

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.004

对慢性鼻 - 鼻窦炎患者细菌生物膜检测方法的改良*

李 晗 孙希才 刘 全 李艳青 胡 俐 于华鹏 王德辉[△]

(复旦大学附属耳鼻喉科医院耳鼻咽喉科 上海 200031)

摘要 目的:应用 BacLight/CSLM 观察 BBF 时要求使用无菌超纯水进行标本制备,超纯水的低渗作用使活体细胞明显减少,干扰观察结果,本研究提出使用无菌生理盐水代替超纯水进行标本制备,以改良检测效果。**方法:**在鼻内镜手术中收取 27 例慢性鼻 - 鼻窦炎(CRS)患者的鼻窦黏膜,使用激光共聚焦显微镜(CSLM)检测细菌生物膜(BBF)。对 16 例 BBF 阳性病例,分别使用无菌生理盐水、超纯水两种方法进行样本制备,采用 BacLight/CSLM 方法检测样本中的 BBF,分别进行 BBF 评分,统计分析两组评分的差异。**结果:**生理盐水组更真实地还原了 CRS 患者鼻窦黏膜中的 BBF 图像。超纯水组的 BBF 评分显著低于生理盐水组,两组评分有显著性差异(2.125 ± 0.885 vs. 1.500 ± 0.632 , $P=0.029$)。**结论:**生理盐水法检测 BBF 更真实地还原 CRS 患者鼻窦中黏膜细胞和 BBF 的形态,有助于准确进行 BBF 评分。

关键词:慢性鼻 - 鼻窦炎;细菌生物膜;激光共聚焦显微镜;细菌生物膜评分

中图分类号:R-33;R765.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)02-217-05

Improvement of BacLight/CSLM Criteria for Detection of Bacterial Biofilm in Chronic Rhinosinusitis*

LI Han, SUN Xi-cai, LIU Quan, LI Yan-qing, HU Li, YU Hua-peng, WANG De-hui[△]

(Department of Otolaryngology, Affiliated Eye Ear Nose and Throat Hospital, Fudan University, Shanghai, 200031, China)

ABSTRACT Objective: Presently, BacLight/CSLM criteria require sterile MQ water for the preparation of specimen in bacterial biofilm (BBF) detection. The hypotonic effect of sterile MQ water disturbs observation results by reducing living cells. In this study, the samples were prepared with sterile natural saline (NS) and sterile MQ water, respectively, and differences between two methods were compared. **Methods:** The mucosa of nasal sinus of 27 patients with chronic rhinosinusitis (CRS) was collected during endoscopic sinus surgery, and BBF was detected by laser confocal microscopy (CSLM). For 16 BBF positive cases, BBF samples were prepared by sterile NS and sterile MQ water respectively. BacLight/CSLM method was applied in the observation of BBF, and BBF scores were measured. Difference of BBF score between the two groups was statistically analyzed. **Results:** BBF image was restored more accurately in NS group. BBF score of MQ water group was significantly lower than that of NS group (2.125 ± 0.885 vs. 1.500 ± 0.632 , $P=0.029$). **Conclusions:** Detection of BBF by NS method reflects the morphology of mucosal cells and BBF in the paranasal sinuses more accurately, and is helpful for BBF scoring.

Key words: Chronic rhinosinusitis; Bacterial biofilm; Confocal laser scanning microscope; Bacterial biofilm score

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R765.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)02-217-05

前言

慢性鼻 - 鼻窦炎(Chronic rhinosinusitis, CRS)是耳鼻咽喉科的常见疾病,发病率高,病情呈现慢性、反复不愈的特点^[1]。CRS 的发展是一个多因素、多步骤的过程,近年来细菌生物膜(Bacterial biofilm, BBF)被发现是 CRS 发病机制中的重要因素,影响 CRS 患者的预后^[2,3]。激光共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscopy, CSLM)可以精确检测 BBF^[4]。FISH/CSLM 是鉴定 BBF 的金标准,但存在准备时间长,成本高、操作复杂等缺点,其应用受到限制。与 FISH/CSLM 相比,

BacLight/CSLM 具有同样的敏感性^[5],因其快速、简便、稳定性高及适用于所有菌种等优点,现已广泛应用于对 BBF 的检测分析。

有研究提出基于 BacLight/CSLM 检测方法的 BBF 评分系统,它与 CRS 临床特征之间具有显著的相关性,因此根据 BBF 评分对 CRS 患者进行分层评估对于精准治疗 CRS 有重要价值^[6]。然而,现行的 BacLight/CSLM 方法中的标本制备过程存在一处不足。应用 BacLight/CSLM 检测 BBF 时要求使用无菌超纯水进行标本洗涤和染色剂配制。超纯水的低渗作用使活体细胞减少、肿胀、分散,干扰了对鼻窦黏膜细胞形态和 BBF 的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81600783);上海市科委基金资助项目(15401971500)

作者简介:李晗(1986-),博士研究生,主治医师,主要研究方向:鼻窦炎,电话:18917785787, E-mail: lihannahil@163.com

△ 通讯作者:王德辉(1963-),博士生导师,教授,主要研究方向:鼻 - 颅底解剖、基础和临床, E-mail: wangdehuiet@sina.com

(收稿日期:2018-07-26 接受日期:2018-08-18)

观察和评估。该问题使得本领域研究中混入了系统性偏差,然而迄今并未见到相关研究对此进行评估。

本研究在使用 BacLight/CSLM 法检测 BBF 的过程中,使用无菌生理盐水代替超纯水进行样本制备,评价两种方法之间观测效果的差别。优化 BacLight/CSLM 方法检测 BBF 的流程,对于 CRS 和 BBF 两个领域的发展均具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 病例入组

本研究选取在 2008 年 9 月至 2009 年 1 月期间于复旦大学附属耳鼻喉医院接受鼻内镜手术 (Endoscopic Sinus Surgery, ESS) 的 27 例 CRS 患者,诊断依据 2003 年 CRS 诊断标准^[6]。该研究得到复旦大学附属耳鼻喉医院伦理委员会批准,获得所有参与者知情同意。

1.2 样本采集

术中收取患者的前/后组筛窦黏膜,组织样本取自黏膜水肿或有分泌物的窦腔。标本取下后立即转入 DMEM 培养基 (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) 并置于冰上,2 小时内完成标本处理和检测。

1.3 样本处理与分析

将每个标本分为两份,分别归入生理盐水组和超纯水组。生理盐水组标本用无菌生理盐水 (Normal saline, NS) 清洗三次,每次至少 3 分钟,以此除去浮游细菌。采用 BacLight LIVE/DEAD 试剂盒 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA),取“A 组份”(Syto 9 核酸染色剂)和“B 组份”(碘化丙啶)各 1.5 μ L 加入 1 mL 无菌生理盐水中配成染色液,将样品浸泡在染色液中,置于暗室室温下孵育 20 分钟。孵育完成后,每个样品在无菌生理盐水中漂洗三次,每次 5 分钟,以去除多余的染色剂。超

纯水组标本的处理将无菌生理盐水全部替换为无菌超纯水,其余操作与生理盐水组相同。最后将制备好的样品置于盖玻片上,用 CSLM 进行扫描、观察和分析。扫描每个样品的整个区域,用浸水透镜分别在 20 倍和 63 倍放大下检测 BBF 结构。

1.4 BBF 形态观察

将具有 BBF 特征的簇状或塔状结构中一个细菌微菌落定义为一个 BBF 计数。BBF 评分标准为:0 分,无 BBF 结构(在至少 10 个随机高倍镜视野下);1 分,在 2-10 个高倍镜视野下可见 1 或 2 个 BBF 计数;2 分,每个高倍镜视野下可见 1 或 2 个 BBF 计数;3 分,每个高倍镜视野可见 3 至 5 个 BBF 计数;4 分,每个高倍镜视野下可见超过 5 个 BBF 计数^[9]。

1.5 BBF 评分及比较分析

在 BBF 阳性组中,分别对两种方法观测取得的图像进行 BBF 评分,比较两组数据的差异,评估两种不同的样本制备方法对观察 BBF 形态的影响。

1.6 统计学分析

结果表示为均数 $\pm$ 标准差,使用 SPSS14.0 软件包 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析。采用 Student's t 检验比较两组独立数据的差异。 $P < 0.05$,具有统计学意义(双侧)。

2 结果

2.1 不同 BBF 评分组的典型 CSLM 图像

利用 BacLight/CSLM 方法检测时,活的细胞和细菌经 Syto-9 染色呈现绿色,而死亡的细胞和细胞碎片呈现红色。以 CSLM 检测细菌生物膜的标准是,在鼻窦黏膜细胞周围观察到适当大小及形态呈现绿色荧光的活菌(直径为 0.5~2 μ m)聚集成微群落,被云雾状的绿色胞外多糖类物质紧密包绕(图 1 箭头所示)。

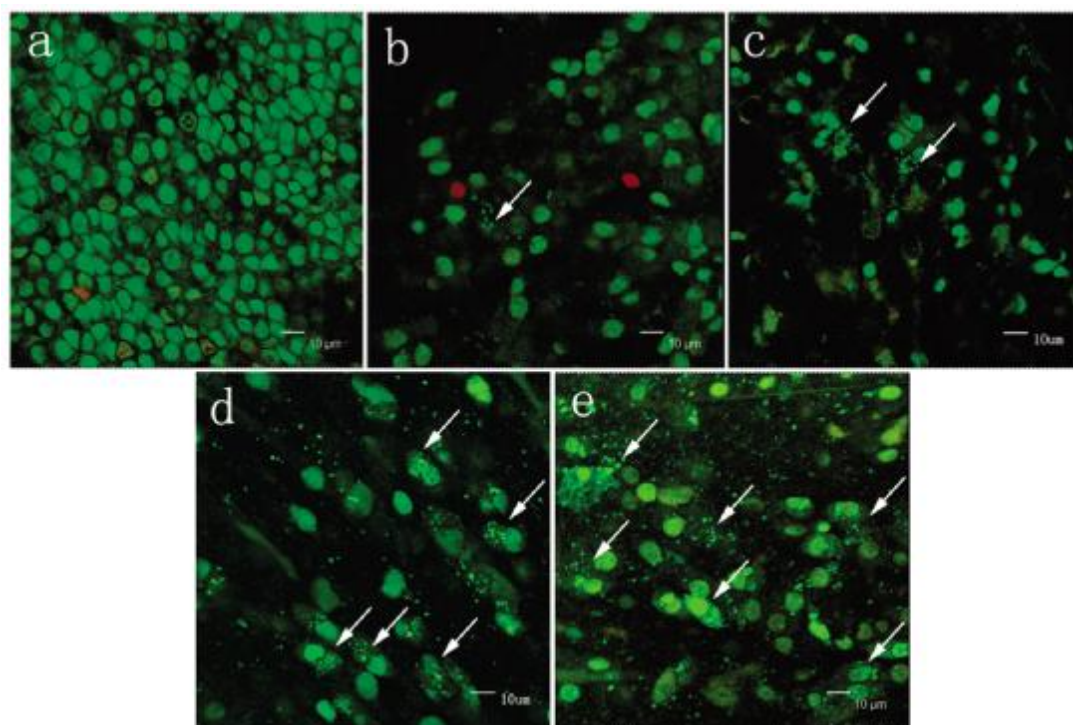


图 1 不同 BBF 评分组鼻窦组织的典型 CSLM 图像(63 $\times$ 放大)

Fig.1 CSLM images of BBF with different BBF scores(63 $\times$)

Note: a—0 score, b—1 score, c—2 scores, d—3 scores, e—4 scores, one arrow point to one BBF structure.

2.2 两种检测方法的观测效果比较

将每个标本都用两种方法进行样本的制备、观察、分析和比较。研究发现在 BBF 阴性组的鼻窦黏膜中,生理盐水法制备的样本细胞排列紧密,大多细胞呈现绿色,代表细胞仍然存活,细胞结构清晰,死亡细胞也能保持原有形态。用超纯水法制备

的样本,大多数细胞已死亡(呈现红色),存活细胞变形较多,死亡细胞多已裂解破碎,显示不出正常的形态,细胞间结构破坏,细胞分离、变形甚至破碎(图 2)。因此,无菌生理盐水法观测效果更好,能够更为真实地反映 CRS 患者鼻窦黏膜中的细胞形态。

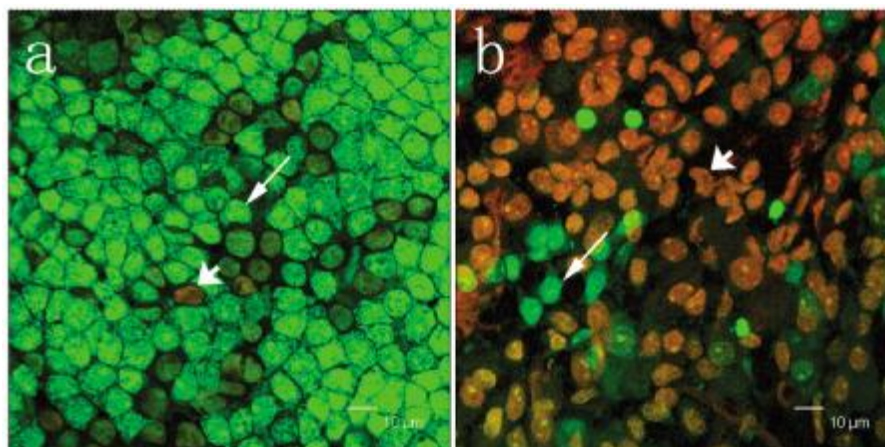


图 2 无菌生理盐水法(a)和无菌超纯水法(b)制备样本的细胞形态比较(63× 放大)

Fig.2 CSLM images of sinus mucosa managed by normal saline (a) and MQ water (b) (63×)

Note: long arrow point to live cell; short arrow point to dead cell.

2.3 两种检测方法的 BBF 评分比较

在 27 例 CRS 患者鼻窦黏膜中,我们发现 BBF 阳性的患者 16 例,BBF 阴性的患者 11 例。在 BBF 阳性组中,对 32 个制

备好的样本(生理盐水法 16 个,超纯水法 16 个)进行 BBF 观测和评分。BBF 评分采取双盲法。两组的 BBF 评分分布情况具体列为表 1。

表 1 两组的 BBF 评分分布情况

Table 1 Distribution of BBF scores in two groups

Group	1 point	2 points	3 points	4 points
Normal saline group	4 (25%)	7 (43.75%)	4 (25%)	1 (6.25%)
MQ water group	9 (56.25%)	6 (37.5%)	1 (6.25%)	0 (0%)

Note: each figure means the number of CRS cases in different BBF score set.

生理盐水组的 BBF 形态清楚,鼻窦黏膜细胞旁可见团簇状细菌包绕在云雾状细胞外多糖等物质中(图 3a 箭头所示);超纯水组的细胞大多死亡,极度肿胀的细胞/细胞碎片与细胞周围的 BBF 结构影像重叠,导致部分 BBF 结构难以准确辨认;更重要的是,超纯水长时间浸泡使得组织肿胀、细胞离散、细胞间隙明显增大,导致每个高倍镜视野下细胞和 BBF 结构数量减少,BBF 评分可能因此被低估(图 3b 箭头所示)。将两组的 BBF 评分进行 Student's t 检验,发现超纯水组的 BBF 评分显著低于生理盐水组,两组评分具有显著性差异(2.125 ± 0.885 vs. 1.500 ± 0.632 , $P=0.029$)(图 3c)。

3 讨论

自然界中约 99% 的细菌以 BBF 的形式存在,只有约 1% 以游离状态生存。在人类细菌感染性疾病中至少有 65% 的病变涉及 BBF^[2]。在耳鼻喉科,慢性中耳炎、胆脂瘤、增殖体炎、扁桃体炎等病变与 BBF 有关^[7]。近年来发现 BBF 也广泛存在于 CRS 患者中,是其发病机制中的重要因素^[2,8]。在 BBF 这种保护状态中,细菌嵌入在自己产生的细胞外聚合物所构成的多维空间结

构中^[9],具有高耐药性和高免疫耐受性,从而影响 CRS 患者的预后^[2,3]。

每个患者的 BBF 形成模式都是独特的,基于 BBF 的特征对 CRS 患者进行分层分析是精准治疗的前提。前期研究已提出了基于 BacLight/CSLM 检测方法的 BBF 评分系统^[5]。研究发现有些临床参数(包括流鼻涕、耳胀、耳痛、内窥镜评分、内镜下水肿、分泌物、结痂等体征评分,CT 评分,病程)在有/无 BBF 的 CRS 患者之间并无差异,却在不同 BBF 评分组之间表现出了显著性差异。相关性分析证实,与 BBF 定性检测相比,BBF 评分与 SNOT-20 症状评分具有更高的相关性。这些结果表明,BBF 评分与临床症状之间的相关性高于单纯定性 BBF,能够对 CRS 患者进行细分、指导临床治疗。因此,准确进行 BBF 评分显得尤为重要。

BBF 中的细菌难以进行浮游培养,目前主要采用扫描电镜、CSLM、荧光原位杂交技术(FISH)等方法检测 BBF 的形态^[4]。最早是用电子显微镜观察 BBF 的超微结构,但标本需要脱水后切片。BBF 中 95% 以上成分是水,脱水对 BBF 结构破坏大,细菌也多已死亡,所以现今多用 CSLM 观察 BBF。CSLM 是一

种可以精确检测 BBF 的技术,并且可以对较厚的观察样品进行断层扫描成像,通过三维重构无损伤地观察和分析其立体结构^[10]。以往,CSLM 和 FISH 检测方法的组合使用被推荐为 BBF 鉴定的“金标准”,但因准备时间长,成本高、操作复杂等缺点,临床应用受到限制。研究发现 BacLight/CSLM 和 FISH/CSLM

的灵敏度具有等效性^[9]。本研究采用 BacLight/CSLM 检测方法,得到了清晰的 BBF 图像,在 16/27 例(59.26%)CRS 患者中发现了 BBF。因此 BacLight/CSLM 可以作为临床实践中筛选 BBF 的优先选择,具有稳定、便捷、高质量等优点。

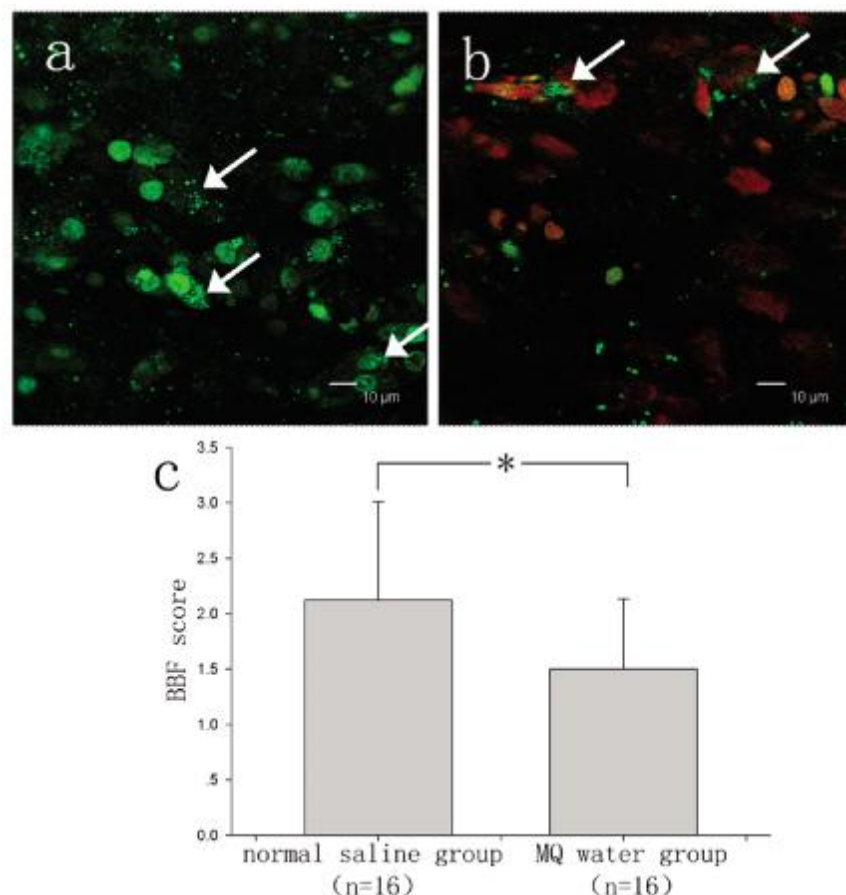


图3 无菌生理盐水法(a)和无菌超纯水法(b)制备样本的BBF形态比较(63×放大)

Fig.3 CSLM images of BBF in sinus mucosa managed by normal saline (a) and MQ water (b) (63×)

Note: one arrow point to one BBF structure. * $P < 0.005$, BBF score of MQ water group was significantly lower than that of NS group.

然而,现行的 BacLight/CSLM 方法在标本制备过程中存在不足。目前所能查阅到的以 BacLight/CSLM 方法直接对组织标本进行 BBF 检测的文献,大多使用无菌超纯水进行标本洗涤和染色剂配制^[12-13],组织样本需要在无菌超纯水中分别进行三次清洗,每次 3 分钟,以去除浮游细菌;染色后再用无菌超纯水洗涤 3 次,每次 5 分钟,以洗去多余的染色剂。标本总共要在超纯水中浸泡约 25 分钟^[14]。超纯水的低渗作用使活体细胞大量减少,干扰了对鼻窦黏膜细胞形态和 BBF 的观察和评估,使得本领域研究结果中不可避免地混入了系统性偏差。值得注意的是,在细菌学基础研究中,细菌拭子直接接种于培养皿,并不存在这个问题^[16,17]。但是对于涉及到临床组织样本的实验研究,这项检测流程优化使得结果更为真实和客观。Kinnari^[12]在慢性喉炎患者、Lampikoski^[15]在慢性中耳炎患者组织样本中以 BacLight/CSLM 方法检测 BBF,使用超纯水进行标本的制备,CSLM 下所见正如本研究如图 2b 和图 3b 中所示,绝大多数细胞已死亡,部分死亡的细胞变形、破碎,与 BBF 结构相重叠,导致 BBF 显示不清。曾有研究提出该问题,强调 BacLight/CSLM 操作中使用生理盐水的重要性^[9],然而迄今为止尚未见到具体

的定量研究对此进行评估。本研究对 BacLight/CSLM 检测方法进行改良,将无菌超纯水更换为生理盐水,并将每个标本用两种方法进行样本的制备、一对一观察对比,对生理盐水组和超纯水组分别进行 BBF 评分,统计发现超纯水组 BBF 评分显著降低。标本使用超纯水浸泡后,细胞肿胀变形、细胞间隙增大,导致每高倍镜视野下观察到的细胞和 BBF 数量减少,是 BBF 评分降低的主要原因。对于仅检测组织样本中是否存在 BBF 现象的定性研究,使用超纯水或生理盐水两种方法并不会对研究结果造成影响。但是,已有研究发现 BBF 的定量检测与临床症状的严重程度具有明显相关性^[9]。使用 BacLight/CSLM 方法简便、快速的对临床标本进行 BBF 的定量检测,对于临床用药和手术方式的选择可能具有指导意义。本研究使用生理盐水代替超纯水,去除了超纯水的低渗作用,能够更好地还原鼻窦黏膜细胞和 BBF 的形态,更准确的对 BBF 进行定量检测。

此外,在 BacLight/CSLM 观测 BBF 的操作流程中,还有以下几点值得注意。首先,尽量选取有较多分泌物的前组/后组筛窦黏膜进行检测。Arild Danielsen 等发现在筛窦黏膜中 BBF 的发生率显著高于中鼻甲^[13]。且相较于鼻腔,筛窦黏膜较薄,有

利于充分染色,也不会因为样本太厚而增加 CSLM 扫描难度。分泌物较多的部位为 CRS 病变部位,能更准确地反映鼻窦黏膜中 BBF 的真实情况。其次,标本取下后立即置入 DMEM 培养液中保存和运送,减少运送过程中细胞和细菌的死亡。第三,在 CSLM 下观察 BBF 时,先用 20 倍镜定性 BBF,对于 BBF 可疑阴性的标本,要全层扫描标本确保没有遗漏 BBF 结构,再以 63 倍镜对 BBF 进行定量分析。这些操作细节有助于增加 BBF 的检出率,还原 CRS 患者鼻窦黏膜中 BBF 的真实情况。

BBF 对抗生素有显著的耐药性,难以通过标准的抗菌治疗根除。诸多治疗方法正在研发中,包括局部抗菌剂、表面活性剂、渗透利尿剂和大环内酯类抗生素,以及茶树油、光动力疗法和脉冲式超声治疗^[18-20]。每种治疗方法都被证明在特定情况下有效,然而并无一种普遍适用的治疗方法,这就要求临床个体化治疗以使患者真正受益。BBF 评分系统将所有 CRS 患者细分为 5 个亚组,其与 SNOT-20 症状评分、内镜评分、病程等指标存在显著的相关性,并且明显优于 BBF 定性检测,有助于 CRS 患者个体化抗 BBF 治疗方案的制定。本研究利用无菌生理盐水代替无菌超纯水进行标本制备,得到了质量更好的观测图像,更为真实地反应 BBF 评分,有助于指导临床个体化治疗。

4 结论

现行的 BacLight/CSLM 操作要求使用超纯水进行标本配置,超纯水的低渗作用使鼻窦黏膜细胞大量减少、细胞和 BBF 结构更为分散,干扰了对鼻窦黏膜中的细胞形态和 BBF 的观察。在 BacLight/CSLM 法检测 BBF 的流程中使用无菌生理盐水代替超纯水进行样本制备,能够更真实地反映鼻窦黏膜中 BBF 的形态,避免 BBF 评分被低估。该改进对于 CRS 患者的抗 BBF 治疗及发病机制研究具有重要的价值。

参考文献(References)

- [1] Sedaghat AR. Chronic rhinosinusitis [J]. Am Fam Physician, 2017, 96(8): 500-506
- [2] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(1): 7-11
- [3] Karunasagar A, Garag SS, Appannavar SB, et al. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis and their implications for clinical management [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2018, 70(1): 43-48
- [4] Di Luca M, Navari E, Esin S, et al. Detection of biofilms in biopsies from chronic rhinosinusitis patients: in vitro biofilm forming ability and antimicrobial susceptibility testing in biofilm mode of growth of isolated bacteria[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1057: 1-27
- [5] Li H, Wang D, Sun X, et al. Relationship between bacterial biofilm and clinical features of patients with chronic rhinosinusitis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 269(1): 155-163
- [6] Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2003, 129(3 Suppl): S1-32
- [7] Marcuzzo AV, Tofanelli M, Boscolo Nata F, et al. Hyaluronate effect on bacterial biofilm in ENT district infections: a review [J]. APMIS, 2017, 125(9): 763-772
- [8] Długaszewska J, Leszczynska M, Lenkowski M, et al. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016, 273(8): 1989-1994
- [9] Berne C, Ellison CK, Ducret A, et al. Bacterial adhesion at the single-cell level[J]. Nat Rev Microbiol, 2018
- [10] Larue AE, Swider P, Duru P, et al. Quantitative 3D comparison of biofilm imaged by X-ray micro-tomography and two-photon laser scanning microscopy[J]. J Microsc, 2018
- [11] Ruangcharoen S, Suwannarong W, Lachica M, et al. Killing activity of LFchimera on periodontopathic bacteria and multispecies oral biofilm formation in vitro[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2017, 33(9): 167
- [12] Kinnari TJ, Lampikoski H, Hyyrynen T, Aarnisalo AA. Bacterial biofilm associated with chronic laryngitis [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 138(5): 467-70.
- [13] Arild Danielsen K, Eskeland Ø, Fridrich-Aas K, et al. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis; distribution and prevalence[J]. Acta Otolaryngol, 2016, 136(1): 109-112
- [14] Singhal D, Jekle A, Debabov D, et al. Efficacy of NVC-422 against Staphylococcus aureus biofilms in a sheep biofilm model of sinusitis [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2012, 2(4): 309-315
- [15] Lampikoski H, Aarnisalo AA, Jero J, et al. Mastoid biofilm in chronic otitis media[J]. Otol Neurotol, 2012, 33(5): 785-788
- [16] Wu X, Zhang Y, Chen X, et al. Inflammatory immune response in rabbits with Staphylococcus aureus biofilm-associated sinusitis[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2018
- [17] Bozić DD, Pavlović B, Milovanović J, et al. Antibiofilm effects of amoxicillin-clavulanic acid and levofloxacin in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2018, 275(8): 2051-2059
- [18] Herget K, Frerichs H, Pitzner F, et al. Functional enzyme mimics for oxidative halogenation reactions that combat biofilm formation [J]. Adv Mater, 2018, e1707073
- [19] Li XH, Lee JH. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy[J]. J Microbiol, 2017, 55(10): 753-766
- [20] Hu X, Huang YY, Wang Y, et al. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections [J]. Front Microbiol, 2018, 9(1299)
- [21] Wound Care, 2018, 7(2): 29-45
- [22] Liu B, Liu Y, Wang L, et al. RNA-seq-based analysis of the hypertrophic scarring with and without pressure therapy in a Bama minipig model[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 11831
- [23] Ogawa R. Recent Advances in Scar Biology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1749
- [24] Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, et al. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions [J]. Advances in
- [25] Zhao J-C, Zhang B-R, Hong L, et al. Extracorporeal shock wave therapy with low-energy flux density inhibits hypertrophic scar formation in an animal model [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(4): 1931-1938
- [26] Goyal A, Linskey KR, Kay J, et al. Differential Expression of Hedgehog and Snail in Cutaneous Fibrosing Disorders: Implications for Targeted Inhibition[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(6): 709-717

(上接第 248 页)