

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00509

聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后乳腺组织免疫应答及细胞增殖的变化

马蕊,陈振雨*,李慧超,任纪祯,张振华

青岛大学医学院附属医院整形美容外科,青岛 266003

[摘要] **目的:**探讨长期聚丙烯酰胺水凝胶(PAAHG)注射隆乳患者术后乳腺组织免疫应答及细胞增殖的变化。**方法:**应用免疫组化法检测10例正常乳腺组织,12例无硬结及20例有硬结的注射式隆乳术后患者乳腺组织中CD68、CD25和PCNA的表达情况,结合常规H-E染色切片进行分析。**结果:**应用亲水性PAAHG注射隆乳术后3~8年,凝胶周围乳腺组织有不同程度的纤维组织增生,并出现炎性细胞及异物巨细胞浸润。CD68、PCNA和CD25阳性细胞极少见于正常乳腺组织中,应用亲水性PAAHG注射隆乳术后,凝胶周围乳腺组织中CD68、PCNA阳性细胞的数目增多,其中有乳房硬结的乳腺组织中CD68、PCNA阳性细胞增多更加明显,3组比较差异具有明显统计学意义($P < 0.01$);而CD25阳性细胞数3组比较无统计学差异。**结论:**亲水性PAAHG长期植入人体后局部可引起一定程度的免疫应答反应及促进细胞增殖。

[关键词] 聚丙烯酰胺水凝胶;乳腺;CD68;CD25;PCNA;细胞增殖

[中图分类号] R 655.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0509-05

Change of immunological response and cell proliferation in breast augmented by polyacrylamide hydrogel injection

MA Rui, CHEN Zhen-yu*, LI Hui-chao, REN Ji-zhen, ZHANG Zhen-hua

Department of Plastic and Cosmetic Surgery, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the change of immunological response and cell proliferation in breast tissues augmented by polyacrylamide hydrogel injection (PHI). **Methods:** The expression of CD68, CD25 and PCNA in 20 breast tissues with indurations, 12 without indurations after breast augmentation by PHI, and 10 normal breast tissues was examined by immunohistochemistry P-V6000; analysis was also done by H-E staining. **Results:** Hyperplasia of fibrous tissue and infiltration of inflammatory cells and macrophages were found in the breast and adjacent tissues 3-8 years after PHI. Positive cells of CD68, CD25 and PCNA hardly existed in the normal tissues, but the breast tissues around the polyacrylamide hydrogel had many positive cells of CD68 and PCNA, especially in cases with indurations; there were significant differences between the 3 groups ($P < 0.01$); and the numbers of cells positive of CD25 were similar between the 3 groups. **Conclusion:** Long-term implantation of polyacrylamide hydrogel can cause immunological reaction and cell proliferation in the local adjacent tissues.

[KEY WORDS] polyacrylamide hydrogel; mammary glands; CD68; PCNA; CD25; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 509-513]

聚丙烯酰胺水凝胶(polyacrylamide hydrogel, PAAHG, 商品名 Interfall-乌克兰, Aquamid-丹麦, Amazing-中国)是一种人体软组织填充剂,为均质无色透明的胶状物质,pH为7.0~8.5,是由丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺经聚合交联而成的网状结构多聚体^[1]。PAAHG于1993年在乌克兰首先正式应用于临床,1995年获得俄罗斯等前苏联加盟共和国的应用。德国、法国、意大利等部分欧洲国家报道Aquamid(雅得媚)用于面部填充回访1~2年效果良好,未发现严重并发症,患者满意率高于

93%^[2-5];韩国也有该产品用于声门闭合不全填充的报道^[6]。

我国于1997年开始应用该产品,在临床实践中却发现受注射者出现不同程度的局部不良反应,其并发症总发生率为6.47%^[7],且PAAHG植入术后仅能取出部分水凝胶,难以完全取净。现虽已全面禁止使用,但对于注射物不能取净仍有少量遗留体内的患者及短期效果良好无任何不良反应的小部分人群,其长期滞留体内对人体有无伤害尚不清楚。基于国内外同类注射产品术后随访时间大多小于2

[收稿日期] 2007-11-28 **[接受日期]** 2008-03-10

[作者简介] 马蕊,硕士生, E-mail: ma_rui2003@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0532-88886261, E-mail: czy_plastic@126.com

年、动物实验的局限性及机体内环境与人类的差异性,本研究选择注射时间大于3年的患者,应用免疫组化染色检测不同组别乳腺及其周围组织中CD68、CD25和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达情况,并进行对照分析,以观测亲水性PAAHG长期植入人体后对乳腺及其周围组织免疫应答反应及细胞增殖的影响,为临床诊治相关疾病奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 临床资料 2005年3月至2007年5月收集临床病例共32例,年龄26~34岁,隆乳术后3~8年。其中乳房对称无硬结10例,生育后哺乳期感染无硬结2例,乳房不对称+硬结10例,乳房对称+硬结10例。患者根据临床查体、B超及手术中所见其乳腺组织中有无硬结分为2组:无硬结组12例和有硬结组20例。取同期我院乳腺中心乳房诊断性穿刺结果阴性的正常乳腺组织10例作为对照。

1.2 主要试剂 鼠抗PCNA单克隆抗体、兔抗人CD68单克隆抗体、鼠抗人CD25单克隆抗体(抗体工作液浓度均为1:100)由青岛宏达通生物技术有限公司提供,P-V6000试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。

1.3 手术方法 于乳房下皱襞做小切口,切除注射物团块(包括有硬结和无硬结)及其周围少量组织,置于10%甲醛固定液中,常规石蜡包埋,每例各做5 μ m连续切片4张,分别做H-E染色及CD68、CD25、PCNA免疫组化染色。

1.4 实验方法 免疫组化染色采用P-V6000法:石蜡切片入二甲苯I和二甲苯II中脱蜡各5min;无水乙醇洗去二甲苯1min;95%、90%、85%梯度乙醇脱蜡,各1min;3% H₂O₂去离子水室温孵育5~10min,以消除内源性过氧化物酶;蒸馏水冲洗,PBS浸泡5min;抗原修复:0.01 mol/L pH 6.0的柠檬酸缓冲液,用微波高档加热至96℃左右约1~2min,并将切片移入修复液中,微波四档加热96℃,20min,取出自然冷却至室温;PBS冲洗1.5min \times 5次;滴加封闭用正常山羊血清工作液室温孵育10~15min,倾去,勿洗;分别滴加一抗(鼠抗PCNA单克隆抗体、兔抗人CD68单克隆抗体、鼠抗人CD25单克隆抗体),4℃湿盒过夜;PBS冲洗1.5min \times 5次;滴加生物素标记的二抗工作液,37℃孵育10~15min;PBS冲洗1.5min \times 5次;滴加0.05%二氨基联苯胺(diaminomen zidenen, DAB),室温显色,自来水冲洗终止反应;Mayer苏木精复染1min;水洗,盐酸乙醇脱色;水洗;脱水、透明;中性树胶封片;显微镜观

察。

1.5 结果判定 每张切片在高倍显微镜下随机选择5个视野(阳性细胞染色清晰,背景染色很低),计算每个视野阳性细胞数,取平均值作为该标本的阳性细胞数。CD68阳性细胞:以胞质中有棕黄色或棕红色颗粒状物者为CD68阳性细胞。CD25阳性细胞:阳性表达定位于细胞膜,被染成棕黄色,胞质无着色,细胞核呈淡蓝染。PCNA阳性细胞:阳性产物定位于细胞核,细胞核被染成棕黄色,胞质无着色。

1.6 统计学处理 实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用SPSS 12.0统计软件,组间比较采用单因素方差分析,实验组两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 H-E染色结果 隆乳术后切片结果(图1):光镜下可见大片被淡紫蓝染的聚丙烯酰胺水凝胶,其周围有不同程度的纤维组织增生,小血管扩张;并出现炎性细胞、淋巴细胞、浆细胞等。注射时间短者其纤维组织增生较注射时间长者轻。



图1 有硬结组H-E染色结果

Fig 1 H-E staining in induration group

Polyacrylamide hydrogel can be seen and large quantity of proliferated fiber tissue was scattered, including inflammatory cells infiltration and a few blood cells. Original magnification: $\times 100$

2.2 免疫组化染色结果 CD68表达:CD68阳性表达定位于胞质,以胞质中有棕黄色或棕红色颗粒状物者为CD68阳性细胞。正常乳腺组织中仅见极少量CD68阳性细胞,应用PAAHG隆乳术后无硬结组可见少量的CD68阳性细胞,而有硬结组CD68阳性细胞数量增多(图2A)。

PCNA表达:PCNA阳性表达定位于细胞核,细胞核被染成棕黄色,胞质无着色,成颗粒状或弥散散在。正常乳腺组织中仅见极少量PCNA阳性细胞,应用聚丙烯酰胺水凝胶隆乳术后无硬结组可见少量

PCNA 阳性细胞,而有硬结组可见多量的 PCNA 阳性细胞(图 2B)。

CD25 表达:CD25 阳性表达定位于细胞膜,细胞膜被染成棕黄色,胞质无着色,细胞核淡蓝染,散在分

布于组织中。正常乳腺组织中仅见极少量 CD25 阳性细胞,在应用聚丙烯酰胺水凝胶隆乳术后无硬结组、有硬结组均可见少量 CD25 阳性细胞(图 2C)。

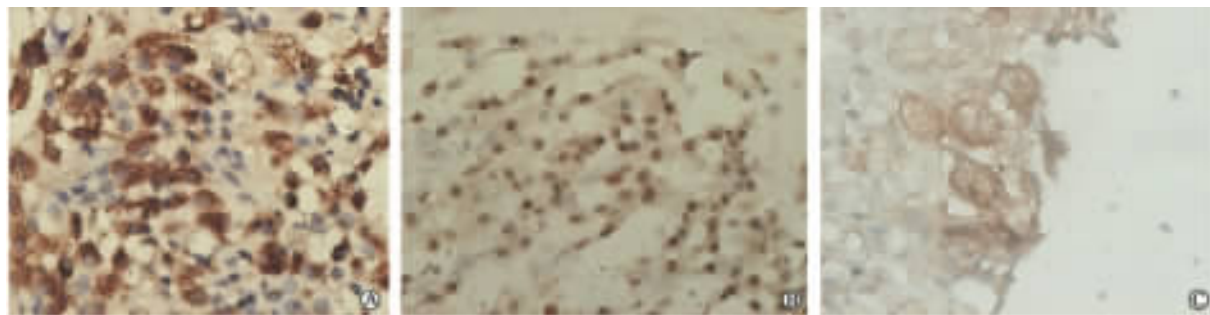


图 2 有硬结组乳腺组织 CD68(A)、PCNA(B)、CD25 (C) 免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistological evaluation of CD68(A), PCNA(B), and CD25(C) in induration group

A: Many CD68 positive cells (brown-yellow) can be seen; deep stained, enlarged and widely distributed; B: Many PCNA positive cells can be seen (dark brown); C: Sporadic CD25 positive cells can be seen, with light-blue nuclei, non-stained cytoplasm and brown-yellow membrane. Original magnification: $\times 400$

2.3 阳性细胞计数结果 各组 CD68、CD25、PCNA 阳性细胞数如表 1 所示。各组间 CD68 阳性细胞数总体比较差异有统计学意义,组间两两比较差异均有显著统计学意义($P < 0.01$);各组 PCNA 阳

性细胞数总体比较差异有统计学意义,组间两两比较差异均有显著统计学意义($P < 0.01$);各组 CD25 阳性细胞数总体比较、组间两两比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组标本 CD68、PCNA、CD25 阳性细胞计数比较
Tab 1 Comparison of CD68, PCNA and CD25 positive cells

Group	<i>n</i>	CD68 ⁺	PCNA ⁺	CD25 ⁺
Control	10	11.5 ± 2.80	0.25 ± 0.40	0.64 ± 0.68
PAAHG injection without induration	12	162.3 ± 23.90 **	3.20 ± 0.50 **	1.23 ± 0.73
PAAHG injection with induration	20	232.20 ± 15.40 ** $\Delta\Delta$	10.20 ± 1.50 ** $\Delta\Delta$	1.36 ± 0.86

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs PAAHG injection without indurations

3 讨论

PAAHG 作为人体软组织填充材料,曾较为广泛地应用于整形美容外科^[1,8],但随着受注射者的增加及注射时间的推移,其并发症逐渐显现,包括乳房注射后疼痛、硬结、包块、影响月经周期,面部填充后局部组织感染、破溃、肉芽增生、坏死,面瘫等^[9-12],并且越来越突出,影响范围越来越广,以至于关于 PAAHG 注射后的诊断以及取出方法成为国内一时的研究热点^[13-17]。2006 年 4 月 30 日国家食品药品监督管理局以“聚丙烯酰胺水凝胶(注射用)不能保证使用中的安全性”禁止生产与使用该产品。Leung 等^[18]对 8 例 PAAHG 注射隆乳患者术后随访研究发现,注射物可导致乳房硬结与炎症,镜下表现

为纤维增生、外周小体形成与局部炎症。中国医疗器械中心与国家药品监督管理局进行离体细胞实验亦证实 PAAHG 可以影响原癌基因 c-Myc mRNA 表达,抑制成纤维细胞生长,引起成纤维细胞坏死,甚至改变细胞的大小、颗粒性等物理性状^[19]。

本研究发现应用 PAAHG 注射式隆乳术后,凝胶周围乳腺组织有不同程度的纤维组织增生,小血管扩张,并出现炎性细胞、淋巴细胞、浆细胞等浸润,部分区域可见异物巨细胞,其中有硬结组比无硬结组炎症反应重,增生更明显。

CD68 是巨噬细胞的表面抗原,主要表达在单核-巨噬细胞,而巨噬细胞是体内众多炎性介质和细胞因子的主要来源^[20],在某些自身免疫性疾病和肿瘤病变中表达明显增高。本研究发现 CD68 极少见

于正常乳腺组织中,而在 PAAHG 注射隆乳术后乳腺组织中明显高表达,其中有硬结组增多更明显,提示注射隆乳术后,乳腺及其周围组织中炎性免疫反应活跃。进一步研究发现 CD68 表达的强弱与注射后时间没有相关性提示这种免疫活跃并不一定随时间延长而衰减。

CD4⁺CD25⁺T 细胞是近年来才被认识的一类免疫调节细胞^[21],在胸腺中产生,主要发挥抑制性免疫调节功能。细胞表面表达 IL-2 受体 α 链,即 CD25,是一种相对分子质量为 55 000 的单链糖蛋白,是 T 细胞活化的重要标志,可作为机体免疫状态评价的一项指标^[22]。CD25 的高表达提示机体免疫处于紊乱或亚紊乱状态^[23]。本研究结果显示:PAAHG 隆乳术后患者乳腺组织内 CD25 表达水平与注射后时间、有无硬结等无明显相关,与正常乳腺组织对比差异无统计学意义,结合本实验 CD68 的表达结果提示机体局部组织虽有活跃的免疫反应,但并无严重的细胞免疫功能紊乱。

增殖细胞核抗原 PCNA 是反映细胞增殖状态的特异性核抗原,是 DNA 聚合酶的一种辅助蛋白,对 DNA 的调节起着重要作用,PCNA 的增多,DNA 合成量也增多^[24]。因此其在细胞核内阳性表达的高低与细胞增殖活性密切相关,是一种准确、简便、直观评价细胞增殖状态的重要指标^[25-26]。本研究发现 PAAHG 注射式隆乳术后 PCNA 表达明显增高,尤以有硬结组为甚,提示硬结的形成可能与注射物刺激 PCNA 高表达、从而导致周围细胞的过度增生有关。

本实验证实亲水性 PAAHG 长期植入人体组织后可以引起周围组织中炎性免疫反应活跃,诱导周围细胞的过度增生,且免疫反应的活跃并未随时间延长而衰减。

[参考文献]

- [1] 麦慧. 聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后并发症的原因分析及处理[J]. 中华整形外科杂志, 2006, 22: 276-278.
- [2] von Buelow S, von Heimburg D, Pallua N. Efficacy and safety of polyacrylamide hydrogel for facial soft-tissue augmentation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2005, 116: 1137-1146.
- [3] Môle B. Lasting treatment of facial HIV and non HIV lipotrophies through the use of SAM GoreTex malar implants and polyacrylamide hydrogel filler Eutrophill. About 90 consecutive cases[J]. *Ann Chir Plast Esthet*, 2006, 51: 129-141.
- [4] von Buelow S, Pallua N. Efficacy and safety of polyacrylamide hydrogel for facial soft-tissue augmentation in a 2-year follow-up: a prospective multicenter study for evaluation of safety and aesthetic results in 101 patients[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 118(3 Suppl): 85S-91S.
- [5] De Santis G, Jacob V, Baccarani A, Pedone A, Pinelli M, Spaggiari A, et al. Polyacrylamide hydrogel injection in the management of human immunodeficiency virus-related facial lipotrophy: a 2-year clinical experience[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 121: 644-653.
- [6] Lee S W, Son Y I, Kim C H, Lee J Y, Kim S C, Koh Y W. Voice outcomes of polyacrylamide hydrogel injection laryngoplasty [J]. *Laryngoscope*, 2007, 117: 1871-1875.
- [7] 吴婷, 罗晓敏, 王波, 朱成斌, 詹思延. 医用聚丙烯酰胺水凝胶软组织充填术随访研究的系统综述[J]. *药物警戒*, 2006, 3: 93-99.
- [8] 谢沛标, 时安平. 聚丙烯酰胺水凝胶在隆乳术中的应用[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22: 648-649.
- [9] 胡华新, 刘学军, 朱辉, 龚连梅, 李震. 聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳不良反应的临床观察[J]. *中华整形外科杂志*, 2002, 18: 81-82.
- [10] 康深松, 张正文, 丑海燕, 翟宏峰. 聚丙烯酰胺水凝胶面部注射术并发症分析[J]. *中华整形外科杂志*, 2003, 19: 325-327.
- [11] 刘勇, 岑瑛, 许学文, 段伟强. 聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术并发症 23 例分析[J]. *中华整形外科杂志*, 2005, 21: 464-466.
- [12] 孙宝东, 乔群, 岳颖, 赵茹, 孙家明, 戚可名. 聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后并发症的处理[J]. *中华整形外科杂志*, 2004, 20: 200-202.
- [13] 岳颖, 乔群, 牛春红, 吴意光, 刘志飞, 耿学琴. 超声影像在聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后并发症处理中的应用[J]. *中华整形外科杂志*, 2003, 19: 334-336.
- [14] 徐丽莹, 孔祥泉, 张一鸣, 徐海波, 刘定西, 于群, 等. 聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后 MRI 诊断价值[J]. *中华整形外科杂志*, 2004, 20: 197-199.
- [15] 王先成, 乔群, 孙家明, 赵茹, 刘志飞, 王阳, 等. 经乳晕切口处理聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后并发症[J]. *中华整形外科杂志*, 2005, 21: 332-334.
- [16] 唐庆, 苏爱云, 古健, 程钢, 刘祥厦, 于国中. 内窥镜辅助清除聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后异物并一期假体置入[J]. *中华整形外科杂志*, 2006, 22: 183-185.
- [17] 陈伟华, 王琳, 吕远东, 刁志勇, 尚勇, 玉光哲. 双平面法隆乳术治疗聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳术后并发症[J]. *中华整形外科杂志*, 2006, 22: 424-426.
- [18] Leung K M, Yeoh G P, Chan K W. Breast pathology in complications associated with polyacrylamide hydrogel (PAAG) mammoplasty[J]. *Hong Kong Med J*, 2007, 13: 1337-1340.
- [19] Xi T F, Fan C X, Feng X M, Wan Z Y, Wang C R, Chou L L. Cytotoxicity and altered c-myc gene expression by medical polyacrylamide hydrogel[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 78: 283-290.
- [20] 朱胜华, 熊卫红. CD68 及 IGF-1 在鼻息肉中的表达及其意义[J]. *医学临床研究*, 2006, 23: 565-567.
- [21] 蒋启发, 谢荣华. CD4⁺CD25⁺T 细胞研究新进展[J]. *实用预防医学*, 2007, 14: 249-252.
- [22] Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface bound transforming growth factor beta[J]. *J Exp Med*, 2001, 194: 629-644.
- [23] Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettgenberg A, Knop J, Enk A H. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood[J]. *J Exp Med*, 2001, 193: 1285-1294.
- [24] Ueda Y, Kanazawa S, Kitaoka T, Dake Y, Ohira A, Ouertani A M, et al. Immunohistochemical study of p53, p21 and PCNA in pterygium [J]. *Acta Histochem*, 2001, 103: 159-165.

- [25] 颜美荣,李正贤,刘庚勋,周一鸣,彭昌福,王芳. PCNA, Bcl-2 和 Bax 在翼状胬肉中的表达及其意义[J]. 临床军医杂志, 2007, 35: 180-182.
- [26] 晏培松,鲁开化,晏伟,王映梅,雷永红,张阳,等. 聚丙烯酰

胺水凝胶注入兔体后组织病理学与免疫组化的动态观察[J]. 中国美容整形外科杂志, 2006, 17: 395-398.

[本文编辑] 曹静