

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.011

咪喹莫特调节 Th1、Th2 细胞相关趋化因子表达抑制兔耳瘢痕增生*

李辉超¹ 闫 伦² 王大雷¹ 楚菲菲¹ 彭 湃¹ 夏 炜^{1△}

(1 第四军医大学西京医院全军整形外科研究所 陕西 西安 710032; 2 康华医院烧伤整形外科 广东 东莞 523000)

摘要 目的:免疫因素在增生性瘢痕的发生中起重要作用,本实验研究免疫抑制剂咪喹莫特对兔耳增生性瘢痕组织中辅助性 T 淋巴(Th)细胞亚群 Th1、Th2 细胞相关趋化因子 CXCL10、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL13 表达的影响,探讨咪喹莫特抑制兔耳瘢痕增生的作用机制。**方法:**选取 16 只新西兰大白兔,雌雄不限。建立兔耳增生性瘢痕模型,每只兔耳腹侧做四个直径为 1 cm 的圆形创面,每个相距 1.5 cm,双侧对称,右耳为咪喹莫特组涂抹 5%咪喹莫特软膏,左耳为空白对照组涂抹等量凡士林软膏,待术后 14 天上皮化均完全后开始涂抹,一日一次,持续一个月。分别于术后第 21、28、35、42、49、56、63 天同一时间空气栓塞法随机处死 2 只兔子,收集所有瘢痕标本。另外处死 2 只健康兔并采集兔耳正常皮肤组织。所有标本行 HE 染色及 Masson 三色法染色,观察形态学差异;测量并计算瘢痕增生指数(Scar elevation index, SEI);行 Real-time PCR 检测 CXCL10、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL13 的表达。**结果:**HE 及 Masson 染色可见咪喹莫特组胶原沉积较空白对照组明显减少,SEI 显示空白对照组于术后第 28 天增生程度达到高峰,其增生程度明显高于咪喹莫特组($P<0.05$);Real-time PCR 结果可见咪喹莫特组 Th2 细胞相关趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7 及 CCL13 表达在各时间点较空白对照组明显降低,Th1 细胞相关趋化因子 CXCL10、CXCL12 的表达在各时间点较空白对照组明显增高($P<0.05$)。**结论:**咪喹莫特可通过调节 Th1、Th2 细胞相关趋化因子的表达来发挥抑制兔耳瘢痕增生的作用。

关键词:兔耳增生性瘢痕模型;咪喹莫特;趋化因子;Th1 细胞;Th2 细胞

中图分类号:Q95-3, R62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)14-2650-07

Imiquimod Inhibit Scar Formation by Regulating the Expression of Th1/Th2 Cell Related Chemokines in Rabbit Ear Hypertrophic Scar Model*

LI Hui-chao¹, YAN Lun², WANG Da-lei¹, CHU Fei-fei¹, PENG Pai¹, XIA Wei^{1△}

(1 Institute of Plastic Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Plastic and Aesthetic Surgery, KangHua Hospital, Dongguan, Guangdong, 523000, China)

ABSTRACT Objective: Immunological factors play an important role in the formation of hypertrophic scars. Our research is aimed to investigate the influence on the expression of Th1/Th2 cell related chemokines CXCL10, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 and CCL13 in rabbit ear hypertrophic scar by imiquimod which is a kind of immunosuppressors and to discuss the inhibitory effect and mechanism of imiquimod on rabbit ear hypertrophic scar formation. **Methods:** Sixteen New Zealand White rabbits were employed in this study. Rabbit ear hypertrophic scar model was built on the basis of the previous literature of our laboratory. Four round wounds were cut in each rabbit ears ventral that diameter of 1cm, bilateral symmetry. All the right ear wounds were treated with 5% imiquimod cream. The blank control group contains all the left ear wounds and were treated with vaseline ointment at the same time. Every wounds were applied cream after healing, once a day, for a month. Normal rabbit ear skins were harvested on 0 day and both of the groups were harvested at the same time on the 21st, 28th, 35th, 42nd, 49th, 56th, 63rd day after operation. Two rabbits were killed by air embolism every time. Hematoxylin-eosin staining and Masson trichrome staining were performed after fixing to observe morphological differences. The expression of CXCL10, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 and CCL13 was detected by Real-time PCR. **Results:** The sections of HE and Masson show that compared with that in the blank control group, the level of the collagen deposition reduced significantly in the imiquimod group. The SEI of the blank control group shows the degree of proliferation peaked at 28 days and it was significantly higher than the imiquimod group($P<0.05$). The mRNA level of Th2 cell related chemokines CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL13 were significantly lower in imiquimod group than blank control group and the mRNA level of Th1 cell related chemokines CXCL10, CXCL12 were significantly higher in imiquimod group than blank control group at every time point($P<0.05$). **Conclusion:** Imiquimod probably inhibits scar formation by regulating the expression of Th1/Th2 cell related chemokines in rabbit ear hypertrophic scar model.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272118)

作者简介:李辉超(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:瘢痕机制研究,

电话:029-84775306,手机:18392181959; E-mail:lihuichaozi@163.com

△ 通讯作者:夏炜,女,副教授,主要研究方向:瘢痕机制的研究, E-mail:weixia@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-01-09 接受日期:2014-01-30)

Key words: Rabbit ear hypertrophic scar model; Imiquimod; Chemokine; Th1 cell; Th2 cell

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2650-07

前言

增生性瘢痕是外科领域中常见病、多发病,是皮肤创伤愈合过程中在上皮化后局部组织仍继续增生,引起皮肤纤维化,以胶原大量沉积为其病理特点,其发病机制尚不清楚。已有研究证实免疫因素在瘢痕的形成与发展过程中占有不可忽视的地位^[1]。其中辅助性T淋巴(Th)细胞群是机体免疫系统中的重要群体,是瘢痕增生过程中的主要免疫细胞^[2]。其主要亚群Th1、Th2细胞受到相应的趋化因子的趋化作用,从外周血被募集到瘢痕局部组织,进而产生多种细胞因子,参与瘢痕的形成^[3-6]。咪喹莫特(Imiquimod)是一种新型人工合成的免疫调节剂,有研究提示^[7]咪喹莫特可以抑制兔耳瘢痕的增生程度,调节Th1、Th2细胞因子的表达。但亦有研究证实^[4-6]单独改变细胞因子的水平不能达到治疗瘢痕的作用。因此,本实验从趋化因子的角度着手,研究兔耳瘢痕在其增生过程中,咪喹莫特对瘢痕局部组织Th1、Th2细胞相关趋化因子CXCL10、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL13表达的影响,为咪喹莫特抑制增生性瘢痕提供更进一步的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康成年无外伤新西兰大耳白兔16只,体重2.3~3.0 kg,雌雄不限,由第四军医大学的实验动物中心提供及饲养,单只单笼规格。

1.2 实验材料

5%咪喹莫特软膏购自四川省明欣药业有限公司;Masson三色染色试剂购自南京森贝伽生物科技有限公司;Trizol Reagent由上海生工提供;引物为奥科生物(北京)合成,实时荧光定量PCR所需试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司(试剂代码:RR047A,RR025A,RR082A)。

1.3 实验方法

1.3.1 兔耳增生性瘢痕模型建立 根据国内外文献报道^[7,8]的方法并加以改进,制作兔耳增生性瘢痕模型。首先沿兔耳缘静脉以3%戊巴比妥钠缓慢推进注射,全身麻醉(3.0 mL/kg);在无菌条件下,避开明显小静脉,于每只兔耳腹侧制作4个直径为1 cm的圆形缺损创面,去除全层皮肤组织及软骨膜,彼此间距约1.5 cm,两侧对称。最后电凝止血,创面暴露,术后前3天每日碘伏消毒创面1~2次,待其自行愈合。共建模14只兔,左、右耳各为一组,每组创面各为56个。每只白兔右耳设为咪喹莫特用药组,于术后14天创面上皮化后局部外用,涂抹给药,每个创面给予5%咪喹莫特软膏量约0.1 g。左耳为空白对照组,与咪喹莫特组给药时间相同,每创面给予凡士林软膏0.1 g,以排除考虑软膏基质本身作为水化膜对瘢痕的作用。每日给药1次,持续1个月。

1.3.2 采集标本 以空气栓塞法处死2只健康无外伤成年兔,收集兔耳皮肤组织为实验正常组织对照。14只建模兔子于术

后第21天、28天、35天、42天、49天、56天、63天各随机处死2只,沿每个瘢痕外围扩展0.5 cm,然后环形切下,每个标本以通过瘢痕最凸点为直径,一分为二。正常兔耳皮肤组织及所有瘢痕标本的一半立即放入4%多聚甲醛溶液中进行固定,然后常规石蜡法包埋,蜡块切片;另一半立即存入-80℃冰箱中保存以用来提取RNA行实时荧光定量PCR检测。

1.3.3 HE染色及Masson三色染色 由第四军医大学基础部病理科完成,用光学显微镜观察所染切片。

1.3.4 计算瘢痕增生指数(Scar elevation index, SEI) 根据HE染色切片显微镜下所见,瘢痕最凸点到耳软骨表面的垂直距离与瘢痕外围正常皮肤至耳软骨表面的垂直距离的比值即为SEI(如图1),瘢痕增生程度越高,瘢痕指数值越大,一般情况下当SEI值>1.6即可认为是增生性瘢痕。用IPP软件测量并计算SEI。

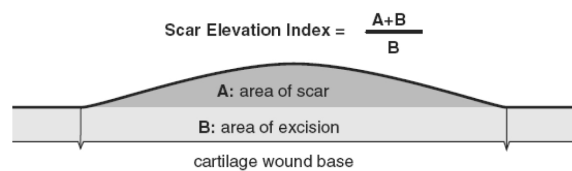


图1 瘢痕增生指数的测量方法

Fig.1 The way to measure Scar Elevation Index(SEI)

1.3.5 Real-time PCR检测 引物设计及Tm值见表1。将不同时间点的标本按顺序分别切取约150 mg组织,用液氮冷冻并用研钵磨成粉状后加入1 mL Trizol提取总RNA,使用紫外分光光度计进行检测标本纯度及浓度,纯化并去除gDNA后逆转录为cDNA。使用试剂SYBR Premix Ex Taq II,通过MJ Research Option 2荧光定量PCR仪对Th1、Th2细胞相关趋化因子CXCL10、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL13的表达进行Real-time PCR检测。

1.4 统计学分析

所获得的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 16.0统计软件进行数据处理,比较采用t检验法,*P<0.05,**P<0.01,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瘢痕模型大体观察

创面上皮化时间约为13~15天,无明显分泌感染、穿孔等情况。术后第35天时(即用药3周时)可见空白对照组和咪喹莫特组瘢痕随时间改变而呈现不同程度的增生:空白对照组瘢痕增生明显,瘢痕颜色红,触之质较硬,创面中心部最厚;咪喹莫特组瘢痕颜色较淡,略高出周围正常皮肤表面,表面较平,瘢痕质软,创面中心增生程度明显减轻(如图2)。空白对照组在术后第28~35天时增生达峰值。

2.2 HE染色结果

镜下可见,术后第35天,空白对照组显示,胶原纤维较粗

表 1 PCR 引物的设计
Table 1 Design of PCR primers

Gene	Sequence	Optimal Annealing Temperature(℃)
GAPDH	Forward Primer:5'tgggatggaaactgtgaagag3'	55
(GeneID:100009074)	Reverse Primer:5'agagcaccagaggaggacg3'	
CCL2	Forward Primer:5'ctccagcatgaaggtctc3'	55
(GeneID:100009130)	Reverse Primer:5'gtcattagcctcttcactg3'	
CCL3	Forward Primer:5'gctctcagcaccaggtctt3'	57
(GeneID:100348776)	Reverse Primer:5'gagcactggctgctgtctc3'	
CCL5	Forward Primer:5'tatgcctcgacaccacg3'	57
(GeneID:100348266)	Reverse Primer:5'cacactggcgggtcttc3'	
CCL7	Forward Primer:5'tgctgtacagattccac3'	55
(GenBank:JX000252.1)	Reverse Primer:5'gtcagcacagacctctcg3'	
CCL13	Forward Primer:5'aggcagaagcatgggagcg3'	57
(GenBank: JX020977.1)	Reverse Primer:5'ggggcccttggcttagaaggcg3'	
CXCL10	Forward Primer:5'cctccagtctcagccatgaatc3'	57
(文献报道 ^[24])	Reverse Primer:5'gatgcaggtacagctacattcta3'	
CXCL12	Forward Primer:5'cccgtagcctgagttac3'	55
(GeneID:101532824)	Reverse Primer:5'ggttggtgctcttcagcc3'	

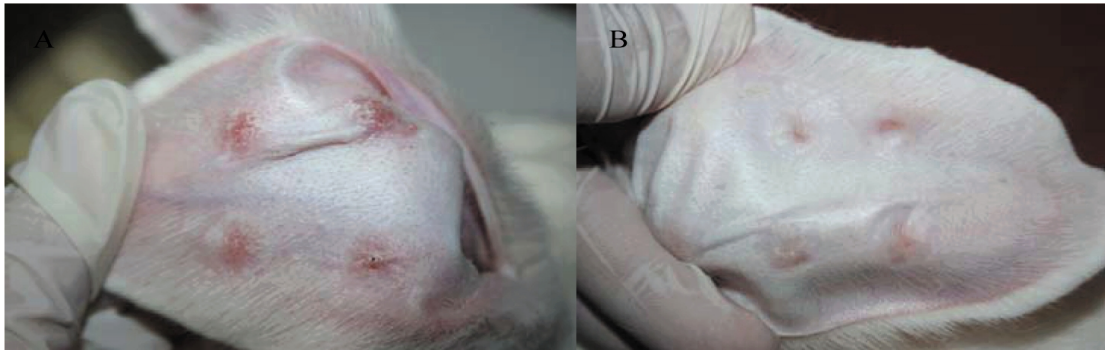


图 2 术后 35 天大体观察

Fig.2 Photos of the 35th day after surgery

注:术后第 35 天实验组较空白对照组增生程度明显减轻(A:空白对照组;B:咪喹莫特组)

Note:At the 35th day after the surgery, we can see the degree of proliferation in the imiquimod group was significantly reduced compared with the blank control group(A: blank control group; B: imiquimod group)

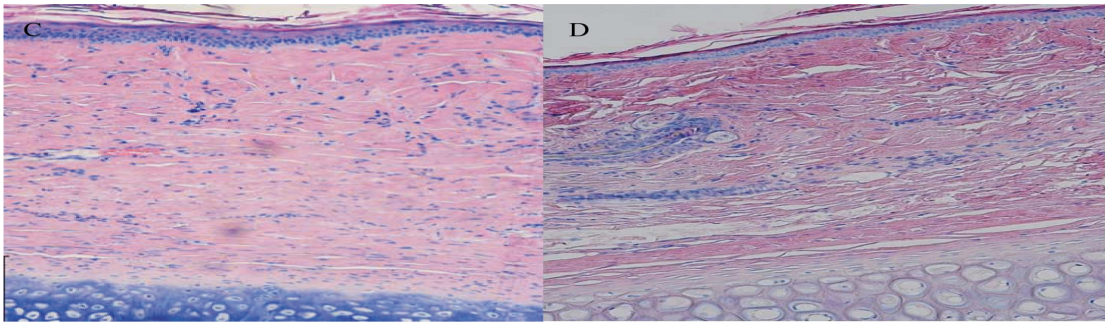


图 3 术后 35 天时 HE 染色(C 空白对照组,D 为咪喹莫特组)(× 100 倍)

Fig.3 HE Staining of the 35th day after surgery

注:术后第 35 天,可见空白对照组胶原纤维致密粗大,结构紊乱有异常沉积,细胞成分较多(C:空白对照组;D:咪喹莫特组(HE Staining 100))

Note:At the 35th day after surgery, we can see the collagen fibers of blank control group was dense and coarse, the structure of the specimen was disorder and many cellular components was abnormally deposited(C:blank control group; D: imiquimod group(HE Staining 100))

大致密,排列紊乱,细胞外基质有大量沉积;咪喹莫特组胶原纤维明显减少且多为平行排列,细胞外基质沉淀少(图3)。

2.3 Masson 染色结果

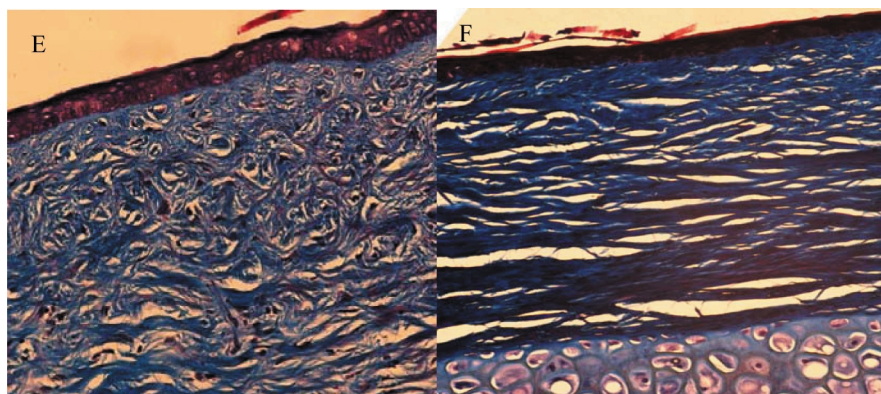


图4 术后第35天 Masson 染色

Fig.4 Masson Staining of the 35th day after surgery

注:术后第35天空白对照组胶原纤维致密粗大,结构紊乱有异常沉积(E:空白对照组;F:咪喹莫特组(Masson Staining 100))

Note: At the 35th day after surgery, the collagen fibers of blank control group was dense and coarse, the structure of the specimen was disorder. (E: blank control group; F: imiquimod group(Masson Staining 100))

2.4 瘢痕增生指数

咪喹莫特组在术后第21、28、35、42、49、56及63天瘢痕指数分别为 1.68 ± 0.32 、 1.81 ± 0.35 、 1.75 ± 0.27 、 1.46 ± 0.29 、

1.43 ± 0.28 、 1.37 ± 0.31 、 1.25 ± 0.21 , 而空白对照组分别为

1.86 ± 0.34 、 2.88 ± 0.32 、 2.49 ± 0.29 、 1.84 ± 0.28 、 1.67 ± 0.32 、 1.58 ± 0.21 、 1.49 ± 0.21 , 如表2所示。

表2 各时间点 SEI 统计表

Table 2 The SEI statistical table of every time point

Groups	21d	28d	35d	42d	49d	56d	63d
Imiquimod group	1.68 ± 0.32	1.81 ± 0.35	1.75 ± 0.27	1.46 ± 0.29	1.43 ± 0.28	1.37 ± 0.31	1.25 ± 0.21
Blank control group	1.86 ± 0.34	2.88 ± 0.32	2.49 ± 0.29	1.84 ± 0.28	1.67 ± 0.32	1.58 ± 0.21	1.49 ± 0.21

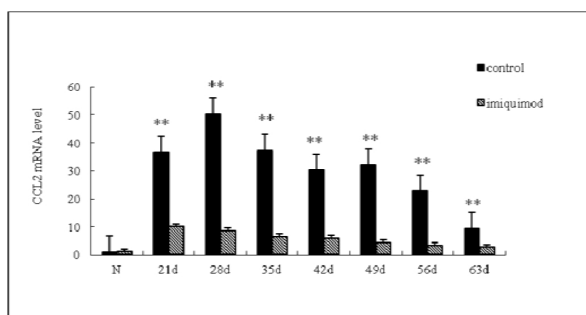


图5 咪喹莫特干预下 CCL2 的表达情况

Fig. 5 The expression of CCL2 by imiquimod treatment

注:Real-time PCR 检测结果,可见咪喹莫特组 CCL2 表达水平较空白对照组在各时间点明显下降,空白组的 CCL2 在术后第28天呈表达高峰, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 差异具统计学意义(N为正常兔耳皮肤组织)

Note: Compared with the blank control group, the expression index of CCL2 in the imiquimod group was significantly lower at every time point. The degree of proliferation in the blank control group was peaked at the 28th day after surgery.

(* $P < 0.05$, $**P < 0.01$, "N" stands for normal rabbit ear skin)

统计学分析后,咪喹莫特组与空白对照组比较 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。各时间点其 SEI 值进行比较后结果如表2所示,各时间点内空白对照组瘢痕增生指数始终高于咪喹莫特

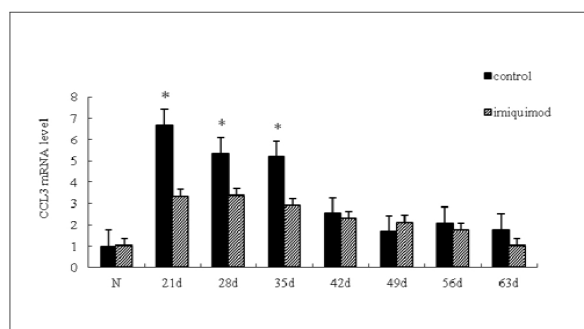


图6 咪喹莫特干预下 CCL3 的表达情况

Fig.6 The expression of CCL3 by imiquimod treatment

Real-time PCR 检测结果,可见咪喹莫特组 CCL3 表达水平较空白对照组在21、28、35天时下降,35天以后两组 CCL3 表达无明显差异, $*P < 0.05$, 差异具统计学意义(N为正常兔耳皮肤组织)

Compared with the blank control group, the expression index of CCL3 in the imiquimod group was lower at the time of 21, 28, 35 days after surgery. It showed no significantly difference between the two groups after 35 days.

(* $P < 0.05$, "N" stands for normal rabbit ear skin)

组,且在28天时达到峰值。故咪喹莫特能够抑制兔耳瘢痕增生,本结果与形态学大体观察的结论是一致的。

2.5 Real-time PCR 检测结果

与正常兔耳皮肤组织(N)的 mRNA 水平相比,在兔耳腹侧瘢痕的增生期内可见,空白对照组的 Th2 细胞相关趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7 及 CCL13 在大部分时间点处于高表达,Th1 细胞相关趋化因子 CXCL10、CXCL12 基本无表达。

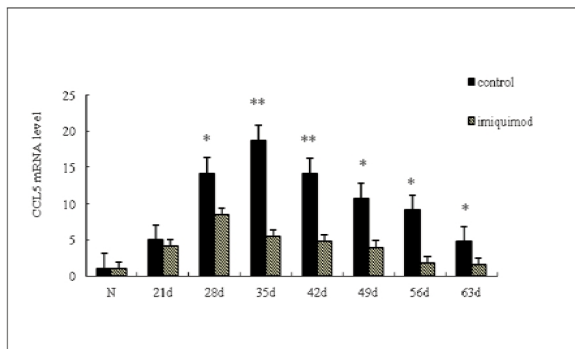


图 7 咪喹莫特干预下 CCL5 的表达情况

Fig.7 The expression of CCL5 by imiquimod treatment

注:Real-time PCR 检测结果,可见咪喹莫特组 CCL5 表达水平较空白对照组在 28,35,42,49,56,63 天明显下降,并呈现一个下降趋势。空白组的 CCL5 在术后第 35 天呈表达高峰,*P<0.05,**P<0.01,差异具统计学意义(N 为正常兔耳皮肤组织)

Note: Compared with the blank control group, the expression index of CCL5 in the imiquimod group was significantly lower at the time of 21,28,35,42,49,56,63 days after surgery and it showed a downward trend in imiquimod group. The degree of proliferation in the blank control group was peaked at the 35th day after surgery.(*P<0.05,**P<0.01,"N"stands for normal rabbit ear skin)

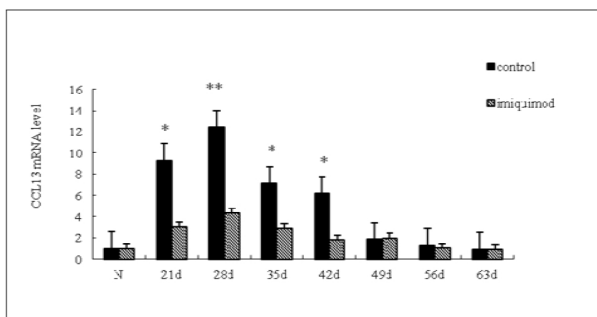


图 9 咪喹莫特干预下 CCL13 的表达情况

Fig.9 The expression of CCL13 by imiquimod treatment

注:Real-time PCR 检测结果,可见咪喹莫特组 CCL13 表达水平较空白对照组在 21,28,35,42 天时明显下降,42 天以后两组 CCL13 表达无明显差异,*P<0.05,**P<0.01,差异具统计学意义(N 为正常兔耳皮肤组织)

Note: Compared with the blank control group, the expression index of CCL13 in the imiquimod group was significantly lower at the time of 21,28,35,42 days after surgery.It showed no significantly difference between the two groups after 42 days.(*P<0.05,**P<0.01,"N"stands for normal rabbit ear skin)

3 讨论

增生性瘢痕是整形外科领域最常见的疾病,常形成于各种创伤、烧伤或手术后,因为确切的发病机制尚不清楚,缺乏安全有效、具有针对性的治疗方法。已有研究表明瘢痕的发生发展

而在咪喹莫特组 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7 及 CCL13 表达明显下降,并显著提高了 CXCL10、CXCL12 在瘢痕组织中的表达。*P<0.05,**P<0.01,差异具统计学意义(如图 5-11)。

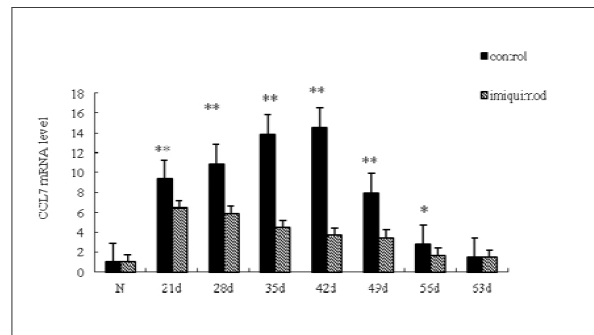


图 8 咪喹莫特干预下 CCL7 的表达情况

Fig.8 The expression of CCL7 by imiquimod treatment

注:Real-time PCR 检测结果,可见咪喹莫特组 CCL7 表达水平较空白对照组在各时间点明显下降,并呈现一个明显下降趋势。空白组的 CCL7 在术后第 42 天呈表达高峰,*P<0.05,**P<0.01,差异具统计学意义(N 为正常兔耳皮肤组织)

Note: Compared with the blank control group, the expression index of CCL7 in the imiquimod group was significantly lower at every time point and it showed a significantly downward trend in imiquimod group. The degree of proliferation in the blank control group was peaked at the 42nd day after surgery.(*P<0.05,**P<0.01,"N"stands for normal rabbit ear skin)

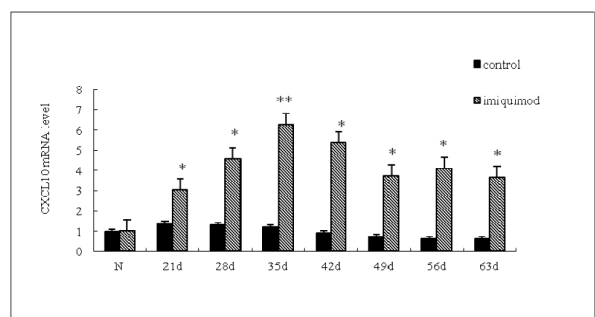


图 10 咪喹莫特干预下 CXCL10 的表达情况

Fig.10 The expression of CXCL10 by imiquimod treatment

注:Real-time PCR 检测结果,可见空白对照组 CXCL10 基本无表达,而咪喹莫特组 CXCL10 在各时间点高表达,并于术后 35 天时呈表达高峰,*P<0.05,**P<0.01,差异具统计学意义(N 为正常兔耳皮肤组织)

Note: The expression index of CXCL10 in the imiquimod group was significantly higher at every time point, and was peaked at the 35th day after surgery while in the blank control group it showed almost no expression or a trend.(*P<0.05,**P<0.01,"N"stands for normal rabbit ear skin)

与机体免疫系统的参与密切相关^[1]。其中辅助性 T 淋巴(Th)细胞群是机体免疫系统中的重要群体,是瘢痕增生过程中的主要免疫细胞^[2],在病理性瘢痕发生中发挥重要作用。Th 细胞主要亚群为 Th1 细胞、Th2 细胞。有研究表明, Th1 和 Th2 细胞在纤维化的形成中发挥重要作用^[9-12]。Th1 细胞主要产生细胞因子

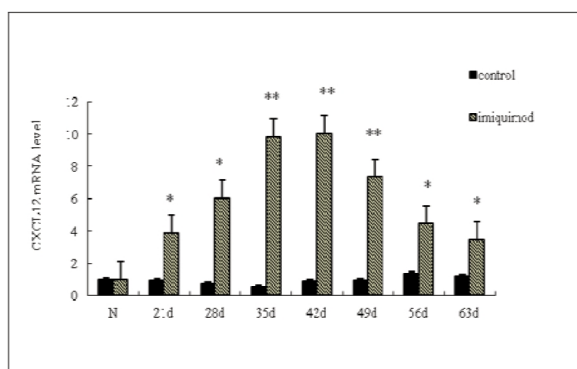


图 11 咪喹莫特干预下 CXCL12 的表达情况

Fig.11 The expression of CXCL12 by imiquimod treatment

注:Real-time PCR 检测结果,可见空白组 CXCL12 基本无表达,而咪喹莫特组 CXCL12 在各时间点高表达,并于术后 42 天时呈表达高峰, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 差异具统计学意义(N 为正常兔耳皮肤组织)

Note: The expression index of CXCL12 in the imiquimod group was significantly higher at every time point, and was peaked at the 42nd day after surgery while in the blank control group it showed almost no expression or a trend. (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, "N" stands for normal rabbit ear skin)

IFN- γ 和 IL-12。IFN- γ 可以抑制胶原合成和增加胶原酶的表达和活性,从而促进胶原重构^[9]。因此,在以 Th1 细胞为主的免疫反应有纤维化程度减轻、细胞外基质降解现象^[10]。Th2 细胞产生多种细胞因子,包括 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 等。其中 IL-4 是强促纤维化因子,作用于成纤维细胞刺激胶原和纤维连接蛋白的产生^[11]。研究表明,在增生性瘢痕形成过程中 Th2 细胞反应为主导^[12]。

咪喹莫特是一种新型的免疫调节剂,其可以被抗原递呈细胞识别并通过与这些细胞表面受体如 Toll 受体 7(TLR 7)结合介导早期的免疫识别与调节,刺激免疫因子 IFN- α 、TNF- α 和 IL-12 等的合成与释放,活化 Th1 细胞免疫途径,增加 Th1 细胞因子 IFN- γ 和 IL-12 产生。同时,也可以通过抑制 Th2 细胞因子白细胞介素 -4、白细胞介素 -5 等的产生来抑制 Th2 细胞免疫反应,使其倾向于形成一个 Th1 细胞免疫为主的反应类型^[13-16]。有研究结果也证实使用了咪喹莫特药膏的兔耳瘢痕组织中 IL-4 表达下降,IFN- γ 的表达增加^[3]。那么是否咪喹莫特抑制瘢痕增生的主要作用机制为调节细胞因子水平改变,如 IFN- γ 的增加或是 IL-4 表达减少?有研究者曾通过向瘢痕组织局部注射 IFN- γ 来进行治疗和预防复发,但未取得效果。说明单独改变某个细胞因子的水平不能达到治疗和预防瘢痕增生的作用^[46]。

趋化因子是由局部组织产生的一族小分子量、具化学趋化活性的蛋白质。免疫细胞其表面分布有不同趋化因子受体,两者相结合后,免疫细胞就在相应的趋化因子的作用下发生迁移^[17-18]。Th1、Th2 细胞在与之相应的趋化因子的作用下,从外周血被募集到组织局部,进而产生多种细胞因子,参与瘢痕形成。趋化因子 CXCL10,可与 Th1 细胞表面受体 CXCR3 特异性结合,是 Th1 细胞的强力募集者,参与 Th1 介导的细胞免疫反应^[19]。CXCL12 在慢性炎症反应中亦倾向于选择性趋化 Th1 细胞^[20]。文献表明 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL13 为 Th2 细胞相关趋化因子^[21-23]。局部组织趋化因子其表达类型和量的差异可显

著影响 Th1、Th2 细胞在局部的表达水平,进而影响瘢痕形成。与正常兔耳皮肤组织(N)的 mRNA 水平相比,在兔耳腹侧瘢痕的增生期内可见,空白对照组的 Th2 细胞相关趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7 及 CCL13 在大部分时间点处于高表达、Th1 细胞相关趋化因子 CXCL10、CXCL12 基本无表达。而在咪喹莫特组 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7 及 CCL13 表达明显下降,并显著提高了 CXCL10、CXCL12 在瘢痕组织中的表达。在本实验结果中可见,与正常兔耳皮肤组织(N)的 mRNA 水平相比,在兔耳腹侧瘢痕的增生期过程中,兔耳增生性瘢痕空白组 Th1 细胞相关趋化因子 CXCL10、CXCL12 在各时间点基本无表达,而 Th2 细胞相关趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL13 在大部分时间点处于高表达,说明在此增生过程中 Th2 细胞反应占了主导地位。而在咪喹莫特组(治疗组)Th2 细胞相关趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CCL7 及 CCL13 表达明显下降,并显著提高了 Th1 细胞相关趋化因子 CXCL10、CXCL12 在瘢痕组织中的表达,使趋化到瘢痕局部组织的 Th1 细胞增加,Th2 细胞减少,Th1 细胞反应增强,Th2 细胞反应受抑制,进而它们分泌的细胞因子 IFN- γ 增加,IL-4、IL-5 水平降低,从而减轻胶原沉积,纤维化程度减轻。病理性瘢痕不仅仅是局部的问题,还受到了来自全身的免疫细胞的调节。因此,单纯处理局部的成纤维细胞或细胞因子的水平,往往难以达到理想的效果。只有阻断循环血液来源的免疫细胞与病变局部细胞间的相互作用,才更有希望取得疗效。可以采用的方式包括小分子趋化因子受体拮抗剂、中和抗体以及免疫抑制剂。我们选择使用作用靶点研究较为准确的免疫抑制剂咪喹莫特,观察其对瘢痕增生的作用,同时通过基因水平 RT-PCR 方法来检测免疫抑制剂对免疫细胞与病变局部细胞相互作用的上游 - 趋化因子的作用表达来进一步阐明其作用机制。本研究结果表明咪喹莫特可以抑制兔耳瘢痕增生,其可以通过调节机体免疫途径中重要的 Th1、Th2 细胞相关趋化因子的表达水平来发挥调节免疫细胞与局部成纤维细胞的相互作用,从而达到抑制兔耳瘢痕增生的作用。本实验有助于阐明 T 细胞来源的信号在瘢痕增生中的作用,为防治增生性瘢痕提供新思路,为治疗提供更加准确的靶点。目前小分子趋化因子受体拮抗剂、中和抗体等尚处于研发阶段,未广泛应用于临床,本实验为这些作用靶点更加准确的药物在瘢痕领域中应用提供了实验思路,非常有必要深入研究。

关于病理性瘢痕中趋化因子的表达,目前已有的研究还大部分集中在单因子或几个因子、或因子横断面的研究。而本实验通过尽量严谨地模拟一个增生性瘢痕的增生期过程,对 Th 细胞相关的一系列的趋化因子进行长期性表达的研究,得出了在兔耳瘢痕增生过程中较为真实的趋化因子的表达曲线,对以后瘢痕防治方法中干预 T 淋巴细胞的趋化和活化的治疗模式提供了大量的数据依据及研究背景。

参考文献(References)

- [1] Traci A. Wilgus. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair [J]. Pharmacol Res, 2008, 58:112-116
- [2] Wong VW, Paterno J, Sorkin M, et al. Mechanical force prolongs acute inflammation via T-cell-dependent pathways during scar formation [J]. FASEB J, 2011, 25(12): 4498-4510

- [3] 闫伦, 李辉超, 王大雷, 等. 咪喹莫特抑制兔耳瘢痕增生的机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(7): 1214-1218
Yan Lun, Li Hui-chao, Wang Da-lei, et al. Imiquimod Inhibit Scar Formation in Rabbit Ear Hypertrophic Scar Model[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(7): 1214-1218
- [4] Al-Khawajah M. Failure of interferon-alpha 2b in the treatment of mature keloids[J]. Inter J Dermatol, 1996, 35(7): 515-517
- [5] Wong TW, Chiu HC, Yip KM. Intralesional interferon alpha-2b has no effect in the treatment of keloids[J]. Br J Dermatol, 1994, 130(5): 683-685
- [6] Hasegawa T, Nakao A, Sumiyoshi K, et al. IFN-gamma fails to antagonize fibrotic effect of TGF-beta on keloid-derived dermal fibroblasts[J]. J Dermatol Sci, 2003, 32(1):19-24
- [7] Morris DE, Wu I, Zhao LL, et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies[J]. Plast Reconstr Surg, 1997, 100(3):674-681
- [8] 李荟元. 创伤研究动物模型 - 兔耳瘢痕模型的建立与应用[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2005:42-45
Li Hui-yuan. The trauma studies animal model - the establishment and application of the model of the rabbit ear scar [M]. Xi'an: the Fourth Military Medical University Press, 2005:42-45
- [9] Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation[J]. 2012, 303(11):L939-952
- [10] Wang R, Ghahary A, Shen YJ, et al. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms [J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(3): 419-427
- [11] Fujitsu Y, Fukuda K, Kumagai N, et al. IL-4-induced cell proliferation and production of extracellular matrix proteins in human conjunctival fibroblasts [J]. Exp Eye Res, 2003, 76(1):107-114
- [12] Tredget EE, Yang L, Delehanty M, et al. Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury [J]. J Interferon Cytokine Res, 2006, 26(3):179-189
- [13] Du Q, Zhou LF, Chen Z, et al. Imiquimod, a toll-like receptor 7 ligand, inhibits airway remodelling in a murine model of chronic asthma [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(1):43-48
- [14] Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, et al. Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells [J]. Mol Carcinog, 2013, 52(10):760-769
- [15] Bart Tarbet E, Deanna L, Bentley JA, et al. Evaluation of imiquimod for topical treatment of vaccinia virus cutaneous infections in immunosuppressed hairless mice [J]. Antiviral Research, 2011, 90 (3): 126-133
- [16] 李剑峰, 章诗富. 咪喹莫特的免疫调节机制及临床应用进展 [J]. 医学综述, 2009, 15(9):1393-1395
Li Jian-feng, Zhang Shi-fu. Progress of Imiquimod in Immunoregulatory Mechanism and Clinical Application [J]. Medical Recapitulate, 2009, 15(9):1393-1395
- [17] Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, et al. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis [J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(3): 141-148
- [18] Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis[J]. Inflamm Res, 2004, 53(11): 585-595
- [19] Groom JR, Richmond J, Murooka TT, et al. CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation[J]. Immunity, 2012, 37(6): 1091-1103
- [20] Clissi B, D'Ambrosio D, Geginat J, et al. Chemokines fail to up-regulate beta 1 integrin-dependent adhesion in human Th2 T lymphocytes [J]. J Immunol, 2000, 164(6):3292-3300
- [21] Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, et al. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production [J]. J Immunol, 1996, 157(10): 4602-4608
- [22] Shang XZ, Chiu BC, Stolberg V, et al. Eosinophil recruitment in type-2 hypersensitivity pulmonary granulomas: source and contribution of monocyte chemotactic protein-3 (CCL7) [J]. Am J Pathol, 2002, 161(1):257-266
- [23] Bellastella G, Rotondi M, Pane E, et al. Simultaneous evaluation of the circulating levels of both Th1 and Th2 chemokines in patients with autoimmune Addison's disease[J]. J Endocrinol Invest, 2011, 34 (11):831-834
- [24] Zuojun H, Lingyu H, Wei H, et al. Interference of IP-10 expression inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia in carotid artery: a new insight in the prevention of restenosis [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(1):125-135