

增生性瘢痕中血管内皮细胞生物学功能的研究

王西樵 陆树良 毛志刚 刘英开



【摘要】 目的 探讨增生性瘢痕中血管内皮细胞的生物学功能及其与瘢痕形成的关系 **方法** 取人增生性瘢痕组织和正常皮肤组织,进行组织学观察。分离和纯化 2 种标本中的血管内皮细胞,应用酶联免疫吸附测定法分别检测单个血管内皮细胞中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、成纤维细胞生长因子 2 (FGF2)、血小板源性生长因子 (PDGF)、内皮素 1 (ET-1) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的水平。**结果** 光学显微镜下可见正常皮肤微血管数目较少;增生性瘢痕微血管数目增多,血管狭长扭曲甚至闭塞。透射电镜可见增生性瘢痕中毛细血管管腔狭窄,有内皮细胞脱落。增生性瘢痕中血管内皮细胞分泌 TGF- β_1 、PDGF、ET-1、VEGF、FGF2 的水平分别为 (60 ± 8)、(30 ± 4)、(0.12 ± 0.03)、(52 ± 5)、(18.1 ± 1.2) $\mu\text{g}/\text{个细胞}$,明显低于正常皮肤 ($P < 0.05$)。**结论** 增生性瘢痕中血管内皮细胞生物学功能减退,可能与瘢痕中胶原的大量产生和缺氧有关。

【关键词】 内皮细胞; 细胞因子类; 瘢痕

Study on the biological function of vascular endothelial cells in the hypertrophic scar WANG Xi-qiao, LU Shu-liang, MAO Zhi-gang, LIU Ying-kai. Department of Burns, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the biological function of vascular endothelial cells from hypertrophic scar, and to analyze the relationship between them. **Methods** The samples from human hypertrophic scar and normal skin tissue were harvested for histological examination. Then vascular endothelial cells were purified and isolated from the samples, and the level of transforming growth factor (TGF) β_1 , platelet driven growth factor (PDGF), endothelin1 (ET)-1, fibroblast growth factor (FGF)2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were determined in a single cell with ELISA. **Results** Few capillary vessels were observed in normal skin under microscope, while an increased number of them were present in hypertrophic scar, with slender, tortuous in morphology and even occluded. The diameter of blood capillary in hypertrophic scar was tiny under electron microscope, and the exfoliation of endothelial cells was observed. The levels of TGF- β_1 , PDGF, ET-1, bFGF and VEGF from vascular endothelial cells from hypertrophic scar were 60 ± 8, 30 ± 4, 0.12 ± 0.03, 52 ± 5, 18.1 ± 1.2 $\mu\text{g}/\text{cell}$, respectively, which were obviously lower than those in normal skin ($P < 0.05$). **Conclusion** The biological function of vascular endothelial cells was attenuated in the hypertrophic scar, which might be the result of the production of large amounts of collagen in the scar tissue, as well as hypoxia.

【Key words】 Endothelial cells; Cytokines; Cicatrix

皮肤组织深度损伤后往往产生增生性瘢痕,其形成机制至今仍不清楚。增生期的瘢痕组织表面颜色鲜红,表明血管增生活跃。在这种活跃的血管增生过程中,血管内皮细胞的功能是否发生变化,而这种变化是否通过生长因子的旁作用,直接或间接地影响成纤维细胞的功能,促进增生性瘢痕的形成?本研究中笔者从瘢痕组织微血管入手,观察血管内皮细胞的生物学功能变化,可能有助于更为全面地认识瘢痕。

1 对象与方法

1.1 标本选择

收集 8 例笔者单位门诊或住院需行手术患者的增生性瘢痕标本,其中男 5 例、女 3 例,年龄 (28 ± 3) 岁。致伤原因:2 例创伤、6 例开水烫伤,均为上肢部位。瘢痕形成时间为伤后 3 个月 ~ 1 年,特征为表面凸起、充血、自觉痒痛不适、有继续增生趋势。同时取门诊包皮环切术患者的包皮标本 8 例,作为正常皮肤对照,其中男 5 例、女 3 例,年龄 (16 ± 3) 岁。所有患者均知情同意。

1.2 组织学观察

收集一部分标本 (约为 1.0 cm × 0.5 cm) 固定

基金项目:国家重点基础研究发展计划 (2005CB522603)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科

在体积分数 10% 甲醛溶液中,1 周内石蜡包埋并于室温保存,切片进行 HE 染色,于图像分析仪(德国 Zeiss 公司)下观察。一部分标本先后经体积分数 2.5% 戊二醛、10 g/L 锇酸固定,再经系列脱水,环氧树脂浸透和包埋,制成 60 nm 超薄切片,经铀、铅双重染色,在 HITACH500 型透射电镜(日本日立公司)下观察,操作电压为 75 kV。余下标本进行细胞分离培养。

1.3 增生性瘢痕和正常皮肤来源的血管内皮细胞中细胞因子的表达

1.3.1 血管内皮细胞的分离和培养 所取标本剪碎后加入 5 g/L I 型胶原酶(美国 Gibco 公司)和 2 g/L 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),置 37 °C 培养箱(含体积分数 5% CO₂)内消化 6 h,过滤洗涤后获得血管内皮细胞和成纤维细胞。加入含微血管生长液(MVGS,美国 Science Biology 公司)、体积分数 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)的 M131 培养液(美国 Science Biology 公司)培养,每 2 天换液 1 次,约 1 周细胞长满培养瓶。以 1.25 g/L 胰蛋白酶消化,再用 CD105 免疫磁珠(德国美天妮公司)纯化血管内皮细胞,离心洗涤后再次加入上述 M131 培养液培养,收集上清液。培养瓶中细胞以磷酸盐缓冲液冲洗 2 次,1.25 g/L 胰蛋白酶消化,离心后重新悬浮,混匀后行细胞计数。

1.3.2 转化生长因子 β₁ (TGF-β₁)、血小板源性生长因子(PDGF)、内皮素 1 (ET-1)、成纤维细胞生长因子 2 (FGF2)和血管内皮生长因子(VEGF)水平的测定 单细胞分泌细胞因子浓度(μg/个细胞) = 上清液中单细胞分泌细胞因子的浓度(μg/ml) × 上清液体积(ml) ÷ 细胞总数(个)。其中上清液中细胞因子浓度的测定,参照双抗体夹心-酶联免疫吸附测定试剂盒(上海森雄生物制剂公司)说明书操作。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SAS 统计软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 组织学观察

2.1.1 光学显微镜观察 正常皮肤微血管和成纤维细胞数目较少,血管壁厚,管腔小,胶原疏松,排列规则(图 1)。增生性瘢痕微血管数量增加、狭长扭曲,血管管壁薄、管腔狭窄,随着病情发展,部分血管塌陷甚至闭塞;成纤维细胞在血管周围分布较多;胶原含量增多,致密盘曲呈结节状,中间细胞稀少。见图 2。

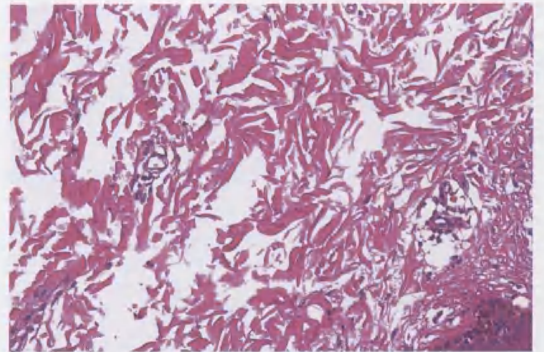


图 1 正常皮肤微血管较少、胶原疏松 HE × 200

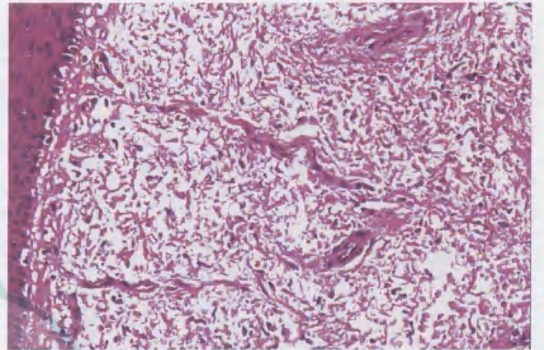


图 2 增生性瘢痕微血管增多,管腔狭窄或闭塞,胶原致密 HE × 200

2.1.2 电镜观察 正常皮肤组织内毛细血管管腔通畅(图 3);增生性瘢痕中毛细血管管腔狭窄,可见脱落的内皮细胞(图 4)。

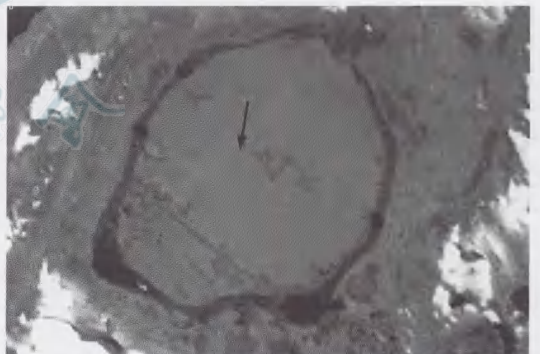


图 3 正常皮肤毛细血管管腔通畅(箭头所示) 透射电镜 × 9700



图 4 增生性瘢痕毛细血管中可见内皮细胞脱落(箭头所示) 透射电镜 × 9700

2.2 血管内皮细胞分泌细胞因子的水平

增生性瘢痕、正常皮肤来源的血管内皮细胞,均能分泌 TGF- β_1 、PDGF、ET-1、VEGF 和 FGF2,两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 增生性瘢痕和正常皮肤血管内皮细胞中细胞因子的表达 ($\mu\text{g}/\text{个细胞}$, $\bar{x} \pm s$)

| 标本来源 | 标本数 | TGF- β_1 | PDGF | ET-1 | VEGF | FGF2 |
|-------|-----|----------------|----------------|-------------------|----------------|------------------|
| 正常皮肤 | 6 | 100 \pm | 59 \pm | 0.33 \pm | 122 \pm | 29.3 \pm |
| | | 7 | 4 | 0.06 | 12 | 6.1 |
| 增生性瘢痕 | 6 | 60 \pm | 30 \pm | 0.12 \pm | 52 \pm | 18.1 \pm |
| | | 8 ^a | 4 ^a | 0.03 ^a | 5 ^a | 1.2 ^a |

注:TGF- β_1 为转化生长因子 β_1 , PDGF 为血小板源性生长因子, ET-1 为内皮素 1, VEGF 为血管内皮生长因子, FGF2 为成纤维细胞生长因子 2; 与正常皮肤比较, a: $P < 0.05$

3 讨论

近来的研究表明,微血管不仅是养分供应者,其内皮细胞还是人体最大、功能异常活跃的内(旁)分泌器官,可以分泌几十种活性物质,参与许多器官和系统的发病过程^[1,2]。创伤修复过程中,血管内皮细胞和成纤维细胞是主要的修复细胞。瘢痕中成纤维细胞功能活跃,推测与其中的血管内皮细胞具有较正常血管内皮细胞更活跃的生物学功能有关,从而导致成纤维细胞的被动激活。

本研究组织学观察结果显示:增生性瘢痕中组织增生活跃,微血管数目和胶原含量增加;但各种生长因子测定结果表明,其血管内皮细胞生物学功能较正常血管内皮细胞减退。

根据瘢痕的病理机制和组织学特点,分析其形成原因为:(1)瘢痕组织内胶原的大量产生和堆积,因机械性挤压作用导致微血管发生狭窄、管腔塌陷甚至闭塞。这种微血管形态和结构的不断改变,最终引起血管内皮细胞功能逐步减退。本研究中光学显微镜观察到微血管这种形态和结构的改变;同时电镜观察到,部分微血管的管腔内出现内皮细胞脱落现象。这些形态学的变化充分说明,微血管和内皮细胞结构发生退行性病变。(2)由于微血管的管腔部分或全部阻塞导致瘢痕组织内缺氧,加重了血管内皮细胞功能的损伤。

Kischer 和 Shetlar^[3]利用电镜观察到,增生性瘢痕组织的微血管内存在大量血管内皮细胞堆积现象,管腔部分或全部阻塞。氧含量测定结果表明,瘢痕皮下组织氧分压只有正常皮肤的 27%^[4]。有文献报道,低氧可进一步促进胶原沉积,加重血管阻塞和缺氧^[5]。

罗向东等^[6]用光学显微镜观察到,体外培养的血管内皮细胞缺氧 1 h,胞核周围出现许多小空泡样变性,是缺氧损伤的典型特征;缺氧 2 h,内皮细胞损伤更加严重。扫描电镜可见细胞收缩和脱落。这些现象说明内皮细胞对缺氧敏感,细胞结构和功能易受损伤。此外,血管内皮细胞功能受损后,血管内容易形成血栓,进一步加重缺氧和内皮细胞损伤。

增生性瘢痕组织内血管内皮细胞生物学功能的减退,归根结底是由于瘢痕内胶原的大量产生和堆积,导致微血管狭窄、闭塞和缺氧。然而,瘢痕发生早期,在胶原尚未堆积的情况下,血管内皮细胞生物学功能如何;它是否在瘢痕发生早期活跃,而在胶原大量产生后逐渐减退?增生性瘢痕形成后内皮细胞功能的减退,是否对成纤维细胞功能产生影响,是否为诱导瘢痕自然成熟的因素之一?诸多疑问目前尚无答案,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, et al. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med*, 2002, 7(3): 213 - 225.
- [2] Lee WH, Hwang TH, Oh GT, et al. Genetic factors associated with endothelial dysfunction affect the early onset of coronary artery disease in Korean males. *Vasc Med*, 2001, 6(2): 103 - 108.
- [3] Kischer CW, Shetlar MR. Microvasculature in hypertrophic scars and the effects of pressure. *J Trauma*, 1979, 19(10): 757 - 764.
- [4] Wakelin SH, Marren P. Aetiology and management of hypertrophic scar and keloids. *Ann R Coll Surg Engl*, 1996, 78(6): 558.
- [5] Chen CP, Yang YC, Su TH, et al. Hypoxia and transforming growth factor-beta 1 act independently to increase extracellular matrix production by placental fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(2): 1083 - 1090.
- [6] 罗向东, 杨宗城, 黎鳌, 等. 缺氧环境对培养的血管内皮细胞的损伤. *中华创伤杂志*, 1996, 12(5): 306 - 308.

(收稿日期: 2006-06-23)

(本文编辑: 莫愚)