

图 4 单光子发射计算机断层摄影显示联合注射组大鼠皮瓣清晰。箭头所示为供血情况

3 讨论

VEGF 结合在微血管内皮细胞的囊-泡小体上,促进生物分子的跨膜转运,以此增加血管通透性,使血管内纤维蛋白原等血浆蛋白外渗。纤维蛋白原与血管外的纤维连接蛋白等多种成分凝结形成交叉的纤维蛋白凝胶体,为内皮细胞、成纤维细胞的迁移提供纤维网络,有利于血管生成。

bFGF 是从牛脑垂体中发现的一种对成纤维细胞具有明显促生长作用的碱性蛋白,对新生血管形成过程中的多个环节如毛细血管基底膜降解、内皮细胞迁移增生、胶原合成、小血管管腔形成等均有明显促进作用。这种促血管生成作用,有可能使皮瓣在转移后较早与受床建立血管网。

联合应用 VEGF 和 bFGF 可以协同促进血管生成,使缺血区快速血管化以达到临床治疗的目的。两者发挥协同作用的可能机制:(1) bFGF 促进了 VEGF 的表达。Seghezzi 等^[1]认为 bFGF 能上调 VEGF 在内皮细胞中的表达。Saadeh 等^[2]观察到随着 bFGF 的增加,VEGF 的表达亦增强,这种剂

量依赖作用是独立的。(2) VEGF 是 bFGF 发挥作用的基础。内皮细胞产生的 VEGF 是 bFGF 诱导血管生成的一种重要“中介”自分泌因子,而且 VEGF 能增强 bFGF 诱导内皮细胞增殖的功能^[1,3]。Ley 等^[4]报道,bFGF 与 VEGF 剂量比值为 3:1 时能产生很强的协同效应。

研究表明,VEGF 在恶性黑色素瘤中过高表达,而在色素痣中不表达^[5]。体外实验表明,过高表达的 VEGF 具有直接促进恶性黑色素瘤细胞增殖的作用^[6]。因此,VEGF 在皮瓣中应用的安全性问题尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries; an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol*, 1998, 141(7):1659-1673.
- [2] Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, et al. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology*, 2000, 141(6): 2075-2083.
- [3] 孙京华, 陈艳艳, 刘常明, 等. b-FGF, VEGF 在碱烧伤大鼠角膜中的表达与新生血管的关系. *眼外伤职业眼病杂志*, 2007, 29(2):81-84.
- [4] Ley CD, Olsen MW, Lund EL, et al. Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay. *Microvasc Res*, 2004, 68(3):161-168.
- [5] 陶娟, 涂亚庭. 恶性黑色素瘤内皮型一氧化氮合酶和血管内皮生长因子的表达. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(10):575-577.
- [6] 陶娟, 涂亚庭. 一氧化氮在血管内皮生长因子诱导恶性黑色素瘤细胞增殖机制中的研究. *中国皮肤性病杂志*, 2004, 18(5): 269-272.

(收稿日期:2007-11-16)

(本文编辑:莫愚)

烧伤患者不同时期增生性瘢痕的透明质酸含量

何晓升 倪有娣 刘茂林 刘苏杭 钟晓春

胎儿创口中富含透明质酸(HA),为正常组织的再生提供了良好的局部环境,可使胎儿无瘢痕愈合。成人伤口愈合时,由于 HA 含量较低,引起瘢痕组织明显增生,有时甚至是肥厚性增生^[1]。本研究选用烧伤患者伤后不同时期的增生性瘢痕组织,观察其 HA 含量的动态变化,旨在为今后用 HA 治疗瘢痕提供参考。

1 对象与方法

1.1 标本取材

选择烧伤后增生性瘢痕患者 29 例,年龄 2~19 岁,瘢痕

形成时间:小于 6 个月 11 例(男 5 例、女 6 例);大于或等于 6 个月,小于 2 年 8 例(男 7 例、女 1 例);大于或等于 2 年 10 例(男 8 例、女 2 例)。留取患者术中切除的瘢痕组织标本,以其术中剩余的腹股沟处正常皮肤标本作为对照,患者或其家属均知情同意。将每块标本分为 3 等份,进行下述检测。

1.2 组织病理学观察

标本用 Bouin 液固定,常规切片,行 HE、胶原纤维(VG)染色,光学显微镜下观察。

1.3 HA 的免疫组织化学分析

将去除皮下组织的标本置于体积分数 10% 甲醛中固定 24 h。乙醇脱水,石蜡包埋,切片(厚 5 μm)。切片用体积分数 3% 过氧化氢处理 10 min,磷酸盐缓冲液清洗,按一抗(HA 结合蛋白)试剂盒(武汉中美科技有限公司)、二抗(与链霉亲和素结合的鼠抗人免疫球蛋白 G)试剂盒(美国 DAKO 公

基金项目:杭州师范大学科研基金(2004XYZ04)

作者单位:310015 杭州市第二人民医院烧伤科

通讯作者:钟晓春,Email:zjhzzxc@163.com,电话:13157125169

司)说明书染色。在光学显微镜下观察染色结果,各视野的染色强度用 DP70 型病理图像分析仪(日本 Olympus 公司,软件由美国 Media Cybernetic 公司提供)进行检测和计算。

1.4 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 HA 含量

每个组织标本称取 0.1 g,加入等渗盐水 1 mL,冰浴下匀浆 3 min(3000 r/min)。收集匀浆液,4 ℃离心,取上清液 100 μL,用 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司)进行检测,按说明书操作。用 MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司)测定各个标本的吸光度值,根据校正曲线计算 HA 含量。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 HE 和 VG 染色

正常皮肤组织真皮中,胶原纤维疏松,呈束状定向排列。3 种增生性瘢痕组织真皮中,胶原纤维排列不规则,呈漩涡状或绳索状,其增厚程度随瘢痕形成时间的延长逐渐减轻。

2.2 免疫组织化学分析和 ELISA 测定

形成时间大于或等于 2 年的瘢痕组织中,HA 含量最高,见图 1,表 1。

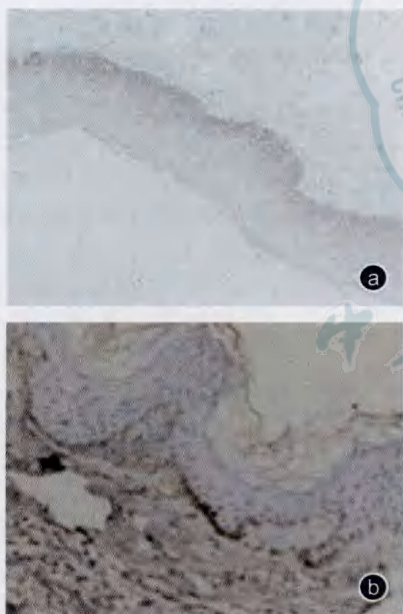


图 1 2 种皮肤组织中透明质酸染色结果 链霉亲和素-生物素复合法 $\times 20$ 。a. 正常皮肤着色较浅;b. 形成时间大于或等于 2 年的瘢痕组织着色较深

表 1 各皮肤组织透明质酸含量比较($\bar{x} \pm s$)

标本来源	样本数	免疫组织化学染色强度	酶联免疫吸附测定值($\mu\text{g}/\text{mL}$)
正常皮肤	29	94 ± 18	0.64 ± 0.13
<6 个月的瘢痕	11	254 ± 43 ^{ac}	1.08 ± 0.25 ^{ac}
≥6 个月, <2 年的瘢痕	8	269 ± 70 ^{ac}	1.81 ± 0.44 ^{ac}
≥2 年的瘢痕	10	378 ± 48 ^b	3.61 ± 0.13 ^b

注:与正常皮肤比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与大于或等于 2 年的瘢痕比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

Weigel 等^[2]报道,皮肤损伤后 2~4 d,HA 的含量上升至最高,而后降至正常水平以下,在后续整个愈合过程中保持此低水平;在慢性瘢痕中,HA 的含量亦低于正常水平。本研究结果显示,正常皮肤 HA 含量最低;瘢痕形成后 6 个月以内,HA 的含量高于正常值;形成时间大于或等于 2 年的增生性瘢痕 HA 含量最高。这一结果与宋慧锋等^[3]的报道相似。笔者认为可能是受伤机体在瘢痕形成过程中,3~6 个月内通过某些机制引起 HA 的合成增多和(或)分解减少,导致 HA 含量上升;瘢痕形成后,随着时间延长 HA 继续增加,可能与瘢痕的成熟和创面重建有关。笔者所采集的小于 6 个月的瘢痕标本基本上是接近 6 个月的,这或许可以解释该组织中的 HA 含量与大于或等于 6 个月且小于 2 年的瘢痕比较,为何差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1989 年,Depalma 等^[4]在研究胎兔皮肤创伤愈合过程中观察到,HA 持续高浓度表达与创面无瘢痕愈合有关。对于 HA 与创面无瘢痕愈合的研究从此受到了重视,相关报道已有不少,但是有些研究结果互相矛盾,尤其是临床试验中所获得的治疗效果不尽一致。有学者认为,在成人皮肤损伤后的数天内,HA 的含量可有一个高峰,以后在整个愈合及慢性瘢痕形成过程中,HA 的含量都降至正常水平以下^[5]。而宋慧锋等^[3]的结果显示,成人烧伤后 3 d 创口及增生性瘢痕中 HA 的含量都高于正常值。本研究结果与后者相似。由此笔者认为,虽然成人皮肤创伤后 HA 含量有所升高,但仍低于胎儿创伤后的 HA 水平,因而导致了瘢痕的产生。这些矛盾的现象提示,创面愈合和瘢痕形成的过程是十分复杂的;HA 作为细胞外基质的一种成分,其作用多样,同时还与其他因素互相影响、互相制约。因此,只有全面了解 HA 的生物学作用,才可能使其在瘢痕防治中发挥更好的效用。

参考文献

- [1] Okasala O, Salo T, Tammi R, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43(2): 125-135.
- [2] Weigel PH, Fuller GM, LeBouef RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theoret Biol*, 1986, 119(2): 219-234.
- [3] 宋慧锋,柴家科,林子豪,等.透明质酸及其受体在不同皮肤组织创面愈合过程中的表达及意义. *中华医学杂志*, 2003, 83(12): 1070-1074.
- [4] Depalma RL, Krummel TM, Durham LA, et al. Characterization and quantitation of wound matrix in fetal rabbit. *Matrix*, 1989, 9(3): 224-231.
- [5] Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, et al. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope*, 2004, 114(4): 760-764.

(收稿日期:2007-11-01)

(本文编辑:罗勤)