

· 论 著 ·

血管内皮生长因子抗体靶向血管治疗对增生性瘢痕 I 型胶原蛋白表达的影响



岳毅刚 蒋常文 李佩英 周思

【摘要】 目的 观察血管内皮生长因子(VEGF)抗体靶向血管治疗对人增生性瘢痕 I 型胶原蛋白在裸鼠体内表达的影响。 方法 将 1% TBSA 深 II 度创面愈合后的增生性瘢痕组织块(取自 1 例女性烧伤患者)植入 48 只 BALA/C 裸鼠肩胛部皮下,建立裸鼠增生性瘢痕移植模型。术后 3 周,将裸鼠分为大剂量组、中剂量组、小剂量组及对照组,每组 12 只,分别用 0.01 mol/L 灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)稀释的 15、10、5 μg/ml VEGF 单克隆抗体 200 μl 以及等量、同浓度的 PBS 进行瘢痕内直接注射,每周 2 次,持续 3 周。术后 45 d,测量各组裸鼠瘢痕组织的大小,计算体积;以 HE 染色行组织学观察;采用逆转录聚合酶链反应与蛋白质印迹法分析瘢痕组织 I 型前胶原蛋白 mRNA 和 I 型胶原蛋白的表达。 结果 大剂量组、中剂量组、小剂量组瘢痕体积分别为(55.3 ± 4.1)、(67.9 ± 5.7)、(78.9 ± 5.5) mm³;与对照组(85.0 ± 7.3) mm³ 比较,大剂量组、中剂量组瘢痕体积明显变小(P < 0.05)。大剂量组、中剂量组血管和成纤维细胞较少,胶原纤维减少,排列较整齐。与对照组比较,大剂量组和中剂量组 I 型前胶原蛋白 mRNA 和 I 型胶原蛋白表达明显降低;小剂量组与之接近。 结论 VEGF 抗体靶向血管治疗可抑制增生性瘢痕血管形成、胶原表达及瘢痕生长。

【关键词】 血管内皮生长因子类; 胶原 I 型; 靶向血管治疗; 增生性瘢痕

Influence of the VEGF antibody targeted vascular therapy on the expression of collagen type I in hyperplastic scar YUE Yi-gang*, JIANG Chang-wen, LI Pei-ying, ZHOU Si. *Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital to Guilin Medical College, Guilin 541001, P. R. China

Corresponding author: YUE Yi-gang, Email: y. y. g@263. net, Tel: 0773 - 2824369

【Abstract】 Objective To investigate the influence of the vascular endothelial growth factor(VEGF) antibody targeted vascular therapy on the expression of human collagen type I in hyperplastic scar of nude mice. **Methods** The hyperplastic scar from one femal burn patient with 1% TBSA deep-partial thickness burns were implanted into subcutaneous skin of scapular region of 48 nude mice. Three weeks later, the nude mice were divide into large dose (LA), medium dose (MD), small dose (SD) and control groups, with 12 mice in each group. The mice in LA, MD and SD groups were injected with 200 μl of 15, 10, 5 μg/ml VEGF monoclonal antibody diluted in 0.01 mol/L PBS, respectively in the scar twice a week for 3 weeks, while those in C group were injected with equal amount of 0.01 mol/L PBS. The area and volume of the scar in each group were calculated and histological changes were observed, and the expression of collagen type I mRNA and its protein in each group were determined 3 days after treatment. **Results** The volume of scar in LA, MD, SD and C groups were (55.3 ± 4.1, 67.9 ± 5.7, 78.9 ± 5.5, 85.0 ± 7.3) mm³, respectively. Compared with that in C group, the volume of the scar were significantly decreased in AD and MD groups (P < 0.05). A few number of vessels and fibroblasts were observed in LD, MD groups, with decreased number of collagen fibers arranged in order. Compared with that in C group, The expression of procollagen type I mRNA and its protein in C group was obviously higher than those in LD and MD groups (P < 0.05), but it was similar to those in SD group. **Conclusion** VEGF targeted vascular therapy is beneficial for the inhibition of the angiopoiesis of hyperplastic scar, the expression of collagen, and the growth of scar.

【Key words】 Vascular endothelial growth factors; Collagen type I; Endothelial cell-targeted therapy; Hypertrophic scar

基金项目:广西科学基金资助项目(0339078)

作者单位:541001 广西壮族自治区桂林医学院附属医院整形外科(岳毅刚);桂林医学院解剖学教研室(蒋常文、李佩英、周思)

通信(讯)作者:岳毅刚, Email: y. y. g@263. net, 电话:0773 - 2824369

随着研究的不断深入,人们对增生性瘢痕形成的分子机制有了新的认识,认为它的形成与其内新生血管形成及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等细胞因子过量表达有关。

VEGF 可促进瘢痕血管的生成,进而引起成纤维细胞的增殖和胶原的形成。为此,本研究以 VEGF 为靶点,用其抗体对增生性瘢痕进行靶向血管治疗,旨在为增生性瘢痕的治疗提供一条新的途径。

材料与方法

1. 主要试剂: VEGF 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; I 型胶原蛋白多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; Trizol 及 PCR 试剂购自美国 Promega 公司; RPMI 1640 培养基购自美国 Sigma 公司。

2. 增生性瘢痕移植模型的制备: 无菌条件下,取 1 例烧伤患者(女, 35 岁, 1% TBSA 深 II 度烧伤, 患者知情同意)创面愈合后 6 个月的增生性瘢痕组织, 去除脂肪, 切成 8.0 mm × 5.0 mm × 3.5 mm 的组织块, 置于预冷的 RPMI 1640 培养基(含青霉素、链霉素各 100 U/ml)中培养。无菌条件下, 在 48 只 BALB/C 裸鼠(中国医学科学院实验动物研究所)肩胛皮肤做一小切口, 将瘢痕组织块移植于皮下, 缝合皮肤建立裸鼠增生性瘢痕移植模型。术后 3 周, 将裸鼠分为大剂量组、中剂量组、小剂量组及对照组, 每组 12 只, 分别用 0.01 mol/L 灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)稀释的 15、10、5 μg/ml VEGF 单克隆抗体 200 μl 以及等量的 0.01 mol/L PBS 进行瘢痕内注射, 每周 2 次, 持续 3 周, 完成治疗后第 3 天取材。

3. 大体情况及组织学观察: 术后 3 周及 45 d(完成治疗后第 3 天)取各组裸鼠瘢痕组织, 用游标卡尺直接测量其最大直径 a 和最小直径 b, 按公式 $V = ab^2/2$ 计算其体积, 并进行大体观察。术后 45 d 的瘢痕组织经 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规石蜡切片(厚度为 5 μm), 脱蜡至水, HE 染色, 常规脱水、透明、封片后, 于光学显微镜下观察。

4. 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 I 型前胶原蛋白 mRNA 的表达: (1)引物设计: 应用 Premier 5.0 软件设计引物, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。I 型前胶原蛋白上游引物为: 5'-CCTAGCAACATGCCAATC-3', 下游引物为: 5'-CA-AAGTCCCACCGAGA-3', 扩增产物长度为 179 bp; β 肌动蛋白上游引物为: 5'-GTGGACATCCGAA-AGAC-3', 下游引物为: 5'-AAAGGGTGAACGCAAC-TAA-3', 扩增产物长度为 382 bp。(2)RNA 提取与 cDNA 合成: 取各组瘢痕组织, 按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 取 2 μg 细胞总 RNA 为模板逆

转录合成 cDNA。反应条件为: 42 °C 逆转录 30 min, 95 °C 5 min 灭活鸟类成髓细胞性白血病病毒逆转录酶。(3)PCR 反应: 取 2 μl 逆转录产物, 以 β 肌动蛋白为内参照进行 PCR 扩增。条件为 95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 40 s、54 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 40 s, 共 30 个循环, 72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果、照相, 用凝胶图像分析系统分析结果, 分别计算各组条带与 β 肌动蛋白的吸光度(A)值的比值, 表示目的基因 mRNA 表达的相对水平。

5. 采用蛋白质印迹法检测 I 型胶原蛋白的表达: 取各组瘢痕组织在冰上提取蛋白, 应用考马斯亮蓝 G250 试剂盒, 每孔加入 50 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将靶蛋白从凝胶转移至硝酸纤维素(NC)膜, 进行丽春红染色, 根据蛋白 marker 确定转膜效果及靶蛋白的位置。NC 膜在 50 g/L 脱脂奶中封闭 1 h, 每平方厘米 NC 膜加入兔抗 I 型胶原蛋白(1:200)0.1 ml, 4 °C 静置过夜。然后与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体于 37 °C 下孵育 1 h, 利用化学发光法进行显色反应, 观察结果。

6. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

结 果

1. 大体情况观察: 各组裸鼠移植后瘢痕全部成活, 能触到凸起、质硬的瘢痕, 无消瘦、精神萎靡、食欲减退、行动迟缓等不良反应。注射 VEGF 单克隆抗体后, 局部未出现红肿、糜烂、化脓、坏死等现象。各组裸鼠瘢痕体积变化见表 1。

表 1 各组裸鼠瘢痕组织体积变化(mm^3 , $\bar{x} \pm s$)

组别	组织块数(块)	术后 3 周	术后 45 d
对照组	12	140.2 ± 0.8	85.0 ± 7.3
小剂量组	12	140.3 ± 0.4	78.9 ± 5.5
中剂量组	12	140.6 ± 0.4	67.9 ± 5.7*
大剂量组	12	140.3 ± 0.6	55.3 ± 4.1*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2. 组织学观察: 术后 45 d 各组裸鼠瘢痕组织外周均有一层纤维结缔组织包膜包裹。大剂量组、中剂量组瘢痕组织内血管、成纤维细胞较少, 胶原纤维较少呈淡红色、稀疏、排列整齐(图 1, 2)。小剂量组瘢痕组织成纤维细胞较多, 胶原纤维较多呈淡红色、排列较为紊乱(图 3)。对照组的瘢痕组织内有大量成纤维细胞, 贴近包膜处有大量血管, 血管内可见染成红色的红细胞, 胶原纤维较多呈淡红色、粗大、漩涡状排列, 细胞核呈蓝黑色(图 4)。



图1 大剂量组瘢痕组织内成纤维细胞多,胶原纤维排列整齐 HE×200

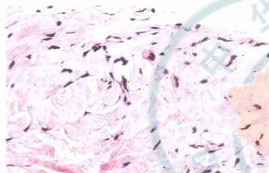


图2 中剂量组瘢痕组织内成纤维细胞较少,胶原纤维排列整齐 HE×200

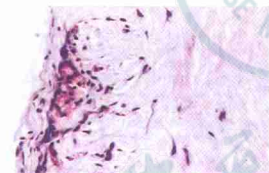


图3 小剂量组瘢痕组织内包裹下可见较多纤维细胞,胶原纤维排列较紊乱 HE×200

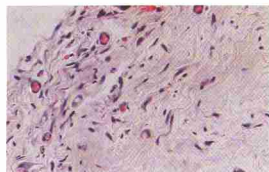


图4 对照组瘢痕组织内可见大量成纤维细胞,近包膜处有大单核细胞浸润成暗紫红色,胶原纤维呈漩涡状排列 HE×200

3. I型前胶原蛋白 mRNA 表达:382,179 bp 处分别可见 β 肌动蛋白和 I 型前胶原蛋白的电泳条带(图5)。大剂量组、中剂量组、小剂量组及对照组 I 型前胶原蛋白 mRNA 表达水平分别为 0.54 ± 0.09 、 0.82 ± 0.08 、 1.56 ± 0.18 和 1.69 ± 0.17 。前两者与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而小剂量组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

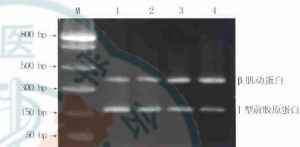


图5 I型前胶原蛋白 mRNA 的表达。M, marker; 1, 对照组; 2, 小剂量组; 3, 中剂量组; 4, 大剂量组

4. I型胶原蛋白表达:与对照组比较,大剂量组、中剂量组 I 型胶原蛋白表达降低,大剂量组尤为明显;小剂量组则与之接近。见图6。



图6 I型胶原蛋白的表达。1, 大剂量组; 2, 中剂量组; 3, 小剂量组; 4, 对照组

讨 论

增生性瘢痕是皮肤受到深度烧(创)伤后,以胶原纤维过度沉积为特征的皮肤纤维化疾病。胶原蛋白由成纤维细胞合成,在皮肤中以 I、III 型为主,是细胞外基质中最重要的成分,除自身的生理支持作用外,还可调节细胞的迁移、增殖,是创面愈合和瘢痕形成的关键因素,其异常合成与沉积是许多纤维化疾病的病理基础。增生性瘢痕多为 I 型胶原蛋白,所以应尽量减少其在组织中的含量和比例^[1]。

近年来生长因子在瘢痕形成过程中的作用越来越受到重视。它是一类刺激细胞分裂的生物活性多肽,在创面愈合及瘢痕形成中发挥着非常重要的作用,参与修复细胞的增殖、分化、迁移及血管形成。VEGF 是最重要的促血管生长因子,具有促进血管新生的作用^[2],它与血管内皮细胞上其特异性受体(VEGFR)1 或 VEGFR-2 结合,通过一系列反应改变

内皮细胞通透性,引起血浆蛋白外渗,为血管新生提供基质。VEGF 是血管内皮细胞特异性有丝分裂原,可促进其增殖、分化,同时也可促进内皮细胞的运动、迁移^[3]。人体的许多细胞和部分肿瘤细胞都可以分泌 VEGF,增殖性瘢痕中的 VEGF 主要由角质形成细胞、成纤维细胞产生。正常皮肤只产生少量的 VEGF,在缺血、缺氧、创伤等病理情况下可产生大量 VEGF。研究表明,VEGF 及 VEGFR 在增生性瘢痕中大量表达,且其表达量与瘢痕血管增生程度、瘢痕成熟程度密切相关^[4]。增生性瘢痕组织内血管生长因子的大量表达可能对瘢痕内大量血管的形成起支持作用,较多数量的血管可能为瘢痕提供充足的氧气和养分,以促进瘢痕成纤维细胞合成过量的胶原纤维。促进血管生成的生长因子不但能促进内皮细胞增殖、迁移及黏附,而且能抑制血管内皮细胞的凋亡^[5]。有研究表明,VEGF 有促进血管形成的作用,与增生性瘢痕形成有关^[4,6]。

靶向血管治疗是近 30 年来发展起来的一种治疗肿瘤的新方法,其治疗目的并非直接杀灭肿瘤细胞,而是针对肿瘤血管新生的不同阶段设计特异性药物,作用于肿瘤血管内皮细胞,使肿瘤血管新生受到抑制,甚至使原有血管退缩,引起肿瘤细胞血液供应障碍,达到抑制肿瘤生长和转移的作用^[7,8]。与肿瘤相类似,增生性瘢痕也表现为大量血管存在,某些促血管生长的细胞因子往往过度表达。能否通过抑制血管新生来达到治疗增生性瘢痕是值得研究的课题,有关这方面的研究报道较少。VEGF 有促进血管新生和瘢痕生长的作用,是血管靶向治疗的目的靶点。沈锐等^[9]用 VEGF 抗体对增生性瘢痕动物模型进行靶向血管治疗,取得了一定的疗效。笔者采用裸鼠增生性瘢痕移植模型,以不同浓度的

VEGF 单克隆抗体进行瘢痕内注射治疗,结果显示:与对照组相比,各剂量组瘢痕体积缩小、血管减少,胶原纤维减少且排列整齐,大剂量组尤为明显。由此表明,VEGF 抗体靶向血管治疗通过阻断 VEGF 的作用,可抑制胶原纤维合成和增生性瘢痕生长,具有重要的临床应用价值,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 于冬梅, 陈天新, 吕松岑, 等. 病理性瘢痕中 I、III 型前胶原 mRNA 及胶原蛋白表达与分布的研究. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37:488-490,493.
- 2 Detmar M, Brown LF, Berse B, et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. J Invest Dermatol, 1997, 108:263-268.
- 3 Zhu KQ, Engrav LH, Armendariz R, et al. Changes in VEGF and nitric oxide after deep dermal injury in the female, red Duroc pig-further similarities between female, Duroc scar and human hypertrophic scar. Burns, 2005, 31: 5-10.
- 4 钱利, 赵柏程, 皮立, 等. 瘢痕组织中微血管数和血管生成因子表达的研究. 中国烧伤创疡杂志, 2003, 15:285-289.
- 5 Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. VEGF mediate angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol, 1998, 152: 1445-1452.
- 6 Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction in the rat-angiogenesis and angioma formation. J Am Coll Cardiol, 2000, 35: 1323-1330.
- 7 Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, et al. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. Cancer Detect Prev, 2003, 27: 229-238.
- 8 Franson PJ, Lapka DV. Antivascular endothelial growth factor monoclonal antibody therapy: a promising paradigm in colorectal cancer. Clin J Oncol Nurs, 2005, 9: 55-60.
- 9 沈锐, 利天增, 祁少海, 等. 靶向血管治疗增生性瘢痕的实验研究. 中华整形外科杂志, 2003, 19:254-257.

(收稿日期:2005-12-13)

(本文编辑:莫愚)

读者 · 作者 · 编者

常用医学词语的规范用法

不规范	规范	不规范	规范	不规范	规范
食道	食管	环孢霉素	环孢素	I°肿大	I度肿大
PH	pH	便标本	粪标本	胞浆	胞质
肢肿	肢体肿胀	光密度	吸光度	终浓度	终质量浓度
分子量	相对分子质量	无差异	差异无统计学意义	梗塞	梗死
呼吸梗阻	呼吸道梗阻	胎鼠	子鼠	神萎	神经萎缩
胸片	胸部 X 线片	阿斯匹林	阿司匹林	托马氏	托马