DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00549

·研究快报·

重组人血管内皮抑制素对兔耳增生性瘢痕 VEGF 和 TIMP-1 表达的影响

王　棚[1],江黎珠[2],薛　斌[3*]
1. 重庆市大足区人民医院骨科,重庆 402360
2. 重庆市大足区人民医院耳鼻喉科,重庆 402360
3. 重庆医科大学附属第一医院烧伤整形科,重庆 400016

[摘要]　**目的**　探讨重组人血管内皮抑制素作用于兔耳增生性瘢痕后对瘢痕中血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1)表达的影响。**方法**　新西兰大白兔 16 只,建立兔耳增生性瘢痕动物模型。模型建立成功后,将其随机分为实验组和对照组,每组 8 只。实验组瘢痕局部注射 0.1 mL 5 mg/mL 的重组人血管内皮抑制素,隔日 1 次,共 5 次;对照组局部注射 0.1 mL 生理盐水,隔日 1 次,共 5 次。在药物干预 30 d 后观察瘢痕大体变化并留取标本,用 RT-PCR 方法检测 *VEGF* 和 *TIMP*-1 mRNA 表达水平的变化,用免疫组织化学方法检测瘢痕组织中 TIMP-1 蛋白表达水平的变化。**结果**　药物干预 30 d 后实验组兔耳瘢痕中 *VEGF* 和 *TIMP*-1 mRNA 表达量分别为 0.279 0±0.030 7、0.244 4±0.057 4,对照组分别为 0.657 0±0.161 1、0.730 2±0.103 8,实验组表达水平均低于对照组($P<0.05$)。实验组兔耳瘢痕中 TIMP-1 蛋白阳性表达水平低于对照组($P<0.05$)。**结论**　重组人血管内皮抑制素能抑制兔耳增生性瘢痕组织形成,其机制可能与抑制 VEGF 和 TIMP-1 表达有关。

[关键词]　瘢痕;血管内皮生长因子类;基质金属蛋白酶抑制剂 1;重组人血管内皮抑制素
[中图分类号]　R 622.9　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　0258-879X(2013)05-0549-04

Effect of recombinant human endostatin on VEGF and TIMP-1 expression in hypetrophic scar of rabbit ears

WANG Peng[1], JIANG Li-zhu[2], XUE Bin[3*]
1. Department of Orthopedics, People's Hospital of Dazu District, Chongqing 402360, China
2. Department of Otolaryngology, People's Hospital of Dazu District, Chongqing 402360, China
3. Department of Burn and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[**Abstract**]　**Objective**　To investigate the effect of recombinant human endostatin on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in hypertrophic scar (HS) of rabbit ears. **Methods**　A total of 16 New Zealand rabbits were used to establish ear HS models. The model rabbits were evenly randomized into two groups: experimental group and control group. Rabbits in the experimental group were locally injected with recombinant human endostatin (0.1 mL, 5 mg/mL, every other day for five times) and those in the control group were injected with normal saline (0.1 mL, every other day for five times). The HS specimens were harvested 30 days after intervention and were grossly observed; RT-PCR was used to test the expression of *VEGF* and *TIMP*-1 mRNA, and TIMP-1 protein was examined by immunohistochemistry method. **Results**　The mRNA expression levels of *VEGF* and *TIMP*-1 in experimental group were significantly lower than that in control group (*VEGF*: 0.279 0±0.030 7 vs 0.657 0±0.161 1, $P<0.05$; *TIMP*-1: 0.244 4±0.057 4 vs 0.730 2±0.103 8, $P<0.05$). The protein expression level of TIMP-1 in experimental group was significantly lower than those in control group ($P<0.05$). **Conclusion**　Recombinant human endostatin can inhibit HS of rabbit ear, which might be through suppressing the expression of VEGF and TIMP-1.

[**Key words**]　cicatrix; vascular endothelial growth factors; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; recombinant human endostatin

[Acad J Sec Mil Med Univ,2013,34(5):549-552]

[收稿日期]　2013-02-03　　[接受日期]　2013-03-07

[作者简介]　王　棚,硕士. E-mail: wangpeng.2002@yahoo.com.cn
*通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012616, E-mail: 182315140@qq.com

增生性瘢痕(hypertrophic scar，HS)是皮肤创面愈合后继续发展的结果，创伤后成纤维细胞增殖失控，胶原过度合成沉积，导致真皮纤维化过度修复[1]。该病在黄种人和黑种人中发病率较高，达4%～16%[2]。HS是整形外科医师面临的一大难题，目前其治疗方法包括手术治疗、压迫治疗、射频治疗、放射治疗及激光治疗等，但这些方法都有各自不足之处。我们前期研究发现重组人血管内皮抑制素能抑制兔耳 HS 组织增生，同时观察到瘢痕组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)蛋白表达降低[3]。本研究在前期研究的基础上进一步观察重组人血管内皮抑制素注射液干预兔耳 HS 后对 VEGF 在 mRNA 水平以及基质金属蛋白酶抑制剂 1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1，TIMP-1)在 mRNA 和蛋白水平表达的影响，以探讨血管内皮抑制素抑制 HS 组织增生的可能分子机制。

1　材料和方法

1.1　*动物和试剂*　成年雄性新西兰大白兔 16 只，体质量(2.00±0.12) kg，重庆医科大学动物实验中心提供[许可证号：SCXK（渝）20020001]。兔抗 VEGF 多克隆抗体、兔抗 TIMP 多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司，重组人血管内皮抑制素注射液由山东先声麦得津生物制药有限公司赠送。SABC 试剂盒、DAB 酶底物显示试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司，PBS 粉剂、多聚赖氨酸购于北京中杉金桥生物技术有限公司。TRIzol 试剂盒、RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司。

1.2　*实验分组和处理*　兔耳 HS 模型的建立见前期研究[3]。兔耳 HS 造模成功后，将 16 只兔随机分为实验组和对照组，每组 8 只，每只兔 12 个创面。实验组于瘢痕基底及瘢痕灶内注射浓度为 5 mg/mL 的重组人血管内皮抑制素注射液 0.1 mL，隔日 1 次，共 5 次；对照组于瘢痕基底及瘢痕灶内注射 0.1 mL 生理盐水，隔日 1 次，共 5 次。兔耳创面上皮化后开始干预(造模术后第 25 天，共 128 个创面形成外观凸起的瘢痕组织)，药物干预后 30 d 终止动物实验，处死动物，切取标本，一分为二，一份用灭菌灭酶的铝箔包好快速置入液氮冷冻 1 h 后转入－80℃冰箱保存，一份用 10%甲醛溶液固定。

1.3　*RT-PCR 法检测组织中 VEGF、TIMP-1 mRNA 表达水平*　按照 TRIzol 试剂盒说明，抽提每份冰冻组织标本的总 RNA，利用紫外分光光度计测定其纯度并定量。根据 GenBank 提供的 *VEGF*、*TIMP*-1 和内参照 *β-actin* 的 mRNA 序列，应用软件 Primer Premier 5.0 自行设计引物并交 Invitrogen 公司合成。*VEGF* 上游引物：5′-CAT ATT CAA GCC TTC CTG C-3′，下游引物：5′-GGT CTG CAT TCA CAT TTG TTG-3′；*TIMP*-1 上游引物：5′-GCA ACT CCG ACC TTG TCA TC-3′，下游引物：5′-AGC GTA GGT CTI GGT GAA GC-3′；*β-actin* 上游引物：5′-GGC TAT AAC TTC ACC ACG ACG-3′，下游引物：5′-CAA TCC AAA CGG AAT ACT TGC-3′。采用 RT-PCR 试剂盒进行反转录及 PCR 扩增。PCR 反应参数：预变性 94℃ 2 min；94℃ 30 s，55℃或 60℃ 30 s，72℃ 1 min，40 个循环；72℃延伸 10 min 后结束扩增反应。取 5 μL PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶(内含溴乙锭)电泳 50 min，紫外灯下观察，采用凝胶成像系统存储和分析图像，以目的条带与 *β-actin* 的灰度值之比作为 mRNA 表达量。

1.4　*免疫组织化学染色*　染色步骤：石蜡切片常规脱蜡、水化，微波抗原修复，DAB 显色，苏木精复染，分化、返蓝，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。以 PBS 取代一抗为阴性对照，重复以上步骤。光镜下观察结果。

结果判定标准：根据阳性反应的强度及面积判断结果，对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别给予 0、1、2、3 分；着色阳性面积按无着色或着色＜1%为 0 分，1%～20%为 1 分，21%～50%为 2 分，≥51%为 3 分，阳性细胞的阳性强度及着色阳性面积相加的总分即为表达程度评分：两者相加之和小于 2 分为阴性(－)，2 分至 3 分为弱阳性（＋），大于 3 分为强阳性(＋＋)；然后根据评分判断其结果[4]。

1.5　*统计学处理*　所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件分析，RT-PCR 结果的比较采用 t 检验，免疫组化结果分析采用秩和检验。检验水平(α)为 0.05。

2　结　果

2.1　*两组瘢痕组织中 VEGF 和 TIMP-1 mRNA 表达情况*　由图 1 可见，*VEGF* mRNA 条带在 186 bp 处表达，其中实验组的 *VEGF* mRNA 条带明显比对照组条带暗；*TIMP*-1 mRNA 条带在 326 bp 处表达，其中实验组的 *TIMP*-1 mRNA 条带明显比对照组条带暗。实验组 *VEGF* mRNA 表达量

(0.279 0±0.030 7)与对照组(0.657 0±0.161 1)差异有统计学意义($P<0.05$)，*TIMP*-1 mRNA 表达量(0.244 4±0.057 4)与对照组(0.730 2±0.103 8)差异亦有统计学意义($P<0.05$)。

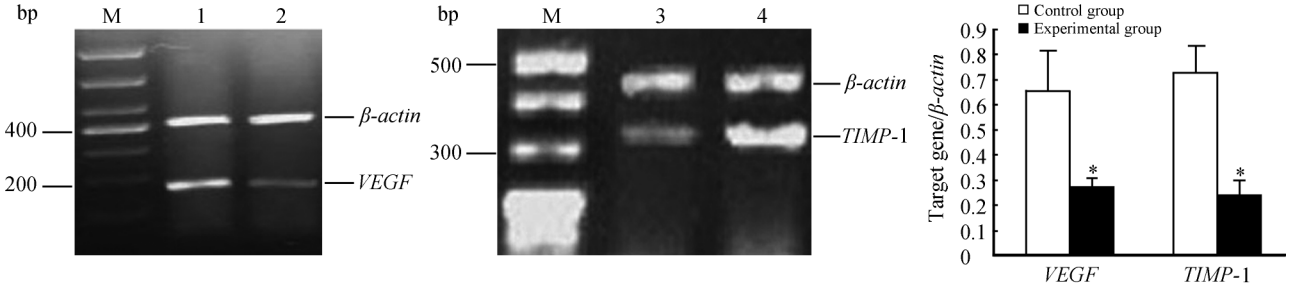

图 1　两组瘢痕组织中 *VEGF* 和 *TIMP*-1 mRNA 表达情况

Fig 1　Expression of *VEGF* and *TIMP*-1 mRNA in hypetrophic scar of rabbit ears

VEGF: Vascular endothelial growth factor; TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1. M: Marker; 1,4: Control group; 2,3: Experimental group. $^*P<0.05$ vs control group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$

2.2　两组瘢痕组织中 TIMP-1 蛋白的表达情况　TIMP-1蛋白阳性信号为棕黄色颗粒，主要位于血管内皮细胞、真皮成纤维细胞胞质及细胞间质中(图 2)。药物干预 30 d 后实验组中 28 个创面 TIMP1 呈阴性表达，31 个创面为＋，5 个创面为＋＋；对照组中 8 个创面为阴性表达，40 个创面为＋，16 个创面为＋＋。统计学分析表明，实验组 TIMP-1 蛋白表达水平低于对照组($P<0.05$)。

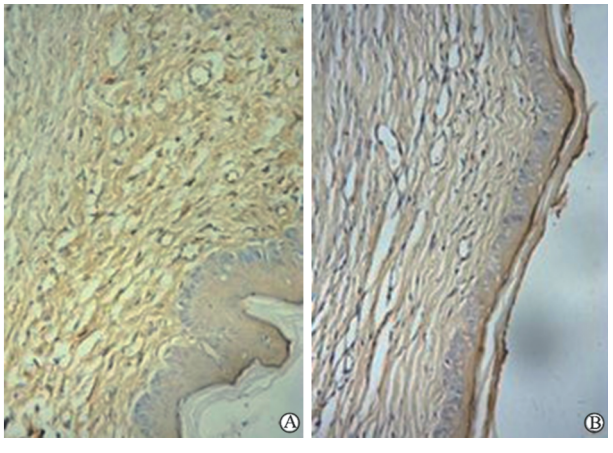

图 2　两组瘢痕组织中 TIMP-1 蛋白的表达情况

Fig 2　Expression of TIMP-1 protein in hypetrophic scar of rabbit ears between two groups

TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1. A: Control group; B: Experimental group. Original magnification: ×200

3　讨　论

HS 是一种病理性瘢痕，是创伤修复过度的结果，其特点是病损突出于皮肤的表面但局限于原有损伤范围之内。内皮抑制素是内源性血管形成抑制因子之一，能特异性地作用于内皮细胞，控制新生血管内皮细胞的增殖，诱导其凋亡，抑制其迁移，从而抑制血管生成和肿瘤生长[5]，达到抗肿瘤的作用，为治疗恶性肿瘤提供了新的途径[6]。HS 的发展与肿瘤的生长具有相似性，均依赖于新生血管的形成。我们前期研究发现重组人血管内皮抑制素能抑制兔耳 HS 组织增生，同时观察到瘢痕组织中 VEGF 蛋白表达降低[3]。

VEGF 是对血管形成具有特异性的重要生长因子，可促进血管内皮细胞增殖、分化、运动和迁移[7]。沈锐等[8]研究发现，烧伤后瘢痕中 VEGF 表达量随瘢痕的增生而增多，伤后 4～6 个月瘢痕增生活跃，局部组织中的 VEGF 浓度达到最高峰，之后随瘢痕的成熟而降低。谭赵云等[9]研究发现 VEGF 在 HS 中高表达，其表达的强度与 HS 的临床分期、隆起高度、硬度、充血程度及伴随痛痒等症状密切相关，说明 VEGF 在 HS 的发生发展中扮演着重要角色。在本实验中，我们发现经重组人血管内皮抑制素作用于兔耳 HS 后，实验组瘢痕组织中 *VEGF* mRNA 表达水平低于对照组($P<0.05$)，故我们推测重组人血管内皮抑制素可能通过抑制 VEGF 表达抑制兔耳 HS 的形成。

TIMP-1 由成纤维细胞和肌成纤维细胞分泌，与器官的纤维化疾病密切相关[10]。当有病理性瘢痕出现时，TIMP-1 在瘢痕局部被检测到表达增高[11]。有研究发现使 HS 成纤维细胞增殖受抑的同时 TIMP-1 表达降低[12]，说明 TIMP-1 是 HS 形成的关键因子，抑制 TIMP-1 的表达可能有助于降解胶原等细胞外基质，从而达到防治 HS 的目的。在

本实验中，我们发现经重组人血管内皮抑制素作用于兔耳 HS 后，实验组瘢痕组织中 *TIMP*-1 mRNA 水平和 TIMP-1 蛋白阳性表达水平均低于对照组（$P<0.05$），故我们推测重组人血管内皮抑制素可能通过抑制 TIMP-1 表达抑制兔耳 HS 的形成。

综上所述，重组人血管内皮抑制素可抑制兔耳 HS 组织形成，其机制可能与抑制 VEGF 和 TIMP-1 的表达有关。因本研究仅是初步探讨，更深入的分子机制有待进一步研究。目前重组人血管内皮抑制素主要应用于肿瘤治疗，对于在人 HS 中的应用国内还未见报道，这将是我们进一步努力的方向。

4　利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] 高明月，蔺　洁，张文显. 增生性瘢痕的防治现状与展望[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2010，14：3753-3756.

[2] Satish L，Lyons-Weiler J，Hebda P A，Wells A. Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts[J]. Wound Repair Regen，2006，14：463-470.

[3] 王　棚，薛　斌，江黎珠，雷　彬，宋鹏宇，丁云鹏，等. 重组人血管内皮抑制素可抑制兔耳增生性瘢痕[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011，15：8689-8692.

[4] 方　荃，马少林，董祥林. 仙人掌提取物对兔耳增生性瘢痕组织块中胶原Ⅰ、Ⅲ及基质金属蛋白酶-1 表达的影响[J]. 新疆医科大学学报，2007，30：568-571.

[5] 李荔霞，郑积华，张为民. 重组人血管内皮抑制素临床应用进展[J]. 癌症进展，2009，7：175-178.

[6] 刘芝兰，刘　颖，陈建兵. 血管内皮抑制素的作用机制和临床应用[J]. 中国医师进修杂志（内科版），2007，30：68-70.

[7] 段泽星，谢立群. VEGF 在肿瘤生长和血管生成中的作用[J]. 世界华人消化杂志，2010，18：2894-2900.

[8] 沈　锐，利天增，祁少海，李叶扬，谢举临，徐盈斌，等. 血管内皮细胞生长因子在烧伤后肉芽组织和增生性瘢痕中的表达[J]. 中国康复理论与实践，2002，8：1-2.

[9] 谭赵云，赵柏程，钱　利，郭　军. COX-2 和 VEGF 在增生性瘢痕中的表达及其临床意义[J]. 中国美容整形外科杂志，2008，19：348-351.

[10] 丁明桥，许朝霞，陈　瑞，王　鹏. 银杏叶提取物对肺纤维化大鼠模型肺组织 MMP-9 及 TIMP-1 表达的影响[J]. 北京中医药，2011，30：869-871.

[11] 张　鹏，纪　亮，李静平，沈　雷，陈永春，李云峰. MMP-1 和 TIMP-1 在人增生性瘢痕中的动态变化[J]. 中国现代医学杂志，2010，20：1665-1668.

[12] 吴建明，汪滋民，吴包金，林子豪，江　华，袁湘斌，等. 核酶对人皮肤瘢痕成纤维细胞增殖和 TIMP-1 表达的影响[J]. 第二军医大学学报，2005，26：30-33.
Wu J M，Wang Z M，Wu B J，Lin Z H，Jiang H，Yuan X B，et al. Effect of ribozyme on TIMP-1 expression and proliferation fibroblasts in human skin scars[J]. Acad J Sec Mil Med Univ，2005，26：30-33.

[本文编辑]　尹　荼

· 书　讯 ·

《常见病原生物图解》已出版

《常见病原生物图解》由朱淮民、任浩主编，第二军医大学出版社出版，ISBN 978-7-5481-0565-7，32 开，定价：25.00 元。

《常见病原生物图解》以图文并茂的形式，简明扼要地介绍了常见细菌、病毒、真菌、原虫和寄生虫等感染性病原生物。主要针对病原生物的形态、结构、致病机制和病原学检查进行阐述。该书实用性强，可供医学院校师生参考使用，也可作为基层医务工作者的培训教材。

该书由第二军医大学出版社发行科发行，全国各大书店均有销售。

通讯地址：上海市翔殷路 800 号，邮编：200433

发行电话：021-65493093

http://www.smmup.cn