

单纯创伤和照射复合创伤愈合过程中成纤维细胞的 病理学及超微结构特点

秦全红 王德文 高亚兵 彭瑞云 谷庆阳 夏国伟 崔雪梅

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 探讨了局部照射对伤口愈合过程中成纤维细胞(Fibroblast, Fb)长消规律、形态学及超微结构的影响。将156只Wistar大鼠随机分为单纯创伤组(对照组)和照射复合创伤组(照射组),采用光镜、电镜和免疫组化方法研究两组伤口愈合中成纤维细胞病理变化、超微结构及 α -actin表达。结果表明,对照组伤口成纤维细胞数量于伤后1—10d呈进行性增加,伤后10d达高峰,照射组成纤维细胞数量于伤后1—15d较对照组减少且高峰后移,伤后15d达高峰。依据超微结构特点成纤维细胞分为过渡型、增殖型、合成分泌旺盛型、肌成纤维细胞型、转归型和凋亡型六种类型。在伤愈不同时期各种类型分布不同,照射组各型成纤维细胞出现滞后,尤其是合成分泌旺盛型和肌成纤维细胞型,并出现畸形成纤维细胞。后者细胞大小形态各异,内质网高度扩张,高尔基体和微丝束减少等。照射抑制伤口成纤维细胞增殖,使各型成纤维细胞出现滞后,并使成纤维细胞形态发生变化,出现特有的畸形成纤维细胞。

关键词 照射, 创伤愈合, 成纤维细胞, 病理, 超微结构

中图分类号 R818.02, R818.74

电离辐射对皮肤伤口愈合的影响是平时与战时均引起关注的问题,尤其是肿瘤病人术后放疗,常常引起皮肤伤口愈合延迟,甚至长期不愈。成纤维细胞是伤口愈合中的主要修复细胞之一,参与创伤愈合的全过程,在创伤愈合中起着重要的作用。成纤维细胞是辐射中度敏感细胞,辐射引起成纤维细胞DNA合成抑制并造成损伤,使之修复能力降低甚至丧失,最终导致创伤愈合延迟^[1]。照射引起的诸多皮肤损伤变化大多数由于成纤维细胞的功能异常所致,如成纤维细胞合成胶原减少可以引起真皮萎缩,伤口强度降低,成纤维细胞胶原酶合成减少,最终导致皮肤的纤维化。目前,关于电离辐射对创伤愈合的研究多集中在对创伤愈合过程中的病理组织学和部分分子生物学研究,而关于辐射对成纤维细胞在伤口愈合中的长消规律和超微结构影响的研究很少见报道。本研究通过光镜、电镜、免疫组织化学方法动态地观察了照射对创伤愈合中成纤维细胞长消规律、组织学形态及超微结构的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

将二级Wistar大鼠156只(体重 (200 ± 20) g,

由军事医学科学院实验动物中心提供)随机分为对照组(单纯创伤组78只)和照射组(照射复合创伤组,78只)。

1.2 动物致伤模型

经腹腔注射1%戊巴比妥钠(30mg/kg体重)麻醉后,剪除大鼠胸背部毛,皮肤经碘酒、酒精消毒,于胸背部正中线对称制做两个直径为1.5cm的圆形全层皮肤伤口,两伤口间隔1.5cm,伤口暴露。对照组伤口不做处理,照射组伤口于伤后进行射线照射,两组动物均单笼饲养于二级动物房。

1.3 照射条件和方法

照射组动物于致伤后半小时内,采用 ^{60}Co 射线单次局部照射(钴源由军事医学科学院钴源室提供),照射范围包括伤口处及其周围为1cm,用铅砖屏蔽,靶距2.5m,照射剂量为25Gy,剂量率为3.75Gy/min。照射剂量选择25Gy,是根据本课题组既往的剂量-效应研究认为:25Gy射线单次局部照射即可引起大鼠伤口愈合明显延迟,又不会导致难愈合的放射性溃疡^[2]。

全军九五重点招标课题基金(96Z008)资助

第一作者:秦全红,女,1968年10月出生,2000年毕业于军事医学科学院放射医学研究所,病理学专业,博士,助理研究员,现工作单位:天津医科大学病理教研室

收稿日期:初稿 2001-09-21,修回 2002-04-25

1.4 观察指标

每日定时观察并记录伤口变化及愈合情况, 分别于伤后 1、2、3、5、7、10、15、21、28、45、60、90 和 180d, 每组取 6 只大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉处死, 取伤口及周围皮肤组织, 中性缓冲福尔马林固定, 石蜡包埋, 常规切片, 经 HE 染色, 光镜观察并计数成纤维细胞数量。于伤后 1、2、5、7、10、15、21、28 和 45d 取电镜样品, 3%戊二醛固定, 再经 1%锇酸固定后制作超薄切片, 用 Philips EM 400T 型透射电镜进行超微结构观察。

1.5 -SM actin 免疫组织化学检测方法

抗 -SM actin 单抗购自北京中山生物工程公司, 采用 SP 法, DAB 显色。

1.6 统计学分析

研究中数据均以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验。

2 结果

2.1 伤口愈合的一般情况

于伤后 1—2d, 对照组伤口炎性渗出较多, 而照射组伤口渗出较少。对照组伤口于伤后第 3 天即开始收缩, 伤后 5—12d 伤口收缩明显, 其平均愈合时间为 $(15.9 \pm 0.3)d$; 照射组伤后各时间点伤口面积均明显大于对照组 ($p < 0.01$), 尤其在伤后 5、7、9 和 12d 照射组伤口收缩明显比对照组差, 平均愈合时间为 $(19.6 \pm 1.1)d$ (与对照组比, $p < 0.01$)。

2.2 单纯创伤与照射复合创伤中成纤维细胞的长消规律和形态学特点

对照组于伤后 1d 可见创缘纤维细胞和小血管外膜细胞变肥大, 胞核由梭形变为椭圆形, 后者更为明显; 于伤后 2d 可见成纤维细胞的增殖, 数量增加, 并见核分裂像、创底、创缘纤维细胞体积增大, 向成纤维细胞转化。照射组虽然于伤后 2d 也可见成纤维细胞的增殖, 但数量明显少于对照组。

对照组于伤后 3—7d 成纤维细胞数量呈进行性增加, 7d 时可见较多的成纤维细胞并行排列, 形成腔隙样结构(形成血管)。10d 时成纤维细胞数量达高峰。照射组成纤维细胞于伤后 3—10d 也呈进行性增加, 但其数量比对照组少, 伤后 7d 见较多的畸形成纤维细胞, 细胞形态大小不一, 呈多形性(蝌蚪形、三角形和细波浪状), 排列紊乱, 并行的成纤维细胞很少, 15d 时成纤维细胞可达高峰。

伤后 15—180d 对照组成纤维细胞数量逐渐减

少。15d 时可见创缘创底成纤维细胞变为细长梭形的纤维细胞; 伤后 21d 对照组肉芽组织成纤维细胞明显减少, 渐代之以丰富的纤维细胞。

照射组伤后 21—180d 成纤维细胞数量逐渐减少, 28d 后逐渐代之以纤维细胞。图 1 为两组伤口中成纤维细胞数量的比较。如图 1 所示, 高倍镜视野定量计数成纤维细胞结果表明, 对照组于伤后 1—10d 成纤维细胞呈进行性增加, 10d+时计数达到高峰 $(2851.52 \pm 286.87)mm^{-2}$, 伤后 15d 开始减少, 伤后 28—180d 成纤维细胞数量减少缓慢, 但 180d 时其数量仍较正常真皮成纤维细胞多。

照射组成纤维细胞于伤后 1—15d 也呈进行性增加, 15d 时计数达高峰 $(2015.15 \pm 132.32)mm^{-2}$, 其高峰值后移且较对照组高峰值低, 伤后 21—180d 成纤维细胞数量逐渐减少, 但较对照组数量略多(见图 1)。

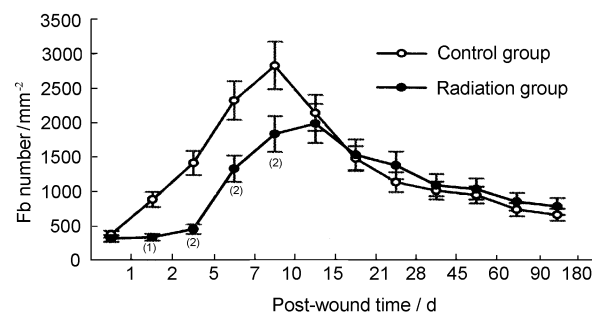


Fig.1 Changes of fibroblast number in the control group and radiation group ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$.

2.3 两组伤口愈合中成纤维细胞超微结构特点

电镜观察发现, 单纯创伤愈合过程中, 在伤后不同时间成纤维细胞具有不同的超微结构特点。

2.3.1 过渡型成纤维细胞 见于伤后 1—2d, 是纤维细胞向成纤维细胞转化的一种形态, 细胞体积较纤维细胞大, 线粒体略大, 基质较致密, 粗面内质网增多, 呈轻度扩张(见图 2)。

2.3.2 增殖型成纤维细胞 主要见于伤后 2—5d, 细胞核大, 粗面内质网丰富, 呈轻度扩张, 腔内含较多电子密度均匀的絮状物, 游离核糖体丰富, 有较丰富的高尔基氏器, 提示其增殖活跃(见图 3)。

2.3.3 合成分泌旺盛型成纤维细胞 主要见于伤后 5—21d, 以 7—15d 为多。成纤维细胞内含有更加丰富的粗面内质网, 中度扩张, 腔内多充满电子密度均匀的絮状物, 细胞内含较密集的微丝, 核异染色质丰富, 多见高尔基复合体和线粒体, 并可见胶原原纤维分泌像, 提示其蛋白和胶原合成分泌活跃(见图 4)。

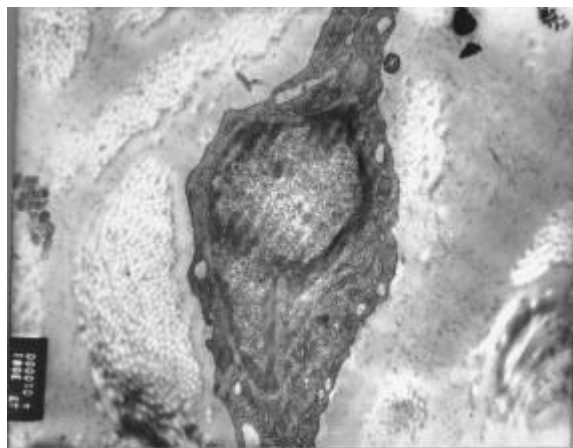


Fig.2 Transitional type fibroblast on first day after wounding in control group. This cell showed big volume, rich mitochondria and many RER with light dilation (TEM, $\times 10000$).

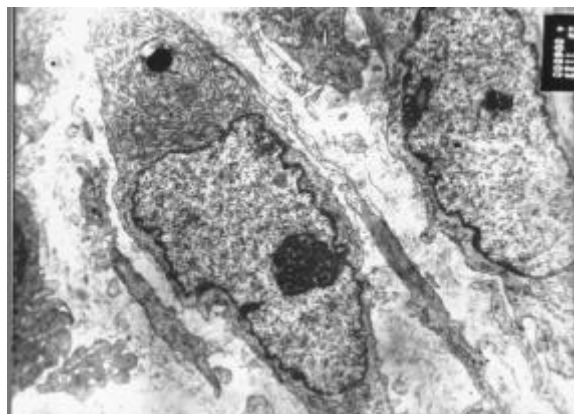


Fig.3 Proliferative type fibroblast on second day after wounding in control group. This cell showed big nucleoli, more rich RER with light to moderate dilation (TEM, $\times 6000$).

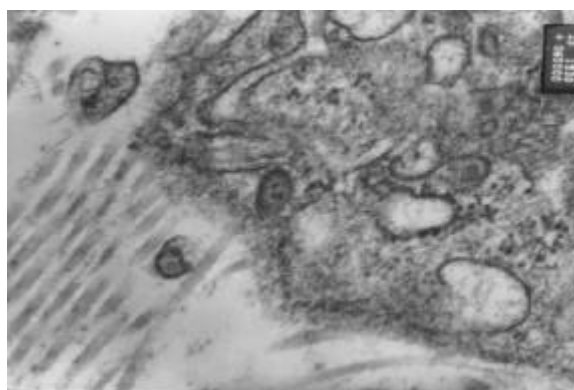


Fig.4 Active synthesis-secretion type fibroblast on fifth day after wounding in control group. This cell showed collagen fibril secreting image (TEM, $\times 60000$).

2.3.4 肌成纤维细胞 主要见于伤后5—21d, 28d时仍可见, 是成纤维细胞的一种特殊表型。肌成纤维细胞具有平滑肌细胞的特点, 含有丰富的平滑

肌肌动蛋白, 有电子致密颗粒的微丝、密体和密斑及细胞联接复合体(见图5)^[3]。同时, 肌成纤维细胞具有成纤维细胞的典型特点。丰富的粗面内质网和高尔基体等, 并可见胶原原分泌像。

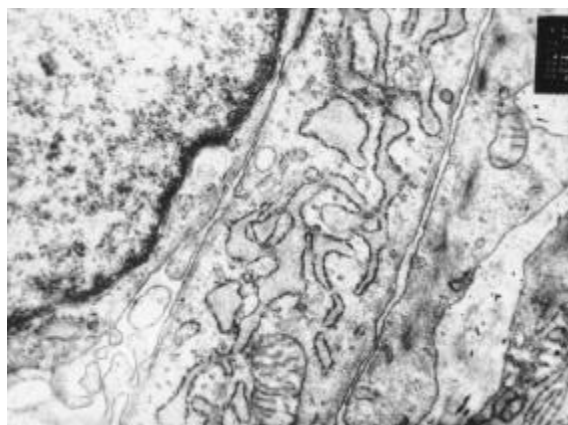


Fig.5 Myofibroblast on fifth day after wounding in control group. This cell showed dense body, dense patch, rich microfilaments and RER with moderate dilation (TEM, $\times 17000$).

2.3.5 转归型成纤维细胞 见于伤后21—28d, 此类细胞是成纤维细胞向纤维细胞转化的中间型细胞, 细胞内微丝减少, 密体密斑消失, 粗面内质网减少, 无分泌像(见图6)。

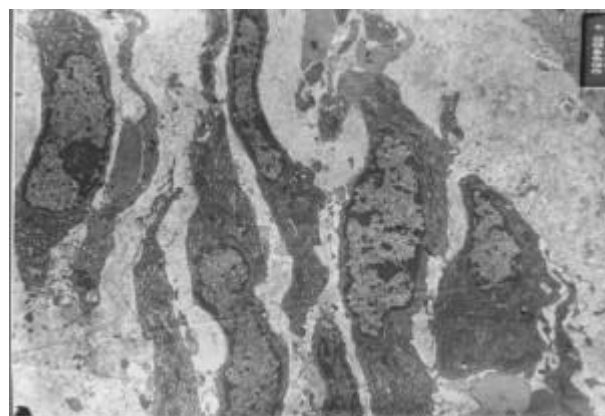


Fig.6 Returned type fibroblast on 21d after wound in control group. This cell showed small volume, thin-length form, reduced microfilaments (TEM, $\times 4600$).

2.3.6 凋亡型成纤维细胞 成纤维细胞核染色质边集或固缩(见图7), 呈团块状, 半月形或圆环状, 但有着完整的核膜, 细胞器结构明显无异常。该型细胞于伤后5d即可见, 15d时剧增, 此后逐渐减少。

如表1所示, 两组伤口于不同时间创周成纤维细胞类型分布有明显的差异。伤后1d, 对照组伤口以过渡型成纤维细胞为主, 照射组成纤维细胞线粒体扩张, 嵴消失, 粗面内质网扩张呈泡状或池状,

并可见凋亡。伤后 2d, 对照组伤口以增殖型成纤维细胞为主, 照射组成纤维细胞以过渡型为主, 细胞增殖不活跃, 并见线粒体空化, 内质网扩张, 脱颗粒, 游离核糖体少。

Tab. 1 The types of fibroblasts in two groups in different time

Post-wound time / d	Control group	Radiation group
1	Transitional type	None
2	Proliferation type	Fewer transitional type, accompanying apoptotic type
3	Proliferation type	Mainly transitional fibroblasts, accompanying apoptotic type
5	Mainly synthesis-secretion type, fewer myofibroblast type	Fewer myofibroblast type and many deformed fibroblasts
7	Mainly synthesis-secretion type, fewer myofibroblast type	Fewer synthesis-secretion type, mainly deformed fibroblasts
10	Mostly myofibroblast type, fewer apoptotic type	Mainly synthesis-secretion type, many deformed fibroblasts, accompanying apoptotic type
15	Mainly returning type, myofibroblast type decreased, many apoptotic type	Mmainly synthesis-secretion type, many apoptotic cells
21	Mainly returning type, few of apoptotic cells	Mainly synthesis-secretion type, many apoptotic cells
28	A fewer returning type, occasionally apoptotic cells	Mainly returning type, more apoptotic cells
45	Occasionally returning type	Many returning type, a few of apoptotic cells

伤后 5d 对照组伤口以合成分泌旺盛型成纤维细胞为主, 并可见少量肌成纤维细胞, 偶见凋亡。照射组成纤维细胞以过渡型和增殖型为主, 合成分泌旺盛型成纤维细胞和肌成纤维细胞相对较少, 部分成纤维细胞较细长, 并有较明显的细胞凋亡和退变。照射组细胞核膜形态不规整, 染色质浓集, 核周间隙增宽, 线粒体空化或呈均质状, 内质网少, 脱颗粒, 并高度扩张。

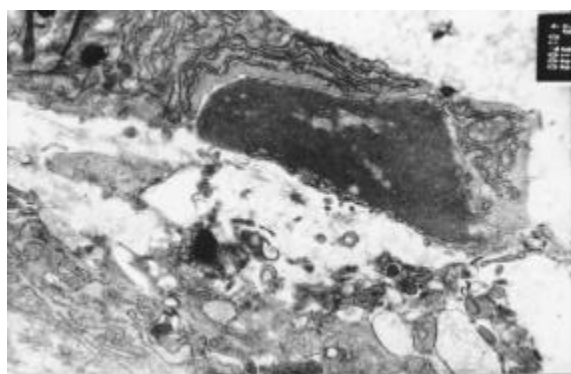


Fig.7 Apoptotic type fibroblast on 10th day after wounding in control group. This cell showed chromatin concentration and aggregation (TEM, $\times 1700$).

伤后 10d 对照组以合成分泌型成纤维细胞和肌成纤维细胞为主。照射组增殖型和合成分泌型成纤维细胞增多, 并成为创缘主要细胞成分, 而肌成纤维细胞较对照组少, 并可见较多凋亡的成纤维细胞,

提示功能活跃和蜕变损伤的成纤维细胞并存。照射组中可以看到部分成纤维细胞核固缩, 核膜消失, 局灶状坏死。

伤后 15d 对照组见成纤维细胞向纤维细胞过渡, 细胞内仍有多量微丝, 凋亡细胞增多。照射组部分成纤维细胞大小不一, 呈畸形, 粗面内质网呈囊状、池状, 高度、甚至极度扩张, 内容空虚, 脱颗粒明显, 膜破裂; 照射组中还可以看到线粒体肿胀、空化或呈均质状, 嵴减少或断裂, 方向各异, 甚至呈纵排状, 高尔基氏器少见, 细胞内微丝少, 提示胶原合成分泌功能减弱。这类细胞称之为畸形成纤维细胞或放射性成纤维细胞(见图 8)。该类细胞主要见于伤后 5—21d。

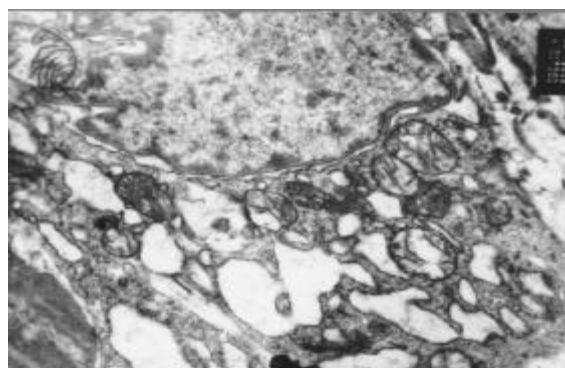


Fig.8 Radiation fibroblast on 15d after wounding in irradiated group. This cell showed extremely dilated RER with degranulation, swollen and vacuolated mitochondria (TEM, $\times 1700$).

伤后 21—28d, 对照组以转归型成纤维细胞为主。照射组 21d 以合成分泌型成纤维细胞为主, 28—45d 则以转归型成纤维细胞为主。

2.4 -SM actin 免疫组织化学染色结果

研究结果表明, 对照组在伤后 3d 即可见 -SM actin 表达阳性的细胞, 5d 时开始增多, 10d 达高峰, 15d 后渐减少, 28d 时仍可见 -SM actin 表达阳性的细胞, 但数量极少。照射组伤口 -SM actin 表达阳性的细胞始于伤后 5d, 在伤后 15d 数量达高峰, 28d 时阳性细胞数明显减少(见表 2)。

Tab. 2 The expression of -SM actin in fibroblasts in the two groups

Post-wound time / d	Control group	Radiation group
1—3	+	-
5	++	+
7	++	++
10	+++	++
15	++	+++
21	+	+
28	±	±

3 讨论

3.1 照射对创伤愈合过程中成纤维细胞长消规律的影响

研究表明, 创伤愈合过程中成纤维细胞的数量动态变化经历为: 增殖期(1—5d)、高峰期(7—10d)和消减期(>15d), 具有明显时相性特点。照射使成纤维细胞增殖减弱, 虽然在伤后 2d 可以看到照射组成纤维细胞的增殖, 但与对照组相比就不明显。同时, 高峰期(10—15d)及消减期(>21d)出现滞后, 在增殖期和高峰期成纤维细胞数量明显低于对照组。可以认为, 照射对创伤愈合过程中成纤维细胞的影响具有“全程性”特点, 而且持续漫长时间。

关于创伤愈合中成纤维细胞来源问题目前仍有争议。多数学者认为, 创伤愈合中成纤维细胞主要来自于伤口边缘未受损伤的成纤维细胞、间充质细胞, 或由静止的纤维细胞活化而来, 这看法已为我们的观察所证实。同时有研究认为^[4], 成纤维细胞的另一来源是血源细胞。在研究中还观察到创周血管外膜细胞及横纹肌周围和脂肪组织间成纤维细胞增殖。

关于伤口愈合过程中成纤维细胞的减少和消亡方式尚未完全明了。结果发现, 对照组在伤后 5d 即可见少许凋亡的成纤维细胞, 在随后各时间点均

有成纤维细胞凋亡, 并呈进行性增加, 于伤后 15d 凋亡细胞数达高峰, 之后逐渐减少。表明在伤口愈合之前, 随着成纤维细胞数量的增加, 凋亡始终伴随这一过程, 即成纤维细胞的新旧更替在创伤愈合中始终存在, 但在早期, 新生强于凋亡; 随着瘢痕的形成和改建, 成纤维细胞凋亡增多, 成纤维细胞增殖弱于消亡。可以认为, 细胞凋亡是成纤维细胞在肉芽组织消减期和瘢痕改建期逐渐减少的主要方式(途径)。此外, 我们观察到, 于伤后 10d 在成纤维细胞数量达高峰时, 即见创底、创缘成纤维细胞向纤维细胞转化, 直至瘢痕形成。电镜观察还可以看到成纤维细胞的退变坏死, 尤其在肉芽组织消减期多见。提示, 这也是成纤维细胞消亡的途径之一。此外, 肉芽组织中部分成纤维细胞转变为毛细血管, 也已为我们的观察所证实, 其发生时间大多在伤后 3—7d, 尤以 5d 为甚。

3.2 照射对创伤愈合过程中成纤维细胞的超微结构的影响

从电镜观察发现, 于伤后不同时间两组伤口成纤维细胞超微结构类型分布有明显差别。照射后各型成纤维细胞出现滞后, 尤以合成分泌旺盛型和肌成纤维细胞为著, 成纤维细胞数量减少, 凋亡出现早且数量多(见于伤后 1d); 照射后转归型成纤维细胞出现提早, 我们称之为成纤维细胞的早老现象, 过早老化的成纤维细胞分泌功能减弱。照射组可见成纤维细胞核内假包含体, 核形态不整或畸形, 染色质边聚, 核周间隙增宽, 线粒体肿胀, 基质呈均质状或减少, 嵴消失, 可见局灶坏死。此外, 照射组细胞内微丝减少, 高尔基体和粗面内质网少, 扩张呈泡状, 腔内空虚, 表明其合成及分泌功能减弱。

抗 -SM actin (-平滑肌肌动蛋白) 单抗是与平滑肌肌动蛋白特异结合的标记物, 能够与肌成纤维细胞的肌动蛋白结合, 从而反映肌成纤维细胞在两组创伤愈合中的变化规律。文献[5]报道, 当肌成纤维细胞停止收缩或伤口完全闭合后, 肌成纤维细胞内的平滑肌肌动蛋白消失。本研究看到当 -SM actin 表达阳性的肌成纤维细胞出现时, 即伤后第 3d, 即可见较明显的伤口收缩, 在其数量增多时, 即伤后 7、10 和 15d, 此时伤口收缩加速。肌成纤维细胞不仅参与伤口收缩, 而且有着与成纤维细胞一样的分泌胶原的功能^[6]。本研究的电镜观察可以看到, 含有丰富的微丝和粗面内质网的肌成纤维细胞分泌胶原原纤维。照射后成纤维细胞内 -SM actin 表达减弱且滞后, 表明照射抑制肌成纤维细胞的表达, 进而抑制伤口收缩及胶原分泌。

照射后成纤维细胞出现多形性,细胞形态大小不很规则,呈三角形、蝌蚪形、细波浪形等。部分细胞体积大,核染色较深。既往研究称为放射性成纤维细胞^[7]。虽然这类细胞核较大,但其核分裂像少见,表明其增殖分裂能力并不强。同时电镜观察发现,此类细胞尚见粗面内质网明显扩张,脱颗粒,腔内空虚,线粒体肿胀或空化,高尔基复合体明显扩张,均提示其蛋白合成分泌功能呈减弱或低下状,可能是受照成纤维细胞损伤后短暂时间内继续其生命活动的一种病理性代偿反应,为放射性伤口所特有。

综上所述,照射抑制成纤维细胞的增殖,使各型成纤维细胞出现滞后,尤其是合成分泌型成纤维细胞和肌成纤维细胞减少,严重影响成纤维细胞的功能。同时照射使伤口收缩能力减弱,胶原纤维合成分泌减少,导致伤口闭合延迟及抗拉能力减弱,从而影响伤口愈合。

参考文献

- 1 Bernstein E F, Sullivan F J, Mitchell J B et al. *Clinic Plastic Surg*, 1993, 20: 435-453
- 2 谷庆阳,王德文,崔彩彬等. *中华放射医学与防护杂志*, 1998, 18(3): 166-169
GU Q Y, WANG D W, CUI C B et al. *Chin J Radiol Med Prot*, 1998, 18(3): 166-169
- 3 Schmitt G A, Desmoulie A, Gabbiarni G et al. *Virchows Arch*, 1994, 425: 3-24
- 4 Bucaorla K, Spiegel L A, Chesney J et al. *Mol Med*, 1994, 1CD: 71-81
- 5 Moulin V, Castilloux G, Jean A et al. *Burns*, 1996, 22: 359-362
- 6 Orgill D, Demling R H. *Cri Car Med*, 1988, 16: 899-988
- 7 谷庆阳,高亚兵,崔彩彬等. *军事医学科学院院刊*, 2000, 24(1): 40-43
GU Q Y, GAO Y B, CUI C B et al. *Bull A CAD Mil Med Sci*, 2000, 24(1): 40-43

THE CHARACTERS OF PATHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF FIBROBLASTS IN NORMAL WOUND AND RADIATION-COMBINED WOUND HEALING

QIN Quanhong WANG Dewen GAO Yabing PENG Ruiyun GU Qingyang XIA Guowei CUI Xuemei
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT The paper is to study the number, morphology and ultrastructure of fibroblasts in the process of wound healing of local irradiated rats. 156 Wistar rats were divided into two groups, the wound group (control) and the radiation-combined wound group (radiation group). Numeral, morphological and ultrastructural changes of the fibroblasts were observed with light microscope and transmission electron microscope. The α -SM actin expression in the fibroblasts was measured with immunohistochemical assay. The number of the fibroblasts in the control group increased gradually and reached to the max on the 10th day. In the radiation group, the fibroblasts number changed less than the control and the peak was seen on the 15th day. The fibroblasts included types of the transition, the proliferation, the synthesis-secretion, the myofibroblast, the transformation and the apoptosis. For the radiation group, each of the six types of fibroblasts, especially the synthesis-secretion type and the myofibroblast type, appeared later in comparison with the control. In addition, the peculiarities of the abnormal fibroblasts could be observed in the radiation group, the highly expanded rough endoplasmic reticulums, the less golgis and microfilaments. Irradiation can inhibit the proliferation of the fibroblasts, delay the appearance of the stage-specific fibroblasts, cause the morphological and ultrastructural changes in the fibroblasts and promote the formation of the abnormal fibroblasts.

KEYWORDS Irradiation, Wound healing, Fibroblast, Pathology, Ultrastructure

CLC R818.02, R818.74