

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240280

· 论 著 ·

低能量 CO₂ 点阵激光通过激活瘢痕表皮细胞 Wnt/β- 联蛋白通路改善大鼠烧伤后瘢痕

顾昊煜, 刘莹莹, 杨璐, 肖仕初, 罗鹏飞*, 夏照帆*

海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院烧伤外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探究瘢痕表皮细胞在低能量 CO₂ 点阵激光改善烧伤后瘢痕中的作用及可能的分子机制。**方法** 建立大鼠背部大面积烧伤后瘢痕模型。对 3 只烧伤后瘢痕模型大鼠给予 30 mJ 低能量 CO₂ 点阵激光干预, 观察瘢痕表皮细胞活化情况, 分离表皮组织行转录组测序筛选激活通路。将 18 只烧伤后瘢痕模型大鼠随机分为 3 组 ($n=6$): 对照组不予激光干预, 激光组予 30 mJ CO₂ 点阵激光干预, 激光+抑制剂组予 30 mJ CO₂ 点阵激光干预+IWR-1 (Wnt/β- 联蛋白通路抑制剂) 瘢痕内注射, 以验证筛选到的通路激活情况及其效应。通过 H-E 染色、马松染色和蛋白质印迹法检测表皮细胞和成纤维细胞活化、Wnt/β- 联蛋白通路激活及瘢痕改善情况。**结果** 低能量激光干预后, 烧伤后瘢痕模型大鼠瘢痕表皮组织 Ki67、增殖细胞核抗原 (PCNA)、细胞角蛋白 19 (CK19)、p63 阳性细胞数量增多, 活化明显; 转录组测序结果结合文献分析筛选出 Wnt/β- 联蛋白通路作为候选通路。在验证性实验中, 与对照组相比, 激光干预后第 5 天烧伤后瘢痕模型大鼠瘢痕表皮细胞 Wnt/β- 联蛋白通路被激活, 激光干预后第 30 天大鼠瘢痕组织真皮胶原排列更为疏松、真皮厚度变薄、α-平滑肌肌动蛋白阳性成纤维细胞数减少、I 型和 III 型胶原蛋白的含量及 I 型/III 型胶原蛋白的比例下降; 给予 Wnt/β- 联蛋白通路抑制剂后, 上述低能量激光干预诱导的 Wnt/β- 联蛋白通路激活、瘢痕表皮细胞活化和瘢痕改善现象均被逆转。**结论** 低能量 CO₂ 点阵激光可通过激活瘢痕表皮细胞 Wnt/β- 联蛋白通路活化瘢痕表皮细胞、改善烧伤后瘢痕。

[关键词] 烧伤; 瘢痕; 低能量点阵激光; 表皮细胞; Wnt/β- 联蛋白通路

[引用本文] 顾昊煜, 刘莹莹, 杨璐, 等. 低能量 CO₂ 点阵激光通过激活瘢痕表皮细胞 Wnt/β- 联蛋白通路改善大鼠烧伤后瘢痕[J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(1): 53-64. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240280.

Low-energy CO₂ fractional laser treatment for post-burn scars via activating Wnt/β-catenin pathway in scar epithelial cells in rats

GU Haoyu, LIU Yingying, YANG Lu, XIAO Shichu, LUO Pengfei*, XIA Zhaofan*

Department of Burn Surgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of scar epithelial cells and its potential molecular mechanisms in the efficacy of low-energy CO₂ fractional laser treating post-burn scars. **Methods** The model of post-major burn scars on the back of rat was established. Three rats with post-major burn scars received 30 mJ low-energy CO₂ fractional laser treatment to detect the activation of scar epidermal cells. Epidermal tissue of scars was isolated for RNA sequencing to screen activated pathways. Subsequently, 18 rats with post-major burn scars were randomly divided into 3 groups ($n=6$): the control group without laser treatment, the laser group receiving 30 mJ CO₂ fractional laser treatment, and the laser+inhibitor group receiving laser treatment and intra-scar injection of IWR-1 (a Wnt/β-catenin pathway inhibitor), to verify the activation status and effects of the selected pathways. Hematoxylin-eosin staining, Masson staining, and Western blotting were used to detect the proliferation of epithelial cells and fibroblasts, the activation of Wnt/β-catenin pathway, as well as the improvement of scar profiles. **Results** After low-energy laser treatment, there was a significant increase in the number of Ki67-positive, proliferating

[收稿日期] 2024-04-30 [接受日期] 2024-06-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81930057, 82272260), 军队后勤科研重点项目(JKBWS23C1018, CHJ23C031), 上海市重中之重研究中心建设项目(2023ZZ02013)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81930057, 82272260), Key Program of Logistics Research of PLA (JKBWS23C1018, CHJ23C031), and Shanghai Top Priority Research Center Project (2023ZZ02013).

[作者简介] 顾昊煜, 博士生. E-mail: 983118110@qq.com

*通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-31161835, E-mail: 15026592154@126.com; Tel: 021-81873247, E-mail: xiazaofan@163.com

cell nuclear antigen (PCNA)-positive, cytokeratin 19 (CK19)-positive, and p63-positive cells in the scar epithelial tissue. RNA sequencing coupled with literature analysis identified Wnt/ β -catenin pathway as a potential candidate pathway. In the confirmatory experiment, compared to the control group, the Wnt/ β -catenin pathway was activated in scar epithelial cells in the laser group 5 d post-laser intervention. After 30 d laser intervention, dermal collagen exhibited a more loosened arrangement, with reduced dermal thickness and significantly less α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive fibroblasts compared to the control group. Collagen I, collagen III, and the relative ratio of collagen I to III in the laser group were at a lower level than those in the control group. Administration of the Wnt/ β -catenin pathway inhibitor blocked the activation of the Wnt/ β -catenin pathway induced by low-energy laser, the proliferation of scar epithelial cells and the improvement of scar profiles.

Conclusion Low-energy CO₂ fractional laser treatment can activate the Wnt/ β -catenin pathway of scar epithelial cells, thereby activating epithelial cells and yielding significant scar improvements.

[Key words] burn; scar; low-energy fractional laser; epidermal cells; Wnt/ β -catenin pathway

[Citation] GU H, LIU Y, YANG L, et al. Low-energy CO₂ fractional laser treatment for post-burn scars via activating Wnt/ β -catenin pathway in scar epithelial cells in rats[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(1): 53-64. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240280.

烧伤是最易导致瘢痕形成的诱发因素,而且烧伤后瘢痕是最容易造成挛缩畸形、功能障碍的瘢痕类型^[1-4]。激光技术因具有损伤小、风险低、恢复快等优势被广泛用于瘢痕治疗^[5]。既往认为,CO₂点阵激光治疗瘢痕的主要靶组织为瘢痕真皮,常选用高能量参数以求达到足够的治疗深度,但这会增加局部出血、感染的风险,甚至诱发瘢痕增生^[6]。近年来,越来越多的临床实践证据显示,低能量CO₂点阵激光可更加安全、有效地防治瘢痕,提示浅层的表皮细胞可能参与了CO₂点阵激光调控瘢痕形成的过程^[7]。本研究通过建立烧伤后瘢痕大鼠模型,探究瘢痕表皮细胞在烧伤后瘢痕中的作用及其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备 12周龄雄性SD大鼠(体重约500~600 g)购于斯贝福(苏州)生物技术有限公司[动物生产许可证号:SCXK(苏)2022-0006]。将大鼠单独饲养于海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院实验动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0033],恒温恒湿环境(温度20~25℃,相对湿度50%~65%)、自由进食和饮水条件下适应性饲养1周后用于实验。参照既往研究,在大鼠背部采用94~98℃沸水浸烫4 s的方法建立背部大面积烧伤模型^[8-9]。烫伤后10~14 d开始脱痂时,使用碘伏和氯己定进行消毒,每天换药,直至瘢痕完全愈合。本研究经海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院实验动物

伦理委员会审批[CHEC(A.E)2023-034]。

1.2 通路筛选 对烧伤后瘢痕模型大鼠($n=3$)背部瘢痕予30 mJ低能量CO₂点阵激光干预(CO₂激光治疗仪,型号为CHX-100H,武汉高科恒光电有限公司),设定间隔时间3.0 ms、点间距0.8 mm。于干预前和干预后第3天分别切取瘢痕组织0.5 cm×0.5 cm(长×宽),修剪去除皮下组织,置于0.5%分散酶II(dispase II)溶液中,37℃下消化1 h以分离表皮。分离后的表皮组织进行转录组测序(由上海伯豪生物技术有限公司完成),筛选差异表达基因,使用RStudio软件对差异表达基因进行京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。结合既往研究^[10-13],筛选出最可能的机制——Wnt/ β -联蛋白通路。

1.3 分组干预 将18只烧伤后瘢痕模型大鼠随机分为3组:对照组($n=6$)、激光组($n=6$)和激光+抑制剂组($n=6$)。激光组予CO₂点阵激光干预(点能量30 mJ,间隔时间3.0 ms,点间距0.8 mm),激光+抑制剂组在相同激光干预基础上于激光干预前1天、干预当天和干预后1天在瘢痕皮下注射Wnt/ β -联蛋白通路抑制剂IWR-1(10 μ g/cm²瘢痕面积),对照组不予激光干预。3组均于干预当天及干预后第1、2、3、5、10、15、30天时拍照记录,并切取0.5 cm×0.5 cm(长×宽)全层瘢痕组织用于后续检测。由于瘢痕愈合是一个漫长的过程,对照组未进行干预,实验期间各时间点检测结果变化不明显,本研究结果呈现时以第1次拍照

取材的结果作为代表。

1.4 组织病理学染色 瘢痕组织经常规石蜡包埋、制片后,进行H-E、马松和天狼星红染色。在普通显微镜下观察表皮和真皮厚度、胶原分布、皮下组织和皮肤附属器的组织学形态,在偏振光显微镜下定性观察I型、III型胶原的含量及I/III型胶原的比例;分别使用 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(英国Abcam公司,货号为ab7817)、CD31抗体(英国Abcam公司,货号为ab182981)、Ki67抗体(英国Abcam公司,货号为ab16667)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(英国Abcam公司,货号为ab29)、细胞角蛋白19(cytokeratin 19, CK19)抗体(英国Abcam公司,货号为ab220193)、p63抗体(英国Abcam公司,货号为ab124762)、 β -联蛋白抗体(英国Abcam公司,货号为ab32572)、骨髓细胞瘤病毒癌基因(myelocytomatosis viral oncogene, c-Myc)抗体(英国Abcam公司,货号为ab32072)行免疫组织化学染色。随机选取6个400 $\times$ 的高倍镜视野(high power field, HPF)进行定量分析。

1.5 蛋白质印迹法 分离瘢痕表皮并提取蛋白质,经电泳、转膜后,分别加入 β -联蛋白抗体(英国Abcam公司,货号为ab32572)、糖原合成激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)抗体(美国CST公司,货号为12456T)、淋巴增强结合因子1(lymphoid enhancer-binding factor 1, LEF-1)抗体(英国Abcam公司,货号为ab137872)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)抗体(英国Abcam公司,货号为ab134175)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Engibody公司,货号为AT0009)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,随后使用HRP标记的山羊抗兔IgG(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号为LF102)室温下孵育2 h,显影曝光后用ImageJ软件分析条带的灰度值。

1.6 统计学处理 使用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析并绘图。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Tukey检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 低能量CO₂点阵激光干预后大鼠瘢痕表皮细胞被活化 大体观察(图1A)显示,背部大面积

烧伤后瘢痕模型大鼠在激光干预后即刻出现白色点状微热损伤区,干预后第1天时瘢痕充血红肿最为显著,随后逐渐变浅,第10天恢复至干预前的状态。H-E染色结果(图1B)显示,低能量激光主要作用于瘢痕表皮全层,对真皮浅层仅造成轻微损伤。激光干预后即刻,瘢痕皮肤中可见倒锥形的微热损伤区,表皮全层被气化形成空白的气化区;干预后第1~2天,渗出物凝结成倒圆锥状的痂,其下表皮细胞逐渐填补激光造成的表皮缺损;干预后第3~5天,表皮层整体增厚,表皮缺损被表皮细胞完全填补;干预后第10~15天,增厚的表皮层逐渐变薄,表皮厚度逐渐恢复至干预前的状态。

免疫组织化学染色结果(图2)显示,对照组表皮仅有基底层存在极少量Ki67阳性和PCNA阳性细胞,表皮深部2/3层散在分布极少量CK19阳性和p63阳性细胞;激光干预后第1~5天,上述阳性细胞数量和层数开始增加,干预后第5天达到最多,瘢痕表皮基底层Ki67阳性细胞数量增加了2.2倍[(31.33 $\pm$ 1.53)/HPF vs (9.67 $\pm$ 2.08)/HPF, $P<0.05$]、PCNA阳性细胞数量增加了3.1倍[(34.33 $\pm$ 4.04)/HPF vs (8.33 $\pm$ 2.08)/HPF, $P<0.05$]、表皮深部2/3层中的CK19阳性细胞数量增加了2.6倍[(44.33 $\pm$ 4.04)/HPF vs (12.33 $\pm$ 1.53)/HPF, $P<0.05$]、p63阳性细胞数量增加了1.9倍[(47.67 $\pm$ 6.43)/HPF vs (16.67 $\pm$ 4.04)/HPF, $P<0.05$]、伴随表皮层的增厚;随后阳性细胞数逐渐减少,至干预后第15天时基本恢复至干预前的状态。上述结果表明,激光干预后瘢痕表皮细胞被活化。

2.2 低能量CO₂点阵激光激活瘢痕表皮细胞通路筛选 取激光干预前和干预后第3天的瘢痕组织分离表皮组织后行转录组测序,结果显示,与激光干预前相比,激光干预后第3天瘢痕组织共有283个基因表达上调,125个基因表达下调(图3A)。对差异表达基因进行KEGG通路富集分析,对富集程度前30位的信号通路进行排序并绘制气泡图。结果表明,激光干预后第3天,多条与细胞增殖相关的信号通路(Wnt/ β -联蛋白信号通路、TNF信号通路、p53信号通路等)被激活(图3B)。结合既往研究报道^[10-13],选取Wnt/ β -联蛋白通路作为候选通路开展后续研究。

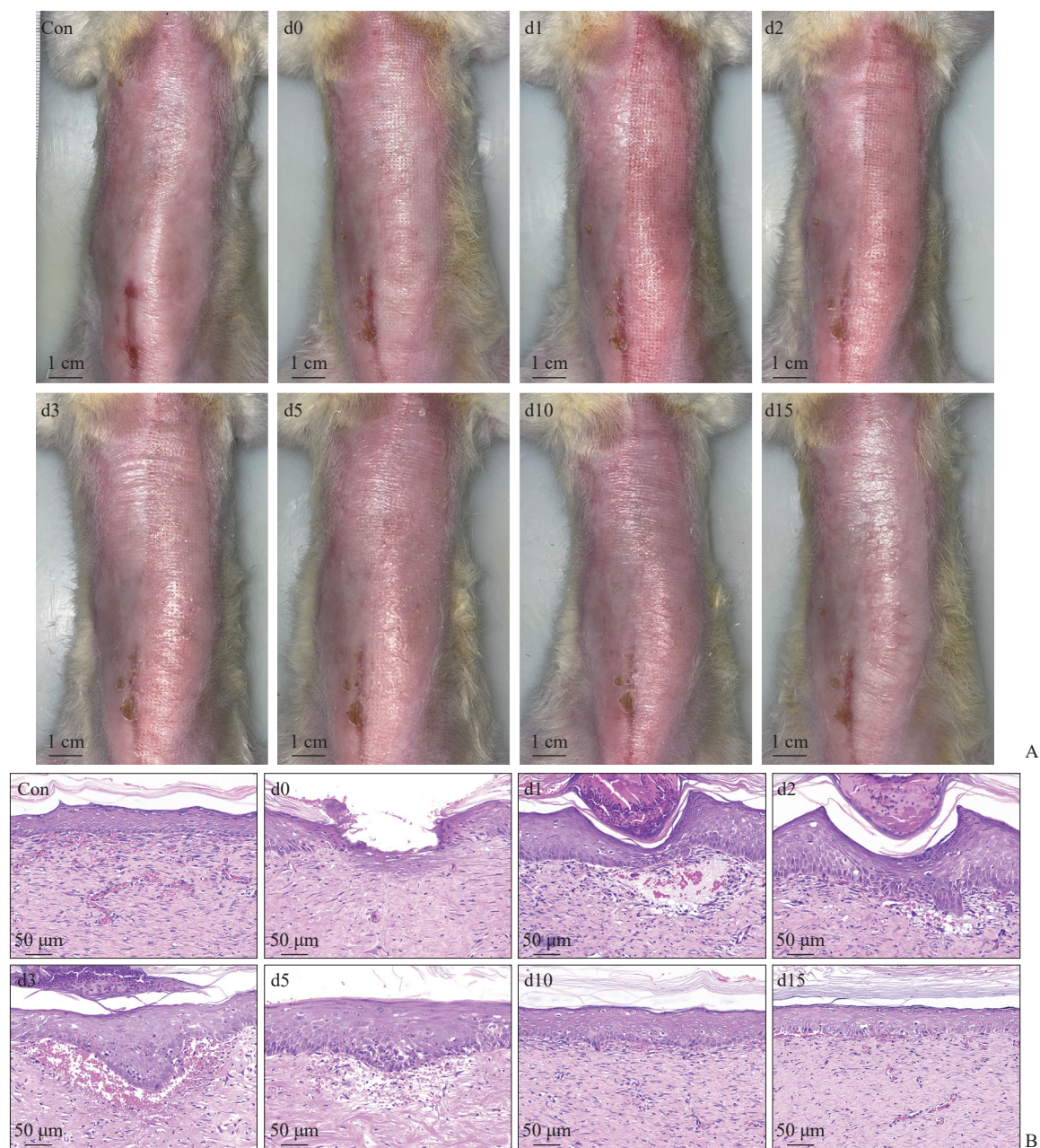


图 1 低能量 CO₂ 点阵激光干预后背部大面积烧伤瘢痕模型大鼠瘢痕的大体观察和组织病理学变化
Fig 1 Macroscopic observation and histopathological changes of scars after low-energy CO₂ fractional laser intervention in model of post-major burn scars on the back of rats

A: Macroscopic observation; B: H-E staining. Con: Control group; d0-d15: Day 0, day 1, day 2, day 3, day 5, day 10 and day 15 after low-energy CO₂ fractional laser intervention of the laser group, respectively. H-E: Hematoxylin-eosin.

2.3 Wnt/ β -联蛋白通路是低能量 CO₂ 点阵激光激活瘢痕表皮细胞的分子机制 免疫组织化学染色结果显示,背部大面积烧伤后瘢痕模型大鼠瘢痕表皮 β -联蛋白阳性程度在低能量激光干预后开始增强,表皮深部 2/3 层的 c-Myc 阳性细胞数量开始增多,至干预后第 3~5 天达到最强[对照组为 $(27.33 \pm 5.13) / \text{HPF}$, 激光组第 5 天为 $(90.67 \pm 8.51) / \text{HPF}$, $P < 0.05$], 并伴表皮层增厚,随后逐渐减弱,至干预后第 15 天时基本恢复至干预前的

状态(图 4A、4B)。蛋白质印迹法检测结果显示,瘢痕表皮中 β -联蛋白、LEF1 和 cyclin D1 的表达量在激光干预后第 1 天便显著上升, GSK-3 β 的表达量下降,变化趋势在干预后第 3~5 天达到高峰。第 5 天时, β -联蛋白、GSK-3 β 、LEF1 和 cyclin D1 的蛋白相对表达量分别为干预前的 (2.22 ± 0.61) 、 (0.54 ± 0.11) 、 (3.39 ± 0.29) 和 (4.32 ± 0.65) 倍(均 $P < 0.05$), 随后逐渐恢复,至干预后第 15 天时基本恢复至干预前的状态(图 4C)。

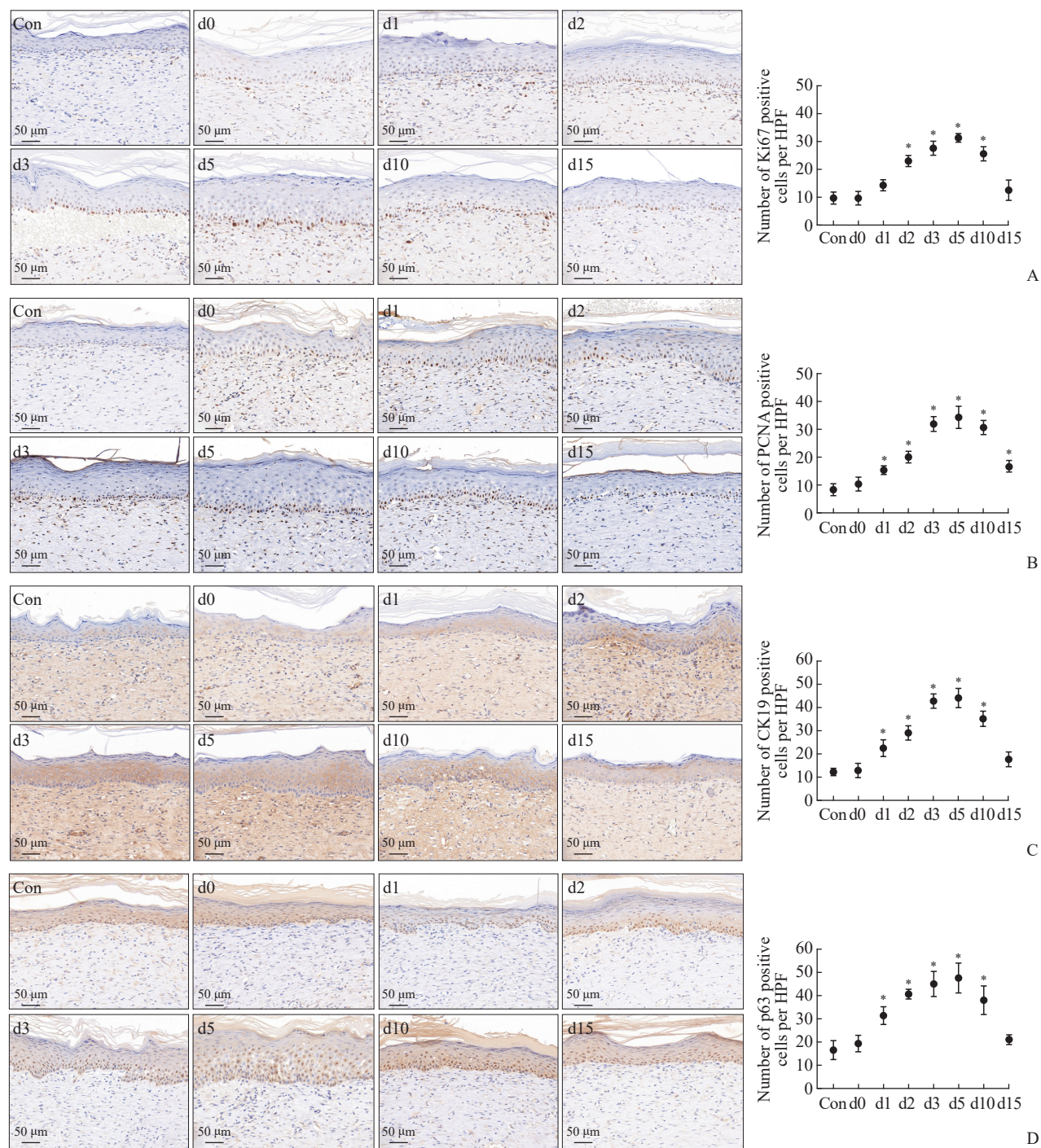


图 2 低能量 CO₂ 点阵激光干预后背部大面积烧伤瘢痕模型大鼠瘢痕表皮细胞活化情况

Fig 2 Activation of scar epidermal cells after low-energy CO₂ fractional laser intervention in model of post-major burn scars on the back of rats

A-D: Immunohistochemical staining results of Ki67, PCNA, CK19, and p63, respectively. Con: Control group; d0-d15: Day 0, day 1, day 2, day 3, day 5, day 10 and day 15 after low-energy CO₂ fractional laser intervention of the laser group, respectively. * $P < 0.05$ vs Con. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; CK19: Cytokeratin 19; HPF: High power field.

在激光干预基础上给予瘢痕内注射 Wnt/ β - 联蛋白通路抑制剂 IWR-1 后, β - 联蛋白阳性细胞数及 β - 联蛋白、LEF1、cyclin D1、GSK-3 β 表达量均未观察到显著变化 (图 5), c-Myc 阳性细胞数未见明显增加 [对照组为 (26.67 $\pm$ 4.16) /HPF, 抑制

剂组第 5 天为 (27.00 $\pm$ 2.65) /HPF, $P > 0.05$]。进一步检测瘢痕表皮细胞活化情况, 结果显示注射 IWR-1 后, 瘢痕表皮未见明显增厚, Ki67 [对照组为 (7.66 $\pm$ 1.53) /HPF, 抑制剂组第 5 天为 (5.67 $\pm$ 3.06) /HPF, $P > 0.05$]、PCNA [对照组为 (6.67 $\pm$

2.08) /HPF, 抑制剂组第 5 天为 (12.33±3.51) /HPF, $P>0.05$]、CK19 [对照组为 (10.33±2.08) /HPF, 抑制剂组第 5 天为 (12.33±1.53) /HPF, $P>0.05$] 和 p63 [对照组为 (17.33±1.53) /HPF, 抑制剂组第 5 天为 (20.67±1.53) /HPF, $P>0.05$] 阳性细胞数均无明显增多 (图 6)。这说明 IWR-1

有效抑制了低能量激光诱发的 β - 联蛋白阳性程度增强, c-Myc 阳性细胞数量和层数增多, β - 联蛋白、LEF1、cyclin D1 表达量上升, GSK-3 β 表达量下降, 瘢痕表皮增厚, 以及 Ki67、PCNA、CK19、p63 阳性细胞数增多等现象。

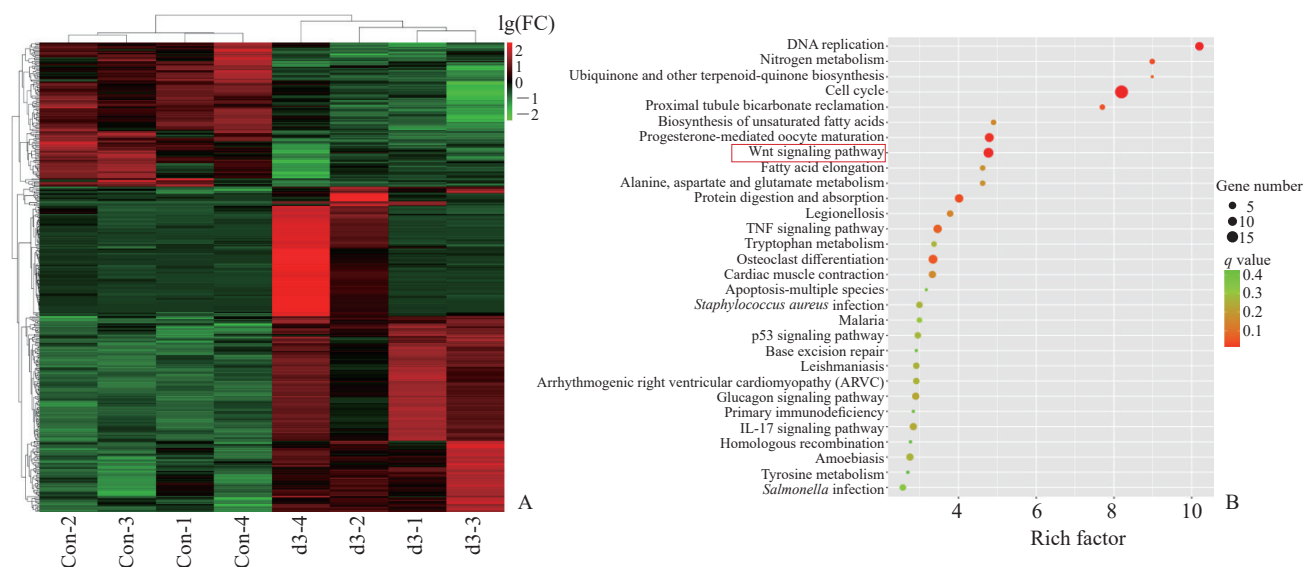


图 3 低能量 CO₂ 点阵激光干预前后背部大面积烧伤瘢痕模型大鼠瘢痕表皮组织转录组测序分析

Fig 3 RNA sequencing analysis of epidermal tissue of scars before and after low-energy CO₂ fractional laser intervention in model of post-major burn scars on the back of rats

A: Heatmap of differentially expressed genes; B: Bubble plot of the top 30 enriched KEGG pathways for differentially expressed genes. Con-1-4: No. 1-4 samples before intervention, respectively; d3-1-4: No. 1-4 samples on day 3 after CO₂ fractional laser intervention, respectively. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; FC: Fold change; TNF: Tumor necrosis factor; IL-17: Interleukin 17.

上述结果证实, 低能量 CO₂ 点阵激光可在干预后第 2~10 天激活瘢痕表皮细胞 Wnt/ β - 联蛋白通路, Wnt/ β - 联蛋白通路抑制剂在激光干预后 15 d 内可有效抑制瘢痕表皮 Wnt/ β - 联蛋白通路激活和细胞活化。因此, 可以认为 Wnt/ β - 联蛋白通路是低能量激光激活瘢痕表皮细胞的分子机制。

2.4 抑制 Wnt/ β - 联蛋白通路逆转低能量 CO₂ 点阵激光对烧伤后瘢痕的改善效应 实验干预后第 30 天取各组大鼠瘢痕组织进行组织病理学检测。H-E 和马松染色结果 (图 7A) 显示, 激光组大鼠瘢痕表皮厚度较对照组变薄 [(49.73±5.41) μ m vs (66.97±5.82) μ m, $P<0.01$], 而激光+抑制剂组大鼠瘢痕表皮厚度与对照组相比差异无统计学意义 [(66.22±4.72) μ m vs (66.97±5.82) μ m, $P>0.05$]。对照组和激光+抑制剂组大鼠瘢痕真皮呈均质深染、内含大量成纤维细胞, 激光组大鼠瘢痕真皮内存在淡染区和无胶原分布的间

隙区; 激光组大鼠瘢痕真皮厚度较对照组变薄 [(1.32±0.09) mm vs (1.59±0.12) mm, $P<0.01$], 而激光+抑制剂组大鼠瘢痕真皮厚度与对照组相比差异无统计学意义 [(1.55±0.09) mm vs (1.59±0.12) mm, $P>0.05$]。免疫组织化学染色结果 (图 7B) 可见, 激光组瘢痕中 α -SMA 阳性成纤维细胞数 [(52.17±11.70) /HPF] 较对照组 [(88.17±10.30) /HPF] 和激光+抑制剂组 [(83.50±11.31) /HPF] 均明显减少 (均 $P<0.01$), 而 CD31 阳性微血管数 [(15.33±2.94) /HPF] 与对照组 [(16.67±2.73) /HPF] 和激光+抑制剂组 [(16.17±3.49) /HPF] 相比差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。天狼星红染色结果 (图 7C) 显示, 与对照组和激光+抑制剂组相比, 激光组瘢痕真皮中橙黄色 I 型胶原和绿色 III 型胶原含量均减少且分布更加疏松, 且 I 型 / III 型胶原的比例下降, 而激光+抑制剂组和对照组间无明显差异。

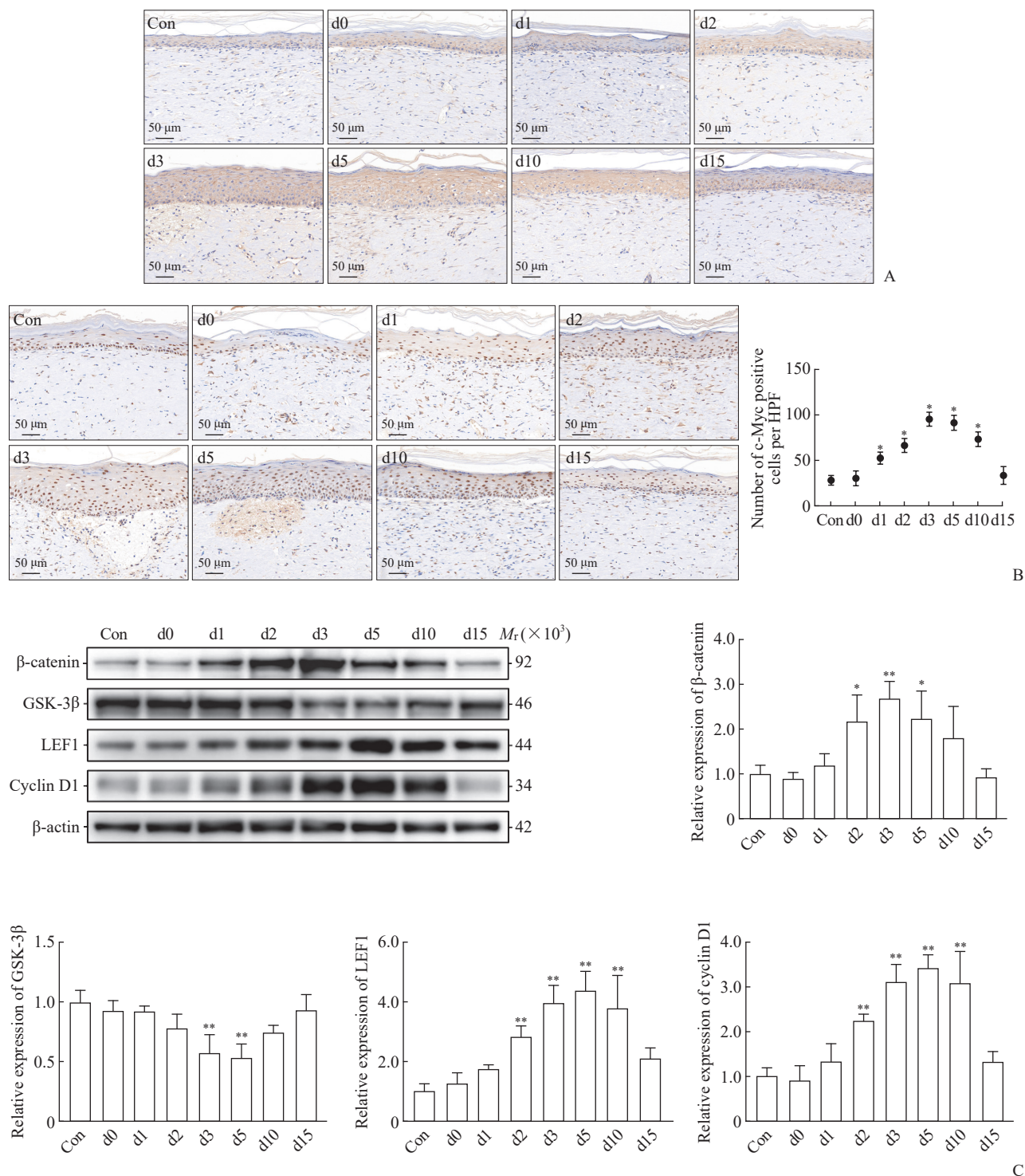


图 4 低能量 CO₂ 点阵激光干预后背部大面积烧伤瘢痕模型大鼠瘢痕表皮 Wnt/β- 联蛋白信号通路激活情况

Fig 4 Activation status of Wnt/β-catenin pathway in scar epidermis after low-energy CO₂ fractional laser intervention in model of post-major burn scars on the back of rats

A, B: Immunohistochemical staining results of β-catenin (A) and c-Myc (B); C: Western blotting analysis of protein expression in the Wnt/β-catenin pathway in scar epidermis tissue at different time points after laser intervention. Con: Control group; d0-d15: Day 0, day 1, day 2, day 3, day 5, day 10 and day 15 after low-energy CO₂ laser intervention of the laser group, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs d0. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. c-Myc: Myelocytomatosis viral oncogene; HPF: High power field; GSK-3β: Glycogen synthase kinase 3β; LEF1: Lymphoid enhancer-binding factor 1.

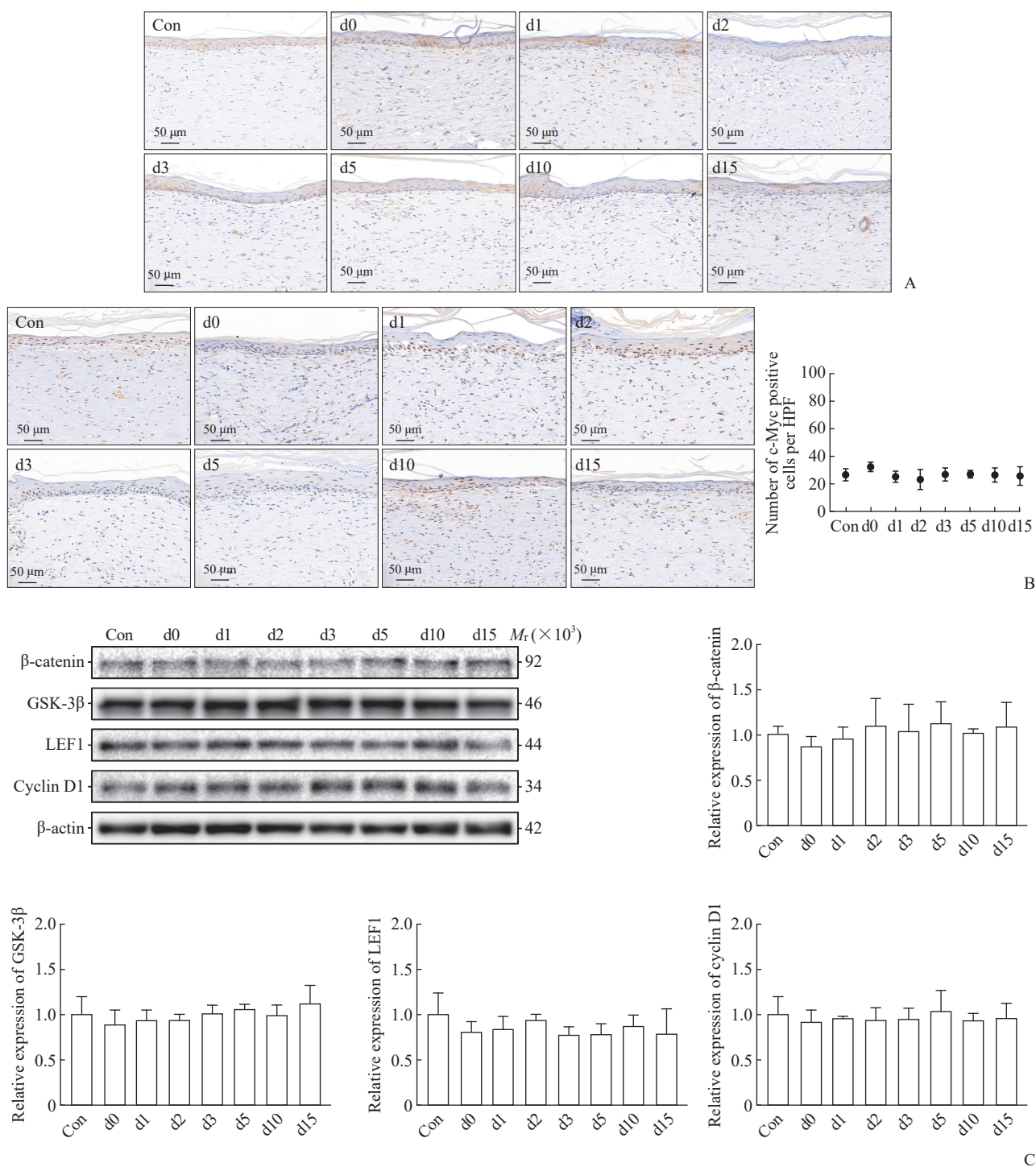


图 5 IWR-1 抑制低能量 CO₂ 点阵激光干预后背部大面积烧伤瘢痕模型大鼠瘢痕表皮 Wnt/β- 联蛋白信号通路激活

Fig 5 IWR-1 inhibiting the activation of the Wnt/β-catenin pathway in scar epidermis tissue after low-energy CO₂ fractional laser intervention in model of post-major burn scars on the back of rats

A, B: Immunohistochemical staining results of β-catenin (A) and c-Myc (B); C: Western blotting analysis of protein expression in the Wnt/β-catenin pathway in scar epidermis tissue at different time points after laser intervention. Con: Control group; d0-d15: Day 0, day 1, day 2, day 3, day 5, day 10 and day 15 after low-energy CO₂ laser intervention of the laser+IWR-1 group, respectively. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. c-Myc: Myelocytomatosis viral oncogene; HPF: High power field; GSK-3β: Glycogen synthase kinase 3β; LEF1: Lymphoid enhancer-binding factor 1.

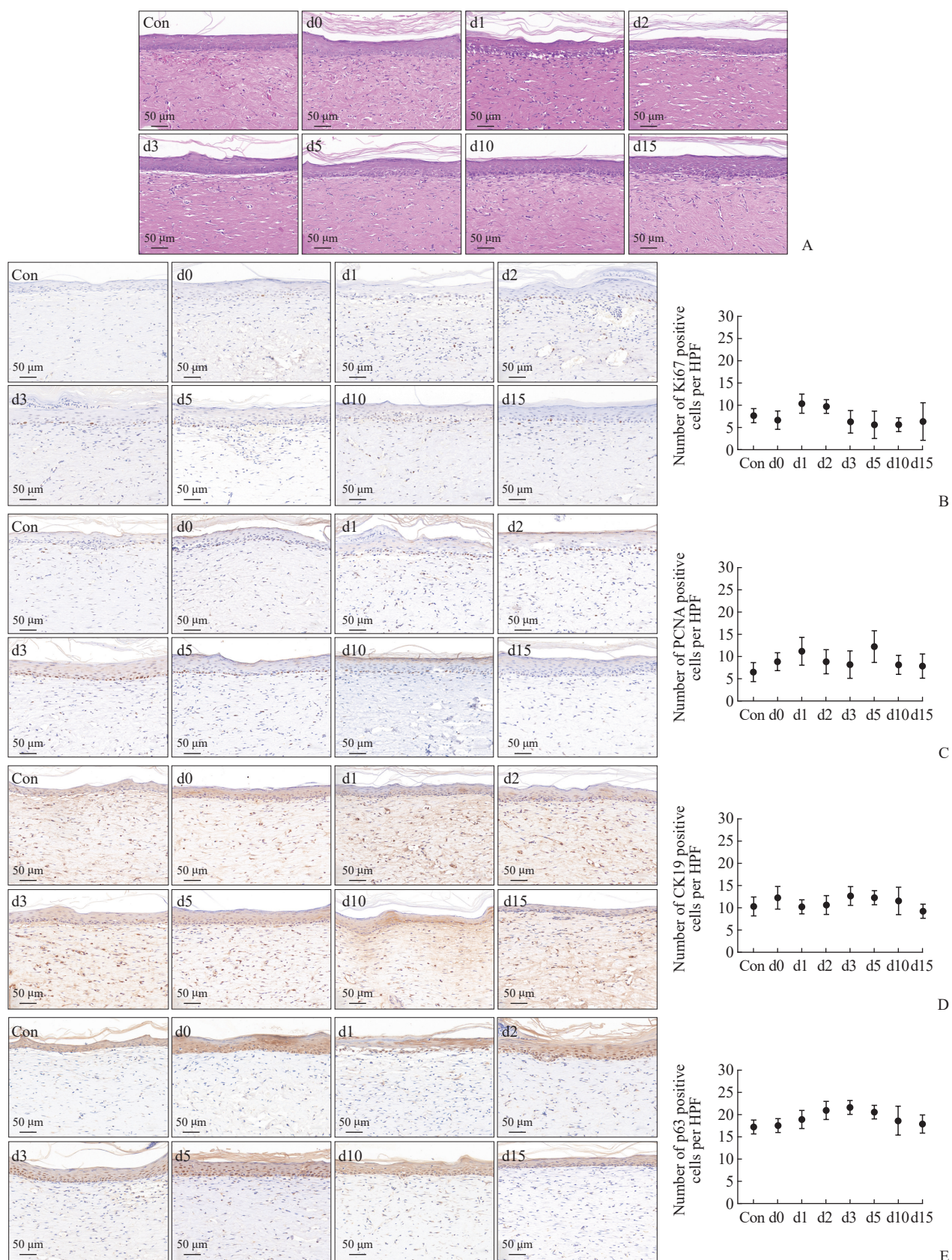


图 6 IWR-1 抑制低能量 CO₂ 点阵激光干预后背部大面积烧伤瘢痕模型大鼠瘢痕表皮细胞活化

Fig 6 IWR-1 inhibiting the activation of scar epidermal cells after low-energy CO₂ fractional laser intervention in model of post-major burn scars on the back of rat

A: H-E staining; B-E: Immunohistochemical staining results of Ki67, PCNA, CK19, and p63, respectively. Con: Control group; d0-d15: Day 0, day 1, day 2, day 3, day 5, day 10 and day 15 after low-energy CO₂ fractional laser intervention of the laser+IWR-1 group, respectively. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. H-E: Hematoxylin-eosin; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; CK19: Cytokeratin 19; HPF: High power field.

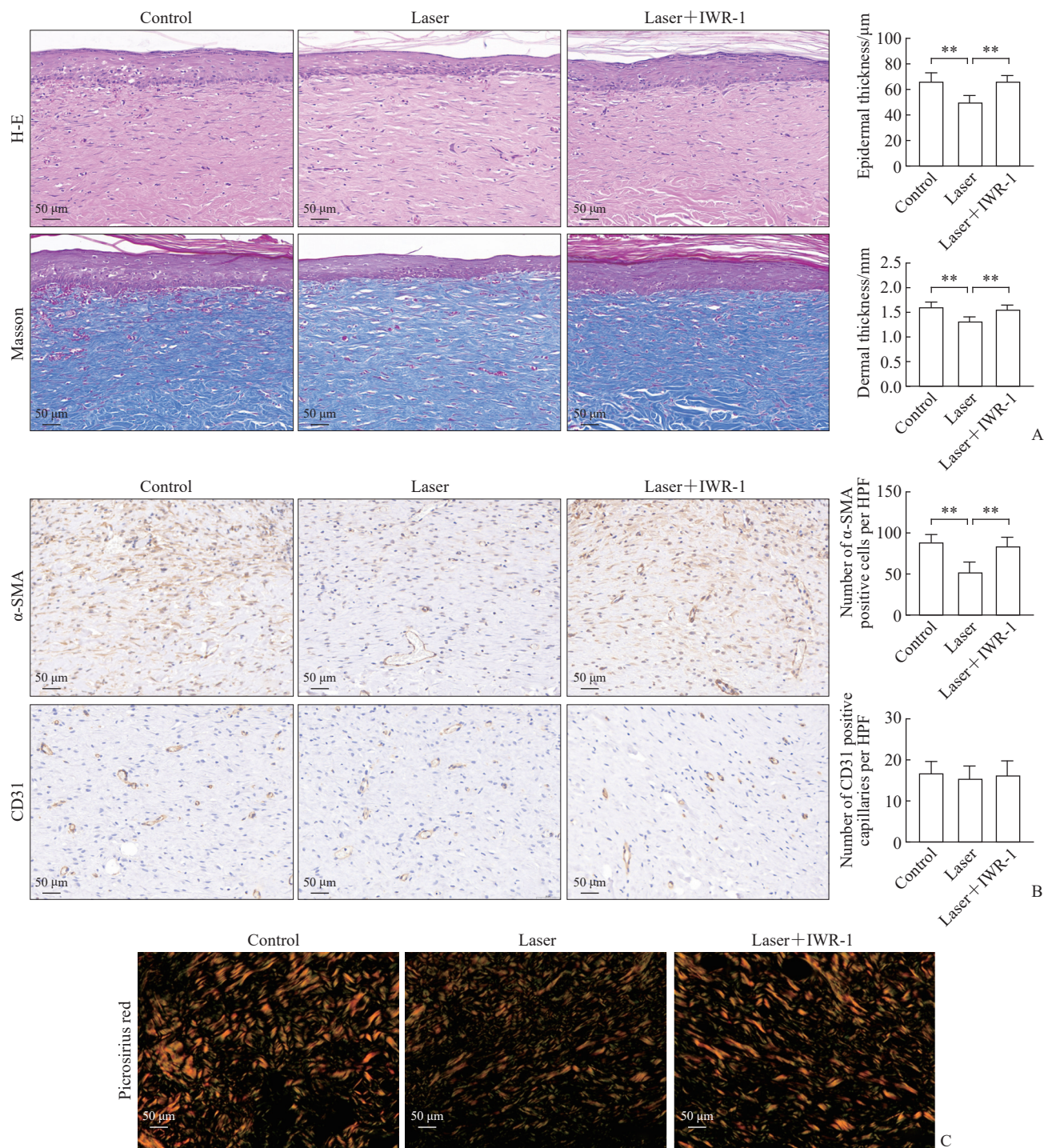


图 7 各组大鼠实验干预后第 30 天瘢痕组织病理学改变

Fig 7 Histological changes of scar tissue 30 d after intervention in rats in each group

A: H-E and Masson staining; B: Immunohistochemical staining results of α -SMA and CD31; C: Picrosirius red staining observed under a polarised light microscope. ** $P < 0.01$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. H-E: Hematoxylin-eosin; α -SMA: α -smooth muscle actin; HPF: High power field.

上述结果表明,低能量 CO_2 点阵激光可有效治疗大鼠背部大面积烧伤后瘢痕,该疗效可被 Wnt/ β -联蛋白通路抑制剂逆转。综合上述研究结果,可以认为低能量 CO_2 点阵激光通过激活瘢痕表皮细胞 Wnt/ β -联蛋白通路改善大鼠背部大面积烧伤后瘢痕。

3 讨论

瘢痕的主要病变位于瘢痕真皮,其特征为大量活化的成纤维细胞及过量分泌的胶原蛋白,因此既往治疗瘢痕主要针对瘢痕的真皮。传统理论认为,

CO₂ 点阵激光治疗瘢痕的机制为“胶原重塑”，即激光直接作用于真皮组织诱发胶原重新排列，进而改善瘢痕^[6]。然而，非成纤维细胞（角质形成细胞、血管内皮细胞和朗格汉斯细胞等）在创面修复和瘢痕形成过程中也发挥了重要作用^[14]。再上皮化时间是目前临床上预测烧伤后瘢痕是否发生及其严重程度的最主要依据^[15-16]：若烧伤创面在 10 d 内愈合，瘢痕发生率约为 0~6%，而一旦愈合时间超过 21 d，瘢痕发生率高达 50%~83%^[17]。此外，角质形成细胞-成纤维细胞相互作用已被证实与伤口愈合及瘢痕形成密切相关，与单独培养的成纤维细胞相比，同活化表皮细胞共培养的成纤维细胞可以合成分泌 10 倍量的胶原酶从而分解胶原、促进胶原重塑，提示表皮细胞对瘢痕的调控具有重要作用^[18]。在临床实践中也发现，作用于瘢痕表皮细胞的低能量 CO₂ 点阵激光也可有效改善瘢痕^[7]。这些证据均提示瘢痕表皮细胞可能在 CO₂ 点阵激光改善烧伤后瘢痕过程中发挥了重要作用。

既往研究表明，瘢痕在 CO₂ 点阵激光治疗后，伴随“胶原重塑”的同时，表皮细胞也发生了相应的改变，但这些研究并未将其作为激光治疗机制进行研究，仅作为伴随现象进行了报道。谭军等^[19]的研究显示，CO₂ 点阵激光作用于兔耳浅表性瘢痕后，与细胞增殖分化相关的 CK19、p63 的表达增加，免疫组织化学染色显示这些蛋白散在分布于表皮基底层。Won 等^[7]的研究显示，增生性瘢痕患者在经 CO₂ 点阵激光治疗后，瘢痕表皮厚度显著增加，而角质层变薄。上述证据高度提示，点阵激光能够通过瘢痕表皮细胞对瘢痕进行调控，但其具体机制尚不清楚。本研究证实了低能量 CO₂ 点阵激光干预后大鼠的瘢痕表皮细胞的确被短期活化，并进一步研究证明了 Wnt/β- 联蛋白通路在这个过程中发挥了重要作用。

在皮肤中，Wnt/β- 联蛋白通路在表皮发育、毛囊发生和组织再生中发挥着至关重要的作用^[12-13,20]。β- 联蛋白是 Wnt 通路的关键介质，可活化干细胞并促进上皮再生，抑制 β- 联蛋白和 c-Myc 会抑制表皮细胞的迁移和分化，导致慢性创面的形成^[21-22]。点阵激光等激光干预可对皮肤造成微损伤，从而启动皮肤损伤修复相关的生物学过程。CO₂ 点阵激光、Er:YAG 激光等激光干预均可促进 C57 小鼠的毛发生长，其机制为激光提高了 Wnt 蛋白的表达，激活

了皮肤 Wnt/β- 联蛋白通路，促进了毛囊从休止期进入生长期^[9]。也有研究表明，点阵激光干预后，皮肤中成纤维细胞生长因子 9 表达升高，激活 Wnt/β- 联蛋白通路从而诱导伤口愈合^[10]。本研究通过转录组测序及组织病理学和分子生物学实验也证实激光可激活瘢痕表皮细胞 Wnt/β- 联蛋白通路，提示其可能在激光改善瘢痕中发挥了重要作用。

本研究也存在一些不足：（1）本研究表明抑制 Wnt/β- 联蛋白通路可逆转低能量 CO₂ 点阵激光对瘢痕表皮细胞的活化，但未使用 Wnt/β- 联蛋白通路激动剂来模拟激光对瘢痕表皮细胞的活化效应、进一步佐证点阵激光是通过激活 Wnt/β- 联蛋白通路来活化瘢痕表皮细胞。（2）尚未阐明被活化的瘢痕表皮细胞是如何作用于瘢痕真皮，进而改善烧伤后瘢痕整体情况。

综上所述，本研究结果显示低能量 CO₂ 点阵激光可通过激活瘢痕表皮 Wnt/β- 联蛋白通路活化瘢痕表皮细胞，进而改善大鼠烧伤后瘢痕，其具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] FINNERTY C C, JESCHKE M G, BRANSKI L K, et al. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury[J]. *Lancet*, 2016, 388(10052): 1427-1436. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31406-4.
- [2] LV K, XIA Z; Chinese consensus panel on the prevention and treatment of scars. Chinese expert consensus on clinical prevention and treatment of scar[J]. *Burns Trauma*, 2018, 6: 27. DOI: 10.1186/s41038-018-0129-9.
- [3] BOMBARO K M, ENGRAV L H, CARROUGHER G J, et al. What is the prevalence of hypertrophic scarring following burns?[J]. *Burns*, 2003, 29(4): 299-302. DOI: 10.1016/s0305-4179(03)00067-6.
- [4] 周浩, 卫牧娟, 陈郑礼, 等. 2007—2017 年烧伤后瘢痕研究的文献计量学分析[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(1): 94-98. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.01.0094. ZHOU H, WEI M J, CHEN Z L, et al. Bibliometrics analysis on research status of scar caused by burns from 2007 to 2017[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2019, 40(1): 94-98. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.01.0094.
- [5] CONFORTI C, VEZZONI R, GIUFFRIDA R, et al. An overview on the role of CO₂ laser in general dermatology[J]. *Dermatol Ther*, 2021, 34(2): e14692. DOI: 10.1111/dth.14692.

- [6] FU X, DONG J, WANG S, et al. Advances in the treatment of traumatic scars with laser, intense pulsed light, radiofrequency, and ultrasound[J]. *Burns Trauma*, 2019, 7: 1. DOI: 10.1186/s41038-018-0141-0.
- [7] WON T, MA Q, CHEN Z, et al. The efficacy and safety of low-energy carbon dioxide fractional laser use in the treatment of early-stage pediatric hypertrophic scars: a prospective, randomized, split-scar study[J]. *Lasers Surg Med*, 2022, 54(2): 230-236. DOI: 10.1002/lsm.23459.
- [8] XI P, LI Y, GE X, et al. Effect of nano-silver hydrogel coating film on deep partial thickness scald model of rabbit[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(4): 797-800. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.09.002.
- [9] MEHRABANI M, SEYYEDKAZEMI S M, NEMATOLLAHI M H, et al. Accelerated burn wound closure in mice with a new formula based on traditional medicine[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2016, 18(11): e26613. DOI: 10.5812/ircmj.26613.
- [10] LIM X, TAN S H, KOH W L, et al. Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling[J]. *Science*, 2013, 342(6163): 1226-1230. DOI: 10.1126/science.1239730.
- [11] LICHTENBERGER B M, MASTROGIANNAKI M, WATT F M. Epidermal β -catenin activation remodels the dermis via paracrine signalling to distinct fibroblast lineages[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10537. DOI: 10.1038/ncomms10537.
- [12] WU Y F, WANG S H, WU P S, et al. Enhancing hair follicle regeneration by nonablative fractional laser: assessment of irradiation parameters and tissue response[J]. *Lasers Surg Med*, 2015, 47(4): 331-341. DOI: 10.1002/lsm.22330.
- [13] ZHENG Z, KIM J, CHOI M J, et al. Histometric changes and epidermal FGF9 expression in carbon photoenhancer-assisted Nd: YAG laser treatment[J]. *J Dermatolog Treat*, 2014, 25(4): 278-282. DOI: 10.3109/09546634.2012.723121.
- [14] SINGER A J. Healing mechanisms in cutaneous wounds: tipping the balance[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2022, 28(5): 1151-1167. DOI: 10.1089/ten.TEB.2021.0114.
- [15] WERNER S, KRIEG T, SMOLA H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(5): 998-1008. DOI: 10.1038/sj.jid.5700786.
- [16] AMIRI N, GOLIN A P, JALILI R B, et al. Roles of cutaneous cell-cell communication in wound healing outcome: an emphasis on keratinocyte-fibroblast crosstalk[J]. *Exp Dermatol*, 2022, 31(4): 475-484. DOI: 10.1111/exd.14516.
- [17] DEITCH E A, WHEELAHAN T M, ROSE M P, et al. Hypertrophic burn scars: analysis of variables[J]. *J Trauma*, 1983, 23(10): 895-898.
- [18] CUI H S, JOO S Y, LEE S Y, et al. Effect of hypertrophic scar fibroblast-derived exosomes on keratinocytes of normal human skin[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6132. DOI: 10.3390/ijms24076132.
- [19] 谭军, 雷颖, 李高峰, 等. 超脉冲CO₂点阵激光干预兔耳浅表性瘢痕的原位再生[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(2): 228-234. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.008.
- [20] HWANG S B, PARK H J, LEE B H. Hair-growth-promoting effects of the fish collagen peptide in human dermal papilla cells and C57BL/6 mice modulating Wnt/ β -catenin and BMP signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11904. DOI: 10.3390/ijms231911904.
- [21] 周思维, 王宇, 左权, 等. 血清剥夺抑制心肌细胞增殖、促进凋亡及对P53和Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(2): 157-161. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.02.0157.
- [22] JERE S W, HOURELD N N. Regulatory processes of the canonical Wnt/ β -catenin pathway and photobiomodulation in diabetic wound repair[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4210. DOI: 10.3390/ijms23084210.

[本文编辑] 孙 岩