

神经生长因子对瘢痕成纤维细胞生物学特征的影响**☆

袁瑞红¹, 刘流¹, 赵德萍², 徐宏慧¹, 孙家平¹, 王福科¹, 马静¹

Effect of nerve growth factor on biological characteristics of scar fibroblasts

Yuan Rui-hong¹, Liu Liu¹, Zhao De-ping², Xu Hong-hui¹, Sun Jia-ping¹, Wang Fu-ke¹, Ma Jing¹

¹Department of Plastic Surgery, ²Clinical Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Yuan Rui-hong^{*}, Studying for doctorate, Physician, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China yhong2001120@126.com

Correspondence to: Liu Liu, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China liuliu3939@126.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 2005C0072M^{*}; Social Development Research Project of Yunnan Province, No. 2007CA006^{*}

Received: 2009-07-20
Accepted: 2009-08-10

Abstract

BACKGROUND: Nerve growth factor is secreted and synthesized by a variety of cells, such as inflammatory cells and repairing cells, its biological effects are diverse and closely related to the process of wound repair, but its mechanism is not yet clear.

OBJECTIVE: To observe the influence of nerve growth factor on the biological characteristics of scar fibroblasts.

METHODS: Eight clinical surgical resection specimens, including 5 face and neck hyperplastic scar or keloid specimens, did not receive any treatment; three were prepuce specimens following circumcision (normal tissue). By use of tissue block method, the scar and normal skin fibroblasts were cultured, followed by digestion passage. The scar tissue and normal tissue fibroblasts at 3-6 passages in the logarithmic phase were seeded in 96-well plate and divided into the experimental group (scar fibroblast group) and the control group (normal skin fibroblasts group), with two parallel holes in each group were added with 3.33, 0.33 mg/L nerve growth factor, 50 μ L. Inverted microscope was used to observe fibroblast morphology. At 24, 48, 72 hours after culture, the absorbance value was measured using MTT. Fibroblast DNA content and cell apoptosis were determined by flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: The fibroblasts were adherent cells, the scar and normal skin tissues were shown to cell free out of tissue block and gradual expansion at 4-6 days after incubation. Compared with normal skin fibroblasts, the pathological scar fibroblasts became larger, irregular shape and arrangement. MTT results showed that nerve growth factor could promote the normal and hypertrophic scar fibroblasts growth, which becomes more apparent. Flow cytometry results showed that by adding nerve growth factor, the percentage of scar fibroblasts at proliferating S-G₂-M phase was higher than that in the control group, with a lower level of apoptosis. It is indicated that nerve growth factor plays an obviously promoting role on normal and scar skin fibroblasts growth and proliferation, especially on the scar skin.

Yuan RH, Liu L, Zhao DP, Xu HH, Sun JP, Wang FK, Ma J. Effect of nerve growth factor on biological characteristics of scar fibroblasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(7):1208-1212. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 神经生长因子由多种细胞分泌合成, 如炎性细胞、修复细胞等, 其生物学作用呈多样性, 与创伤修复过程密切相关, 但其作用机制尚不明。

目的: 观察神经生长因子对瘢痕成纤维细胞生物学特征的影响。

方法: 8份临床手术切除标本, 其中5份为面颈部增生性瘢痕或瘢痕疙瘩标本, 未接受过任何治疗; 3份为包皮环切术切除的包皮标本(正常组织)。采用组织块法培养瘢痕及正常皮肤成纤维细胞, 消化法传代。取3~6代对数生长期瘢痕组织及正常组织成纤维细胞, 接种于96孔培养板中, 设置实验组(瘢痕成纤维细胞组)和对照组(正常皮肤成纤维细胞组), 每组设两个平行孔, 分别加入3.33, 0.33 mg/L神经生长因子各50 μ L。采用倒置显微镜观察成纤维细胞形态。培养24, 48, 72 h后, MTT测定各孔的吸光度。流式细胞术分析成纤维细胞DNA含量及细胞凋亡情况。

结果与结论: 成纤维细胞为贴壁生长型细胞, 瘢痕和正常皮肤组织块在接种后4~6 d可见细胞从组织块中游出, 逐渐向周围扩展。与正常皮肤成纤维细胞相比, 病理性瘢痕成纤维细胞体积较大, 形态和排列不规则。MTT结果显示, 神经生长因子可促进正常及瘢痕成纤维细胞的生长, 后者更为明显。流式细胞术测定结果显示, 加入神经生长因子后, 瘢痕成纤维细胞增殖期S-G₂-M细胞百分数高于对照组, 且凋亡水平降低。提示神经生长因子对正常及瘢痕皮肤成纤维细胞的生长趋势与增殖活性有明显的促进作用, 对瘢痕皮肤的作用更明显。

关键词: 瘢痕; 细胞因子; 成纤维细胞; 创伤愈合; 皮肤组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.07.016

袁瑞红, 刘流, 赵德萍, 徐宏慧, 孙家平, 王福科, 马静. 神经生长因子对瘢痕成纤维细胞生物学特征的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1208-1212. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

病理性瘢痕在临床上发病率较高, 目前比较一致的看法是瘢痕疙瘩是一个复杂的病变, 与许多基因相关^[1-2]。瘢痕疙瘩和增生性瘢痕是成纤维细胞密度和细胞外基质物质增加的结果。表皮角质形成细胞之间的相互作用和真皮成纤维细胞在调节和稳态瘢痕形成中发挥重要作用, 瘢痕疙瘩和增生性瘢痕是相同的过程中的两个不同阶段^[3-4]。近年的大量研究已表明, 创伤部位细胞的多样性和合成活性由各种生长因子调节, 即生长因子参与了创伤修复的调控过程^[5]。生长因子大量释放, 迅速扩散, 并被蛋白酶降解, 新的生长因子又从趋化而来的细胞中合成, 另外, 细胞间基质也影响生长因子的作用, 影响其溶解性及储存。因此, 在创伤修复的一系列过程中, 生长因子起着关键性的作用。研究表明, 在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中Fas、p53、Caspase-3和Caspase-9的表达均低于正常皮肤, 而Bcl-2的表达则高于正常, 这就导致细胞的凋亡受阻, 形成增生性瘢痕^[6-8]。在增生性瘢痕中由于肌成纤维细胞凋亡基因的表达较正常创口低, 促使瘢痕收缩进而挛缩, 影响功能和外观^[9-11]。基于上述原因, 临床及实验均将治疗瘢痕的重点放在抑制成纤维细胞的增生上。

神经生长因子可由多种细胞分泌合成, 如炎症细胞、修复细胞等, 其生物学作用具有多样性, 均与创伤修复过程有密切关系, 但其作用机制尚不明了。基于以上结果, 作者进行了更深入的研究。

1 材料和方法

设计: 对比观察体外细胞学实验。

时间及地点: 于2007-08/2009-12在昆明医学院第一附属医院完成。

材料:

组织标本: 实验组织取自8例临床手术切除标本, 其中5例为增生性瘢痕或瘢痕疙瘩, 均未接受过任何治疗, 3例为包皮环切术切除的包皮, 所有患者均无全身器官性疾病。其中男6例, 女2例; 年龄4~32岁, 平均17岁; 瘢痕病程1~14年, 平均4年。瘢痕取材部位: 均取自面颈部。标本采集前征得患者及其家属知情同意。

实验药品、试剂及仪器:

药品、试剂及仪器	来源
DMEM 培养基	美国 GIBCO 公司
新生胎牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
胰蛋白酶	美国 sigma 公司
EDTA、PBS(pH7.2-7.4)液、D-Hank's 液(pH7.2-7.4)	自配
神经生长因子	武汉海特生物制药股份有限公司
MTT 溶液	中山公司
超净工作台	杭州净化设备公司
CO ₂ 培养箱	德国 Heraeus 公司
倒置显微镜, 高速离心机	HERMLE 公司
NH.WZI.CU600 电热恒温水浴箱	上海医疗器械七厂
ELX-800 酶标检测仪	BIO-TEK 公司
血球计数仪, XMT-7000 型烤箱	上海实验仪器总厂
一次性 96 孔培养板	FAICON 公司

实验方法:

瘢痕和正常皮肤成纤维细胞原代培养及传代^[12-15]: 成纤维细胞为贴壁细胞, 进行组织块培养。将组织置于无菌生理盐水中漂洗 10 min, 尽量去除组织所附血液; 置于200 U/mL青霉素、200 mg/L链霉素双抗液培养皿中漂洗 10 min; 用眼科剪完全修去表皮及皮下组织, 将组织块剪成1.0~2.0 mm³左右的小组织块; 将小组织块用眼科镊送入50 mL培养瓶中, 在瓶壁上均匀摆置, 间距5 mm, 翻瓶放置于37 °C、体积分数5% CO₂孵箱中静置2 h, 让组织块与瓶壁粘附; 翻瓶, 加入含体积分数10%新生胎牛血清及100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素双抗液的完全DMEM培养液(pH为7.2~7.4), 于37 °C、体积分数5% CO₂孵箱中静置培养。

细胞传代: 倒弃瓶内旧培养液; 向瓶内加入0.5~1.0 mL 0.25%胰酶+0.02%EDTA(1:1)的消化液, 轻摇培养瓶, 使消化液流遍所有细胞表面; 将培养瓶置于显微镜下观察, 发现细胞间质回缩、细胞间隙增大后, 立即倒弃消化液(消化时间2~5 min), 加入少许新的完全DMEM培养液终止消化; 用弯头吸管吸取瓶内培养液, 反复轻轻吹打瓶壁细胞及细胞团块, 使之成为单细胞悬液; 进行细胞计数, 以1×10⁹ L⁻¹细胞浓度接种于新的培养瓶中, 继续培养。

神经生长因子对成纤维细胞生长的影响: 实验取培养至3~6代成对数生长期细胞, 调整细胞数为1×10⁹ L⁻¹, 接种于96孔培养板中, 每孔加入单细胞悬液100 μL, 将96孔培养板移入37 °C、体积分数5%CO₂孵箱中培养过夜。取出96孔培养板, 设置实验组(瘢痕成纤维细胞组)

昆明医学院第一附属医院, ¹整形外科, ²临床医学实验研究中心, 云南省昆明市 650032

袁瑞红[☆], 女, 1976年生, 云南省昆明市人, 蒙古族, 昆明医学院在读博士, 医师, 主要从事颌面部整形美容临床和基础研究。
yhong2001120@126.com

通讯作者: 刘流, 教授, 博士, 博士生导师, 昆明医学院第一附属医院, 云南省昆明市 650032
liuliu3939@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2010)07-01208-05

收稿日期:2009-07-20
修回日期:2009-08-10
(20090608009/GW·Y)

和对照组(正常皮肤成纤维细胞组), 每组设两个平行孔, 分别加入质量浓度为3.33, 0.33 mg/L的神经生长因子各50 μ L。将96孔培养板置于37 $^{\circ}$ C、体积分数5% CO₂孵箱中分别培养24, 48, 72 h。

改良四唑盐(MTT)比色试验^[16]: 呈色: 取出96孔培养板, 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 继续培养4 h; 4 h后取出96孔培养板, 每孔加入质量三联液100 μ L, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 继续孵育12~20 h; 比色: 选择540~570 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值。

流式细胞术对瘢痕成纤维细胞DNA含量及细胞凋亡(TUNNEL)的分析: 取6~8代对数生长期细胞, 消化后制成单细胞悬液, 调整细胞数为 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 接种于100 mL培养瓶中。将培养瓶置于37 $^{\circ}$ C、体积分数5% CO₂孵箱中培养过夜。实验组加入终质量浓度为5 μ g/L的神经生长因子, 另一组为对照组, 为不加试剂相同容积的无血清DMEM液细胞组。经处理、采集后用WincycleDNA软件分析, 得出G₀/G₁期、G₂/M期、S期等细胞生长特点。

主要观察指标: 培养24, 48, 72 h后, MTT测定各孔的吸光度。流式细胞术分析瘢痕成纤维细胞DNA含量及细胞凋亡情况。

设计、实施、评估者: 由全体作者共同完成。

统计学分析: 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用SPSS10.0软件包。采用配对t检验和成组t检验, 将实验组(瘢痕成纤维细胞)和对照组(正常皮肤成纤维细胞)进行比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性意义。统计学处理由昆明医学院统计学教研室完成。

2 结果

2.1 瘢痕成纤维细胞体外培养的形态观察 成纤维细胞为贴壁生长型细胞, 在倒置相差显微镜下观察, 瘢痕和正常皮肤组织块在接种后4~6 d可见细胞从组织块中游离, 逐渐向周围扩展开, 细胞的生长排列多呈放射状、栅栏状或旋涡状。与正常皮肤的成纤维细胞相比, 病理性瘢痕的成纤维细胞体积较大, 形态和排列不规则, 见图1。



Figure 1 The growth of cell is adherent, long fusiform and railings shape (Inverted microscope, $\times 200$)
图1 细胞贴壁生长, 长梭形, 呈栅栏状生长(倒置显微镜, $\times 200$)

2.2 MTT比色实验结果 见表1。

表1 生长因子对正常和瘢痕成纤维细胞生长影响的测定结果
Table 1 Influence of growth factor on the normal and scar fibroblast growth ($A_{540 nm}$) ($\bar{x} \pm s, A$)

Group	Nerve growth factor (mg/L)	24 h	48 h	72 h
Normal skin fibroblasts	0	3.02 \pm 0.23	3.10 \pm 0.21	3.37 \pm 0.14
Scar fibroblasts	0	3.10 \pm 0.19	3.09 \pm 0.19	3.32 \pm 0.20
Normal skin fibroblasts	3.33	2.75 \pm 0.40 ^a	3.16 \pm 0.31	3.37 \pm 0.09
Scar fibroblasts	3.33	2.93 \pm 0.17 ^b	3.31 \pm 0.18 ^b	3.18 \pm 0.24 ^b
Normal skin fibroblasts	0.33	2.93 \pm 0.24	3.04 \pm 0.52 ^a	3.30 \pm 0.16
Scar fibroblasts	0.33	2.79 \pm 0.32	2.97 \pm 0.23	3.10 \pm 0.24 ^b

^a $P < 0.05$, vs. normal skin fibroblasts without nerve growth factor; ^b $P < 0.05$, vs. scar fibroblasts without nerve growth factor

结果分析:

正常皮肤:

3.33 mg/L 神经生长因子干预组与未进行生长因子干预的正常皮肤成纤维细胞在24 h 差异有显著性意义($P < 0.05$)。0.33 mg/L 神经生长因子与未进行生长因子干预的正常皮肤成纤维细胞在48 h 差异有显著性意义($P < 0.05$), 其他时间段差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

瘢痕皮肤:

3.33 mg/L 神经生长因子干预组与未进行生长因子干预的正常皮肤成纤维细胞在3 个时间段作用的差异均有显著性意义($P < 0.05$)。0.33 mg/L 神经生长因子与未进行生长因子干预的正常皮肤成纤维细胞只在72 h 差异有显著性意义($P < 0.05$), 其他时间段差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

在同一种质量浓度中观察生长因子对正常皮肤和瘢痕皮肤成纤维细胞之间作用的比较结果显示, 神经生长因子在各个时间段的作用差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 流式细胞术测定结果 见图2。

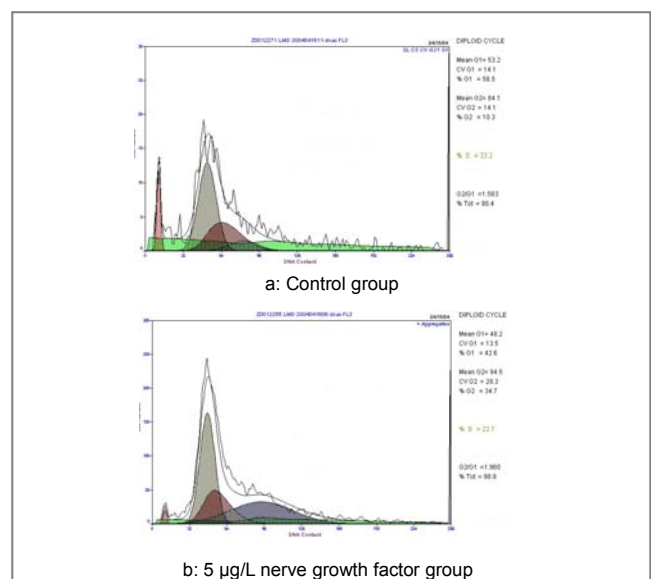
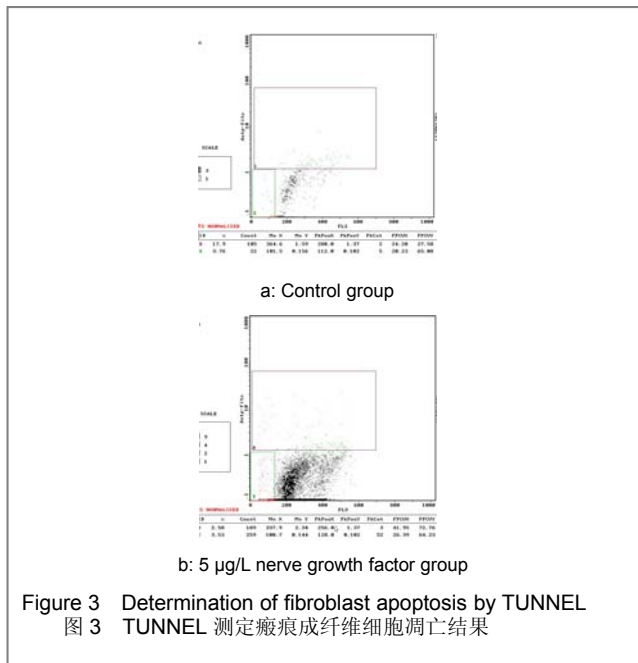


Figure 2 Determinations of fibroblast DNA content by flow cytometry
图2 流式细胞术测定瘢痕成纤维细胞 DNA 含量结果

流式细胞术测定瘢痕成纤维细胞DNA含量结果显示,与对照组(未加入任何影响因素的瘢痕成纤维细胞组)相比,实验组加入神经生长因子后增殖期(S-G₂-M)细胞百分数明显增高,增殖期(S-G₂-M)细胞百分数分别是:对照组:G₁期56.5%,G₂期10.3%,S期33.2%,G₂/G₁=1.583;神经生长因子组:G₁期42.6%,G₂期34.7%,S期22.7%,G₂/G₁=1.96。TUNNEL对细胞凋亡的测定结果显示:与对照组比较,实验组凋亡数明显降低,凋亡数分别为:对照组17.9%,实验组2.58%,见图3。



3 讨论

神经生长因子是神经系统最重要的生物活性分子,除能促进伤后神经纤维的再生外,它还对免疫、造血等非神经系统具有重要的调节作用,可以通过促进免疫、炎性细胞的功能和活性而促进创面愈合,并在创伤后局部痛觉过敏的发生中发挥重要作用。实验表明,增生性瘢痕中存在神经生长因子的异常高水平表达,且神经生长因子创面上皮化后仍可趋化、活化炎性细胞,并促进其增殖及脱颗粒。因此推测^[17],增生性瘢痕内异常高水平的神经生长因子能通过趋化、活化炎性细胞而启动病理性胶原代谢。神经生长因子在增生性瘢痕的病理性胶原代谢中可能发挥了重要的启动作用。高水平的神经生长因子趋化并活化炎性细胞,促进其增殖及释放细胞因子和炎症递质,后者又作用于成纤维细胞,使成纤维细胞功能状态发生改变,合成过量的胶原等细胞外基质,最终导致增生性瘢痕的发生。

现在有学者提出“神经源性炎症假说”,即过度的神经生长因子可诱导感觉纤维过度释放神经肽,从而导

致神经肽的积累,即使在没有机械应力的作用下,仍然能导致瘢痕疙瘩和增生性瘢痕的形成^[18]。有实验表明,羊膜发布大量的基底神经生长因子和转化生长因子β₁和神经生长因子受体的表达。此外,除了神经生长因子的存在,可以大大增加转化生长因子β₁的产生和释放^[19]。神经生长因子中在治疗不同原因造成的溃疡(角膜溃疡,褥疮,后病毒感染,化学烧伤)时,可能缩短恢复进程,是因神经生长因子和/或神经营养因子不同时间过程的受体/大鼠p75(非编码区)的表达,可能调节最后进程。因此,神经生长因子的潜在亲愈合能力的可能调节愈合过程中的一些病理变化^[20]。局部应用神经生长因子可改善韧带愈合促进再生和血管生成,并导致瘢痕增强韧带的力学性能^[21]。在心肌梗死瘢痕愈合的研究中显示,受损的疤痕在的地塞米松治疗愈合后,衰减的瘢痕肌成纤维细胞增殖及神经生长因子的表达,有助于减少梗死区域的神经反应^[22]。有学者应用基因芯片技术研究显示,在瘢痕疙瘩与正常皮肤中,有高表达的转化生长因子β₁和神经生长因子^[23]。

本实验MTT结果显示,3.33 mg/L神经生长因子与未进行生长因子干预正常皮肤成纤维细胞在24 h作用差异有显著性意义($P < 0.05$),0.33 mg/L神经生长因子与未进行生长因子干预正常皮肤成纤维细胞在48 h作用差异有显著性意义($P < 0.05$),其他时间段作用的差异均无显著性意义($P > 0.05$),此结果提示神经生长因子对正常皮肤成纤维细胞在高质量浓度(3.33 mg/L)、短时间(24 h)和低质量浓度(0.33 mg/L)、长时间(48 h)有影响。对瘢痕成纤维细胞的测定结果显示,3.33 mg/L神经生长因子与未进行生长因子干预瘢痕皮肤成纤维细胞在3个时间段差异均有显著性意义($P < 0.05$),0.33 mg/L神经生长因子只有在72 h差异有显著性意义($P < 0.05$),其他时间段差异均无显著性意义($P > 0.05$),此结果提示,瘢痕成纤维细胞对高质量浓度(3.33 mg/L)的神经生长因子比较敏感,且不受时间的限制,而对低质量浓度(0.33 mg/L)的神经生长因子而言,要在较长的时间(72 h)下才对瘢痕成纤维细胞有影响。对同一质量浓度而言,神经生长因子对正常皮肤成纤维细胞和瘢痕成纤维细胞之间在3个时间段的差异无显著性意义($P > 0.05$),此结果显示,神经生长因子对正常皮肤和瘢痕组织中成纤维细胞的作用之间没有明显的差异性,但不代表神经生长因子对两者中的成纤维细胞没有作用。

流式细胞术测定结果显示,加入神经生长因子后,瘢痕成纤维细胞增殖期(S-G₂-M)细胞百分数高于对照组,TUNNEL对细胞凋亡的测定结果显示:与对照组比较,实验组凋亡数明显降低。此结果提示,瘢痕成纤维细胞在生长过程中,对神经生长因子的刺激作用是比较敏感的。

综合以上结果显示,在创伤修复过程中,神经生长

因子在促进炎症细胞聚集的同时, 还促进了成纤维细胞的增殖, 且在瘢痕的形成过程中, 在一定的条件下, 可影响正常皮肤和瘢痕组织的成纤维细胞的增殖, 但后者的敏感性偏高, 因此可以促进创伤的愈合, 但在一定的条件下可能会导致瘢痕组织中成纤维细胞的过度增殖, 导致病理性瘢痕的形成, 这一点有待于进一步的研究。

4 参考文献

- [1] Chen W, Fu XB, Ge SL, et al. Development of gene microarray in screening differently expressed genes in keloid and normal-control skin. Chin Med J (Engl). 2004;117(6):877-881.
- [2] Hu ZF, Gao JH, Li W, et al. Differential gene expression profile of keloids: a study with cDNA microarray. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2006;26(3):308-312.
- [3] Köse O, Waseem A. Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? Dermatol Surg. 2008;34(3):336-346.
- [4] Scheithauer M, Riechelmann H. Basic Mechanisms of Cutaneous Woundhealing. Laryngorhinootologie. 2003;82(1):31-35.
- [5] Molina V, Blank M, Shoefeld Y. Fibrotic diseases. Harefuah. 2002;141(11):973-978.
- [6] 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(4):373-382.
- [7] Kasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, et al. Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts in vitro. Lab Invest. 2000;80(3):345-357.
- [8] Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, et al. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. J Dermatol Sci. 1999;22(1):31-37.
- [9] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen. 2005;13(1):7-12.
- [10] Shin D, Minn KW. The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar. Plast Reconstr Surg. 2004;113(2):633-640.
- [11] Moulin V, Larochelle S, Langlois C, et al. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. J Cell Physiol. 2004;198(3):350-358.
- [12] Luo JM, Wang L. Jiepouxue Yanjiu. 2007; 29(1):33-37. 骆建民, 王俐. 人真皮原代成纤维细胞的培养、鉴定及蛋白酶活性受体的表达[J]. 解剖学研究, 2007;29(1):33-37.
- [13] Wu SH, Luo XB, Zhu B. Shiyong Yufang Yixue. 2005;12(2):406-407. 吴尚辉, 罗学滨, 祝斌. 人瘢痕组织成纤维细胞的培养[J]. 实用预防医学, 2005, 12 (2):406-407.
- [14] Xue B, Wang P, Dong PJ. Jiguang Zazhi. 2007;28(2):95-97. 薛斌, 王璞, 董浦江. 人瘢痕疙瘩成纤维细胞原代培养及生物学行为研究[J]. 激光杂志, 2007, 28 (2):95-97.
- [15] Bian HN, Chen HD, Zheng SY, et al. Zhonghua Shiyuan Waikexue Zazhi. 2007;24(2):161-162. 卞徽宁, 陈华德, 郑少逸, 等. 体外持续培养对瘢痕成纤维细胞胶原合成的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24 (2):161-162.
- [16] SITU ZQ, Wu JZ. Xi'an: World Publishing Corporation. 2000:168-169. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000:168-169.

- [17] Yang DY, Li SR, Li HY. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2000;22(11):1090-1093. 杨东运, 李世荣, 李荟元. 神经生长因子对瘢痕组织中炎性细胞及胶原沉积的影响[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(11):1090-1093.
- [18] Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. Med Hypotheses. 2008;71(1):32-38.
- [19] Coassin M, Lambiase A, Micera A, et al. Nerve growth factor modulates in vitro the expression and release of TGF-beta1 by amniotic membrane. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2006;244(4):485-491.
- [20] Micera A, Lambiase A, Stampachiacciere B, et al. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. Cytokine Growth Factor Rev. 2007;18(3-4):245-256.
- [21] Mammoto T, Seerattan RA, Paulson KD, et al. Nerve growth factor improves ligament healing. J Orthop Res. 2008;26(7):957-964.
- [22] El-Helou V, Proulx C, Gosselin H, et al. Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region. J Appl Physiol. 2008;104(1):150-156.
- [23] Chen W, Fu X, Sun X, et al. Analysis of differentially expressed genes in keloids and normal skin with cDNA microarray. J Surg Res. 2003;113(2):208-216.

来自本文课题的更多信息——

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2005C0072M), 云南省社会发展攻关项目(2007CA006)。

利益冲突: 本文实验过程及结果与任何团体、组织没有任何利益冲突。

实验设计与文章构思: 本实验主要观察了细胞因子(包括 rhIFN- α 、rhIL-2、EGF、bFGF、PDGF、TNF- α 及 NGF)对成纤维细胞生物学行为的影响以及病理改变。其创新性就在于从细胞分子生物学水平探究细胞因子和药物对病理性瘢痕形成与增生的作用机制, 将形态学与细胞分子生物学相结合进行研究。实验过程中采用了比较新的研究方法如免疫组织化学、流式细胞学技术以及一些特殊的病理学染色技术, 并采用透射电镜对细胞的超微结构进行观察, 所得出的结论给以后的研究奠定了一定的基础并对临床治疗有一定的理论指导意义。

实验中所采用的细胞因子, 其对病理性瘢痕形成的作用机制只是其中的一部分, 但瘢痕的形成机制是很复杂的, 受很多方面的影响, 实验仅做了一小部分, 具体的还有待进一步的研究。因此, 课题组将继续向更深入的方面进行, 如从基因的角度研究病理性瘢痕的形成, 血管化在病理性瘢痕形成中的作用, 丹参注射液是哪一种或几种成分作为受体操纵性钙阻滞剂发挥作用等, 最终能为临床提供更有有效的治疗方法奠定可靠的病理学基础。