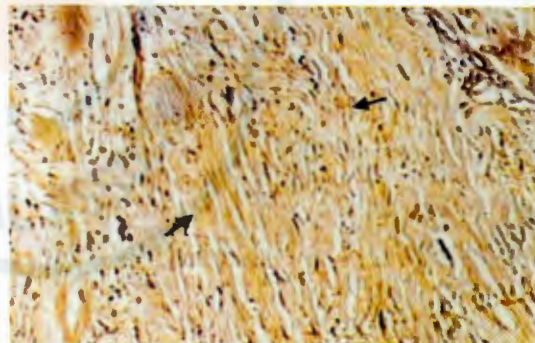


图 2 NS 组织 I 型胶原免疫组化染色,真皮层中可见到较多的棕黄色阳性颗粒 SABC × 200

Fig 2 Identification of Type I collagen in normal skin (NS) by immunohistochemical test, which exhibited as mass yellowish positive signals within dermal layer SABC × 200

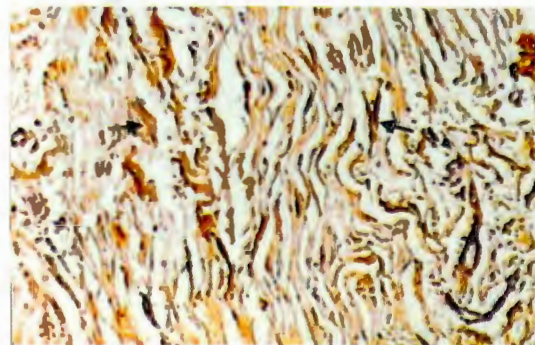


图 3 HS 组织 III 型胶原免疫组化染色,真皮层可见到棕黄色散在分布的少量阳性颗粒,胶原束较细小 SABC × 200

Fig 3 Identification of Type III collagen in HS by immunohistochemical test, which exhibited as diffuse yellowish positive signals within dermal layer with smaller collagen bundles SABC × 200

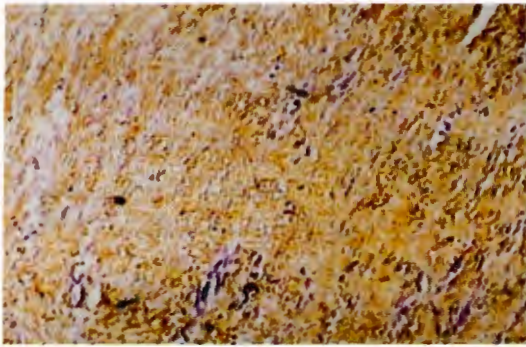


图 4 NS 组织Ⅲ型胶原免疫组化染色,真皮层可见较多棕黄色阳性颗粒,胶原束排列较密集 SABC × 200
 Fig 4 Identification of Type III collagen in NS by immunohistochemical test, which exhibited as mass yellowish positive signals within dermal layer with dense collagen bundles SABC × 200

2. TGFβ₁ 的免疫组化结果: HS 组织中 TGFβ₁

阳性细胞主要分布在胶原结节内,细胞浆呈棕黄色,颗粒粗大,多数为成纤维细胞,间质内也有少量散在的阳性颗粒(图 5)。NS 组织中偶见 TGFβ₁ 阳性的细胞(图 6)。阴性对照无阳性表达。

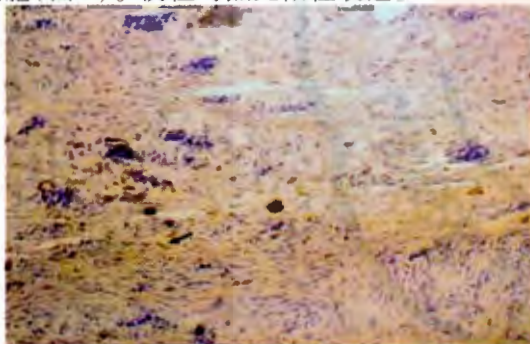


图 5 HS 组织 TGFβ₁ 免疫组化染色,阳性细胞呈棕黄色,多数为成纤维细胞,主要分布在胶原结节内 SABC × 100

Fig 5 Identification of TGFβ₁ in HS by immunohistochemical test. The positive cells exhibited as brownish with fibroblasts as the major cells that were mainly located in the collagen node SABC × 100

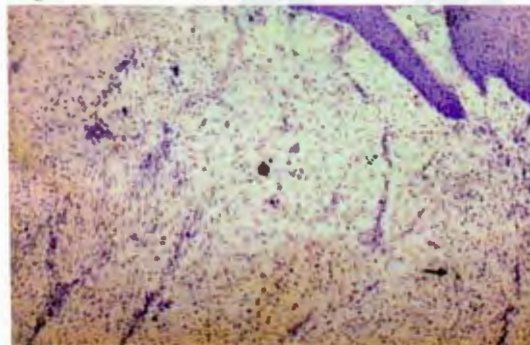


图 6 NS 组织 TGFβ₁ 的免疫组化染色,真皮层中偶见 TGFβ₁ 阳性细胞 SABC × 100

Fig 6 Identification of TGFβ₁ in NS by immunohistochemical test. There were less TGFβ₁ positive cells exhibiting brownish within dermal layer SABC × 100

3. 原位杂交结果观察:(1) MMP-1 在 HS 和 NS 组织中表达较弱,仅见少量的黄色阳性颗粒,多位于胶原结节中,表皮中无阳性表达。空白对照切片中

无阳性颗粒。(2) TIMP-1 在 HS 组织中表达明显增多,其阳性颗粒为棕黄色,主要位于胶原结节的成纤维细胞内,血管内皮细胞中也有较强的表达(图 7)。偶见 NS 组织的真皮血管内皮细胞中,散在分布的 TIMP-1 阳性颗粒(图 8)。

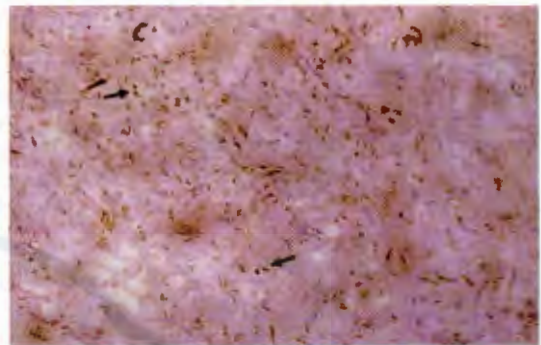


图 7 HS 组织 TIMP-1 mRNA 原位杂交,可见较多的棕黄色阳性颗粒 原位杂交 × 100

Fig 7 Identification of TIMP-1 mRNA expression as brownish granules in HS by in situ hybridization × 100

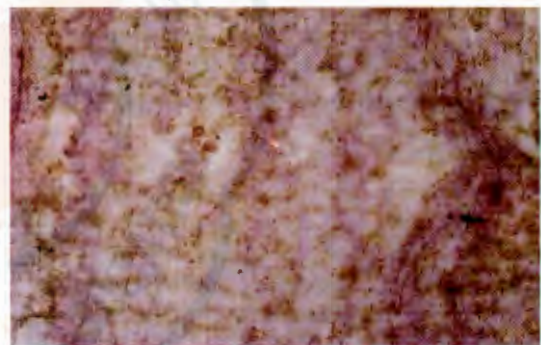


图 8 NS 组织 TIMP-1 mRNA 原位杂交,偶见阳性颗粒 原位杂交 × 100

Fig 8 Identification of occasional TIMP-1 mRNA expression as brownish granules in NS by in situ hybridization In situ hybridization × 100

4. 图像半定量分析:(1) 不同年龄 HS 组各病程中 I 型胶原含量均有增加,与正常皮肤比较,差异有显著性意义 (P < 0.05); Ⅲ型胶原的减少与正常皮肤比较,差异有显著性意义 (P < 0.05)。(2) HS 组各病程之间, I 型胶原及 Ⅲ型胶原量差异无显著性意义,结果见表 1。HS 组和 NS 组 TGFβ₁ 及 MMP-1、TIMP-1 图像分析结果见表 2、3。

表 1 HS 不同年龄组 I、Ⅲ 型胶原图像分析结果 (% , $\bar{x} \pm s$)
 Tab 1 The comparison of type I and type III collagens between HS and NS groups by image analysis (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	胶原类型	正常皮肤	瘢痕形成时间(月)		
			6 ~ 12	12 ~ 24	> 24
1 ~ 19 岁	I	28.6 ± 2.51	53.6 ± 3.26 *	55.3 ± 2.46 *	49.4 ± 3.80 *
	Ⅲ	22.7 ± 1.56	8.12 ± 0.82 *	8.85 ± 1.21 *	7.48 ± 0.82 *
	I / Ⅲ	1.26	6.60	6.25	6.60
20 ~ 50 岁	I	29.5 ± 1.97	46.4 ± 2.31 *	48.6 ± 2.50 *	45.0 ± 2.39 *
	Ⅲ	21.2 ± 1.34	12.5 ± 2.40 *	13.3 ± 1.73 *	11.5 ± 1.69 *
	I / Ⅲ	1.39	3.71	3.65	3.91

注:两组患者各 15 例;与正常皮肤比较, * P < 0.05

表 2 各组 TGFβ₁ 阳性率分析结果(%, $\bar{x} \pm s$)Tab 2 The comparison of TGFβ₁ between HS and NS groups by image analysis(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TGFβ ₁
1~19岁(HS)	15	8.62 ± 0.96*
1~19岁(NS)	15	1.28 ± 0.18
20~50岁(HS)	15	5.02 ± 0.93
20~50岁(NS)	15	1.33 ± 0.18

注:与20~50岁HS组比较,*P<0.01

表 3 各组 MMP-1、TIMP-1 表达阳性率分析结果(%, $\bar{x} \pm s$)Tab 3 The comparison of the expressions of MMP-1 and TIMP-1 mRNA between HS and NS groups by image analysis(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MMP-1	TIMP-1	TIMP-1/MMP-1
1~19岁(HS)	15	0.43 ± 0.02	3.55 ± 0.56**	8.26
1~19岁(NS)	15	0.41 ± 0.02	0.32 ± 0.05	-
20~50岁(HS)	15	0.45 ± 0.04	3.30 ± 0.40**	7.33
20~50岁(NS)	15	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.04	-

注:HS组TIMP-1与MMP-1比较,#P<0.01;HS组TIMP-1与NS组比较,★P<0.01

讨 论

在HS和NS中,I、Ⅲ型胶原纤维是最主要的构成部分。形态学提示胶原纤维直径与Ⅲ型胶原的比例呈负相关^[2],在发育过程中呈协调表达,用以维持皮肤的正常组织结构。在HS的形成过程中,I型胶原纤维的增加和Ⅲ型胶原的减少都起着至关重要的作用,粗大的I型胶原是瘢痕组织的病理基础。本研究结果表明,HS组I型胶原含量较NS组增加显著,Ⅲ型胶原明显减少,1~19岁(儿童青少年段)HS组I型胶原含量增加更为显著,该组I/Ⅲ型胶原的比例明显高于20~50岁HS组,提示愈合过程中,由于粗大的I型胶原占据愈合创面的主体,Ⅲ型胶原网状纤维相应减少并发生结构改变,使I/Ⅲ型胶原的比例失调,愈合创面质地坚硬而缺乏弹性,最终导致增生性瘢痕的形成。1~19岁HS组的I/Ⅲ型胶原比例失衡更为明显,表明组织中失调的胶原比例与年龄有着密切关系。在预防和减轻儿童青少年HS形成的过程中,如果采用某种措施减少I型胶原在组织中的含量或调控其构成比例,相信能取得更好的效果。

TGFβ₁是纤维化疾病中导致细胞外基质(ECM)沉积的主要调节因子之一,它的过度表达和应用,均可导致局部纤维组织增生^[3]。TGFβ₁通过增加I、Ⅲ型胶原基因的表达,促进胶原合成以及刺激纤维粘连蛋白、肌腱蛋白和蛋白多糖的合成进而导致ECM沉积。研究提示HS组织中TGFβ₁mRNA

稳态水平明显高于NS,表明HS组织自身能够产生TGFβ₁,同时进一步促使成纤维细胞增殖及I型胶原蛋白异常合成及沉积^[4]。本实验中,TGFβ₁在HS组织中的表达显著高于NS组织,主要位于成纤维细胞和血管内皮细胞,ECM中也有散在表达,证实TGFβ₁在HS的形成中起着重要的调控作用。1~19岁HS组TGFβ₁的表达高于20~50岁HS组,I/Ⅲ型胶原比例增高,HS的实际发生率亦较高,提示其表达与年龄有密切的关系。Shah^[5]证实创伤愈合过程中,使用TGFβ中和抗体可使瘢痕的形成显著减少,而愈合的伤口与正常真皮结构、组织张力相似。因此,应用TGFβ₁抗体治疗该年龄段HS,提示可能是一种有效的方法。

MMP-1与TIMP-1是与胶原降解有关的重要酶类。MMP-1的活性通过一系列过程受到调节,包括使酶达到最适宜的功能状态和TIMP-1对酶的抑制作用等^[6]。TIMP-1与MMP-1结合成复合体,从而抑制其活性并减少胶原降解。Ghahary等^[7]观察到,HS成纤维细胞中MMP-1mRNA的表达和酶活性均较NS为低,认为HS中MMP-1的低表达以及TIMP-1的高表达,使得胶原降解不足进而导致胶原纤维的过度聚集。本实验原位杂交结果显示,HS组织中TIMP-1mRNA表达与NS比较明显增强,MMP-1表达偏低接近NS,这种现象对胶原降解起着抑制作用,是诱导瘢痕形成的原因之一。HS两个年龄组之间的TIMP-1mRNA和MMP-1mRNA表达差异均无显著性意义,提示可能与年龄无关。

胶原作为皮肤创面愈合过程中修复损伤的必然物质,受到很多因素的调节。TGFβ₁在其中起重要作用,表达过度时可扰乱胶原合成与降解之间的平衡,导致ECM沉积、HS的形成及挛缩^[8]。同时可以抑制MMP-1的表达,促使TIMP-1和降解产物增加,减少胶原的降解。因此笔者推测TGFβ₁能够促进I型胶原合成和TIMP-1的高表达,引起I/Ⅲ型胶原比例失调,抑制MMP-1的活性从而减少胶原降解,使胶原的合成与降解失衡最终导致HS的形成。1~19岁HS组中I/Ⅲ型胶原比例增高的原因,可能是TGFβ₁显著增高并促使I型胶原过度合成所致,发生机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- Alster TS, West TB. Treatment of scars: a review. *Ann Plast Surg*, 1997, 39: 418-432.
- Linares HA. From wound to scar. *Burns*, 1996, 22: 339-352.
- Rong H, Tang XM, Zhao Y, et al. Postsurgical intraperitoneal exposure to glove powders modulates inflammatory and immune-related ey

tokine production. Wound Rep Reg, 1997, 5:89-96.

4 唐世杰, 庞素芳, 曹亚. 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织中 TGFβ₁ 及 I、III 型胶原基因表达的改变及意义. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 15:283-285.

5 Shah H. Control of scarring in adult wound by neutralizing antibody to TGFβ. Lancet, 1992, 1:213-214.

6 胡大海, 陈璧. 基质金属蛋白酶在皮肤创面愈合中的作用. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 317-320.

7 Ghahary A, Shen YJ, Nedelec B, et al. Collagenase production is lo

I, III in post-burn hypertrophic scar fibroblasts and is reduced by iN-Sulin-like growth factor-1. J Invest Dermatol, 1996, 106:476-481.

8 傅小兵, 盛志勇. 软组织创伤修复基础研究的现状与展望. 解放军医学杂志, 1997, 4:3-15.

(收稿日期:2002-08-01)
(本文编辑:王旭)

· 经验交流 ·

新型高效剪皮机在微粒皮移植术中的应用

张明良 狄春良 李迟 张普柱 马春旭

微粒皮移植术应用至今已有 15 年余,但微粒皮的制作仍采用人工方法,费时又费力。曾有同行研制出多种剪皮机械,但由于操作繁琐,已停止使用。近年来作者自行研制一种新型高效剪皮机,经临床应用效果较好,现介绍如下。

基本结构及操作步骤:(1)基本结构:剪切部分由一个三刃刀片(定刀片)及一个四刃刀片(动刀片)组成,旋转部分由电机及旋转轴组成,盛皮部分包括盛皮杯及支架。见图 1。(2)操作步骤:将两个多刃刀片连接在旋转轴上,垂直置于盛皮杯底,再将待切皮片放入盛皮杯中,加入适量等渗盐水,浸没皮片及刀片,一般约 10 ml,按动开关,电机驱动旋转轴,带动刀片旋转,两刀片相对运动,将皮片剪成微粒皮。

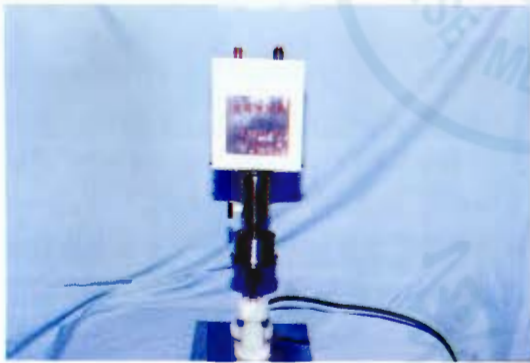


图 1 剪皮机外观

剪皮效率:为测试该剪皮机效率,笔者将面积为 1.5%、厚度为 0.2 mm 的薄断层皮,经本机剪切不同时间。取出剪碎微粒皮,分散在坐标纸上,其最小格为 1 mm²,计数 500 个微粒皮以上,计算 <1 mm² 及 <0.1(0.3×0.3) mm² 微粒皮百分率。经 6 次检测,结果显示:经本机剪切 5 min, <1 mm² 微粒皮比率达到 85% 以上,其中 <0.1 mm² 的极小微粒皮占 29%。剪切 15 min, <1 mm² 微粒皮比率达到 96%,其中 <0.1 mm² 的极小微粒皮约占 48%。机制微粒皮的这种微小程度,人工剪皮是达不到的,完全符合临床使用要求。随着需剪皮片面积的增加或减少,剪切时间可以相应增减。

理论计算:本机旋转轴每分钟旋转 82 圈,每旋转 1 圈,

三刃及四刃刀片相交:3×4=12 次,则每分钟相交:82×12=984 次。如人工剪皮,每分钟剪 60~80 次,两者比较:16:1 或 12:1,即本机剪皮效率为人工剪皮的 12~16 倍。

临床应用:在 12 例 28 个部位的微粒皮移植术中,使用本机制作微粒皮,与采用人工剪皮的一组病例相比较,两组微粒皮移植创面愈合情况见表 1。由表 1 可以看出,剪皮机制备的微粒皮,其创面愈合率 100% 者达到 67.8%,而人工剪成的微粒皮,创面愈合率 100% 者仅为 26.4%,两者比较 P<0.01,差异有非常显著性意义。这说明本机制成的微粒皮可以保持良好的活力,而且可促进创面愈合。

表 1 微粒皮移植创面愈合率比较

制备方法	例数	微粒皮移植创面愈合例百分率(%)			
		100	>90	>60	<60
剪皮机	28	19(67.8)	5(17.9)	4(14.3)	0
人工	34	9(26.4)	13(38.2)	9(26.5)	3(8.8)

讨论:在微粒皮移植术中,用剪刀剪皮的过程比较烦琐,2% 皮片需 2~3 人剪 30~40 min,费人费时费力。有报告采用网状切皮机,将皮片放在托板上,经多种角度送入滚筒刀后将皮片剪碎^[1,2]。但皮片容易粘在器械上,而且切成的碎皮不够小,达不到 <1 mm² 的微粒标准。笔者研制的新型剪皮机具有以下特点:

1. 本机制成的微粒皮比人工剪成的微粒皮小,制成的微粒皮中约一半为 <0.1 mm² 的极小微粒皮,这是人工剪皮所不可能达到的,因而机制微粒皮利用率高,对方向性的要求低,所以能够达到更好的创面愈合,如上文所示创面愈合率 100% 者可达 67.8%,远非人工剪皮所能比拟。
2. 剪皮效率高,为人工的 12~16 倍,节省大量时间。
3. 自动剪皮,不需人工操作,节省人力。
4. 装配简单,便于操作,且消毒容易,实用性强。

参 考 文 献

1 Inoue Y, Tarabe H, Tai Y. Method for the preparation of microskin grafts using skin-graft meshers. Plast Reconstr Surg. 1994, 94: 890.

2 Lai CA, Lin SD, Tsai CC. An easy way to prepare microskin grafts. Burns, 1994, 20:151-153.

(收稿日期:2001-04-29)
(本文编辑:张红)

作者单位:100035 北京,积水潭医院烧伤科(张明良、李迟、张普柱、马春旭);北京科技大学(狄春良)