

药物这两种情况在严重烧伤早期常同时存在,故混合性的酸碱失衡类型比较多见,从表 1 可以看出,混合性酸碱失衡类型共 38 例,占全组患者的 53%,其中最常见的是呼碱合并代酸,如果在此基础上,不恰当的使用碱性的药物盲目纠正酸中毒,有可能发生 TABD^[4]。从表 3 可以看出,TABD 组患者第一个 24 小时平均补充 5% NaHCO₃ 为 480.0 ± 134.7mL,与非 TABD 组患者 (197.1 ± 97.4mL) 相比有非常显著性差异 ($p < 0.01$),说明 TABD 的发生与补碱过多有关。从表 1 可以看出,严重烧伤休克期 TABD 的发生率较高 (共 15 例,占总数的 20.8%),且以呼碱为主,共 13 例,占 TABD 组的 86.7%,其他两例为呼酸为主的 TABD。与分析判断的结果一致。

综上所述,严重烧伤休克期发生的酸碱失衡类型复杂,以高 AG 代酸与伴高 AG 代酸的混合性酸碱失衡为主,所发生的 TABD 与医源性因素有关,是可以预防的。在烧伤休克补液治疗过程中,重点应扩容,纠正低灌注和组织缺氧,除有严重的血红与肌红蛋白尿外,不宜过早过量的补充碱性药物,同时避免使用大量的等张 NaCl 溶液,尽量使用平

衡液。

参考文献

- [1] 孙业祥,张裁福,李守生,等. 烧伤患者高氯性三重酸碱失衡的判断及其机理的探讨 [J]. 中国病理生理杂志. 2000; 16 (8): 744 ~ 748.
- [2] 安静,黎鳌. 烧伤严重程度分类 [M]. 见黎鳌主编. 烧伤学. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1995: 14.
- [3] Abrogue HJ, Madias NE. Management of life-threatening acid-base disorders [J]. N Engl J Med 1998; 338: 26 - 34.
- [4] Gardner LB, Fournier AM. Extraordinary alkalemia and triple acid-base disturbance [J]. South Med J 1984; 77: 265-268.

【作者简介】

孙业祥 (1966—), 男 (汉族), 安徽六安市人, 1989 年毕业于安徽医科大学, 硕士学位, 副主任医师。

汪昌荣 (1946—) 男 (汉族), 安徽合肥市人, 1970 年毕业于安徽医科大学, 主任, 主任医师, 硕士研究生导师。

陈侠英 (1945—), 女 (汉族), 安徽淮北市人, 1969 年毕业于安徽医科大学, 副主任, 主任医师, 硕士研究生导师。

(收稿日期: 2003-05-16; 修回日期: 2003-06-10)

瘢痕组织中微血管数和血管生成因子表达的研究

钱利, 赵柏程, 皮立, 李晓芳

【摘要】 目的: 研究不同的瘢痕组织中血管内皮细胞生长因子 (VEGF) mRNA 及其受体 fms 样酪氨酸激酶-1 (Flt-1) 的表达, 微血管 (MV) 计数及其意义。方法: 应用原位分子杂交方法研究 VEGFmRNA 的表达, 应用免疫组化方法研究 Flt-1 表达及 MV 的计数。结果: 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织中 MV 数目多于正常皮肤和扁平瘢痕组织中的 MV 数目。VEGFmRNA、Flt-1 在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中表达阳性率高于正常皮肤和扁平瘢痕组织中的表达 ($P < 0.05$), VEGFmRNA 表达阳性病例组的 MV 计数显著高于 VEGFmRNA 表达阴性病例组的 MV 计数 ($P < 0.05$)。结论: 血管内皮细胞过度增殖可能是瘢痕过度增生的重要因素之一。

【关键词】 增生性瘢痕; 瘢痕疙瘩; 血管内皮细胞生长因子; fms 样酪氨酸激酶; 微血管

【中图分类号】 R619.6 【文献标识码】 A 【文章编号】 1001-0726 (2003) 04-0285-05

A study on the expression of VEGF mRNA, Flt-1 and MV count in scar tissues QIAN Li, ZHAO Bai-cheng, PI Li, et al., Dept. of Burns and Plastic Surgery, The 2nd Xiang-ya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

【Abstract】: Objective: To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA, fms-like tyrosine kinase (Flt-1) and microvessel (MV) count in different scar tissues. **Method:** The expression of VEGF mRNA was valued by *in situ* hybridization method and the expression of Flt-1 and MV count was investigated by using immunohistochemical method. **Result:** The MV count and the positive rate of VEGF mRNA, Flt-1 are higher in hyperplastic scar and keloid than those in normal skin and surgical scar. **Conclusion:** The proliferation of endothelial cells may initiate and stimulate the formation of pathological scars.

【Key words】 Hyperplastic scar; keloid; vascular endothelial growth factor; fms-like tyrosine kinase; microvessel

增生性瘢痕与瘢痕疙瘩是烧、创伤或病损后组织过度修复的表现,常常造成局部畸形或伴有不同程度的功能障碍。目前有学者注意到瘢痕增生的程度与微血管的密度有关,并且发现活跃表达胶原基因的成纤维细胞多聚集在微血管周围^[1]。提示瘢痕的血管增生可能与病理性瘢痕的形成机制密切相关。本研究采用原位分子杂交和免疫组化方法研究不同瘢痕组织中 VEGF mRNA、Flt-1 的表达和 MV 的计数,探讨 VEGF mRNA 及其受体 Flt-1 与病理性瘢痕的关系,阐明病理性瘢痕中血管生成机制,为预防和治疗病理性瘢痕提供一定的试验依据。

一、材料与方法

1. 材料:选择我院烧伤整形科住院和门诊手术切除的增生性瘢痕 28 例和瘢痕疙瘩 15 例。28 例增生性瘢痕(男 18 例,女 10 例,年龄范围 2~35 岁)中 27 例为烧伤所致,1 例为外伤所致;四肢部位 22 例,躯干部 3 例,面部 3 例。瘢痕疙瘩 15 例(男 6 例,女 9 例,年龄范围 8~25),8 例为烧伤后所致,2 例为蚊虫叮咬所致,5 例为外伤后所致,其中胸部 6 例,肩部 4 例,腹部 2 例,耳垂 3 例,43 例病理性瘢痕患者术前均无长期外用防治瘢痕药物治疗病史。正常皮肤 14 例,取自我科住院病人(男 6 例,女 8 例,年龄范围 5 岁~36 岁)。扁平瘢痕 7 例,取自我院普外科腹部手术患者(男 5 例,女 2 例,年龄范围 8 岁~40 岁)。所有标本经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,切片。主要试剂为 VEGF mRNA 原位杂交试剂盒和 Flt-1 免疫组化试剂盒均购自武汉 Boster 公司, DAB-HCL 为瑞士进口分装。

2. 方法: VEGF mRNA 染色方法为原位分子杂交法主要步骤: (1) 切片脱蜡至水洗; (2) 3% H₂O₂ 处理后滴加消化液; (3) 滴杂交液孵育过夜; (4) 滴加兔抗人 VEGF mRNA 抗体; (5) 滴加生物素化羊抗兔

IgG: (6) 加 SABC 后用 DAB 显色。结果判定:以阳性细胞百分率和阳性着色强度的得分之和进行判断。细胞浆和/或细胞核内含淡黄色颗粒为阳性细胞,阳性细胞数 < 10%、10%~30%、30%~70% 和 > 70% 分别计 1、2、3、4 分。而杂交信号强度可分为弱、中、强三级分别计 1、2、3 分。上述两种计分相加,1~3 分为阴性,4~7 分为阳性。试剂盒内的阳性切片为阳性染色对照,以 0.5MPBS 代替杂交液作为每次染色的阴性对照。Flt-1 染色方法为常规 ABC 法(染色步骤略),结果判定评分同原位杂交法。应用试剂盒阳性切片为阳性染色对照,以 PBS 法代替一抗做为阴性对照。微血管计数(MVC)为常规 ABC 免疫组化法。应用 CD34 单抗免疫组化染血管内皮细胞,按 Weidner 微血管计数方法计数微血管量,即在切片中随机选择 20 个高倍视野,计数每个视野中微血管数量,然后求其均值。采用 SPSS 统计软件包对结果进行分析(选用单因素方差分析、q 检验和 χ^2 检验)。

二、结果

1. VEGF mRNA Flt-1 及 MV 在不同瘢痕组织及皮肤中的分布特征: VEGF mRNA 阳性反应物质主要分布在胞浆,偶见于细胞核, Flt-1 阳性反应物质主要见于血管内皮细胞的胞膜上。增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中, VEGF mRNA 主要在成纤维细胞表达,部分由角朊细胞表达:增生性瘢痕中 MV 多分布在浅层和胶原结节的周围。而瘢痕疙瘩中 MV 多分布在瘢痕疙瘩与周围邻近组织的交界处,瘢痕疙瘩中心区域少见。正常皮肤中, VEGF mRNA 主要由角朊细胞表达,扁平瘢痕中 VEGF mRNA 可由角朊细胞表达,部分见于成纤维细胞。见照片 1-8。

2. VEGF mRNA、Flt-1、MVC 在不同瘢痕组织的表达和分布:增生性瘢痕 VEGF mRNA 表达阳性率最高,瘢痕疙瘩组次之,扁平瘢痕组其次,正常

皮肤 VEGFmRNA 表达阳性率最低。瘢痕疙瘩组 Flt-1 阳性率最高，增生性瘢痕组次之，扁平瘢痕组其次，正常皮肤 Flt-1 阳性率最低。微血管计数从高到低依次为增生性瘢痕、瘢痕疙瘩、正常皮肤和扁平瘢痕。增生性瘢痕与正常皮肤组，增生性瘢痕与扁平瘢痕组、瘢痕疙瘩与正常皮肤、扁平瘢痕之

间比较，VEGFmRNA、Flt-1 的表达阳性率以及 MVC 明显增高存在显著差异 ($P < 0.05$)。增生性瘢痕与瘢痕疙瘩比较，正常皮肤与扁平瘢痕比较，不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 1 及照片 1-8。

表 1 VEGFmRNA、Flt-1 及 MV 在不同组织中的表达

	例数	VEGFmRNA (%)	Flt-1 (%)	MVC ($\bar{x} \pm S$)
增生性瘢痕	28	82.1 (23/28)	85.7 (24/28)	74.01 $\pm$ 11.37
瘢痕疙瘩	15	73.3 (11/15)	93.3 (14/15)	68.27 $\pm$ 15.19
正常皮肤	4	21.4 (3/14)	7.1 (/14)	57.02 $\pm$ 5.40
扁平瘢痕	7	28.6 (2/7)	28.6 (2/7)	52.00 $\pm$ 9.49



图 1 微血管计数在正常皮肤中的表达 $\times 100$

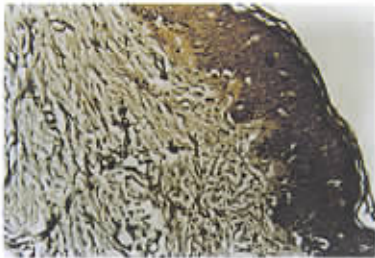


图 2 微血管计数在扁平瘢痕中的表达 $\times 100$

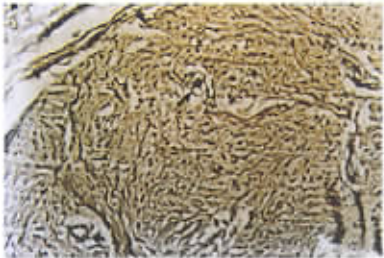


图 3 微血管计数在增生性瘢痕中的表达 $\times 100$



图 4 微血管计数在瘢痕疙瘩中的表达 $\times 100$

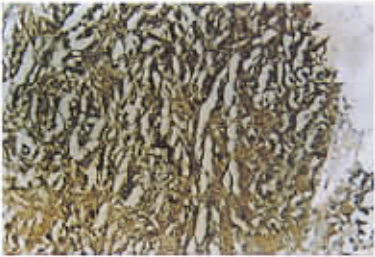


图 5 VEGFmRNA 在增生性瘢痕中的表达 $\times 100$



图 6 VEGFmRNA 在瘢痕疙瘩中的表达 $\times 100$



图 7 Flt-1 在增生性瘢痕中的表达 $\times 100$

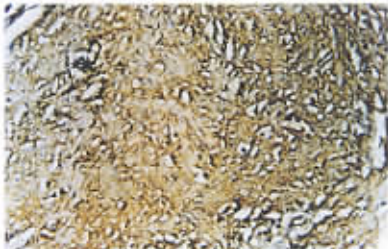


图 8 Flt-1 在瘢痕疙瘩中的表达 $\times 100$

3. VEGFmRNA 的表达与 MVC 的关系：在增生性瘢痕、瘢痕疙瘩、扁平瘢痕和正常皮肤中，

VEGFmRNA 阳性病例 MVC 均明显高于 VEGFmRNA 阴性病例，有显著性差异（ $P<0.05$ ）。见表 2。

表 2 VEGFmRNA 在不同组织中的表达与 MVC 的关系

	例 数	MVC ($\bar{X} \pm S$)
增生性瘢痕	VEGFmRNA 阳性 3	78.35 ± 10.56
	VEGFmRNA 阴性 5	61.58 ± 3.50
瘢痕疙瘩	VEGFmRNA 阳性 11	73.51 ± 16.56
	VEGFmRNA 阴性 4	62.56 ± 2.06
正常皮肤	VEGFmRNA 阳性 3	63.67 ± 2.34
	VEGFmRNA 阴性 11	57.85 ± 6.07
扁平瘢痕	VEGFmRNA 阳性 2	62.50 ± 7.78
	VEGFmRNA 阴性 5	47.80 ± 6.53

4. VEGFmRNA、Flt-1 表达及 MVC 与临床特征的关系：增生性瘢痕组病程小于一年的病例中 MVC 明显高于病程超过一年的病例，VEGFmRNA、和 Flt-1 的表达阳性率在小于一年的病例组中亦高于病程超过一年的病例组（ $P<0.05$ ），而瘢痕疙瘩组，VEGFmRNA、Flt-1 及 MVC 按病程分组比较，组间相比无显著性差异（ $P>0.05$ ）。

三、讨论

血管内皮细胞生长因子（VEGF）是最重要的促血管生长因子，分子量为 35-45KD 的分泌型糖蛋白。人体的许多细胞和部分肿瘤细胞都可以分泌 VEGF，它与血管内皮细胞上的特异性受体 Flt-1 或 FLK/KDR 结合后通过一系列反应，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 还可促进内皮细胞的迁移和增殖^[2]。

增生性瘢痕和瘢痕疙瘩是烧、创伤和病损后组织过度修复的表现。两种瘢痕具有完全不同的生物学特性，且临床治疗效果亦截然不同。血管生成是创伤修复过程中重要的环节，从创伤早期炎症反应、肉芽组织的形成到机体组织的重建和瘢痕形成都离不开血管内皮细胞的参与。因此国外有学者提出创伤后异常的血管反应可能是导致创伤愈合结果不同的重要因素^[3]。Clar 等发现增生性瘢痕中的血流量高于普通瘢痕^[4]，还有学者注意到瘢痕的增生程度与微血管密度有关，并且活跃表达胶原基因的成纤维细胞多聚集在微血管周围^[1]。这些推测或研究提示，瘢痕的血管增生可能与病理性瘢痕的形成机制密切相关。目前国内外尚无病理性瘢痕和正常皮肤组织血管形成机制的比较研究，亦无 VEGFm-

RNA、Flt-1 表达及其与 MVC 之间关系的类似报道。本研究结果发现：增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织中 VEGFmRNA 及其受体 Flt-1 的表达及 MVC 较正常皮肤、扁平瘢痕明显增高，且 VEGFmRNA 阳性的病例，其 MVC 高于 VEGFmRNA 阳性的病例。结果提示增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织的形成与血管内皮细胞过度增殖有关，在这一过程中 VEGF 及其受体 Flt-1 起着重要作用。

VEGFmRNA 在病理瘢痕中的表达显著高于正常皮肤和扁平瘢痕组织，VEGF 表达水平越高，微血管数目越多，表明 VEGF 与血管新生有关。烧、创伤组织修复过程中，当局部微环境发生变化如持续低氧，严重感染，组织长期的高代谢反应以及异物的存留均可以使皮肤角朊细胞、成纤维细胞分泌的促血管生长因子如 VEGF 增多；同时还可提高内皮细胞对促血管生成因子的反应，从而使新生血管的生长异常增多^[6]。新生的血管可为成纤维细胞合成胶原提供丰富的前体物质，而胶原的大量合成和沉积，又可以压迫微血管使得局部氧浓度更加低下，故缺氧既可作为最重要的血管生成刺激因素，又能引起血管的增生^[6]。使之形成恶性循环。据此推测，这可能是增生性瘢痕和瘢痕疙瘩血管异常生成的病理机制。另外，VEGF 表达的增多可使局部组织微血管的通透性增加，VEGF 通过囊泡小体介导的跨膜转运，导致血浆蛋白渗出，改变细胞外基质的成分，为血管新生创造条件，也为成纤维细胞合成胶原提供物质基础。因此，增生性瘢痕的胶原结节常常围绕血管分布，VEGF 的增多还可能与瘢痕疙瘩瘤样增长有关^[7]。

本研究证明, MV 计数与增生性瘢痕的病程显著相关, 增生性瘢痕一年后血管减少, 充血减退, 逐渐软化。而瘢痕疙瘩 MV 计数与病程无明显关系。这与增生性瘢痕生长的有限性以及瘢痕疙瘩常超过原伤口界限, 不断侵犯邻近组织的生长方式是一致的, 具体的作用机制还不十分了解。由此可见, 瘢痕中成纤维细胞通过 VEGF 与血管内皮细胞互相作用, 互相调节, 促进了病理性瘢痕中血管的异常生长, 也促进了瘢痕的异常增生。因此抑制血管内皮的增殖, 改善瘢痕血管的病理状态, 可望成为防治病理性瘢痕的新途径之一。

参考文献

- [1] Zhang LQ, Loato M, Munona P, et al. Normal and hypertrophic scars: qualification and localization of messenger RNAs for type I, III and VI collagens. [J]. Br J Dermatol, 1994, 130: 453.
- [2] Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels [J]. Am J Physiol 1996, 271: H2520-H2528.
- [3] Enrich HP, Kelley SF. Hypertrophic scars: An interruption in the remodeling of repair, a laser Doppler blood flow study [J]. Plastic and Reconsurg 1992, 90 (6): 993-998.
- [4] Clark JA, Leung KS, Cheng JCY, et al. The hypertrophic

scar and microcirculation properties [J]. Burns, 1996, 22 (7): 447-450.

- [5] Senger DR. Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines [J]. Am J Pathol, 1996, 149: 1-7.
- [6] Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Hypoxia regulates the expression of bVDF/VEGF and its receptors in Human skin [J]. J Invest Dermatol, 1997, 108: 263-268.
- [7] Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. VEGF mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing [J]. Am J Pathol (US) 1998, 152 (6): 1445-1452.

【作者简介】

钱利 (1972—), 女 (汉族), 山东人, 1994 年于湖南医科大学毕业, 主要从事创面修复与瘢痕防治的研究, 博士研究生, 主治医师。

赵柏程 (1957—), 男 (汉族), 湖南常德人, 1983 年于湖南医科大学毕业, 主要从事创面修复与瘢痕防治的研究, 科主任, 教授。

皮立 (1967—), 男 (汉族), 湖南长沙人, 1992 年于湖南医科大学毕业, 主要从事创面修复与瘢痕防治的研究, 硕士研究生, 主治医师。

(收稿日期: 2003-04-16; 修回日期: 2003-06-18)

第八届全国烧伤创疡学术会议通知

为进一步总结交流“皮肤再生医学”在烧伤创疡及相关疾病的基础研究和临床应用方面所取得的研究成果和实践经验, 提高烧伤创疡医疗和学术水平, 促进皮肤再生医学的发展, 中国中西医结合学会烧伤专业委员会、中国烧伤创疡科技中心、中国烧伤创疡杂志社拟于 2004 年 5 月在广西南宁联合召开第八届全国烧伤创疡学术会议, 会议主题: 规范应用烧伤皮肤再生疗法, 提高烧伤整体治疗水平。届时会议将邀请专家作有关皮肤再生医学进展和系列研究报告并进行学术交流; 同时会议还将颁发“第六届全国烧伤创疡科技进步奖”、“第五届全国烧伤康复明星奖”和“第二届美宝杯优秀论文奖”, 会期三天。欢迎全国烧伤医学界同仁以及相关学科临床医学工作者参加, 并请作好论文征文、科技进步奖申报和烧伤康复明星申报工作, 以便在会上进行评选和交流。会议具体时间和地点将另行通知。

有关奖励评审条件和具体要求, 请见本期杂志有关通知, 申报截止日期: 2004 年 3 月 31 日 (以邮戳为准):

申报资料请寄至: 中国中西医结合学会烧伤专业委员会办公室

地 址: 北京宣武区广义街 7 号乐凯大厦 1104 室 邮编: 100053 联系人: 邢颖

电话: 010-63042423, 63016969 E-mail: periodical@mebo.com