

•基础研究•

•论著•

BMP-2蛋白通过Smad途径对牙髓干细胞成牙本质分化的作用机制研究

王晔, 于森, 张丞, 张婉君, 马永平

(保定市第二医院口腔科 河北 保定 071000)

[摘要]目的: 探讨骨形成蛋白2 (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 对牙髓干细胞成牙本质分化的影响及对Smad1/5通路的调节作用。方法: 取对数生长期的人牙髓干细胞, 配制成密度为 3×10^4 个/毫升的细胞悬液, 接种于24孔板, 置于培养箱中培养至细胞密度约为80%时, 将细胞随机分为对照组、单纯诱导组和抑制剂组。对照组细胞不做任何处理, 单纯诱导组细胞用浓度为100 ng/ml的BMP-2诱导液 (BMP-2溶于DMEM培养基) 培养, 抑制剂组细胞先用200 nmol/L的Smad1/5抑制剂LDN-193189处理24 h后, 更换为BMP-2诱导液, 培养14 d后, CCK-8检测人牙髓干细胞活性、qRT-PCR检测牙本质基质蛋白1 (DMP-1) 和牙本质涎磷蛋白 (DSPP) mRNA相对表达量、检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性、茜素红染色观察矿化结节情况、蛋白印迹法检测BMP-2和p-Smad1/5蛋白相对表达量。结果: 单纯诱导组矿化结节明显, 抑制剂组矿化结节减少; 与对照组比较, 单纯诱导组牙髓干细胞活性、ALP活性增强, DMP-1和DSPP mRNA相对表达量、BMP-2和p-Smad1/5蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与单纯诱导组比较, 抑制剂组牙髓干细胞活性、ALP活性减弱, DMP-1和DSPP mRNA相对表达量、BMP-2和p-Smad1/5蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。结论: BMP-2可诱导人牙髓干细胞成牙本质分化, 可能是通过调节Smad1/5信号通路发挥作用。

[关键词] 牙髓干细胞成牙本质分化; 骨形成蛋白2; Smad1/5; 调节作用; 信号通路

[中图分类号] R329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2023) 02-0001-04

The Mechanism of BMP-2 Protein on Odontoblast Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Via Smad Pathway

WANG Ye, YU Miao, ZHANG Cheng, ZHANG Wanjun, MA Yongping

(Department of Stomatology, Baoding Second Hospital, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) on odontoblast differentiation of pulp stem cells and its regulation on Smad1/5 pathway. **Methods** The human dental pulp stem cells in logarithmic growth stage were taken and prepared into cell suspension with density of 3×10^4 cells/ml, then cell suspension were inoculated in a 24-well plate and cultured in an incubator until the cell density was about 80%, then were randomly divided into control group, simple induction group and inhibitor group, control group without any treatment, while simple induction group were treated with 100 ng/ml of BMP-2 and inhibitor group were treated with 200 nmol/L of Smad1/5 inhibitor LDN-193189 for 24 h. Then BMP-2 induction solution was replaced and cultured for 14 days. CCK-8 was used to detect the activity of human pulp stem cells, qRT-PCR was used to detect the mRNA relative expression levels of dentin matrix protein 1 (DMP-1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP), alkaline phosphatase (ALP) activity was detected, alizarin red staining was used to detect the mineralized nodules, and western blot was used to detect the relative protein expression of bone morphogenetic protein (BMP-2) and p-Smad1/5. **Results** Mineralization nodules were increased in the simple induction group, while decreased in the inhibitor group. Compared with the control group, pulp stem cell activity, ALP activity, mRNA relative expression levels of DMP-1 and DSPP, protein relative expression levels of BMP-2 and p-Smad1/5 were increased in the single induction group ($P < 0.05$). Compared with the simple induction group, the pulp stem cell activity, ALP activity, mRNA relative expression levels of DMP-1 and DSPP, protein relative expression levels of BMP-2 and p-Smad1/5 were decreased in the inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusion** BMP-2 can induce odontoblast differentiation of human pulp stem cells, possibly by regulating the Smad1/5 signaling pathway.

Key words: dental pulp stem cells odontoblast differentiation; bone morphogenetic protein-2; Smad1/5; regulating effect; signaling pathway

基金项目: 2020年度河北省医学科学研究课题计划 (编号: 20200170)

第一作者: 王晔, 主治医师; 研究方向为口腔全科。E-mail: 17134089419@163.com

牙源性干细胞包括牙髓干细胞、牙周膜干细胞以及根尖牙乳头干细胞。牙髓干细胞是一种成体干细胞,一般存在于牙髓组织,具有类似于间充质干细胞的生物学特性,可被诱导分化为成牙本质细胞,具有成骨分化能力,所以对牙周组织再生具有重要作用。体内实验证明,将牙髓干细胞分泌的细胞外囊泡植入大鼠无髓根管,促进牙髓再生,在某些刺激因子作用下,牙髓干细胞可发生牙本质再生^[1-2]。BMP-2在骨再生的促进和维持中发挥重要作用,而且是已知的骨诱导性生长因子之一^[3],Han等^[4]的体外研究证明,BMP-2失活抑制骨髓间充质干细胞向成骨细胞样细胞分化。将含有人重组BMP-2载体注入颅骨缺损的大鼠体内,可有效促进颅骨愈合,且反复给药并不能增强或减弱愈合能力^[5]。BMP信号可激活其受体Smad1/5,Smad1/5信号分子可将细胞因子转导信号由细胞质转至细胞核,调控靶基因转录^[6]。研究报道,BMP-2/Smad信号通路与成骨分化密切相关,该信号通路激活不仅改善骨质疏松症,而且可促进骨髓间充质干细胞成骨分化^[7-8]。但BMP-2是否可激活Smad1/5在牙髓干细胞向成牙本质细胞分化过程中发挥调控作用的研究甚少,因此,本研究以人牙髓干细胞为研究对象,探讨BMP-2对牙髓干细胞成牙本质分化的影响以及对Smad1/5信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器:①Smad1/5信号通路抑制剂LDN-193189购自美国Selleck公司;②CCK-8细胞活性检测试剂盒购自日本Dojindo公司;③BCA试剂盒购自德国赛默飞世尔科技公司;④碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)试剂盒购自北京索莱宝科技公司;⑤Trizol试剂盒、反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;⑥p-Smad1/5、Smad1/5、BMP-2和GAPDH抗体购自美国Abcam公司;⑦茜素红购自美国Thermo Fisher Scientific公司;牙本质基质蛋白1(Dentin matrix protein 1,DMP1)和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein,DSPP)引物序列由上海生物工程股份有限公司合成;⑧可见分光光度计购自上海光学仪器五厂有限公司;⑨酶标仪购自美国Bio-TEK公司;⑩细胞系:人牙髓干细胞(上海研生实业有限公司)。

1.2 细胞培养与分组:将人牙髓干细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每2 d更换一次培养基,待细胞融合度达到90%时,0.25%胰蛋白酶消化、传代。取第3代对数生长期的人牙髓干细胞,DMEM培养基将细胞重悬,接种于24孔板,细胞密度为3×10⁴个/孔,置于培养箱中培养,当细胞密度约为80%时,随机分为对照组、单纯诱导组和抑制剂组。对照组细胞不做任何处理,单纯诱导组细胞用浓度为100 ng/ml的BMP-2诱导液^[9](BMP-2溶于DMEM培养基)培养,抑制剂组细胞先用200 nmol/L的LDN-193189处理24 h后,弃去原有培养液,更换为BMP-2诱导液。培养14 d后,用于以下实验。

1.3 CCK-8法检测人牙髓干细胞活性:收集各组细胞,制成细胞密度为1×10⁷个/毫升的细胞悬液,接种于96孔板,每孔100 μl,培养箱中继续培养5 h,每孔加入CCK-8工作液10 μl,轻轻混匀后37℃孵育30 min,设置酶标仪波长为450 nm,测定吸光度OD值,OD值越大说明活细胞活性越强。实验重复5次。

1.4 qRT-PCR法检测DMP1和DSPP mRNA相对表达量:收集各组细胞,4℃下Trizol试剂提取细胞中总RNA,利用逆转录试剂盒,将RNA逆转录成cDNA,以cDNA为模板,以GAPDH为内参,进行扩增,反应程序设定为:95℃预变性4 min,95℃变性5 s,56℃退火30 s,70℃延伸30 s,共40个循环,采用2^{-△△CT}计算DMP1和DSPP的相对表达量。实验重复5次。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列
DMP-1	F:5' -CGAAGTAGTAGCAGAG-3'
	R:5' -CACTGATCAGGATTGACG-3'
DSPP	F:5' -TTGCAAGCTACACGGAT-3'
	R:5' -TCGTCAGAGTCACAGTGA-3'
GAPDH	F:5' -CATCGTAGCTACTGCTCT-3'
	R:5' -GCTGACAGATCGCTGCTT-3'

1.5 ALP活性检测:收集各组细胞,PBS清洗后,加入全细胞裂解液,冰上裂解10 min,4℃ 1 000 r/min离心5 min,吸取上清液,缓冲液、显色液依次加入到上清液中,可见分光光度计检测510 nm波长处的吸光度A值。按照说明书,绘制标准曲线,根据标准曲线计算样品浓度,样品测定浓度与标准蛋白浓度值的比值为ALP活性。实验重复5次。

1.6 茜素红染色观察矿化结节情况:取各组细胞,PBS清洗3次,每孔加入40 g/L的多聚甲醛溶液1 ml室温固定30 min,PBS清洗3次,每孔加入40 mmol/L的茜素红染液1 ml,室温避光染色20 min,双蒸水清洗4次,倒置显微镜下观察矿化结节情况并拍照。实验重复5次。

1.7 蛋白印迹法检测BMP-2、p-Smad1/5蛋白相对表达量:收集各组细胞,PBS清洗3次,加入100 μl RIPA裂解液,冰上静置30 min,4℃ 1 200 r/min离心10 min,离心半径为10 cm,收集上清,BCA法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液后,100℃煮沸10 min,使蛋白变性稳定。80 V电泳20 min使蛋白至分离胶处,120 V电泳2 h,湿转2 h,将蛋白转至PVDF膜上,TBST洗膜3次,室温封闭1 h,BMP-2、p-Smad1/5、Smad1/5、GAPDH一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育2 h,TBST洗膜3次,ECL法显色,Image J计算蛋白条带灰度值,BMP-2、p-Smad1/5、Smad1/5蛋白条带灰度值与GAPDH蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白表达量。实验重复5次。

1.8 统计学分析:采用SPSS 21.0统计学软件分析数据,计量资料均以($\bar{x} \pm s$)描述,多样本计量资料比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活性检测结果：细胞活性组间比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；与对照组比较，单纯诱导组细胞活性增强（ $P<0.05$ ）；与单纯诱导组比较，抑制剂组细胞活性降低（ $P<0.05$ ）。见表2。

表2 三组细胞活性比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)	
组别	细胞活性
对照组	0.84±0.05
单纯诱导组	1.96±0.08*
抑制剂组	1.47±0.06**
F值	378.280
P值	<0.001

注：*表示与对照组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与单纯诱导组比较， $P<0.05$ 。

2.2 qRT-PCR检测结果：DSPP、DMP-1 mRNA相对表达量组间比较，差异有统计学意义；与对照组比较，单纯诱导组、抑制剂组的DSPP、DMP-1 mRNA相对表达量升高；与单纯诱导组比较，抑制剂组DSPP、DMP-1 mRNA相对表达量降低，差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）。见表3。

表3 三组细胞中DSPP、DMP-1 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)		
组别	DSPP	DMP-1
对照组	1.02±0.48	1.24±0.54
单纯诱导组	6.73±0.57*	7.42±0.65*
抑制剂组	4.83±0.54**	5.62±0.47**
F值	149.753	162.077
P值	<0.001	<0.001

注：*表示与对照组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与单纯诱导组比较， $P<0.05$ 。

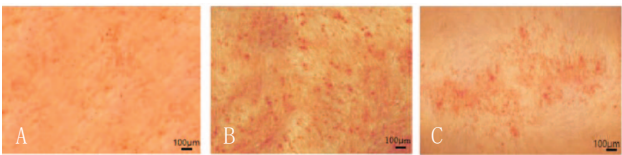
2.3 ALP活性检测结果：ALP活性组间比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。与对照组比较，单纯诱导组、抑制剂组ALP活性升高（ $P<0.05$ ）；与单纯诱导组比较，抑制剂组ALP活性降低（ $P<0.05$ ）。见表4。

表4 三组细胞中ALP活性比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)	
组别	ALP活性
对照组	4.00±0.38
单纯诱导组	8.83±0.53*
抑制剂组	6.36±0.46**
F值	137.382
P值	<0.001

注：*表示与对照组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与单纯诱导组比较， $P<0.05$ 。

2.4 茜素红染色结果：与对照组比较，单纯诱导组矿化结节明显增多；与单纯诱导组比较，抑制剂组矿化结节明显

减少。见图1。



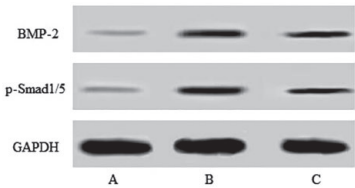
注：A. 对照组；B. 单纯诱导组；C. 抑制剂组

图1 茜素红染色（×40）

2.5 BMP-2、p-Smad1/5蛋白相对表达量检测结果：BMP-2、p-Smad1/5蛋白相对表达量组间比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。与对照组比较，单纯诱导组、抑制剂组BMP-2、p-Smad1/5蛋白相对表达量升高（ $P<0.05$ ）；与单纯诱导组比较，抑制剂组BMP-2、p-Smad1/5蛋白相对表达量降低（ $P<0.05$ ）。见图2、表5。

表5 三组细胞中BMP-2、p-Smad1/5蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)		
组别	BMP-2	p-Smad1/5
对照组	0.14±0.05	0.15±0.06
单纯诱导组	0.53±0.06*	0.62±0.05*
抑制剂组	0.32±0.06**	0.27±0.05**
F值	58.918	104.012
P值	<0.001	<0.001

注：*表示与对照组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与单纯诱导组比较， $P<0.05$ 。



注：A. 对照组；B. 单纯诱导组；C. 抑制剂组

图2 细胞中BMP-2、p-Smad1/5蛋白表达

3 讨论

人牙髓干细胞存在于牙髓组织中，具有高度增殖、多向分化潜能以及无免疫排斥等特点，且来源广、获取方便，因此，被视为牙髓再生的理想种子细胞。正常情况下，人牙髓干细胞处于静息状态，在某些刺激因素作用下，可分化为成牙本质细胞、成骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞^[10]。牙本质是组成牙齿的硬组织部分，其中含有牙本质小管，管中存在神经纤维和液体成分，外界刺激可通过牙本质小管传至牙髓。当出现牙齿磨损或龋齿时，牙髓干细胞可分化为成牙本质细胞，成牙本质细胞快速分泌大量基质，产生修复性牙本质，封闭牙本质小管，阻断细菌入侵，避免牙髓发生炎症反应造成不可逆性损伤。

BMP是一类高度保守的具有分泌作用的功能性蛋白，目前发现的BMP有20多种亚型，除BMP-1外，其余亚型属于TGF-β家族。BMP活化后以二聚体的形式存在，通过作用于

受体及信号转导途径触发细胞发育。Zhong等^[11]研究发现,长链非编码RNA H19可上调人牙髓干细胞中BMP-2表达,促进牙髓干细胞向成牙本质细胞转化。在人牙髓干细胞和小鼠骨髓基质细胞成骨分化过程中,BMP-2可增强ALP活性、细胞外基质矿化和成骨基因表达^[12]。体外研究表明,早期BMP-2和血管内皮生长因子培养人根尖乳头干细胞,可促进其骨/牙源性分化^[13]。成牙本质细胞在早期分化和矿化阶段,需经历细胞增殖和细胞外基质合成,在此阶段特异性表达ALP,高分化的成牙本质细胞中ALP显著高于未分化细胞,因此ALP可作为早期成牙本质细胞分化的标志物。胶原I是牙本质细胞外基质蛋白中最丰富的蛋白,在成牙本质细胞分化、牙本质形成和矿化过程中具有重要作用,而研究发现,100 ng/ml BMP-2诱导液可促进胶原I的表达和分泌^[14],从而控制成牙本质细胞分化以及牙本质形成。已有研究表明,将BMP-2溶于培养基中,制成浓度为100 ng/ml的培养液,培养14 d后ALP活性增强。本研究通过BMP-2诱导液培养人牙髓干细胞,10 d后同样检测到ALP活性增强,此实验结果提示牙髓干细胞发生成牙本质细胞转化。

DSPP和DMP-1是评判成牙本质细胞分化的关键指标,DSPP是牙本质中含量最为丰富的非胶原基质,在牙本质矿化中起重要作用,但DSPP合成后很快被酶切成牙本质涎蛋白和牙本质磷蛋白。既往研究表明,Bbx通过调节DSPP控制新生鼠牙根形成,DSPP转基因小鼠可部分修复DSPP基因缺失小鼠的牙本质缺陷^[15-16]。DMP-1是成牙本质细胞早期分化时特异性表达的磷酸性蛋白酶,通常与DSPP联合判断成牙本质细胞分化情况。Ma等^[17]研究发现,DMP-1可增强 β -磷酸三钙种植体在犬上颌窦底,可增强骨再生和骨整合。本研究中,100 ng/ml BMP-2诱导液培养后DSPP和DMP-1 mRNA相对表达量升高,茜素红染色显示矿化结节明显,提示牙髓干细胞发生成牙本质细胞转化并发生矿化。

经典的BMP/Smads信号通路在多种疾病的骨代谢和骨分化中的作用已被广泛报道,Yuan等^[18]报道强直性脊柱炎中BMP/Smads信号通路的激活被抑制后,可降低成纤维细胞的成骨转化。细胞外钙通过放大BMP-2对Smad信号的影响促进骨髓间充质干细胞的骨形成^[19]。胰岛素样生长因子1通过激活BMP-2/Smad1/5信号通路促进犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化^[20]。诱导多能干细胞实现牙齿再生是一种新的干细胞来源,而研究发现,200 nmol/L Smad1/5信号通路抑制剂LDN-193189处理多能干细胞,可抑制其成釉分化效应^[21]。本研究采用Smad1/5抑制剂LDN-193189预处理后,BMP-2诱导液培养人牙髓干细胞,蛋白印迹法检测BMP-2和Smad1/5蛋白表达情况,结果显示,LDN-193189可降低BMP-2诱导液培养的人牙髓干细胞中BMP-2和Smad1/5蛋白表达,提示BMP-2/Smad1/5信号通路参与调控人牙髓干细胞牙本质分化。

综上所述,BMP-2可促进人牙髓干细胞成牙本质分化,其可能是通过调节Smad1/5信号通路发挥调控作用,但本研

究存在一定不足之处,BMP-2剂量选择以及不同处理时间对牙髓干细胞成牙本质的影响需要确定。另外,BMP-2如何调节Smad1/5信号通路以及Smad1/5信号通路激活后在促进成牙本质分化中具体发挥怎样的作用需要进一步探讨。

[参考文献]

- [1]Chen W J,Xie J,Lin X,et al.The role of small extracellular vesicles derived from lipopolysaccharide preconditioned hDPSCs in dental pulp regeneration[J].J Endod,2021,47(6):961-969.
- [2]Chen J,Xu H,Xia K,et al.Resolvin E1 accelerates pulp repair by regulating inflammation and stimulating dentin regeneration in dental pulp stem cells[J].Stem Cell Res Ther,2021,12(1):75.
- [3]熊军,刘韦,曾凡,等. TNF- α 对骨形成蛋白-2诱导的小鼠C2C12细胞向成骨细胞分化的影响及可能机制[J].现代生物医学进展,2019,19(2):249-252,274.
- [4]Han X,Zhu N,Wang Y,et al.1,25(OH)₂D₃ inhibits osteogenic differentiation through activating β -catenin signaling via downregulating bone morphogenetic protein 2 [J].Mol Med Rep,2020,22(6):5023-5032.
- [5]Son H, Lee M N,Kim Y,et al.Bone generation following repeated administration of recombinant bone morphogenetic protein 2[J]. Tissue Eng Regen Med,2021,18(1):155-164.
- [6]左乔,唐海双,张小曦,等. 骨形成蛋白2通过上调磷酸化Smad1/5促进大鼠颅内动脉瘤血管平滑肌细胞凋亡[J].中华神经外科杂志,2020,36(5):509-515.
- [7]Wang X J,Liu J W,Liu J.MiR-655-3p inhibits the progression of osteoporosis by targeting LSD1 and activating BMP-2/Smad signaling pathway[J].Hum Exp Toxicol,2020,39(10):1390-1404.
- [8]Wang Z,Bao H W.Cnidium lactone stimulates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via BMP-2/smad-signaling cascades mediated by estrogen receptor[J].Am J Transl Res,2019,11(8):4984-4991.
- [9]浦铁民,韩亚琨. 外源性抑制Wnt信号通路对BMP-2诱导的人牙髓细胞向成牙本质分化的影响[J].山东医药,2019,59(4):41-44.
- [10]姜力铭,宋戈,夏商,等. 转化生长因子 β 1对人牙髓干细胞成骨分化作用研究[J].中国实用口腔杂志,2018,11(9):530-533.
- [11]Zhong J,Tu X,Kong Y,et al.LncRNA H19 promotes odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells by regulating miR-140-5p and BMP-2/FGF9[J].Stem Cell Res Ther,2020,11(1):202.
- [12]Huang H,Dou L,Song J,et al.CBFA2T2 is required for BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,496(4):1095-1101.
- [13]Zhang W,Zhang X,Ling J,et al.Osteo-/odontogenic differentiation of BMP2 and VEGF gene-co-transfected human stem cells from apical papilla[J].Mol Med Rep,2016,13(5):3747-3754.
- [14]何文喜,牛忠英,赵守亮,等. Smad分子在骨形成蛋白2调控成牙本质细胞I型胶原基因表达中的作用[J].中华口腔医学杂志,2004,39(5):386-389.
- [15]Jhn H J,Kim J A,Lim J,et al.Bobby sox homolog regulates tooth root formation through modulation of dentin sialophosphoprotein[J].J Cell Physiol,2021,236(1):480-488.
- [16]Zhang H,Xie X,Liu P,et al.Transgenic expression of dentin phosphoprotein (DPP) partially rescued the dentin defects of DSPP-

- null mice[J].PLoS One,2018,13(4):e0195854.
- [17]Ma D,Wang Y,Chen Y,et al.Promoting osseointegration of dental implants in dog maxillary sinus floor augmentation using dentin matrix protein 1-transduced bone marrow stem cells[J].Tissue Eng Regen Med,2020,17(5):705-715.
- [18]Yuan B,Wu Z.MMP-2 silencing reduces the osteogenic transformation of fibroblasts by inhibiting the activation of the BMP/Smad pathway in ankylosing spondylitis[J].Oncol Lett,2018,15(3):3281-3286.
- [19]Aquino-Martínez R,Artigas N,Gómez B,et al.Extracellular calcium promotes bone formation from bone marrow mesenchymal stem cells by amplifying the effects of BMP-2 on SMAD signalling[J].PLoS One,2017,12(5):e0178158.
- [20]廖春晖,李明飞,叶金梅,等.IGF1通过BMP2-Smad1/5信号通路调控犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化[J].广东牙病防治,2020,28(1):16-23.
- [21]刘治,覃文聘,高鹏,等. Smad1/5信号通路在诱导多能干细胞成釉分化中的作用研究[J].医学研究杂志,2020,49(3):134-140.
- [收稿日期]2021-07-13
- 本文引用格式:王晔,于淼,张丞,等.BMP-2蛋白通过Smad途径对牙髓干细胞成牙本质分化的作用机制研究[J].中国美容医学,2023,32(2):1-5.

·论著·

不同移植部位对可注射组织工程化脂肪生存率的影响

吕成鹏¹,倪华²,李龙³,刘彦普⁴,贺龙龙¹

(1.西安交通大学口腔医院 陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室 陕西 西安 710004; 2.空军军医大学口腔医院组织工程研发中心 陕西 西安 710032; 3.广东省深圳市南山区蛇口人民医院口腔科 广东 深圳 518066; 4.空军军医大学口腔医院口腔颌面外科 陕西 西安 710032)

[摘要]目的:研究裸鼠腹股沟及背部两个不同部位注射移植组织工程化脂肪的存活率。方法:体外分离培养的兔脂肪来源的脂肪基质干细胞(ADSCs)和富含血小板血浆(PRP)与自体兔脂肪颗粒混合注射于裸鼠皮下,按照移植部位分为背部组和腹股沟组,分别于移植后1周、2周、4周、6周,通过B超检测方法评价移植物体积变化情况。结果:脂肪移植后第1、2、4、6周,背部组脂肪移植物存活率为(84.39±7.41)%、(70.89±4.57)%、(52.49±4.42)%、(42.44±5.42)%;腹股沟组存活率为(82.00±6.93)%、(73.81±5.59)%、(61.82±5.94)%、(51.23±4.37)%;两组存活率随时间的推移逐渐降低,通过重复测量的统计分析显示两组存活率差异具有统计学意义($P<0.05$),腹股沟组脂肪移植物存活率高于背部组。结论:裸鼠腹股沟的组织工程化脂肪移植存活率更高。

[关键词]脂肪基质干细胞;富含血小板血浆;脂肪移植;存活率;组织工程

[中图分类号]R622 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2023)02-0005-04

Effect of Different Transplantation Sites on Survival Rate of Injectable Tissue Engineered Fat

LYU Chengpeng¹, NI Hua², LI Long³, LIU Yanpu⁴, HE Longlong¹

(1.Key laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, College of Stomatology of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China; 2.Tissue Engineering Center, School of Stomatology, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 3.Department of Stomatology, Shenzhen Nanshan District Shekou People's Hospital, Shenzhen 518066, Guangzhou, China; 4.Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different host sites on the survival rate of injectable tissue engineered fat. **Methods** Adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and platelet rich plasma (PRP) were isolated and cultured in vitro

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070820);陕西省科学技术厅社会发展领域项目资助课题(编号:2019SF-161)

通信作者:贺龙龙,主治医师;研究方向为软组织修复重建、种植临床研究。E-mail:paulmann@163.com

第一作者:吕成鹏,主治医师;研究方向为组织修复重建。E-mail:lvchengpeng@xjtu.edu.cn

and injected subcutaneously into nude mice. According to the transplantation site, they were divided into back group and groin group. At the 1st, 2nd, 4th, 6th weeks after transplantation, the changes of graft volume were evaluated by B-ultrasonography. **Results** At the 1st, 2nd, 4th, 6th weeks after transplantation, the survival rates of fat grafts in back group were $(84.39 \pm 7.41)\%$, $(70.89 \pm 4.57)\%$, $(52.49 \pm 4.42)\%$, $(42.44 \pm 5.42)\%$, and the groin group were $(82.00 \pm 6.93)\%$, $(73.81 \pm 5.59)\%$, $(61.82 \pm 5.94)\%$, $(51.23 \pm 4.37)\%$. Statistical analysis of repeated measurements showed that the survival rate of the two groups was statistically different ($P < 0.05$), and the survival rate of fat graft in the groin group was higher than that in the back group. **Conclusions** Inguinal transplantation in nude mice can improve the survival rate of injectable tissue engineered fat transplantation.

Key words: adipose derived mesenchymal stem cells; platelet-rich plasma; fat transplantation; survival rate; tissue engineering

颌面部软组织缺损的美学修复是临床工作中经常面临的问题^[1-2]。目前, 缺损的修复手段主要包括假体的植入、透明质酸充填和自体脂肪移植等, 但这些方法都有一定的局限性。假体植入和透明质酸充填由于其可能存在的术后并发症给病人带来风险^[3], 而自体脂肪由于其分布广泛、手术操作便捷及无排斥反应和伦理问题越来越广泛地应用于颌面软组织缺损修复, 但脂肪移植后不可控的吸收问题为脂肪移植带来困扰^[4]。人工诱导脂肪再生(即组织工程化脂肪)技术的出现为软组织缺损的修复提供了新的思路, 组织工程化脂肪可通过提供种子细胞、血运条件及再生微环境实现脂肪组织的新生。组织工程脂肪被认为是目前最有前景的治疗软组织缺损的方法^[5]。本研究通过将构建的可注射组织工程化脂肪移植于裸鼠皮下不同部位, 探讨不同移植部位对可注射组织工程化脂肪生存率的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂: 高糖DMEM (Gibco), 胎牛血清 (Gibco), I型胶原酶 (Sigma), β -甘油磷酸钠 (Sigma), 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) (Peprtech), 吡咯美辛 (Peprtech), 茜素红 (Peprtech)。

1.2 实验动物: 6月龄新西兰大白兔3只, 体重2.5~3 kg, 6周龄雌性裸鼠6只, 移植后裸鼠分为两组, 裸鼠背部皮下组和裸鼠腹股沟皮下组(同体对照, 每组6个位置)。由空军军医大学实验动物中心提供和饲养。

1.3 ADSCs的分离和培养: 取新西兰兔双侧腹股沟及颈背部的皮下脂肪, 剪碎并清理切取的脂肪组织, 用DMEM高糖配制1%I型胶原酶37℃消化1 h; 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。加入DMEM培养基(含双抗, 10%胎牛血清, 292 mg/L的谷氨酰胺, 50 mg/L的Vitamin C)重悬浮; 接种于25 cm²培养瓶中, 5%CO₂, 37℃饱和湿度培养, 3 d后换液, 后隔日换液; 5~7 d后按照1:2比例传代, 第二代细胞以1:3传代。

1.4 ADSCs的成脂、成骨多向分化能力检测

1.4.1 成脂分化能力检测: 取第3代的ADSCs细胞, 1×10^5 个/cm²接种于1.2 cm×1.2 cm的盖玻片上, 细胞密度达80%后加入成脂诱导培养基, 3 d换液1次, 7 d后用4%的多聚甲醛固定15 min, PBS洗3遍, 60%异丙醇淋洗。浸入油红O染色

10 min, 60%异丙醇分色至背景无色, 双蒸水洗1遍, 苏木精复染, 晾干, 甘油明胶封片, 光镜下检查。

1.4.2 成骨分化能力检测: 取第3代的ADSCs细胞, 1×10^5 个/cm²接种于1.2 cm×1.2 cm的盖玻片上, 细胞密度达80%以后加入成骨诱导培养基, 每3 d换1次液, 4周后用4%的多聚甲醛固定15 min, PBS洗3遍, 加1%茜素红溶液, 37℃染色30 min, 双蒸水洗去多余的染料, 晾干, 甘油明胶封片, 光镜下检查。

1.5 富含血小板血浆(PRP)的制备: 20 ml无菌注射器抽取抗凝剂枸橼酸钠2 ml, 于新西兰大白兔耳中动脉抽取18 ml动脉血, 1 500 rpm离心20 min, 使PRP/PPP和红细胞分开, 超净台内吸取全部上清液、白膜层及以下2 mm的红细胞层, 置于抗凝管中, 再次以2 000 rpm离心10 min, 弃掉部分上清液, 剩余液体即为PRP; 按照10:1比例加入激活剂(10%CaCl₂+凝血酶), 20 s即凝固, 将PRP凝胶剪碎平均分成6份, 置于4℃冰箱中备用。

1.6 脂肪移植物的制备及移植方法: 兔耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠(1 ml/kg), 取颈背部脂肪清理并修剪, 将脂肪组织剪成直径为1 mm的颗粒。每个样本加入 1×10^6 个第三代脂肪基质干细胞。1 ml的针管18号白色针头吸取脂肪移植物, 在裸鼠背部及裸鼠腹股沟皮下利用针头潜行分离, 注射构建的脂肪复合物, 背部皮下组及腹股沟皮下组各6个标本, 每个点注射0.3 ml脂肪复合物(ADSCs+PRP+脂肪颗粒)。

1.6 B超测量移植物体积方法: 测量由2位固定的医生执行以减少系统误差, 测量介质为水。测量指标为移植物的长、宽和高, 通过计算公式: $1/2 \times a \times b \times c$ (a长、b宽、c高)来计算体积^[6], 对第1、2、4、6周进行测量。存活率=各时间点测量脂肪体积/0.3×100%。

1.7 统计学分析: 统计分析运用SPSS 26.0软件, 对不同移植部位的脂肪存活率进行分析。分析方法: 运用重复测量的方差分析来评价背部移植组与腹股沟移植组移植物体积随时间变化的差异。

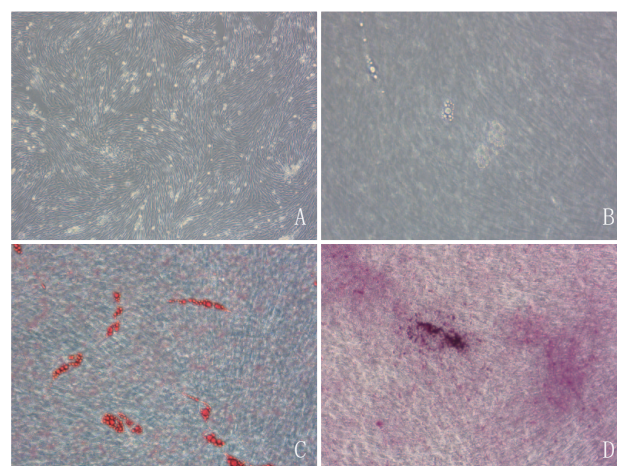
2 结果

2.1 ADSCs的体外培养及多向诱导能力检测: 对新西兰兔切去脂肪组织进行原代培养。8 h细胞贴壁, 24 h贴壁完成,

72 h更换培养液, 培养细胞呈多角形、短梭形(图1A), 传代后渐渐成为均质的长梭形细胞。取第3代培养细胞进行成脂肪、成骨诱导。加入成脂诱导液后, 细胞逐渐变为多角形, 3 d后细胞内可见小脂滴形成, 4 d后脂滴逐渐变大(图1B)。油红O染色见红染的脂滴(图1C)。加入成骨诱导液3 d后, 细胞变成短梭形, 4周后茜素红染色阳性(图1D)。

2.2 不同移植部位的可注射组织工程化脂肪存活率: 大体肉眼观察, 两组移植裸鼠均存活, 脂肪移植健康, 无感染及排斥反应发生。随时间变化, 裸鼠腹股沟及背部脂肪移植物体积逐渐变小。第6周时, 腹股沟移植组脂肪体积明显大于背部移植组(图2)。

B超对两组移植不同时间点体积进行测量(图3), 并计算存活率。腹股沟组与背部组存活率随时间的推移逐渐降低(表1), 第2~4周降幅最大, 第6周时腹股沟组的存活率明显高于背部组($P<0.05$), 差异有统计学意义。运用重复测量的统计学分析, 两组的存活率有显著差异($P=0.033$), 腹股沟组存活率高于背部组(见表1)。



注: A. 原代培养的ADSCs细胞($\times 10$); B. 可见细胞中有脂滴形成($\times 20$); C. 油红O染色可见红色脂滴($\times 20$); D. 为ADSCs成骨诱导后的茜素红染色阳性($\times 20$)

图1 脂肪基质干细胞(ADSCs)的成脂、成骨诱导



图2 两组第1、2、4、6周大体观察

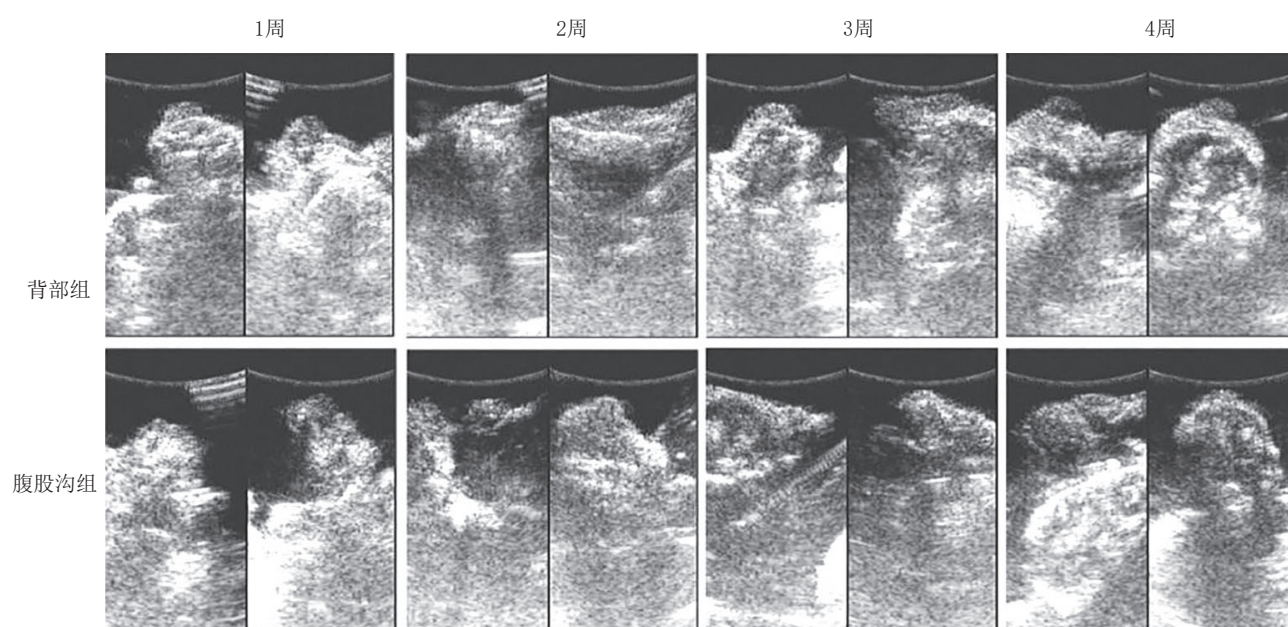


图3 两组第1、2、4、6周B超测量脂肪移植物体积变化情况

表1 两组第1、2、4、6周移植脂肪存活率比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	1周	2周	4周	6周
背部组	84.39±7.41	70.89±4.57	52.49±4.42	42.44±5.42
腹股沟组 [#]	82.00±6.93	73.81±5.59	61.82±5.94	51.23±4.37*

注: *表示腹股沟组与背部组的重复测量分析有统计学差异 ($n=6$, $P<0.05$), [#]表示两组第6周比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

创伤、感染、肿瘤、先天畸形等各种因素可以导致颌面部软组织大面积缺损,自体组织移植是目前颌面软组织修复重建的主要手段,包括皮瓣移植、皮肤扩张、脂肪移植等技术^[7]。其中,脂肪移植因其具有操作简便、取材方便、来源丰富、组织相容性好等特点被广泛运用于临床。随着对脂肪移植研究的不断深入,在移植手术中对于脂肪的获取、处理、移植后处理等环节也得到不断的更新和优化^[8]。目前,脂肪移植不仅用于软组织的修复重建,在美容整形领域也有广泛运用^[9]。脂肪移植不仅可以单独应用,也可以与皮瓣移植结合使用,术后的效果比传统皮瓣移植更加自然、患者满意度高。而脂肪移植技术在应用过程中也存在移植脂肪吸收率高等难题,其中移植脂肪组织的血供重建是影响治疗效果的关键因素^[10]。

脂肪基质干细胞(Adipose-derived stem cells, ADSCs)是组织工程中常用的种子细胞。其具有多项分化作用,在合适的条件下ADSCs能够被诱导成为成脂细胞、软骨细胞、肌细胞、神经细胞、成骨细胞和内皮细胞;另外,移植的ADSCs能通过旁分泌作用促进组织建立新生血管、调节炎症反应来刺激宿主来源干细胞成脂^[11-12]。富含血小板血浆(PRP)能够缓慢释放各种生长因子,可以促进血管内皮细胞再生。PRP与脂肪颗粒联合注射后,可以增大脂肪颗粒周围毛细血管密度,提高脂肪移植的生存率^[13]。本课题组^[14]通过脂肪基质干细胞复合PRP运用于脂肪移植中,能够显著提高移植脂肪的存活率。

唐军^[15]等对Wistar雌性大鼠背部皮下和股二头肌内进行组织工程脂肪移植,发现背部皮下组脂肪存活率优于股二头肌组,认为背部皮下为良好的移植位点。本研究通过将组织工程脂肪复合物移植于裸鼠背部皮下与腹股沟皮下,观察移植物体积变化,从而判断不同部位对于脂肪移植后生存率的影响。通过重复测量的方差分析,腹股沟皮下组移植后体积大于背部皮下组,体积变化差异 $P=0.033<0.05$,差异有统计学意义;第1、2、4周时,组间对比 $P>0.05$,组间差异无统计学意义;第6周时,组间对比 $P<0.05$,腹股沟皮下组体积大于背部皮下组,体积差异有统计学意义。腹股沟皮下脂肪移植能够减少脂肪移植后的吸收。实验结果可能与裸鼠腹股沟皮下血供良好、机械张力小等因素有关,其细胞与分子学机制需要进一步研究。

总之,组织工程化脂肪生存率有耐于良好的成脂微环

境,血运供应和机械张力都应该是动物模型建立需要考虑的问题。本研究发现可注射组织工程化脂肪的裸鼠腹股沟皮下移植组存活率大于背部皮下移植,为组织工程脂肪移植受区的选择提供一些参考。

【参考文献】

- [1]陈旭卓,周知航,郑吉骊,等.3D生物打印技术在口腔颌面部骨组织缺损修复的研究进展[J].中国口腔颌面外科杂志,2018,16(3):279-283.
- [2]郑晨曦,隋秉东,胡成虎.口腔颌面软组织损伤的再生修复策略[J].中国实用口腔杂志,2016,(12):705-708.
- [3]姜平,陈其庆,黄伟锋.颞部软组织层次解剖学研究及透明质酸注射充填的安全层次探讨[J].中华整形外科杂志,2016,32(4):280-285.
- [4]顾云鹏,马桂娥,刘珍君,等.基于面部美学单位综合因素设计的全面部脂肪填充术[J].中华整形外科杂志,2017,33(z1):88-92.
- [5]王雪岑,郑亚丽,鲁峰.工程化脂肪与正常脂肪组织的生长模式[J].中华整形外科杂志,2018,34(9):773-777.
- [6]Minn K W, min K H, Chang H, et al. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts[J]. Aesthetic Plast Surg, 2010, 34(5):626-631.
- [7]沈余明.复杂软组织缺损的修复策略与功能重建[J].中华创伤杂志, 2021, 37(6): 494-500.
- [8]袁继龙,石杰.自体脂肪移植的研究进展及热点问题[J].中国美容整形外科杂志, 2019, 30(8):449-451, 474.
- [9]李瑞芬,刘毅.自体脂肪移植量对其成活率及面部年轻化效果的影响[J].中国美容医学, 2020, 29(4):170-173.
- [10]刘丹丹,粘铭轩,何君君.提高自体脂肪移植成活率的研究进展[J].中华医学美容美容杂志, 2021, 27(4):349-352.
- [11]Luiz C D S, Natale Ferreira G D A, Christina M T, et al. Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2015, 135(4):999-1009.
- [12]Eslami A, Dehbashi M, Ashja-Arvan M, et al. Assessment of ability of human adipose derived stem cells for long term overexpression of IL-11 and IL-13 as therapeutic cytokines[J]. Cytotechnology, 2020, 72(5):773-784.
- [13]赵武超,邵家松,宋勇.富血小板血浆联合自体脂肪移植的研究进展[J].中华医学美容美容杂志, 2020, 26(1):78-80.
- [14]吕成鹏,倪华,马锐,等.脂肪基质干细胞促进脂肪移植后血管化的研究[J].山西医科大学学报, 2018, 49(6):621-626.
- [15]唐军,徐斌,刘毅.不同移植部位对组织工程化脂肪存活的影响[J].中国美容医学, 2011, 20(8):1238-1242.

[收稿日期]2021-10-15

本文引用格式: 吕成鹏,倪华,李龙,等.不同移植部位对可注射组织工程化脂肪生存率的影响[J].中国美容医学,2023,32(2):5-8.

· 论 著 ·

不同时期应用复方肝素钠尿囊素凝胶对大鼠深Ⅱ度烧伤后增生性瘢痕形成的影响

邢亮, 冯建科, 马磊磊, 魏伟, 张庆富, 张涵

(河北医科大学第一医院烧伤整形科 河北 石家庄 050000)

[摘要]目的: 研究不同时期应用复方肝素钠尿囊素凝胶对深Ⅱ度烧伤大鼠增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)的影响, 以期发现复方肝素钠尿囊素凝胶抑制瘢痕的最佳时间。方法: 使用砣码法制备深Ⅱ度烧伤大鼠模型。根据复方肝素钠尿囊素凝胶应用时间分为14 d组(A组)、28 d组(B组)和42 d组(C组), 每组根据有无应用复方肝素钠尿囊素凝胶分为未应用组(A1组、B1组、C1组)和应用组(A2组、B2组、C2组), 并于应用28 d后取材, 每组应用前取材作为应用前对照组(A0组、B0组、C0组)。共造模45只, 每小组5只。每天固定时间均匀涂抹复方肝素钠尿囊素凝胶于各创面。对A组创面拍照并计算创面愈合率, HE染色检测各组瘢痕组织的厚度, Masson染色检测各组瘢痕组织胶原纤维的表达, RT-PCR检测各组瘢痕组织炎症因子IL-6和TNF- α mRNA的表达。结果: 应用复方肝素钠尿囊素凝胶对创面愈合率有一定影响。A2、B2组瘢痕组织的厚度增长量较A1、B1组低, 未应用组和应用组瘢痕组织厚度的差值A组、B组均大于C组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A2、B2、C2组胶原纤维光密度值的生长量较A1、B1、C1组低, 未应用组和应用组胶原纤维光密度值变化量的差值比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 其中A组>C组。A2组IL-6和TNF- α mRNA相对表达的变化量较A1组低, B2组IL-6 mRNA相对表达的变化量较B1组低, 未应用组和应用组IL-6 mRNA相对表达变化量的差值A组>B组>C组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A2、B2和C2组分别较A1、B1和C1组成纤维细胞增生相对较少, 胶原纤维排布相对规则。结论: 深Ⅱ度烧伤后14 d、28 d和42 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶均可一定程度的抑制大鼠瘢痕增生和胶原纤维的表达, 减少炎症因子基因的表达, 其中14 d应用效果最佳。

[关键词] 复方肝素钠尿囊素凝胶; 烧伤; 深Ⅱ度; 增生性瘢痕; 胶原纤维; 炎症因子

[中图分类号] R619⁺.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2023) 02-0009-06

Effects of Compound Heparin Sodium and Allantoin Gel at Different Stages on Hypertrophic Scar Formation after Deep Second Degree Burn in Rats

XING Liang, FENG Jianke, MA Leilei, WEI Wei, ZHANG Qingfu, ZHANG Han

(Department of Burns and Plastic Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

Abstract: Objective To explore the effects of compound heparin sodium and allantoin gel at different stages on hypertrophic scar formation after deep second degree burn in rats, in order to find the best time for compound heparin sodium and allantoin gel to inhibit scars. **Methods** The deep second degree burn rat models were prepared by weight method. According to the application time of compound heparin sodium and allantoin gel, all rats were divided into 14 d group (group A), 28 d group (group B) and 42 d group (group C). Each group was divided into non-application groups (group A1, B1, C1) and application groups (group A2, B2, C2) according to whether the compound heparin sodium and allantoin gel was applied or not, and the samples were collected at 28 days after application. The samples collected before application were used as control groups (group A0, B0, C0). A total of 45 models were made, 5 in each group. Compound heparin sodium and allantoin gel was evenly applied to each wound at a fixed time every day. The wounds of group A were photographed and calculated the wound healing rate. The thickness of scar tissue was measured by HE staining. The expression of collagen fibers were measured by Masson staining. The inflammatory factors IL-6 and TNF- α mRNA expressions were detected by RT-PCR. **Results** The application of compound heparin sodium and allantoin gel had a certain effect on the wound healing rate. The increase of scar tissue thickness in groups A2 and B2 were lower than that in groups A1 and B1, respectively. The difference of scar tissue thickness between the non-application group and the application group in group A and B was greater than that in group C,

基金项目: 河北省政府资助专科带头人培养项目(编号: LS201805); 河北省卫生健康委员会基金项目(编号: 20200116)

通信作者: 张庆富, 烧伤整形科主任, 教授, 博士研究生导师; 主要从事烧伤并发症研究。E-mail: zhangqfdoctor@163.com

第一作者: 邢亮, 主治医师; 主要从事烧伤并发症研究。E-mail: doctorxingl@163.com

the differences were statistically significant ($P<0.05$). The increase of collagen fiber optical density in group A2, B2 and C2 were lower than that in group A1, B1 and C1. The differences in the change of collagen fiber optical density between the non-application group and the application group were statistically significant ($P<0.05$). Among them, group A>group C. The relative expression changes of IL-6 and TNF- α mRNA in group A2 were lower than those in group A1. The relative expression of IL-6 mRNA in group B2 was lower than that in group B1. The difference of IL-6 mRNA relative expression between the non-application group and the application group was group A>group B>group C, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with group A1, B1 and C1, group A2, B2 and C2 constituted less fibroblasts proliferation, and the arrangement of collagen fibers were relatively regular. **Conclusion** Application of compound heparin sodium and allantoin gel on 14 d, 28 d, and 42 d after deep second degree burns can inhibit hypertrophic scars in rats to a certain extent, inhibit the expression of collagen fibers, and reduce the expression of inflammatory factor genes. 14 d was the best choice.

Key words: compound heparin sodium and allantoin gel; burns; deep second degree; hypertrophic scar; collagen fibers; inflammatory cytokines

瘢痕是皮肤受到各种创伤愈合修复后的自然反应,其异常增生可导致病理性瘢痕。病理性瘢痕可以分为很多种,包括增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)、浅表性瘢痕和瘢痕疙瘩等^[1]。在瘢痕的众多类型里以HS最为常见而又难以治疗,约占91.4%^[2]。深Ⅱ度烧伤伤及真皮网层,因此极易发生异常增生,形成HS,给患者带来经济和心理负担,是临床烧伤科医师面临的一大难题^[2]。复方肝素钠尿囊素凝胶内含洋葱提取液、肝素钠和尿囊素,具有抑制成纤维细胞的增殖、避免组织硬化、抗炎、增加瘢痕表面有弹力、减少病理性胶原过度增生和促进细胞上皮化的作用,常用于创面愈合后立即应用,临床治疗作用明确,但有研究发现部分患者治疗效果并不理想^[3-4]。瘢痕的增生过程可分为炎症期(肉芽组织期)、增生期、重塑期(瘢痕成熟期)3个阶段^[5]。各个阶段细胞生长环境不同,药物作用效果也因应用时间不同可产生巨大的差异。本研究通过制备深Ⅱ度烧伤大鼠模型,观察不同时期应用复方肝素钠尿囊素凝胶对HS的影响,以期发现复方肝素钠尿囊素凝胶抑制瘢痕增生的最佳时间。

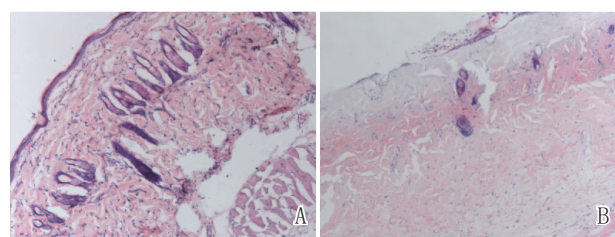
1 材料和方法

1.1 实验动物:选择20周龄SPF级SD大鼠50只,购于河北伊维沃生物科技有限公司[动物生产许可证号:SCXK(冀)2020-002],雌雄不限,体重(250±50)g。分笼饲养于室温18℃~25℃、湿度50%~60%、12 h光照/12 h黑暗交替和洁净空气通风的环境中。定时喂食和更换垫料。所有的处理严格遵循《实验动物管理条例》,并在医院实验动物管理委员会监督下进行。

1.2 主要试剂与仪器:复方肝素钠尿囊素凝胶购于Merz Pharma GmbH & Co. KGaA公司;OCT冰冻切片包埋剂、伊红、苏木素、改良Masson三色染色试剂盒和中性树胶均购于索莱宝公司;TRIZOL购于Thermo Scientific公司;FastKing RT Kit和FastFire qPCR PreMix购于天根生化科技有限公司;实验仪器和实验场地由河北医科大学第一医院中心实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 实验模型制备:SD大鼠实验前1周进行适应性饲养。参照丁毅等^[6]报道的方法制备模型:大鼠实验前1周进行适应性饲养,造模前1 d禁食禁水12 h。使用10%水合氯醛(0.3 ml/kg)腹腔注射麻醉,背部备皮,完全刮干净毛发后用8%硫化钠溶液脱毛,75%乙醇消毒。将砣码放到烧开的水浴锅中,煮沸10 min,用镊子将砣码垂直置于大鼠背部要烫伤的皮肤上,持续10 s后移开砣码(病理切片观察是否为深Ⅱ度烫伤),移开砣码后立即予腹腔注射5 ml生理盐水,进行抗休克治疗。病理切片证实造模成功,切片呈现:部分真皮层内细胞坏死,部分毛囊等附件残存,毛细血管扩张、管腔可见血液瘀滞及红细胞。对照组大鼠不作任何处理。见图1。



注:A.对照组;B.模型组

图1 两组创面皮肤病理切片(100×)

1.3.2 实验分组:根据复方肝素钠尿囊素凝胶应用时间分为14 d组(A组)、28 d组(B组)和42 d组(C组)。其中A组又分为应用前对照组(A0组,于造模第14天取材)、未应用组(A1组,于造模第14天应用凡士林,涂抹28 d后取材)、应用组(A2组,于造模第14天应用复方肝素钠尿囊素凝胶,与A1组同期取材)。B组又分为应用前对照组(B0组,于造模第28天取材)、未应用组(B1组,于造模第28天应用凡士林,涂抹28 d后取材)、应用组(B2组,于造模第28天应用复方肝素钠尿囊素凝胶,与B1组同期取材)。C组又分为应用前对照组(C0组,于造模第42天取材)、未应用组(C1组,于造模第42天应用凡士林,涂抹28 d后取

材)、应用组(C2组,于造模第42天应用复方肝素钠尿囊素凝胶,与C1组同期取材)。共造模45只,每小组5只。未应用组和应用组每天固定时间在创面直径3 cm范围内均匀涂抹凡士林或复方肝素钠尿囊素凝胶3次(各凝胶涂擦量为1.0 g)。

1.3.3 创面愈合率计算:观察A组SD大鼠瘢痕组织的质地、颜色和上皮化程度,并用相机拍照。在3 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 和42 d记录创面情况,使用Adobe Photoshop CS6和 Image-Pro Plus 6.0软件计算大鼠的愈合率。愈合率(%)=(S0-S)/S0×100%,其中S0为原始创面面积,S为未愈合创面面积。创面完全愈合的标准为创面完全被上皮覆盖,无残余缺损,创面色均一光滑。

1.3.4 HE染色:收集各组瘢痕组织放入4%甲醛溶液中固定、脱水,OCT包埋后切成10 μm厚的切片。苏木精染色5 min,伊红染色3 min,完成操作后将切片在Nikon显微镜下拍照,观察组织形态。镜下测量瘢痕组织以及邻近的正常组织表皮层和真皮层厚度。取5个视野的平均值。

1.3.5 Masson染色:按照改良Masson三色染色试剂盒说明书进行染色,脱水后用二甲苯透明、封片,完成操作后将切片在Nikon倒置显微镜下拍照进行分析。观察各组SD大鼠瘢痕组织胶原纤维的分布与排列。应用Image-Pro Plus 6.0进行分析,测量积分吸光度值和图像面积,求每个视野积分吸光度与图像面积的比值,记为光密度值。

1.3.6 实时荧光定量RT-PCR检测:取SD大鼠瘢痕组织100 mg置于匀浆器中,加入裂解液进行匀浆,提取总RNA,并逆转录为cDNA,最后进行qPCR进行检测。所需引物由上海生工生物有限公司合成。见表1。以GAPDH基因作为内参,采用 $1g2^{-\Delta CT}$ 法计算瘢痕组织中IL-6和TNF-α mRNA的表达, $\Delta CT=CT_{(目的基因)}-CT_{(GAPDH)}$ 。

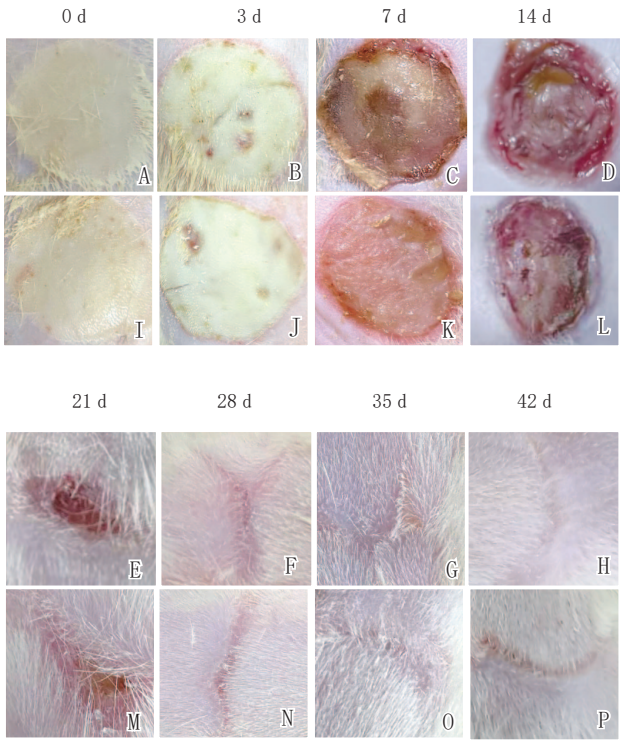
表1 各基因引物序列

基因	正义引物(5'-3')	反义引物(3'-5')
IL-6	TGCCCTTCAGGAACAGCTATG	TGGGTGGTATCCTCTGTGAAGTCTCTCTC
TNF-α	CCGGGCTCAGAAATTCACAACACTA	CCCAGCAATCCAGGCCACTAC
GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTG	GCTTCACCACCTTCTTGAT

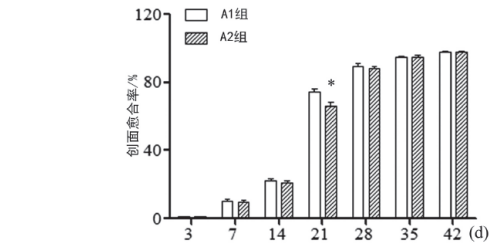
1.3.7 统计学分析:采用Excel进行数据汇总。GraphPad Prism version 5.0软件进行制图。SPSS 22.0统计软件对数据进行统计学分析。采用Spapiro-Wilk进行正态性检验,Levene检验进行方差齐性检验。符合正态且方差齐的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本进行t检验;多组数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD法。不符合正态分布计量资料采用M(P_{25}, P_{75})表示,两独立样本采用Mann-Whitney U检验;多组数据采用Kruskal-Wallis单因子方差分析,两两比较采用Dunnnett法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(双尾)。

2 结果

2.1 复方肝素钠尿囊素凝胶对创面愈合率的影响:烧伤后3 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d和42 d,对A1组和A2组创面进行拍照。见图2。3 d、7 d和14 d,A1组和A2组创面愈合率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。A1组在14 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶后,21 d创面愈合率与A2组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);28 d、35 d和42 d创面愈合率与A2组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。应用复方肝素钠尿囊素凝对创面愈合率有一定影响。见图3。



注:A~H,A1组;I~P,A2组
图2 A1组和A2组不同时间大鼠烧伤创面愈合情况

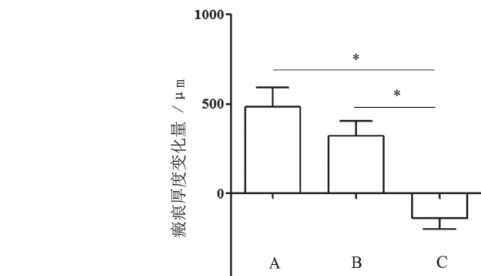


注:*表示与A1组比较, $P < 0.05$
图3 A1组和A2组不同时间大鼠烧伤创面愈合率比较

2.2 不同时间应用复方肝素钠尿囊素凝胶对瘢痕组织厚度的影响:各组间大鼠创面邻近的正常皮肤组织表皮层和真皮层厚度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。瘢痕组织厚度变化值为未应用组和应用组与应用前对照组的差值,即未应用和应用复方肝素钠尿囊素凝胶28 d后瘢痕组织厚度的变化量。A2组和B2组瘢痕组织厚度的增长量较A1组和B1组低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。三个时间

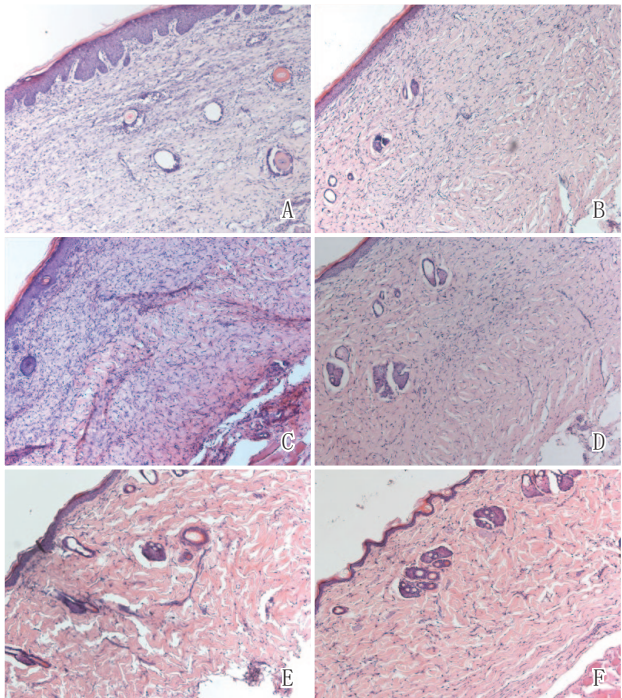
点未应用组和应用组瘢痕组织厚度的差值A组、B组均大于C组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见图4。各组瘢痕组织HE染色结果见图5。

表2 未应用组与应用组瘢痕厚度变化比较 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)				
组别	只数	A组	B组	C组
未应用组 (A1/B1/C1组)	5	479.72 \pm 106.43	211.69 \pm 86.66	9.23 \pm 58.11
应用组 (A2/B2/C2组)	5	-7.85 \pm 34.96	-108.96 \pm 52.98	147.86 \pm 78.67
t值		4.352	3.157	1.417
P值		0.002	0.014	0.194



注：* $P<0.05$

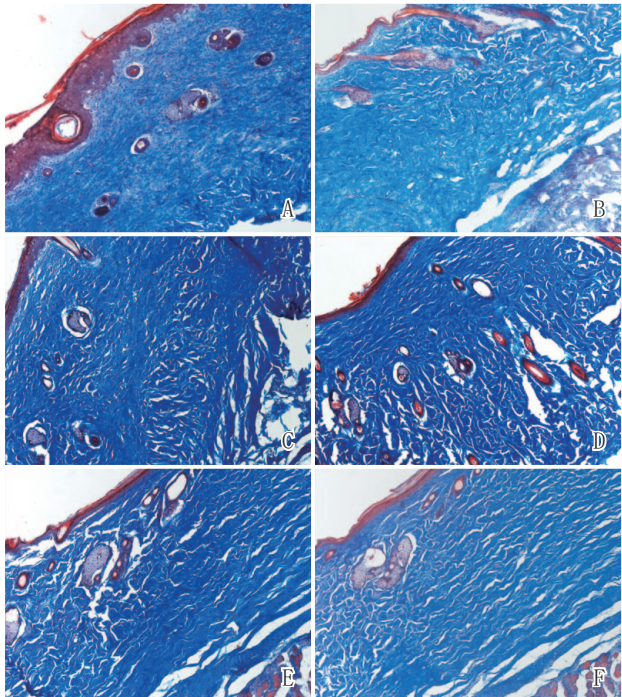
图4 各组瘢痕组织厚度变化量比较



注：A. A1组；B. A2组；C. B1组；D. B2组；E. C1组；F. C2组

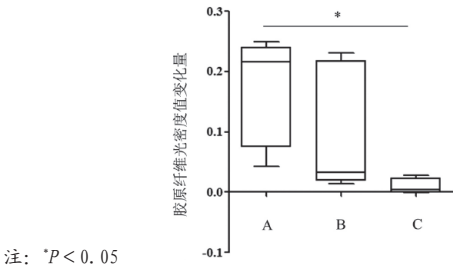
图5 各组瘢痕组织HE染色结果（100 \times ）

2.3 不同时间应用复方肝素钠尿囊素凝胶对瘢痕组织胶原纤维的影响：改良Masson染色瘢痕组织后，胶原纤维呈蓝色，肌纤维、胞质、纤维素、角蛋白和红细胞呈红色，见图6。胶原纤维光密度变化值为未应用和应用复方肝素钠尿囊素凝胶28 d后瘢痕组织胶原纤维光密度值的变化量。A2组、B2组、C2组瘢痕组织胶原纤维光密度值的增长量分别较A1组、B1组、C1组低，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见表3。三个时间点未应用组和应用组胶原纤维光密度值变化量差值比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。其中，A组明显大于C组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；A组与B组、B组与C组比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），见图7。



注：A. A1组；B. A2组；C. B1组；D. B2组；E. C1组；F. C2组

图6 各组瘢痕组织Masson染色结果（100 \times ）



注：* $P<0.05$

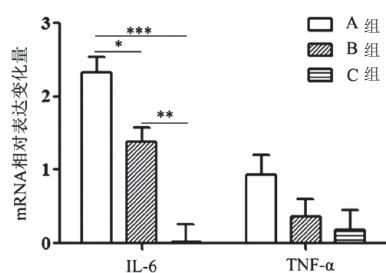
图7 各组瘢痕组织胶原纤维光密度值变化量比较

表3 未应用组与应用组胶原纤维光密度值变化比较					$[\bar{x}\pm s, M(P_{25}, P_{75})]$	
组别	只数	A组	B组	C组		
未应用组 (A1/B1/C1组)	5	0.32 \pm 0.04	0.05 (0.03, 0.23)	0.03 (0.02, 0.04)		
应用组 (A2/B2/C2组)	5	0.15 \pm 0.01	0.02 (-0.01, 0.03)	-0.01 (-0.05, 0.01)		
t/Z值		3.965	-2.193	-2.611		
P值		0.004	0.028	0.009		

表4 未应用组与应用组IL-6和TNF- α mRNA相对表达量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-6			TNF- α		
		A组	B组	C组	A组	B组	C组
未应用组(A1/B1/C1组)	5	-2.03 \pm 0.21	-1.95 \pm 0.20	-3.91 \pm 0.23	-1.16 \pm 0.27	-1.35 \pm 0.23	-1.53 \pm 0.28
应用组(A2/B2/C2组)	5	-4.36 \pm 0.23	-3.33 \pm 0.14	-3.93 \pm 0.27	-2.09 \pm 0.24	-1.72 \pm 0.29	-1.71 \pm 0.27
t值		7.458	5.772	0.057	2.561	0.974	0.466
P值		0.000	0.000	0.956	0.034	0.359	0.654

2.4 不同时间应用复方肝素钠尿囊素凝胶对瘢痕组织IL-6和TNF- α mRNA表达的影响: IL-6和TNF- α mRNA的相对表达变化值为未应用和应用复方肝素钠尿囊素凝胶28 d后瘢痕组织IL-6和TNF- α mRNA相对表达的变化量。A2组IL-6和TNF- α mRNA相对表达的变化量较A1组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); B2组IL-6 mRNA相对表达的变化量较B1组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); B2组与B1组TNF- α mRNA相对表达的变化量比较差异无统计学意义($P > 0.05$); C2组与C1组IL-6和TNF- α mRNA相对表达的变化量比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表4。三个时间点未应用组和应用组IL-6 mRNA相对表达变化量的差值A组最大, B组次之, C组最小, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 三个时间点未应用组和应用组TNF- α mRNA相对表达变化量的差值比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图8。

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 图8 各组瘢痕组织IL-6和TNF- α mRNA相对表达变化量比较

2.5 各组炎性细胞、成纤维细胞和胶原纤维的分布与排列: A1组、B1组和C1组未应用复方肝素钠尿囊素凝胶, 炎性细胞明显增多, 成纤维细胞增生明显, 胶原纤维排列紊乱, 结构致密, 增生明显。A2组、B2组和C2组应用复方肝素钠尿囊素凝胶, 炎性细胞相对较少, 成纤维细胞和胶原纤维增生相对较少, 胶原纤维排布相对规则, 结构疏松, 间隙较宽。见图5~6。

3 讨论

烧伤是日常生活中常见的意外伤害之一, 我国每年有超2 000万人因不同程度的烧伤入院, 其中又以深Ⅱ度烧伤最为常见^[7]。深Ⅱ度烧伤伤及真皮网层, 因此极易发生异常增生, 形成HS。复方肝素钠尿囊素凝胶内含洋葱提取液、肝素钠和尿囊素, 具有抑制成纤维细胞的增殖、避免

组织硬化、抗炎、增加瘢痕表面弹力、减少病理性胶原过度增生和促进细胞上皮化的作用, 常于创面愈合后立即应用, 临床治疗作用明确, 但有研究发现部分患者治疗效果不甚理想^[3-4]。瘢痕的增生过程可分为炎症期(肉芽组织期)、增生期、重塑期(瘢痕成熟期)3个阶段^[5]。各个阶段细胞生长环境不同, 药物作用效果也因应用时间不同可产生巨大的差异。在炎症阶段, 炎症细胞可浸润到伤口位置, 清除细菌和坏死组织, 并分泌细胞因子激活成纤维细胞的增殖和血管发生; 在增殖阶段, 创面完全愈合, 成纤维细胞产生大量胶原纤维和及其他细胞基质蛋白; 在成熟阶段, 瘢痕组织重塑, 最终成熟。有研究表明, 深Ⅱ度烧伤大鼠创面成纤维细胞在第14天增殖最活跃^[8], 在第28天创面基本愈合, 开始进入增殖阶段^[9]。这也是本次实验设定复方肝素钠尿囊素凝胶应用时间的依据。

复方肝素钠尿囊素凝胶作为一种抗HS的药物, 具有抗纤维母细胞增生和抑制细胞外基质生成的作用^[10]。因此, 在临床中复方肝素钠尿囊素凝胶在创面愈合后立即使用。本研究发现, 烧伤后第3、7和14天, A1组和A2组创面愈合率比较差异无统计学意义。A1组在14 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶后, 第21天创面愈合率与A2组比较差异有统计学意义, 第28、35和42天创面愈合率与A2组比较差异无统计学意义。因此, 应用复方肝素钠尿囊素凝胶对创面愈合有一定影响。

增生性瘢痕形成机制复杂, 主要是由于皮肤过度修复, 即真皮成纤维细胞为主的细胞大量增殖及以胶原纤维为主的细胞外基质过度堆积^[11]。成纤维细胞和胶原纤维的排列结构和组成比例的改变可直接影响瘢痕组织的质地。在本研究中14 d和28 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶后成纤维细胞和胶原纤维的表达减少, 最终有效抑制瘢痕增生, 且14 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶后效果最明显。大鼠创面在第14天成纤维细胞增殖最活跃^[8]。推测复方肝素钠尿囊素凝胶在成纤维细胞和胶原纤维活跃的初期作用更加明显。而42 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶仅能抑制胶原纤维的表达, 对瘢痕组织的厚度无明显的影响, 这可能是增生后期细胞处于相对稳定状态, 对药物反应不明显。

有研究表明, 皮肤在损伤后为更好的进行修复, 开始启动机体免疫系统, 适度的炎症反应有利于溶解和去除组

织碎片,抑制细菌,防止加重感染,而过度持续性的慢性炎症则会造成创面愈合障碍并刺激成纤维细胞增殖分裂^[12]。皮肤损伤后,在急性炎症期积极治疗,可抑制IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23和TNF- α 等炎症因子的过表达,进而抑制增生性瘢痕的产生和减少创面皮肤的色素沉积^[13]。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)及其下游Smad家族的信号转导通路在增生性瘢痕发病机制中发挥关键作用。既往研究发现,IL-6过表达可诱导Th1细胞反应,进而激活TGF- β_1 /Smad3信号通路,将急性炎症转变为慢性炎症,促进纤维化状态,从而导致瘢痕的增生^[14-15]。本研究发现,14 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶可显著降低IL-6和TNF- α mRNA的相对表达;28 d仅能显著降低IL-6 mRNA的相对表达;42 d不能显著降低IL-6和TNF- α mRNA的相对表达。提示在炎症期应用复方肝素钠尿囊素凝胶的抑炎作用更加明显,后期由于创面愈合,炎症因子表达相对降低,故复方肝素钠尿囊素凝胶抑制炎症作用降低。

本研究的目的是探讨复方肝素钠尿囊素凝胶抑制HS的最佳应用时间。在14 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶后,与未应用组比,仅在21 d瘢痕愈合产生差异,之后无明显影响,这可能与复方肝素钠尿囊素凝胶影响肉芽组织的产生同时具有抗炎作用,两者作用效果叠加导致。王茶锋等^[16]研究发现,对122例儿童颜面部软组织挫伤患者于术后早期应用复方肝素钠尿囊素凝胶预防瘢痕,并随访6个月~1年,均无明显瘢痕且外观及功能的恢复理效果想。本研究也有相似的结果,在14 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶对抑制瘢痕增生和胶原纤维生成方面明显较28 d和42 d效果好。目前,复方肝素钠尿囊素凝胶应用于完全愈合后,这是为防止其抑制创面愈合而引起感染。然而,随着人们意识的提高、处理及时和抗生素的应用,烧伤创面感染的风险大大降低。提示,深II度烧伤早期应用复方肝素钠尿囊素凝胶对抑制瘢痕增生效果会更加明显且不易发生感染。

综上所述,深II度烧伤后14 d、28 d和42 d应用复方肝素钠尿囊素凝胶均可一定程度抑制大鼠瘢痕的增生,抑制胶原纤维和炎症因子基因的表达,其中14 d应用效果最佳。为临床更好的使用复方肝素钠尿囊素凝胶治疗HS提供了理论依据。

[参考文献]

- [1]李丽,王林.正常皮肤与病理性瘢痕组织中HIF-1 α 和促炎细胞因子水平比较及两者相关性研究[J].中国美容医学,2019,28(4):71-73.
- [2]Xia Z,Wang J,Yang S,et al.Emodin alleviates hypertrophic scar formation by suppressing macrophage polarization and inhibiting

the Notch and TGF- β pathways in macrophages[J].Braz J Med Biol Res,2021,54(8):e11184.

- [3]Kahraman A,Kahveci R.Evaluating the effect of polytetrafluoroethylene and extractum cepae-heparin-allantoin gel in peripheral nerve injuries in a rat model[J].Plast Surg (Oakv),2015,23(1):9-14.
- [4]Conti V,Corbi G,Ianna Cc One T,et al.Effectiveness and tolerability of a patch containing onion extract and allantoin for cesarean section scars[J].Front Pharmacol,2020,11:569514.
- [5]Sanon S,Hart D A,Tredget E E.Molecular and cellular biology of wound healing and skin regeneration[J].Skin Tissue Engineer Regenerat Med,2016:19-47.
- [6]丁毅,吾拉尔·阿德力,李敏,等.一种简便的大鼠II度烫伤模型制备方法[J].临床与病理杂志,2021,41(3):517-522.
- [7]白淑娟,康海燕,白翠翠.身心护理在颜面部烧伤患者中的应用效果[J].临床医学研究与实践,2020,5(10):155-157.
- [8]赵春霖,王丽娟,董小鹏,等.生肌玉红膏对深II度烧伤大鼠创面愈合过程中I、III型胶原表达变化的影响[J].中国中医药科技,2013,20(5):467-468.
- [9]刘沂霖,李利平,陈季玲,等.大鼠皮肤急性深II度 β 射线损伤创面愈合过程中的对比观察[J].中国烧伤创疡杂志,2014,26(1):30-35.
- [10]Hassanpour S E,Farnoush N,Karami M Y,et al.The effect of silicone gel versus contractubex gel on the upper-extremity postsurgical scars: A randomized, double-blinded, controlled trial[J].Med J Islam Repub Iran,2020,34:146.
- [11]Condorelli A G,El Hachem M,Zambruno G,et al.Notch-ing up knowledge on molecular mechanisms of skin fibrosis: focus on the multifaceted Notch signalling pathway[J].J Biomed Sci,2021,28(1):36.
- [12]邓雨萌.炎性反应在瘢痕疙瘩发生发展中的作用及机制研究[J].中国美容医学,2020,29(4):167-169.
- [13]Kurokawa I,Layton A M,Ogawa R.Updated treatment for acne: targeted therapy based on pathogenesis[J].Dermatol Ther (Heidelb),2021,11(4):1129-1139.
- [14]Yang L,Lian Z,Zhang B,et al.Effect of ligustrazine nanoparticles on Th1/Th2 balance by TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in rats with postoperative peritoneal adhesion[J].BMC Surg,2021,21(1):211.
- [15]王忆梅.硅油尿素地米乳膏对兔耳增生性瘢痕Th1/Th2相关细胞因子及TGF- β_1 /smad3信号通路的影响[D].成都:成都中医药大学,2016.
- [16]王茶锋,陈毓青,郭君.儿童颜面部软组织挫伤122临床分析[J].吉林医学,2013,34(5):918-919.

[收稿日期]2021-12-15

本文引用格式:邢亮,冯建科,马磊磊,等.不同时期应用复方肝素钠尿囊素凝胶对大鼠深II度烧伤后增生性瘢痕形成的影响[J].中国美容医学,2023,32(2):9-14.

·论 著·

点阵CO₂激光联合A型肉毒毒素治疗HS的临床疗效及对患者血清TNF- α 、TGF- β_1 和MMP-9水平的影响

张雪, 兰东, 宁淑华, 冉立伟, 于思思, 张杰

(首都医科大学附属北京朝阳医院皮肤与医疗美容科 北京 100043)

[摘要]目的: 观察点阵CO₂激光联合A型肉毒毒素(Botulinum toxin A, BTXA)治疗增生性瘢痕(Hypertrophic scars, HS)的临床疗效及其对患者血清肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子 β_1 蛋白(Transforming growth factor- β_1 protein, TGF- β_1)和基质金属蛋白酶9(Matrix metalloproteinase 9, MMP-9)水平的影响。方法: 选取2019年2月-2020年3月本院收治的HS患者50例, 按照随机数表法将其分为对照组和观察组, 各25例。对照组接受点阵CO₂激光治疗, 观察组接受点阵CO₂激光联合BTXA治疗。观察两组患者治疗前后温哥华瘢痕量表(Vancouver scar scale, VSS)评分、视觉模拟评分(Visual analogue scale, VAS)、数字评分法(Numeric rating scales, NRS)、瘢痕面积、瘢痕厚度以及血清TNF- α 、TGF- β_1 、MMP-9水平变化, 并记录不良反应发生情况, 比较不良反应总发生率。结果: 治疗前, 两组患者VSS评分、VAS评分、NRS评分、瘢痕面积及瘢痕厚度无明显差异($P>0.05$); 治疗后6个月, 两组患者VSS评分、VAS评分、NRS评分、瘢痕面积及瘢痕厚度显著降低($P<0.05$), 且观察组显著低于对照组($P<0.05$); 治疗前两组患者血清TNF- α 、TGF- β_1 、MMP-9水平无明显差异($P>0.05$); 治疗后1个月, 两组患者血清TNF- α 、TGF- β_1 、MMP-9水平均显著降低($P<0.05$), 且观察组显著低于对照组($P<0.05$); 两组患者不良反应总发生率无明显差异($P>0.05$)。结论: 点阵CO₂激光联合BTXA治疗HS疗效显著, 能够明显降低VSS评分, 减轻患者的痛苦及瘙痒程度, 降低患者血清TNF- α 、TGF- β_1 和MMP-9水平, 安全性高。

[关键词]点阵CO₂激光; A型肉毒毒素; 增生性瘢痕; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子 β_1 蛋白; 基质金属蛋白酶9

[中图分类号]R619⁺.6 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2023)02-0015-04

Clinical Efficacy of Fractional CO₂ Laser Combined with Type A Botulinum Toxin in the Treatment of HS and Its Effect on TNF- α , TGF- β_1 and MMP-9 Levels in Patients

ZHANG Xue, LAN Dong, NING Shuhua, RAN Liwei, YU Sisi, ZHANG Jie

(Department of Skin and Medical Cosmetology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100043, China)

Abstract: **Objective** To observe the clinical efficacy of fractional CO₂ laser combined with botulinum toxin A (BTXA) in the treatment of hypertrophic scars (HS) and its effect on levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β_1 protein (TGF- β_1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). **Methods** 50 cases of HS patients from February 2019 to March 2020 were selected and divided into the control group and the observation group according to the random number table method, with 25 cases in each group. The control group was treated with fractional CO₂ laser, and the observation group was treated with fractional CO₂ laser combined with BTXA. The changes of Vancouver scar scale (VSS) score, visual analog scale (VAS) score, numerical rating scale (NRS) score and serum TNF- α , TGF- β_1 and MMP-9 levels before and after the treatment in the two groups were observed, the incidence of adverse reactions was recorded, and the total incidence of adverse reactions was compared. **Results** Before the treatment, there were no significant differences in VSS score, VAS score and NRS score between the two groups ($P>0.05$); 6 months after the treatment, VSS score, VAS score and NRS score in the two groups significantly decreased ($P<0.05$), and the observation group was significantly lower than the control group ($P<0.05$); Before the treatment, there were no significant differences in serum TNF- α , TGF- β_1 and MMP-9 levels between the two groups ($P>0.05$). 1 month after the treatment, the levels of serum TNF- α , TGF- β_1 and MMP-9 in the two groups significantly decreased ($P<0.05$), and the observation group was significantly lower than the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Fractional CO₂ laser combined with BTXA in the

treatment of HS has a significant effect, can significantly reduce the VSS score, relieve the pain and itching degree of patients, and reduce the serum TNF- α , TGF- β_1 , MMP-9 levels, with high safety.

Key words: fractional CO₂ laser; botulinum toxin A; hypertrophic scar; tumor necrosis factor- α ; transforming growth factor- β_1 protein; matrix metalloproteinase 9

瘢痕是烧伤、创伤等导致的皮肤组织发生的病理变化,临床上以瘙痒及疼痛为主要症状^[1],若创面发生过度修复,成纤维细胞的大量增生、胶原基质的过度沉积,容易发展成纤维增生性的真皮损伤,并进一步形成增生性瘢痕(Hypertrophic scars, HS),或者瘢痕疙瘩^[2]。随之而来的形象受损、功能残疾将对患者的生活质量产生严重的负面影响^[3]。目前临床上治疗HS的方法有手术和非手术,非手术方法包括压迫、冷冻疗法、激光以及药物注射^[4]。近年来,激光治疗被认为是治疗创伤性瘢痕和挛缩的一线疗法,激光技术的发展为HS和瘢痕疙瘩引入了新的治疗方案^[5-6]。此外,HS病灶周围注射A型肉毒杆菌毒素(Botulinum toxin A, BTXA)被认为是目前预防、治疗HS最有前景的方法之一^[7]。本研究旨在观察点阵CO₂激光联合BTXA治疗HS的临床疗效,及其对患者血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子 β_1 蛋白(TGF- β_1)及基质金属蛋白酶9(MMP-9)水平的影响,以期寻求最佳临床治疗方案提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料:选取2019年2月-2020年3月本院收治的HS患者50例,按照随机数表法将其分为对照组和观察组,各25例。对照组患者男14例、女11例,年龄(32.56 \pm 3.16)岁,病程(3.58 \pm 1.26)月,病因烧伤6例,外伤16例,手术3例,瘢痕部位面部6例,躯干10例,四肢9例;观察组患者男15例、女10例,年龄(31.84 \pm 3.57)岁,病程(3.68 \pm 1.21)月,病因烧伤8例,外伤15例,手术2例,瘢痕部位面部8例,躯干11例,四肢6例。两组患者上述一般资料比较无明显差异($P>0.05$)。

1.2 纳入和排除标准

1.2.1 纳入标准:①符合《现代瘢痕治疗学》^[8]中的HS诊断标准;②未接受其他治疗;③病程2~6个月;④患者知情同意,并签署同意书。

1.2.2 排除标准:①妊娠、哺乳期女性;②合并严重肝肾功能不全;③合并精神疾病或意识障碍;④过敏体质。

1.3 治疗方法

1.3.1 对照组:采用点阵CO₂激光治疗。具体治疗方法:术前以酒精消毒患者需要治疗的区域后,根据患者瘢痕外形选取恰当的扫描图形,并采用点阵CO₂激光对其瘢痕部位进行扫描,使激光发光端和需要治疗的部位保持90°,并与皮肤维持5~10 cm的垂直距离。若患者瘢痕较薄,即轻度HS选择Deep FX模式进行治疗,参数设置:能量密度12~18 mJ/cm²,频率15~30 Hz,光斑密度8%~16%;若患

者瘢痕较厚、即中重度HS选择Active FX模式治疗,参数设置:能量密度80~150 mJ/cm²,频率35~60 Hz,光斑密度35%~60%,重复1~3遍。48 h内冰敷,48 h后每日使用防晒霜。1次/月,共治疗3次。定期复查。

1.3.2 观察组:采用点阵CO₂激光联合BTXA治疗。具体治疗方法:采用与对照组相同的点阵CO₂激光治疗,告知患者用药风险后,使用BTXA对患者进行局部注射。注射前将100 U的BTXA稀释于2.5 ml的0.9%氯化钠注射液,分装至1 ml注射器以备,于瘢痕周围注射,每个注射点间隔1 cm,每个点的注射剂量为4 U,1次/月,共注射3次。告知所有患者避免抓、挠治疗部位,且禁食辛辣以及烟酒。定期复查。

1.4 观察指标

1.4.1 温哥华瘢痕量表(Vancouver scar scale, VSS)评分:VSS评分共有颜色、血管分布、厚度以及柔软度四个项目,分数与瘢痕严重程度成正相关。分别于治疗前、治疗后6个月对两组患者进行评定,并比较总分差异。

1.4.2 疼痛及瘙痒程度:分别于治疗前、治疗后6个月采用视觉模拟评分(Visual analogue scale, VAS)对两组患者进行疼痛评估,得分与疼痛程度成正相关;采用数字评分法(Numeric rating scales, NRS)对两组患者进行瘙痒程度评估,得分与瘙痒程度成正相关。

1.4.3 瘢痕面积及瘢痕厚度:分别于治疗前、治疗后6个月记录两组患者瘢痕面积与瘢痕厚度。

1.4.4 血清指标:分别于治疗前、治疗后1个月检测两组患者血清TNF- α 、TGF- β_1 及MMP-9水平并进行比较。

1.4.5 不良反应:治疗后6个月内对患者进行随访并复查,观察两组患者不良反应发生情况,并比较总发生率。

1.5 统计学分析:使用SPSS 21.0软件进行统计学计算,计量资料均采取“ $\bar{x}\pm s$ ”来描述,两组间采用独立 t 检验,治疗前后采用配对 t 检验;计数资料不良反应以[例(%)]表示,采用连续性 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者VSS评分比较:治疗前,两组患者VSS评分无明显差异($P>0.05$);治疗后6个月,两组患者VSS评分显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),且观察组显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 两组患者疼痛及瘙痒程度比较:治疗前,两组患者VAS评分、NRS评分无明显差异($P>0.05$);治疗后6个月,两组患者VAS评分、NRS评分显著降低($P<0.05$),且观察组显著低于对照组($P<0.05$)。见表2。

表1 两组患者VSS评分比较 (x̄±s, 分)					
组别	例数	VSS		t值	P值
		治疗前	治疗后6个月		
对照组	25	13.38±4.52	8.19±1.59	8.494	<0.001
观察组	25	13.53±4.64	5.63±1.27	13.367	<0.001
t值		0.115	6.290		
P值		0.908	<0.001		

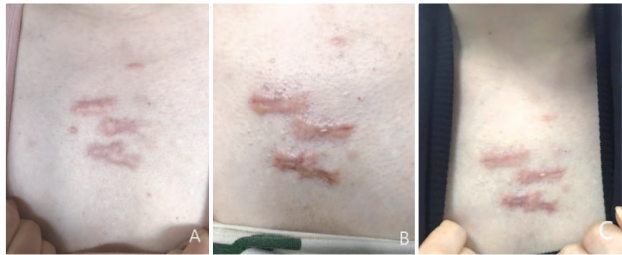
表2 两组患者VAS及NRS评分比较 (x̄±s, 分)					
组别	例数	VAS		NRS	
		治疗前	治疗后6个月	治疗前	治疗后6个月
对照组	25	5.36±1.35	2.68±0.32*	5.82±1.61	2.33±0.57*
观察组	25	5.29±1.46	1.29±0.17*	5.75±1.68	1.43±0.36*
t值		0.176	19.180	0.150	6.675
P值		0.861	<0.001	0.881	<0.001

注: *表示与本组治疗前相比, $P < 0.05$ 。

2.3 两组患者治疗前后瘢痕面积和瘢痕厚度比较: 治疗前, 两组患者瘢痕面积、瘢痕厚度无明显差异 ($P > 0.05$); 治疗后6个月, 两组患者瘢痕面积、瘢痕厚度显著减小 ($P < 0.05$), 且观察组显著小于对照组 ($P < 0.05$)。见表3。观察组典型病例见图1。

表3 两组患者瘢痕面积及瘢痕厚度比较 (例, x̄±s)					
组别	例数	瘢痕面积/cm ²		瘢痕厚度/mm	
		治疗前	治疗后6个月	治疗前	治疗后6个月
对照组	25	5.32±1.13	3.15±0.68*	13.72±2.68	8.04±1.65*
观察组	25	5.27±1.22	2.46±0.52*	13.64±2.37	6.32±1.14*
t值		0.150	4.030	0.112	4.288
P值		0.881	<0.001	0.911	<0.001

注: *表示与本组治疗前相比, $P < 0.05$ 。



注: A. 治疗前; B. 治疗中; C. 治疗后6个月

图1 观察组典型病例治疗前后

表4 两组患者TNF-α、TGF-β ₁ 及MMP-9水平比较 (例, x̄±s)							
组别	例数	TNF-α/(ng/ml)		TGF-β ₁ /(ng/L)		MMP-9/(ng/ml)	
		治疗前	治疗后1月	治疗前	治疗后1月	治疗前	治疗后1月
对照组	25	210.78±68.73	175.99±51.62*	458.32±35.86	398.77±30.19*	70.95±8.56	46.51±5.83*
观察组	25	209.85±66.31	138.75±28.79*	452.54±36.17	215.26±21.33*	69.56±8.91	31.37±4.58*
t值		0.049	3.150	0.567	24.822	0.562	10.211
P值		0.961	0.003	0.573	<0.001	0.576	<0.001

注: *表示与本组治疗前相比, $P < 0.05$ 。

2.4 两组患者血清指标比较: 治疗前, 两组患者TNF-α、TGF-β₁及MMP-9水平无明显差异 ($P > 0.05$); 治疗后, 两组患者的TNF-α、TGF-β₁及MMP-9水平显著降低 ($P < 0.05$), 且观察组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。见表4。

2.5 两组患者不良反应比较: 治疗后6个月内, 两组患者不良反应总发生率无明显差异 ($P > 0.05$)。见表5。

表5 两组患者不良反应比较 [例(%)]					
组别	例数	色素沉着	持续性红斑	表皮萎缩	总不良反应
对照组	25	2(8.00)	1(4.00)	2(8.00)	5(20.00)
观察组	25	1(4.00)	1(4.00)	1(4.00)	3(12.00)
连续性 χ^2 值					0.149
P值					0.700

3 讨论

HS是烧伤、创伤和外科手术后创面愈合的常见并发症, 是一种由于过度愈合导致成纤维细胞异常增殖和细胞外基质, 尤其是胶原过度沉积的皮肤纤维增生性疾病^[9]。其特点是红肿、坚硬、隆起、瘙痒和疼痛, 不仅影响裸露部位的外观, 而且还会导致跨越关节的功能障碍。目前HS的治疗措施主要包括硅胶、加压、手术和激光。

近年来, 一些研究发现BTXA能抑制平滑肌和外分泌腺胆碱能或非胆碱能神经递质的释放, 使成纤维细胞的增殖活性降低^[10-11], 从而将BTXA的应用扩展到更多的领域, 如预防瘢痕和治疗抑郁症。许多研究表明, BTXA不仅可以降低创面张力, 减少瘢痕形成, 而且还可以防止胶原的过度沉积^[12-13], 这一点在本研究中得到了证实。这些先前的研究表明, BTXA参与了瘢痕纤维化的过程。一项双盲、随机临床试验显示BTXA注射可改善VSS评分, 其中, 瘢痕厚度和柔软度方面的改善尤为明显, 并且可以预防上眼睑成形术后HS的形成^[14]。本研究中, 两组患者VSS评分显著降低, 与上述实验结果一致。此外, 笔者发现相较于单纯采用点阵CO₂激光治疗而言, 采用点阵CO₂激光联合BTXA治疗的患者, 其VSS评分方面体现出显著的优势, 这得益于BTXA可抑制成纤维细胞增殖、分化, 防止细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积。更加值得注意的是, 采用点阵CO₂激光联合BTXA治疗的患者, VAS评分、NRS评分方面均展现出了明显优势, 这表明其疼痛程度、瘙痒程度均较对照组更低。BTXA的效果最多可达6个月, 同时, 少量肉毒素便能

降低皮肤的张力,因此能减少瘢痕组织周围皮肤张力,改善瘢痕厚度以及柔韧性。在本研究中,采用点阵CO₂激光联合BTXA治疗的患者瘢痕面积及瘢痕厚度均得到一定程度的改善,也验证了这一点。

HS的形成涉及到许多细胞因子、细胞外基质的交互作用。在皮肤受到外来刺激时,TNF- α 大量合成、分泌,其可以通过增加MMP活性,加强成纤维细胞的侵袭性,从而促进HS的形成^[15]。另一方面,其能够和血管内皮生长因子相互作用,加速血管的新生,将血管的通透性提高,进而使炎症增生增加,从而促进HS的形成。作为TGF家族中不可忽视的促瘢痕纤维化细胞因子,TGF- β_1 能够刺激间质细胞的增殖,形成细胞外基质,参与多种组织的纤维化反应。据刘霞等^[16]研究结果显示,血清TGF- β_1 高表达的烧伤患者,其烧伤创面的愈合时间较低表达患者短,14 d内创面愈合率较低表达患者更高,这提示烧伤患者血清TGF- β_1 高表达则可促进其烧伤创面的愈合。MMP是一类参与调节细胞基质平衡的蛋白酶超家族,其中MMP-9是明胶酶类,主要作用于IV型胶原蛋白^[17]。在皮肤受到创伤后,炎症因子、组织修复因子通过TGF- β_1 向创伤面聚集,同时,TGF- β_1 诱导金属蛋白酶组织抑制因子-1的合成,下调MMP-9表达,促使ECM过度沉积,从而形成HS。在本研究中,笔者观察到两组患者的血清TNF- α 、TGF- β_1 、MMP-9水平均较治疗前显著下降,这与Tawfic^[18]等报道一致,分析原因在于激光诱导的深层组织加热促进了基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)的产生,同时伴随着异常胶原的降解,并启动了生理性伤口愈合过程,形成了新的胶原,这些都有效地重塑瘢痕。

本研究对所有患者进行了6个月的随访,安全性分析显示,两组患者发生的不良反应情况均为轻度,予以对症治疗后好转,两组患者不良反应总发生率差异并无统计学意义,提示点阵CO₂激光联合BTXA治疗HS安全性高。但是本研究纳入病例均为病程6个月以内,体现的是对新鲜瘢痕的疗效,对于陈旧性瘢痕的疗效暂时未能探讨,有待后续做进一步研究与探讨。

综上所述,点阵CO₂激光联合BTXA治疗HS具有显著疗效,能够明显降低VSS评分,减轻患者的痛苦及瘙痒程度,降低患者血清TNF- α 、TGF- β_1 、MMP-9水平,安全性高。

[参考文献]

- [1]孙燕,黄咏梅,王萍.长脉宽激光联合得宝松注射液治疗小面积瘢痕疙瘩[J].中国美容医学,2020,29(12):27-30.
- [2]庞轲,刘一君,张凯,等.增生性瘢痕治疗研究进展[J].中国烧伤创疡杂志,2019,31(1):58-62.
- [3]黄振,陈烨,王朋,等.二氧化碳点阵激光联合自体脂肪注射治疗烧伤后增生性瘢痕效果的前瞻性随机对照临床研究[J].中华烧伤杂志,2021,37(1):49-56.
- [4]Ghazawi F M,Zargham R,Gilaedino M S,et al.Insights into the pathophysiology of hypertrophic scars and keloids:how do they

differ[J].Adv Skin Wound Care,2018,31(1):582-595.

- [5]Kauvar A N B,Kubicki S L,Suggs A K,et al.Laser therapy of traumatic and surgical scars and an algorithm for their treatment[J].Lasers Surg Med,2020,52(2):125-136.
- [6]Seago M,Shumaker P R,Spring L K,et al.Laser treatment of traumatic scars and contractures:2020 international consensus recommendations[J].Lasers Surg Med,2020,52(2):96-116.
- [7]武凤莲,朱东来,王连英,等.A型肉毒毒素对增生性瘢痕组织中bFGF、caspase-3和Bcl-2表达的影响[J].河北医药,2020,42(4):499-502,507.
- [8]蔡景龙,张宗学.现代瘢痕治疗学[M].北京:人民卫生出版社,1998:98.
- [9]Li Y H,Yang J M,Zheng Z,et al.Botulinum toxin type A attenuates hypertrophic scar formation via the inhibition of TGF- β_1 /Smad and ERK pathways[J].J Cosmet Dermatol,2020,13:13842.
- [10]Hu C H,Tseng Y W,Lee C W,et al.Combination of mesenchymal stem cell-conditioned medium and botulinum toxin type A for treating human hypertrophic scars[J].J Plast Reconstr Aesthet Surg,2020,73(3):516-527.
- [11]Costo T,Campine E.A new hypothesis in botulin therapy for depression:Insula cortex modification[J].Dermatol Ther,2019,32(5):e13008.
- [12]Moon J,Yoon J Y,Yang J H,et al.Atrophic acne scar:a process from altered metabolism of elastic fibres and collagen fibres based on transforming growth factor-beta1 signalling[J].Br J Dermatol,2019,181(6):1226-1237.
- [13]Zhang X,Lan D,Ning S,et al.Botulinum toxin type A prevents the phenotypic transformation of fibroblasts induced by TGFbeta1 via the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J].Int J Mol Med,2019,44(2):661-671.
- [14]Huang R L,Ho C K,Tremp M,et al.Early postoperative application of botulinum toxin type a prevents hypertrophic scarring after epicanthoplasty:a split-face,double-blind,randomized trial[J].Plast Reconstr Surg,2019,144(4):835-844.
- [15]Ogawa R.Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis[J].Int J Mol Sci,2017,18(3):606.
- [16]刘霞,李凯琳,张梦莲.血清EPO、TGF- β_1 、细胞间黏附分子-1与II度烧伤患者创面愈合及瘢痕程度的关系分析[J].中国美容医学,2020,29(6):101-105.
- [17]谢志敏,潘乔林,张怡,等.寻常型天疱疮患者血清对HaCaT细胞Dsg、MMP-9表达的影响[J].皮肤性病诊疗学杂志,2020,27(5):295-300,306.
- [18]Tawfic S O,El-Tawdy A,Shalaby S,et al.Evaluation of fractional CO₂ versus long pulsed Nd:YAG lasers in treatment of hypertrophic scars and keloids:a randomized clinical trial[J].Lasers Surg Med,2020,52(10):959-965.

[收稿日期]2021-04-02

本文引用格式:张雪,兰东,宁淑华,等.点阵CO₂激光联合A型肉毒毒素治疗HS的临床疗效及对患者血清TNF- α 、TGF- β_1 和MMP-9水平的影响[J].中国美容医学,2023,32(2):15-18.