

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.006

5-氟尿嘧啶对增生性瘢痕的作用研究*

孔德平, 陈 凯[△]

(重庆医科大学附属永川医院药剂科 402160)

[摘要] **目的** 探讨 5-氟尿嘧啶(5-FU)对兔耳增生性瘢痕组织的影响。**方法** 建立兔耳外伤性皮肤早期瘢痕增生模型。将 12 只兔随机平均分为 3 组,设立生理盐水注射对照组(A 组)、局部注射 5-FU 组(B 组)和局部涂抹 5-FU 软膏组(C 组),观察各组瘢痕改变情况。60 d 后空气栓塞法随机处死兔子,切取含创面的兔耳组织,分别进行苏木精-伊红(HE)染色及 Masson 染色观察组织形态学变化及组织中细胞及胶原等的改变。Real-time PCR 及 ELISA 法检测 TGF- β 、PDGF、bFGF 和 INF- γ 的表达水平。**结果** HE 和 Masson 染色显示,与 A 组和 C 组比较,B 组真皮层变薄,成纤维细胞和胶原纤维数量较少,胶原纤维排列规则,无胶原结节或者胶原结节不明显。B 组和 C 组 TGF- β 、PDGF、bFGF、INF- γ mRNA 表达水平和蛋白水平均显著低于 A 组,且 B 组效果好于 C 组。**结论** 5-FU 对增生性瘢痕有治疗作用,瘢痕组织局部注射 5-FU 比局部涂抹 5-氟尿嘧啶软膏更为有效。

[关键词] 5-氟尿嘧啶;增生性瘢痕;兔耳模型;血管化**[中图分类号]** R62**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)08-1029-03

The effects of 5-fluorouracil on hypertrophic scar of rabbit ears*

Kong Deping, Chen Kai[△]

(Chongqing Medical University Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing 402160, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of 5-fluorouracil on hypertrophic scar in rabbit ears. **Methods** The hypertrophic scar models in rabbit ears were reproduced and randomly divided into 3 groups (group A, group B and group C). On postoperative 60th days, Hematoxylin-eosin and Masson staining staining was applied to observe themorphological and collagen change of scars under light microscope. Real-time PCR and ELISA were conducted to detect the expression of TGF- β , PDGF, bFGF and INF- γ . **Results** HE and Masson staining showed that thinner dermis, fewer fibroblasts and collagen fibers, collagen fibers arranged regularly and less collagen nodule was observed group B compared with the group A and group C. Furthermore, we found that TGF- β , PDGF, bFGF, INF- γ mRNA and protein expression levels were significantly lower in group B and group C than the group A, and group B was more effective than group C. **Conclusion** 5-fluorouracil is effective for the treatment of hypertrophic scars, and the localized injection of 5-fluorouracil is more effective than the ointment group.

[Key words] 5-fluorouracil; hypertrophic scar; model in rabbit ears; vasc

增生性瘢痕是各种烧、创伤后最常见的并发症,易导致患者伤处外观畸形及功能障碍。其形成是由于皮肤创伤后的愈合过程中,成纤维细胞过量增殖和胶原纤维过度增生的结果。通过传统压力治疗、硅酮凝胶外用、曲安奈德局部注射治疗均疗效不确切,并可能因治疗导致一系列并发症^[1]。5-氟尿嘧啶(5-FU)是一类广谱的氟化嘧啶类抗肿瘤药物,可以通过细胞内抑制 DNA 的合成,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。近年来发现该药在瘢痕治疗方面具有一定作用^[2-3],但具体机制尚不清楚。本实验旨在通过建立兔耳增生性瘢痕模型,探讨 5-FU 对兔耳创面瘢痕形成的影响及其作用机制,为瘢痕防治及药物临床应用提供实验和理论依据。

1 材料与方**1.1 兔耳增生性瘢痕模型的建立**

1.1.1 实验动物及分组 选择 12 只健康新西兰大耳白兔,雌雄不限,体质量 1.5~2.5 kg,月龄 8~10 个月。随机分为 3 组,生理盐水注射对照组(A 组),5-FU 1.0 mL+生理盐水 4.0

mL,5-FU 浓度 5.0 mg/mL 局部注射组(B 组),5-FU 软膏局部外用组(C 组),使用 2.5% 5-FU 软膏,广州白云山何济公制药有限公司生产,批准文号:国药准字 H44023085。

1.1.2 兔耳增生性瘢痕模型的制作 瘢痕模型的制作参照冯登超^[4]方法建立兔耳增生性瘢痕模型。于术后 60 d 空气栓塞法随机处死兔子,分别沿创面边缘 0.5 cm 处环形切开,切取含创面的兔耳组织,取材后的兔子即退出实验。所取组织均匀 4 等分。

1.2 苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 三色染色 10% 的中性甲醛固定、脱水、包埋、切片、HE 染色后进行组织学观察,检测组织中细胞及胶原等的改变。Masson 三色染色法参照参考文献^[5]。

1.3 ELISA 定量检测 术后 60 d 抽取静脉血,按转化生长因子 β (TGF- β)、血小板源生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞因子(bFGF)、INF- γ 和的 ELISA 试剂盒说明书分别操作,每例样本组设 3 个平行复孔。根据检测吸光度值用 Curve Expert

* 基金项目:重庆市永川区自然科学基金资助项目(Ycstc,2013nc8019)。 作者简介:孔德平(1977-),主管药师,主要从事临床药学研究。

[△] 通讯作者, Tel:13272740008; E-mail:cjhh168@sina.com。

软件分析并制定标准曲线,从而计算出不同条件培养基中各因子的浓度。

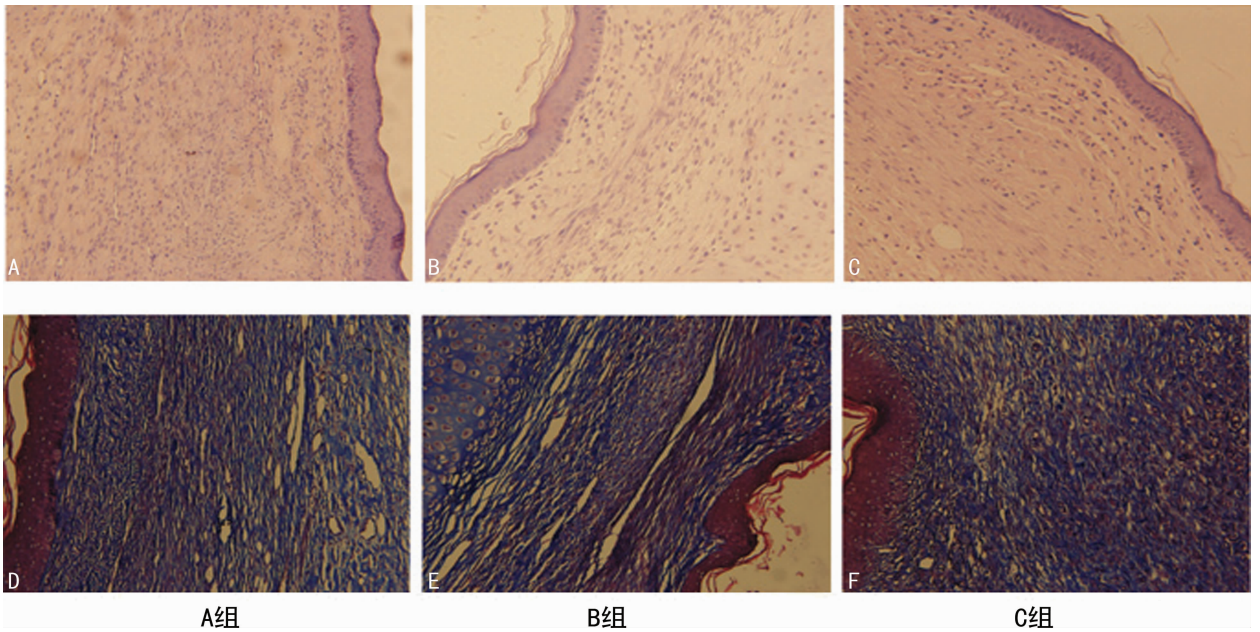
1.4 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 按 Trizol 操作说明书提取细胞总 RNA 并逆转录扩增 cDNA,使用反应 Real time PCR 仪检测 TGF-β、PDGF、bFGF 和 INF-γ。检测条件:预变性 95 ℃,15 min;变性 95 ℃,10 s,退火/延伸 60 ℃,30 s,40 个循环。采用 Real-time PCR 仪自带分析软件分析各样品各基因表达情况。相对定量采用 2^{-ΔΔCT} 法计算。引物序列见表 1。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计数资料组间比较采用 χ² 检验,计量资料组间比较行 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 瘢痕形成情况 通过肉眼观察,A 组表现为斑块质硬,色红。B、C 组瘢痕质地柔软平整;且 B 组比 C 组瘢痕明显软化、变平。

2.2 组织切片观察 HE 染色切片结果表明,A 组(图 1A)其瘢痕厚,胶原纤维多而致密粗大,排列紊乱,可见漩涡状结构和胶原结节,其间有少量炎性细胞,结构近似人的增生性瘢痕组织。B 组(图 1B)瘢痕厚度显著降低,核较小,胶原纤维束间有较大的空隙,排列比较规则,呈水平方向。C 组(图 1C)瘢痕厚度较薄,成纤维细胞数量较少,胶原纤维致密下降,表层排列规则,内层排列方向似漩涡状。Masson 染色切片结果表明:胶原纤维呈蓝色,于细胞间散在分布。与 A 组(图 1D)相比,B 组(图 1E)及 C 组(图 1F)胶原纤维染色较淡,较为疏松,且二者间有明显区别。



A、B、C; HE 染色;D、E、F; Masson 染色。

图 1 3 组染色组织切片影像学表现

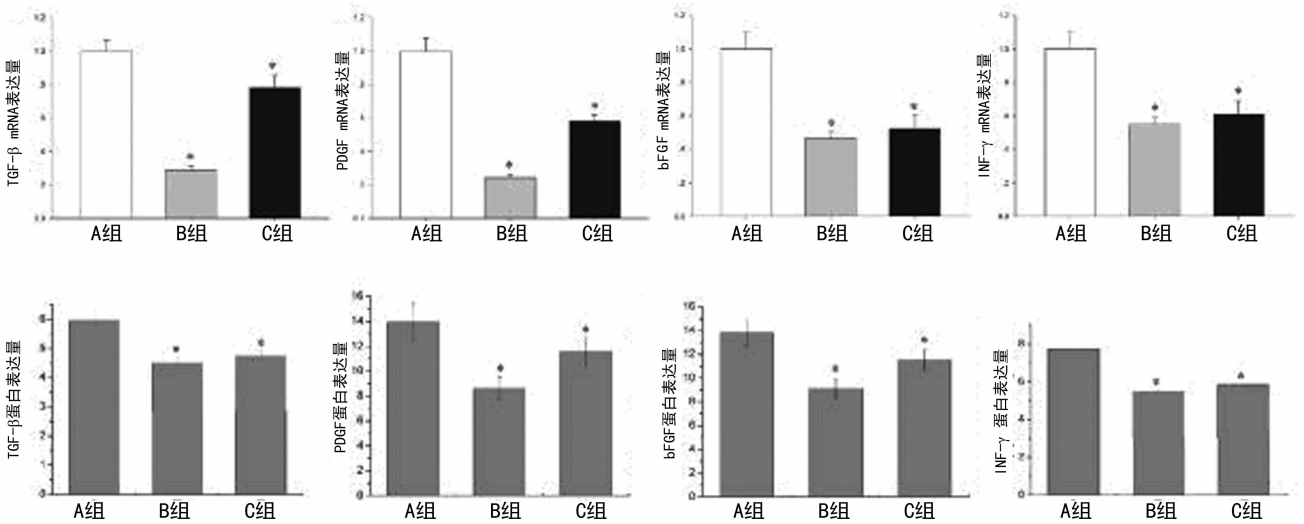


图 2 Real-time PCR 和 ELISA 检测 TGF-β、PDGF、INF-γ、bFGF 的表达水平

2.3 INF-γ、PDGF、bFGF 和 TGF-β 的表达水平 通过 Real-time PCR 检测,A 组、B 组与 C 组中,TGF-β、PDGF、bFGF、

INF- γ 的 mRNA 表达均有明显下降;且 B 组 mRNA 下降幅度更大。接着采用 ELISA 方法对 4 种细胞因子的蛋白做了进一步检测,结果与 Real-time PCR 检测一致(图 2)。

表 1 Real-time PCR 引物序列

名称	引物序列
INF- γ	sense 5'-AAT GCA AGT AGC CCA GAT G-3'
	antisense 5'-GAT CTG CAG ATC ATC CAC CGG-3'
PDGF	sense 5'-AGC ACC TTC GTT CTG ACC TG-3'
	antisense 5'-TAT TCT CCC GTG TCT AGC CCA-3'
bFGF	sense 5'-GAG AAG AGC GAC CCT CAC A-3'
	antisense 5'-TAG CTT TCT GCC CAG GTC C-3'
TGF- β	sense 5'-GGT ACC TGA ACC CGT GTT GCT-3'
	antisense 5'-TGT TGC TGT ATT TCT GGT ACA GCT C-3'
β -actin	sense 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3'
	antisense 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'

3 讨 论

增生性瘢痕是皮肤创面愈合后瘢痕持续增生的一种病理现象,其本质是以成纤维细胞为主的细胞成分过度增殖,合成并分泌胶原为主的细胞外基质。瘢痕组织中胶原纤维大量沉积,排列紊乱,主要以 I、III 型胶原为主。胶原的过度分泌和降解减少是胶原沉积的主要原因^[6]。由于增生性瘢痕的发生机制目前仍未阐明,至今还缺乏具有临床指导意义的防治方法。

近年来的研究发现 5-FU 除了具有抗肿瘤作用,国内外均有 5-FU 应用于抗瘢痕的报道。瘢痕疙瘩切除后局部单纯应用 5-FU 能够改变瘢痕疙瘩创面的愈合特征,合理的用药剂量及时间尚需进一步研究^[7]。国内研究发现 5-FU 在体外能明显抑制人增生性瘢痕组织中成纤维细胞的增殖及 cyclinD1、cdk4 的 mRNA 表达^[8]。研究者采用低浓度去炎松-A(5~10 mg/mL)和 5-FU(6.25 mg/mL)混合液治疗病理性瘢痕,也获得了满意的疗效^[9]。本研究中,通过 HE 及 Masson 实验发现,与 A 组和 C 组比较,B 组显著改善了瘢痕组织的病理状况。

TGF- β 是促进瘢痕增生的主要刺激因子^[10]。研究发现 TGF- β 可刺激成纤维细胞分泌纤维连接蛋白, I、III 型胶原和前胶原。还可减少胶原酶降解细胞外基质的作用,并间接地通过 PDGF 刺激细胞外基质的产生,促进瘢痕增生。其他如 PDGF、bFGF 等均在增生性瘢痕组织中表达增高^[11-13]。他们可通过各种途径促进成纤维细胞增殖和胶原纤维分泌^[14]。基于以上机理,为了研究 5-FU 抑制增生性瘢痕作用机制,作者通过 Real-time PCR 及 ELISA 实验发现 B、C 组明显的抑制 INF- γ 、PDGF、bFGF、TGF- β 的 mRNA 及蛋白的表达,且 B 组效果优于 C 组。

本研究利用外伤性兔耳早期瘢痕增生模型,证实了 5-FU 通过抑制 INF- γ 、PDGF、bFGF、TGF- β 的表达抑制兔皮肤增殖性瘢痕,且局部注射比软膏外用抑制瘢痕增生效果更显著。进一步研究其作用机制、给药方式,以及对 5-FU 进行化学修饰

合成,降低其不良反应,有望开发出预防和治疗人皮肤增生性瘢痕的有效药物。

参考文献

- [1] Zeng G, Zhong F, Li J, et al. Resveratrol-mediated reduction of collagen by inhibiting proliferation and producing apoptosis in human hypertrophic scar fibroblasts[J]. *BioSci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(12): 2389-2396.
- [2] Ogawa R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids[J]. *Plastic Reconstruct Surg*, 2010, 125(2): 557-568.
- [3] 武晓莉. 手术联合低浓度 5-氟尿嘧啶和糖皮质激素局部注射治疗耳郭瘢痕疙瘩疗效观察[J]. *中华医学杂志*, 2009, 16(89): 1102-1105.
- [4] 冯登超. 青蒿素对兔耳创面瘢痕增生的抑制效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 24(12): 4601-4605.
- [5] 林云恩, 龙惠东, 许惠娟, 等. 微波改良 Masson 三色法在观察博来霉素诱导的大鼠肺纤维化中应用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 26(9): 1014-1016.
- [6] 汤苏成. 喉、气管狭窄瘢痕的基础研究现状[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2008, 6(22): 568-571.
- [7] 姜疆, 刘毅. 瘢痕的药物治理现状[J]. *临床军医杂志*, 2008, 36(1): 121-125.
- [8] 陈天新. 5-FU 对增生性瘢痕中 cyclinD1、cdk4 及 p53 基因表达的影响[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2006, 5(17): 343-346.
- [9] 崔子伟. 低浓度去炎松-A 和 5-氟尿嘧啶混合液治疗增生性瘢痕[J]. *中华医学美容美容杂志*, 2008, 6(14): 1532-1533.
- [10] Penn JW, Grobelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review [J]. *Int J Burns Trauma*, 2012, 2(1): 18-28.
- [11] Zhang XF, Guo SZ, Lu KH, et al. Different roles of PKC and PKA in effect of interferon-gamma on proliferation and collagen synthesis of fibroblasts[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2004, 25(10): 1320-1326.
- [12] Akimoto S, Ishikawa O, Iijima C, et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by fibroblast, macrophages and mast cells in hypertrophic scar[J]. *Eur J Dermatol*, 1999, 9(5): 357-362.
- [13] Ren HT, Hu H, Li Y, et al. Endostatin inhibits hypertrophic scarring in a rabbit ear model[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2013, 14(3): 224-230.
- [14] 张玲, 武继祥, 李世荣. 肥厚性瘢痕和瘢痕瘤的病因病理学研究进展[J]. *局解手术学杂志*, 2005, 14(2): 127-128.