

论著·基础研究

## 增生性瘢痕中血管内皮功能障碍对成纤维细胞功能的影响

奚 箐, 郑捷新, 王西樵

上海交通大学医学院附属瑞金医院灼伤整形科, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·探索增生性瘢痕在演变过程中血管内皮功能障碍对成纤维细胞功能的影响。**方法**·分离和培养正常皮肤, 以及增生期、消退期和成熟期瘢痕的血管内皮细胞, 然后收集其培养上清液, 加入正常皮肤来源的成纤维细胞中; 48 h 后收集成纤维细胞, 利用 Alamar blue 测定细胞增殖活性, 天狼星红染色测定胶原含量, TUNEL 法检测细胞凋亡情况。另外, 以血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体、血小板衍生的生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 抗体、转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 抗体、内皮素 1 (endothelin 1, ET-1) 抗体和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 抗体中和血管内皮细胞培养液中的相应生长因子, 观察对成纤维细胞增殖、凋亡和胶原产生的影响。**结果**·与对照组相比, 消退期瘢痕来源的血管内皮细胞培养液能够显著抑制成纤维细胞的增殖活性和胶原生成, 促进细胞凋亡 (均  $P < 0.01$ )。抗体中和 TGF- $\beta 1$ 、PDGF 或 bFGF 后, 成纤维细胞增殖和胶原产生被明显抑制 (均  $P < 0.05$ ), 而三者联合阻断可诱导细胞凋亡 ( $P < 0.01$ )。**结论**·瘢痕中血管内皮功能障碍能够抑制成纤维细胞的增殖和胶原蛋白生成, 诱导细胞凋亡, 尤其以消退期瘢痕血管内皮细胞作用更为显著; 该过程中 TGF- $\beta 1$ 、PDGF 和 bFGF 可能发挥主要作用。

**[关键词]** 增生性瘢痕; 血管内皮功能障碍; 内皮细胞; 成纤维细胞; 瘢痕消退

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.10.004 **[中图分类号]** R644 **[文献标志码]** A

### Effect of endothelial dysfunction in hypertrophic scars on fibroblasts biology

Xi Jing, ZHENG Jie-xin, WANG Xi-qiao

Burn and Plastic Center, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the effect of endothelial dysfunction in hypertrophic scar regression on the fibroblasts biology. **Methods**·Scar-derived endothelial cells were isolated and cultured from proliferative scars, regressive scars and mature scars, and the endothelial cells from normal skin as control. After 6 h of culture, the endothelial cell culture medium (ECCM) was harvested. In addition, the fibroblasts from normal skin were cultured and treated with the ECCM. After 48 h, the cell viability, total collagen production, and cell apoptosis were assessed by Alamar blue, sirius red staining, and TUNEL assay, respectively. Furthermore, anti-VEGF (vascular endothelial growth factor), anti-PDGF (platelet derived growth factor), anti-TGF- $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ ), anti-ET-1 (endothelin 1), and anti-bFGF (basic fibroblast growth factor) neutralizing antibodies were individually added to the ECCM to identify their effects on fibroblasts biology. **Results**·The results revealed that the ECCM from regressive scars inhibited fibroblasts viability and collagen production, and induced apoptosis ( $P < 0.01$ ). Moreover, after neutralization of TGF- $\beta 1$ , PDGF or bFGF by antibodies, fibroblasts proliferation and collagen production were significantly inhibited ( $P < 0.05$ ), and combined blockade of the three factors could induce apoptosis ( $P < 0.01$ ). **Conclusion**·Vascular endothelial dysfunction in hypertrophic scars can inhibit fibroblast proliferation and collagen production, and induce cell apoptosis, especially in regressive scars. TGF- $\beta 1$ , PDGF and bFGF may play a major role in this process.

**[Key words]** hypertrophic scar; endothelial dysfunction; endothelial cell; fibroblast; scar regression

烧伤、创伤或手术后常引起增生性瘢痕, 通常难以控制。然而, 临床发现多数增生性瘢痕在没有治疗情况下, 经数月或数年后, 增生自然停止, 并可逐步自行消退成熟。这个现象提示: 在瘢痕增生的过程中, 可能发生了某种变化, 这个变化诱导了瘢痕的消退成熟。既往研究<sup>[1-2]</sup>发现, 成纤维细胞激活和大量胶原生成是增生性瘢痕形成的重要原因, 而成纤维细胞的凋亡则有助于诱导瘢痕的消

退成熟; 然而, 引发成纤维细胞凋亡和瘢痕退化的因素目前仍不清楚。

在瘢痕组织中, 成纤维细胞的生物学功能主要受到周围微环境的调节<sup>[3]</sup>, 而毛细血管是形成微环境的关键因素。在皮肤中, 毛细血管主要由单层内皮细胞 (endothelial cell) 组成, 内皮细胞表面有许多孔道, 允许水、小分子和大分子物质通过。因此, 血管内皮被视为微血管和邻

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30872686, 81671914) (National Natural Science Foundation of China, 30872686, 81671914)。

**[作者简介]** 奚 箐 (1969—), 女, 主治医师, 硕士; 电子信箱: xj10707@rjh.com.cn。

**[通信作者]** 王西樵, 电子信箱: wxqiao2002@hotmail.com。

近细胞之间的调节界面<sup>[4]</sup>。此外,血管内皮目前被认为是一个巨大的内分泌器官,能够释放大量的生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)和内皮素1(endothelin 1, ET-1)等,形成成纤维细胞周边微环境<sup>[5-6]</sup>。研究<sup>[7-9]</sup>发现,内皮源性的生长因子可以调节肝脏、胰腺和神经系统等多个器官的发育和功能维持,作用至关重要。神经系统的研究<sup>[9-11]</sup>证据表明,内皮细胞和神经元之间存在直接的关联,主要由于两者分泌和共享一些相同的生长因子。内皮细胞不仅对神经元起着保护作用<sup>[12]</sup>,而且也启动损伤后的修复过程。因此,血管内皮细胞在调节细胞生物学过程和组织稳态中起着重要作用。

前期研究<sup>[13]</sup>发现,在增生性瘢痕演变过程中存在微血管内皮功能障碍、内皮细胞萎缩、细胞因子分泌减少,因此推测内皮功能可能诱导瘢痕消退成熟。本研究拟分离和培养不同时期瘢痕的血管内皮细胞,收集内皮细胞培养上清液,加入正常皮肤来源的成纤维细胞中,观察对成纤维细胞增殖活性、胶原含量以及细胞凋亡的影响。另外,利用TGF- $\beta$ 1抗体、PDGF抗体、ET-1抗体、VEGF抗体和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)抗体,中和上清液中的相应细胞因子,观察对成纤维细胞增殖、凋亡和胶原分泌的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

内皮细胞生长培养基 M131 (Cascade Biologics, 美国), CD105 磁珠柱 (Miltenyi Biotec, 德国), 细胞活性指示剂 Alamar blue (Serotec, 英国), 天狼星红染色液 (Solarbio, 美国), 4, 6-二脒-2-苯基吡啶 (DAPI, Santa Cruz, 美国), TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (Millipore, 美国), TGF- $\beta$ 1 抗体、PDGF 抗体、ET-1 抗体、VEGF 抗体、bFGF 抗体 (Novus Biologicals, 美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 瘢痕血管内皮细胞和成纤维细胞的分离和培养** 收集上海交通大学医学院附属瑞金医院灼伤整形科患者不同时期的增生性瘢痕,将瘢痕分为增生期(愈后 3~12 个月)(PS 组)、消退期(愈后 2~4 年)(RS 组)和成熟期(愈后 >4 年)(MS 组),以正常皮肤作为对照组,每组 8 例。组织收集后,利用组织消化法和免疫磁珠

技术进行血管内皮细胞和成纤维细胞的分离培养<sup>[14]</sup>。首先去除表皮,将瘢痕组织或正常皮肤切成长径 1~3 mm 的碎片,用 0.5% I 型胶原酶和 0.2% 胰蛋白酶溶液分别消化 6 h 和 2 h;然后,加入 10% 胎牛血清(FCS)终止消化,经 70  $\mu$ m 孔径尼龙网过滤后离心;将沉淀的细胞重悬于 M131 培养基(含 10% FCS)中,并接种到细胞培养瓶中培养。细胞培养至 80% 融合后,使用 CD105 磁珠柱进行细胞分离纯化,CD105 阳性细胞(血管内皮细胞)用 M131+10% FCS 培养,而 CD105 阴性细胞(成纤维细胞)用 DMEM+10% FCS 培养。随后,将内皮细胞培养 12 h 后,更换为无血清培养基 M131,继续培养 6 h,收集血管内皮细胞条件培养液(endothelial cell culture medium, ECCM),用于后续实验。

**1.2.2 ECCM 培养成纤维细胞** 将正常成纤维细胞传代后,先以 DMEM+10% FCS 培养 6 h,待细胞贴壁后,更换为之前收集的不同时期瘢痕或正常皮肤的 ECCM,培养 48 h 后,分别测定细胞增殖活性、胶原含量以及细胞凋亡情况。

**1.2.3 Alamar blue 测定细胞活性** 细胞活性的测定采用 Alamar blue 方法。将成纤维细胞用磷酸盐缓冲液冲洗 2 遍,然后加入 150  $\mu$ L Alamar blue 与 DMEM 混合溶液(1:100),37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h;每孔吸出 50  $\mu$ L 悬浮液转移至 96 孔黑色培养板,酶标仪上检测 540 nm 处的吸光度值[D(540 nm)]。

**1.2.4 天狼星红染色测定细胞胶原含量** 总胶原含量采用天狼星红染色测定。0.1% 的天狼星红染色液加入细胞培养板中,孵育 90 min,双蒸水冲洗后风干过夜;次日取出拍照,然后加入 200  $\mu$ L 0.1 mol/L 氢氧化钠溶解细胞,每孔吸出 50  $\mu$ L 悬浮液转移至 96 孔黑色培养板,酶标仪上检测 D(540 nm)。

**1.2.5 TUNEL 法测定细胞凋亡** 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。以 4% 多聚甲醛固定细胞,然后加入 TUNEL 反应液,0.2% 曲通增加通透性,最后加入 DAPI,盖上盖玻片,分别在普通光学显微镜和荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.6 抗体中和法检测内皮细胞源性细胞因子的作用** 分别利用 TGF- $\beta$ 1 抗体、PDGF 抗体、ET-1 抗体、VEGF 抗体、bFGF 抗体中和正常皮肤 ECCM 中的细胞因子,然后培养成纤维细胞 48 h,分别测定细胞活性、胶原含量和细胞凋亡情况,观察这 5 种生长因子对成纤维细胞的作用。

### 1.3 统计学方法

应用 SAS 9.2 统计软件包进行数据处理,经验证各组

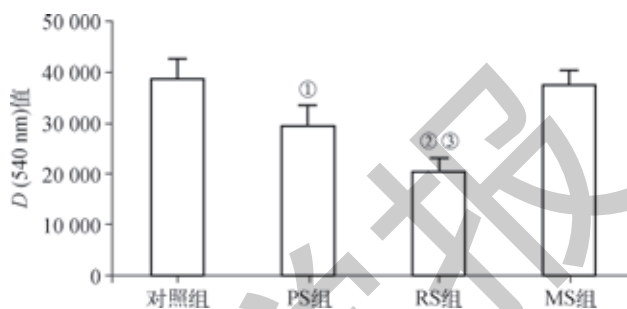
数据均符合正态分布和方差齐性, 因此采用方差分析进行组间比较, 采用 *SNK* 法进行两两比较。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血管内皮功能障碍抑制成纤维细胞增殖

用不同时期瘢痕 ECCM 培养正常成纤维细胞, Alamar

blue 测定成纤维细胞增殖活性, 观察血管内皮细胞对成纤维细胞活力的影响。结果发现, 与对照组比较, PS 组成纤维细胞的增殖活性显著下降 ( $P < 0.05$ ), 而 RS 组的细胞活性进一步降低 ( $P < 0.01$ ); MS 组细胞活力基本恢复正常, 与对照组比较差异无统计学意义 (图 1)。以上结果表明: 血管内皮功能障碍能够抑制成纤维细胞活性, 尤以消退期瘢痕组织内皮细胞作用更显著。



注: ①  $P=0.040$ , ②  $P=0.009$ , 与对照组比较; ③  $P=0.037$ , 与 PS 组比较

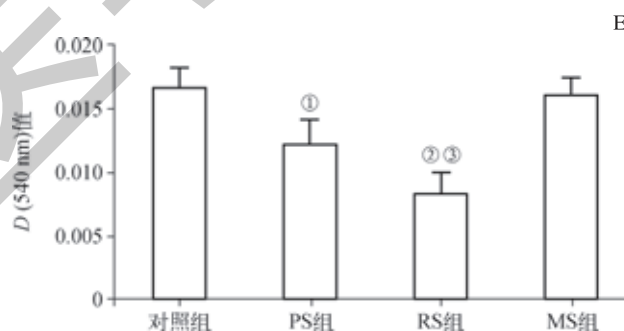
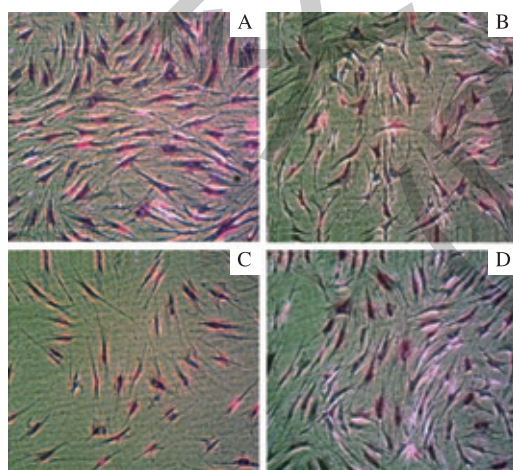
图 1 血管内皮功能障碍对成纤维细胞活性的影响 ( $n=8$ )

Fig 1 Effect of endothelial dysfunction on the cell viability of fibroblasts ( $n=8$ )

### 2.2 血管内皮功能障碍抑制成纤维细胞胶原含量的生成

天狼星红染色是一种检测胶原含量的方法。将不同时期瘢痕组织的 ECCM 加入成纤维细胞培养, 结果发现, 对照组成纤维细胞产生大量胶原, PS 组和 RS 组成纤维细胞胶原含量较对照组显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 且这 2 组之

间差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); MS 组细胞胶原含量基本恢复到正常水平 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。因此, 在瘢痕演变的过程中, 血管内皮功能障碍导致成纤维细胞胶原的产生减少, 在消退期达到最低水平。



注: A. 对照组; B. PS 组; C. RS 组; D. MS 组; E. 各组胶原含量的比较。A ~ D 为天狼星红染色 ( $\times 400$ )。①  $P=0.036$ , ②  $P=0.008$ , 与对照组比较; ③  $P=0.032$ , 与 PS 组比较

图 2 血管内皮功能障碍对成纤维细胞胶原生成的影响 ( $n=8$ )

Fig 2 Effect of endothelial dysfunction on the collagen production of fibroblasts ( $n=8$ )

### 2.3 血管内皮功能障碍诱导成纤维细胞凋亡

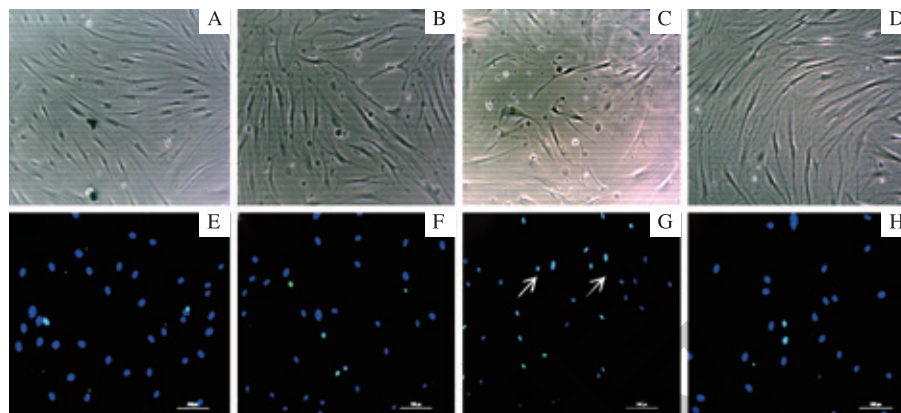
在普通光学显微镜下观察, 与对照组的成纤维细胞相比, PS 组细胞表现出不健康的形态特征, 细胞

数量减少; 而 RS 组在镜下可观察到一定数量的死细胞。TUNEL 荧光染色显示, 对照组细胞有极少量的细胞凋亡 [(1.4  $\pm$  0.4) %], PS 组细胞凋亡数量有所



增加 $[(2.2 \pm 0.8) \%$ ], 但与对照组的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而 RS 组细胞凋亡数量较对照组显著增加 $[(13.2 \pm 4.1) \%, P = 0.005]$ ; MS 组成纤维细胞无明显调

亡 $[(1.2 \pm 0.3) \%]$  (图 3)。因此, 瘢痕演变过程中消退期瘢痕血管内皮功能障碍对成纤维细胞产生抑制作用, 诱导成纤维细胞凋亡。



注: A、E. 对照组; B、F. PS 组; C、G. RS 组; D、H. MS 组。A ~ D 为在普通光学显微镜下观察 ( $\times 200$ )。E ~ H 为 TUNEL 染色后在荧光显微镜下观察, 绿色为凋亡细胞 (箭头示), 蓝色为正常细胞 (标尺为  $100 \mu\text{m}$ )

图 3 血管内皮功能障碍对成纤维细胞凋亡的影响 ( $n=5$ )

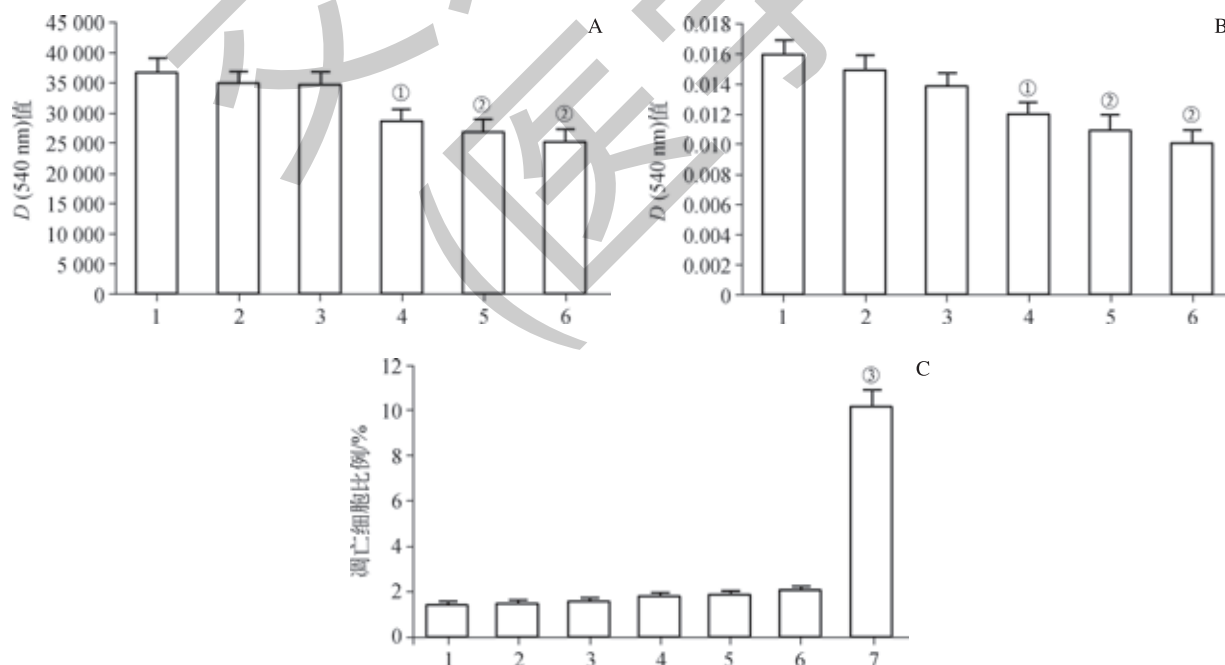
Fig 3 Effect of endothelial dysfunction on the cell apoptosis of fibroblasts ( $n=5$ )

## 2.4 血管内皮细胞源生长因子的作用

分别在正常皮肤的 ECCM 中添加 TGF- $\beta$ 1、PDGF、ET-1、VEGF 和 bFGF 的中和抗体, 培养 48 h 后, 测定成纤维细胞的细胞活性和胶原含量, 以确定各生长因子对成纤维细胞的作用。结果发现, 经 TGF- $\beta$ 1 抗体、PDGF 抗体或 bFGF 抗体中和后, 成纤维细胞的增殖活性和胶原含

量较对照组显著降低 (均  $P < 0.05$ ); 而 VEGF 抗体和 ET-1 抗体未观察到明显的作用后变化。

另外, 在这些抗体中, 没有一种单独抗体中和后能引起细胞凋亡, 而 TGF- $\beta$ 1 抗体、PDGF 抗体和 bFGF 抗体的联合作用能显著促进细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。



注: A. 细胞活性; B. 胶原含量; C. 凋亡细胞比例。<sup>①</sup> $P=0.044$ , <sup>②</sup> $P=0.043$ , <sup>③</sup> $P=0.008$ , 与对照组比较。1. 对照组; 2. VEGF 抗体; 3. ET-1 抗体; 4. bFGF 抗体; 5. PDGF 抗体; 6. TGF- $\beta$ 1 抗体; 7. bFGF 抗体 + PDGF 抗体 + TGF- $\beta$ 1 抗体

图 4 分别中和 TGF- $\beta$ 1、PDGF、ET-1、VEGF 和 bFGF 后对成纤维细胞功能的影响 ( $n=5$ )

Fig 4 Biological changes of fibroblasts after antibody neutralizing TGF- $\beta$ 1, PDGF, ET-1, VEGF and bFGF ( $n=5$ )

### 3 讨论

在瘢痕组织中,成纤维细胞和内皮细胞相互作用、相互影响。一方面,成纤维细胞可以分泌 VEGF 和 bFGF 促进血管内皮细胞增殖,促进血管新生;另一方面,内皮细胞也可以分泌 TGF- $\beta$ 1、PDGF 和 bFGF 促进成纤维细胞增殖和胶原分泌。两者分泌的细胞因子在成纤维细胞和血管内皮细胞之间形成微环境,共同调节两者的功能和行为。

目前认为,瘢痕中生长因子 TGF- $\beta$ 1、VEGF、bFGF 和 PDGF 的高表达是瘢痕形成的重要原因;这些生长因子来源除了成纤维细胞自身分泌外,内皮细胞是最主要的来源<sup>[7]</sup>。我们前期的研究<sup>[7]</sup>发现,除了 VEGF 外,内皮细胞分泌的 TGF- $\beta$ 1、bFGF、PDGF 和 ET-1 水平均显著高于成纤维细胞。TGF- $\beta$ 1、PDGF 和 ET-1 具有促进成纤维细胞增殖和胶原合成的作用<sup>[15-20]</sup>,而 VEGF、bFGF 和 ET-1 可以促进新生血管的形成<sup>[21-22]</sup>,两者是增生性瘢痕形成的病理基础。本实验证实,瘢痕中内皮细胞生长因子水平的降低能够抑制成纤维细胞的增殖活性和胶原蛋白的产生,甚至引发成纤维细胞凋亡。其中 TGF- $\beta$ 1、PDGF 和 bFGF 水平可能发挥着主要作用。而且,单一因子水平的降低并不能引起细胞调

亡,三者水平同时降低才可以引起成纤维细胞凋亡。

需要指出的是,在本实验中,增生期 ECCM 对成纤维细胞的抑制作用,与之前的研究<sup>[7]</sup>结果——增生性瘢痕中的成纤维细胞功能活跃似乎相矛盾,原因可能与瘢痕中多种因素参与有关。比如增生期瘢痕内轻度和中度缺氧的存在,可以刺激成纤维细胞,促进其活化相关生长因子的表达<sup>[23-25]</sup>,一定程度上削弱血管内皮功能障碍对成纤维细胞的抑制作用。因此,轻微的血管内皮功能障碍并不能完全抑制成纤维细胞活化,只有当内皮功能障碍达到一定阈值,才能引发细胞功能改变并触发细胞凋亡,比如消退期内皮功能障碍。此时,组织内出现严重缺氧反而抑制成纤维细胞功能,降低生长因子的表达<sup>[26]</sup>。

通过实验发现,微血管和血管内皮在瘢痕发生和演变中发挥了重要作用;因此,抑制微血管内皮功能可能抑制增生性瘢痕的形成。内皮抑素是一种抑制内皮功能的重组蛋白<sup>[27]</sup>,本课题组利用内皮抑素注射到兔耳增生性瘢痕中,发现能够显著抑制瘢痕增生<sup>[28]</sup>,与 Zhang 等<sup>[29]</sup>利用血管生成抑制剂预处理伤口,愈后减少瘢痕的结果基本一致。这些实验均提示,利用内皮功能障碍可能是未来治疗增生性瘢痕的一种新方法和新策略。

### 参 考 文 献

- [1] Köse O, Waseem A. Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? [J]. *Dermatol Surg*, 2008, 34(3): 336-346.
- [2] Renò F, Sabbatini M, Lombardi F, et al. *In vitro* mechanical compression induces apoptosis and regulates cytokines release in hypertrophic scars [J]. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(5): 331-336.
- [3] Zhu H, Tamot B, Quinton M, et al. Influence of tissue origins and external microenvironment on porcine foetal fibroblast growth, proliferative life span and genome stability [J]. *Cell Prolif*, 2004, 37(3): 255-266.
- [4] Cohen Z, Bonvento G, Lacombe P, et al. Serotonin in the regulation of brain microcirculation [J]. *Prog Neurobiol*, 1996, 50(4): 335-362.
- [5] Vane JR, Botting RM. Secretory functions of the vascular endothelium [J]. *J Physiol Pharmacol*, 1992, 43(3): 195-207.
- [6] Baumgartner-Parzer SM, Waldhäusl WK. The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109(Suppl 2): S166-S179.
- [7] Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, et al. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function [J]. *Science*, 2001, 294(5542): 559-563.
- [8] Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels [J]. *Science*, 2001, 294(5542): 564-567.
- [9] Shen Q, Goderie SK, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells [J]. *Science*, 2004, 304(5675): 1338-1340.
- [10] Li W, Li P, Hua Q, et al. The impact of paracrine signaling in brain microvascular endothelial cells on the survival of neurons [J]. *Brain Res*, 2009, 1287: 28-38.
- [11] Leventhal C, Rafii S, Rafii D, et al. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 13(6): 450-464.
- [12] Park JA, Choi KS, Kim SY, et al. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule- to cell-based approaches [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(2): 247-253.
- [13] Wang XQ, Liu YK, Qing C, et al. Hyperactivity of fibroblasts and functional regression of endothelial cells contribute to microvessel occlusion in hypertrophic scarring [J]. *Microvasc Res*, 2009, 77(2): 204-211.
- [14] Wang XQ, Liu YK, Mao ZG, et al. Isolation, culture and characterization of endothelial cells from human hypertrophic scar [J]. *Endothelium*, 2008, 15(3): 113-119.
- [15] Younai S, Nichter LS, Wellisz T, et al. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor- $\beta$  in keloid and hypertrophic scar fibroblasts [J]. *Ann Plast Surg*, 1994, 33(2): 148-151.
- [16] Kopp J, Preis E, Said H, et al. Abrogation of transforming growth factor- $\beta$  signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21570-21576.
- [17] Tan EM, Qin H, Kennedy SH, et al. Platelet-derived growth factors-AA and -BB regulate collagen and collagenase gene expression differentially in human fibroblasts [J]. *Biochem J*, 1995, 310(Pt 2): 585-588.
- [18] Falanga V, Katz MH, Kirsner R. The effects of endothelin-1 on human dermal fibroblast growth and synthetic activity [J]. *J Surg Res*, 1992, 53(5): 515-519.
- [19] Carley WW, Niedbala MJ, Gerritsen ME. Isolation, culture and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 7(6): 620-630.
- [20] Krålling BM, Bischoff J. A simplified method for growth of human microvascular endothelial cells results in decreased senescence and continued responsiveness to cytokines and growth factors [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 33(4): 308-315.
- [21] Rofstad EK, Halsør EF. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4932-4938.
- [22] Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(5): 1537-1547.
- [23] Zheng J, Song F, Lu SL, et al. Dynamic hypoxia in scar tissue during human hypertrophic scar progression [J]. *Dermatol Surg*, 2014, 40(5): 511-518.
- [24] Phillips PG, Birnby LM, Narendran A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(5Pt1): L789-L800.
- [25] Lario S, Mendes D, Bescós M, et al. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in an experimental model of kidney transplantation [J]. *Transplantation*, 2003, 75(10): 1647-1654.
- [26] Lynam EC, Xie Y, Dawson R, et al. Severe hypoxia and malnutrition collectively contribute to scar fibroblast inhibition and cell apoptosis [J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(5): 664-671.
- [27] Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis [J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3403-3411.
- [28] Wang ZY, Song F, Xu LJ, et al. Endostar injection inhibits rabbit ear hypertrophic scar formation [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2012, 11(4): 271-276.
- [29] Zhang LX, Wang Z, Yang GP. The effect of the angiogenesis inhibitor, angiostatin, on hypertrophic scarring [J]. *J Surg Res*, 2003, 114(2): 262.

[收稿日期] 2019-02-26

[本文编辑] 瞿麟平

