

张力对小鼠增生性瘢痕形成及羟脯氨酸含量的影响**

杨恒连¹, 肖虎², 冉丽², 李强²

文章亮点: ①实验利用张力制作小鼠瘢痕模型有较大的创新性。②张力可导致小鼠瘢痕增生显著, 羟脯氨酸含量显著增高

关键词: 张力; 瘢痕; 羟脯氨酸; 小鼠; 瘢痕增生; 动物模型; 组织构建

摘要

背景: 张力在细胞增殖、分化、凋亡以及基因表达过程中起着重要的作用。

目的: 观察张力对小鼠增生性瘢痕形成及羟脯氨酸含量的影响。

方法: 4周龄大 C57/BL 小鼠随机分为 2 组, 张力组小鼠背部制作一个 2 cm 长直线性全层皮肤切口, 用尼龙线缝合, 4 d 后拆线, 再用尼龙线将 22-mm 扩张螺丝固定到已经愈合的创面上, 隔日扩张。对照组扩张螺丝不动。分别于伤后 1, 2, 3, 4, 5 周各取 6 只小鼠瘢痕组织观察瘢痕组织厚度、横截面积改变, 测量瘢痕组织羟脯氨酸含量。

结果与结论: 张力组瘢痕增生明显, 其厚度、横截面积显著大于对照组 ($P < 0.01$), 张力组各时间点瘢痕组织羟脯氨酸含量显著高于对照组 ($P < 0.01$)。表明张力导致小鼠瘢痕增生显著, 羟脯氨酸含量显著增高。

¹ 济南消防医院, 山东省济南市 250021; ² 山东大学附属省立医院烧伤整形科, 山东省济南市 250021

杨恒连, 男, 1974 年生, 山东省郓城县人, 汉族, 2002 年山东大学医学院毕业, 主治医师, 主要从事烧伤瘢痕研究。

通讯作者: 肖虎, 博士, 副主任医师, 山东大学附属省立医院烧伤整形科, 山东省济南市 250021
xiao_212@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)46-08685-04

收稿日期: 2012-02-24
修回日期: 2012-03-10
(20111124012/W · T)

Effect of mechanical strain on hypertrophic scar formation and hydroxyproline content in mice

Yang Heng-lian¹, Xiao Hu², Ran Li², Li Qiang²

Abstract

BACKGROUND: Mechanical strain plays a key role in cell proliferation, differentiation, apoptosis and gene expression.

OBJECTIVE: To investigate mechanical strain effects on the formation of hypertrophic scar and hydroxyproline content in mice.

METHODS: Four weeks old C57/BL mice were randomly divided into mechanical strain group and control group. The mice in the mechanical strain group were subjected to a 2-cm full-thickness skin incision, and then sutured with nylon wire. After stitches were taken out at day 4, 222-cm-mm stretching screw was fixed on the healed wound with nylon wire and expanded every other day. While stretching screw in the control group had no treatment. Six mice in each group were collected respectively at weeks 1, 2, 3, 4 and 5 after wounded, and then their hypertrophic scar thickness, cross-sectional area changes and hydroxyproline content in the hypertrophic scar tissues were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, scar hyperplasia in the mechanical strain group was more obvious, besides, the thickness, cross-sectional area of hypertrophic scars was bigger ($P < 0.01$). Hydroxyproline content in the hypertrophic scar tissues of the mechanical strain group was significantly higher than that in the control group at each time point ($P < 0.01$). These results suggest that mechanical strain can result in obvious scar hyperplasia in mice and a significant increase in hydroxyproline content.

Yang HL, Xiao H, Ran L, Li Q. Effect of mechanical strain on hypertrophic scar formation and hydroxyproline content in mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(46): 8685-8688.

0 引言

瘢痕是临床上的难题。病理性瘢痕包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩, 易发生于张力高的部位,

如胸骨前, 肩背部等。临床上常可见到张力高的部位患有瘢痕疙瘩的患者, 在无张力部位存在着正常瘢痕。在组织学上, 病理性瘢痕以过剩的细胞外基质尤其是胶原沉积为特征。

研究表明, 张力通过降低成纤维细胞凋亡

¹Jinan Fire Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China; ²Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Yang Heng-lian, Attending physician, Jinan Fire Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China

Corresponding author: Xiao Hu, Doctor, Associate physician, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China
xiao_212@hotmail.com

Supported by: Medical and Health Science and Technology Development Project for the Youth of Shandong Province, No. 2009QZ023*; Promotive Research Fund for Excellent Young and Middle-aged Scientists of Shandong Province, No. BS2009YY043*

Received: 2012-02-24
Accepted: 2012-03-10

与促进成纤维细胞合成丰富的胶原纤维^[1]。然而其具体机制尚不清楚。实验拟观察张力对小鼠在瘢痕形成的影响,检测瘢痕组织羟脯氨酸含量的动态变化并探讨其机制,有利于临床合理开展瘢痕治疗预防工作。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2007年1月至2010年12月在山东大学附属省立医院中心实验室完成,实验室的生物安全的防护水平为BSL-4,为省部级重点实验室。

材料: 4周龄雌性清洁级C57/BL60只小鼠60只,体质量(16±3) g,山东大学附属省立医院实验动物中心提供。

实验方法:

实验动物及分组: 选用4周龄大C57/BL小鼠60只。随机分为张力组和对照组各30只,每组按照5个时相点,即伤后1, 2, 3, 4, 5周各分为5小组,每小组6只。在张力组小鼠背部制作一个2 cm长直线性全层皮肤切口,用6-0尼龙线缝合并对齐皮缘,4d后拆线,用6-0尼龙线将22-mm扩张螺丝(Great Lakes Orthodontic Products, Tonawanda, NY)仔细固定到已经愈合的创面上,隔日扩张。扩张前,用记号笔在瘢痕两侧标记两点,术后4 d开始小心扩张螺丝2 mm,以后隔日扩张4 mm以增加瘢痕的张力。在扩张的间歇期,由于皮肤的自然伸长,可以观察到皮肤张力逐渐减少,故每隔一日将扩张螺丝扩张以便维持张力。对照组扩张螺丝不动,按照5个时相点,于伤后1, 2, 3, 4, 5周各动物剃毛,瘢痕组织取材。

组织形态学观察: 标本用体积分数10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,利用苏木精-伊红染色,观察瘢痕组织厚度、横截面积改变。

羟脯氨酸含量: 采用比色氯胺T法测量组织羟脯氨酸含量,评定瘢痕增生程度。方法:称取瘢痕10 μg左右于试管中,于105 °C盐酸溶液中水解16 h,稀释该溶液中的羟脯氨酸浓度至0.5–2.0 mg/L,再经氯胺T氧化,最后根据氧化后的羟脯氨酸与对二甲氨基苯甲醛反应生成的红色化合物,在波长558 nm 2 nm处比色。利

用标准曲线计算样品中羟脯氨酸含量。

主要观察指标: 观察瘢痕组织厚度、横截面积以及羟脯氨酸含量。

统计学分析: 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SAS统计软件处理。各组间比较采用Student's t检验。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用小鼠60只,分为2组,无脱失,全部进入结果分析。

2.2 两组瘢痕组织形态学观察结果 大体可见伤后第1周后张力组瘢痕显著高于周围正常皮肤,此硬块不断高出皮面,开始呈淡红色,在伤后第2周增生达到高峰,见图1,增生性瘢痕表面无毛发等皮肤附件;伤后第5周增生性瘢痕色泽变淡,但仍高出皮面。对照组瘢痕增生不明显,颜色接近正常肤色,表面平整,触之质软,见图2。



Figure 1 Hypertrophic scar area in mice was big under gross observation in the mechanical strain group after wounded for 2 wk

图1 张力组小鼠伤后第2周大体观察瘢痕面积较大



Figure 2 Hypertrophic scar area in mice was small under gross observation in the control group

图2 对照组小鼠大体观瘢痕面积较小

2.3 两组瘢痕组织厚度、横截面积改变 光镜下,苏木精-伊红染色显示在术后第1周后张力组瘢痕明显,在伤后第2周增生达到高峰,毛囊

等皮肤附件缺失, 见图3, 伤后第5周瘢痕增生仍明显。对照组瘢痕增生不明显, 见图4。张力组瘢痕增生厚度、横截面积显著大于对照组($P < 0.01$)。

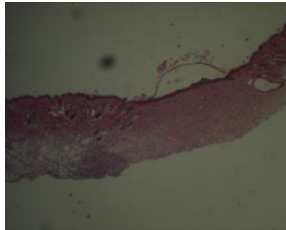


Figure 3 Hypertrophic scar area in mice was big under gross observation in the mechanical strain group after wounded for 2 wk, and hair follicle loss was found (Hematoxylin-eosin staining, $\times 10$)

图3 伤后第2周张力组小鼠瘢痕横截面积较大, 毛囊等皮肤附件缺失(苏木精-伊红染色, $\times 10$)

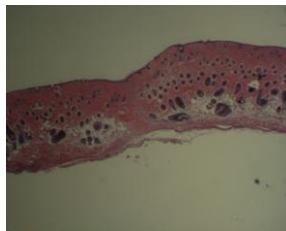


Figure 4 Cross-sectional area of hypertrophic scar in mice was small in the control group (Hematoxylin-eosin staining, $\times 10$)

图4 对照组鼠瘢痕横截面积较小(苏木精-伊红染色, $\times 10$)

2.4 两组瘢痕组织羟脯氨酸含量 张力组小鼠瘢痕羟脯氨酸含量伤后第1周后显著明显高于对照组($P < 0.01$), 在伤后第2周增生达到高峰, 伤后第5周, 仍高于对照组($P < 0.01$), 见表1。

表1 两组小鼠瘢痕羟脯氨酸含量变化
Table 1 Changes of hydroxyproline content in the hypertrophic scar tissues in the two groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, mg/g)

Time (wk)	Mechanical strain group	Control group
1	25.68 $\pm$ 2.29 ^a	13.27 $\pm$ 1.31
2	39.61 $\pm$ 2.27 ^{ab}	15.09 $\pm$ 2.19
3	37.29 $\pm$ 3.56 ^a	14.36 $\pm$ 1.81
4	38.41 $\pm$ 2.92 ^a	15.93 $\pm$ 2.28
5	35.68 $\pm$ 3.40 ^a	14.20 $\pm$ 1.93

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. the previous time point in the same group

3 讨论

组织创伤修复包括再生和瘢痕愈合两种形式, 其中再生一般只发生在低等生物和胚胎早期的创伤, 成人组

组织创伤修复一般通过瘢痕愈合。瘢痕又包括不高出于正常皮肤的非病理性瘢痕(又称正常瘢痕)和高出正常皮肤的病理性瘢痕(又称异常瘢痕)其中多数伤口愈合后表现为病理性瘢痕, 后者又包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩。不论何种类型的瘢痕增生都可能影响外貌与功能, 是整形外科临床上最常见的疾病。研究瘢痕增生机制, 探索有效的防治方法对于减轻或消除瘢痕造成的各种畸形具有十分重要的意义。瘢痕研究一般包括细胞培养、动物模型和临床观察3种方式。其中瘢痕动物模型的复制非常困难, 一直是该研究领域的学者们努力的一个方向。

建立增生性瘢痕的动物模型, 对研究创伤早期愈合、正常愈合瘢痕向增生性瘢痕的演变以及评价增生性瘢痕的各种治疗手段等, 都具有重要意义。有学者将人的瘢痕疙瘩组织块移植于无胸腺鼠(裸鼠)背部皮下内, 植入的瘢痕组织未见排斥现象发生, 60 d 时经组织形态学检查及生化检验证实, 该组织仍保留瘢痕疙瘩特性, 初步发现制作瘢痕疙瘩模型的可行性。将瘢痕疙瘩切成1 cm 厚的薄片, 并培养来自瘢痕疙瘩的成纤维细胞, 分别植入裸鼠的皮下, 发现两2后都生成一皮下硬结, 植入的组织块保持了原来的组织学及生化特点, 并能建立与瘢痕疙瘩相似的血液循环。将人的正常皮肤组织移植于裸鼠背部体表, 1 个月后, 将移植后的人皮肤进行深度烧伤, 连续观测3-6 个月, 结果发现移植皮肤的存活及烧伤创伤愈合过程在大体和镜下观察到的特征均与在人体时相同。裸鼠模型, 除具有免疫缺陷外, 这种裸鼠模型的瘢痕是来源于人, 并非动物自生瘢痕, 因此它并非严格意义上的增生性瘢痕动物模型^[2-4]。

有学者在试验中证实兔耳急性及慢性创面上有明显的真皮过度增生。据此, 他们在兔耳腹侧面制作深及软骨层的全层皮肤缺损创面, 经长达288 d 的连续观测, 结果有69%的创面愈合后出现明显的高于皮面的瘢痕增生, 且经组织学检查可见特征性的胶原纤维结节及慢性炎症改变等^[5-8]。李荟元等^[9]比较了兔耳不同部位(腹面与背面)、不同形状(圆形与方形)以及不同组织结构(全层皮肤与全层皮肤加软骨)缺损后的瘢痕增生形成情况, 发现兔耳尤其是兔耳腹面可以产生类似于人增生性瘢痕的病理改变, 并认为它有可能成为研究增生性瘢痕的动物模型。兔耳瘢痕模型, 其操作简便, 类瘢痕样增生发生率也较高, 但其类瘢痕样增生形成与兔耳中软骨关系密切, 与人皮肤瘢痕组织的形成基础差别较大, 其对瘢痕研究的价值有待进一步商榷^[10]。

张力、炎症反应、细菌感染以及异物反应是瘢痕增生的主要原因。临床上, 利用Z、W、V-Y等皮瓣改变和

降低刀口张力等措施都可以减少瘢痕增生^[11-14]。利用弹力绷带压迫瘢痕可以预防和治疗瘢痕^[15]。实验利用“张力越大, 瘢痕越大”的原理^[16-18], 以扩张螺丝在小鼠背部定期增加张力, 制作出增生性瘢痕模型。羟脯氨酸为胶原蛋白的特征性氨基酸, 是合成胶原的特有原料, 在胶原中的含量较为恒定, 其含量可表示胶原含量。测定增生性瘢痕中羟脯氨酸的含量明显增加, 表示胶原含量增多, 反映组织愈合过程中胶原的代谢水平。因此在临床和实验中, 胶原总量的测定常采用羟脯氨酸法^[19-22]。实验发现张力组小鼠瘢痕羟脯氨酸含量伤后第1周后显著明显高于对照组, 在伤后第2周增生达到高峰, 伤后第5周, 仍高于对照组。

实验发现创面愈合的前3 d即炎症反应期, 增加创面张力会导致刀口裂开, 而4 d以后即增生期增加张力会导致瘢痕增生。相比传统的兔耳瘢痕与裸鼠瘢痕模型, 小鼠增生性瘢痕模型, 能更深入地进行如基因敲除, 基因治疗等深层次的分子生物学研究。

4 参考文献

- [1] Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, et al. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J*. 2007;21(12):3250-3261.
- [2] Wang J, Ding J, Jiao H, et al. Human hypertrophic scar-like nude mouse model: characterization of the molecular and cellular biology of the scar process. *Wound Repair Regen*. 2011;19(2):274-285.
- [3] Wei YJ, Yan XQ, Ma L, et al. Oleanolic acid inhibits hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36(5):528-533.
- [4] Wu JG, Wei YJ, Ran X, et al. Inhibitory effects of essential oil from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* on hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Pharm Biol*. 2011;49(7):764-769.
- [5] Jia S, Zhao Y, Mustoe TA. The effects of topically applied silicone gel and its silver derivative on the prevention of hypertrophic scarring in two rabbit ear-scarring models. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(12):e332-33
- [6] Gisquet H, Liu H, Blondel WC, et al. Intradermal tacrolimus prevent scar hypertrophy in a rabbit ear model: a clinical, histological and spectroscopical analysis. *Skin Res Technol*. 2011;17(2):160-166.
- [7] Yagmur C, Guneren E, Kefeli M, et al. The effect of surgical denervation on prevention of excessive dermal scarring: a study on rabbit ear hypertrophic scar model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(10):1359-1365.
- [8] Kimura T. Hairless descendants of Mexican hairless dogs: an experimental model for studying hypertrophic scars. *J Cutan Med Surg*. 2011;15(6):329-339.
- [9] Li HY, Liu JB, Xia W, et al. Zhonghua Zhengxing Waikexue. 2001;17(5):276-278.
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[J]. 中华整形外科杂志, 2001, 17(5):276-278.
- [10] Mustoe TA, Cooter RD, Gold MH, et al. International clinical recommendations on scar management. *Plast Reconstr Surg*. 2002;110:560-571.
- [11] Suzuki S, Um SC, Kim BM, et al. Versatility of modified planimetric Z-plasties in the treatment of scar with contracture. *Br J Plast Surg*. 1998;51:363-369.
- [12] Ripper S, Renneberg B, Landmann C, et al. Adherence to pressure garment therapy in adult burn patients. *Burns*. 2009; 5(5):657-64.
- [13] Reish RG, Zuhaili B, Bergmann J, et al. Modulation of scarring in a liquid environment in the Yorkshire pig. *Wound Repair Regen*. 2009;17(6):806-816.
- [14] Yagmur C, Akaishi S, Ogawa R. Mechanical receptor-related mechanisms in scar management: a review and hypothesis. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(2):426-34.
- [15] Costa AM, Peyrol S, Pôrto LC, et al. Mechanical forces induce scar remodeling. Study in non-pressure-treated versus pressure-treated hypertrophic scars. *Am J Pathol*. 1999;155(5): 671-1679.
- [16] Wong VW, Paterno J, Sorkin M, et al. Mechanical force prolongs acute inflammation via T-cell-dependent pathways during scar formation. *FASEB J*. 2011;25(12):4498-4510.
- [17] Gurtner GC, Dauskardt RH, Wong VW, et al. Improving cutaneous scar formation by controlling the mechanical environment: large animal and phase I studies. *Ann Surg*. 2011;254(2):217-225.
- [18] Guo F, Carter DE, Leask A. Mechanical tension increases CCN2/CTGF expression and proliferation in gingival fibroblasts via a TGF β -dependent mechanism. *PLoS One*. 2011;6(5):e19756.
- [19] Thompson MS, Epari DR, Bieler F, et al. In vitro models for bone mechanobiology: applications in bone regeneration and tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):1533-1541.
- [20] Sopher R, Nixon J, Gorecki C, et al. Effects of intramuscular fat infiltration, scarring, and spasticity on the risk for sitting-acquired deep tissue injury in spinal cord injury patients. *J Biomech Eng*. 2011;133(2):021011.
- [21] Paterno J, Vial IN, Wong VW, et al. Akt-mediated mechanotransduction in murine fibroblasts during hypertrophic scar formation. *Wound Repair Regen*. 2011;19(1):49-58.
- [22] Gurtner GC, Dauskardt RH, Wong VW, et al. Improving cutaneous scar formation by controlling the mechanical environment: large animal and phase I studies. *Ann Surg*. 2011;254(2):217-225.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 山东省医药卫生科技发展计划青年基金 (2009QZ023); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2009YY043)。

作者贡献: 实验操作为第一作者, 实验设计, 实施, 评估为第二作者, 数据分析为第三作者, 形态学观察为第四作者。盲法评估。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。