文章编号:1000-5404(2009)10-0941-04

论著

负压创缘治疗对慢性创缘 HIF-1α 和 VEGF 表达的影响

高 兵,简华刚,曾 勇,秦开秀,苏晓林,谢 成 (重庆医科大学附属第二医院创伤烧伤科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察临床负压创缘治疗(negative pressure wound therapy, NPWT)对创缘及创缘的影响,探讨负压创缘治疗促进慢性创缘血管生长的可能机制。**方法** 临床选取慢性创缘病例12例,完全随机分为实验组和对照组,实验组为负压创缘治疗组,对照组为传统方法治疗组,即常规换药(生理盐水敷料)组。分别于治疗前1 d,治疗后1、4、7 d取创缘全层皮肤组织,逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)测样本组织低氧诱导因子-1α mRNA(hypoxia inducible factor-1α mRNA,HIF-1α mRNA)的表达,免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)测样本组织的HIF-1α及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor , VEGF)的表达。**结果** 实验组HIF-1α mRNA相对含量,HIF-1α、VEGF的阳性表达细胞数均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),VEGF阳性表达与HIF-1α阳性表达呈正相关($r=0.854$,$P<0.01$,$n=48$)。**结论** 负压创缘治疗能诱导HIF-1α高表达,通过HIF-1α上调VEGF的表达促进创缘血管生长,进而促进创缘愈合。

关键词: 慢性创缘;负压创缘治疗;低氧诱导因子-1α;血管内皮生长因子
中图法分类号: R339.5;R392.3;R641 **文献标识码:** A

Negative pressure wound treatment upregulates hypoxia inducible factor-1α and VEGF expressions during wound healing

GAO Bing, JIAN Hua-gang, ZENG Yong, QIN Kai-xiu, SU Xiao-lin, XIE Cheng (Department of Trauma and Burns, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the impact of negative pressure wound treatment (NPWT) on the wound and its circum and explore the possible mechanism by which NPWT promotes the growth of chronic wound blood vessels. **Methods** Totally 12 patients with chronic wounds were subjected in our hospital, and then randomly divided into experimental and control group. The experimental group were treated with NPWT whereas the control group were treated with the traditional method, namely conventional dressing with normal saline dressing. Full-thickness skin samples on the verge of the wound were collected respectively in 1 d before the treatment and 1, 2 and 7 d after the treatment respectively. The mRNA expression of the hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expressions of HIF-1α and VEGF were detected by immunohistochemical method (IHC). **Results** The mRNA expression of HIF-1α was significantly more in the experimental group than in the control group ($P<0.05$), so did the protein expression ($P<0.05$). There was more VEGF in the experimental group than in the control group, with significant difference ($P<0.05$). Meanwhile, the expression of VEGF and the expression of HIF-1α was positively correlated ($r=0.854$,$P<0.01$). **Conclusion** NPWT upregulates the expression of HIF-1α, then increases the expression of VEGF to promote wound blood vessel growth and consequently wound healing.

Key words: chronic wounds; negative pressure wound treatment; hypoxia inducible factor-1α; vascular endothelial growth factor

负压创缘治疗(negative pressure wound therapy, NPWT)被用于创缘治疗以来,已广泛用于慢性难愈性创缘的临床治疗,并取得了满意的临床效果。近年来,已经证实NPWT可以清除坏死组织和引流液,促进血

作者简介: 高 兵,男,四川省广安市人,硕士研究生,主要从事创伤创缘愈合方面的研究。E-mail:gaobing023@163.com
通信作者: 简华刚,电话:(023)63693399,E-mail: hgjian@sohu.com
收稿日期: 2008-12-16;**修回日期:** 2009-02-03

管生长及肉芽组织形成,增加创缘局部血流,促进慢性创缘愈合[1-3]。但有关其促进创缘血管生长、增加创缘血流的机制尚不十分清楚。本实验对慢性创缘的患者采用负压创缘治疗,取创缘全层皮肤组织,用RT-PCR及IHC方法,观察负压创缘治疗对创缘低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响,探讨负压创缘治疗促进慢性创缘血管生长的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

主要仪器:Bio-Rad PCR仪,Bio-Rad UNIVERSAL HOOD Ⅱ-S.N.76S/04988成像仪(美国Bio-Rad公司),冷冻型Biofuge离心机(德国Heraeus公司),XW-80C VERTEX旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。主要试剂:RNAiso Plus(提取总RNA)及RNA PCRTM kit Ver.3.0(RT-PCR试剂盒)购于TaKaRa公司,引物及β-actin内参均由TaKaRa公司合成。HIF-1α单克隆抗体、VEGF单克隆抗体及免疫组化通用试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司。NPWT装置组件:YB-DX230电动吸引器(武汉捷创医疗设备有限公司)、无菌敷料、引流管及透明密封贴膜。

1.2 研究对象

收集我科2008年4-7月慢性创缘病例12例,男性7例,女性5例(均取得患者知情同意)。其中腹部术后切口感染2例,小腿胫前慢性溃疡3例,肢体小面积深度烧伤后溃疡形成4例,骶尾部压力性溃疡1例,会阴区感染后溃疡形成2例。年龄28~66(44.0±5.3)岁,病程2~5个月,所选患者均无其他系统严重疾病,创缘均深及皮下,并且无自动愈合倾向。12例患者以完全随机的方法分为2组,即治疗组和对照组,每组6例;治疗组为负压创缘治疗组,对照组为传统方法治疗组,即常规换药(生理盐水敷料)组。

1.3 方法

1.3.1 创缘治疗 治疗组:常规清创(清除坏死组织并消毒创周),用NPWT装置进行负压吸引,一端接生理盐水冲洗装置,冲洗速度为1~2 ml/min,创缘及创周围手术贴膜完全封闭,负压调整为-100 mmHg,间歇式吸引、冲洗,每小时吸引、冲洗20 min,每天吸引时间为4 h,总治疗时间为28 h。在创缘负压治疗后1、4、7 d更换敷料。对照组:常规清创后,根据创缘情况放置生理盐水引流纱条,无菌敷料包扎,每天换药1次,敷料湿润或污染须立即更换。

1.3.2 创缘大体观察及组织块收集 分别在创缘治疗前1 d、治疗后1、4、7 d换药前观察创缘色泽、渗出、分泌物、创缘及床周,观察并记录后,用组织剪剪取创缘全层皮肤约6 mm×3 mm×2 mm。将组织块均匀分为2份,一份去表皮及脂肪组织,100 mg/块,冻存于-80 ℃液氮冰箱,用于RT-PCR;一份甲醛固定,石蜡包埋,切片,用于HE及IHC。

1.3.3 RT-PCR测HIF-1α mRNA 用RNAiso试剂盒提取细胞总RNA,以β-actin作为内参照,作RT-PCR分析,所有操作按试剂盒说明完成,稍作修改。PCR扩增条件为:94 ℃预变性2 min,然后94 ℃ 0.5 min,60 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1.5 min,共45个循环。人HIF-1α引物序列:上游为5′-CAGGATCAGACACCTAGTCCTTC-3′,下游为5′-ATGTGGGTAGGAGATGGAGATG-3′,产物大小为458 bp。内参照基因β-actin引物序列:上游为5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,下游为5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′,产物大小为272 bp。反应结束后,取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,确认PCR反应产物,电泳后以凝胶成像系统成像并用Quantity One软件进行扫描半定量分析,以所测得样品光密度积分与内参照人actin光密度积分的比值为样本半定量值。

1.3.4 免疫组化测HIF-1α及VEGF 每组各时间点样本取切片5张,HE染色1张、HIF-1α及VEGF各2张。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(S-P法),进行免疫组化染色,按试剂盒说明书操作,取试剂盒提供的阳性标本做阳性对照。光镜观察,以细胞内出现棕黄色颗粒作为HIF-1α及VEGF阳性表达细胞。在400倍视野下,每张切片取3个视野,分别计数视野中HIF-1α的阳性细胞数以及VEGF的阳性细胞数,取6个视野计数之和为HIF-1α及VEGF阳性表达的相对含量。

1.3.5 微血管计数 每组每时相点各取2张切片,采用S-P法进行免疫组化染色,同1.3.4,并于显微镜下观察,细胞质呈棕黄色颗粒者为CD34表达阳性细胞 。以阳性单个内皮细胞或内皮细胞簇作为1个血管计数。在高倍镜(×400)下计数5个视野的微血管数,取其和为该标本的微血管数相对含量。

1.4 统计学分析

用SAS 8.0统计软件对所有数据进行重复测量设计的方差分析,对VEGF的阳性表达与HIF-1α的阳性表达进行线性相关分析,对微血管计数数据进行t检验。

2 结果

2.1 大体观察及创缘愈合情况

治疗前创缘较多渗出,肉芽晦暗,创周无明显红肿。实验组:治疗后1 d,创缘较清洁,少许渗出;第4天,创缘清洁,创缘开始有新鲜肉芽形成,创基变浅;第7天,创基较多新鲜肉芽生长,红润,创缘新生上皮开始移行。对照组:创缘情况改善缓慢,直到第7天,仍有少许渗出,肉芽晦暗,无新鲜肉芽形成,创缘皮肤挛缩。治疗后2周,治疗组6例患者创缘均闭合,其中3例自体植皮,2例直接缝合,1例自行闭合,创缘闭合平均时间为9 d。治疗后23 d,对照组6例患者均闭合创缘,其中5例自体植皮,1例减张缝合,创缘闭合平均时间为15 d。实验组创缘闭合时间明显少于对照组。

2.2 HE染色结果

治疗前1 d,2组HE染色结果无明显区别,光镜下见少许炎性细胞浸润及少量微血管。随着治疗的延续,实验组肉芽组织中成纤维细胞浸润及新生血管形成逐渐增多,散在分布少量炎症细胞,上皮基底细胞增生活跃;对照组炎性细胞浸润、成纤维细胞及新生血管数量有少量增加。治疗后第7天,治疗组新生血管明显多于对照组(图1)。

2.3 HIF-1α mRNA的RT-PCR结果分析

治疗前,2组均有少量HIF-1α mRNA表达。治疗后,实验组目的基因量开始增加,第4天目的基因量上升明显,第7天

目的基因量仍维持在较高水平;对照组 HIF-1α mRNA 水平缓慢增加,于各时相点都为较低水平表达(图 2)。各时相点样本 HIF-1α mRNA 半定量值统计数据见表 1。对 2 组数据进行重复测量设计的方差分析,分析结果显示:①不同时间点 HIF-1α mRNA 水平差异有统计学意义($F = 180.79$, $P < 0.01$)。②处理方式与时间点未见交互作用($F = 2.85$, $P > 0.05$)。③结合组间差异的检验结果和 HIF-1α mRNA 水平变化趋势,2 种治疗的 HIF-1α mRNA 量的主效应差异有统计学意义($F = 6.84$, $P < 0.05$)。统计分析结果提示:2 种治疗对创周 HIF-1α mRNA 水平的影响有差异,治疗组 HIF-1α mRNA 水平高于对照组 HIF-1α mRNA 水平,说明 NPWT 能促进慢性创缘 HIF-1α mRNA 的合成。

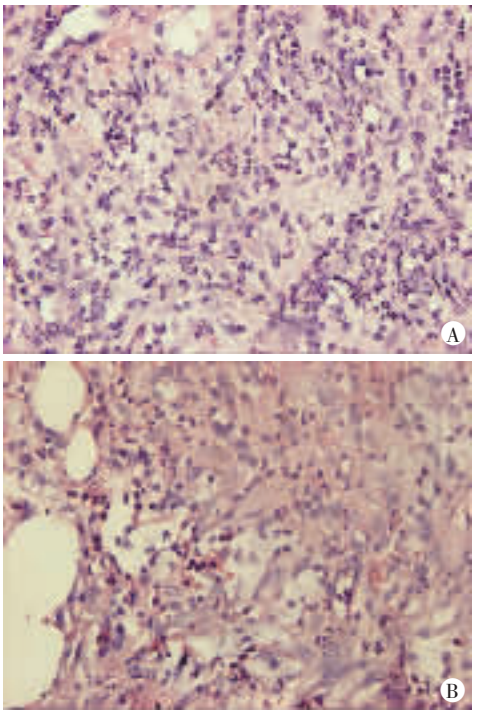
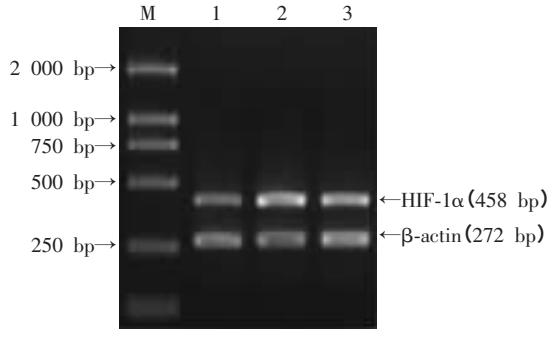


图 1　对照组(A)和治疗组(B)第 7 天真皮浅层组织病理学观察(HE×400)



M: DNA 标准(DL 2000); 1:治疗前;2:治疗第 4 天;3:治疗第 7 天

图 2　治疗组 HIF-1α mRNA 的表达

表 1　各时相点创缘样本 HIF-1α mRNA 半定量值($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前 1 d	治疗后 1 d	治疗后 4 d	治疗后 7 d
治疗组	0.184 5±0.003 3	0.247 8±0.002 3[a]	0.317 0±0.012 8[a]	0.366 5±0.014 8[a]
对照组	0.187 8±0.004 8	0.204 8±0.006 6	0.292 3±0.013 6	0.343 3±0.003 6

a:$P < 0.05$, 与对照组比较

2.4　HIF-1α 及 VEGF 的免疫组织化学表达

治疗前创缘组织真皮浅层及表皮基底层偶见 HIF-1α 及 VEGF 的阳性表达细胞,随着治疗时间的延长,治疗组创缘组织表皮基底层及真皮浅层的 HIF-1α 及 VEGF 的阳性表达细胞数明显增加(图 3)。对照组 HIF-1α 及 VEGF 的阳性表达细胞数缓慢增加,水平较低。统计数据见表 2、3。将 HIF-1α 及 VEGF 的统计数据进行重复测量的方差分析。HIF-1α 的数据分析结果显示,治疗方式与时间不存在交互作用($F = 2.79$, $P > 0.05$),各时间点 HIF-1α 的表达水平不同($F = 89.09$, $P < 0.01$),2 组治疗对 HIF-1α 蛋白影响的主效应有差异($F = 7.36$, $P < 0.05$)。VEGF 的数据分析结果显示,治疗方式与时间不存在交互作用($F = 2.79$, $P > 0.05$),各时间点 HIF-1α 的表达水平不同($F = 155.16$, $P < 0.05$),2 组治疗对 VEGF 蛋白影响的主效应有差异($F = 5.58$, $P < 0.05$)。结果提示,2 种治疗方法对创周 HIF-1α 及 VEGF 的影响有差异,治疗组创周 HIF-1α 及 VEGF 的阳性表达均高于对照组,说明 NPWT 能促进慢性创缘 HIF-1α 及 VEGF 的合成与分泌。

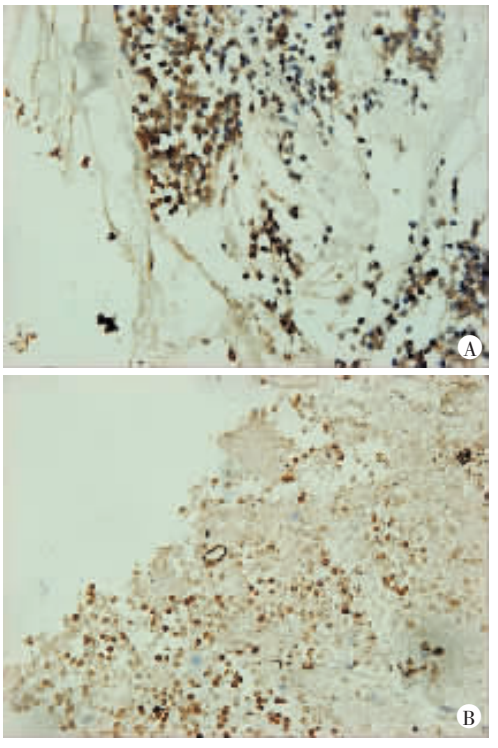


图 3　治疗组创缘真皮浅层 HIF-1α(A)和 VEGF(B)的表达(S-P×400)

表 2　各时相点创缘样本 HIF-1α 蛋白阳性表达细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前 1 d	治疗后 1 d	治疗后 4 d	治疗后 7 d
治疗组	29.50±1.18	42.83±2.06[a]	59.13±4.30[a]	72.50±2.95[a]
对照组	30.33±1.69	33.00±1.69	50.68±4.94	63.83±3.89

a:$P < 0.05$, 与对照组比较

表 3　各时相点创缘样本 VEGF 蛋白阳性表达细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前 1 d	治疗后 1 d	治疗后 4 d	治疗后 7 d
治疗组	40.00±2.39	64.01±3.41[a]	77.23±2.88[a]	87.33±2.82[a]
对照组	41.67±1.50	56.17±2.66	69.83±1.30	79.17±1.47

a:$P < 0.05$, 与对照组比较

2.5 线性相关分析

对 VEGF 蛋白阳性细胞数与 HIF-1α 蛋白阳性细胞数进行线性相关性分析，结果示 VEGF 蛋白与 HIF-1α 蛋白呈直线正相关（$r=0.854$，$P<0.01$，$n=48$）。

2.6 微血管计数结果

随着治疗的延续，治疗组 CD34 阳性表达的微血管数持续增加（图4），于治疗后第7天，治疗组微血管数（39.67±2.61）与对照组微血管数（29.17±2.51）相比有显著差异（$t=3.27$，$P<0.01$）。结果提示 NPWT 能促进创缘血管生长。

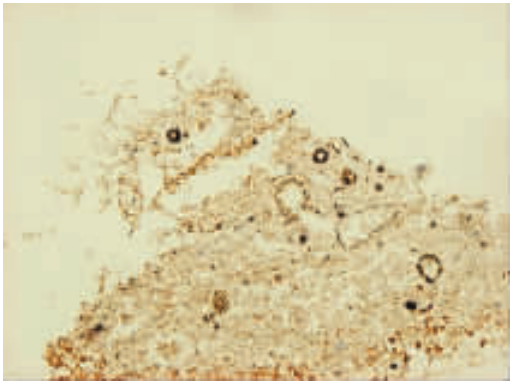


图4 治疗组血管内皮细胞 CD34 的表达 （S-P×400）

3 讨论

导致创缘愈合延迟或不愈合的原因很多，其中新生血管形成障碍和（或）延迟可能是其重要原因[4]。新生血管化机制相当复杂，涉及细胞、基质和生长因子等综合的调控作用。VEGF 是参与新生血管化调控的主要生长因子，通过特异地作用于血管内皮细胞上的专一受体，引起内皮细胞增殖、血管通透性增加，参与包括血管周围细胞外基质的降解、毛细血管的分化与吻合等血管再生过程，进而增加创缘血供，促进创缘愈合[5]。

HIF-1 是 Hep3B 细胞株中发现的一种 DNA 结合蛋白，可调控许多基因的表达。HIF-1 由 α 和 β 2个亚单位组成，以异源性二聚体的形式存在，HIF-1α、HIF-1β 均为含有 PAS（Per-AHR/ARNT-Sim）同源区的碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）转录因子的家族成员，其中 HIF-1α 决定了 HIF-1 的活性[6]。在血管的发育过程中，HIF-1 对血管新生起重要作用，它是 VEGF 的转录活化因子，通过转录活化编码 VEGF 基因而刺激血管新生[7-9]。Schwacha 等[10]研究证实，在心肌细胞中，不但低氧能诱导 HIF-1α 稳定表达，机械应激也能诱导 HIF-1α 稳定表达。在牵张激活离子通道受到初始刺激后，机械应激诱导 HIF-1α 稳定表达，其后，VEGF 的表达被增强，此过程与信号通路 PI3K/AKT/FRAP 有关。并且，已报道的存在机械应激促进 HIF-1α 及 VEGF 表达的细胞有：心肌细胞、肾小球系膜细胞、平滑肌细胞及骨软骨细胞[10,11]。

负压创缘治疗简单、安全且有效，作为慢性创缘的一种治疗技术已有20余年的历史。负压创缘治疗不同于传统慢性创缘治疗方法，是在负压基础上密封创缘，变开放创缘为相对闭合创缘，防止污染和继发性感染；在负压的作用下，能增加创缘血流量，刺激肉芽组织生长，促进创缘愈合。本实验以 NPWT 处理慢性创缘，治疗后 HIF-1α mRNA、HIF-1α 蛋白及 VEGF 蛋白表达水平均增加，随着治疗的延续，在治疗组创缘持续表达较高水平的 HIF-1α mRNA、HIF-1α 蛋白及 VEGF 蛋白；且 VEGF 表达与 HIF-1α 表达呈正相关。本实验结果表明，NPWT 能诱导 HIF-1α 高表达并促进创缘血管生长。NPWT 促进创缘血管生长的可能机制为 NPWT 诱导 HIF-1α 高表达，通过 HIF-1α 上调 VEGF 的表达，在 HIF-1α 及 VEGF 的共同作用下促进创缘血管生长。NPWT 诱导 HIF-1α 高表达的机制可能与创缘存在持续机械负荷有关，和/或与创缘局部低氧有关，其具体机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Llanos S, Danilla S, Barraza C, *et al*. Effectiveness of negative pressure closure in the integration of split thickness skin grafts: a randomized, double-masked, controlled trial[J]. Ann Surg, 2006, 244(5): 700-705.

[2] Silberstein J, Grabowski J, Parsons J K. Use of a Vacuum-Assisted Device for Fournier's Gangrene: A New Paradigm[J]. Rev Urol, 2008, 10(1): 76-80.

[3] Labler L, Keel M, Trentz O, *et al*. Wound conditioning by vacuum assisted closure (VAC) in postoperative infections after dorsal spine surgery[J]. Eur Spine J, 2006, 15(9): 1388-1396.

[4] Eming S A, Krieg T, Davidson J M. Gene therapy and wound healing [J]. Clin Dermatol, 2007, 25(1): 79-92.

[5] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis[J]. Natl Med, 2000, 6(4): 389-395.

[6] Ziello J E, Jovin I S, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia[J]. Yale J Biol Med, 2007, 80(2): 51-60.

[7] Dai Y, Xu M, Wang Y, *et al*. HIF-1alpha induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(6): 1036-1044.

[8] Deonarine K, Panelli M C, Stashower M E, *et al*. Gene expression profiling of cutaneous wound healing[J]. J Transl Med, 2007, 5: 11.

[9] Pufe T, Lemke A, Kurz B, *et al*. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor[J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 185-192.

[10] Schwacha M G, Nickel E, Daniel T. Burn injury-induced alterations in wound inflammation and healing is associated with Suppressed hypoxia inducible factor-1aplha expression[J]. Mol Med, 2008, 14(9-10): 628-633.

[11] Johnson A B, Barton M C. Hypoxia-induced and stress-specific changes in chromatin structure and function[J]. Mutat Res, 2007, 618(1-2): 149-162.

（编辑 王小寒）