

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.009

不同能量 CO₂ 点阵激光对博来霉素诱导的小鼠增生性瘢痕的作用及 Hedgehog 信号通路的影响 *

肖明明¹ 张瑞芳² 李 灿¹ 刘漪沦² 刘卫华^{2△}

(1 成都医学院基础医学院 四川 成都 610500; 2 成都医学院第一附属医院 四川 成都 610500)

摘要 目的:探讨不同能量 CO₂ 点阵激光对博来霉素诱导的小鼠增生性瘢痕模型的作用及其对瘢痕组织中 Hedgehog 信号通路的影响。**方法:**于雄性 C57BL/6J 小鼠背部皮肤注射博来霉素(1 mg/d, 4 周)制作增生性瘢痕模型,另取 4 只小鼠背部注射 PBS 缓冲液作为对照。造模成功之后,随机将小鼠分为瘢痕对照组(模型组),10 mj 激光治疗组(10 mj 组)和 20 mj 激光治疗组(20 mj 组),每组 6 只小鼠。10 mj 组小鼠给予 10 mj 激光治疗(共 3 次,每次间隔 2 周);20 mj 组小鼠给予 20 mj 激光治疗(共 3 次,每次间隔 2 周)。治疗结束后,处死小鼠,取瘢痕全层标本进行病理组织学染色观察(HE、Masson 染色)以及 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、GLi1 免疫荧光观察。**结果:**①我们成功复制出小鼠增生性瘢痕模型;②20 mj CO₂ 点阵激光治疗可有效修复瘢痕组织,经治疗后皮肤瘢痕程度显著减轻,同时可降低真皮层厚度和减轻瘢痕组织的纤维化程度;③免疫荧光染色结果提示,CO₂ 点阵激光可显著减少小鼠皮肤增生性瘢痕中 α-SMA、GLi1 表达。**结论:**于小鼠的背部皮肤注射博来霉素可建立增生性瘢痕模型。CO₂ 点阵激光为治疗增生性瘢痕一种有效的治疗方式,其作用可能与其对 Hedgehog 信号通路的抑制有关。

关键词:增生性瘢痕;CO₂ 点阵激光;组织病理;纤维化;GLi1 蛋白

中图分类号:R-33;R619.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)02-244-05

Effect of Fractional CO₂ Laser on Mice Hypertrophic Scar and Hedgehog Pathway induced by Bleomycin*

XIAO Ming-ming¹, ZHANG Rui-fang², LI Can¹, LIU Yi-lun², LIU Wei-hua^{2△}

(1 School of Preclinical Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan, 610000, China;

2 The First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan, 610500, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of different energies fractional CO₂ laser on bleomycin-induced mice hypertrophic scar model and Hedgehog signaling pathway in scar tissue. **Methods:** Bleomycin (1 mg/d, 4 weeks) was injected into the back skin of male C57BL/6J mice to establish hypertrophic scar model, and PBS was injected into the back of 4 mice as control. After the model was erected, the mice were randomly divided into scar control group (model group), 10 mj laser treatment group (10 mj group) and 20 mj laser treatment group (20 mj group), 6 mice in each group. Mice in 10 mj group were treated with 10 mj laser (three times, two weeks apart) and mice in 20 mj group were treated with 20 mj laser (three times, two weeks apart). At the end of treatment, the mice were sacrificed, and the full-thickness scar specimens tissues were taken for histopathological staining (HE, Masson's staining) and immunofluorescence observation the expression of alpha-SMA and GLi1. **Results:** ① We successfully replicated the mouse model of hypertrophic scar. ② Fractional CO₂ laser treatment can effectively repair scar tissue and reduce the thickness and fibrosis degree of dermis. ③ The results of immunofluorescence staining suggested that CO₂ lattice laser could significantly reduce the expression of alpha-SMA and GLi1 in hypertrophic scars of mouse skin. **Conclusions:** A model of hypertrophic scar can be established by injecting bleomycin into the skin of the back of mice. CO₂ lattice laser is an effective treatment for hypertrophic scar, and its effect may be related to the inhibition of Hedgehog signaling pathway.

Key words: Hypertrophic scar; Fractional CO₂ Laser; Histopathology; Fibrosis; GLi1 protein

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R619.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)02-244-05

前言

增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)作为病理性瘢痕的一种,是成纤维细胞产生的胶原蛋白等在组织中沉淀后,难以被

吸收或重塑而表现出的一种病理状态。表现为持续性炎症反应和纤维异常增生,影响患者的形象和健康,也增加了患者的心理负担^[1]。HS 病因多种多样但均由于真皮深层的损伤造成。典型的表现为:局部组织的增厚,质地坚硬且明显高于正常皮面,

* 基金项目:四川省科技计划项目(2017JY0304;2018054);四川省医学会科研课题计划(S16021);四川省卫计委重点项目(16ZD038)

作者简介:肖明明(1983-),主要研究方向:临床应用解剖学

△ 通讯作者:刘卫华(1973-),硕士研究生导师,研究员,主要研究方向:临床应用解剖学, E-mail: 872485363@qq.com, 电话:028-83016604

(收稿日期:2018-07-23 接受日期:2018-08-18)

挛缩致周围组织移位,运动关节发生 HS 还会导致患者运动功能受限等^[2]。

目前 HS 治疗手段较多,大致分为药物、敷料、物理治疗、手术治疗以及各种疗法的联合治疗等^[2,3]。由于其发病机制复杂,涉及遗传、多种信号通路等,目前其形成的分子机制尚不明确,加上缺乏较好的动物模型,因此其治疗进展较为缓慢,当前的治疗效果仍不理想^[45]。近年证实 CO₂ 点阵激光对增生性瘢痕有较好疗效,但其具体机制不清,从而限制该项技术的发展及进一步推广应用^[67]。为此,我们认为有必要采用不同的动物模型进一步深入了解 CO₂ 点阵激光治疗的疗效与机制,为更好地推广该技术提供依据。

本研究中,我们参照付小兵院士课题组及 Ferreira 等的造模方法^[89],在复制博来霉素小鼠背部皮肤增生性瘢痕造模基础上应用点阵激光进行治疗,观察不同能量的激光对增生性瘢痕的治疗效果并初步探讨其相关的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

7-8 周龄健康、雄性 C57BL/6J 小鼠(购于成都达硕公司),在适应性喂养 1 周后进行增生性瘢痕小鼠模型的制作。瘢痕模型制作成功后随机分为 3 组,包括瘢痕对照组,高能量的激光治疗组(20 mj 能量组)和低能量的激光治疗组(10 mj 能量组),每组 6 只小鼠。

1.2 小鼠增生性瘢痕模型的制作^[89]

小鼠以 10% 水合氯醛麻醉后,背部备皮。注射博来霉素促进瘢痕的生成。注射方法:背部皮下注射博来霉素(1 mL,浓度为 1 mg/mL,博来霉素以 PBS 溶解),共计 4 w 完成造模。另取 4 只健康小鼠以同法备皮,皮下注射同体积的 PBS 缓冲液作为阴性对照。

造模结束后随机选取 4 只小鼠行颈椎脱臼法处死,选取博来霉素注射区域皮肤全层标本组织,钝性分离皮肤组织大小约 1 cm×1 cm,并将组织分为两份,一份以生理盐水冲洗后置于 10% 甲醛溶液固定以进行病理组织学染色观察(HE、Masson 染色;另一份立即做冰冻切片,切片厚度 6 μm 进行 α-SMA、glioma-associated oncogene homologue 1(GLI1)免疫荧光观察;

另取背部注射 PBS 的小鼠皮肤组织同法进行染色作为对照。

1.3 干预方法

造模成功之后,随机将小鼠分为 3 组,每组 6 只,包括瘢痕对照组,20 mj 激光治疗组,10 mj 激光治疗组。20 mj 激光治疗组小鼠给予 3 次能量为 20 mj 的激光治疗;10 mj 激光治疗组小鼠给予 3 次能量为 10mj 的激光,两组小鼠的治疗间隔均为 2 周。

1.4 观察指标

治疗结束后小鼠以 10% 水合氯醛经腹腔麻醉后处死,获取皮肤标本。选取治疗皮肤全层标本组织,钝性分离皮肤组织大小约 1 cm×1 cm,并将组织分为两份,一份以生理盐水冲洗后置于 10% 甲醛溶液固定以进行病理组织学染色观察(HE、Masson 染色;另一份立即做冰冻切片,切片厚度 10 μm,行 α-SMA、GLI1 免疫荧光观察。

1.4.1 HE 染色 参照文献取皮肤标本行石蜡切片经常规 HE 染色后观察小鼠正常皮肤的组织和治疗前后增生性瘢痕组织的形态学特点^[9]。

1.4.2 Masson 染色 参照文献取皮肤标本行石蜡切片观察小鼠正常皮肤的组织和治疗前后皮肤组织中纤维形成情况^[9]。

1.4.3 免疫荧光染色 参照文献方法^[10],皮肤以冰冻切片包埋剂包埋后,于 -20 ℃ 中行冰冻切片,厚度约 10 μm,参照既往方法先后孵育一抗,二抗后在荧光光镜下观察,拍照和分析。

1.5 统计学分析

以 SPSS 18.0 进行数据录入和统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 prism 5.0 制图软件作图,组间比较采用非配对 t 检验的方法,以 P<0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 博来霉素建立的小鼠模型增生性瘢痕情况

HE 染色提示 C57BL/6J 对照小鼠的皮肤组织结构完整,呈红染波纹状,胶原纤维较细,密集排列,纤维间和纤维周围可见部分成纤维细胞,无炎性细胞浸润(图 1A)。模型组表皮层上皮增厚明显,真皮层胶原沉积增加,胶原束增粗,排列不规则,并可见大量炎性细胞浸润(图 1B);对真皮厚度进行测量,结果显示模型组的真皮厚度明显厚于正常皮肤组织(图 1C)。

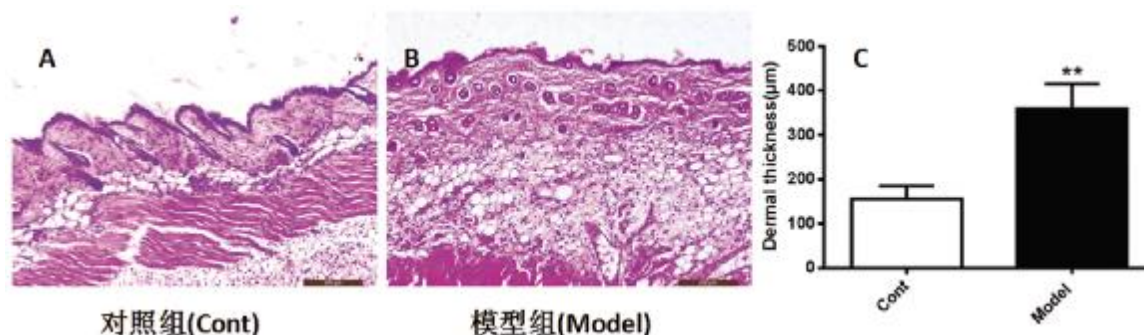


图 1 HE 染色对比观察正常对照小鼠和模型组小鼠皮肤瘢痕组织

Fig.1 Skin scar tissue of normal control mice and model mice were observed by HE staining

Note: **P<0.01 versus Cont group. The scale bar represents 200 μm.

Masson 染色显示正常皮肤组织内血管、成纤维细胞较少,胶原稀疏,排列整齐(见图 2A)。模型组瘢痕组织外周均有一层

纤维结缔组织包膜包绕,瘢痕组织内有大量成纤维细胞,贴近包膜处有大量血管,胶原纤维粗大,漩涡状排列(见图 2B)。

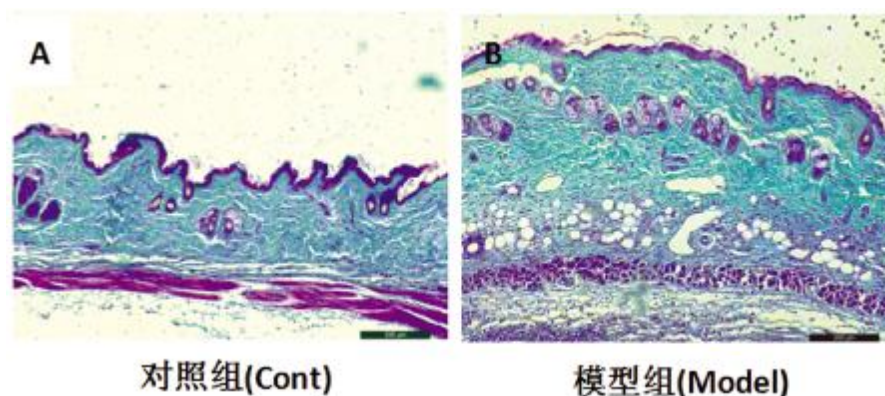


图 2 Masson 染色观察对照小鼠和模型组小鼠皮肤瘢痕组织中纤维增生情况

Fig.2 Proliferation of fibrous tissue in skin scar tissue of control mice and model mice were observe by Masson staining

Note: The scale bar represents 200 μm .

免疫荧光染色观察正常对照小鼠和模型组小鼠皮肤瘢痕组织中 α -SMA(绿色)和 GLi1(红色),模型组较之正常组可见

α -SMA、GLi1 大量表达,表明模型组胶原蛋白和成纤维细胞更多也即显示出增生性瘢痕特性(见图 3A,3B)。

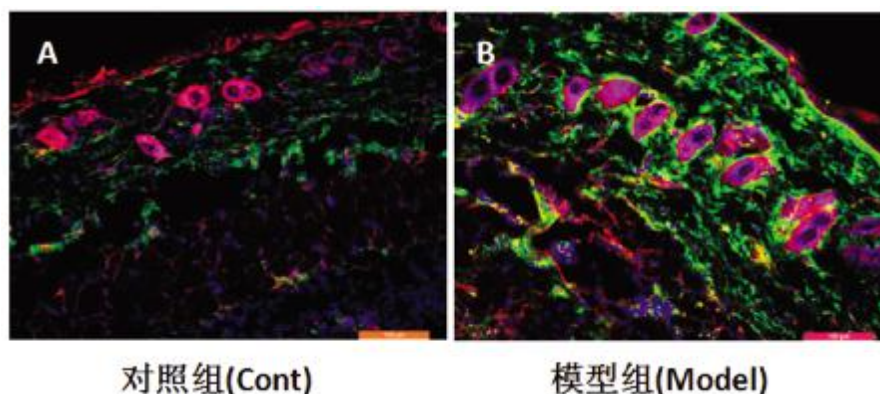


图 3 正常对照小鼠和模型组小鼠皮肤瘢痕组织中 α -SMA 和 GLi1 的表达

Fig.3 Expression of alpha -SMA and GLi1 in skin scar tissue of normal control mice and model mice

Note: The scale bar represents 100 μm .

2.2 CO₂ 点阵激光对增生性瘢痕的疗效

以 HE 染色观察分析不同能量的 CO₂ 点阵激光对真皮层的大体情况及真皮层的厚度的影响(见图 4),同时以 Masson 染色观察真皮胶原纤维化的作用(见图 5)。结果发现 20 mj 的 CO₂ 点阵激光可显著改善真皮胶原组织的排列,减少血管数量,并且显著降低真皮层的厚度(见图 4)。20 mj CO₂ 点阵激光

治疗组小鼠皮肤真皮层的厚度显著低于模型组小鼠皮肤真皮层的厚度, $P < 0.05$;10 mj CO₂ 点阵激光治疗组小鼠有降低真皮层厚度的趋势,但经统计无显著差异, $P > 0.05$ (见图 4)。Masson 染色提示,20 mj CO₂ 点阵激光治疗可显著减轻真皮层的纤维化程度(见图 5)。

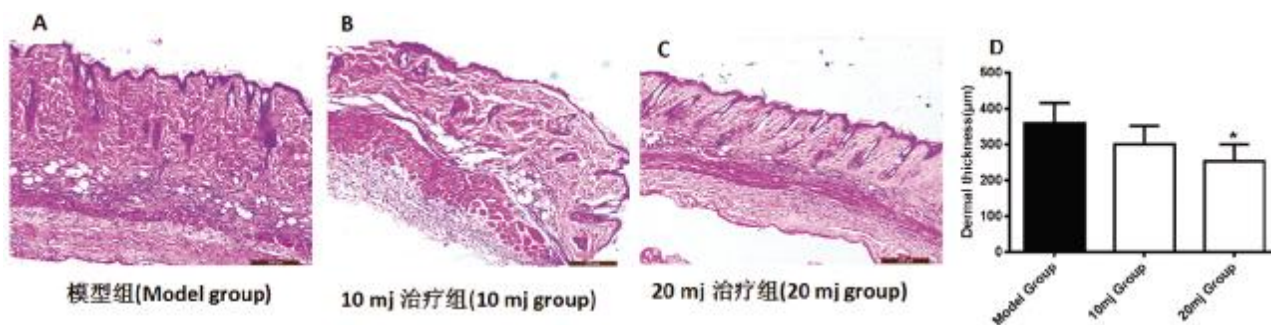


图 4 各组小鼠皮肤组织 HE 染色结果

Fig.4 HE staining in mice skin tissue of each group

Note: The scale bar represents 200 μm .

2.3 CO₂ 点阵激光对增生性瘢痕组织中 α -SMA 和 GLi1 表达的影响

以免免疫荧光方法观察小鼠皮肤瘢痕中 α -SMA(绿色)和 Hedgehog 信号通路中的关键分子 GLi1(红色)的表达情况。结

果发现,CO₂点阵激光治疗后小鼠皮肤组织中 α -SMA 和 GLi1 点阵激光治疗的降低程度更为显著(见图 6)。的表达水平明显降低,而与 10 mj 能量比较,20 mj 能量的 CO₂

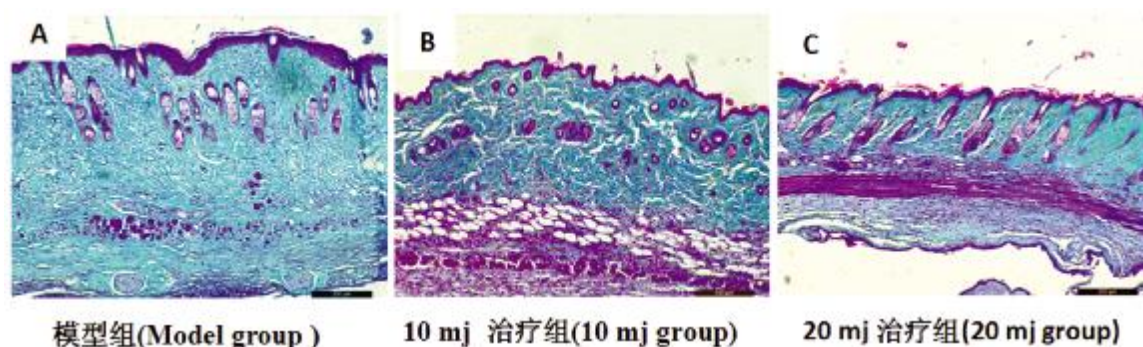


图 5 各组小鼠皮肤组织 Masson 染色结果

Fig.5 Masson staining in mice skin tissue of each group

Note: The scale bar represents 200 μ m.

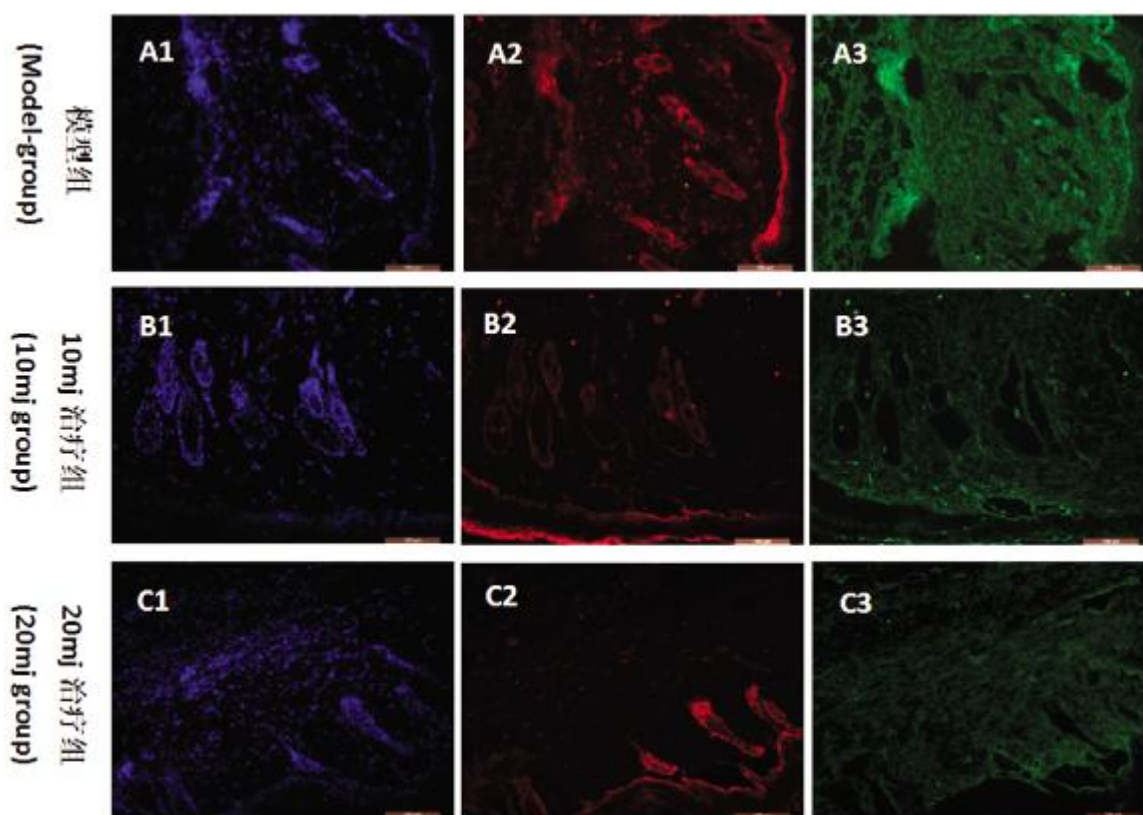


图 6 免疫荧光观察各组小鼠皮肤组织中 α -SMA 和 GLi1 的表达

Fig.6 Expression of α -SMA and GLi1 in mice skin tissues were observed by immunofluorescence

Note: The scale bar represents 100 μ m.

3 讨论

随着激光技术的进步和临床应用经验的累积,目前激光治疗 HS 的研究已成为该领域的热点。当下应用于治疗 HS 的有 CO₂ 激光,非剥脱 1550 铒玻璃激光和脉冲染料激光灯等^[6]。点阵 CO₂ 激光利用热分解作用原理,在瘢痕表面产生矩阵点状排列的微热损伤,从而刺激瘢痕皮肤启动修复程序,最终使包括表皮和真皮在内的全层皮肤发生重建和再生,达到修复治疗目的^[11]。因此,在将来点阵 CO₂ 激光有可能成为 HS 的常规治疗方法,但其确切疗效和相关的机制尚需进一步明确。

有研究证实了点阵 CO₂ 激光在兔耳 HS 模型的疗效,但由于兔耳的软骨部位与人体的增生性瘢痕皮肤软组织解剖结构及组织仿生学的差异,不能提供更为近似的组织基础^[12,13]。除了兔外,目前相关的动物模型还有猪、小鼠等。其中猪与人类的皮肤组织最为接近,但存在成本较高、饲养、管理难等因素^[14]。因此,在本研究中,我们利用 C57BL/6J 小鼠,于小鼠背部注射博来霉素成功复制出类似于人类的 HS 模型。表现为上皮明显增厚,真皮层胶原沉积增加,胶原束增粗,排列不规则,并可见大量炎性细胞浸润,Masson 染色提示有大量成纤维细胞,胶原纤维粗大,漩涡状排列,进一步用免疫荧光染色证实 HS 模型真

皮组织中代表肌成纤维细胞特征的 α -SMA表达显著增多。我们研究发现点阵CO₂激光治疗可有效修复小鼠HS模型的瘢痕组织,减轻瘢痕组织中纤维化程度,降低瘢痕组织中真皮层的厚度。

目前HS的机制尚未完全明确,公认的以炎症免疫机制为主,涉及多种细胞,包括免疫细胞:B淋巴细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞,成纤维细胞和血管内皮细胞等^[15-17]。细胞在经免疫炎症损伤以后释放多种细胞因子参与半盒组织形成,包括转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)^[18],血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)^[19]和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors, IGFs)^[20]等。上述细胞因子相互作用,相互影响,在HS的发生、发展中扮演重要的角色。在细胞的相互作用中,上皮细胞和间充质细胞,血管内皮细胞同样发挥一定的作用。例如,上皮细胞通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、TGF- β /Smad信号通路的激活等促进纤维化和瘢痕形成^[21-23]。

近年的研究报道表明,随着肝、肾、心肌纤维化、瘢痕的形成过程中Hedgehog通路机制的Gli1蛋白表达增多^[5]。应用环巴胺特异阻断Hedgehog信号通路后兔耳增生性瘢痕内血管内皮生长因子(VEGF)、 α -SMA、I型胶原蛋白表达降低,瘢痕增生得到抑制,提示阻断Hedgehog信号通路将可能成为一种治疗增生性瘢痕的理想的、有效的方法^[14]。Gli1最初在人胶质细胞瘤(glioma)中发现并因此而得名。Gli家族是锌指结构的转录因子,在脊椎动物中Gli家族成员有Gli1, Gli2, Gli3。3种蛋白具有不同的转录调节功能。Gli1是Hedgehog信号通路的效应分子,能被该通路激活,激活的Gli1转入核内,调节基因表达,介导系列的生物效应^[24-26]。本研究利用免疫荧光的方法观察博来霉素诱导的小鼠HS模型与Hedgehog信号通路中的Gli1蛋白表达是否有相关性以及点阵CO₂激光治疗HS的疗效是否亦与该通路相关。我们的研究结果发现,在以博来霉素诱导的HS小鼠模型的皮肤真皮层中Hedgehog信号激活,表现为Gli1蛋白表达显著增多,而经点阵CO₂激光治疗后Gli1蛋白的表达显著下降,提示其作用机制与抑制该信号通路相关。

本研究证实,采用博来霉素于小鼠的背部皮肤注射造模可较好地建立HS模型;CO₂点阵激光为治疗HS一种有效的治疗方式,与其他方法合用可提高HS的疗效。其对小鼠HS模型的作用可能与调节Hedgehog信号通路机制的Gli1蛋白表达有关,确切的机制尚需进一步明确。目前,对瘢痕组织的修复治疗是一个难题,CO₂点阵激光无论在临床还是在动物实验中均体现了良好的疗效,但目前单一的治疗手段对于瘢痕组织的修复效果任然欠佳,因此目前联合治疗可能是一种有益的尝试。

参考文献(References)

- [1] 王达利.增生性瘢痕防治的研究进展与方向[J].中华损伤与修复杂志(电子版), 2017, 12(04): 247-253
- [2] Amini-Nik S, Yousuf Y, Jeschke MG. Scar management in burn injuries using drug delivery and molecular signaling: Current treatments and future directions[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 123: 135-154
- [3] Wang X, Wu X, Liu K, et al. Topical cryoanesthesia for the relief of pain caused by steroid injections used to treat hypertrophic scars and keloids[J]. Noertjojo. K, ed. Medicine, 2017, 96(43): e8353
- [4] 张燕,海洪宇,王莹.建立增生性瘢痕动物模型的研究进展[J].中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(02): 67
- [5] 周思政,李青峰.皮肤创伤愈合和增生性瘢痕动物模型的研究进展[J].组织工程与重建外科杂志, 2018, 14(01): 48-52
- [6] 雷颖,吴潮帆,李文志,等.激光治疗增生性瘢痕的新进展[J].中国激光医学杂志, 2018, 27(03): 225-227
- [7] Żakowski T, Nachulewicz P, Mazgaj M, et al. A new CO₂ laser technique for the treatment of pediatric hypertrophic burn scars: An observational study[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(42): e5168
- [8] 武艳,冯长江,恩和吉日嘎拉,等.骨髓间质干细胞对小鼠皮肤瘢痕形成的抑制作用观察[J].解放军医学杂志, 2013, 38(01): 34-38
- [9] Ferreira AM, Takagawa S, Fresco R, et al. Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(8): 1900-1908
- [10] Chen X, Shi C, Cao H, et al. The hedgehog and Wnt/ β -catenin system machinery mediate myofibroblast differentiation of LR-MSCs in pulmonary fibrogenesis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 639
- [11] Azzam OA, Bassiouny DA, El-Hawary MS, et al. Treatment of hypertrophic scars and keloids by fractional carbon dioxide laser: a clinical, histological, and immunohistochemical study [J]. Lasers Med Sci, 2016, 31(1): 9-18
- [12] 欧阳华伟,谭军,李高峰,等.点阵CO₂激光治疗兔耳增生性瘢痕后P物质的变化[J].中国美容医学, 2015, 24(18): 31-34
- [13] 李军,王育斌,陈维,等.点阵CO₂和脉冲染料激光联合治疗对兔耳增生性瘢痕的影响 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(04): 621-624
- [14] Böhm M, Stegemann A. Bleomycin-induced fibrosis in MC1 signalling-deficient C57BL/6J-Mc1r (e/e) mice further supports a modulating role for melanocortins in collagen synthesis of the skin [J]. Exp Dermatol, 2014, 23(6): 431-433
- [15] 周游,王婷,于尔特.增生性瘢痕形成的病理机制和当代治疗现状[J].解剖科学进展, 2016, 22(04): 432-435
- [16] Zhou J, Zhao Y, Simonenko V, et al. Simultaneous silencing of TGF- β 1 and COX-2 reduces human skin hypertrophic scar through activation of fibroblast apoptosis [J]. Oncotarget, 2017, 8 (46): 80651-80665
- [17] Connolly D, Vu HL, Mariwalla K, et al. Acne Scarring—Pathogenesis, Evaluation, and Treatment Options [J]. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology, 2017, 10(9): 12-23
- [18] Wang YW, Liou NH, Cheng JH, et al. siRNA-targeting transforming growth factor- β type I receptor reduces wound scarring and extracellular matrix deposition of scar tissue[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134 (7): 2016-2025
- [19] Finnerty CC, Jeschke MG, Branski LK, et al. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge following burn injury [J]. Lancet (London, England), 2016, 388(10052): 1427-1436
- [20] Friks J, Merl-Pham J, Plesnila N, et al. Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury [J]. EMBO Reports, 2018, 19(5): e45294
- [21] Barnes LA, Marshall CD, Leavitt T, et al. Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing: Emerging Therapies to Minimize Scar Formation[J]. Advances in Wound Care, 2018, 7(2): 47-56

(下转第 221 页)

利于充分染色,也不会因为样本太厚而增加 CSLM 扫描难度。分泌物较多的部位为 CRS 病变部位,能更准确地反映鼻窦黏膜中 BBF 的真实情况。其次,标本取下后立即置入 DMEM 培养液中保存和运送,减少运送过程中细胞和细菌的死亡。第三,在 CSLM 下观察 BBF 时,先用 20 倍镜定性 BBF,对于 BBF 可疑阴性的标本,要全层扫描标本确保没有遗漏 BBF 结构,再以 63 倍镜对 BBF 进行定量分析。这些操作细节有助于增加 BBF 的检出率,还原 CRS 患者鼻窦黏膜中 BBF 的真实情况。

BBF 对抗生素有显著的耐药性,难以通过标准的抗菌治疗根除。诸多治疗方法正在研发中,包括局部抗菌剂、表面活性剂、渗透利尿剂和大环内酯类抗生素,以及茶树油、光动力疗法和脉冲式超声治疗^[18-20]。每种治疗方法都被证明在特定情况下有效,然而并无一种普遍适用的治疗方法,这就要求临床个体化治疗以使患者真正受益。BBF 评分系统将所有 CRS 患者细分为 5 个亚组,其与 SNOT-20 症状评分、内镜评分、病程等指标存在显著的相关性,并且明显优于 BBF 定性检测,有助于 CRS 患者个体化抗 BBF 治疗方案的制定。本研究利用无菌生理盐水代替无菌超纯水进行标本制备,得到了质量更好的观测图像,更为真实地反应 BBF 评分,有助于指导临床个体化治疗。

4 结论

现行的 BacLight/CSLM 操作要求使用超纯水进行标本配置,超纯水的低渗作用使鼻窦黏膜细胞大量减少、细胞和 BBF 结构更为分散,干扰了对鼻窦黏膜中的细胞形态和 BBF 的观察。在 BacLight/CSLM 法检测 BBF 的流程中使用无菌生理盐水代替超纯水进行样本制备,能够更真实地反映鼻窦黏膜中 BBF 的形态,避免 BBF 评分被低估。该改进对于 CRS 患者的抗 BBF 治疗及发病机制研究具有重要的价值。

参考文献(References)

- [1] Sedaghat AR. Chronic rhinosinusitis [J]. Am Fam Physician, 2017, 96(8): 500-506
- [2] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(1): 7-11
- [3] Karunasagar A, Garag SS, Appannavar SB, et al. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis and their implications for clinical management [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2018, 70(1): 43-48
- [4] Di Luca M, Navari E, Esin S, et al. Detection of biofilms in biopsies from chronic rhinosinusitis patients: in vitro biofilm forming ability and antimicrobial susceptibility testing in biofilm mode of growth of isolated bacteria[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1057: 1-27
- [5] Li H, Wang D, Sun X, et al. Relationship between bacterial biofilm and clinical features of patients with chronic rhinosinusitis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 269(1): 155-163
- [6] Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2003, 129(3 Suppl): S1-32
- [7] Marcuzzo AV, Tofanelli M, Boscolo Nata F, et al. Hyaluronate effect on bacterial biofilm in ENT district infections: a review [J]. APMIS, 2017, 125(9): 763-772
- [8] Długaszewska J, Leszczynska M, Lenkowski M, et al. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016, 273(8): 1989-1994
- [9] Berne C, Ellison CK, Ducret A, et al. Bacterial adhesion at the single-cell level[J]. Nat Rev Microbiol, 2018
- [10] Larue AE, Swider P, Duru P, et al. Quantitative 3D comparison of biofilm imaged by X-ray micro-tomography and two-photon laser scanning microscopy[J]. J Microsc, 2018
- [11] Ruangcharoen S, Suwannarong W, Lachica M, et al. Killing activity of LFchimera on periodontopathic bacteria and multispecies oral biofilm formation in vitro[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2017, 33(9): 167
- [12] Kinnari TJ, Lampikoski H, Hyyrynen T, Aarnisalo AA. Bacterial biofilm associated with chronic laryngitis [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 138(5): 467-70.
- [13] Arild Danielsen K, Eskeland Ø, Fridrich-Aas K, et al. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis; distribution and prevalence[J]. Acta Otolaryngol, 2016, 136(1): 109-112
- [14] Singhal D, Jekle A, Debabov D, et al. Efficacy of NVC-422 against Staphylococcus aureus biofilms in a sheep biofilm model of sinusitis [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2012, 2(4): 309-315
- [15] Lampikoski H, Aarnisalo AA, Jero J, et al. Mastoid biofilm in chronic otitis media[J]. Otol Neurotol, 2012, 33(5): 785-788
- [16] Wu X, Zhang Y, Chen X, et al. Inflammatory immune response in rabbits with Staphylococcus aureus biofilm-associated sinusitis[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2018
- [17] Božić DD, Pavlović B, Milovanović J, et al. Antibiofilm effects of amoxicillin-clavulanic acid and levofloxacin in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2018, 275(8): 2051-2059
- [18] Herget K, Frerichs H, Pitzner F, et al. Functional enzyme mimics for oxidative halogenation reactions that combat biofilm formation [J]. Adv Mater, 2018, e1707073
- [19] Li XH, Lee JH. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy[J]. J Microbiol, 2017, 55(10): 753-766
- [20] Hu X, Huang YY, Wang Y, et al. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections [J]. Front Microbiol, 2018, 9(1299)
- [21] Wound Care, 2018, 7(2): 29-45
- [22] Liu B, Liu Y, Wang L, et al. RNA-seq-based analysis of the hypertrophic scarring with and without pressure therapy in a Bama minipig model[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 11831
- [23] Ogawa R. Recent Advances in Scar Biology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1749
- [24] Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, et al. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions [J]. Advances in
- [25] Zhao J-C, Zhang B-R, Hong L, et al. Extracorporeal shock wave therapy with low-energy flux density inhibits hypertrophic scar formation in an animal model [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(4): 1931-1938
- [26] Goyal A, Linskey KR, Kay J, et al. Differential Expression of Hedgehog and Snail in Cutaneous Fibrosing Disorders: Implications for Targeted Inhibition[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(6): 709-717

(上接第 248 页)