

• 实验研究 •

# 自体成纤维细胞移植治疗声带瘢痕的实验研究

田永胜<sup>1</sup> 关静<sup>2</sup> 李祖飞<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究声带内移植自体成纤维细胞后声带瘢痕的变化特点。方法:对 40 只新西兰大白兔以锐性损伤单侧声带制作声带瘢痕模型后,取自体皮肤组织采用酶消化法培养成纤维细胞。将模型分为实验组及对照组,将培养至第 3 代的成纤维细胞经 CM-DIL 染料标记后注入实验组声带瘢痕周围,1 周后采用荧光显微镜观察成纤维细胞注射后的存活情况,1 个月后进行组织学检查,观察声带瘢痕组织的形态改变,并运用 RT-PCR 方法测定瘢痕声带和移植成纤维细胞声带与正常声带中 I 型、III 型胶原蛋白的表达差异。结果:自体成纤维细胞移植 1 周后可在注射声带内观察到荧光标记细胞,移植 1 个月后,声带瘢痕内胶原蛋白组织结构与正常声带内胶原蛋白组织结构相近,声带瘢痕中 I 型、III 型胶原蛋白表达比例与正常声带组织中的比例相近。结论:自体成纤维细胞移植入声带后可在声带内存活,接受自体成纤维细胞移植后声带瘢痕可恢复至正常声带结构。

**[关键词]** 声带瘢痕;自体成纤维细胞;声带注射喉成形术

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.22.008

**[中图分类号]** R767.4 **[文献标志码]** A

## Experimental study of autologous fibroblast cell transplantation in the treatment of vocal fold scar

TIAN Yongsheng<sup>1</sup> GUAN Jing<sup>2</sup> LI Zufei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, Aerospace Center Hospital, Beijing, 100049, China; <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, General Hospital of Chinese People's Liberation Army)

Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tsh008@hotmail.com

**Abstract Objective:** To study the change characteristics of vocal cords scar after the implantation of autologous fibroblast cells into the vocal cords. **Method:** Forty New Zealand rabbits were used for the production of vocal fold scar model by creating a unilateral vocal fold wounds, we take the skin tissues of each rabbits and cultured them via enzyme digestion method to obtain autologous fibroblast cells. The models were separated into the experimental group and the control group, the third generation fibroblast cells with CM-DIL labeled were then injected into the surrounding area of the vocal fold scar in the experimental group, the survival situation of the injected cells were observed by fluorescence microscopy after 1 week, histological examination was performed after 1 months to observe the morphological changes of vocal fold scar tissues, RT-PCR method was used to measure the expression variation of type I collagen and type III collagen in the vocal cords and the normal vocal cords, respectively. **Result:** After 1 week of autologous fibroblast transplantation into the vocal folds, the fluorescence labeled cells were observed. 1 month after transplantation, the collagen protein in the vocal fold scar tissues was similar to that in the normal vocal folds, the expression of type I collagen and type III collagen in vocal fold scars is similar to those in the normal vocal folds. **Conclusion:** Autologous fibroblast migration into the vocal cords can survive well inside the vocal cords, and the vocal scar can be recovered to normal vocal cord structure after transplantation of autologous fibroblast cells.

**Key words** vocal scar; autologous fibroblast cell; injection laryngoplasty

对声带瘢痕的处理一直是临床难题之一,目前国内外已在临床治疗方面进行了大量的尝试,如直达喉镜下瘢痕切除术、显微喉镜下瘢痕切除术、激光手术、声带内移(注射喉成形术或甲状软骨成形术),但这些方法多只强调恢复声门的大小和外形,追求呼吸功能的保存,未能较好地保存发声功

能<sup>[1]</sup>。近年来声带注射喉成形术(injection laryngoplasty)逐渐得到推广及应用,注射物质主要包括脂肪<sup>[2]</sup>、胶原<sup>[3]</sup>、羟基磷灰石钙<sup>[4]</sup>、透明质酸等<sup>[5-6]</sup>。声带注射喉成形术操作简便易行、创伤小,但由于注射物的提取、筛选、吸收等问题,理想的填充物质及材料有待进一步研发<sup>[7]</sup>。近年来,有学者应用间充质干细胞促进损伤声带的修复再生<sup>[8-9]</sup>,取得了一定疗效。但间充质干细胞的来源及培养均受条件限制,且干细胞在体内分化方向不易控

<sup>1</sup>航天中心医院耳鼻咽喉科(北京,100049)  
<sup>2</sup>解放军总医院耳鼻咽喉头颈外科 解放军耳鼻咽喉研究所  
通信作者:田永胜, E-mail: tsh008@hotmail.com

制。为此,本研究以自体成纤维细胞作为声带植入物,研究成纤维细胞植入声带后声带瘢痕的变化,对成纤维细胞治疗声带瘢痕的可行性进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 模型制作

实验用兔(新西兰大白兔)40只(80侧声带),雌雄不限,年龄3个月,体重2.8~3.2kg,经0°耳内镜检查系统检查喉部形态及声带运动无异常。以5%戊巴比妥钠(1ml/kg)静脉注射麻醉后于0°耳内镜下行右侧声带前中部锐性切除,深达声韧带;以左侧声带作为正常对照,观察3个月。

### 1.2 兔皮肤成纤维细胞的分离培养及标记

乙醇局部消毒后,获取实验用兔背部皮肤组织约1mm×1mm,Ⅰ型胶原酶消化后,以含10%胎牛血清及1%双抗的DMEM培养液培养,获得皮肤成纤维细胞。

### 1.3 细胞标记

将培养并传代到第3代成纤维细胞以CM-DIL染料标记。将汇合至80%的第3代细胞以0.25%胰酶消化后稀释成 $1 \times 10^9$ /L,加入CM-DIL溶液,混匀,使细胞悬液含CM-DIL的浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。 $37^\circ\text{C}$ 细胞培养箱孵育2d。

### 1.4 声带注射

将已造模兔子随机分组,对照组10只,实验组30只。实验组接受成纤维细胞注射,对照组不接受注射。以5%戊巴比妥钠(1ml/kg)静脉注射麻醉后,于直径2.7mm的0°耳内镜下将标记好的成纤维细胞注入实验组右侧声带瘢痕部位,达声带肌层(成纤维细胞含量为 $1 \times 10^5$ 个/ml,注射剂量为0.5ml)。

### 1.5 荧光显微镜检查

植入成纤维细胞1周时,自实验组中随机抽取6只兔,以5%戊巴比妥钠(2ml/kg)对实验用兔行静脉注射,快速无痛处死后完整切取喉,沿兔全喉水平面切片,片厚 $3 \mu\text{m}$ 。对注射细胞声带及对侧正常声带分别进行荧光显微镜观察,观察成纤维细胞植入后的存活情况。

### 1.6 组织学观察

植入成纤维细胞后1个月,选取6只实验组及6只对照组实验用兔进行组织学观察。以5%戊巴比妥钠(2ml/kg)对实验用兔静脉注射,快速无痛处死后完整切取喉,沿兔全喉水平面切片,片厚 $3 \mu\text{m}$ ,切片间隔行苏木精-伊红染色和Masson三色法染色。对实验组声带、对照组声带和正常声带分别进行组织学观察。

### 1.7 QRT-PCR方法检测Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白含量mRNA表达比例

植入成纤维细胞后1个月,选取8只实验组及

11只对照组实验用兔进行组织学观察。采用QRT-PCR方法对瘢痕部声带、正常声带、接受成纤维细胞注射治疗后声带内Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白含量mRNA水平表达比例进行定量比较。检测Ⅰ型、Ⅲ型胶原mRNA水平表达;采用Trizol提取组织中的总RNA,样本经试剂盒逆转录为cDNA。Ⅰ型胶原蛋白上游引物序列为5'-CGCTGTTCT-TGCAGTGGTAGG-3',下游引物序列为5'-CT-CAAGAGAAGGCTGGG-3'。Ⅲ型胶原蛋白上游引物序列为5'-CATTGAAATGTGTTTG-GTGGA-3',下游引物序列为5'-TAAACCAAC-CTCTTCCTGAAGC-3'。PCR反应条件:逆转录 $37^\circ\text{C}$ 变性15min, $85^\circ\text{C}$ 退火5s。逆转录为cDNA,行PCR反应。于ABI-7500定量PCR仪(Applied Biosystems美国ABI公司),荧光染料法观察PCR产物,以同一管中目的基因产物和管家基因产物进行数据分析,以此反映其mRNA表达程度变化。

### 1.8 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析最小显著差异法对组间胶原比例差别进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验用兔存活情况

3个月后共有36只实验用兔造模成功,4只实验用兔分别因术后感染及术中窒息死亡。实验组中2只兔因注射成纤维细胞后窒息死亡。

### 2.2 成纤维细胞培养

兔背部皮肤经消化、培养后次日可见到成纤维细胞贴壁生长,并于第6天长满培养板80%,进行传代后顺利传代培养到第3代,CM-DIL染色见细胞染色均匀(图1~2)。

### 2.3 细胞注射后存活情况

荧光显微镜下见注射标记成纤维细胞1周后右侧声带中可见存活的成纤维细胞,成纤维细胞分布于右侧声带前中部(图3)。

### 2.4 成纤维细胞注射后声带瘢痕改变情况

苏木精-伊红染色见接受成纤维细胞注射后,声带瘢痕部胶原纤维形态变为平行,未接受成纤维细胞注射瘢痕组织中胶原纤维成杂乱团状(图4)。Masson三色法染色见瘢痕组织中的胶原纤维排列无规则成乱麻状,接受成纤维细胞移植后的胶原纤维排列规律成线性平行排列(图5)。

### 2.5 声带中胶原蛋白含量变化

经注射成纤维细胞1个月后,实验组中声带Ⅰ型胶原含量较对照组中Ⅰ型胶原含量低,并与正常声带中Ⅰ型胶原含量相近。实验组中Ⅰ型/Ⅲ型胶原比值低于对照组并与正常声带接近(表1,图6)。

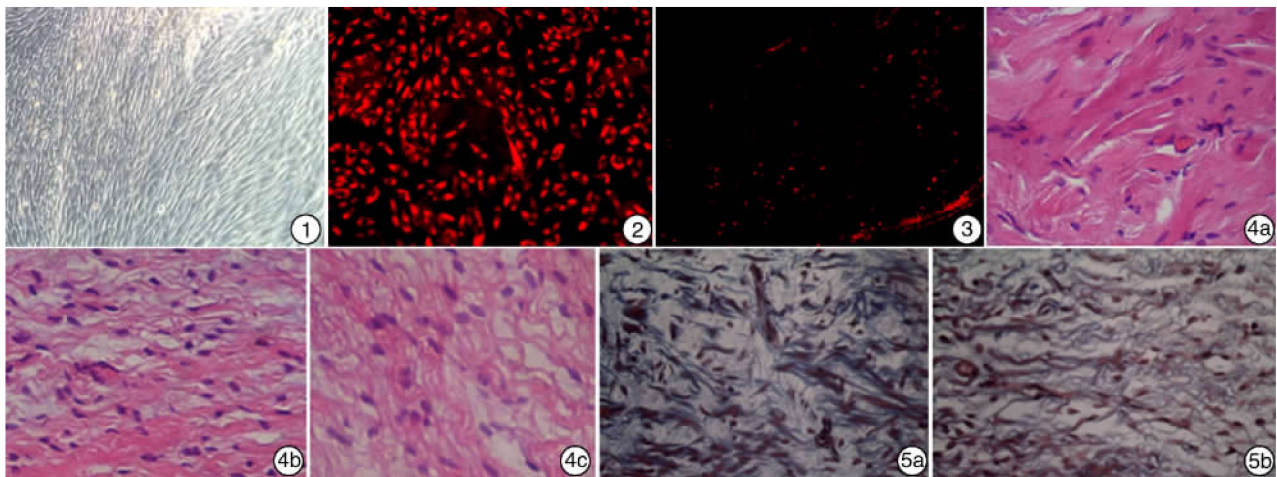
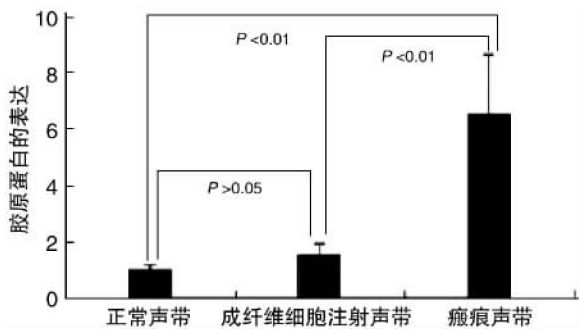


图 1、2 成纤维细胞培养；图 3 成纤维细胞分布于右侧声带前中部；图 4 成纤维细胞注射后声带瘢痕的改变 苏木精-伊红染色 ×40；图 5 Masson 三色法染色

表 1 不同分组中声带组织内 I 型、III 型胶原蛋白表达水平的比较

组别	例数	I 型胶原	III 型胶原	I / III
正常声带	19	0.46 ± 0.23	0.57 ± 0.18	0.80 ± 0.07
实验组	8	1.03 ± 0.25	0.86 ± 0.19	1.19 ± 0.34
对照组	11	1.41 ± 0.27	0.22 ± 0.14	6.40 ± 0.90



成纤维细胞注射后声带中 I 型/III 型胶原蛋白比例与正常声带组织差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 声带瘢痕组织 I 型/III 型胶原蛋白比例高于正常声带及注射成纤维细胞的声带 ( $P < 0.01$ )。

图 6 不同条件下声带中胶原蛋白的表达比例

### 3 讨论

目前多采用干细胞治疗声带缺损,如脂肪干细胞等<sup>[10-11]</sup>,干细胞通过注射植入损伤声带后表现出促进声带细胞外基质分泌、合理分布及有序化排列的功能,还具有促进声带修复再生的作用。但是干细胞取材困难,培养条件要求高,不易推广。与干细胞相比,成纤维细胞具有取材方便、培养条件简单的优点<sup>[12-13]</sup>。近年来,研究发现人体内注射入成纤维细胞后可对皮肤中瘢痕组织的消退产生积极的作用<sup>[14]</sup>。在面部瘢痕周围注射成纤维细胞可以改变瘢痕组织的结构<sup>[15]</sup>。本实验在兔体表皮肤中

培养成纤维细胞取材方便、创伤小,易于生长和应用。

目前认为声带损伤后 3~40 d 可能是介入治疗的关键时期,如能在此时抑制胶原蛋白的沉积,可能会减少损伤后期声带瘢痕的形成<sup>[16]</sup>。研究表明,声带瘢痕在受损第 3 个月时趋于稳定,在声带瘢痕形成过程中,成纤维细胞增生在声带损伤后 3 个月内明显,特别是 3~15 d 内处于极度活跃增生的状态<sup>[17-18]</sup>,3 个月后瘢痕组织趋于稳定。本研究中,在声带损伤 3 个月后,通过注射成纤维细胞,仍然可以改善声带瘢痕组织中胶原蛋白的比例及结构,与文献中报道的皮肤瘢痕中注射成纤维细胞后瘢痕组织发生改变的结果相类似,可能与 3 个月后瘢痕组织中的炎性递质减退并趋于稳定相关。

本研究发现,在声带形成瘢痕后,瘢痕中胶原纤维的形态和比例发生改变。正常声带组织中的胶原纤维位于弹性纤维深层,与弹性纤维交错,呈波浪状排列,分布规则,而声带瘢痕组织中的胶原纤维增多,排列紊乱,呈团状、旋涡状。研究表明,III 型胶原纤维表达主要在伤口愈合的早期,为具有柔韧性的一类胶原,而 I 型胶原纤维主要表现在伤口愈合的晚期,对伤口的抗张力及收缩有重要的作用<sup>[19]</sup>。I 型胶原纤维有很强的张力,其含量决定着组织的僵硬程度。I 型/III 型胶原比值变化可导致组织的顺应性发生改变,I 型/III 型胶原的比值升高,将使组织僵硬并失去弹性,因此 I 型/III 型胶原之

间保持适当数量和比例对维持组织正常结构和功能具有重要意义。本研究中,在声带瘢痕周围注射成纤维细胞后,声带瘢痕中胶原蛋白的组织形态发生了改变并与正常声带组织中的胶原蛋白组织形态相近,同时声带瘢痕中胶原蛋白含量的比例也发生改变,I型/Ⅲ型胶原蛋白的比例恢复至与正常声带组织相近的水平。这种改变表明声带受损3个月时,瘢痕组织虽然已经形成,但在周围环境发生改变时,声带瘢痕中胶原蛋白的组织结构与比例也可以发生改变。

本研究表明,通过在声带瘢痕组织周围注射成纤维细胞可以有效改善声带瘢痕组织的结构。本实验研究了成纤维细胞对受损3个月时声带瘢痕的作用,但对于声带受伤后急性期接受成纤维细胞注射的作用尚需进一步观察及研究。

#### 参考文献

- [1] FRIEDRICH G, DIKKERS F G, ARENS C, et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the Phonosurgery Committee of the European Laryngological Society[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 270: 2491—2507.
- [2] NEUENSCHWANDER M C, SATALOFF R T, ABAZA M M, et al. Management of vocal fold scar with autologous fat implantation: perceptual results[J]. *J Voice*, 2001, 15: 295—304.
- [3] MARTÍNEZ ARIAS A, REMACLE M, LAWSON G. Treatment of vocal fold scar by carbon dioxide laser and collagen injection: retrospective study on 12 patients[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010, 267: 1409—1414.
- [4] CARROLL T L, ROSEN C A. Long-term results of calcium hydroxylapatite for vocal fold augmentation[J]. *Laryngoscope*, 2011, 121: 313—319.
- [5] XINQIAO J, YOON Y, CLIFTON R J, et al. Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 3336—3344.
- [6] GASTON J, THIBEAULT S L. Hyaluronic acid hydrogels for vocal fold wound healing[J]. *Biomatter*, 2013, 3: e23799.
- [7] KING J M, SIMPSON C B. Modern injection augmentation for glottic insufficiency[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 15: 153—158.
- [8] BENGT S, NAGUBOTHU S R, JESSICA C, et al. Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of vocal folds after scar excision—a xenograft analysis[J]. *Laryngoscope*, 2011, 121: 2185—2190.
- [9] VALERIE A, VASSILIKI K, IRINI M, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells in the regeneration of vocal folds: a study on a chronic vocal fold scar[J]. *Stem Cell Int*, 2016, 2016: 9010279.
- [10] NAO H, SHIGERU H, MASANOBU M, et al. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124: E461—E469.
- [11] LIANG Q, LIU S, HAN P, et al. Micronized acellular dermal matrix as an efficient expansion substrate and delivery vehicle of adipose-derived stem cells for vocal fold regeneration[J]. *Laryngoscope*, 2012, 122: 1815—1825.
- [12] CHHETRI D K, BERKE G S. Injection of cultured autologous fibroblasts for human vocal fold scars[J]. *Laryngoscope*, 2011, 121: 785—792.
- [13] CHHETRI D K, HEAD C, REVAZOVA E, et al. Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 131: 864—870.
- [14] LAMME E N, VAN LEEUWEN R T, BRANDSMA K, et al. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation[J]. *J Pathol*, 2000, 190: 595—603.
- [15] WEISS R A, WEISS M A, BEASLEY K L, et al. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial[J]. *Dermatol Surg*, 2007, 33: 263—268.
- [16] HERIS H K, MIRI A K, GHATTAMANENI N R, et al. Microstructural and mechanical characterization of scarred vocal folds[J]. *J Biomech*, 2015, 48: 708—711.
- [17] LING C, YAMASHITA M, ZHANG J, et al. Reactive response of fibrocytes to vocal fold mucosal injury in rat[J]. *Wound Repair Regen*, 2010, 18: 514—523.
- [18] GUGATSCHKA M, KOJIMA T, OHNO S, et al. Recruitment patterns of side population cells during wound healing in rat vocal folds[J]. *Laryngoscope*, 2011, 121: 1662—1627.
- [19] TATEYA T, TATEYA I, SOHN J H, et al. Histological study of acute vocal fold injury in a rat model[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2006, 115: 285—292.

(收稿日期:2016-06-14)