

- [11] Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide [J]. Proc Natl Acad Sci. U S A. 1982, 79 (18): 5485-9.
- [12] Ekelund KM, Ekblad E. Structural, neuronal, and functional adaptive changes in atrophic rat ileum [J]. Gut. 1999, 45 (2): 236-45.
- [13] Han SP, Yang CL, Chen X, et al. Direct evidence for the role of neuropeptide Y in sympathetic nerve stimulation-induced vasoconstriction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1998, 274 (1): H290-4.
- [14] Mundinger TO, Taborsky GJ Jr. Differential action of hepatic sympathetic neuropeptides: metabolic action of galanin, vascular action of NPY [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002, 278 (3): E390-7.
- [15] Inoue H, Imokawa H, Yamanaka M, et al. Detection of endothelin 1, 2 and endothelin-like immunoreactant in wound surface and plasma in mice with thermal injury [J]. Life Sci. 1993, 52 (25): PL291-6.
- [16] 彭曦, 冯晋斌, 颜洪, 等. 早期肠道营养改善烧伤大鼠胃组织血液灌流的实验研究 [J]. 重庆医学, 2001, 30 (6): 517-19.

【作者简介】

邵立健 (1974—), 男 (汉族), 江西都昌人, 2001 年江西医学院研究生毕业, 在读博士生, 讲师。

朱清仙 (1955—), 男 (汉族), 南昌人, 1977 年江西医学院毕业, 教授。

何明 (1956—), 男 (汉族), 南昌人, 1977 年江西医学院毕业, 教授。

(收稿日期: 2003-10-21; 修回日期: 2003-12-20)

烧伤后瘢痕内缺氧环境的变化

李高峰, 罗成群, 刘浔阳, 贺全勇, 李萍, 徐阳成

【摘要】 目的: 探讨瘢痕形成和成熟过程中组织内的缺氧状况及其影响因素。方法: 采用免疫组化法检测烧伤后肉芽组织、不同时期瘢痕和正常皮肤中缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 和分化群 (CD34) 的表达, 采用权重方法分别对各组表皮和真皮的 HIF-1 α 表达结果进行量化, 并根据 CD34 染色结果进行血管计数。结果: 随瘢痕时间的增长, HIF-1 α 表达强度逐渐减弱, 血管计数逐渐减少, 真皮细胞密度逐渐降低。结论: 瘢痕中高细胞密度和高细胞活性是形成瘢痕内缺氧环境的重要原因, 缺氧环境的改善, 可促进瘢痕成熟, HIF-1 α 在瘢痕内缺氧环境的改善过程中可能发挥重要作用。

【关键词】 HIF-1 α ; CD34; 缺氧; 烧伤; 瘢痕

【中图分类号】 R644; R619.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-0726 (2004) 01-0004-05

Changes of hypoxic environment in burn scars Li Gao-feng, LUO cheng-qun, LIU Xun-yang, et al. The 3rd Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410013, China

【Abstract】Objective: To explore the hypoxic status of the tissue in the course of scar formation and the influencing factors. **Method:** The expressions of HIF-1 α and CD34 in burn wound granulation, burn scar of different phases and normal skin were detected by immunohistochemical method. The expressions of HIF-1 α in epidermis and dermis were quantified by weight method and microvessel count was done on the basis of the expression of CD34. **Result:** As the course of scar formation and maturation developed, the expression of HIF-1 α weakened, the count of microvessels and the density of dermis cells decreased gradually. **Conclusion:** High density and high activity of cells are important factors of the formation of hypoxic environment in scar. Amelioration of hypoxia may

accelerate scar maturation. HIF-1 α may play an important role in hypoxia amelioration.

【Key words】HIF-1 α ; CD34; hypoxia; scar; burn;

烧伤后瘢痕是当今临床医学面临的一大难题, 其形成机制尚不明了。影响瘢痕形成的因素很多, 目前研究表明缺氧不仅能促进成纤维细胞分裂增殖, 延长其生存, 又能使成纤维细胞合成胶原增加, 并影响胶原酶的表达, 而且能调节多种生长因子的表达, 对瘢痕的形成产生重要作用^[1]。但是目前尚无瘢痕形成及成熟过程中缺氧状况研究的报道。缺氧诱导因子 HIF-1 (HIF-1) 是对缺氧刺激的特异感受因子^[2], 能间接反应组织中的缺氧状况。CD34 抗原稳定表达于血管内皮细胞, 敏感性高^[3], 能很好地反应微循环状况。本研究通过检测肉芽组织、各不同时期瘢痕及正常皮肤中 HIF-1 和 CD34 的表达, 探讨瘢痕组织内的缺氧状况及其影响因素。

一、材料与方法

1. 标本来源及制备: 本组患者 25 例, 男性 21 例, 女性 4 例: 年龄最小 10 岁, 最大 32 岁, 平均 20.9 \pm 5.92 岁, 各组年龄差异无显著性意义, 均为烧伤或烧伤后瘢痕患者 (瘢痕疙瘩除外), 无其它合并症, 未作特殊治疗。烧伤原因: 18 例为火焰烧伤, 7 例为热液烫伤。标本均取自上臂或前臂, 肉芽组织在植皮术中获得, 1 月~6 月瘢痕取于第一次皮肤针治疗术中^[1], 其余标本均取于整形术中, 部分患者在瘢痕的不同时期手术, 取标本多次。根据烧伤创面愈合后的时间, 将标本分为 6 组, 每组 8 个标本: ①正常皮肤; ②烧伤后 1 月内的创面肉芽组织; ③愈后 1 月~3 月的瘢痕; ④愈后 4 月~6 月的瘢痕; ⑤愈后 7 月~12 月的瘢痕; ⑥愈后大于 1 年的瘢痕。所有标本取材后立即以 10% 的中性福尔马林液固定, 然后脱水, 石蜡包埋, 分批切片。

2. 主要试剂: 鼠抗人 CD34 单克隆抗体 (即用型), SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒, 购自北京中山生物技术有限公司。兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体 (1:150 稀释), SABC 试剂盒, 购自武汉博士德生物工程有限公司。

3. 免疫组化染色方法: 载玻片以多聚赖氨酸

处理, 石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 高压法抗原热修复, 然后按试剂盒说明书进行实验, 3% 的过氧化氢及封闭血清孵育后, 依次加入一抗 (加 PBS 作阴性对照)、生物素化二抗及辣根酶标记链霉卵白素 (S-A/HRP) 或链霉亲和素-过氧化物酶复合物 (SABC), 以上每步骤前均以磷酸缓冲液 (PBS) 充分浸洗标本, 最后以 DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水, 封片。

4. 结果判断: HIF-1 α 阳性细胞半定量: 光镜下观察, 按染色的深浅 (信号强度) 分为 3 级: 棕黑色为强阳性 “+++”, 棕黄色为阳性 “++”, 浅棕色为弱阳性 “+”。表皮和真皮分别进行半定量。表皮层随机取 5 个 1/2d (d 为高倍视野直径) 长表皮进行阳性细胞计数, 将阳性细胞选定在各个级别中, 用权重方法将全部阳性信号进行量化, 即 “+++” 乘 3, “++” 乘 2, “+” 乘 1。权重量化的数字能反映该段表皮的相对信号强度, 取 5 个表皮段的平均值作为该标本的相对信号强度。真皮层取相应于表皮的 5 个位置, 每个位置由浅到深取 3~5 个高倍视野, 每个视野观察 50 个细胞, 阳性细胞亦采用权重方法进行量化, 求其平均值作为该位置的相对信号强度。取 5 个位置的平均值作为该标本真皮的相对信号强度。将各组 8 例标本的相对信号强度计算均数和标准差。

CD34 阳性血管计数: 光镜下观察, 染成棕黄色的单个内皮细胞、细胞丛及血管腔作为一个血管计数, 注意排除与内皮细胞形态明显不一样的炎性细胞及晚期瘢痕成纤维细胞。于靠近瘢痕、皮肤表皮及肉芽膜随机取 5 个位置, 每个位置由浅到深取 3~5 个高倍视野, 求其平均值, 作为该位置计数, 然后取 5 个位置的平均值作为本片血管计数。将各组 8 例标本的血管计数分别计算均数和标准差。

5. 统计学处理: 统计数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件包对所得数据进行方差分析和直线相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

二、结果

1. HIF-1 α 在肉芽组织、各期瘢痕和正常皮肤中的表达：图 1a~1f 显示，肉芽组织中中性粒细胞、巨噬细胞呈强阳性表达，血管内皮细胞和成纤维细胞呈阳性表达。瘢痕中表皮层主要表达于基底细胞和部分棘层、颗粒层细胞。真皮层成纤维细胞、内皮细胞和炎性细胞均有表达，主要表达于 1 月~3 月和 4 月~6 月组瘢痕组织中，且表皮下血管丰富区成纤维细胞为弱阳性或阴性，而深层成纤维细胞则基本为阳性。6 月后组瘢痕和正常皮肤组真皮层中基本无表达。1 月~3 月组瘢痕成纤维细胞核肥大，染色深，多呈短梭状，4 月~6 月组瘢痕深层成纤维细胞较多且呈长条形或空泡状，此两组成纤维细胞均呈星罗均匀分布状态，平均细胞密度高。而 6 月后组瘢痕及正常皮肤成纤维细胞核中等大小，多为梭形，呈聚焦状分布于血管、汗腺周围，平均细胞密度较低。各组表达的相对信号强度见表 1。

表 1 各组血管计数及 HIF-1 α 表达的相对信号强度

组别	血管计数	表皮 HIF-1 α	真皮 HIF-1 α
创面肉芽组织	15.63 \pm 1.85	98.88 \pm 6.33	98.88 \pm 6.33
1~3 个月瘢痕	6.25 \pm 1.67*	31.63 \pm 2.62*	68.88 \pm 3.60*
4~6 个月瘢痕	6.88 \pm 1.55	24.63 \pm 5.15*	65.25 \pm 3.54
7~12 个月瘢痕	6.25 \pm 1.28	22.63 \pm 3.81	8.63 \pm 2.97*
大于 1 年瘢痕	3.00 \pm 0.76*	13.88 \pm 3.83*	3.63 \pm 2.13 Δ
正常皮肤	2.63 \pm 0.92	5.13 \pm 4.36*	2.13 \pm 1.64

注 1：组间比较结果为：* 与上一组比较， $P < 0.01$ ； Δ 与上一组比较， $P < 0.05$ 。

2. 血管计数与表皮 HIF-1 α 间 $r = 0.904$ ，高度正相关 ($P < 0.01$)；血管计数与真皮 HIF-1 α 间 $r = 0.794$ ，高度正相关 ($P < 0.01$)。

2. 肉芽组织、各期瘢痕和正常皮肤中血管计数：图 2a~2f 显示，肉芽组织和瘢痕中血管内皮细胞，特别是深层血管内皮细胞大部分肥大，凸向管腔，而正常皮肤血管内皮细胞较扁平，血管内膜光滑。肉芽组织和 1 年内瘢痕血管呈散点状均匀分布或条索状分布，而 1 年后瘢痕和正常皮肤则呈聚散状分布。各组血管计数及与 HIF-1 α 表达强度的关系见表 1。

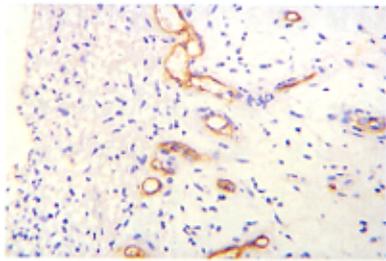


图 1a

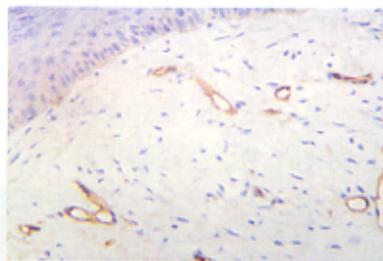


图 1b

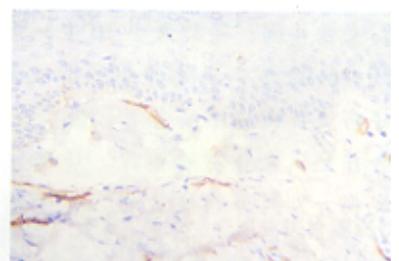


图 1c

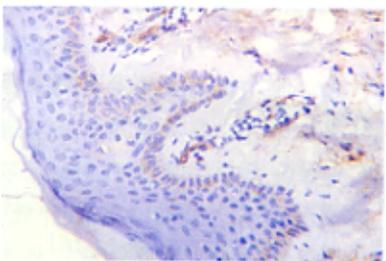


图 1d

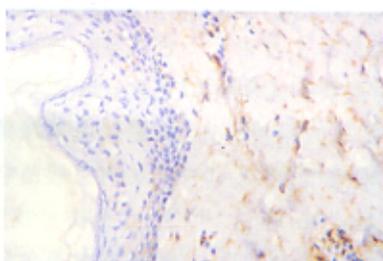


图 1e

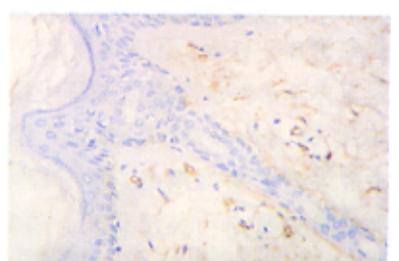


图 1f

图 1a-1f 分别为烧伤后创面肉芽，愈合后 2 月、5 月、9 月、1.5 年瘢痕及正常皮肤的 CD34 表达图 SP \times 40

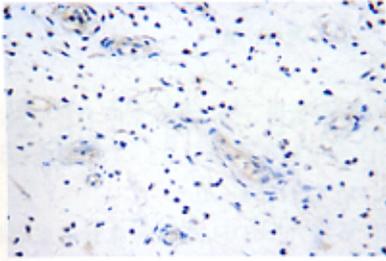


图 2a

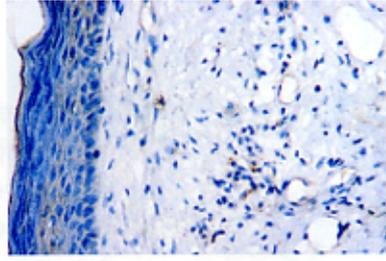


图 2b

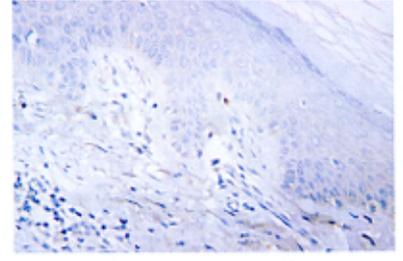


图 2c

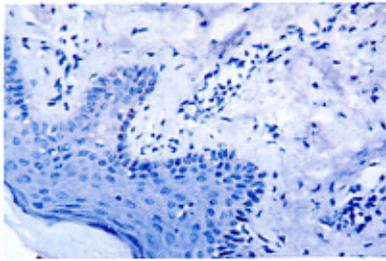


图 2d

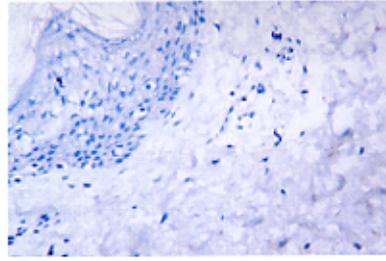


图 2e

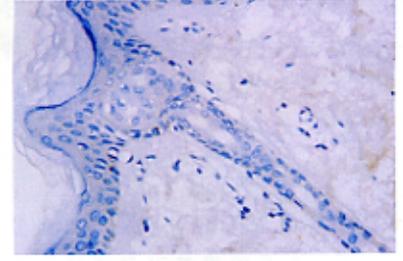


图 2f

图 2a~2f 分别为烧伤后创面肉芽、愈合后 2 月、5 月、9 月、1.5 年瘢痕及正常皮肤的 HIF-1 α 表达图 SP \times 40

三、讨论

组织内缺氧环境的形成是供氧与耗氧之间失衡的结果。供氧离不开局部微循环血流状况，与微血管数、微血管通畅程度及细胞外基质对氧气的通透性有关。耗氧则与细胞密度和细胞功能状态相关。HIF-1 是缺氧条件下广泛存在哺乳动物和人体内的一种转录因子，具有异源二聚体结构，由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚单位组成。HIF-1 β 分子量为 91KD~94KD，与异源二聚化及稳定 HIF-1 有关。HIF-1 α 分子量为 120KD，是 HIF-1 的氧调节亚单位，它决定 HIF-1 的活性，当细胞氧浓度降低时，HIF-1 α 蛋白水平呈指数增加^[4,5]。因此，HIF-1 α 的表达强度能间接反应细胞的缺氧状况。

本研究结果表明，炎性细胞、表皮细胞、毛囊与汗腺细胞、内皮细胞及成纤维细胞等均能表达 HIF-1 α 。在瘢痕形成到成熟过程中，HIF-1 α 表达呈明显的由强到弱趋势，反映出其缺氧状况逐渐改善的规律。通过血管计数亦可发现其血管数目逐渐减少的规律。按常理，血管数目少，才会出现缺

氧环境，因此，瘢痕中缺氧环境的形成并非完全由血管数目决定。Tokuda 通过测量培养中的成纤维细胞周围的氧张力发现细胞表面氧张力与细胞密度和细胞活性等因素有关^[6]。本研究结果表明肉芽组织和 1 月~3 月组瘢痕中 HIF-1 α 表达最强，同时也是细胞密度最大，核染色深，细胞功能最活跃时，但血管密度并不低。随着瘢痕的成熟，细胞密度逐渐降低，HIF-1 α 的表达亦逐渐减弱。因此，在瘢痕形成过程中，细胞增殖，活性升高对缺氧环境的形成起重要作用。

HIF-1 作为对缺氧的特异感受因子，其基本作用是对缺氧产生适应性反应，调节氧平衡。它可诱导血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达，从而促成血管生成^[2]。本研究发现，瘢痕形成和成熟过程中，HIF-1 α 表达强度与血管数均呈逐渐减小的关系，反映出 HIF-1 调节血管生成的作用。肉芽组织和瘢痕中内皮细胞凸向管腔，管腔不通畅，均是新生血管的表现，其功能尚不完善，因此，不能仅凭血管数目反映微循环状况。肉芽组织和早期瘢痕中血管数目虽多，但不成熟，组织中仍缺氧严

重。随着血管的成熟,包括血管壁改建,管腔由堵塞状变为通畅状,及空间位置由散点状、条索状到聚散状、树枝状分布。瘢痕内缺氧环境才真正得到改善。

Kischer 认为瘢痕中内皮细胞增殖和堵塞微血管管腔是造成瘢痕内缺氧环境的原因^[7]。根据本研究结果,认为高细胞密度、高细胞活性是缺氧环境形成的重要原因,而内皮细胞增殖凸向管腔是内皮细胞对缺氧的反应,是新生血管的表现。随着新生血管的成熟和缺氧环境的改善,内皮细胞呈现正常形态,瘢痕亦走向成熟。

Semenza 认为, HIF-1 α 通过诱导 VEGF 和 P₅₃ 等基因转录产生既能使缺氧细胞存活,又能使那些不能适应的缺氧细胞凋亡的作用^[2]。本研究发 4 月~6 月组瘢痕深层成纤维细胞数目增多,核多呈长条形或空泡状,与其它组成纤维细胞形态明显不同,表达 HIF-1 α 较多,而 7 月~12 月组成纤维细胞密度降低, HIF-1 α 表达基本为阴性。因此瘢痕成熟过程中,成纤维细胞数目的减少,可能与 HIF-1 α 诱导的细胞凋亡有关。HIF-1 α 诱导细胞凋亡,减少细胞密度,抑制细胞活性,从而降低耗氧量及瘢痕的缺氧环境。

综上所述,肉芽组织、瘢痕中高细胞密度和高细胞活性是形成瘢痕缺氧环境的重要原因。随着缺氧环境的改善,瘢痕逐渐走向成熟。HIF-1 α 可能既通过诱导 VEGF 等血管生成因子表达,促进血管生成和成熟,改善微循环,完善供氧系统,又通过诱导 P₅₃ 等基因表达,促使细胞凋亡,减少细胞数目,抑制细胞活性,降低耗氧量,故在瘢痕内缺氧环境的改善过程中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 罗成群,李高峰,贺全勇,等.皮肤针联合疤痕平治疗烧伤后增生性瘢痕的临床研究[J].中国烧伤创疡杂志,2003,15(1):68-70.
- [2] 罗杰,王长谦,黄定九.CD34 基因与血管内皮细胞[J].国外医学生理、病理科学与临床分册,2000,20(6):442-444.
- [3] Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive response mediated by hypoxia-inducible factor 1[J]. J Clin Invest, 2000,106(7):809-812.
- [4] 江从庆海,艾中立,刘志苏.缺氧诱导因子-1与肿瘤[J].国外医学外科学分册,2001,28(6):327-330.
- [5] Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension[J]. Am J Physiol, 1996; 271(4 Pt 1): C1172-80.
- [6] Tokuda Y, Crane S, Yamaguchi Y, et al. The level and kinetics of oxygen tension detectable at the surface of human dermal fibroblast cultures[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(3): 414-420.
- [7] Kischer CW. Contribution of electron microscopy to the study of the hypertrophic scar and related lesions[J]. Scanning Microsc, 1993, 7(3): 921-930.

【作者简介】

李高峰(1975—),男(汉族),湖南衡南人,衡阳医学院本科毕业,中南大学博士研究生。

罗成群(1948—),男(汉族),湖南衡南人,衡阳医学院毕业,教授、博士生导师。

刘浔阳(1938—),男(汉族),江西九江人,湖南医学院毕业,教授、博士生导师。

(收稿日期:2003-10-04;修回日期:2003-12-20)

* 小资料 *

我国期刊论文位居世界第五位

本刊讯:据“中国科技论文统计与分析年度报告”报道:2002 年被国际上三大检索系统(SCI、EI、ISTP)收录的我国期刊论文,共计 77395 篇,比 2001 年增加 12869 篇,增长率为 19.9%,比世界科技论文总量的增长率高 21.9 个百分点,占世界科技论文总量 1441296 篇的 5.37%,提高了 0.97 个百分点,仅在美国、日本、英国和德国之后,位居世界第五位。