

增生性瘢痕裸鼠模型的组织形态学特征

祁少海¹, 利天增¹, 何洁华², 黄文革³, 吴义方³, 谢举临¹, 賁晓松¹

(中山医科大学 1. 附属第一医院烧伤科, 广东 广州 510080; 2. 肿瘤医院病理科, 广东 广州 510060;
3. 电镜室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】建立人增生性瘢痕(HTS)裸鼠模型和观察瘢痕组织形态学变化特点。【方法】将 HTS 移植至裸鼠的皮下, 采用光镜、电镜和免疫组化方法观察移植后的 HTS 的形态学、T 淋巴细胞、巨噬细胞和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的分布变化特点。【结果】术后裸鼠全部成活, 植入的瘢痕无坏死。在 6~7 周内均能保持其原有的组织结构。光镜、电镜观察成纤维细胞(FB)内含丰富的粗面内质网、线粒体; 移植后瘢痕组织中的 T 淋巴细胞、巨噬细胞细胞分布和 TGF- β_1 免疫反应强度与移植前相似。【结论】在裸鼠体内建立的 HTS 模型是一个可行和可靠的动物模型, 移植的 HTS 在 6~7 周内仍能保持其原有的组织形态特征。

关键词: 瘢痕, 肥大性/病理学; 疾病模型, 动物; 小鼠, 裸

中图分类号: R644 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0123-04

Morphological Characteristics of Human Hypertrophic Scar in an Animal Model of Nude Mice

QI Shao-hai¹, LI Tian-zeng¹, HE Jie-hua², HUANG Wen-ge³, WU Yi-fang³, XIE Ju-lin¹, BEN Xiao-song¹

(1. Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences (SUMS),
Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pathology, Cancer Center, SUMS, Guangzhou 510060, China;
3. Department of Electron Microscopes, SUMS, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To establish a model of human hypertrophic scars in nude mice and to investigate its morphological characteristics of the scars. 【Methods】Human hypertrophic scars were implanted subcutaneously in the nude mice. The morphological changes were observed using light and electron microscopes. T lymphocytes, macrophages and TGF- β_1 in the implanted scars were demonstrated by immunohistochemical staining, and the variation were analyzed. 【Results】All the mice survived after implantation of human hypertrophic scars. No necrosis was found in the implanted scars under the light microscopy. The original morphology of the scars was maintained at sixth and seventh weeks after transplantation. Demonstrated by electron microscopy, the fibroblasts in the scars contained rich rough endoplasmic reticula and mitochondria. There were no changes of density of infiltrated T lymphocytes and macrophages. Immunohistochemically, TGF- β_1 reaction was stronger in the scars implanted than in control. 【Conclusions】Implantation of human hypertrophic scars in nude mice was feasible and reliable animal model for scar study. There is no morphological variation in the human hypertrophic scars in nude mice until 6~7 weeks after implanting.

Key words: cicatrix, hypertrophic; disease model, animal; mice, nude

增生性瘢痕(HTS)是烧伤整形科的难题, 常引起毁容、功能障碍。HTS 仅见于人类, 到目前为止尚无动物皮肤损伤自然遗留 HTS 的报道。因

此, 建立人 HTS 动物模型, 对研究瘢痕形成、发展规律、防治等有重要意义。裸鼠, 无胸腺、缺乏 T 淋巴细胞, 在其体内制作瘢痕模型是可能的。本研究

收稿日期: 1999-08-25

基金项目: 广东省医学联合攻关基金资助项目(989004)、中医药管理局基金资助项目(98384)

作者简介: 祁少海(1965-) 男, 广东东莞人, 硕士, 主治医师

观察裸鼠移植人 HTS 的形态学、T 淋巴细胞、巨噬细胞和 TGF- β_1 分布的变化,找出模型较稳定的和适合用药的时间,为 HTS 的研究提供基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

HTS 来源于手术切除的同一病人面部全层瘢痕。瘢痕发红、坚硬,高出于正常皮肤。主要试剂: RPMI 1640 培养基系美国 GIBCO 公司生产。CD3 为抗人多克隆抗体, CD68 为鼠抗人单克隆抗体, TGF- β_1 为鼠抗人多克隆抗体,均为 DAKO 产品。

1.2 实验动物

裸鼠,为单纯 T 淋巴细胞缺陷(BALB/c-nunu 品系),选 6~8 周龄裸鼠,雌雄不拘。动物由中山医科大学实验动物中心提供。

1.3 动物模型的制备

按 Shetlar^[1]方法进行。将 HTS 切成 0.7 cm \times 0.5 cm \times 0.2 cm 大小,立即放置于 RPMI 1640 + 双抗(青霉素 0.1×10^6 U/L、链霉素 0.1×10^6 U/L)组织培养液中。3 h 后,将瘢痕组织块移植于 30 只 6 周龄裸鼠背部肩胛内侧皮下。

1.4 形态学的观察

1.4.1 大体形态观察 在移植后的不同时间,观察 HTS 动物模型的体积变化、硬度、存活率、排斥反应、感染率。将移植后不同时间的瘢痕从裸鼠皮下取出,记录瘢痕组织移植前后的体积,作 HE 和 Masson 染色。

1.4.2 光镜观察 移植前后瘢痕组织成纤维细胞(FB)培养的比较:手术切下的 HTS 组织在无菌条件下经漂洗,剪碎,接种于含 $\varphi = 20\%$ 新生小牛血清

RPMI 1640 培养液的培养瓶中,置 37°C , $\varphi = 5\%$ CO₂ 原代培养。待细胞接近融合时经胰酶消化传代。Gimesa 染色:将 FB 接种于盖玻片上,加入含 $\varphi = 20\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,培养 24 h,然后用无水乙醇固定, Gimesa 染色,在光镜下观察。

1.4.3 透射电镜观察 将瘢痕组织和培养的 FB 用戊二醛固定及磷酸缓冲液冲洗。再经锇酸固定及双蒸水冲洗,丙酮脱水,包埋、切片、醋酸铀染色后在透射电镜下观察。

1.4.4 免疫组化检查 ①移植前后瘢痕组织内 T 淋巴细胞、巨噬细胞免疫组化染色: $4\ \mu\text{m}$ 切片,常规脱蜡水化, PBS 洗 3 次, 5 min, $\varphi = 3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 室温 10 min, PBS 洗 3 次, 5 min, 正常血清室温 20 min, 一抗为 CD3 (1:100) 或 CD68 (1:200), 过夜, Biotin-IgG 和 HRP-SP 各 37°C 45 min, DAB 显色, Mayer 苏木素复染,脱水、透明、封片。在光镜下观察组织结构及细胞特异性染色。DAB 显色的阳性信号呈棕黄色。②移植前后瘢痕组织内 TGF- β_1 的变化: $4\ \mu\text{m}$ 厚度切片,免疫组化染色(LSAB 法),稀释度为 1:50, DAB 显色, Mayer 苏木素复染。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 7.5 for Win 进行方差分析。

2 结 果

2.1 移植前后瘢痕组织的形态学改变

裸鼠全部存活,可触及裸鼠背部肩胛内侧皮下瘢痕结节,质硬,活动,与皮肤结合紧密,没有观察到排斥反应。切开皮肤,见瘢痕有包膜覆盖,包膜上有丰富的小血管网。HTS 移植后的体积变化见表 1。

表 1 HTS 移植后的体积变化($V_{\text{HTS}} / \text{cm}^3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Change of hypertrophic scars size after transplantation

$n^{1)}$	The time after implanted (t/d)						
	0	21	30	42	45	50	60
$V_{\text{HTS}} / \text{cm}^3$	0.072 \pm 0.0033	0.064 \pm 0.003 ²⁾	0.062 \pm 0.0026 ²⁾	0.061 \pm 2.3 ²⁾	0.053 \pm 0.0041 ³⁾	0.026 \pm 0.002	0.020 \pm 0.002

1) $n = 6$, Referred to the numbers of the scars; 2) $P > 0.05$; 3) $P < 0.05$

瘢痕组织移植 21、30、42 d 的平均体积的差异与移植前无统计学意义,移植 42 d 后瘢痕组织体积逐渐变小,与移植前比较其差异有统计学意义。HE 染色、Masson 染色光镜下,瘢痕组织外周有纤

维性包膜,包膜内血管向瘢痕内延伸,这种现象在 Masson 染色中相当清楚;移植的 HTS 在 45 d 内均能保持其原有的螺旋状胶原纤维和典型的结节状胶原融合,细胞丰富;随着时间的延长(超过 50 d),

瘢痕体积明显缩小, 细胞成分减少, 胶原密度降低, 胶原束变小, 血管数减少, 闭塞, 瘢痕组织出现钙化(图1,2)。

2.2 透射电镜观察

植入的 HTS 在 45 d 内 FB 含丰富的粗面内质网、线粒体。巨噬细胞和肥大细胞少见。瘢痕中还有一定数量的肌成 FB, 周围胶原束粗大。瘢痕组织移植时间越长, 纤维细胞增多, 胶原间质变得疏松, 粗面内质网少、脱颗粒, 线粒体肿胀、空泡化(图3,4)。

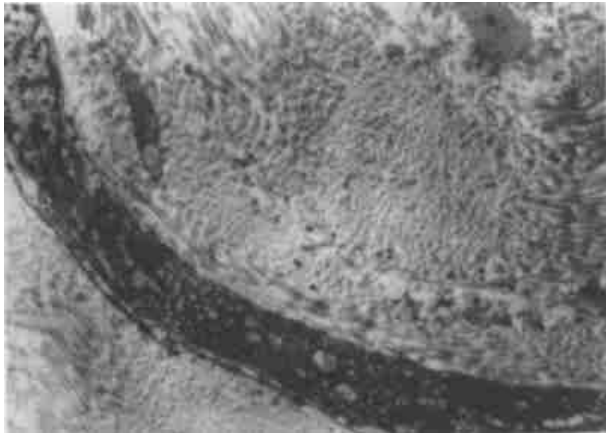


图3 瘢痕移植 21 d 组织切片(TEM $\times 2\ 950$)

Fig. 3 Section of implant of hypertrophic scar after 21 d

After implantation 21 d the fibroblasts in scars contained rich rough endoplasmic reticula and mitochondria



图4 瘢痕移植 50 d 组织切片(TEM $\times 2\ 950$)

Fig. 4 Section of implant of hypertrophic scar after 50 days

After implantation 50 d, the fibroblasts in scars contained few rough endoplasmic reticula and mitochondria

2.3 移植前后瘢痕组织 FB 培养的比较

移植前和移植后 30 d 培养的 FB, 倍增时间相同; 用 Gimesa 染色, 移植前后的 FB 形态未见有不同, 胞浆丰富, 核分裂相多见; 透射电镜下, FB 内含丰富的粗面内质网、线粒体。

2.4 T 淋巴细胞浸润的免疫组化染色结果

将 HTS 组织移植于裸鼠后, 原瘢痕组织内 T 淋巴细胞浸润无明显减少, 在 21 ~ 42 d 内仍然分布广泛, 尤其在部分小血管周围。T 淋巴细胞浸润情况按 1990 年 Martin 等^[2]所采用的方法进行比较, 结果见表 2。

表2 瘢痕组织内 T 淋巴细胞浸润程度

Table 2 T lymphocyte density in hypertrophic scars

HTS	t (after implanted) / d						
	0	21	30	42	45	50	60
T cell ¹⁾	5	4	4	3	3	2	1

1) The same line figures (T cell) represent an arbitrary scale 0 ~ 10(0 referred to no lymphocytes, 10 referred to very dense T cell infiltrate)

巨噬细胞浸润的分布与 T 淋巴细胞相似, 可见围绕血管浸润聚集现象。

2.5 TGF- β_1 在瘢痕组织中的分布

免疫组化结果判断标准^[3,4]: 于相同强度光线下观察同一批免疫组化染色, 分为 3 个等级, 无黄褐色为阴性反应(-), 浅黄褐色为阳性反应(+), 深褐色为强阳性反应(++); TGF- β_1 在瘢痕组织移植前为强阳性反应(++), 移植 21 ~ 42 d 仍为强阳性反应(++), 移植超过 50 d 阳性反应减弱或灶性阳性反应。在 TGF- β_1 阳性反应瘢痕组织中, 多分布在 FB、血管内皮细胞和炎症细胞以及细胞外基质中。

3 讨论

裸鼠是先天性胸腺缺陷的突变小鼠。因胸腺缺陷, 缺乏 T 淋巴细胞^[1]。由于裸鼠有这样的生物学特性, 在其体内进行人类组织移植不会发生排斥, 因此, 在裸鼠体内制作 HTS 动物模型是可行的。Kischer 等^[5]报道初始体积为 5 mm \times 5 mm \times 8 mm 的人瘢痕移植体, 体积随时间的延长而缩小; Estrem^[6]将 1 μ m 厚培养的瘢痕疙瘩 FB 植入裸鼠体内, 生成平均体积为 6.5 mm³ 的包块; 但 Waki^[7]发现, 1 mm 的瘢痕疙瘩在移植后 4 周内体积增大, 然后逐渐缩小。诸作者关于瘢痕在裸鼠体内移植后体积变化的结果不一致, Waki^[7]认为其原因可能与植入瘢痕的大小不同、裸鼠细胞产生胶原酶降解植入物, 供血血管的形成有差异或 FB 丧

失胶原基因调节因子的反馈机制等有关。本实验(表1)显示,增生瘢痕移植后体积有所缩小,2周后维持稳定,这是因为瘢痕移植于皮下,瘢痕与裸鼠未完全建立血运,靠组织液营养,2~3周后完全建立血运,并形成了包囊,瘢痕体积在21~42 d内的变化无统计学差异($P > 0.05$),体积基本维持稳定。超过45 d,体积随时间的延长而很快缩小,差异明显($P < 0.05$),说明移植瘢痕的体积在 $0.7 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm}$ 左右较合适,移植瘢痕太大,瘢痕建立血运困难,组织中间易坏死、钙化;移植瘢痕太小,瘢痕的观察对比不容易,而且其组织量也难以满足其它研究等需要。移植前后的培养瘢痕FB的特性保持不变,具增生活跃、合成旺盛的功能。

HTS的FB发生旺盛增殖活化,与免疫细胞的作用密切相关。Martin^[2]发现T淋巴细胞、巨噬细胞在瘢痕增生时浸润较多。巨噬细胞、T淋巴细胞除参与组织炎症反应外,更为重要的是通过释放多种介质直接或间接影响组织的纤维化或血管化,在组织修复中有重要作用^[8,9]。所释放的细胞因子包括白细胞介素1(IL-1)、FB生长因子(FBF)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)等,这些细胞因子具有促进FB增殖、细胞外基质合成功能。因此,巨噬细胞、T淋巴细胞在HTS中的浸润及其释放多种细胞因子,是HTS形成的重要因素。本实验观察到移植后瘢痕形态学的变化是有阶段性的,HTS移植6~7周内,保持稳定,移植45 d后HTS组织形态开始明显变化,FB减少,胶原密度降低,结构疏松。其原因可能是在6~7周内,原HTS内浸润的T淋巴细胞、巨噬细胞凋亡数目减少较慢,裸鼠T淋巴细胞缺乏,对移植瘢痕反应很轻;移植45 d后,原HTS内浸润的T淋巴细胞、巨噬细胞凋亡较快,随着裸鼠长大,胸腺发育,残余的T淋巴细胞抗移植反应逐渐增强,使瘢痕组织出现明显退化。TGF- β 具有促进FB增殖、细胞外基质合成功能。TGF- β_1 免疫组化结果证实:移植前及移植后45 d内TGF- β_1 在FB、血管内皮细胞呈强阳性反应。瘢痕组织胶原纤维粗大,呈旋涡状,血管丰富。FB

较多,胞浆含丰富的粗面内质网、线粒体。移植50 d后的HTS组织的TGF- β_1 分布呈灶性阳性或弱阳性反应,FB和血管内皮细胞明显减少,胶原纤维变小,排列相对整齐,与成熟瘢痕的结构类似。综上所述,建立HTS裸鼠模型是可行的,移植的HTS在6~7周内能保持其原有的结构特征,适用于各种治疗研究。

(本文图1、2见插页4)

(本实验得到中山医科大学病理教研室文剑明教授的指导和帮助,特在此致以衷心感谢)

参考文献:

- [1] Shetlar M R, Shetlar C L, Hendricks L, *et al.* The used of athymic nude mice for the study of human keloids [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1985, 179(4): 549.
- [2] Martin C W, Muir I F. The role of lymphocyte in wound healing [J]. *Br J Plast Surg*, 1990, 43(6): 655.
- [3] 辛时林, 谷元延. 纤维连接蛋白在增生性瘢痕中的分布及意义的研究 [J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1995, 11(4): 292.
- [4] 黎志明, 利天增. 瘢痕组织中转化生长因子 β 的免疫组化定位研究 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19增刊: 41.
- [5] Kischer C W, Pindur J, Shetlar M R, *et al.* Implasts of hypertrophic scars and keloids into the nude (athymic) mouse: viability and morphology [J]. *J Trauma*, 1989, 29(5): 672.
- [6] Estrem S A, Domayer M, Bardach J, *et al.* Implantation of human keloids into athymic mice [J]. *Laryngoscope*, 1987, 97(10): 1214.
- [7] Waki E Y, Crumley R L, Jakowatz J G. Effects of pharmacologic agents on human keloids implanted in athymic mice [J]. *Arch Otolaryngo Head Neck Surg*, 1991, 117(10): 1177.
- [8] Browder W, Willian P, Lucore P, *et al.* Effect of macrophage function on early wound healing [J]. *Surgery*, 1988, 104(2): 224.
- [9] Barbul A. Immune aspects of wound repair [J]. *Clin Plast Surg*, 1990, 17(3): 433.

(编辑 张敏瑞)

增生性瘢痕裸鼠模型的组织形态学特征 (正文见第 123 页)

Morphological Characteristics of Human Hypertrophic Scar in an Animal Model of Nude Mice (Text in page 123)

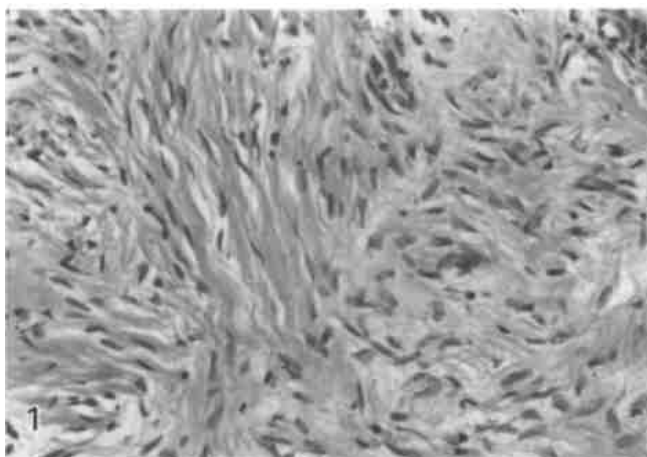


图 1 瘢痕移植 42d 组织切片(HE× 200)

Fig.1 Section of implant of hypertrophic scar after 42 days (HE× 200)

After implantation 42 days there were plenty of fibroblasts and typical collagen nodes in scar tissue

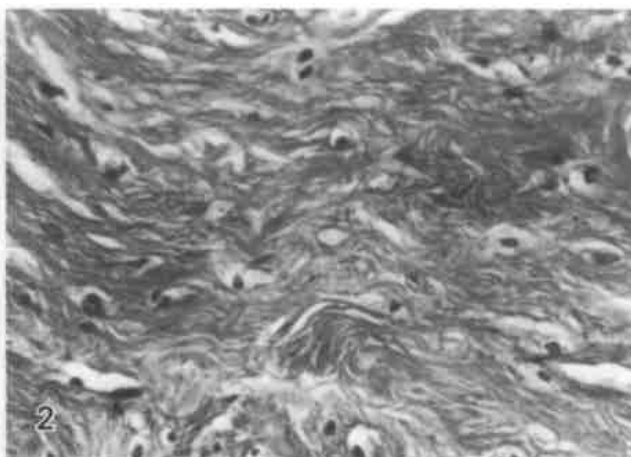


图 2 瘢痕移植 30 d 组织切片(Masson× 100)

Fig.2 Section of implant of Hypertrophic scar after 30 days (Masson× 100)

After implantation 30 days, there were a lot of capillaries vasculars from capsule to scar tissue. Collagen fibers were disorder

非小细胞肺癌 UAGE-3 抗原的表达 (正文见第 127 页)

Expression of MAGE-3 Antigen in Non-small Cell Lung Cancer (Text in page 127)

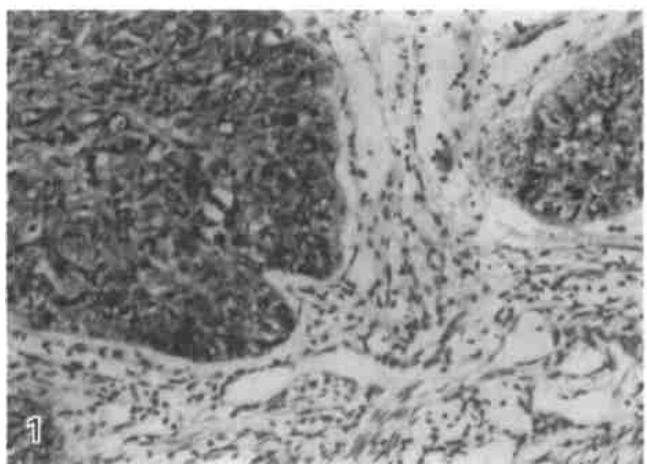


图 1 肺腺鳞癌 MAGE-3 抗原的表达

Fig.1 Expression of MAGE-3 antigen in adeno-squamous cell carcinoma of lung

Immunohistochemistry staining (ISAB) of MAGE-3 antigen, tumor cells were positive(+++), stromal cells were negative(-), 10× 10

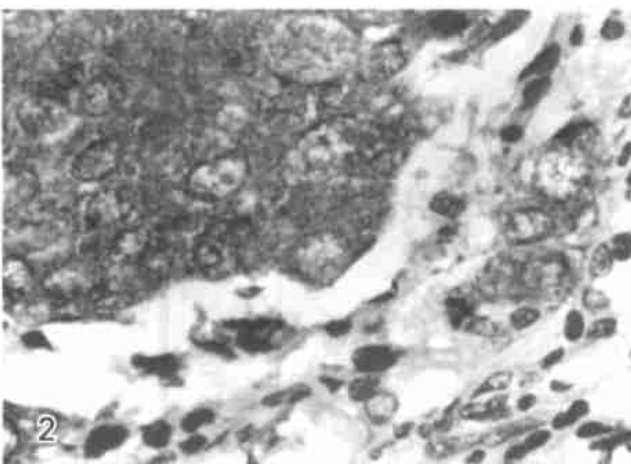


图 2 肺鳞状细胞癌 MAGE-3 抗原的表达

Fig.2 Expression of MAGE-3 antigen in squamous cell carcinoma of lung

Immunohistochemistry staining (ISAB) of MAGE-3 antigen, tumor cells were positive(+++), stromal cells were negative(-), 10× 40