

· 短篇论著 ·

增生性瘢痕退行性变过程中的细胞凋亡和相关基因表达

吴包全 吴建明 林子豪 陈刚 张益帆

增生性瘢痕发生的重要机制之一是成纤维细胞不能进入正常的程序性死亡, 导致其异常增殖使细胞外基质过度沉积。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)的活化形式过度表达可诱导细胞凋亡^[1]。本实验对增生性瘢痕退行性变的不同时期采用原代缺口末端标记(TUNEL)法作细胞凋亡检测, 探讨细胞凋亡及 caspase-3 在该过程中的作用机制。

一、材料与方

1. 标本来源及处理: 2001—2005 年笔者单位收治烧伤后增生性瘢痕患者 8 例, 其中男 5 例, 女 3 例, 年龄 29~43 岁 [(36±7) 岁]。均为热烧伤, 其中深 II 度 2 例, III 度 6 例。标本取自增生期(创面愈合后 5~15 个月)及瘢痕稳定期(首次切除增生性瘢痕标本后 8~36 个月), 其中颈部 1 例, 胸部 5 例, 上肢 1 例, 大腿 1 例, 标本切除后体积分数 10% 中性甲醛溶液固定。以上环节患者均知情同意。

2. 细胞凋亡检测: 操作按 TUNEL 试剂盒(德国宝灵曼公司)说明进行。设置阳性和空白对照, 以磷酸盐缓冲液(PBS)代替末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)作为阴性对照。凋亡结果判定: 以细胞核呈棕色者为阳性, 结合 HE 染色, 选取无坏死细胞的 5 个视野, 用 MIAS 2000 型图像分析系统(成都四川大学图像图形研究所)对阳性细胞进行计数, 每视野计数 1 000 个细胞, 以阳性细胞所占百分比为凋亡指数(AI), 取 5 个视野 AI 均值。

3. 免疫组织化学染色: 采用 En Vision 二步法。一抗为兔抗 caspase-3 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), En Vision 试剂盒为丹麦 DAKO 公司产品。细胞质棕色者视为阳性结果。将已知阳性组织切片作为阳性对照, PBS 替代一抗作阴性对照。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。

4. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

二、结果

1. 细胞凋亡检测结果: 增生期瘢痕组织内仅见少量弱阳性成纤维细胞; 稳定期瘢痕组织内可见成纤维细胞凋亡, 主要分布于真皮网状层及深层, 在表皮层亦可见少量分布, 凋亡细胞核呈棕色或深黄色(图 1)。瘢痕退行性变不同时期的成纤维细胞 AI 值分别为: 增生期(6.4±1.7)%、稳定期(24.0±12.1)%, 二者比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 免疫组织化学染色结果: 增生期瘢痕组织内 caspase-3 表达呈阴性, 或仅见血管内皮细胞中有弱阳性(±)表达。稳定期的增生性瘢痕组织阳性表达较强(+++), 主要见于成

纤维细胞和血管内皮细胞, 部分表皮基底层及附件亦可见阳性表达(图 2)。



图 1 在稳定期增生性瘢痕组织中可见凋亡的成纤维细胞 TUNEL × 400

图 2 稳定期增生性瘢痕成纤维细胞 caspase-3 表达呈强阳性 En Vision × 400

三、讨论

caspase-3 是 caspases 家族的核心成员, 在哺乳动物中通过水解相应的蛋白底物介导大多数细胞凋亡, 是介导细胞凋亡的核心蛋白^[2], 但其对增生性瘢痕退行性变的调控机制目前尚不明确。本研究前期基因芯片扫描结果提示, caspase-3 在增生性瘢痕退行性变过程中表达存在明显差异, 样本间杂交信号比值(Ratio 值)大于 10, 即稳定期的增生性瘢痕中基因表达量高于增生期瘢痕组织的 10 倍以上^[3]。本实验通过免疫组织化学原位检测证实, caspase-3 在稳定退变的瘢痕组织中阳性表达强度明显高于增生活跃的瘢痕组织, 说明其稳定退行性变与 caspase-3 诱导的成纤维细胞凋亡有关。TUNEL 主要检测相对于晚期的细胞凋亡, 本研究结果表明, 增生期与稳定期的增生性瘢痕组织存在明显凋亡差异, 在稳定期瘢痕中表皮、真皮等部位及成纤维细胞、血管内皮细胞中凋亡细胞增多, 推测与其退行性变密切相关。临床观察提示, 此时患者局部增生性瘢痕有逐渐消退的趋势, 其机制可能与成纤维细胞凋亡增多有关。有研究表明, 成纤维细胞凋亡增加是增生性瘢痕消退的重要原因^[4]。如果在瘢痕的增生期设法促进其成分凋亡, 尤其是促使成纤维细胞凋

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371472)

作者单位: 000000 内蒙古, 第二军医大学长征医院整形外科(吴包全现在复旦大学华山医院整形外科, 200040)

亡,减少其过度增殖,降低胶原产生量,就有可能促使增生性瘢痕提前进入退化性变阶段。

参考文献

- 1 Jerome KR, Sloan DD, Aubert M. Measurement of CTL-induced cytotoxicity: the caspase 3 assay. *Apoptosis*, 2003, 8: 563-571.
- 2 Arai M, Sasaki A, Saito N, et al. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 detects high level of apoptosis frequently in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *Pathol Int*, 2005, 55:122-129.
- 3 吴建明,汪惠民,吴包金,等.核酶对人皮肤瘢痕成纤维细胞增殖和 TIMP-1 表达的影响. *第二军医大学学报*, 2005, 26: 30-

33.

- 4 Akasaka Y, Ito K, Fujita K, et al. Activated caspase expression and apoptosis increase in keloids; cytochrome c release and caspase-9 activation during the apoptosis of keloid fibroblast lines. *Wound Repair Regen*, 2005, 13: 373-382.
- 5 Luo S, Benathan M, Raffoul W, et al. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg*, 2001, 107: 87-96.

(收稿日期:2006-07-04)

(本文编辑:王旭)

腹部联合皮瓣分期转移修复前臂环形毁损性电烧伤八例

朱雄翔 胡大海 徐明达 陈壁 韩军涛 董茂龙

上肢高压电烧伤大多存在腕部、前臂皮肤软组织广泛缺损,覆盖创面是其修复的难点,临床上这类患者截肢率较高,特别是腕部Ⅲ型电烧伤^[1-2]。笔者单位应用腹部联合皮瓣分期转移的方法治疗上肢Ⅲ型电烧伤患者8例,取得较好疗效,现报告如下。

一、资料与方法

1. 临床资料:本组8例患者均为男性青壮年,被高压电烧伤上肢7例,左上肢1例,腕部及前臂均有环形毁损性创面。其中7例于伤后48 h内入院,1例于伤后40 d左右由外院转入。5例患者于入院后4 h内急诊清创行腹壁联合皮瓣分期转移修复术,2例急诊行前臂切开减张,于伤后72 h行清创探查皮瓣修复术,1例移植刃厚皮控制感染后延期行皮瓣修复术。

2. 手术方法:(1)清创:患者在全身麻醉或臂丛神经+硬膜外麻醉下,用止血带压迫止血,切除腕部、前臂中下部1/3处的坏死软组织,探查并清除坏死前臂屈肌肌腹及毁损离断的肌腱,清除坏死旋前方肌,保留连续性较好的变性神经、肌腱,不必刻意探查前臂主要血管。肘部正中受累者,应扩创探查,若有坏死的胫桡肌、肱二头肌应一并清除,松止血带后彻底止血。(2)皮瓣设计以手术方法:Ⅰ期皮瓣移植术以腹壁下动脉脐旁穿支为轴型血管;以患肢间侧脐与肩胛下角连线为旋转轴并向外,向下设计皮瓣,或以腹壁浅动脉、旋髂浅动脉为轴型血管向内,向上设计皮瓣。根据伤肢皮肤软组织缺损长度,设计皮瓣的蒂长;皮瓣长度以能覆盖前臂半环为准,一般为12-15 cm。从深筋膜下剥离并掀起皮瓣,注意保护脐旁血管穿支或腹壁浅动脉与旋髂浅动脉,将前臂完全埋于腹壁上,放置负压引流管。术后2-3周行Ⅱ期皮瓣延迟术,以脐至肩胛下角连线为Ⅱ期皮瓣的蒂及旋转轴,向上腹壁设计皮瓣,或以腹股沟的平行线为旋转轴向髂嵴外侧设计Ⅱ期皮瓣。于皮瓣远端2-3 cm处设计宽约4 cm长皮桥,从深筋膜深层完全剥离皮瓣,注意切断结扎Ⅰ期皮瓣的轴型血管如脐旁穿支、腹壁浅动脉、旋髂浅动脉后原位缝合。术后2-3周皮瓣完全剥离后,修复肢体对侧创面。

二、结果

1. 本组患者术后皮瓣均未发生坏死,腹部皮瓣Ⅱ期转移后外形良好。但其中1例由于Ⅰ期皮瓣覆盖后创面封闭不严继发感染,影响到伤后变性坏死但连续性尚好的正中神经、屈指肌肌腱。Ⅱ期皮瓣转移术时彻底清除坏死正中神经及屈指肌肌腱,虽然保存了肢体,但手功能已基本丧失。

2. 典型病例:患者男,30岁,被10 kV高压电烧伤右 upper 肢,伤后8 h入院(图1),急诊行前臂腕部切开减张术,伤后第4天行清创探查及腹壁联合皮瓣Ⅰ期转移术。清创后,右前臂环形软组织缺损,正中神经变性坏死约7 cm,桡静脉栓塞,桡动脉变性坏死,前臂指深、浅屈肌坏死,部分指浅屈肌肌腱、腕屈肌肌腱连续性尚存,尺动脉、尺静脉壁变性但血管通畅性尚好。前侧缺损约23 cm,后侧缺损约20 cm(图2、3)。Ⅰ期设计腹壁上、下动脉脐旁穿支为蒂的轴型皮瓣,皮瓣长13 cm,蒂长21 cm。剥离深筋膜深层皮瓣后将损伤肢体埋于腹壁上,放置负压引流管,伤口愈合良好。于Ⅰ期皮瓣转移术后3周行上腹部皮瓣延迟术,术后16 d(图4)行上腹部皮瓣Ⅱ期转移术,上肢创面顺利修复。术后8周复查,患者全手感觉丧失,指间关节、掌指关节功能丧失,拇指尚存微弱内收功能。术后1年随访,患肢外形良好(图5)。



图1 电烧伤后患肢前臂、腕部皮肤环形坏死