

病理性瘢痕中主要氧化酶和抗氧化酶活性测定

李伟人¹⁾ 岑 瑛^{2)*} 刘晓雪²⁾ 李晓红³⁾ 左凤琼⁴⁾⁽¹⁾ 贵阳医学院附属医院整形烧伤科, 贵州 550004; ⁽²⁾ 四川大学华西医院整形烧伤科, 成都 610041;⁽³⁾ 四川大学华西药学院, 成都 610041; ⁽⁴⁾ 四川大学华西基础与法医学院, 成都 610041)

摘要 采用化学比色法测定正常皮肤(8例)、增生性瘢痕(10例)及瘢痕疙瘩(10例)组织中黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)、铜锌超氧化物歧化酶(copper, zinc-superoxide dismutase, CuZn-SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)活性以及丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量. 结果表明: 与正常皮肤比较, 病理性瘢痕中 XO 和 CuZn-SOD 活性增加、CAT 活性降低($P < 0.05$)而 GPX 活性不变, CAT/CuZn-SOD 和 GPX/CuZn-SOD 活性比率下降($P < 0.05$), 同时 MDA 含量升高($P < 0.05$). 增生性瘢痕、瘢痕疙瘩之间比较均无差异. 上述结果表明, 在病理性瘢痕中, 氧化酶 XO, 抗氧化酶 CuZn-SOD、CAT 以及 GPX 的活性改变可能是引起活性氧水平升高的原因之一, 在抗氧化剂选择上, CAT 可能较为合理.

关键词 增生性瘢痕, 瘢痕疙瘩, 黄嘌呤氧化酶, 抗氧化酶, 丙二醛

学科分类号 R472

病理性瘢痕是一种以成纤维细胞增殖和胶原过度沉积为主要特征的皮肤纤维化疾病, 常常导致局部畸形及功能障碍, 被视为外科领域的一大难题. 其发病机制不清. 自由基与多种疾病有关, 在纤维化疾病的发病机制中具有重要作用. 陈小平等^[1,2]利用电子自旋共振技术在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中成功捕捉到明显的氧自由基信号, 提供了病理性瘢痕中自由基水平升高的直接证据. 体外研究则发现, 应用各种抗氧化剂均能抑制加入自由基生成体系中的瘢痕组织成纤维细胞吡啶连接链(大量存在于瘢痕组织胶原纤维之间)的形成^[3,4]. 这些研究均表明病理性瘢痕的发生与自由基增加有关. 至于引起自由基水平升高的原因, 仅有 Wan 等^[5]的研究提示与瘢痕局部过渡金属 Fe^{2+} 含量增加有关, 然而, 是否还有其他 ROS (包括氧自由基和许多相关物质) 产生途径或者因为抗氧化防御体系缺陷所致, 目前还不清楚. 这一问题的澄清不仅能够为瘢痕过度增生的自由基学说充实体内研究证据, 而且对今后通过定向干预自由基产生途径或者有选择性地使用抗氧化剂防治瘢痕过度增生具有重要的理论指导意义. 为此, 观察了病理性瘢痕中主要氧化酶和抗氧化酶的活性变化.

1 材料与方法

1.1 标本来源

本实验所收集标本均取自门诊和住院治疗患者. 瘢痕疙瘩组(K组)10例, 男4例、女6例, 平均年龄 (23.40 ± 6.90) 岁, 平均病程 2.2 年; 增生性瘢痕组(HS组)10例, 男4例、女6例, 平均年龄 (20.60 ± 5.54) 岁, 平均病程 0.67 年; 正常皮肤组(N组)8例, 平均年龄 (23.25 ± 6.86) 岁. 增生性瘢痕与瘢痕疙瘩的鉴别根据瘢痕范围是否超过原发灶, 是否有向四周浸润生长的倾向, 并经常规病理切片帮助诊断. 研究对象均没有全身结缔组织疾病及重要脏器器质性病变, 局部无溃疡、无感染. 所取标本分2块, 一块立即置于液氮中冷冻, 然后移至 -70°C 冰箱保存, 另一块 10% 多聚甲醛固定后石蜡包埋, 常规 HE 染色.

1.2 主要仪器和试剂

超低温冰箱(-70°C , MDF-382, 日本), 超声破碎仪(Sonic and Materials Inc, 美国), 高速冷冻

* 通讯联系人. Tel: 028-85422201, E-mail: gz_lwr@163.com

收稿日期: 2007-01-09, 接受日期: 2007-04-02

离心机 (Biofuge28RS, 美国), 移液器 (Nichiryo NPX-10, 日本), 紫外可见光分光光度计 (751GW, 中国), 光学显微镜和图像采集系统 (BX51, OLYPUS, 日本) 等. 黄嘌呤氧化物(XO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、丙二醛(MDA)测试盒与总蛋白质定量测试盒(南京建成生物工程研究所).

1.3 XO、SOD、CAT、GPX、MDA 测定

组织称重后, 冰浴上融化, 小剪刀剪碎, 按重量体积比加入 9 倍生理盐水, 超声匀浆仪冰浴上匀浆, 制成 10%组织匀浆液, 4℃, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液按试剂盒所附说明书要求测定. 用比活力表示 XO (U/g)、CuZn-SOD (U/mg)、CAT(U/g)和 GPX(U/μg)活性, 比浓度表示 MDA (μmol/g)含量.

1.4 常规 HE 染色法

石蜡切片脱蜡至水, 苏木素染色, 伊红染色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

1.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS12.0 统计分析软件处理, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 各组数据比较采用单因素方差分析. $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结 果

2.1 MDA、XO 测定

实验各组 MDA、XO 测定结果见表 1. 与正常皮肤组比较, 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组 MDA 含量与 XO 活性明显升高($P < 0.05$), 增生性瘢痕、瘢痕疙瘩组间比较均无差异.

Table 1 MDA concentration and XO activity in different groups

Group name	MDA/(μmol·g ⁻¹)	XO/(U·g ⁻¹)
Normal skin group	0.8213 ± 0.0864	9.6087 ± 2.2813
Hypertrophic scar group	1.1390 ± 0.1067 ¹⁾	12.6690 ± 2.2640 ¹⁾
Keloid group	1.1900 ± 0.0748 ¹⁾	12.7880 ± 2.3794 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$, vs normal skin group, $\bar{x} \pm s$.

2.2 主要抗氧化酶活性测定

与正常皮肤组比较, 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组 CuZn-SOD 活性明显升高($P < 0.05$), CAT 活性明显降低 ($P < 0.05$), GPX 呈下降趋势但无显著性差异, CAT/CuZn-SOD 和 GPX/CuZn-SOD 活性比率明显降低($P < 0.05$); 增生性瘢痕、瘢痕疙瘩组间比较无差异. 实验各组主要抗氧化酶活性及活性比率见表 2, 表 3.

Table 2 Antioxidase activity in different groups

Group name	CuZn-SOD/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·g ⁻¹)	GPX/(U·μg ⁻¹)
Normal skin group	20.60 ± 5.56	44.31 ± 11.03	2.40 ± 0.64
Hypertrophic scar group	31.65 ± 2.21 ¹⁾	25.29 ± 6.02 ¹⁾	2.13 ± 0.68
Keloid group	34.36 ± 5.01 ¹⁾	25.48 ± 9.47 ¹⁾	1.87 ± 0.55

¹⁾ $P < 0.05$, vs normal skin group, $\bar{x} \pm s$.

Table 3 CAT/CuZn-SOD and GPX/CuZn-SOD activity ratios in different groups

Group name	CAT/CuZn-SOD	GPX/CuZn-SOD
Normal skin group	2.2425 ± 0.6278	0.1213 ± 0.0530
Hypertrophic scar group	0.8050 ± 0.2092 ¹⁾	0.0680 ± 0.0244 ¹⁾
Keloid group	0.7450 ± 0.2535 ¹⁾	0.0580 ± 0.0286 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$, vs normal skin group, $\bar{x} \pm s$.

2.3 表皮细胞层次和真皮成纤维细胞密度

实验各组表皮细胞层次和真皮成纤维细胞密度见表 4、图 1, 2. 与正常皮肤组比较, 增生性瘢痕

和瘢痕疙瘩组表皮细胞层次和真皮成纤维细胞密度明显增加($P < 0.05$), 增生性瘢痕与瘢痕疙瘩组间比较无差异.

Table 4 Epidermal cell layer and dermal fibroblast density in different groups

Group name	Epidermal cell layer	Dermal fibroblast density
Normal skin group	4.3 ± 1.1	76.00 ± 26.17
Hypertrophic scar group	8.0 ± 1.4 ¹⁾	225.14 ± 53.44 ¹⁾
Keloid group	8.9 ± 1.3 ¹⁾	277.29 ± 58.76 ¹⁾

¹⁾ $P < 0.05$, vs normal skin group, $\bar{x} \pm s$.

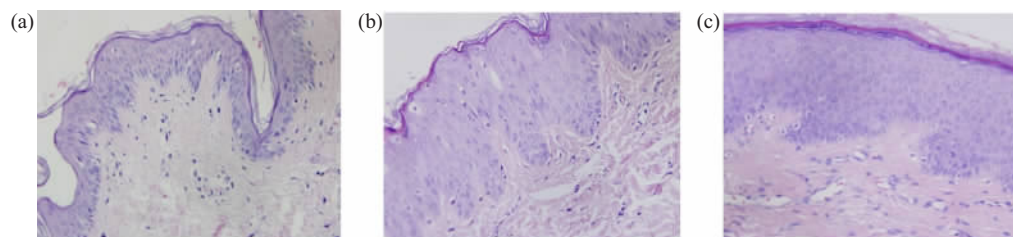


Fig. 1 Epidermal cell layer in different groups

Hypertrophic scars and keloids show an increased thickness of the epidermis compared with normal skin. (a) Normal skin. (b) Hypertrophic scar group. (c) Keloid group. HEx400.

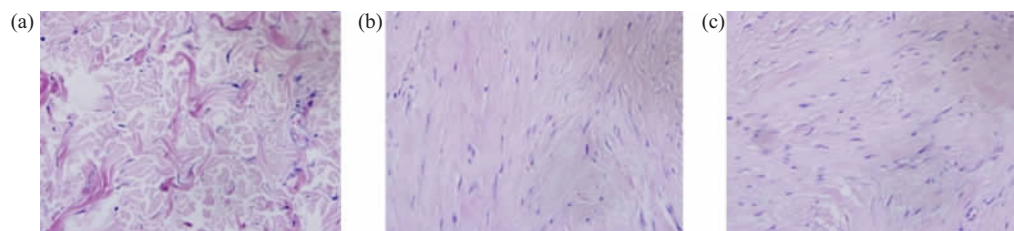


Fig. 2 Dermal fibroblast density in different groups

Hypertrophic scars and keloids differ from normal skin by dermal fibroblast density. (a) Normal skin. (b) Hypertrophic scar group. (c) Keloid group. HEx400.

3 讨 论

丙二醛(malonaldehyde, MDA)是体内自由基作用于生物膜多价不饱和脂肪酸,发生脂质过氧化反应生成的终产物,已普遍用作检测机体组织中自由基水平的指标.本研究发现,病理性瘢痕中MDA含量显著高于正常皮肤,表明病理性瘢痕中自由基水平升高,这一结果与文献报道^[1,2]相符合.机体需要利用氧和氧化反应产生能量和清除病原微生物,但是在此过程中通过酶促和非酶促反应途径不可避免也要产生一些活性氧(ROS,包括氧自由基和许多相关物质).XO途径是体内产生ROS的一个重要来源,可以利用分子氧作为电子受体各自氧化次黄嘌呤和黄嘌呤为黄嘌呤和尿酸,在这两步反应中产生超氧阴离子自由基(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)^[6].本实验结果首次证实病理性瘢痕中XO活性增加,表明XO途径产生的ROS增多.通过对XO途径的一定干预和治疗可能是防治瘢痕过度增生的一条有效措施.

ROS及其副产物可以损伤DNA、蛋白质和脂质.为支持有氧代谢,机体内同时存在一个抗氧化防御体系.在抗氧化防御体系中,抗氧化酶构成了细胞内的第一道抗氧化防线,主要抗氧化酶有SOD、CAT和GPX.这3种酶各自有着特异的、不

可替代的作用.首先SOD同工酶通过歧化反应催化 $O_2^{\cdot-}$ 转变为 H_2O_2 和 O_2 ,尔后通过GPX和CAT的作用使 H_2O_2 转变为 H_2O 和 O_2 .

一般认为SOD同工酶具有细胞保护作用,研究表明,CuZn-SOD表达降低将引起凋亡增加和水肿加重^[7].然而CuZn-SOD活性增加可以引起 H_2O_2 产生增多,在CAT或者GPX活性正常时,将引起 H_2O_2 堆积,加重组织损害^[8~10].因此CuZn-SOD活性增加只有同时伴有CAT或者GPX活性增加才具有细胞保护作用^[11,12].本实验结果显示,在病理性瘢痕中CuZn-SOD活性增加,CAT活性降低以及GPX活性不变,CAT/CuZn-SOD和GPX/CuZn-SOD活性比率下降,提示病理性瘢痕中主要抗氧化酶活性比率发生失衡,这一变化将导致瘢痕局部 H_2O_2 产生增加、清除减少.而 H_2O_2 是一种有潜在毒性的ROS,能够在细胞内或细胞间自由弥散,在过渡金属 Fe^{2+} 或者 Cu^{2+} 存在时,可以通过Fenton reaction转变为 $\cdot OH$ (目前已知最为活跃、毒力最强的自由基).研究表明,病理性瘢痕中过渡金属 Fe^{2+} 含量增加^[9],因此,由于抗氧化酶活性比率失衡而产生的 H_2O_2 ,因不能被有效清除,而将可能转变为 $\cdot OH$,产生细胞毒性.然而病理性瘢痕是一种以成纤维细胞增殖为主要特征的皮肤纤维化

疾病, 本实验结果以及文献报道^[13,14]也显示病理性瘢痕表皮细胞层次和真皮成纤维细胞密度较正常皮肤明显增加, 究其原因可能与其他抗氧化酶以及小分子抗氧化剂的协同保护作用有关, 通过它们对 H_2O_2 及其代谢产物的清除增加, 从而将 ROS 控制在一定水平, 以避免发生严重脂质过氧化反应引起的细胞凋亡或者坏死增加. 最近 Lim 等^[15]的研究结果也证实, 来自瘢痕疙瘩的角质化细胞金属硫蛋白同工酶 MT1A、1E、1F 和 2A 表达上调, 而金属硫蛋白是一种富含半胱氨酸的小分子蛋白质, 具有很强的清除 $\cdot\text{OH}$ 的功能^[16].

鉴于病理性瘢痕中主要抗氧化酶活性比率发生失衡, 而这可以导致瘢痕局部 H_2O_2 堆积, 同时有研究表明, 一定水平的 O_2^- 或 H_2O_2 能够刺激不同类型细胞的增殖^[17], 因此纠正这一失衡可能有助于防治瘢痕过度增生. 通过外源性的补充 CAT 可能较为合理. 体外研究也发现, 在各种抗氧化剂中, 包括 SOD、GPX、CAT 和去铁铵等, 只有 CAT 对加入自由基生成体系中的瘢痕组织成纤维细胞既能最为有效地抑制吡啶连接链 (大量存在于瘢痕组织的胶原纤维之间) 形成, 又能不损害细胞形态结构^[3,4]. 至于 GPX, 由于其在清除 H_2O_2 的同时需要利用 GSH, 故单一补充 GPX 的抗氧化效能可能是有限的, 对此还需要进一步实验研究. 而继续补充 CuZn-SOD 反而可能加重这一失衡, 并且 CuZn-SOD 除歧化活力外, 同时还具有弱的过氧化物酶的功能, 即在 H_2O_2 过度产生时, 可以导致 O_2^- 的产生^[18,19], 此外 CuZn-SOD 的剂量依赖效应呈现钟型曲线特点^[20,21], 即一定范围内的活性增加提供保护效应, 进一步增加将导致保护效应降低甚至加剧氧化损伤. 因此 CuZn-SOD 在病理性瘢痕的应用疗效还有待评估.

参 考 文 献

- 陈小平, 徐坚方, 吴卫华, 等. 人体瘢痕组织中的自由基检测. 中华整形烧伤外科杂志, 1992, **8** (4): 160~161
Chen X P, Xu J F, Wu W H, *et al.* Chin J Plast Surg & Burns, 1992, **8** (4): 160~161
- 陈小平, 郭光昭, 李松春, 等. 电子自旋共振检测人体瘢痕疙瘩的初步研究. 中华整形烧伤外科杂志, 1996, **12** (1): 9~11
Chen X P, Guo G Z, Li S C, *et al.* Chin J Plast Surg & Burns, 1996, **12** (1): 9~11
- Wan K C, Wu H T, Chan H P. Effects of antioxidants on pyridinoline cross-link formation in culture supernatants of fibroblasts from normal skin and hypertrophic scars. Clin & Exp Dermatol, 2002, **27** (6): 507~512
- 胡棠, 熊良俭, 梁秉中, 等. 抗氧化剂对人皮肤瘢痕成纤维细胞及其中的吡啶连接链形成的影响. 中华医学杂志, 2002, **82** (9): 590~592
Hu T, Xiong L J, Liang B Z, *et al.* Natl Med J China, 2002, **82** (9): 590~592
- Wan K C, Lewis W H. Study of free iron and pyridinoline in hypertrophic scars normal skin. Brit J Biom Sci, 1996, **53** (3): 196~203
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. Free Radic Biol Med, 2002, **33** (5): 774~797
- Kondo T, Reaume A G, Huang T T, *et al.* Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. J Neurosci, 1997, **17** (11): 4180~4189
- Yarom R, Sapoznikov D, Havivi Y, *et al.* Premature aging changes in neuromuscular junctions of transgenic mice with an extra human CuZnSOD gene: a model for tongue pathology in Down's syndrome. J Neurol Sci, 1988, **88** (1~3): 41~53
- Ditelberg J S, Sheldon R A, Epstein C J. Brain injury after perinatal hypoxia-ischemia is exacerbated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. Pediatr Res, 1996, **39** (2): 204~208
- Chetkovich H J F, Ditelberg J S, Chen S. Glutathione peroxidase activity decreases and hydrogen peroxide accumulates after perinatal hypoxia-ischemia in SOD1 overexpressing mice. Pediatr Res, 1997, **41** (7): 288
- Amstad P, Peskin A, Shah G, *et al.* The balance between Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. Biochemistry, 1991, **30** (38): 9305~9313
- Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. J Biol Chem, 1994, **269** (3): 1606~1609
- Niessen F B, Spauwen P H, Schalkwijk J. On the nature of hypertrophic scars and keloids: A review. Plast Reconstr Surg, 1999, **104** (5): 1435~1458
- Atiyeh B S, Costagliola M, Hayek S N. Keloid or hypertrophic scar: the controversy: review of the literature. Ann Plast Surg, 2005, **54** (6): 676~680
- Lim D, Phan T T, Yip G W. Up-regulation of metallothionein isoforms in keloid Keratinocytes. Int J Mol Med, 2006, **17** (2): 385~389
- Oteiza P L, Olin K L, Fraga C G, *et al.* Oxidant defense systems in testes from zinc-deficient rats. Proc Soc Exp Biol Med, 1996, **213** (1): 85~91
- Burdon R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radic Biol Med, 1995, **18** (4): 775~794
- Hodgson E K, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. Biochemistry, 1975, **14** (24): 5294~5299
- Yim M B, Chock P B, Stadtman E R. Enzyme function of copper,

- zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem*, 1993, **268** (6): 4099~4105
- 20 Omar B A, Gad N M, Jordan M C, *et al.* Cardioprotection by Cu, Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Rad Biol Med*, 1990, **9** (6): 465~471
- 21 Nelson S K, Bose S K, McCord J M. The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the perfused heart. *Free Rad Biol Med*, 1994, **16** (4): 195~200

The Changes of Main Oxidase and Antioxidase Activities in The Pathological Scars

LI Wei-Ren¹⁾, CEN Ying^{2)*}, LIU Xiao-Xue²⁾, LI Xiao-Hong³⁾, ZUO Feng-Qiong⁴⁾

¹⁾The Affiliated Hospital of Guiyang Medical Collage, Guizhou 550004, China;

²⁾West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

³⁾West China Hospital of Pharmacy Sichuan University, Chengdu 610041, China;

⁴⁾College of Pre-clinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract In order to study the changes of main oxidase and antioxidant in the pathological scars, the tissues of hypertrophic scar (10 cases), keloid (10 cases) and normal skin (8 cases) were obtained. The concentration of malonaldehyde (MDA) and the activities of xanthine oxidase (XO), copper, zinc-superoxide dismutase (CuZn-SOD), catalase (CAT) as well as glutathione peroxidase (GPX) were detected by spectrophotometric method. Compared with normal skin tissues, the concentration of malonaldehyde and xanthine oxidase activity were significantly higher in pathological scars ($P < 0.05$), SOD activity were higher, CAT activity was decreased remarkably in pathological scars than that in normal skin tissues ($P < 0.05$). And the activity ratios of CAT/CuZn-SOD and GPX/CuZn-SOD were obviously reduced ($P < 0.05$). However, no significant differences were observed in the decrease activity of GPX. Differences in above-mentioned indexes all were not remarkable between hypertrophic scars and keloids. These data suggest that the changes of XO, CuZn-SOD, CAT and GPX activities may be a reason resulted in an increase in the level of reactive oxygen species in pathological scars. In the alternative of antioxidants, CAT may be more reasonable.

Key words hypertrophic scars, keloids, xanthine oxidase, antioxidant, malonaldehyde

*Corresponding author. Tel: 86-28-85422201, E-mail: gz_lwr@163.com

Received: January 9, 2007 Accepted: April 2, 2007