

595nm 激光对兔耳瘢痕成纤维细胞增殖活性的影响^{*}

滕雯 郝立君 任丽虹 肖志波 王敏 李芍华

(哈尔滨医科大学附属第二医院激光美容中心 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:探讨兔耳增生性瘢痕动物模型形成过程中成纤维细胞增殖活性的动态变化及595nm Vbeam 激光照射的影响。方法:利用兔耳腹侧面建立增生性瘢痕模型,按不同时间段取材,采用免疫组织化学方法观察瘢痕形成不同时期增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白的表达,对比研究在兔耳增生性瘢痕形成过程中595nm Vbeam 激光照射对成纤维细胞增殖活性的影响。结果:上皮化后增殖细胞核抗原阳性细胞反应率随时间推移逐渐增高,至上皮化后4周达高峰。从上皮化后1周开始即可见到595nm Vbeam 激光照射后增殖细胞核抗原蛋白表达较对照组明显减弱,成纤维细胞增殖活性受到明显抑制,两组差异具有极显著性($P < 0.01$)。结论:595nm Vbeam 激光照射可明显抑制兔耳增生性瘢痕成纤维细胞的增殖活性,对兔耳腹侧面增生性瘢痕有明显的防治作用。

关键词: Vbeam 激光;增生性瘢痕;成纤维细胞;增殖细胞核抗原(PCNA)

中图分类号: Q764 **文献标识码:** A

The influence of 595nm Vbeam laser on proliferative activity of fibroblasts in the hypertrophic scarring models in rabbit ears

TENG Wen, HAO Li-jun, REN Li-hong, et al

Laser & cosmetic center, 2nd affiliated hospital of Harbin medical university, Harbin 150086, Heilongjiang, China

ABSTRACT Objective: To observe the dynamic change of the proliferative activity of fibroblasts in the hypertrophic scarring models in rabbit ears and investigate the influence of 595nm Vbeam laser on them. **Methods:** 20 white rabbits were used to establish the models of hypertrophic scar in ears, the material was taken on different time, studying the changes of fibroblasts with 595nm Vbeam laser irradiation and comparing with the controls during the process of forming hypertrophic scars, and the expression of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) protein was detected by immunohistochemical method. **Results:** The expression of PCNA increased gradually after re-epithelization, and the peak of the expression of PCNA was at 4th week. The expression of PCNA in the 595nm Vbeam laser irradiation group was obviously weaker than that in the control group since one week after re-epithelization ($P < 0.05$). There was significant difference between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** 595nm Vbeam laser irradiation can inhibit the proliferative activity of fibroblasts in hypertrophic scars of rabbit ears, which has obvious effect on preventing and treating hypertrophic scars.

Key words: Vbeam laser; Hypertrophic scar; Fibroblast; Proliferation cell nuclear antigen (PCNA)

前言

瘢痕形成是美容医学临床上的一个常见问题,是烧伤或手术等创伤后常见的并发症,但目前没有一种治疗可以从根本上阻止瘢痕的发生或者获得令人满意的疗效。Vbeam 激光是一种波长为595nm的脉冲染料激光,近年来脉冲染料激光应用于临床治疗各种血管性病损的同时,发现其对瘢痕有一定作用。本实验通过建立兔耳增生性瘢痕模型做实验对象,在瘢痕形成过程中动态观察成纤维细胞增殖活性的变化及595nm Vbeam 激光照射的影响,探讨激光对增生性瘢痕的防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料:

1.1.1 实验动物:日本大耳白兔20只,雌雄不限,体重1.5~2.0kg,由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供[许可证号SCXK(黑)20020002]。

1.1.2 主要试剂:I 抗鼠抗兔PCNA单克隆抗体、II 抗羊抗鼠IgG抗体-HRP多聚体、DAB显色试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器设备:595nm Vbeam 激光血管治疗仪(美国CANDALA公司生产);OLYMPUS光学显微镜。

1.2 实验方法:

1.2.1 建立动物模型:大耳白兔分笼饲养2天后,按文献报道方法建立增生性瘢痕动物模型,即在3%戊巴比妥那耳缘静脉注射麻醉下,取俯卧位,用圆形钻刀在每只兔耳腹侧面沿长轴避开可见血管,各做4个直径6mm的圆形全层皮肤缺损创面,深达软骨表面,每个创面间隔2cm以上,共做160个。术后常

* 黑龙江省卫生厅指导性计划项目(2005-280)

作者简介:滕雯,(1972-),女,博士,主治医师,主要研究方向:瘢痕的激光治疗

通讯作者:滕雯, E-mail: tengwen178@yahoo.com.cn

(收稿日期:2005-06-06 接受日期:2006-07-10)

规抗感染,自由进食。术后 21 天,160 个创面中有 103 个创面愈合突出于皮肤表面,即形成增生性瘢痕。

1.2.2 实验分组:创面上皮化后切取一组增生性瘢痕 8 处(A 组),然后将形成的增生性瘢痕随机分为两组,分别为激光治疗组和对照组。激光治疗组在创面上皮化后开始进行激光照射,采用 Vbeam 激光血管治疗仪,波长 595nm,本组采用的治疗参数是光斑直径 7mm,发射频率 1.5Hz,脉宽 1.5-6ms,能量密度 7-11J/cm²,动态冷却发射时间和间隔时间均为 30ms。开始时每周照射一次,一个月后改为每两周照射一次,共两个月。对照组不进行治疗。

1.2.3 标本取材及处理:在上皮化后 1,2,4,6,8 周分别切取两组增生性瘢痕各 8 处(B, C, D, E, F 组),加上上皮化后切取的一组瘢痕,共计取材 88 处。各组组织均 4% 多聚甲醛固定 48h 后常规脱水,石蜡包埋,拟行 PCNA 蛋白测定。

1.2.4 观察指标:PCNA 蛋白测定应用常规 2 步免疫组化法,按试剂盒说明书操作。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,细胞核内含有棕黄色颗粒者为阳性细胞。在 400 倍光镜下观察结

果,每张切片找 5 个阳性细胞最多的视野进行计数,阳性细胞反应率(%) = 阳性细胞数/细胞总数 × 100%,结果取均数。

1.2.5 统计学分析:每组样本数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 软件进行统计学处理,使用配对 t 检验,以 P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

纳入实验大耳白兔 20 只,实验中无脱落,全部进入结果分析。免疫组化染色可见表皮基底细胞层,棘细胞层,颗粒层和大量真皮成纤维细胞及真皮血管内皮细胞较多增殖细胞核抗原阳性表达。上皮化后增殖细胞核抗原阳性细胞反应率为 18.33%,以后随时间推移逐渐增高,至上皮化后 4 周达高峰。从上皮化后 1 周开始可见激光治疗组增殖细胞核抗原蛋白表达较对照组减弱,经统计学处理,两组差异具有极显著性(P < 0.01),具体见表 1。上皮化后 4 周,对照组增殖细胞核抗原表达见图 1,激光治疗组增殖细胞核抗原表达减弱见图 2。

表 1 两组兔耳增生性瘢痕增殖细胞核抗原的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Comparison of the expression of PCNA of hypertrophic scars in the two groups

组别	上皮化	上皮化后时间(周)				
		1	2	4	6	8
对照组	18.33 ± 1.10	27.66 ± 1.51	38.94 ± 2.85	64.26 ± 4.23	46.83 ± 3.58	28.16 ± 1.87
激光治疗组		25.36 ± 1.55*	32.26 ± 2.53*	41.93 ± 3.66*	30.19 ± 2.09*	20.75 ± 1.76*

与对照组比较,* P < 0.01; Compared with control group, * P < 0.01

3 讨论

创伤修复过程中,由于全身和局部因素的影响,常可导致细胞外基质(ECM)过度沉积和胶原降解减少而形成增生性瘢痕或瘢痕疙瘩,不仅严重影响外貌和功能,也会造成患者心理的异常。目前对于增生性瘢痕的治疗方法很多,用于防治瘢痕的药物研究也非常多,但人们对增生性瘢痕和瘢痕疙瘩形成的原因尚不完全明了^[1],临床疗效还不尽如人意。

激光治疗增生性瘢痕始于 20 世纪 70 年代后期。激光治疗瘢痕的原理是利用激光的烧灼、气化、切割、凝固及散焦等特有作用,去除瘢痕组织或损伤瘢痕内血管、抑制胶原合成和细胞增殖及诱导细胞凋亡。应用脉冲染料激光治疗瘢痕始于 20 世纪 90 年代初期,原理在于其能特异作用于微血管^[2]。1994 年 Alster 报道了应用 585nm 闪光灯泵染料激光治疗静止期红斑性增生性瘢痕,经皮肤纹理分析和临床观察等研究证实 1 到 2 次治疗就有明显改善^[3-4]。Vbeam 激光血管治疗仪也是一种脉冲染料激光,波长为 595nm,由于其波长更长,对组织的穿透也更深。其脉宽具有可调性,有 1.5ms、6ms、10ms、20ms、30ms、40ms,可根据不同病变适当选择,超长脉宽使组织有更长时间吸收激光能量,得到温和加热和均匀凝结,会取得更好的治疗效果。另外该激光仪还配有动态冷却系统,既能有效降低激光热效应对皮肤的损害又能减轻病人的疼痛,在治疗血管性疾病中起到良好效果^[5]。应用脉冲染料激光治疗瘢痕的原理在于抑制小血管的形成并闭合小的血管,来加重瘢痕缺氧程度并减少生长因子及成纤维细胞来源,从而预防并治疗瘢痕。

成纤维细胞增殖活性在增生性瘢痕的发生发展中起到重要作用,而其增殖活性又分为增殖分化功能和细胞外基质的合成分泌功能^[6-7]。增殖细胞核抗原 PCNA 是一种核内蛋白质,是分子量为 36000 的高度保守的分子,又称周期蛋白(cyclin),系 DNA 聚合酶的辅助蛋白,调节 DNA 复制起重要作用,其量的变化与 DNA 合成一致^[8]。PCNA 的表达已证实与细胞的增殖状态密切相关^[9]。在创伤愈合过程中最重要的细胞活动之一就是细胞增殖,成纤维细胞增殖是通过有丝分裂实现,是受控的有节制的过程,受多种环境因素的影响,如细胞因子调控成纤维细胞增殖与 G₀/G₁ 期有关。在细胞周期中,增殖细胞核抗原 PCNA 的合成对细胞由 G₀/G₁ 期进入 S 期必不可少,静止期含量很少,G₁ 晚期开始增加,S 期达到高峰,G₂/M 期明显下降。PCNA 的合成有严格的细胞状态限制性,仅出现在增殖旺盛的细胞和肿瘤细胞,处于静止期细胞几乎没有 PCNA 的合成。PCNA 合成的细胞限制性与细胞是否增殖有关,已有研究表明,增殖细胞核抗原的表达与细胞增殖活性有明显的相关性,是反映细胞增殖状态的一个指标^[10]。故本实验用 PCNA 蛋白表达来代表瘢痕成纤维细胞的增殖活性。脉冲染料激光对血管的作用已经得到证实,而其对成纤维细胞增殖活性的作用还鲜有报道。因此本实验用兔耳建立增生性瘢痕动物模型,在瘢痕形成过程中动态观察成纤维细胞的增殖活性,并用脉冲染料激光作用于兔耳增生性瘢痕,通过与对照组比较增殖细胞核抗原蛋白表达的变化来确定 595nm Vbeam 脉冲染料激光对兔耳增生性瘢痕形成过程的影响,证实其对

(图 1- 图 2 请见封 3)

(下转第 39 页)

3 讨论

腔内心电图储存功能(Stored EGMs)是新型起搏器的一项重要自动化功能。早在上世纪90年代初,研究人员开始对起搏器的这一功能进行临床研究,有人把这种功能称为起搏器的holter功能(holter function of pacemaker)^[1],也有称之为自动分析辅助诊断功能(Automatic Interpretation for Diagnostic Assistant, AIDA)^[2]。起搏器腔内心电图反映的是电极导线头局部感知的心电活动。心房电极感知的是心房心电活动,腔内心电图心房主波相当于体表心电图P波。心室电极感知的是心室心电活动,腔内心电图心室主波相当于体表心电图R波,腔内心电图的时相与体表心电图相对应^[3]。目前,起搏器腔内心电图储存功能对临床诊断和指导治疗方面的应用研究在国内鲜有报道。Cazeau等^[1]的研究结果认为:起搏器的holter功能可以用于房性快速心律失常的诊断,其储存的腔内心电图可以作为患者长期随访的分析资料。AIDA多中心研究组进行一项前瞻性研究^[2],结果表明:AIDA功能可以用于监测有症状的房性快速心律失常的发生状况,也可用于抗心律失常治疗的疗效评价,以及作为无症状的房性快速心律失常是否需要抗凝治疗的依据。ST. JUDE MEDICAL的IDENTITY系列5376型、5386型双腔起搏器具有记录和储存腔内心电图功能,能自动检测和储存超过预先设定的检测频率的房性或室性快速心律失常事件,因此在随访时可以遥测出相关的信息数据。在本组研究中,14例记录有房性快速心律失常,依据腔内心电图

图分析结果(房扑204次,房速163次),对伴有明显临床症状或房性快速心律失常发生次数较多的8例患者采用相应的药物治疗,其中5例房性快速心律失常消失,其余3例发生房扑68次,房速43次,与初次随访相比明显减少(111 vs 367, $P < 0.05$),AMS启动的次数也明显减少(82 vs 138, $P < 0.05$),其疗效是显著的,同时也说明对腔内心电图的分析是可靠的。因此,从功能的角度来看,腔内心电图类似动态心电图(holter)的检测功能,腔内心电图的分析结果可以作为调整起搏参数、起搏模式和临床用药的依据,也可用于评价抗心律失常治疗后的疗效。对于需要长期随访的起搏器患者,腔内心电图储存功能提供了一个既方便又有效的方法。但腔内心电图易受噪音干扰,甚至因心房、心室交叉感知而增加分析的难度。本组研究中1例出现交叉感知,1例受肌电干扰而不能进行腔内心电图分析,因此腔内心电图储存功能还不能完全代替动态心电图。但随着人工心脏起搏技术的飞跃发展,相信腔内心电图储存功能会得到进一步的完善。

参考文献

- [1] Cazeau S, Ritter P, et al. Diagnosis of atrial arrhythmias using the Holter function of a new DDD pacemaker[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1994, 17: 2106-13
- [2] Defaye P, Mouton E. A new diagnostic concept in cardiac pacing for the evaluation of the incidence of atrial arrhythmias. Results of the AIDA study[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1998, 21: 250-5
- [3] 王立群主译. Hesselson A. 著. 起搏心电图简析(The simplified interpretation of pacing ECG)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 47

(上接第27页)

增生性瘢痕的预防及治疗作用。经免疫组化分析证实上皮化后增殖细胞核抗原阳性细胞反应率为18.33%,以后随时间推移逐渐增高,至上皮化后4周达高峰。经595nm Vbeam脉冲染料激光照射后,激光治疗组增殖细胞核抗原PCNA表达从上皮化后1周开始同对照组比较可见明显减弱,提示成纤维细胞的增殖活性降低。本实验结果显示,在增生性瘢痕形成过程中,从上皮化后就开始应用Vbeam脉冲染料激光照射,可抑制成纤维细胞增殖活性,进而减轻兔耳瘢痕增生程度,但其对于人类增生性瘢痕的作用还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Bayat A, Bock O, Mrowietz U, et al. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta 1 common polymorphisms and plasma levels[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 11(2): 535-543
- [2] Anderson RR, Parrish JA. Microvasculature can be selectively damaged using dye lasers: a basic theory and experimental evidence in human skin[J]. *Lasers Surg Med*, 1981, 1(3): 263-276
- [3] Alster TS. Improvement of erythematous and hypertrophic scars by the

585nm flashlamp-pumped pulsed dye laser[J]. *Ann Plast Surg*, 1994, 32(2): 186-190

- [4] Alster TS, Williams CM. Treatment of keloid stemotomy scars with 585 nm flashlamp-pumped pulsed dye laser[J]. *Lancet*, 1995, 34, (8959): 1198-1200
- [5] 李芍华, 滕雯, 王敏, 等. Vbeam激光治疗毛细血管扩张症[J]. *中华医学美容美容杂志*, 2004, 10(3): 138-140
- [6] 黄勇, 林立新, 赵伟, 等. 瘢痕组织成纤维细胞培养及其超微结构观察[J]. *现代康复*, 2001, 5(7): 54-56
- [7] 郭爱华, 柳大烈. 胚胎无瘢痕愈合的调控机制研究: (I)成纤维细胞形态和生长动力学研究[J]. *现代康复*, 2001, 5(12): 56-57
- [8] 黄杰雄, 黄致治. 增殖细胞核抗原研究进展[J]. *国外医学生理、病理与临床分册*, 1994, 14: 9-11
- [9] Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein[J]. *Nature*, 1987, 326(6112): 517-520
- [10] Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication[J]. *Exp Cell Res*, 1986, 163(2): 287-293

(正文请见第 24 页)

nm23 和 S-100 蛋白在 B16 黑色素瘤模型鼠的表达和意义

王忠成

(哈尔滨医科大学大庆校区解剖学教研室 163319)

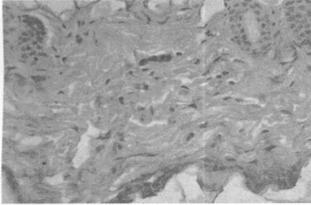


图 1 对照组皮肤 Nm23 免疫组化染色 x132

Figure 1. Skin of Nm23 dyed by Immunohistochemical method in control group x132

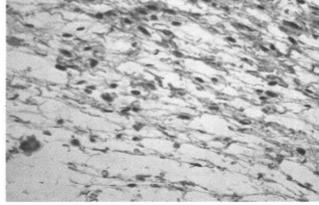


图 2 早期组皮肤 Nm23 免疫组化染色 x132

Figure 2. Skin of Nm23 dyed by Immunohistochemical method in early group x132

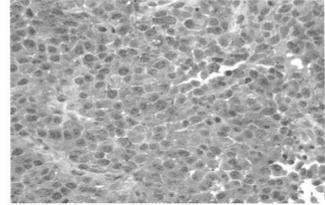


图 3 晚期组皮肤 Nm23 免疫组化染色 x132

Figure 3. Skin of Nm23 dyed by Immunohistochemical method in late group x132

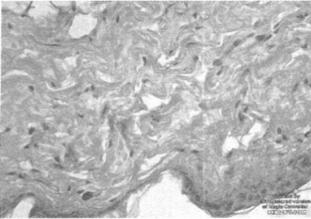


图 4 对照组皮肤 S-100 蛋白免疫组化染色 x132

Figure 4. Skin of S-100 Proteins dyed by immunohistochemical method in control group x132

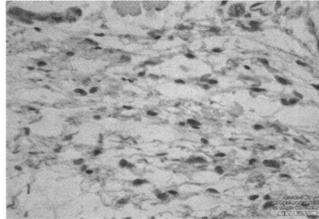


图 5 早期组皮肤 S-100 蛋白免疫组化染色 x132

Figure 5. Skin of S-100 Proteins dyed by immunohistochemical method in early group x132

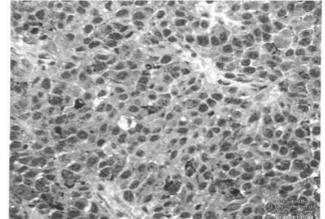


图 6 晚期组皮肤 S-100 蛋白免疫组化染色 x132

Figure 6. Skin of S-100 Proteins dyed by immunohistochemical method in late group x132

(正文请见第 26 页)

595nm 激光对兔耳瘢痕成纤维细胞增殖活性的影响

滕雯 郝立君 任丽虹 肖志波 王敏 李芍华

(哈尔滨医科大学附属第二医院激光美容中心 黑龙江 哈尔滨 150086)

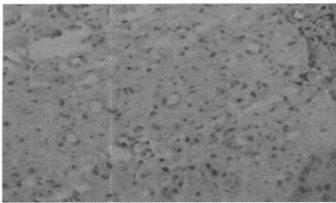


图 1、上皮化后 4 周对照组瘢痕 PCNA 表达 (免疫组化×400 倍)

Figure1. PCNA expression of hypertrophic scar 4 weeks after re-epithelization in the control group by immunohistochemical (IHC) method(×400)

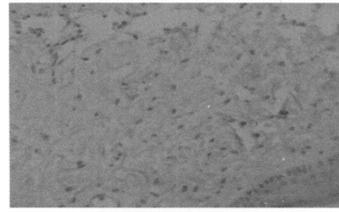


图 2、上皮化后 4 周激光治疗组瘢痕 PCNA 表达 (免疫组化×400 倍)

Figure2. PCNA expression of hypertrophic scar 4 weeks after re-epithelization in the laser treatment group by IHC method(×400)