

- of subgingival debridement with adjunctive Er : YAG Laser in chronic periodontitis patients a randomised clinical trial[J]. J Periodontol, 2014, 86(4): 1-15.
- [4] 姜阳, 何权敏, 刘清蒙. 外周血TNF- α 、IL-6、IL-10和HMGB-1与慢性牙周炎伴口臭的相关性研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2017, 27(5): 261-265.
- [5] 杨柳青, 徐雪, 王黎明, 等. 慢性牙周炎患者龈沟液中IL-8和TNF- α 水平变化及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(30): 5933-5936.
- [6] 尹敏, 冯伟, 金巧霞, 等. 慢性牙周炎患者牙龈卟啉单胞菌感染与NLRP3、IL-1 β 、IL-18在牙周膜细胞中的表达研究[J]. 中华全科医学, 2017, 15(7): 1102-1104.
- [7] 纪晓霞, 韩正贵, 刘雪芹, 等. 观察与分析牙周炎患者应用中西联合治疗临床效果[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2015, 10(6): 56-58.
- [8] 张宇, 林野, 刘洋, 等. 牙周炎晚期伴上颌牙槽骨前突畸形患者即刻种植全牙列固定修复的侧貌变化初探[J]. 中华口腔医学杂志, 2017, 52(10): 625-630.
- [9] 马小红. 妊娠期糖尿病伴慢性牙周炎患者血清TNF- α 及IL-10水平[J]. 贵州医科大学学报, 2015, 40(7): 750-753.
- [10] 赵溪达, 刘静波, 张翀, 等. Nd:YAG激光联合牙周基础治疗对牙周炎疗效的评价[J]. 上海口腔医学, 2016, 25(2): 248-253.
- [11] 刘继刚, 刘昊. 慢性牙周炎患者龈沟液中MIP-1 α 和TNF- α 的变化[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2016, 26(8): 495-497.
- [12] Zhao Y, Yin Y, Tao L, et al. Er:YAG laser versus scaling and root planing as alternative or adjuvant for chronic periodontitis treatment: a systematic review[J]. J Clin Periodontol, 2014, 41(11): 1069-1079.
- [13] 胡杉林, 秦飞, 郑江海, 等. IL-4、IL-6和IL-13基因多态性与慢性牙周炎的相关性研究[J]. 海南医学, 2016, 27(21): 3455-3457.
- [14] 姚希, 张宁, 李昀生, 等. 前牙的即刻与延期种植: 牙周组织健康程度及成功率比较[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(12): 1958-1963.
- [15] 王金海, 杜原宏, 魏振辉. 研究基础治疗联合牙周维护治疗慢性牙周炎的效果[J]. 当代医学, 2016, 22(33): 80-81.
- [16] 董健, 佟庆敏, 李敏. 牙周病患者前牙即刻种植的短期临床疗效观察[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2017, 18(2): 79-83.
- [17] 王熙, 刘莎. 即刻种植即刻修复多颗牙对牙龈乳头保留的临床研究[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2016, 3(8): 114-115.

[收稿日期] 2017-12-04 [修回日期] 2018-01-03

编辑/朱婉蓉

普萘洛尔抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞生长机制的实验研究

徐永飞, 武海龙, 赵哲媛, 石英光

(郑州大学附属洛阳中心医院烧伤美容整形外科 河南 洛阳 471000)

[摘要]目的: 探讨普萘洛尔抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞生长的机制。方法: 选择本院瘢痕疙瘩患者病理组织, 分离培养, 获取成纤维细胞, 并分别于含有普萘洛尔的培养基(实验组)和单纯培养基(对照组)中进行培养, 应用CCK-8法检测两组瘢痕疙瘩成纤维细胞生长曲线, 酶标仪检测450~630nm的吸光度值。结果: 实验组瘢痕疙瘩成纤维细胞生长能力明显受到抑制, 且吸光度值明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 普萘洛尔可明显抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长, 为整形外科中瘢痕疙瘩的预防及治疗提供了新方向。

[关键词] 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞; 普萘洛尔; 生长曲线

[中图分类号] R619⁺.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2018) 02-0091-03

Experimental Study on the Inhibitory Effect of Propranolol on the Growth of Keloid Fibroblasts

XU Yong-fei, WU Hai-long, ZHAO Zhe-yuan, SHI Ying-guang

(Department of Plastic Surgery, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of propranolol on the growth mechanism of keloid fibroblasts. **Methods** The pathological tissues of keloid patients were selected and cultured in the medium containing propranolol (the experimental group) and simple medium (the control group). The growth curve of two groups of keloid fibroblasts was detected by CCK-8, and the absorbance values of 450-630nm was detected by Microplate reader. **Results** The growth ability of keloid fibroblasts in the

experimental group was significantly inhibited, and the absorbance value was significantly lower than that of the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Propranolol can significantly inhibit the growth of keloid fibroblasts, and provide a new direction for the prevention and treatment of keloid in plastic surgery.

Key words: keloid; fibroblasts; propranolol; growth curve

瘢痕疙瘩常继发于皮肤伤口的不良愈合, 不仅影响美观, 常可伴发局部感觉异常, 严重者甚至可形成局部破溃, 严重影响患者身心健康。普萘洛尔常用于整形外科中血管瘤的治疗^[1], 其在抑制血管瘤侵袭性生长方面, 疗效显著。基于此, DE Mesquita CJ^[2]曾大胆假设将普萘洛尔应用于瘢痕疙瘩的治疗, 并做了大量的临床实验。本研究主要从普萘洛尔对瘢痕疙瘩的生物学特性方面出发, 明确其影响瘢痕组织成纤维细胞生长的作用机制, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验药品及试剂: 盐酸普萘洛尔片(东北制药生产, 批准文号: 国药准字HP1021682), PBS液, 0.075% II型胶原酶, 10% FBS, 低糖DMEM, 胎牛血清, DMEM培养基, 青链霉素, 0.25% 胰蛋白酶, 二甲基亚砜(DMSO)溶液, PBS溶液。

1.2 瘢痕疙瘩组织: 瘢痕疙瘩组织来源于本院整形外科瘢痕疙瘩切除患者, 并经病理证实, 且所有患者对本研究知情并签署相关知情同意书。纳入标准: ①患者6个月内病变组织无破溃、感染及癌变等; ②患者6个月内未口服抗瘢痕药物或激素类药物; ③患者6个月内未接受放射治疗; ④无精神性疾病及相关器质性疾病者。

2 方法

2.1 瘢痕疙瘩成纤维细胞的制备: 用PBS液冲洗所获取的脂肪组织, 用II型胶原酶消化获取脂肪颗粒, 过滤上清液及未消化的脂肪组织, 并放入离心机中以1 200r/min离心10min, 得到单核细胞, 调整细胞浓度至 10^4 个细胞/ml, 进行培养, 获取所取种子细胞, 并进行免疫鉴定。

2.2 实验分组: 根据培养基不同, 将实验分为2组, 实验组为含有50ng/L普萘洛尔的培养基; 对照组为单纯培养基。将获取的瘢痕疙瘩成纤维细胞分别放入两组培养基中进行培养, 48h后, 两组培养基中分别加入10ul的CCK-8液, 继续培养24h。

2.3 检测指标: 使用酶标仪检测两组瘢痕疙瘩成纤维细胞生长因子450~630nm的吸光度值, 吸光度值越高, 表明瘢痕成纤维细胞增殖能力越强^[3]; 并连续检测其7d生长曲线, 从而明确普萘洛尔对瘢痕疙瘩成纤维细胞生长能力的影响。

2.4 统计学分析: 数据采用SPSS 18.0统计软件进行分析。采用LSD-*t*检验进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 瘢痕疙瘩成纤维细胞鉴定结果: 利用免疫细胞化学技术, 可见瘢痕成纤维细胞表面标记物CD73、CD90及CD105均为阳性^[4], 表达率较高, 说明细胞具有成纤维细胞特性。结果见图1。

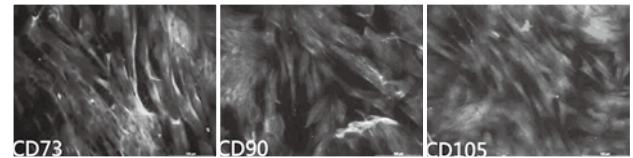


图1 瘢痕成纤维细胞表面标记物CD73、CD90及CD105

3.2 一般形态学观察: 实验组细胞数目较少, 体积较小, 排列疏松, 呈梭形或长方形, 核小, 轮廓清晰; 对照组细胞数目较多, 体积较大, 排列紧密, 呈突出的纺锤形或星形扁平细胞, 核大, 轮廓清晰。

3.3 两组瘢痕成纤维细胞吸光度值检测结果: 实验组瘢痕成纤维细胞吸光度值明显小于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 观察组瘢痕成纤维细胞增殖能力较差。见表1。

3.4 两组瘢痕成纤维细胞生长曲线: 两组细胞总体生长趋势大致相同, 第1~2天生长缓慢, 第3~4天生长迅速, 第5天达到高峰, 第6~7天相对平稳, 形成一个平台期。实验组细胞生长能力明显低于对照组。见图2。

表1 两组瘢痕疙瘩成纤维细胞不同时间吸光度值比较

分组	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
实验组	0.439±0.008	0.537±0.032	0.747±0.023	1.125±0.077	1.395±0.055	1.804±0.024	1.883±0.044
对照组	0.461±0.014	0.609±0.008	0.915±0.029	1.450±0.038	1.900±0.024	2.183±0.049	2.284±0.049
<i>t</i> 值	3.035	4.881	10.143	8.458	18.935	15.663	13.657
<i>P</i> 值	0.016	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

($\bar{x} \pm s$)

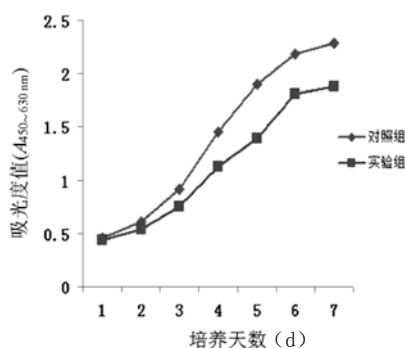


图2 两组瘢痕成纤维细胞生长曲线

4 讨论

瘢痕疙瘩与普通瘢痕不同,常突出于体表,且不稳定,不仅影响美观,甚至局部可出现疼痛、瘙痒等不适症状,影响工作和休息,其无法自行消失,长期存在可发生破溃,严重影响患者身心健康^[5]。目前国内外学者比较认可的发病机制是组织细胞的功能异常,即成纤维细胞的过度增殖^[6],成纤维细胞是瘢痕疙瘩发生的始动细胞,也是形成肉芽组织、合成胶原等细胞外基质、进行伤口重塑的重要细胞,它通过活化、增殖、合成胶原来修复创面,可一旦成纤维细胞的功能发生异常将导致瘢痕疙瘩的形成^[7]。瘢痕疙瘩的治疗是临床上的难题,单一的治疗方法效果差,临床上治疗瘢痕疙瘩的方法有手术切除、放疗、局部注射药物、激光治疗、压力疗法以及联合治疗等^[8],国内外学者一致认为联合疗法的效果较单一疗法好。目前瘢痕内注射药物在治疗瘢痕疙瘩中起到了重要作用^[9-10]。因此对于瘢痕疙瘩,早期干预,使瘢痕疙瘩丧失生长的始动力,尤为重要。

普萘洛尔最早应用于整形外科中婴幼儿血管瘤的治疗,其机制可能与抑制血管瘤成纤维细胞生长因子有关^[11],研究发现^[12-13],普萘洛尔作为常用的 β 受体拮抗剂,具有抑制胶原蛋白形成、抗纤维化作用,其作用机理是通过竞争性抑制TGF- β_1 受体,从而抑制了成纤维细胞的生物学活性,减少胶原分泌,达到抗纤维化的效果^[14]。

本研究探讨了普萘洛尔抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞生长,从而抑制瘢痕疙瘩生长,实验标本来源于本院瘢痕疙瘩患者,并经病理证实,采用中性蛋白酶消化分离瘢痕表皮细胞,避免表皮细胞对实验结果带来干扰,进一步传代培养,将所获得的种子细胞应用其特异性标志物进行鉴定,从而保证实验结果的准确性。将含有50ng/L普萘洛尔的培养基作为实验组,对照组选用单纯培养基,通过绘制两组瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长曲线,并测定第1~7天吸光度值来反应瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长能力,结果发现,实验组与对照组瘢痕疙瘩成纤维细胞均呈S形生长,但实验组细胞生长能力明显低于对照组,且实验组瘢痕疙瘩成纤维细胞吸光度值明显低于对照组,进一步证明,普萘

洛尔可在一定程度上抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长,从而抑制瘢痕疙瘩的生长及其纤维化,为临床上瘢痕疙瘩的预防及治疗提供了新方向,但本研究仅仅通过细胞方面的基础研究提供理论支持,要全面应用于临床,有待于进一步的临床实验研究。

[参考文献]

- [1]马立国,饶颖慧,吴春涛,等.两种方法联合放疗治疗瘢痕疙瘩的疗效比较[J].河北医药,2010,32(14):1868-1870.
- [2]DE Mesquita CJ.About strawberry, crab claws, and the Sir James Black's invention. Hypothesis: can we battle keloids with propranolol[J].Med Hypotheses,2010,74(2): 353-359.
- [3]Perdanasari AT,Lazzeri D,Su W,et al.Recent Developments in the Use of Intralesional Injections Keloid Treatment[J].Arch Plast Surg,2014,41(6):620-629.
- [4]张哲,康春福,陈斌,等.缺氧状态下瘢痕疙瘩成纤维细胞条件培养基对血管形成能力的影响[J].中华整形外科杂志,2014,30(4):283-288.
- [5]孙奎,吴晓明,张鸿霞,等.丝裂霉素C对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖与Smad2/3蛋白表达的影响[J].中国老年医学杂志,2012,32(2):5215-5217.
- [6]石英光.普萘洛尔对瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用研究[D].郑州:郑州大学,2014.
- [7]颜彤彤,陈敏亮,马奎,等.干扰人整合素蛋白135基因表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖能力的影响[J].中华整形外科杂志,2017,33(1):49-50.
- [8]刘洋.曲安奈德及普萘洛尔对瘢痕疙瘩成纤维细胞体外作用的研究[D].郑州:郑州大学,2015.
- [9]蔡宏,王毅侠,李铀,等.光动力学疗法对瘢痕成纤维细胞中转化生长因子 β_1 的作用[J].中国美容医学,2017,26(2):5-8.
- [10]Butzelaar L,Ulrich MM,Mink van der Molen AB,et al.Currently known risk factors for hypertrophic skin scarring: A review[J].J Plast Reconstr Aesthet Surg,2016,69(2):163-169.
- [11]Storch CH,Hoeger PH.Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action[J].Br J Dermatol,2010,163(2):269-274.
- [12]Haubner F,Leyh M,Ohmann E,et al.Effects of botulinum toxin A on patient-specific keloid fibroblasts in vitro[J].Laryngoscope,2014,124(6):1344-1351.
- [13]Wang X,Gao Z,Wu X,et al.Inhibitory effect of TGF- β peptide antagonist on the fibrotic phenotype of human hypertrophic scar fibroblasts[J].Pharm Biol,2016,54(7):1189-1197.
- [14]李艳.点阵CO₂激光联合积雪苷霜软膏治疗痤疮凹陷性瘢痕疗效观察[J].中国医疗美容,2014,4(2):57-58.
- [15]Sharquie KE,Noaimi AA,Al-Karhi MR.Debulking of Keloid Combined with Intralesional Injection of 5-Fluorouracil and Triamcinolone versus Intralesional Injection of 5-Fluorouracil and Triamcinolone[J].J Cosmet Dermatol Sci Appl,2014,4(2):85.