

# 创面愈合中真皮组织再生过程的观察

申 霄 齐发芝<sup>△</sup>

(复旦大学附属中山医院整形外科 上海 200032)

**【摘要】 目的** 研究全层皮肤创面愈合过程中真皮的再生模式以及与表皮层、基底膜层再生的关系。**方法** 在大鼠背制备全层皮肤创面( $n=10$ )。分别于第1,2,3,4,5周取创面标本。行HE、PAS染色以及用碱性水浸泡方法制作扫描电镜标本,在光镜和扫描电镜下观察创面愈合中真皮的再生情况。**结果** 在术后第1,2周时在创缘可见新生的薄层表皮向创面中心移行生长;随后是表皮下真皮浅层的生长,而深层真皮相对保持静止。在第3周时,在新生表皮下方与新生真皮的部位之间见不连续的PAS阳性带,在第5周时,创面外周见连续的PAS阳性带,而在创面中央处仍不连续。扫描电镜的观察显示创面边缘真皮乳头层较网状层率先向创面中央生长,网状层生长较缓慢,在后期与肉芽组织转化而来的结缔组织相融合。**结论** 创伤后真皮乳头层和网状层表现出不同的再生模式。乳头层真皮的再生与表皮的再生密切相关。表皮的新生和移行发生在在乳头层真皮新生之前,而基底膜结构在表皮和真皮乳头层均形成后才开始形成。

**【关键词】** 创面愈合; 真皮; 扫描电镜

**【中图分类号】** R 318 **【文献标志码】** B

## The observation of the process of dermal regeneration in wound healing

SHEN Xiao, QI Fa-zhi<sup>△</sup>

(Department of Plastic Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】 Objective** To study the regenerative pattern of dermis in full layer wound healing process, and the relation to regeneration of epidermis and basal membrane. **Methods** Full layer wounds were created at the dorsal site of rats ( $n=10$ ), the specimens were obtained at 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> week; HE and PAS staining were performed, and the alkaline water maceration method was used for preparing scanning electronic microscope (SEM) specimens; the healing process of dermis was observed under light microscope and electronic scanning microscope. **Results** The wound edge showed the regeneration of immature epidermis towards central granulation tissue at the early stage, followed by the growth of dermis adjacent to epidermis. The PAS positive layer was seen between neo-dermis and epidermis at the peripheral wound 5 weeks after wounding, while the central wound exhibited incontinuous PAS positive layer. Under the SEM study, the papillary dermis developed toward central wound prior to reticular dermis, which grew relatively slower and syncretized with the granulation tissue at the later phase. **Conclusions** The papillary and reticular dermis exhibit distinct regenerative pattern in wound healing. The regeneration of papillary dermis is closely related to epidermis. The neo-formation and migration is prior to dermal growth, and the basal membrane begins to form after the formation of epidermis and dermis.

**【Key words】** wound healing; dermis; scanning electronic microscope

皮肤软组织创伤的愈合不仅是表皮的覆盖,还包括真皮结缔组织的再生和重塑。真皮为皮肤提供机械支持和外观特征,是维持创面愈合质量的最重要因素。迄今为止,人们对创面愈合过程进行了大量的研究,但对创面愈合中真皮层的再生特点仍所

知较少。在既往的研究中无法特异性区分真皮乳头层和网状层真皮在创面愈合中的生长模式,真皮在创面愈合的后期如何进行结构的重塑;真皮内细胞与细胞之间、细胞与基质之间如何相互调控等问题目前仍不清楚<sup>[1]</sup>。近年来对创面愈合中真皮再生的

上海市科委自然科学基金(07JC14013)

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: alexsenla@163.com

三维形态学研究国内尚无报道。Yamamoto<sup>[2,3]</sup>的研究认为真皮乳头层与网状层有不同的再生模式,基底膜与新生真皮同时生长。本实验用碱性水处理的方法可无损伤地去除胶原基质中的细胞和组织碎屑,利用扫描电镜可以观察创面愈合过程中真皮不同组织结构再生的精细三维结构,从而可探索创面愈合中不同真皮层的再生模式,以及与表皮、基底膜再生过程的关系。

材 料 和 方 法

**实验动物** SD大鼠 10 只,雌雄不拘,体重 200 ~250 g,由中科院实验动物中心提供。

**动物模型制作方法** 取 SD 大鼠,在氯胺酮腹腔麻醉下(150 mg/kg)制备鼠背全层皮肤创面,直径约 1.5 cm。创面制备后不予包扎,单笼饲养,自由进食饮水。标本获取分别于第 7、14、21、28 天在麻醉下取创面边缘组织标本。标本包括创面、新生肉芽及部分正常皮肤组织。

**组织标本 HE、PAS 染色方法** 取材组织块,脱水,常规石蜡包埋,垂直创缘方向做切片,一张做 HE,一张做 PAS 染色。切片常规用二甲苯脱蜡,经逐级乙醇至水洗,苏木精及伊红液染色 5 min 后水洗。另一张切片用 0.5%高碘酸氧化 6~8 min 后蒸馏水洗,无色品红加盖避光染 7~10 min,不经水洗,擦净组织旁多余染液,0.5%重亚硫酸钠作用 1 min,水洗 2~5 min,苏木精复染 1 min 左右后水洗,常规脱水,透明,封片。在显微镜下观察创缘表皮及基底膜的生长情况。

**碱性水处理的扫描电镜标本制作方法** 在 2.5%戊二醛 4℃下固定超过 24 h,垂直于表面修剪,暴露出从边缘正常皮肤到创面肉芽组织的断面;断面标本浸泡在 30℃ 2N NaOH 7 d,用蒸馏水浸洗 2~3 d 直到水变清。标本在 1% 锇酸 4℃下固定 2 h,在 1% 锇酸水溶液中浸泡一夜,0.1% mol/L 磷酸缓冲液洗 3 次(各 15 min);脱水及置换。临界点干燥约 2 h,样品粘贴于样品台上喷金 3 min,抽真空。用扫描电镜观察标本断面真皮的生长情况,加速电压为 20 kV(日立 S-520)。

结 果

**大体组织观察结果** 在术后第 1 周,缺损创面被肉芽组织和血痂覆盖,未出现明显的创面收缩。术后第 2 周,创面上的血痂开始脱落,创面出现明显的收缩。与创面收缩相比,表皮新生较缓慢。边缘

新生表皮不稳定,易从创面撕脱。术后第 5 周,创面完全被表皮覆盖,中央部分表皮最薄,创面周围表皮较厚。

**组织染色观察结果** 创缘处真皮与肉芽组织间有明显界限,可见薄层表皮向创缘中心的肉芽组织移行。相比外周正常组织,创面边缘显示为菲薄的、不成熟的表皮。新生的薄层表皮下方见真皮浅层在肉芽组织上方生长,真皮深层再生相对较缓慢(图 1A-B)。在正常皮肤部分见移行区表皮和真皮之间的基底膜区域显示一条连续 PAS 染色阳性带,但是创缘以内未见此阳性带。在第 2 周时,新生表皮进一步分化并增厚。在新生表皮下方与新生真皮的部位之间见不连续的 PAS 阳性带,提示开始有基底膜结构的生成(图 1C-D)。在创伤形成后第 5 周,创面的外周见新生真皮与表皮之间出现连续的 PAS 阳性带,而创面中央处只见不连续的 PAS 阳性带(图 1E-F)。对比大体组织和光镜下的观察,发现新的真皮乳头层在新生表皮的外周,与 PAS 阳性层相对应,晚于新生表皮向创面中央的生长。在没有表皮覆盖的肉芽组织上则没有见到真皮乳头的生长。

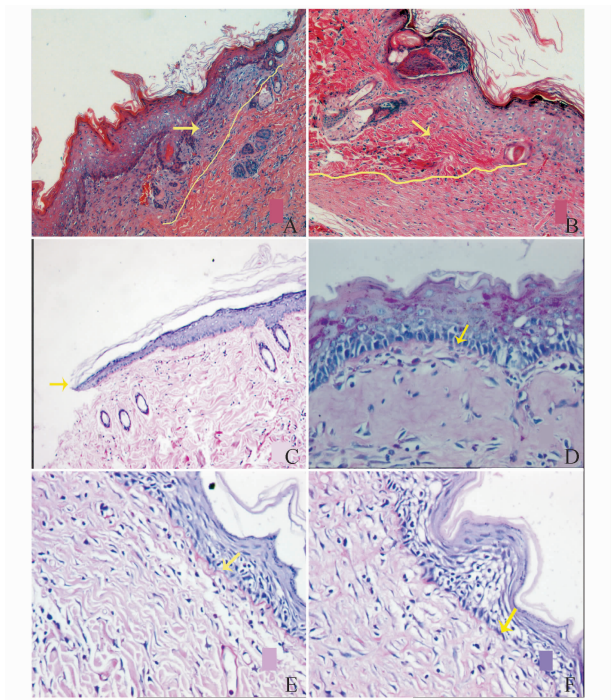


图 1 大鼠创面 HE 及 PAS 染色

Fig 1 The HE and PAS stain of rats' wounds

A: HE stain of the wound edge at 2 weeks postoperatively( $\times 400$ ); B: HE stain of the wound edge at 3 weeks postoperatively, the arrow points to the direction of the wound growth; C: PAS stain of the wound at one week postoperatively( $\times 100$ ); D: PAS stain of the wound at 3 weeks postoperatively( $\times 400$ ); E: PAS stain of the peripheral part of the wound at 5 weeks postoperatively( $\times 400$ ); F: PAS stain of the central part of the wound at 5 weeks postoperatively( $\times 400$ ).

**扫描电镜的观察结果** 正常大鼠皮肤真皮乳头层厚度约为 10  $\mu\text{m}$ ,乳头层胶原由精细的纤维交织成束状,构成较致密的网络结构;网状层较乳头层厚,由较粗大、卷曲的纤维组成,纤维组织构成较疏松的空间结构(图 2A~D)。在术后第一周时,可见边缘乳头层的精细胶原纤维组织开始向肉芽组织方向生长,但未见网状层真皮在肉芽组织的生长,两者之间的界限清晰(图 2E)。在第 2 周时,创面中央肉芽组织开始形成网状层样的粗大、疏松、卷曲的纤维,并有较多的胶原沉积。这是不成熟的胶原组织,在胶原束之间有大量的纤维交叉联系,并形成粗糙的网格结构(图 2F)。对比大体和组织染色观察结果,新生乳头层真皮较表皮层的移行缓慢,提示表皮组织先在肉芽组织上生长,然后才是乳头真皮的生长。新生的乳头真皮是在肉芽组织上生长,上方由表皮覆盖。乳头真皮越往创面中心越薄,并在肉芽组织上显示出卷曲和清晰的胶原网络。

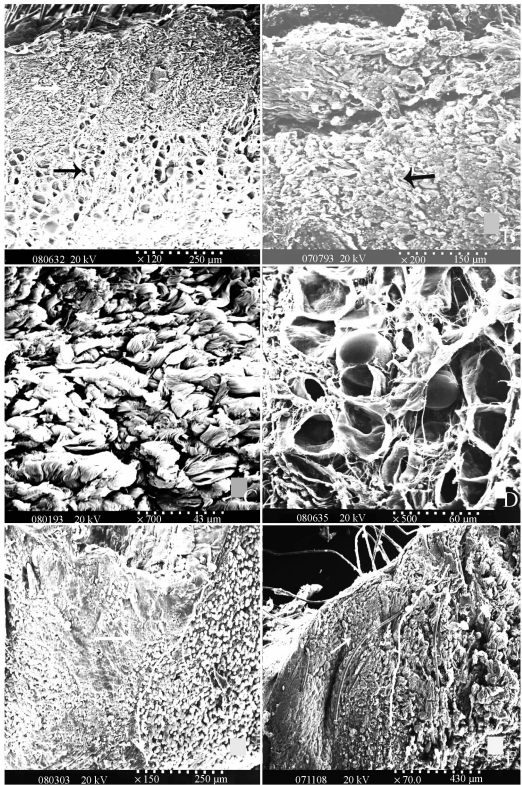


图 2 大鼠创面扫描电镜观察

Fig 2 The electronic microscopic image of rats' wound

A: The SEM image of the rat skin after processing of alkaline water( $\times 120$ ), the white arrow points to the papillary dermis, the black arrow points to the reticular dermis; B: The SEM image of the rat skin without process of alkaline water ( $\times 200$ ); C: The ultra-microscopic structure of papillary dermis ( $\times 700$ ); D: The ultra-microscopic structure of reticular dermis( $\times 500$ ); E: The SEM image of the wound edge at one week postoperatively( $\times 150$ ); F: The SEM image of the wound edge at 2 weeks postoperatively.

讨 论

真皮分为乳头层和网状层。乳头层又称真皮上部,为紧靠表皮的薄层结缔组织,纤维较细密,细胞较多。网状层较厚,位于乳头层下方,是真皮的主要组成成分。真皮乳头层与网状层不仅有着不同的组织结构和占据不同的位置,其生理功能也有着显著的差异。Dunkin<sup>[4]</sup>等人通过对人体不同深度伤口愈合的观察研究,发现网状层真皮损伤后的修复有明显的瘢痕,而仅伤及乳头层不会导致明显的瘢痕形成。乳头层与网状层的成纤维细胞具有相似的形态,但 DNA 分析表明不同部位的成纤维细胞有自己的基因表达特点和性质,合成各自独特的细胞外基质(ECM)、细胞因子等<sup>[5]</sup>。由于到目前为止真皮乳头层及网状层缺乏特异性标志物,在创伤愈合研究中传统的研究方法无法特异性区分两者结构,只能通过光镜组织学大体区别。因此限制了对真皮不同层次再生功能的深入研究。

本研究的结果发现创面愈合过程中表皮率先向创面中央移行和生长,随后是乳头层真皮的生长,而网状层真皮再生相对缓慢。虽然乳头层与网状层均属于真皮组织,但却有明显不同的生物学特性,乳头层的功能与表皮层密切相关。Yamamoto<sup>[2,3]</sup>的研究表明,创面愈合过程中无表皮新生的肉芽组织上没有发现乳头层真皮的生长;创面愈合中真皮乳头层和网状层有不同的生长模式,表皮、基底膜和乳头层真皮随着表皮的移行在肉芽组织上生长,新生的乳头层真皮与表皮层一起生长,并构成一个皮肤“新生单位”,而网状层真皮的形成则可能来自于肉芽组织的晚期的胶原重塑。与 Yamamoto 的研究结果不同,本部分试验中我们观察到基底膜结构并未与乳头层一起开始生长,而是在表皮层和乳头层形成后才开始生长。这个结果提示我们随着表皮的新生,真皮乳头层开始生长,网状层真皮再生相对缓慢。基底膜的出现更可能是乳头层真皮与表皮相互作用的结果,因为只有在出现表皮以及下方的真皮后一段时间才观察到基底膜结构的生成。基底膜的生成可能是真皮与表皮之间建立稳定联结的结果,在良好的真皮与表皮生长后才开始生长。碱性水浸泡扫描电镜法(alkaline water maceration scan electronic microscopy,AWMSEM)是日本实验学者Ohtani<sup>[6]</sup>为制备胰腺细胞外基质的方法而研发出的一种去除基质中细胞和胶原外成分的方法。用这种方法能够无损伤地去除胶原基质中细胞、血痂以及胶原之外的纤维成分,能精确表现出胶原纤维的三

维结构和排列情况,是一种理想的脱除基质中细胞成分的方法。在本研究中我们应用这个方法可更加直观地观察真皮胶原纤维的超微结构,详细观察创面中不同真皮层各自的愈合过程。

在创伤愈合过程中,表皮细胞接触的细胞外基质对表皮的再生起着重要的调控作用<sup>[7]</sup>。临床上发现创伤初期的新生表皮较易脱落,皮肤耐磨性差,易生成水泡。Moulin<sup>[8]</sup>的研究证实在创面愈合中,基底膜的生成表明再生皮肤的稳定,基底膜延迟或者不完全生成会导致表皮脱落或者水泡生成。乳头层真皮和基底膜对保持真皮-表皮连接的稳定性、促进表皮成熟有重要的作用。基底膜的形成代表创面愈合的成熟和再生表皮的稳定,但它在创面愈合中的再生过程目前仍无定论。

尽管人们早已开始对皮肤真皮的研究,但对不同层次的真皮组织进行更为细致的研究有助于我们了解真皮在皮肤愈合过程中的生长特点。本部分实验观察到真皮乳头层在早期即参与创伤的修复,真皮网状层较乳头层再生缓慢。真皮的乳头层与网状层在结构和功能上均有显著的差异,在将来的研究中会进一步探索产生这种差异的机制,以为创面愈合以及瘢痕的治疗提供新的途径。

## 参 考 文 献

- [1] George Broughton II, Jeffrey Janis E, Christopher Attinger E.

The basic science of wound healing[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006,117(Suppl):12-34.

- [2] Naoto Yamamoto, Tomoharu Kiyosawa, Katsuyuki Arai. Dermal neoformation during skin wound healing as demonstrated using scanning electron microscopy [J]. *Ann Plast Surg*, 2004,52:398-406.
- [3] Naoto Yamamoto, Mashaki Nambu, Ryuichi Azuma, *et al.* Dermal neoformation during partial-thickness skin wound healing[J]. *Ann Plast Surg*, 2004,56:182-185.
- [4] Christopher Dunkin SJ, Jonathon Pleat M, Patrick Gillespie H. Scarring occurs at a critical depth of skin injury: precise measurement in a graduated dermal scratch in human volunteers[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2007,119:1 722-1 732.
- [5] Chang HY, Chi JT, Dudoit S. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts [C]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99:12 877-12 882.
- [6] Ohtani S. Three-dimensional organization of the collagen fibrillar framework of the human and rat livers[J]. *Arch Histol Cytol*, 1998,51:473-488.
- [7] Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation[J]. *EMBO J*, 2002,21(15):3 919-3 926.
- [8] Moulin V, Auger FA, Garrel D. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin [J]. *Burns*, 2000,26:3-12.

(收稿日期:2008-05-30;编辑:张秀峰)

## (上接第 840 页)

- [22] Gupta R, Rastogi P, Sarna M, *et al.* Body-mass index, waist-size, waist-hip ratio and cardiovascular risk factors in urban subjects[J]. *J Assoc Physicians India*, 2008,56:131-132.
- [23] Elsayed EF, Sarnak MJ, Tighiouart H, *et al.* Waist-to-hip ratio, body mass index, and subsequent kidney disease and death[J]. *Am J Kidney Dis*, 2008,52(1):29-38.
- [24] Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N, *et al.* Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study[J]. *Circulation*, 2007, 116 (25): 2 933 -

2 943.

- [25] 王舜尧,陈爱民. 睡眠障碍对老年单纯收缩期高血压的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2008,24(7):1 176-1 177.
- [26] 刘建红,梁大华,韦彩周,等. 广西地区打鼾人群血压状况分析 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2007,30(5):347-351.
- [27] Dart RA, Gregoire JR, Guterman DD, *et al.* The association of hypertension and secondary cardiovascular disease with sleep-disordered breathing[J]. *Chest*, 2003,123(1):244-260.

(收稿日期:2008-03-12;编辑:张秀峰)