

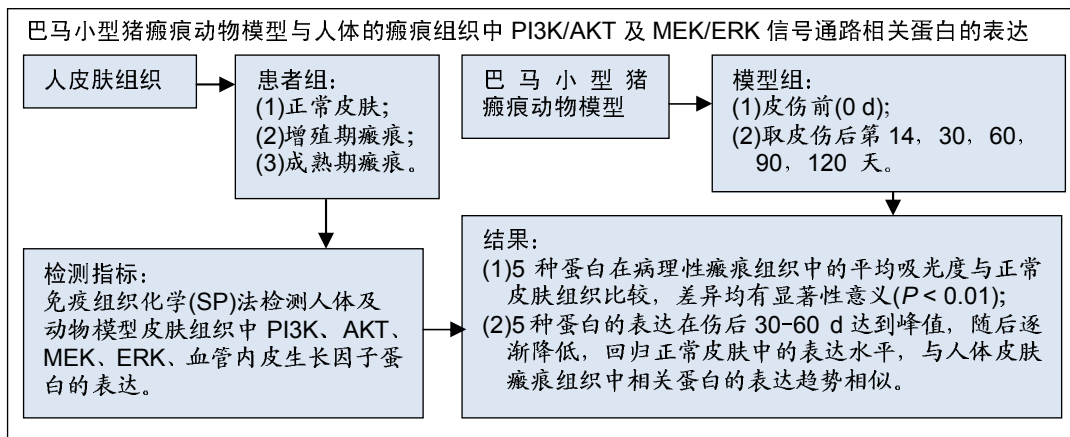
巴马小型猪与人体瘢痕组织中PI3K/AKT和MEK/ERK信号通路相关蛋白的表达趋势相似性研究

李晨晨^{1,2}, 柳柏梅^{1,2}, 刘阳^{1,2}, 吕营^{1,2}, 崔普东^{1,2}, 安美文^{1,2} (1太原理工大学应用力学与生物医学工程研究所, 山西省太原市 030024; 2山西省材料强度与结构冲击重点实验室, 山西省太原市 030024)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1312

ORCID: 0000-0001-6902-8448(李晨晨)

文章快速阅读:



李晨晨, 女, 1993 年生, 陕西省晋中市人, 汉族, 太原理工大学在读硕士, 主要从事软组织力学研究。

通讯作者: 安美文, 博士, 教授, 太原理工大学应用力学与生物医学工程研究所, 山西省太原市 030024; 山西省材料强度与结构冲击重点实验室, 山西省太原市 030024

文献标识码: B

稿件接受: 2019-02-16



文题释义:

PI3K/AKT 信号通路: 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3Ks)信号参与体内细胞的增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种生理功能, 近年来发现 IA 型 PI3K 和下游分子蛋白激酶 B(PKB 或 Akt)组成的信号途径与人类皮肤瘢痕组织形成的关系密切。

MEK/ERK 信号通路: 胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的一员, 它的信号传递途径是涉及调节细胞生长、发育及分裂的信号网络的核心, 其基本的信号传递步骤遵循 Ras-Raf-MEK-ERK 途径。

摘要

背景: 增生性瘢痕的发生原因、发生时间、发生的对象以及治疗方式是当前研究的重点与难点。研究表明, 磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)信号通路及其下游因子在细胞增殖与凋亡、侵袭与迁移、血管生成以及致纤维化等过程中发挥了重要作用。

目的: 分析巴马小型猪瘢痕动物模型与人体的瘢痕组织中 PI3K/AKT 及 MEK/ERK 信号通路相关蛋白的表达, 探讨巴马小型猪作为动物瘢痕模型的可行性。

方法: 人皮肤标本来源于太钢总医院山西省烧伤救治中心整形外科; 猪皮肤标本来源于课题组前期建立的巴马小型猪瘢痕动物模型。所有患者均了解试验的过程并自愿参加。研究方案由太钢总医院伦理委员会讨论通过并经动物实验伦理委员会批准。将人皮肤标本分为正常皮肤组、增殖期瘢痕组、成熟期瘢痕组; 巴马小型猪瘢痕模型根据伤后取材时间分为 0 d 组(对照组)、14 d 组、30 d 组、60 d 组、90 d 组和 120 d 组。采用免疫组织化学法检测人体及猪模型不同皮肤组织中 PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子蛋白的表达。

结果与结论: ①PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子蛋白在瘢痕动物模型的正常皮肤组织中呈阴性表达, 在病理性瘢痕组织中呈阳性表达, 且平均吸光度与正常皮肤组织比较, 差异均有显著性意义($P < 0.01$); ②5 种蛋白的表达在伤后 30-60 d 达到峰值, 随后逐渐降低, 回归正常皮肤中的表达水平, 与人体皮肤瘢痕组织中相关蛋白的表达趋势相似; ③在巴马小型猪皮肤与人体皮肤组织中 PI3K/AKT 和 MEK/ERK 信号通路相关蛋白的表达趋势具有相似性, 为巴马小型猪是瘢痕形成机制研究的理想动物模型提供了又一个证据。

关键词:

增生性瘢痕; PI3K/AKT 信号通路; MEK/ERK 信号通路; 动物模型; 血管内皮生长因子

中图分类号: R446

基金资助:

国家自然科学基金(11372208, 31870934), 项目负责人: 安美文

缩略语:

磷脂酰肌醇-3 激酶: phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K; 蛋白激酶 B: protein kinase B, AKT; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶: mitogen-activated protein kinase, MEK; 细胞外信号调节激酶: extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2

Li Chenchen, Master candidate, Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China; Shanxi Provincial Key Laboratory of Material Strength and Structural Impact, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Corresponding author: An Meiwen, PhD, Professor, Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China; Shanxi Provincial Key Laboratory of Material Strength and Structural Impact, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China

Trend similarity of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways related protein expression in the hypertrophic scar of Bama pigs and human

Li Chenchen^{1,2}, Liu Baimei^{1,2}, Liu Yang^{1,2}, Lü Ying^{1,2}, Cui Pudong^{1,2}, An Meiwen^{1,2} (¹Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China; ²Shanxi Provincial Key Laboratory of Material Strength and Structural Impact, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Etiology, time, subjects and treatment methods of hypertrophic scar are issues of concern and difficulties. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) and mitogen-activated protein kinase (MEK)/ extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) signaling pathways and downstream factors have been shown to play an important role in cell proliferation and apoptosis, invasion and migration, angiogenesis and fibrosis.

OBJECTIVE: To explore the feasibility of Bama pig as an animal model of hypertrophic scar by analyzing the expression and distribution of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways related proteins in the hypertrophic scar model of human and Bama pigs.

METHODS: Human samples were from the Department of Plastic of Tisco General Hospital Shanxi Burn Treatment Center, and the pig skin samples were from the previous Bama pig model of scar established by our group. All patients signed the informed consents, and the study was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Tisco General Hospital. The human samples were divided into normal skin, hypertrophic scar and mature scar groups. The Bama pig models of scar were divided into 0 day (control group), 14-, 30-, 60-, 90-, and 120-day groups. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of PI3K, AKT, MEK, ERK and vascular endothelial growth factor proteins in the human and pig skin tissues.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The expression of PI3K, AKT, MEK, ERK, and VEGF protein in the normal skin tissue of animal model of scar was negative, and positive in pathological scar. The average absorbance value showed significant difference compared with the normal skin tissues ($P < 0.01$). (2) The expression of the five proteins peaked at 30-60 days after injury, and then decreased gradually to the normal level, which was similar to the trend in human skin scar tissue. (3) To conclude, the protein expression level related to PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways in Bama pig skin is similar to human skin, which provides evidence for using Bama pig as animal model to study the mechanism of scar formation.

Key words: hypertrophic scar; PI3K/AKT signaling pathway; MEK/ERK signaling pathway; animal model; vascular endothelial growth factor
Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 11372208 and 31870934 (both to AMW)

0 引言 Introduction

增生性瘢痕是真皮损伤后一种常见的病理现象,临床上表现为质硬、发红且伴有瘙痒、高出正常皮肤,严重挛缩时会造成功能障碍,影响患者的正常活动,甚至会影响到其心理健康^[1-4]。随着分子生物学的发展,与增生性瘢痕形成相关的各类细胞因子及其信号转导通路成为了近年研究的热点。其中,磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2)信号通路及其下游因子在细胞增殖与凋亡、侵袭与迁移、血管生成以及致纤维化等过程中发挥了重要作用^[5-6]。文章研究了人体与动物模型的瘢痕组织及正常皮肤组织中这2条信号通路的相关蛋白表达水平随时间的变化趋势及差异,探究巴马小型猪瘢痕动物模型的实用性及有效性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 建立巴马小型猪瘢痕动物模型,并收集瘢痕皮肤样本;同时,在医院收集人皮肤样本。采用免疫组织化学(SP)法检测人体及动物模型瘢痕组织中PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子蛋白的表达。

1.2 时间及地点 实验于2017年9月至11月在材料强度与结构冲击山西省重点实验室完成。

1.3 材料 人皮肤标本来源于太钢总医院山西省烧伤救治中心整形科;猪皮肤标本来源于课题组前期建立的巴马

小型猪瘢痕动物模型^[7]。其中人增生性瘢痕患者10例,男7例,女3例,临床均有瘢痕形成史,年龄最小6岁,最大58岁;瘢痕形成时间短则1个月,最长3年;病变位于胸腹部4例、四肢4例、头面部2例;4例有皮肤烧伤、4例有烫伤、2例有不同原因的创伤等损伤史。正常皮肤组织取自临床手术切除的带有正常皮肤组织的病变标本。取材标本术前均未接受药物及其他治疗,所有患者均了解实验的过程并自愿参加此次研究。研究方案由太钢总医院伦理委员会讨论通过,并经动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和国家法规。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 根据农晓琳等^[8]的分类方法,将人皮肤组织分为:正常皮肤、增殖期瘢痕、成熟期瘢痕。

瘢痕动物模型组: 3头雌性巴马小型猪,体质量21-23 kg,取皮前使用电动剃毛刀剃去背部毛发,清水清洗干净后用聚维酮碘及75%乙醇消毒皮肤。肌肉注射舒泰50麻醉后,使动物侧位平躺于手术台上,在脊柱两侧各画出2块面积为8 cm×8 cm、前后间隔12 cm的区域并注射生理盐水进行常规术前备皮。用电动取皮刀造成深度1.8 mm(涉及真皮层)的创面。形成创面后不做任何药物处理,简单止血并包扎伤口,取皮后3 d拆除包扎,使创面自然愈合。于伤后0, 14, 30, 60, 90, 120 d不同时间点分别麻醉后取创面皮肤组织^[7]。

1.4.2 免疫组织化学技术检测5种蛋白表达 以皮肤组织作为阳性对照片;阴性对照片用PBS代替一抗,切片

脱蜡至水，微波修复抗原，二抗按试剂盒说明书进行操作，DAB显色，苏木精复染，二甲苯透明后中性树脂胶封固，光镜下观察。观察着棕色者为阳性染色，于×200光镜下观察，每张切片随机选取5个完整而不重叠的视野拍照，应用Image-Pro Plus 6.0软件检测积分吸光度，求其均值作为此切片的平均吸光度值(平均A值)，进行统计学分析。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	分析巴马小型猪瘢痕动物模型与人体的瘢痕组织中PI3K/AKT及MEK/ERK信号通路相关蛋白的表达
借鉴已有标准实施动物造模:	参考文献[7]课题组前期建立的巴马小型猪瘢痕动物模型
选择动物的条件:	①巴马小型猪; ②雌性; ③体质量21-23 kg
猪皮肤标本来源:	课题组前期建立的巴马小型猪瘢痕动物模型 ^[7]
模型与所研究疾病的关系:	探讨巴马小型猪作为动物瘢痕模型的可行性
造模技术描述:	①巴马小型猪肌肉注射舒泰50麻醉后,常规术前备皮; ②在脊柱两侧各画出2块面积为8 cm×8 cm、前后间隔12 cm的区域,用电动取皮刀造成深度为1.8 mm(涉及真皮层)的创面; ③形成创面后不做任何药物处理,简单止血并包扎伤口,取皮后3 d拆除包扎,使创面其自然愈合
动物数量及分组方法:	根据伤后取材时间分为0 d组、14 d组、30 d组、60 d组、90 d组和120 d组 ^[7]
造模成功评价指标:	用电动取皮刀造成深度为1.8 mm(涉及真皮层)的创面,不做任何药物处理,使创面自然愈合
造模后实验观察指标:	免疫组织化学(SP)法检测人体及动物模型不同皮肤组织中PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子蛋白的表达
造模后动物处理:	于伤后0, 14, 30, 60, 90, 120 d不同时间点分别麻醉后取皮肤组织 ^[7]
伦理委员会批准文件:	研究方案经太钢总医院动物实验伦理委员会批准

1.5 主要观测指标 免疫组织化学(SP)法检测人体及动物模型不同皮肤组织中PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子蛋白的表达。

1.6 统计学分析 根据图像分析系统计算后得到的所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,且均采用SPSS 22.0软件进行统计分析,各组之间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 巴马小型猪皮肤组织和人正常皮肤组织免疫组织化学观察 目标蛋白阳性表达信号呈棕黄色颗粒状,并且主要表达于细胞质中。在人体正常皮肤组织中,PI3K/AKT蛋白在表皮层呈阳性表达,在真皮层呈弱阳性表达;MEK蛋白在真皮层中呈阴性表达,ERK蛋白在真皮层中呈弱阳性表达,两者在表皮组织中表达较低;在病理组织中,AKT

蛋白呈强阳性表达;MEK蛋白在真皮层中表达较正常组增强,MEK/ERK蛋白在表皮层表达较正常组也明显增强。血管内皮生长因子蛋白在正常皮肤组织及病理组织中均呈阳性表达。在巴马小型猪正常皮肤组织中,血管内皮生长因子蛋白呈弱阳性表达,其余各蛋白的表达定位与人体正常皮肤组织相似;在病理瘢痕组织中,ERK蛋白呈强阳性表达,其余表达情况与人体病理组织大致相同。见图1。

2.2 巴马小型猪模型和人体皮肤组织PI3K/AKT蛋白表达见图2。

2.2.1 巴马小型猪模型 PI3K的平均A值在取皮后30 d和60 d的皮肤组织中略高于0 d组($P_{30}=0.007$; $P_{60}=0.112$),在取皮后90 d及120 d则逐渐下降回归至0 d组水平($P_{90} > 0.05$; $P_{120} > 0.05$);对于其下游因子AKT,取皮后14 d,平均A值显著低于0 d组($P_{14}=0.01$);取皮后30 d和60 d的组织中平均A值则显著高于0 d组和14 d组($P_{30}=0.000$, $P_{60}=0.000$),60 d组略高于30 d组;取皮后90 d及120 d,AKT的平均A值变化规律与PI3K一致($P_{90} > 0.05$; $P_{120} > 0.05$)。

2.2.2 人体皮肤组织 病理增殖期瘢痕组、成熟期瘢痕组PI3K的平均A值均显著高于正常组($P=0.003$, $P=0.007$),但增殖期瘢痕组、成熟期瘢痕组2组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。病理增殖期瘢痕组、成熟期瘢痕组的AKT的平均A值同样高于正常组($P=0.033$, $P=0.013$)。

2.3 巴马小型猪模型和人体皮肤组织MEK/ERK蛋白表达见图2。

2.3.1 巴马小型猪模型 MEK的平均A值在取皮后60 d皮肤组织中高于0 d组及其余各时间点组($P=0.000$),其余几组与0 d组相比较差异无显著性意义($P > 0.05$);ERK的平均A值随时间依次增高,并在取皮后30 d达到最高($P_{30}=0.000$),直到取皮后60 d时ERK的平均A值依然显著高于其余各组($P_{60}=0.003$),但略低于30 d组;取皮后60 d后ERK的平均A值与对照组比较差异无显著性意义($P_{90} > 0.05$; $P_{120} > 0.05$)。

2.3.2 人体皮肤组织 成熟期瘢痕组MEK/ERK的平均A值明显高于其余2组($P_{MC}=0.000$; $P_{EC}=0.019$),正常皮肤组、增殖期瘢痕组间2种蛋白的平均A值比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.4 血管内皮生长因子蛋白表达

2.4.1 巴马小型猪模型 血管内皮生长因子的平均A值在取皮后60 d显著高于对照组($P=0.000$),其余时间点平均A值相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.4.2 人体皮肤组织 增殖期瘢痕组血管内皮生长因子的平均A值较正常皮肤组显著升高($P=0.003$),成熟期瘢痕组则显著低于正常皮肤组($P=0.000$)。见图2。

3 讨论 Discussion

3.1 既往该领域研究的贡献和存在的问题 瘢痕是机体

创伤后皮肤组织过度修复的结果。病理性瘢痕分为增生性瘢痕和瘢痕疙瘩两类, 其中, 增生性瘢痕临床上表现为高于正常皮肤的红色纤维化组织, 质地较硬, 且常伴随瘙痒等症^[9-14]。当发生在面部或关节处等主要部位时, 可能会造成患者不同程度的功能障碍和心理障碍, 严重影响患者的生活质量。因此, 如何预防及治疗增生性瘢痕一直是整形外科、皮肤科研究的热点和难点问题。组织学切片分析增生性瘢痕的特点主要是成纤维细胞过度增殖, 细胞外基质过度合成、降解减少导致胶原纤维排列紊乱、各类蛋白多糖及糖蛋白过度沉积, 形成局部皮肤的纤维组织过度增生^[15-20]。至今, 增生性瘢痕的发病机制仍然没有被阐述清楚, 一般认为, 增生性瘢痕的形成是一个非常复杂的生物过程, 受到一系列特定基因的严格调控^[21-22]。基因控制细胞合成并分泌多种细胞因子, 细胞因子进而控制细胞外基质的合成分泌, 并且对细胞的增殖凋亡形成反馈调节^[23]。

近年来的研究证明, MEK/ERK与PI3K/AKT通路是2条重要的胞内信号转导通路, 在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、自噬以及血管生成等过程中发挥重要功能, 其调节异常与许多肿瘤的发生相关^[24-25]。国内外已有研究发现, 皮肤鳞状细胞癌组织中存在PI3K/AKT通路活化的现象, 其表达明显增强^[26]。恶性肿瘤中由于PI3K/AKT信号转导通路被异常活化, 导致肿瘤细胞增殖失控、刺激血管形成, 增强肿瘤细胞的侵袭转移能力。刘剑毅等^[27]发现, 在人增生性瘢痕提取的成纤维细胞中, 结缔组织生长因子可以激活PI3K/AKT信号通路, 当进一步使用PI3K抑制剂LY294002进行干扰时, 抑制剂可抑制这种激活作用。Paterno等^[28]的研究表明, 在小鼠模型中机械力可能通过增强AKT蛋白的表达进而增强细胞的存活率, 导致形成增生性瘢痕。除此以外, An等^[29]曾报道, miR-205-5p可通过抑制血管内皮生长因子的表达来抑制PI3K/AKT信号通路的表达, 从而减缓瘢痕疙瘩的发展。

Ras-Raf-MEK-ERK信号通路是生物体内另一条控制细胞多种病理及生理过程的信号通路, 其重要作用包括参与细胞的增殖、迁移与分化^[30]。Hu等^[31]的研究表明, ERK介导了瘢痕成纤维细胞中一型胶原蛋白的表达, 进而导致了兔耳瘢痕的形成。有研究发现, 新生血管的形成过程中, 内皮细胞内MEK/ERK信号通路发挥了重要作用, ERK分子可能通过抑制内皮细胞的增殖及迁移行为来影响新血管的生成, 提示MEK/ERK信号通路中的信号分子可能成为治疗血管生成相关疾病的靶向分子^[32-34]。

在课题组前期的基因测序实验中也已证明这2条重要的信号通路在增生性瘢痕形成过程中起重要作用。PCR结果表明, PI3K、AKT、MEK和ERK的mRNA表达水平在瘢痕形成及发展过程中呈现先升高再降低的趋势, 在取皮后120 d, 各基因表达基本回到正常皮肤表达水平^[7]。

在目前国内外的报道中, 增生性瘢痕的动物模型主要是裸鼠模型和兔耳模型^[35], 2种模型各有利弊, 所以至

今尚缺乏公认的理想瘢痕动物模型。Shetlar等^[36]研究者发现将人的瘢痕疙瘩组织移植到裸鼠背部皮下, 瘢痕组织不仅能够存活, 而且还可以维持原来的形态结构特点, 在此基础上, Kischer等^[37]建立了移植型的裸鼠瘢痕动物模型。由于这种模型的瘢痕组织并不是自身产生的, 在裸鼠身上可能会出现萎缩吸收的情况, 这与人体瘢痕组织的持久性存在着显著区别, 其次移植需要由患者提供, 导致实验的可重复性明显降低。随着对瘢痕动物模型的不断研究, 1997年, Morris等^[38]发现, 兔耳腹侧制作的创面在愈合过程中局部会产生与人体增生性瘢痕类似的瘢痕组织。而后, 李荟元等^[39-40]进一步研究了Morris的兔耳增生性瘢痕模型, 并建立了兔耳腹不同形状的创面。组织学结果显示70%的兔耳圆形创面可以形成与人增生性瘢痕类似的增生组织, 并且可以观察到这些瘢痕组织中的胶原纤维呈漩涡状排列, 甚至可观察到胶原结节。由此, 兔耳瘢痕动物模型受到了广泛的关注, 兔耳瘢痕模型是裸鼠模型的一大进步。但兔耳由于其结构的特点, 产生的瘢痕与耳软骨受损有一定的关系, 与人类产生增生性瘢痕的机制存在差异, 所以近年来也有不少学者选择猪作为研究对象, 巴马小型猪体型较小且遗传稳定, 在皮肤厚度、结构等很多特点上与人类皮肤相似^[41]。而且应用于临床治疗的异种供皮也是来源于猪皮肤^[42]。故研究巴马小型猪的皮肤增生性瘢痕模型具有一定的可行性。

3.2 作者研究区别于他人他篇的特点及局限性 课题组前期已成功构建巴马小型猪瘢痕模型, 并将此模型用于增生性瘢痕的压力治疗研究^[7]。此次实验在此基础上选择巴马小型猪瘢痕模型皮肤组织与人皮肤增生性瘢痕组织进行对比, 检测不同时间点MEK/ERK通路与PI3K/AKT通路相关蛋白的表达情况及分布定位。

课题组前期通过蛋白水平的研究发现, 在动物模型瘢痕组织中, MEK、ERK的表达均随时间的推移而增加, 并在取皮后60 d左右达到最高, 其表达水平和表达强度与猪正常皮肤组织的差异有统计学意义。MEK/ERK通路是一条作用机制比较明确的信号通路, 在多种病理过程中发挥了重要作用, 包括细胞增殖、生长、分化等^[43]。在瘢痕形成的初期, 成纤维细胞增殖异常, 控制细胞增殖生长和分化的MEK/ERK信号通路表达水平明显增高, 且在染色切片中可见大量增殖细胞。取皮后第120天, MEK、ERK表达水平较取皮后第60天时明显降低, 且接近正常皮肤中的表达水平, 提示此时成纤维细胞的增殖活性已经下降, 瘢痕增生减缓。

PI3K/AKT信号通路是近年来被广泛研究的一个生长因子信号转导途径, 激活后具有促进细胞增殖、迁移、抑制凋亡及血管生成等功能。AKT是PI3K下游一个重要的调节激酶, 参与多种细胞生命活动。研究结果显示, 在取皮后第30天和60天的瘢痕皮肤组织中, PI3K和AKT均呈现高表达, 其表达水平和表达强度与正常皮肤表皮组织差异有

显著性意义。取皮后第120天的皮肤组织中, PI3K和AKT的表达水平接近正常皮肤。研究结果提示PI3K/AKT信号通路是瘢痕形成及发展过程中的异常环节。马娜等^[44]报道, 病理性瘢痕皮肤组织中的PI3K表达高于正常皮肤组, 提示PI3K/AKT信号通路的激活参与了病理性瘢痕的发生。在人瘢痕组织中, AKT同样高表达, 但PI3K的表达却低于正常皮肤, 这可能是由于皮肤位置的差异或者瘢痕处于的时期不同造成的。

血管内皮生长因子是一种特异作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子^[45-46], 既能促进血管内皮细胞增殖迁移, 又能增加微血管的通透性, 促进物质交换, 有利于血管和基质细胞的生长。有研究发现, 在皮肤创伤修复的多个阶段中均可检测到血管内皮生长因子的表达^[47-50]。组织学水平观察可见, 病理性瘢痕组织中含有丰富的微血管, 新生的微血管为瘢痕组织提供了营养基础, 在其形成和发展过程中可能起到了不可或缺的作用。在瘢痕动物模型中, 伤口形成后, 血管内皮生长因子的表达随着时间推移逐渐增加, 取皮后第60天时, 皮肤样本的免疫组化结果显示, 血管内皮生长因子呈现高表达, 提示此时期血管内皮细胞增殖分裂异常活跃, 可能促进微血管的产生, 为瘢痕组织供养。取皮后第120天时, 血管内皮生长因子的表达回归正常水平, 此时的瘢痕很可能已经进入成熟期, 增殖活动减弱。与此对应的是, 在人早期的瘢痕组织中, 血管内皮生长因子呈高表达; 在后期的瘢痕组织中血管内皮生长因子表达下降, 并接近于正常皮肤中的表达水平。Zhu等^[51]报道, 在红杜洛克猪瘢痕模型中, 血管内皮生长因子表达水平在取皮4周后达到峰值, 然后降低到正常皮肤中的表达水平, 与此次实验结果基本一致。此外, 也有研究显示, 在大鼠皮肤全层切除的伤口模型中, 切除手术后3d是血管内皮生长因子的表达高峰, 随后表达逐渐下降^[52], 说明愈合早期的创面组织对新生微血管的需求量极大。因此, 血管内皮生长因子的高表达可能与新生毛细血管的数量有关, 从而形成了良好的循环系统, 为创伤的愈合尤其是肉芽组织的形成提供了物质基础。

3.3 研究的重要意义 综上所述, 课题组建立的动物瘢痕模型为连续研究病理性瘢痕的发生、发展过程提供了可能性, 且PI3K/AKT和MEK/ERK信号通路相关蛋白与人体皮肤组织中具有相似的分布情况及表达趋势, 提示该模型可以作为临床上研究人类皮肤瘢痕的模式。

致谢: 感谢国家自然科学基金(11372208, 31870934)的支持。感谢太钢总医院山西省烧伤救治中心侯春胜主任对课题的提出给予的启发和帮助。感谢安美文、刘阳、王立等老师在实验方案上给予的指导, 感谢柳柏梅师姐、吕管师兄和崔普东同学的帮助。

作者贡献: 实验设计为第一作者、通讯作者和第二作者, 实验参与者为全体作者, 第一作者成文, 通讯作者审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(11372208, 31870934)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题: 研究方案的实施符合《赫尔辛基宣言》和太钢总医院山西省烧伤救治中心对研究的相关伦理要求。实验方案经太钢总医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

知情同意问题: 人体皮肤标本的供者及其家属在充分了解实验方案的前提下签署了“知情同意书”。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

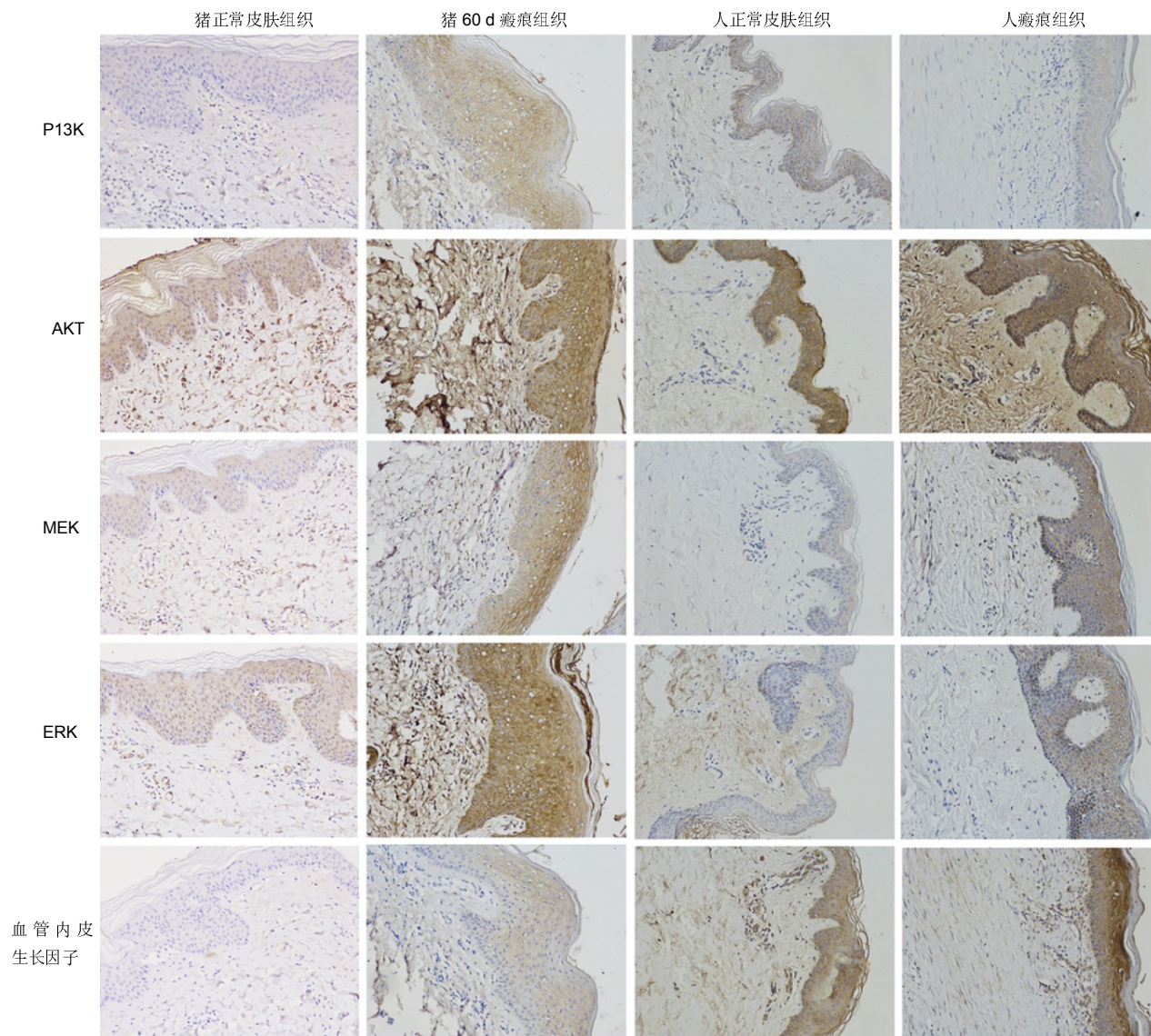
文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

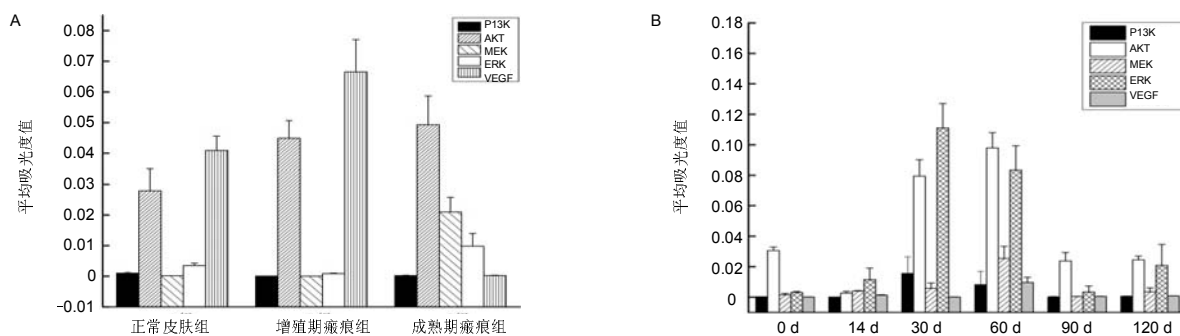
- [1] Kwan PO, Tredget EE. Biological Principles of Scar and Contracture. *Hand Clin*. 2017;33(2):277-292.
- [2] Alster TS, Tanzi EL. Hypertrophic scars and keloids: etiology and management. *Am J Clin Dermatol*. 2003; 4(4):235-243.
- [3] Butzelaar L, Ulrich MMW, Mink vd MAB, et al. Currently known risk factors for hypertrophic skin scarring: A review. *J Plast Reconstr Aes*. 2016; 69(2):163-169.
- [4] Butzelaar L, Soykan EA, Garre F, et al. Going into surgery: Risk factors for hypertrophic scarring. *Wound Repair Regen*. 2015; 23(4):531-537.
- [5] Matheny RW, Adamo ML. Current Perspectives on Akt Activation and Akt-ions. *Exp Biol Med*. 2009; 234(11): 1264-1270.
- [6] Patel P, Sekiguchi Y, Oh KH, et al. Smad3-dependent and -independent pathways are involved in peritoneal membrane injury. *Kidney Int*. 2010;77(4):319-328.
- [7] Baimei L, Yang L, Li W, et al. RNA-seq-based analysis of the hypertrophic scarring with and without pressure therapy in a Bama minipig model. *Sci Rep-UK*. 2018; 8(1): 11831-11841.
- [8] 农晓琳, 邓凌, 李佳荃, 等. bFGF、TGFβ1在人皮肤病理性瘢痕不同时期的表达及意义[J]. *广西医科大学学报*, 2010, 27(2): 180-183.
- [9] 周鹏军, 王琼, 李张军, 等. 光动力疗法对兔耳增生性瘢痕组织中 MMP-9, MMP-13和TIMP-1的影响[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2013, 27(9):877-880.
- [10] 蔡景龙. 现代瘢痕学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [11] Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP, et al. Hypertrophic burn scars: analysis of variables. *J Trauma*. 1983;23(10): 895-898.
- [12] Beldon P. Abnormal scar formation in wound healing. *Nursing Times*. 2000;96(10):44-45.
- [13] Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MW. Skin scarring. *Brit Med J*. 2003;326(7380): 88-92.
- [14] Kwan PO, Tredget EE. Biological principles of scar and contracture. *Hand Clinics*. 2017; 33(2): 277-292.



图注: 巴马小型猪病理瘢痕组织中, ERK 蛋白呈强阳性表达, 其正常组织中血管内皮生长因子蛋白呈弱阳性表达, 其余蛋白表达与人体病理组织大致相同。

图 1 免疫组织化学检测巴马小型猪皮肤组织和人正常皮肤组织中 PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子蛋白的表达($\times 200$)

Figure 1 Expressions of PI3K, AKT, MEK, ERK and vascular endothelial growth factor proteins in the human and pig skin tissues detected by immunohistochemistry ($\times 200$)



图注: 图 A 为人皮肤组织; B 为猪皮肤组织。5 种蛋白的表达在伤后 30-60 d 达到峰值, 随后逐渐回归正常皮肤中的表达水平, 与人体皮肤瘢痕组织中相关蛋白的表达趋势相似。

图 2 巴马小型猪皮肤组织和人皮肤组织中 PI3K、AKT、MEK、ERK、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达

Figure 2 Expressions of PI3K, AKT, MEK, ERK and vascular endothelial growth factor proteins in the human normal and pig skin tissues

- [15] Slemp AE, Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr*.2006;18(4): 396-402.
- [16] Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, et al. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review [J]. *Plast Reconstr Surg*.1999; 104(5): 1435-1458.
- [17] Ehrlich HP, Desmoulière A, Diegelmann RF, et al. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol*.1994;145(1): 105-113.
- [18] Schneider M, Meites E, Daane SP. Keloids: Which treatment is best for your patient?.*J Fam Practice*. 2013; 62(5):227-33.
- [19] 南美兰,金哲虎,金承龙.4-HPR对瘢痕疙瘩成纤维细胞 Procollagen I、MMP-1及信号通路P13K/Akt的影响[J].*中国皮肤性病学杂志*, 2018,32(3):245-251.
- [20] Jalali M, Bayat A.Current use of steroids in management of abnormal raised skin scars.*Am Surgeon*.2007; 5(3):175-180.
- [21] Leventhal D, Furr M, Reiter D. Treatment of Keloids and Hypertrophic Scars: A Meta-analysis and Review of the Literature. *Arch Facial Plast Surg*.2006; 8(6):362-368.
- [22] 李荟元,鲁开化,郭树忠.新编瘢痕学[M].西安:第四军医大学出版社, 2003.
- [23] van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns*, 2009, 35(1):15-29.
- [24] 王配合. γ DT细胞、IGF-1及Akt与增生性瘢痕相关研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2011.
- [25] 陈伟,付小兵,孙同柱,等.增生性瘢痕中磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶和 c-Jun蛋白的表达特征及其与瘢痕形成的关系[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2003, 17(5):379-381.
- [26] Lin N, Moroi Y, Uchi H, et al. Significance of the expression of phosphorylated-STAT3, -Akt, and -ERK1/2 in several tumors of the epidermis. *J Dermatol Sci*.2007;48(1):71-73.
- [27] 刘剑毅,李世荣. PI3K/AKT 信号通路在CTGF促人增生性瘢痕成纤维细胞转分化中的作用[J].*中国美容医学杂志*, 2008, 17(3): 395-397.
- [28] Paterno J, Vial IN, Wong VW, et al. Akt-mediated mechanotransduction in murine fibroblasts during hypertrophic scar formation. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(1): 49-58.
- [29] An G,Liang SZ,Sheng CH,et al.Upregulation of microRNA-205 suppresses vascular endothelial growth factor expression-mediated PI3K/Akt signaling transduction in human keloid fibroblasts. *Eep Biol Med*.2017;242(3):1-11.
- [30] Lee JP, Li YC, Chen HY, et al. Protective effects of luteolin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves inhibition of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in neutrophils.*Acta Pharmacologica Sinica*.2010; 31(7):831-838.
- [31] Hu XL, Wang HT, Liu JQ, et al. The role of ERK and JNK signaling in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production and scar formation. *Arch Dermatol Res*.2013; 305(5):433-445.
- [32] Lee SJ,Namkoong S,Kim YM,et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf/MEK/ERK-and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways .*AmJ Physiol Heart Circ Physiol*.2006;291(6):2836-2846
- [33] Bullard LE,Qi X,Penn JS. Role for extracellular signal-responsive kinase -1 and -2 in retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2003; 44(4):1722-1731.
- [34] 任萱,林莉萍,丁健. 微管抑制剂C9抑制新生血管生成的作用机制[J]. *中国新药杂志*, 2011,20(17):1703-1710
- [35] 王芳,唐旭华,周晖. 分子靶向抗肿瘤药物的皮肤不良反应及处理[J]. *中华皮肤科杂志*,2016,49(7):519-523.
- [36] Shetlar MR, Shetlar CL, Hendricks L, et al. The use of athymic nude mice for the study of human keloids. *Exp Biol Med*.1985; 179(4): 549-552.
- [37] Kischer CW, Pindur J, Shetlar MR, et al. Implants of hypertrophic scars and keloids into the nude (athymic) mouse: viability and morphology. *J Trauma*.1989; 29(5): 672-677.
- [38] Morris DE, Wu L, Zhao LL, et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. *Plast Reconstr Surg*.1997;100(3): 674-681.
- [39] 李荟元,刘建波,兰海.建立增生性瘢痕动物实验模型[J].*第四军医大学学报*, 1998,19: 655-657.
- [40] 李荟元,刘建波,夏炜,等.增生性瘢痕动物实验模型的建立与应用[J].*中华整形外科杂志*, 2001,17(5):276-278.
- [41] 陈俊颖. 人与巴马香猪皮肤的比较生物学研究[J].*中国比较医学杂志*,2006,16(5):288-290.
- [42] Mitra A, Leyes A, Manser K, et al. Use of Minipig Skin Biopsy Model as an Innovative Tool to Design Topical Formulation to Achieve Desired Pharmacokinetics in Humans. *J Pharm Sci-US*.2015; 104(5):1701-1708.
- [43] Bai X, He T, Liu J, et al. Loureirin B inhibits fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition in hypertrophic scar via TGF- α , β , γ /Smad pathway. *Exp Dermatol*.2015; 24(5):355-360.
- [44] 马娜,郭瑞珍,阮媛,等.PI3K-AKT-Bcl-2抗凋亡途径与瘢痕癌细胞凋亡相关性探讨[J].*中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(8):599-604.
- [45] 李菲菲,米立国,隋鸿锦.血管内皮生长因子对皮肤血管生成影响的研究进展[J].*大连医科大学学报*,2009, 31(5):599-603.
- [46] 行敏,赵凤梅,吴洁,等. CO2点阵激光联合紫草治疗增生性瘢痕临床疗效及对血清中VEGF的影响[J].*中国皮肤性病学杂志*, 2018,32(1):110-114.
- [47] 李学锋,李道萍,王慧君. 小鼠皮肤创伤愈合过程中VEGF、TGF- β 1、bFGF表达的免疫组织化学研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2003,12(4):367-371.
- [48] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-358
- [49] Labler L,Rancan M,Mica L,et al.Vacuum-assisted closure therapy increases local interleukin-8 and vascular endothelial growth factor levels in traumatic wounds.*J Trauma Nurs*.2009; 66(66): 749-757
- [50] Erba P, Ogawa R, Ackermann M, et al. Angiogenesis in wounds treated by microdeformational wound therapy. *Ann Surg*.2011; 253(2): 402-409.
- [51] Zhu KQ, Engrav LH, Armendariz R, et al. Changes in VEGF and nitric oxide after deep dermal injury in the female, red Duroc pig—further similarities between female, Duroc scar and human hypertrophic scar. *Burns*.2005; 31(1):0-10.
- [52] 刘晓彤,沈若武,卞明心,等.大鼠创伤皮肤组织VEGF、PDGF和bFGF表达及意义[J].*青岛大学医学院学报*, 2016,52(2): 209-211.