

· 瘢痕的形成与防治 ·

新型增生性瘢痕裸鼠动物模型的建立

杨东运 李世荣 李钢 刘剑毅 王珍祥 毋巨龙 陈艳清

【摘要】 目的 建立一种稳定的增生性瘢痕(HS)动物模型,为进一步研究 HS 的发病机制提供帮助。方法 在 100 只裸鼠背部分别作 2.0 cm × 1.5 cm 全层皮肤缺损创面,移植人全厚皮肤;皮片存活后用加热的铜棒造成深Ⅱ度烫伤,观察创面愈合后的瘢痕增生情况。结果 皮片完全存活的 86 只裸鼠中,67 只有明显、持续的瘢痕增生,占 78%。增生瘢痕的外观和组织学特点与人体增生性瘢痕相似。瘢痕增生的平均厚度为 0.34 cm,最厚 0.60 cm,增生时间为 63~217 d,平均 128 d。结论 该模型瘢痕增生明显、增生持续时间长,可用于观察创面愈合至瘢痕形成的全过程,是目前较为稳定的增生性瘢痕动物模型。

【关键词】 烧伤; 瘢痕; 模型,动物

Establishment of an animal model of human hyperplastic scar in nude mice YANG Dong-yun, LI Shi-rong, LI Gang, LIU Jian-yi, WANG Zhen-xiang, WU Ju-long, CHEN Yan-qing. Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 Objective To establish an ideal model of human hyperplastic scar (HS) in nude mice, so as to provide us a new model to carry out further studies on the mechanism of HS development. Methods Full skin defect sized 2.0 cm × 1.5 cm was created on the back of 100 nude mice. The defect was thereafter covered with full thickness human skin. After the grafted skin survived, the nude mice were subjected to deep partial thickness burn of the grafted skin with heated copper rod. The development of the hyperplasia of the scar after wound healing was observed histologically and grossly. Results Grafted full-thickness human skin took and survived well in 86 out of 100 nude mice. There was obvious and continuous hyperplasia of scar in 67 mice (78%). The external appearance and histological features of the HS appeared similar to those in human HS. The average thickness of the scar was 0.34 cm, with the thickest part measuring 0.6 cm. In addition, the time of hyperplastic change lasted for 63-217 days in average of 128 days. Conclusion Obvious and continuous scar hyperplasia could be found in this model, and the whole process beginning from wound healing to the formation of HS could be easily observed. The model was therefore suitable and ideal for the study of HS.

【Key words】 Burn; Cicatrix; Model, animal

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是人体真皮烧(创)伤愈合后出现的一种特有的病理现象,不仅影响患者的外观,还可引起严重的功能障碍甚至致残,是烧(创)伤整形领域研究的难点和重点之一,但目前尚无理想的瘢痕动物模型供研究之用。为此,笔者将人正常全厚皮肤移植于裸鼠,并给予深Ⅱ度烫伤(以下称烧伤)建立 HS 动物模型,以期为进一步研究 HS 提供帮助。

材 料 与 方 法

1. 动物及标本来源:4~6 周龄裸鼠 100 只,体重 18~23 g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,为单纯 T 淋巴细胞缺陷(BALB/c)品系。人全厚皮来源于手术切除的腹壁和巨乳正常皮肤,术前征得患者同意。

2. 人全厚皮移植:将人全厚皮肤去除多余的皮

下脂肪,修剪成 2.0 cm × 1.5 cm 的皮片备用。用 10 倍等渗盐水稀释氟哌啶醇复方制剂,5~10 ml/kg 肌肉注射麻醉裸鼠。剪除裸鼠背部全层皮肤约 2.0 cm × 1.5 cm,创面移植人全厚皮片并加压包扎。术后 15 d 拆线,观察移植皮片存活率、色泽及质地变化,同时剔除皮片完全坏死或部分坏死的裸鼠。

3. 制作深Ⅱ度烧伤创面:磨平直径 1.0 cm、重 300 g 的铜柱一端,将铜柱置入 100℃ 水中 15 min,取出后迅速用纱布擦干,不加外界压力置于裸鼠背部的移植皮片上 8 s,造成直径 1.0 cm 的圆形深Ⅱ度创面(经组织学切片证实)。创面暴露,自行愈合。

4. 增生瘢痕形态大体观察:观察创面愈合后瘢痕增生的大体情况,切取 3 个月的瘢痕组织测量其厚度,并记录瘢痕增生持续时间。

5. 增生瘢痕组织学观察:切取 3 个月的瘢痕组织标本,经石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察增生瘢痕的组织学特点,并与消退期瘢痕及正常人全

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000175)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院整形科

厚皮片作比较。

结 果

1. 移植皮片的存活情况:100 只移植皮片的裸鼠中,皮片全部坏死 5 只、部分坏死 9 只,皮片存活率为 86%,其色泽与人体皮肤相似,质地柔软(图 1)。

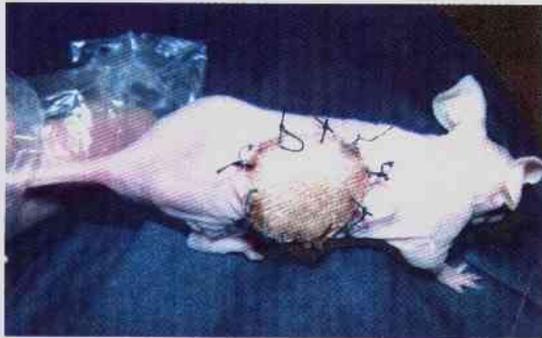


图 1 裸鼠背部创面移植皮片后 15 d,色泽、质地与正常人皮肤相似

Fig 1 The color and the texture of the graft were similar to those of the normal human skin 15 days after skin grafting

2. 增生瘢痕大体观察:裸鼠背部创面愈合后,局部逐渐隆起,充血明显、质硬且高于周围正常组织。本组移植皮片完全存活的 86 只裸鼠中,67 只有明显的瘢痕增生占 78%,厚度 ≥ 0.20 cm。3 个月左右增生达到高峰,最厚处达 0.60 cm,平均 0.34 cm(图 2)。4 个月部分瘢痕开始变软,并有不同程度的挛缩。但 6 个月后,大部分瘢痕仍明显高于皮面。瘢痕增生持续时间为 63~217 d,平均 128 d。

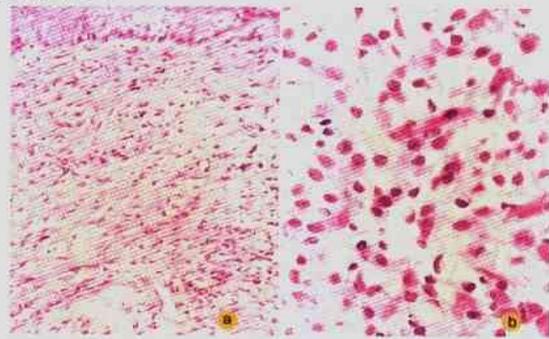


图 2 裸鼠背部创面愈合后 3 个月,瘢痕增生明显

Fig 2 Evident scar proliferation 3 months after wound healing

3. 增生瘢痕组织学观察:增生期瘢痕真皮层明显增厚,真皮乳头层、网状层界限不清,胶原纤维致密,胶原束排列紊乱,在真皮深层呈水平方向排列,浅层则呈结节或漩涡状分布,其间细胞成分及微血管增多,多见细胞核分裂(图 3)。消退期瘢痕真皮层明显变薄,胶原纤维变细,致密度降低,其间细胞成分和血管数目减少。正常人全厚皮真皮乳头层和网状层界限较明显,胶原纤维排列疏松,细胞成分及

血管数目少。



注:a.增生3个月瘢痕表皮基底膜变平,真皮层胶原纤维粗大致密;b.细胞成分及血管数目增多,多见细胞核分裂

图 3 增生3个月瘢痕组织学观察 HE $\times 400$

Fig 3 There was flattened base membrane in the scar epithelia, thick and pykno-collagen bundles (a) in the dermal layer with increased cellular components and vascular number and quite a number of nucleus division (b) HE $\times 400$

讨 论

创伤尤其是烧伤后 HS 的发生率很高,其发生有内、外两方面的因素:内部因素主要是人真皮成纤维细胞在适度刺激下能够持续合成过量的胶原等细胞外基质,导致瘢痕持续增生。成纤维细胞的这种特异性可能是由人体的基因所决定的。外部因素包括很多方面,其中最重要的是炎症细胞及其释放的生物活性因子,它们可以影响甚至决定成纤维细胞的功能状态和胶原的合成与分解代谢^[1]。动物身上不发生 HS,到目前为止还没有一种理想的 HS 动物模型^[1]。关于 HS 动物模型的研究已有不少报道,根据其特点可大致分为两类:一类是将人体 HS 组织切下后移植于裸鼠^[2],另一类是直接于动物体表(主要是兔耳腹侧面)造成创面,待其愈合后出现肉眼可见的瘢痕增生^[3,4]。这些模型对于研究 HS 有一定的价值,但也有其局限性。理想的 HS 动物模型应该能用来观察自创面愈合至 HS 形成的全过程,并具有较好的可控性和可比性,瘢痕增生持续时间较长(>100 d),有人类 HS 的遗传学和病理生理学特点^[1]。笔者结合以往动物模型的特点,建立了新型的 HS 动物模型:裸鼠是 T 细胞免疫缺陷的突变小鼠,其体表移植人全厚层皮肤后不会发生排斥反应,没有改变可引发 HS 的内部因素,创面局部为人真皮成纤维细胞。同时该模型具备引发 HS 的外部因素:烧伤创面炎症反应趋化及活化炎症细胞促进其释放多种生物活性物质,进而刺激成纤维细胞合成大量的胶原等细胞外基质。另外,必要时还可以人为地延长创面愈合时间、促进瘢痕增生。本组

78% 的裸鼠有很明显的瘢痕增生,但其持续时间并不相同,这可能与基因的表达差异有关,有待进一步研究。

以往研究中所采用的麻醉方法主要是腹腔内注射戊巴比妥,裸鼠麻醉死亡率偏高。本实验中,笔者采用氟哌啶醇复方制剂,它可快速、安全地松弛裸鼠的肌肉。该方法安全剂量范围大,即便是操作失误多注射 1 倍的麻醉药物,也不会引起动物死亡^[5]。皮片移植后不能存活的最主要原因是皮片滑动及皮片下血肿。传统的方法是在皮片缝合后用弹力套压迫固定,如固定不牢,皮片容易滑动,压力大小也不易掌握,过小达不到压迫效果,容易造成皮下血肿;过大则会影响裸鼠呼吸甚至致死。本研究采用整形外科技术,应用打包加压的方法避免了上述不足,移植后皮片存活率为 86%。

笔者在以往研究的基础上建立的 HS 动物模型具有较好的可控性和可比性,且能观察创面愈合至

HS 形成的全过程,有助于进一步深入研究 HS 的发病机制。另外,本研究中因移植皮片部分坏死而没有继续进行实验的裸鼠,残存的移植皮片逐渐干痂脱落,此表现类似于异种移植排斥反应,和目前人体皮肤移植于裸鼠后可终生存活的观点相矛盾,对此有必要进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 杨东运,李世荣.增生性瘢痕和瘢痕疙瘩动物模型的研究现状.中华整形外科杂志,2003,19:60-61.
- 2 祁少海,利天增,何洁华,等.增生性瘢痕裸鼠模型的组织形态学特征.中山医科大学学报,2000,21:123-126.
- 3 Morris DE, Wu L, Zhao LL, et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. Plast Reconstr Surg, 1997, 10:674-681.
- 4 李荟元,刘建波,夏炜,等.增生性瘢痕动物实验模型的建立与应用.中华整形外科杂志,2001,17:276-278.
- 5 丁运萍,刘学旭,陈庆芳.速眠新对 SD 大鼠的全麻效果.上海实验动物科学,1999,19:175-176.

(收稿日期:2003-11-20)

(本文编辑:苟学萍)

· 警钟 ·

静脉滴注胰岛素致穿刺部位坏死二例

邬佳敏 万思源

例 1 女,5 岁。开水烫伤总面积 45%,其中浅 II 度 20%、深 II 度 18%、III 度 7% TBSA。休克期后输注激化液(葡萄糖、胰岛素比例 4 g:1 U,氯化钾浓度为 0.3%^[1]),静脉穿刺针留置于未受伤之右足背。输液至第 5 天,患儿穿刺部位水肿,并有一 4.0 cm × 5.0 cm 水泡。拔除留置针,用注射器抽出暗红色水泡液 10 ml,并保留水泡皮。次日见水泡创基呈黑红色。1 周后局部皮肤出现 4.0 cm × 5.0 cm 干性坏死,皮下树枝状栓塞血管网清晰可见。行削痂植皮手术时,削除坏死部分达正常组织,同时给予刃厚皮片移植,术后 5 d 坏死创面痊愈。

例 2 男,34 岁,瓦斯爆炸烧伤面颈部、躯干、四肢,总面积 75%,其中浅 II 度 15%、深 II 度 50%、III 度 10% TBSA。休克期后每日补以激化液,其中胰岛素用量为 24 U/d,葡萄糖溶液浓度低于 15%。静脉穿刺针留置于患者未受伤之右足背,输液至第 5 天穿刺部位组织水肿,皮肤有一 5.0 cm × 5.0 cm 水泡,水泡内液及创基均呈暗红色。拔除该处留置针,以 0.25% 普鲁卡因 4 ml 局部封闭,数日后水肿逐渐消退,创面缩小至 2.0 cm × 1.5 cm,结痂后痂下愈合。

讨论 有文献报道,连续长时间于同一局部应用胰岛素可引起该处红肿、形成水泡、硬结、溢血和脂肪组织萎缩等不良反应,并可逐渐加重^[2]。本组 2 例患者静脉穿刺皮肤均出现暗红色水泡,其中例 1 因未及时采取有效措施,导致皮

下脂肪组织萎缩、创面加深。另外选择穿刺部位时应尽量避免皮肤松弛度不够、皮下组织较少的足背。否则当输液渗漏到一定程度,局部组织水肿,发生循环、营养代谢障碍,进而导致局部脂肪萎缩及皮肤坏死。

普鲁卡因可使血管平滑肌松弛,有明显的血管扩张作用^[3]。0.25% 普鲁卡因溶液用于局部封闭可使发炎损伤部位的症状得到一定缓解^[4]。例 2 因及时行 0.25% 普鲁卡因局部封闭,减少了病灶对周围神经的损害,改善了局部营养代谢,从而减轻了胰岛素导致的局部组织不良反应,使创面结痂后痂下愈合。由此,笔者建议在对重度烧伤患者进行肠外营养支持治疗时,应尽量避免于足背等皮下组织较薄处进行静脉穿刺。如受限于病情,静脉穿刺必须选择于该处时,则应勤观察,一旦出现局部组织水肿,须及时拔除该处静脉穿刺针,抬高患肢,局部热敷。对于局部皮肤出现水泡者,应及时给予 0.25% 普鲁卡因作局部封闭。

参 考 文 献

- 1 盛志勇,郭振荣,主编.危重烧伤治疗与康复学.北京:科学出版社,2001.340.
- 2 陈新谦,金有豫,汤光,主编.新编药理学.第 15 版.北京:人民卫生出版社,2003.610.
- 3 徐叔云,主编.现代实用临床药理学.北京:华夏出版社,1997.401-402.
- 4 侯连兵,主编.常用药物新剂型及临床应用.北京:人民军医出版社,1998.121.

(收稿日期:2002-10-24)

(本文编辑:张 红)

作者单位:550005 贵阳特殊钢有限责任公司职工医院烧伤科