

论著·基础研究

基于“细菌超载”证据的增生性瘢痕治疗新方式探索

原 博¹, 余佳容¹, 张 铮², 王西樵¹, 刘 琰¹, 夏照帆³

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形与创面修复科, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院整形外科, 上海 200011; 3. 海军军医大学第一附属医院烧伤外科, 上海 200433

[摘要] **目的**·观察体外细菌对成纤维细胞功能的影响, 以及体内细菌干预对兔耳增生性瘢痕的影响。**方法**·收集2023年1月—2024年12月上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形与创面修复科的16例临床增生性瘢痕标本和正常皮肤组织, 进行革兰染色。标准金黄色葡萄球菌扩增灭活后, 以 10^2 、 10^3 和 10^4 CFU/mL干预正常皮肤来源的成纤维细胞。采用Edu染色观察金黄色葡萄球菌对成纤维细胞增殖的影响, 免疫荧光染色法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达, Western blotting检测血管内皮生长因子(vascular permeability factor, VEGF)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、I型胶原及III型胶原蛋白表达, 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测金黄色葡萄球菌对白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-8、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等炎症因子分泌的影响。选取10只新西兰白兔, 双耳共建立80个创面, 创面采用金黄色葡萄球菌菌液处理, 待增生性瘢痕形成后, 予瘢痕皮内注射左氧氟沙星或生理盐水, 观察瘢痕生长情况进行温哥华瘢痕量表评分。兔耳瘢痕取材后, 进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、Masson染色和革兰染色, 采用免疫组织化学检测IL-6、IL-8、TNF- α 及MCP-1等炎症因子的表达。**结果**·临床瘢痕组织内存在大量革兰染色阳性菌, 与正常皮肤比较差异有统计学意义($P=0.001$)。体外实验证明: 低丰度细菌(10^2 、 10^3 CFU/mL)可显著促进成纤维细胞增殖($P=0.045$, $P=0.017$)和 α -SMA表达($P=0.042$, $P=0.002$), 促进VEGF($P=0.023$, $P=0.011$)、TGF- β 1($P=0.029$, $P=0.031$)、I型胶原蛋白($P=0.032$, $P=0.025$)、III型胶原蛋白表达($P=0.019$, $P=0.027$), 以及促进炎症因子IL-6($P=0.023$, $P=0.011$)、IL-8($P=0.021$, $P=0.009$)、TNF- α ($P=0.029$, $P=0.011$)及MCP-1($P=0.023$, $P=0.008$)分泌。兔耳瘢痕中注射左氧氟沙星后, 45 d和60 d时瘢痕增生减轻($P=0.019$, $P=0.013$); 60 d时瘢痕炎症细胞减少, 细菌含量降低, 胶原蛋白沉积变少, 炎症因子IL-6($P=0.025$)、IL-8($P=0.021$)、MCP-1($P=0.028$)及TNF- α ($P=0.019$)等表达下降。**结论**·低丰度细菌促进瘢痕成纤维细胞致纤维化能力, 抗生素应用可有效减轻增生性瘢痕的形成。

[关键词] 增生性瘢痕; 细菌; 成纤维细胞; 炎症因子**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2026.05.004 **[中图分类号]** R453.2 **[文献标志码]** A

Novel approach to hypertrophic scar treatment based on evidence of bacterial overload

Yuan Bo¹, Yu Jiarong¹, Zhang Zheng², Wang Xiqiao¹, Liu Yan¹, Xia Zhaofan³

1. Department of Burns, Plastic Surgery and Wound Repair, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 3. Department of Burn Surgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effects of bacteria on fibroblast function *in vitro* and the impact of bacterial intervention on hypertrophic scars in rabbit ears *in vivo*. **Methods**·A total of 16 clinical hypertrophic scar specimens and normal skin tissues were collected from patients admitted to the Department of Burns, Plastic Surgery and Wound Repair, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, from January 2023 to December 2024, and subjected to Gram staining. After amplification and inactivation, standard *Staphylococcus aureus* was used to treat fibroblasts derived from normal skin at concentrations of 10^2 , 10^3 , and 10^4 CFU/mL. The effects on fibroblast proliferation were observed by using Edu staining, while α -smooth muscle actin

[基金项目] 国家自然科学基金(82472555, 82472544); 上海市重中之重研究中心建设项目(2023ZZ02013)。**[通信作者]** 王西樵, 副研究员, 博士; 电子信箱: wxqiao2002@hotmail.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82472555, 82472544); Shanghai Top Priority Research Center Project (2023ZZ02013)。**[Corresponding Author]** Wang Xiqiao, E-mail: wxqiao2002@hotmail.com。

(α -SMA) expression was detected by immunofluorescence. The expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), type I collagen and type III collagen were measured by Western blotting. Additionally, the secretion of inflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), was evaluated by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In the *in vivo* study, 80 wounds were created on the ears of 10 New Zealand white rabbits, followed by inoculation with *Staphylococcus aureus*. After hypertrophic scar formation, intradermal injections of levofloxacin or saline were administered. Scar growth was monitored, and Vancouver Scar Scale scores were recorded. Scar tissues were harvested for hematoxylin and eosin staining, Masson staining, and Gram staining, along with immunohistochemical detection of IL-6, IL-8, TNF- α and MCP-1 expression. **Results** Clinical scar tissues exhibited significantly greater abundance of Gram-positive bacteria than normal skin tissues ($P=0.001$). *In vitro* experiments demonstrated that low-abundance bacteria (10^2 and 10^3 CFU/mL) significantly promoted fibroblast proliferation ($P=0.045$, $P=0.017$) and α -SMA expression ($P=0.042$, $P=0.002$). These bacteria also enhanced the expression of VEGF ($P=0.023$, $P=0.011$), TGF- β 1 ($P=0.029$, $P=0.031$), type I collagen ($P=0.032$, $P=0.025$), and type III collagen ($P=0.019$, $P=0.027$), as well as the secretion of inflammatory cytokines IL-6 ($P=0.023$, $P=0.011$), IL-8 ($P=0.021$, $P=0.009$), TNF- α ($P=0.029$, $P=0.011$), and MCP-1 ($P=0.023$, $P=0.008$). In the rabbit ear model, levofloxacin injection significantly reduced scar hyperplasia at 45 and 60 days ($P=0.019$, $P=0.013$). At 60 days, treated scars showed decreased inflammatory cell infiltration, reduced bacterial load, less collagen deposition, and lower expressions of IL-6 ($P=0.025$), IL-8 ($P=0.021$), MCP-1 ($P=0.028$), and TNF- α ($P=0.019$). **Conclusions** Low-abundance bacteria promote the profibrotic capacity of scar fibroblasts, while antibiotic application effectively mitigates hypertrophic scar formation.

[Key words] hypertrophic scar; bacteria; fibroblast; inflammatory cytokine

创面愈合后，瘢痕中一直存在慢性炎症反应^[1]。既往文献多将其归因于无菌性炎症，但近年也有研究^[2-3]指出微生物和瘢痕形成密切相关，亦有报道^[4]指出，使用含抗菌成分的敷料杀菌可以减轻愈合后瘢痕。笔者团队^[5]曾收集瘢痕形成时间介于6~12个月的33例增生性瘢痕组织，以及36例正常皮肤组织，通过高通量测序发现：增生性瘢痕存在“细菌超载”现象，其中金黄色葡萄球菌丰度显著高于正常皮肤，且与温哥华瘢痕量表评分呈正相关。该现象突破了“创面愈合后瘢痕组织内无菌”的传统观念，部分解释了瘢痕内慢性炎症持续存在的原因，以及临床上伴有毛囊炎的下颌、会阴部瘢痕增生异常严重等现象。但是，瘢痕内低丰度的细菌，是否是瘢痕增生的致病因素之一？另外，对瘢痕内细菌进行抗生素治疗，是否可以部分减轻瘢痕增生？本研究拟通过体内外实验，初步阐明细菌对瘢痕形成的影响，以及寻找干预瘢痕增生的新方法。

1 材料和方法

1.1 标本收集

选取2023年1月—2024年12月于上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形与创面修复科住院并行瘢痕切除、自体皮肤移植术的增生性瘢痕患者16例。排除合并瘢痕感染及瘢痕疙瘩的患者。以患者术后残留的正常皮肤组织作为对照组。

1.2 检测指标与方法

1.2.1 组织学观察 取人体正常皮肤和瘢痕组织，去除表皮及真皮浅层，经4%多聚甲醛固定后，于梯度乙醇中连续脱水，二甲苯透明，低熔点石蜡包埋并定向连续切片，厚度5 μ m。固定后的组织进行革兰染色（试剂盒购自武汉赛维尔生物技术有限公司），观察并采集图像。兔耳瘢痕组织处理同上，分别进行革兰染色、苏木精-伊红（hematoxylin and eosin, HE）染色及Masson染色，操作均参照标准实验流程。

1.2.2 正常皮肤成纤维细胞分离培养 采用组织块培养法，取正常皮肤组织经PBS冲洗后剪碎，加入含10%胎牛血清的DMEM培养瓶中，置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱内孵育。1周后于显微镜下可观察到成纤维细胞自组织块迁出，待细胞融合度达80%时进行传代。本研究采用第2~6代细胞。

1.2.3 细菌刺激成纤维细胞培养模型的建立 将正常皮肤组织中培养的成纤维细胞接种于75 cm²培养瓶中。购买金黄色葡萄球菌菌株，经培养扩增后，于100 $^{\circ}$ C条件下灭活10 min，获得含灭活细菌及其代谢产物的菌液。分别按照 10^2 、 10^3 、 10^4 CFU/mL的浓度将其添加至成纤维细胞培养瓶中，孵育48 h后，采用Edu染色法观察细胞增殖情况，同时收集细胞培养上清液，用于酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）；另抽提细胞蛋白质，用于Western blotting检测。

1.2.4 ELISA法检测上清液中IL-6、IL-8、TNF- α 及MCP-1的浓度 采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测(ELISA试剂盒均购自上海森雄科技实业有限公司)。以白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)为例:将抗大鼠IL-6单抗包被于酶标板上,使标准品和样本中的IL-6与单抗特异性结合;加入生物素化的抗大鼠IL-6抗体,形成免疫复合物并结合于板上;再加入辣根过氧化物酶标记的亲合素使其与生物素结合,最后加入酶底物显色,在450 nm处测定吸光度($D_{450\text{ nm}}$)值,并计算相应IL-6的浓度。同法检测IL-8、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)浓度。

1.2.5 Western blotting检测TGF- β 1、VEGF、I型胶原及III型胶原蛋白 用RIPA裂解液提取总蛋白,并通过BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,转印至硝酸纤维素膜上。用5%脱脂牛奶封闭1 h,随后加入以下分子的一抗,4℃孵育过夜:转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、I型胶原及III型胶原蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(稀释度均为1:1 000;武汉三鹰生物技术有限公司),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(1:1 000;美国Cell Signaling Technology)。TBST洗膜3次,每次10 min。二抗室温孵育1 h, TBST漂洗3次,每次10 min。采用化学发光法显影,使用ImageJ软件对蛋白条带进行灰度值分析。

1.2.6 Edu染色法检测细胞增殖 为检测金黄色葡萄球菌对成纤维细胞增殖水平的调控作用,本研究采用Edu染色法进行检测。具体步骤如下:收集培养后的成纤维细胞,与10 mmol/L的Edu试剂(货号C0075S,上海碧云天生物技术股份有限公司)共同孵育;用4%多聚甲醛固定细胞,加入反应缓冲液孵育;使用Hoechst33342染料对细胞核进行染色,置于荧光显微镜下观察;通过ImageJ软件对红色荧光强度进行定量分析,以此评估细胞增殖水平。

1.2.7 免疫荧光染色法检测 α -SMA表达 收集细胞后,以4%甲醛固定,PBS洗涤,室温下用0.1% Triton X-100渗透处理15 min。经1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭后,加入抗 α -平

滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(1:200; ab51520, 英国Abcam)室温孵育1 h,再以兔抗小鼠二抗(1:100; 北京索莱宝科技有限公司)室温孵育1 h。最后用4',6'-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI; 美国Sigma)染色。采用共聚焦激光扫描显微镜(德国Zeiss)观察并采集图像。

1.2.8 兔耳增生性瘢痕模型制备 选取10只新西兰白兔[雌雄各5只,月龄4个月,体质量(2.5 $\pm$ 0.3) kg],参照既往文献方法制作兔耳瘢痕模型^[6]。新西兰白兔购自上海甲干生物科技有限公司,生产许可证号SCXK(沪)2025-0007,使用许可证号SYXK(沪)2024-0002。按照《实验动物环境及设施》有关规定,所有新西兰兔单笼饲养,每日12 h光照,相对湿度为40%~65%,温度18~25℃,可自由进水及进食。

于每侧兔耳制作4个面积1 cm²的创面,深达软骨表面,随后于创面滴加10³ CFU/mL的金黄色葡萄球菌菌液1 mL。造模后24 d兔耳瘢痕形成,将每侧兔耳的4个瘢痕分为2组,每组2个,最终对照组、实验组各40个瘢痕。处理方法如下:对照组瘢痕内直接注射生理盐水,实验组注射左氧氟沙星注射液(0.75 mg/mL,先声药业有限公司),单瘢痕注射剂量为0.1 mL;分别于造模后第24、31、38日各注射1次,每周1次,共3次;于造模后第60日取材,进行后续实验。并在第24、31、38、45、60日对瘢痕进行温哥华瘢痕量表评分,内容包括色泽、血管分布、柔软度及厚度。

1.2.9 免疫组织化学染色检测IL-6、IL-8、MCP-1和TNF- α 表达 采用链霉亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法进行免疫组织化学染色,主要步骤如下:石蜡切片常规脱蜡至水,内源性过氧化物酶封闭液处理10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。BSA封闭15 min后,加入兔抗人IL-6、IL-8、TNF- α 及MCP-1抗体(工作浓度1:100;美国Santa Cruz Biology),4℃过夜孵育;PBS冲洗后加入抗兔二抗,室温孵育30 min。PBS冲洗,加入SP试剂,室温孵育30 min。PBS冲洗后,二氨基苯乙胺(diaminobenzidine, DAB)显色10~15 min。流水冲洗、脱水、中性树脂封片。以正常兔血清代替一抗作为阴性对照,出现棕黄色染色判定为阳性表达。

1.3 统计学分析

采用SPSS 27.0软件进行数据分析。符合正态分

布的定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2组间比较采用独立样本 t 检验；多组间比较采用单因素方差分析，当差异有统计学意义时进一步采用最小显著差异 (least significant difference, LSD) 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 临床基本情况

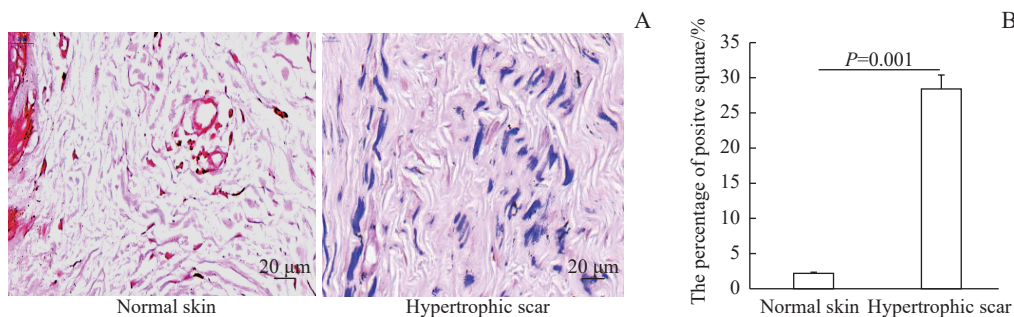
患者瘢痕生长时间为6个月至2年；其中男性10例，平均年龄 (37.6 ± 5.7) 岁；女性6例，平均年龄 (34.7 ± 4.8) 岁。2组性别构成与年龄比较，差异均无统计学意义。

2.2 瘢痕组织内革兰阳性细菌数量显著增多

结果显示，在正常皮肤组织内仅见极少量的革兰阳性菌，而在增生性瘢痕组织内可见大量革兰阳性菌，细菌呈现颗粒状，数量显著高于正常皮肤组 ($P=0.001$, 图1)。

2.3 低丰度细菌刺激成纤维细胞增殖

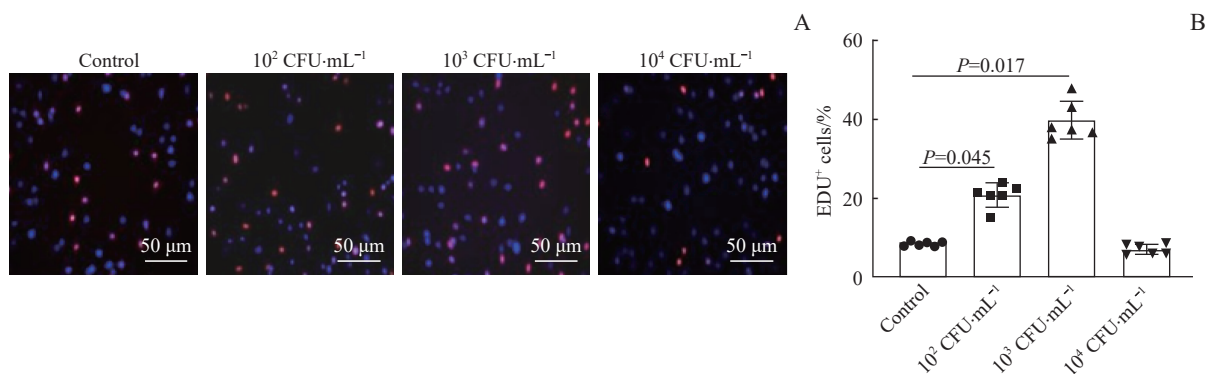
为验证瘢痕相关细菌对成纤维细胞增殖的影响，采用Edu染色法进行检测。结果显示：与对照组比较， 10^2 和 10^3 CFU/mL的细菌能够显著促进成纤维细胞增殖 ($P=0.045$, $P=0.017$)；当细菌浓度上升至 10^4 CFU/mL时，其促增殖作用有所减弱 (图2)。提示低丰度细菌可促进成纤维细胞增殖。



Note: A. Representative images of Gram staining for normal skin and hypertrophic scar tissues are presented, illustrating different bacterial distribution patterns. B. Bacterial abundance was quantified by calculating the percentage of positively stained areas, with statistical analysis results displayed.

图1 正常皮肤和增生性瘢痕革兰染色结果

Fig 1 Gram staining results of normal skin and hypertrophic scar tissues



Note: A. Cellular immunofluorescence results demonstrated fibroblast proliferation after Edu detection under different concentrations of bacterial treatment. B. The ratio of Edu-positive cells to total cells was used to assess cell proliferation and the statistical results are displayed accordingly.

图2 不同浓度细菌干预后成纤维细胞增殖水平的变化 (Edu检测)

Fig 2 Changes in fibroblast proliferation after treatment with different bacterial concentrations detected by Edu assay

2.4 低丰度细菌可刺激成纤维细胞分泌炎症因子

收集细胞培养液上清液，采用ELISA检测炎症因子表达水平，结果显示：经 10^2 CFU/mL和 10^3 CFU/mL热灭活细菌处理后，成纤维细胞分泌的IL-6 ($P=0.023$, $P=0.011$)、IL-8 ($P=0.021$, $P=0.009$)、TNF- α ($P=$

0.029 , $P=0.011$) 和 MCP-1 ($P=0.023$, $P=0.008$) 水平均呈浓度依赖性升高。当细菌浓度升至 10^4 CFU/mL时，上述炎症因子水平有所下降，但仍显著高于对照组 ($P=0.021$, $P=0.017$, $P=0.022$, $P=0.019$) (图3)。提示低丰度细菌能够促进成纤维细胞分泌炎症因子。

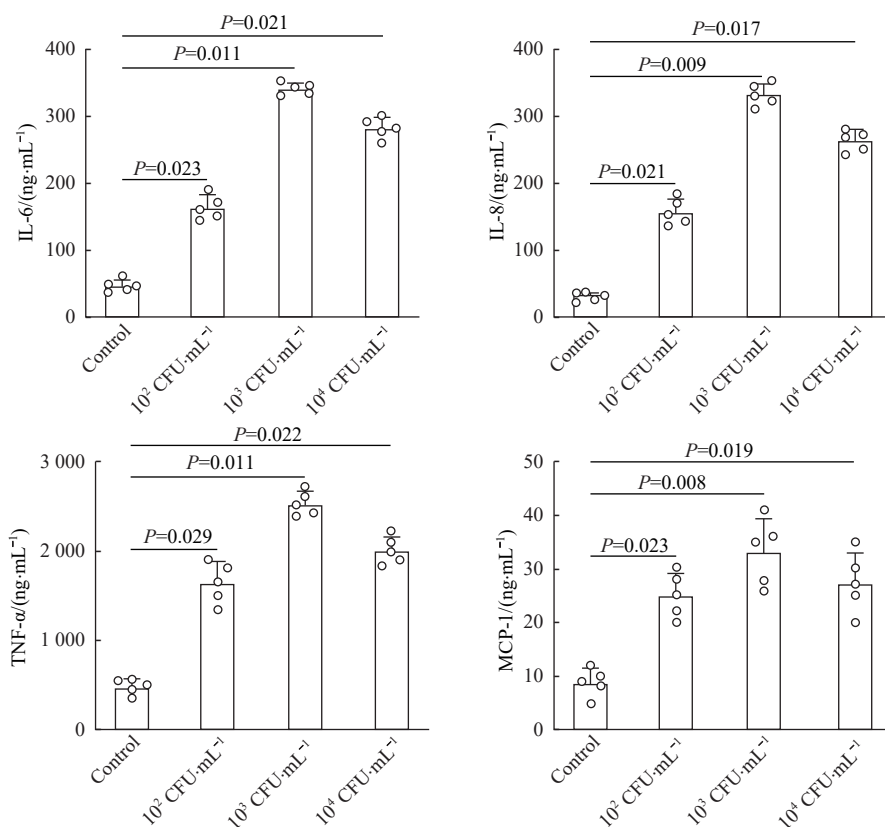


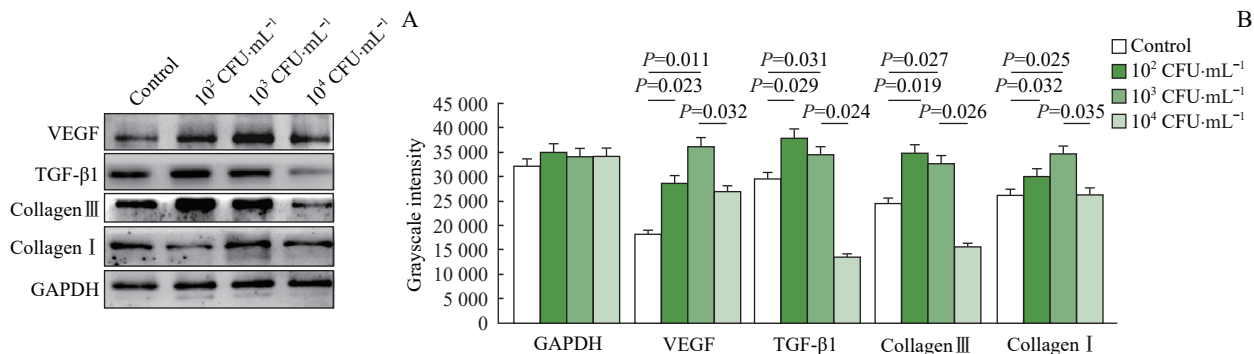
图3 不同浓度细菌干预后成纤维细胞IL-6、IL-8、TNF-α及MCP-1的分泌水平

Fig 3 Secretion levels of IL-6, IL-8, TNF-α, and MCP-1 in fibroblasts after treatment with different concentrations of bacteria

2.5 低丰度细菌显著促进成纤维细胞表达 VEGF、TGF-β1、I 型胶原及 III 型胶原

为探究瘢痕相关细菌对成纤维细胞分泌生长因子及胶原的调控作用, 采用 Western blotting 检测 VEGF、TGF-β1、I 型胶原和 III 型胶原的蛋白表达水平。结果显示: 与对照组相比, 10^2 CFU/mL 和 10^3 CFU/mL 细菌处理可显著上调成纤维细胞中 VEGF ($P=0.023$, $P=0.011$)、TGF-β1 ($P=0.029$, $P=0.031$)、

I 型胶原 ($P=0.032$, $P=0.025$) 和 III 型胶原 ($P=0.019$, $P=0.027$) 的蛋白表达; 而当细菌浓度升高至 10^4 CFU/mL 时, 上述因子的表达水平呈现下降趋势, 与 10^3 CFU/mL 组相比差异具有统计学意义 ($P=0.032$, $P=0.024$, $P=0.035$, $P=0.026$)。详见图 4。上述结果提示: 低丰度细菌可有效促进成纤维细胞中与纤维化发生相关蛋白的表达, 增强其促纤维化生物学功能。



Note: A. Western blotting was performed to analyze the expression of VEGF, TGF-β1, type III collagen, and type I collagen in fibroblasts after treatment by different concentrations of bacteria. B. The expression levels of VEGF, TGF-β1, type III collagen, and type I collagen were normalized to GAPDH.

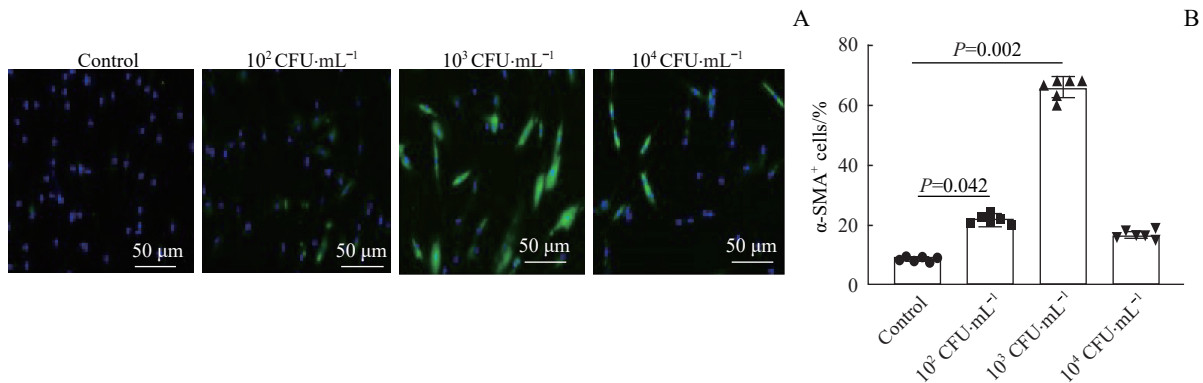
图4 不同浓度细菌处理对成纤维细胞 VEGF、TGF-β1、I 型胶原和 III 型胶原蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of different bacterial concentrations on the protein expression of VEGF, TGF-β1, type I collagen, and type III collagen in fibroblasts

2.6 低丰度细菌可显著促进成纤维细胞分化

免疫荧光检测结果显示, 对照组仅见极少量 α -SMA 阳性表达; 经 10^2 、 10^3 CFU/mL 细菌处理后, 成纤维细胞中 α -SMA 表达水平显著升高, 并与细菌呈浓

度依赖性正相关 ($P=0.042$, $P=0.002$); 当细菌浓度升至 10^4 CFU/mL 时, α -SMA 表达量有所下降, 但略高于对照组 ($P>0.05$, 图 5)。上述结果提示, 低丰度细菌可有效促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。



Note: A. Representative immunofluorescent staining images of α -SMA in fibroblasts after treatment with different bacterial concentrations. B. The ratio of α -SMA-positive cells to total cells was used to assess α -SMA expression and the statistical results are displayed accordingly.

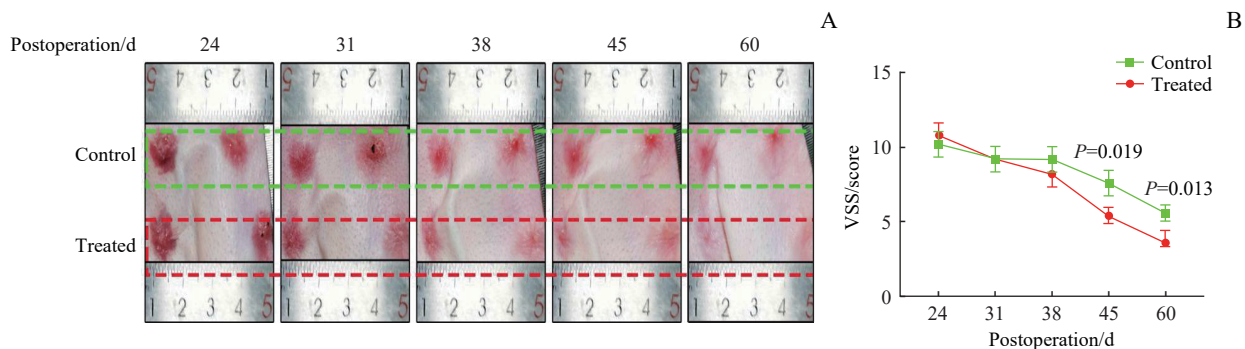
图5 不同细菌浓度作用于成纤维细胞后 α -SMA 表达的变化

Fig 5 Changes in α -SMA expression in fibroblasts after exposure to different bacterial concentrations

2.7 左氧氟沙星注射可减轻兔耳模型瘢痕增生

本研究采用兔耳增生性瘢痕模型, 探讨清除细菌对瘢痕形成的干预作用。术后第 24 日, 兔耳增生性瘢痕模型构建成功, 瘢痕组织表现为充血发红、质地坚硬且局部隆起。随后于瘢痕局部注射生理盐水 (对照组) 与左氧氟沙星 (实验组)。术后第 60 日大体观察发现: 对照组瘢痕仍呈明显红色, 组织

增厚; 而实验组瘢痕组织趋于平软, 颜色变淡, 红色浸润区域显著缩小 (图 6A)。温哥华瘢痕量表评分结果表明, 实验组评分在术后第 45 日和第 60 日均显著低于对照组 ($P=0.019$, $P=0.013$; 图 6B)。上述结果提示: 局部应用左氧氟沙星可减少兔耳模型的增生性瘢痕形成。



Note: A. Macroscopic observations of rabbit ear hypertrophic scars at different time points after intralesional injection of levofloxacin. B. Vancouver Scar Scale (VSS) scores were compared at the corresponding time points, and the statistical results are shown.

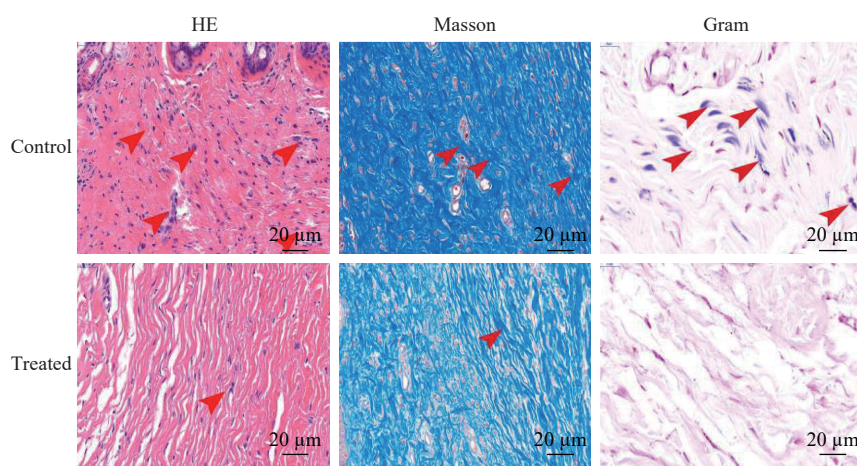
图6 兔耳增生性瘢痕经左氧氟沙星注射后不同时相点的瘢痕外观与温哥华瘢痕量表评分

Fig 6 Scar appearance and Vancouver Scar Scale scores at different time points after levofloxacin injection in rabbit ear hypertrophic scars

2.8 左氧氟沙星注射可减少瘢痕内细菌数量及胶原沉积

于观察终点取兔耳瘢痕组织, 革兰染色显示: 对照组可见较多致密阳性染色, 而实验组阳性染色明显减少; HE 染色显示: 与对照组相比, 实验组炎症细胞浸

润减少, 胶原排列相对疏松, 更接近成熟瘢痕或正常皮肤组织形态; Masson 染色显示: 对照组胶原大量沉积、排列致密, 而实验组胶原含量显著降低、结构疏松, 与正常皮肤更为接近 (图 7)。提示局部应用抗生素可减少瘢痕内细菌数量、炎症细胞浸润及胶原沉积。



Note: Representative HE staining, Masson staining, and Gram staining images of rabbit ear hypertrophic scars. The red arrows represent typical inflammatory cells, collagen fibers, and bacteria, respectively.

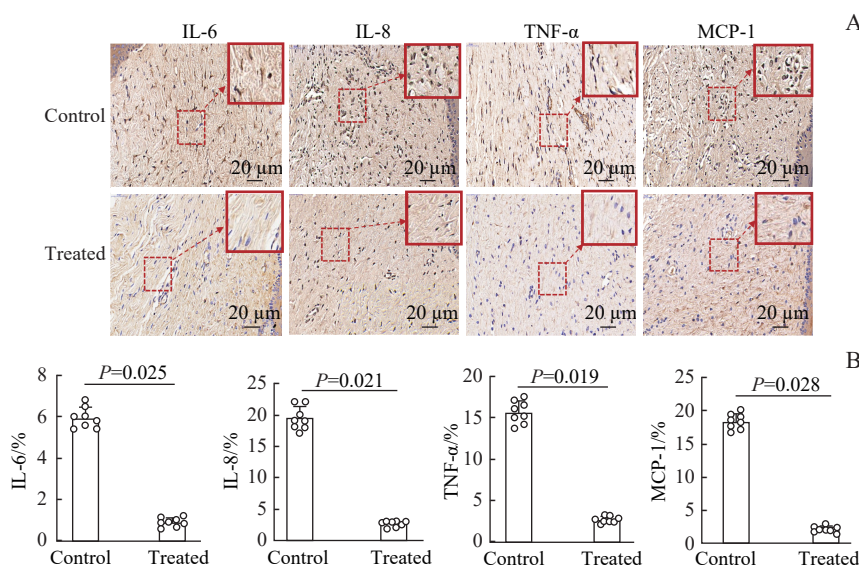
图7 左氧氟沙星注射后第60日兔耳增生性瘢痕的组织学染色

Fig 7 Histological staining of rabbit ear hypertrophic scars at day 60 after levofloxacin injection

2.9 左氧氟沙星注射可减少瘢痕内炎症因子产生

于观察终点取材,采用免疫组织化学染色检测炎症因子表达。结果显示,对照组中IL-6、IL-8、TNF- α 和

MCP-1呈高表达,而实验组上述因子表达水平显著降低($P=0.025$, $P=0.021$, $P=0.019$, $P=0.028$) (图8)。提示局部应用抗生素可减少瘢痕内炎症因子的产生。



Note: A. Immunohistochemical staining of IL-6, IL-8, TNF- α , and MCP-1 in rabbit ear hypertrophic scar tissues before and after injection of levofloxacin. B. Quantitative analysis of the relative expression levels of inflammatory cytokines.

图8 兔耳增生性瘢痕内注射左氧氟沙星后炎症因子IL-6、IL-8、TNF- α 、MCP-1的表达情况

Fig 8 Expression of inflammatory cytokines IL-6, IL-8, TNF- α , and MCP-1 in rabbit ear hypertrophic scar tissues after intralesional injection of levofloxacin

3 讨论

Ogawa^[1]认为,炎症可能是增生性瘢痕发生的重要驱动因素。我们发现:去除表皮及真皮浅层组织后,瘢痕内存在以金黄色葡萄球菌等为主的“细菌超载”现象;这可能是瘢痕中慢性炎症迁延的重要原

因^[1]。创面愈合后组织中为何残留细菌呢?结合以往文献分析,可能与细菌耐药、生物膜形成、免疫逃逸等多种因素有关^[7-8]。有文献报道:金黄色葡萄球菌可以刺激中性粒细胞产生衣康酸来抑制中性粒细胞氧化暴发,从而逃避机体的免疫清除^[9];这些逃逸的细菌最终定植于皮肤,成为瘢痕组织中的共生菌。

而成纤维细胞作为瘢痕修复中的关键细胞,其功能主要受到周边微环境的调控。因此,瘢痕中低丰度细菌的存在,可能对成纤维细胞致纤维化功能产生重要影响。

本研究中,我们使用低丰度细菌刺激成纤维细胞后,发现纤维化相关因子比如 VEGF、TGF- β 1、I 型胶原和 III 型胶原蛋白表达增加。成纤维细胞产生胶原和分泌生长因子是其根本特征,细胞增殖、成纤维细胞肌化等细胞学事件与瘢痕组织中血管化和纤维化进程密切相关。在这些因素合力驱动下,瘢痕发生充血、增生挛缩等改变。而瘢痕局部形成的纤维化或起到“固定细菌”以防止感染扩散和对组织的破坏等生物学目的,因此细菌和纤维化之间可能存在着相互影响和相互制约的关系。

本研究中我们也发现:细菌刺激后,成纤维细胞分泌 IL-6、IL-8、MCP-1、TNF- α 等炎症因子增多。传统观念认为:分泌炎症因子是中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞的“专职”,而成纤维细胞产生炎症因子,提示成纤维细胞可能“兼职”炎症细胞的某些功能。近期研究^[10-11]发现,成纤维细胞这种炎症预警功能,与皮肤常驻免疫细胞少、成纤维细胞率先感受炎症信号有关,因而其可发挥“岗哨”细胞的作用。所以成纤维细胞不仅是创面修复细胞,也是炎症的“前哨”细胞,它以多种角色参与创面修复过程中的炎症和纤维化修复。据文献^[12-14]报道,IL-6、IL-8、MCP-1、TNF- α 等炎症因子均可参与肝脏、肾脏等多种器官的纤维化病理过程。因此,细菌—炎症—纤维化过程可能是机体纤维化增生的核心病理环节和共性路径。

需要说明的是,体外实验中,在 10^4 CFU/mL 浓度细菌作用下,成纤维细胞生长因子和炎症因子表达均下降,可能与细胞受到细菌和毒素的损害有关,细胞内线粒体等动力中心功能受损,生长因子和炎症因子表达下降。因此只有低丰度,即 10^3 CFU/mL 或以下的细菌才能促进瘢痕增生。另外,高丰度的细菌可能导致细胞溶解、组织感染和创面破溃。临床上发现:瘢痕自发性感染,可能与细菌浓度突破阈值、细菌增殖扩散有关。

为了验证减少细菌载量对瘢痕增生的影响,我们在兔耳创面建立后,予创面添加细菌处理,待增生性瘢痕形成后,实验组在瘢痕组织中注射左氧氟沙星,对照组注射生理盐水。左氧氟沙星是一种广谱抗菌药

物,对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、变形杆菌属等多种革兰阳性、阴性菌均具有抑制作用。一项针对前列腺纤维化的研究^[15]发现,采用左氧氟沙星治疗大肠埃希菌感染,结果逆转了前列腺的纤维化。本研究结果也发现:左氧氟沙星注射后,实验组瘢痕红色优先减退,瘢痕变平软,温哥华瘢痕量表评分明显降低。组织学进一步验证了瘢痕内细菌含量降低、炎症因子表达下降和胶原沉积变少。该结果证明:抗生素应用可以减少瘢痕形成,再次验证了细菌—炎症—纤维化这一主线存在于瘢痕增生中。

目前针对瘢痕内炎症,激素注射是临床常规治疗手段,且可获得快速、显著的效果,被作为增生性瘢痕的一线治疗^[16]。然而,激素虽然效果好,但容易复发,可能与细菌未被杀灭、炎症源头依然存在有关。一项关于博来霉素和曲安奈德的对照研究^[17]发现:在烧伤后增生性瘢痕内注射博来霉素,其疗效优于曲安奈德,可能与博来霉素是抗生素,对金黄色葡萄球菌等具有杀灭作用有关。

再者,化脓性汗腺炎是一种慢性皮肤病,与免疫异常、金黄色葡萄球菌超载有关,常导致增生性瘢痕形成^[18]。而外用抗生素是其重要治疗方法之一,如克林霉素凝胶、莫匹罗星软膏、夫西地酸乳膏等。特异性皮炎是一种免疫性疾病,也与金黄色葡萄球菌超载有关。目前,夫西地酸乳膏外用,已作为特异性皮炎的常规治疗手段^[19-20]。

综上,瘢痕细菌的存在,突破了我们对瘢痕形成机制的传统认知。本研究结果为瘢痕的细菌治疗提供了理论基础和动物实验依据,但仍缺乏临床对照研究予以验证,期待在后续的研究中进一步推进。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors declare no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有试验均已获得上海交通大学医学院附属瑞金医院医学伦理委员会的审核批准[文件号(2021)临伦审第(15)号]。所有试验过程均遵守《上海交通大学医学院附属瑞金医院医学伦理审查操作规程》的条例进行。

All experimental protocols in this study were reviewed and approved by the Medical Ethics Committee of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine [Document No. (2021) Clinical Ethics Review No. 15]. The experimental procedures were strictly conducted in accordance with the Medical Ethics Review Operational

Procedures of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院动物伦理委员会和动物医疗福利委员会批准(批件号:SH9H-2022-A612-SB)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》的条例进行。

All animal experiments conducted in this study have been reviewed and approved by the Animal Ethics Committee and the Animal Welfare Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No. SH9H-2022-A612-SB). All experimental procedures were conducted in compliance with the *Regulations on the Management of Laboratory Animals*.

作者贡献/Authors' Contributions

夏照帆、刘琰负责课题指导;王西樵负责课题设计;余佳容、原博参与实验操作、数据整理;原博、余佳容、张铮参与动物实验;王西樵、原博参与论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

Xia Zhaofan and Liu Yan were responsible for project guidance; Wang Xiqiao was in charge of project design; Yu Jiarong and Yuan Bo participated in experimental operations and data organization; Yuan Bo, Yu Jiarong, and Zhang Zheng participated in the animal experiments; Wang Xiqiao and Yuan Bo contributed to the writing and revision of the manuscript. All authors have read the final version of paper and consented to its submission.

- Received: 2025-11-19
- Accepted: 2026-01-19
- Published online: 2026-05-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Ogawa R. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 606.
- [2] Caven L T, Carabeo R A. The role of infected epithelial cells in *Chlamydia*-associated fibrosis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1208302.
- [3] Yang N, Zhang H, Zhang Y H, et al. Bacterial colonization contributes to pathological scar formation via the regulation of inflammatory response[J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 569.
- [4] Duan X Z, Li J, Gao R Z, et al. Antimicrobial hydrogel loaded with broccoli exosomes promotes anti-scarring healing of MRSA-infected wounds[J]. *Mater Today Bio*, 2025, 35: 102276.
- [5] Yu J R, Mao Z G, Zhou Z D, et al. Microbiome dysbiosis occurred in hypertrophic scars is dominated by *S. aureus* colonization[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1227024.
- [6] Hu C H, Tseng Y W, Chiou C Y, et al. Bone marrow concentrate-induced mesenchymal stem cell conditioned medium facilitates wound healing and prevents hypertrophic scar formation in a rabbit ear model[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 275.
- [7] Laarman A J, Ruyken M, Malone C L, et al. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion[J]. *J Immunol*, 2011, 186(11): 6445-6453.
- [8] Awuh J A, Flo T H. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(9): 1625-1648.
- [9] Tomlinson K L, Riquelme S A, Baskota S U, et al. *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil itaconate production that suppresses the oxidative burst[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(2): 112064.
- [10] Smith R S, Smith T J, Blieden T M, et al. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation[J]. *Am J Pathol*, 1997, 151(2): 317-322.
- [11] Silzle T, Randolph G J, Kreutz M, et al. The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(2): 173-180.
- [12] Bahcecioglu I H, Koca S S, Poyrazoglu O K, et al. Hepatoprotective effect of infliximab, an anti-TNF- α agent, on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis[J]. *Inflammation*, 2008, 31(4): 215-221.
- [13] Therrien F J, Agharazii M, Lebel M, et al. Neutralization of tumor necrosis factor- α reduces renal fibrosis and hypertension in rats with renal failure[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 36(2): 151-161.
- [14] Papiris S A, Tomos I P, Karakatsani A, et al. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations[J]. *Cytokine*, 2018, 102: 168-172.
- [15] Wong L, Hutson P R, Bushman W. Resolution of chronic bacterial-induced prostatic inflammation reverses established fibrosis[J]. *Prostate*, 2015, 75(1): 23-32.
- [16] Yan X, Jiang R H, Tang Q H, et al. Targeting local glucocorticoid metabolism with a silk fibroin microneedle for more effective hypertrophic scar repair[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 319(Pt 4): 145753.
- [17] Farokh Forghani S, Sobouti B, Shahbazi A, et al. Comparing the efficacy of triamcinolone acetonide versus bleomycin in hypertrophic scars in burn patients: a clinical trial[J]. *Med J Islam Repub Iran*, 2024, 38: 111.
- [18] Sabat R, Jemec G B E, Matusiak Ł, et al. Hidradenitis suppurativa[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 18.
- [19] Beattie P E, Lewis-Jones M S. Parental knowledge of topical therapies in the treatment of childhood atopic dermatitis[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2003, 28(5): 549-553.
- [20] Belloni Fortina A, Neri L. Antibiotic therapy in the management of atopic dermatitis[J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2015, 150(3): 321-325.

[本文编辑] 崔黎明

