

长链非编码 RNA H19 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响*

章杰 李文芳# 王芳 杨红华 万芸 刘伟

(南昌大学第一附属医院 江西南昌 330006)

摘要:目的:探讨长链非编码 RNA H19 在瘢痕疙瘩组织中的表达情况及对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响及机制。方法:本次实验共收集 8 例瘢痕疙瘩患者组织标本,对照组取自 8 例成熟皮肤、8 例成熟瘢痕,通过 RT-PCR 法检测长链非编码 RNA H19 的表达;对体外培养的人瘢痕疙瘩成纤维细胞,首先采用脂质体介导的 scramble siRNA、H19 siRNA、阴性对照 siRNA 转染体外培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞,验证 H19 siRNA 的转染效率;MTT 法检测转染 H19 siRNA 后成纤维细胞的增殖,Western blotting 检测转染后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)的表达。结果:与对照组相比,H19 mRNA 的表达量在瘢痕疙瘩患者中明显升高($P < 0.05$);与 scramble siRNA、阴性对照 siRNA 相比,转染 48 h 后 H19 siRNA 转染的成纤维细胞 H19 mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$);与空白对照组(转染时不加 siRNA 和脂质体)和阴性对照 siRNA 组相比,使用 H19 的 siRNA 转染后,成纤维细胞的增殖明显受到抑制,mTOR 和 VEGF 的表达水平明显降低($P < 0.05$)。结论:下调非编码长链 RNA H19 的表达量可以抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖。

关键词:瘢痕疙瘩;长链非编码 RNA H19;增殖

Abstract: Objective: To investigate the effect of long non-coding RNA H19 on proliferation of human keloid fibroblasts and the possible role of the mechanisms underlying keratinocyte proliferation. Methods: The samples were collected from 24 patients, in which were 8 with keloids, 8 with normal scars and 8 with normal skin control. The H19 expression level in human keloid fibroblasts, normal scars and normal skin were determined by RT-PCR. H19-siRNA, scramble siRNA and control siRNA mediated by lipofectamin were introduced into human keloid fibroblasts, respectively. The silencing effect of H19 was verified by RT-PCR. An effect of H19 on cell proliferation was investigated by MTT colorimetric assay. To evaluate which signaling mediators were regulated by H19 in keloid fibroblast, the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were tested by western blot. Results: The data showed that H19 levels were markedly increased in human keloids fibroblasts compared with normal controls ($P < 0.05$). Forty-eight hours after transfection, mRNA expression of H19 in H19 siRNA treated cells was remarkably reduced as compared with those in the scramble siRNA and control siRNA treated cells ($P < 0.05$). H19 siRNA treatment obviously inhibit the proliferation of Keloid Fibroblasts ($P < 0.05$). The study further verified that H19 was associated with mTOR and VEGF, and that this association resulted in the proliferation of human keloids fibroblasts. Conclusion: These data suggest that down-regulating the expression of H19 strongly suppressed cell proliferation of keloid fibroblasts.

Key words: Keloid; lncRNA H19; Proliferation

中图分类号: R 622

文献标识码: B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2013.09.001

瘢痕疙瘩(Keloid,KD)是特殊体质发生的一种纤维组织增生,是整形外科常见的疾病,近年大量研究表明瘢痕疙瘩的发病机制与多种信号转导通路、基因和细胞因子密切相关^[1]。成纤维细胞是瘢痕疙瘩组织的主要效应细胞,主要病理特点是过度增生、凋亡障碍及分泌大量的细胞外基质^[2]。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类长度在 200~100 000 nt 的 RNA 分子,本身不编码蛋白质,大量研究表明 lncRNA 参与了转录激活、转录干扰和核内运输等多种重要的调控过程^[3]。长链非编码 RNA H19 在多种肿瘤中异常表达,且具有原癌活性,敲除 H19 后,肿瘤细胞的增殖及侵袭能力显著降低^[4],鉴于 H19 在基因表达及肿瘤方面的独特作用,有理由推测,其与瘢痕疙瘩也有着必然的联系。然而,迄今为止对于 H19 是否在瘢痕疙瘩组织中异常表达尚不明确,本文首先通过 RT-PCR 检测患者瘢痕疙瘩组织中 H19 的 mRNA 表达情况,然后通过体外培养、siRNA 转染干扰技术探索 H19 与瘢痕疙瘩成纤维

细胞增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 病例收集 收集 2006 年 5 月~2013 年 6 月在我院就诊的 8 例瘢痕疙瘩患者组织标本,患者术前无药物治疗史,术前均经患者知情和同意,该试验方案均经过我院伦理委员会批准,术后病理证实为瘢痕疙瘩。对照组取自 8 例成熟皮肤、8 例成熟瘢痕,所取部位与瘢痕疙瘩基本相近。

1.2 成纤维细胞的分离、培养及分组 将切除的新鲜标本用生理盐水漂洗 3 次,去除上皮,切成 2 mm×2 mm 大小的组织块,平铺在无菌培养瓶上,加入 0.5 mL 培养液,放入 37℃、5%的 CO₂ 培养箱中培养,4 h 后翻转培养瓶,继续加入 5 mL 培养液及少量血清培养。3~4 d 换液一次,当培养的成纤维细胞长满瓶底后,用 PBS 漂洗,0.25%胰蛋白酶消化,传代,加入新鲜的培养液继续培养,取经过 3 次传代培养的细胞用于本实验研究。体外研究 H19 与增殖关系的实验设计:实验分为三组,空白组(转染

* 基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目资助(编号 GJJ13153)

通讯作者:李文芳,E-mail:wenfanglee@126.com

时不加 siRNA 和脂质体);阴性对照组(加入阴性对照 siRNA 与脂质体复合物);H19 siRNA 转染组(转染时加入 H19 siRNA 的质粒)。

1.3 脂质体介导的 siRNA 干扰 采用脂质体介导的 scramble siRNA、H19 siRNA、阴性对照 siRNA 转染体外培养的成纤维细胞进行转染效率的鉴定,阴性对照 siRNA 与目的基因的序列无同源性, GAPDH 作为内参。H19 的 siRNA 为三种 siRNA 的混合物包括三种:H19-siRNA1,5'-CCAACAUCA AAGACACCAUd-TdT-3';H19-siRNA2,5'-GCAG GACAUGACAUGGUCCdTdT-3';和 H19-siRNA3,5'-UAAGUCAUUUGCACUGGU UdTdT-3'^[5]。待细胞生长到 60%~80%融合时,按 scramble siRNA、H19 siRNA 转染试剂的说明书进行转染。每组设 8 个复孔,转染后用转染试剂于 37℃在培养箱培养 5 h 后。每孔中加入含有 20%胎牛血清的 DMEM 培养基。37℃培养箱培养至 24 h,更换为新鲜含 10%血清的 DMEM 培养基继续培养至 48 h 后收集细胞进行实验。

1.4 RT-PCR 检测 lncRNA 的 mRNA 表达 瘢痕疙瘩成纤维细胞转染 1 d 后收集细胞,按 RNA 分离试剂盒说明进行分析所提取总 RNA,使用反转录试剂盒(Promega)进行反转录,具体操作根据说明书进行。利用琼脂糖凝胶电泳进行检测各组 lncRNAH19 的表达,GAPDH 作为内参,定量分析各电泳条带的光密度,RT-PCR 产物以各组细胞目的基因与 GAPDH 的光密度比值进行比较,每组样本检测 8 次。患者新鲜组织标本每个样取 100 mg 进行提取 mRNA,之后步骤如上。

1.5 Westing blotting 检测转染后成纤维细胞 VEGF 和 mTOR 的表达 转染 48 h 后收集细胞,使用蛋白提取试剂盒(碧云天)提取蛋白,所有操作按照说明书进行。Bradford 法定量后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,使用湿转法转膜,封闭,一抗过夜,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)和 caspase-3 抗体均购自美国 santa cruz 公司,洗膜,HRP 标记的二抗(康为世纪)室温孵育 1 h,洗膜后,ECL 显色。Image J 软件灰度分析结果,GAPDH(santa cruz)作为内参。

1.6 MTT 法检测瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖 用胰蛋白酶将处于对数生长期的成纤维细胞消化,制成细胞浓度为 1×10^4 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,每孔细胞悬液 100 μ L。分别用质粒感染,每组设 8 个副孔,分别培养至 12、24 及 48

h 后加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L 继续培养,终止培养后,吸弃孔内上清,每孔加入 150 μ L DMSO,震荡使晶体充分溶解,酶标仪上检测波长为 490 nm 的吸光值。

1.7 统计分析 数据采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,比较采用单因素方差分析和 t 检验,两两之间的比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 定义为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 长链非编码 RNAH19 在正常组织与瘢痕疙瘩组织中的表达 长链非编码 RNA H19 的 mRNA 水平在正常皮肤与成熟纤维组织中表达水平较低,而在瘢痕疙瘩组织中表达明显升高,与前两者相比有显著统计学差异($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三种组织中 H19 mRNA 表达量 ($\bar{X} \pm S$)

正常皮肤组织	成熟瘢痕组织	瘢痕疙瘩组织
0.21	0.22	0.86*
0.11	0.12	0.75*
0.09	0.23	0.65*
0.14	0.09	0.14*
0.23	0.12	0.96*
0.22	0.21	0.75*
0.15	0.32	0.34*
0.23	0.27	0.79*
0.1725 \pm 0.05676	0.1975 \pm 0.08067	0.6550 \pm 0.27670*

注:与正常皮肤、成熟瘢痕组织相比,* $P < 0.05$ 。

2.2 鉴定转染后干扰效率 鉴定转染后干扰效率,与 scramble siRNA、阴性对照 siRNA 相比,H19 siRNA 转染后的成纤维细胞 H19 mRNA 表达量明显降低,有显著统计学差异($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 三种组织中成纤维细胞 H19 mRNA 表达量 ($\bar{X} \pm S$)

阴性对照组 siRNA	scramble siRNA	H19 siRNA
0.42	0.53	0.01*
0.60	0.40	0.05*
0.70	0.60	0.09*
0.63	0.91	0.06*
0.64	0.43	0.01*
0.32	0.65	0.02*
0.85	0.22	0.03*
0.86	0.92	0.01*
0.6280 \pm 0.1880	0.5825 \pm 0.2440	0.0350 \pm 0.0293*

注:与 scramble siRNA、阴性对照 siRNA 相比,* $P < 0.05$ 。

2.3 转染后成纤维细胞增殖的变化 与空白对照组相比,H19 siRNA 转染后的成纤维细胞增殖在 12、24 和 48 h 内明显受抑制,统计学差异显著($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 转染后成纤维细胞增殖的变化 ($\bar{X} \pm S$)

空白组(OD 值)	质粒转染组(OD 值)	t	P 值	
12 h	0.1982 \pm 0.0279	0.1421 \pm 0.0153	20.03	<0.01
24 h	0.2563 \pm 0.05127	0.2015 \pm 0.0281	3.25	<0.01
48 h	0.3143 \pm 0.0984	0.2312 \pm 0.0315	2.79	<0.05

2.4 转染后成纤维细胞的 Stat3 和 mTOR 的变化与空白组和阴性对照组相比, H19 siRNA 转染组的 VEGF 和 mTOR 表达水平明显降低, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 4、表 5。

表 4 三种组织中 VEGF 表达水平 ($\bar{X} \pm S$)

空白组	阴性对照组	H19 siRNA 转染组
0.96	0.87	0.36*
0.91	1.13	0.49*
1.12	0.86	0.34*
0.89	0.92	0.28*
0.87	0.89	0.31*
0.950± 0.1007	0.934± 0.1119	0.356± 0.0808*

注:与空白组和阴性对照组相比, * $P < 0.05$ 。

表 5 三种组织中 mTOR 表达水平 ($\bar{X} \pm S$)

空白组	阴性对照组	H19 siRNA 转染组
0.72	0.65	0.12*
0.61	0.79	0.19*
0.49	0.56	0.27*
0.69	0.60	0.11*
0.54	0.57	0.23*
0.610± 0.09721	0.634± 0.09397	0.184± 0.06914*

注:与空白组和阴性对照组相比, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究结果首次证实长链非编码 RNA H19 在瘢痕疙瘩组织中的表达异常升高, 以往研究表明病理性瘢痕疙瘩的发生与多种信号转导异常有关, 其中原癌基因 c-Myc 和转录因子 E2F1 在瘢痕疙瘩组织中发挥重要作用, 原癌基因 c-Myc 与细胞增殖、分化关系密切, 主要作用机制是通过编码生长因子、受体和细胞内信息传递物质调控细胞的生长增殖与分化, c-Myc 蛋白的表达在疙瘩成纤维组织中明显升高^[6]。最近一项研究表明 c-Myc 可以诱导 lncRNA H19 的表达^[7]。E2F1 蛋白在瘢痕疙瘩组织中表达水平较正常皮肤组织明显升高^[8-9], 它在成纤维细胞的分化、增殖或表型转化及胶原合成中发挥重要的作用。此外, 研究同时证实 E2F1 可以诱导 H19 的表达^[10]。因此, 我们推测瘢痕疙瘩组织中成纤维细胞可能通过 c-Myc 及 E2F1 调控 H19 的表达, 从而在瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖中发挥重要作用。

mTOR 是哺乳动物雷帕霉素的靶蛋白, P70S6k 是核糖体 40s 小亚基 S6K 蛋白激酶, 通过磷酸化 S6 蛋白激酶 5' TOPmRNA 的翻译起始, 5' TOPmRNA 翻译的产物控制包括大部分的翻译元件成分, 而翻译元件在有丝分裂原刺激引起的细胞生长、增殖过程中发挥关键的作用^[11]。抑制 mTOR 活性可以使下游的 P70S6K 和 4E-BP1 磷酸化受阻, 阻止真核起始因子 eIF-4E 的释放和转录, 抑制细胞生长增殖。研究证实 mTOR/P70S6k 信号途径是瘢痕疙瘩发病机制中的重要参与者, 抑制 mTOR 的活性可以抑制疙瘩成纤维细胞的增殖^[12]。本研究发现下调 H19 基因

可以明显降低 mTOR 的表达量, 提示 H19 可能通过 mTOR 信号通路控制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖。血管内皮生长因子 (VEGF) 是新生血管形成中重要的血管内皮细胞刺激因子^[13], 在正常人体内分布广泛, 生理情况下表达水平较低, 在一些病理情况下如肿瘤组织中过量表达, 主要作用是促进血管生成增加血供以及促进损伤组织和血管内皮细胞的修复。VEGF 过表达是瘢痕疙瘩形成及发展的重要因素^[14-15], 抑制瘢痕疙瘩中 VEGF 的产生可以减少新生血管的数量, 从而显著抑制瘢痕疙瘩的生长^[16]。以往研究证实 VEGF 在疙瘩组织中的全层均有表达, 但主要由角肌细胞和成纤维细胞产生。本研究发现降低 H19 的表达量可以显著抑制 VEGF 的生成, 从而抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖, 表明 H19 是成纤维细胞生成 VEGF 的重要调节因子。

综上所述, H19 的过量表达与瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖密切相关, 下调 H19 的表达可以抑制 mTOR 和 VEGF 的产生, 从而抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖, 提示 H19 可以作为瘢痕疙瘩治疗的一个新靶点。

参考文献

- [1] Wolfram D, Tzankov A, Pulzl P, et al. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management[J]. *Dermatol Surg*, 2009, 35: 171-181
- [2] Mofikoya BO, Adeyemo WL, Abdus-salam AA. Keloid and hypertrophic scars: a review of recent developments in pathogenesis and management[J]. *Nig Q J Hosp Med*, 2007, 17: 134-139
- [3] Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1: 391-407
- [4] Matouk I, Raveh E, Ohana P, et al. The increasing complexity of the oncofetal h19 gene locus: functional dissection and therapeutic intervention[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 4 298-4 316
- [5] Yang F, Bi J, Xue X, et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells [J]. *FEBS J*, 2012, 279: 3 159-3 165
- [6] 李广帅, 陈言汤, 牛扶幼, 等. 病理性瘢痕组织中 survivin mRNA 和 C-myc、P27kip1 蛋白的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2006, 41(6): 1 030-1 033
- [7] Baryshte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 5 330-5 337
- [8] 张怀军, 邢新, 王大为, 等. E2F1 蛋白在病理性瘢痕组织中的表达[J]. *实用美容整形外科杂志*, 2003, 14(4): 169-171
- [9] 张怀军, 李桑蕾, 张磊, 等. 病理性瘢痕组织中 E2F1 基因的表达及其意义[J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2007, 21(3): 187-189
- [10] Berteaux N, Lottin S, Monte D, et al. H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 29 625-29 636
- [11] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149: 274-293
- [12] Ong CT, Khoo YT, Mukhopadhyay A, et al. mTOR as a potential therapeutic target for treatment of keloids and excessive scars[J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16: 394-404
- [13] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 669-676

(下转第 9 页)

规、电解质、血气分析及血糖等;换血后需禁食 6~8 h,根据情况开奶;可继续应用丙种球蛋白阻断溶血反应,减轻黄疸反弹。

1.3 统计学方法 运用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差表示,采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

24 例患儿换血前平均血清总胆红素水平为 (469.74 ± 45.36) $\mu\text{mol/L}$,换血后为 (245.60 ± 15.31) $\mu\text{mol/L}$,换血后总胆红素水平明显低于换血前,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。换血后生化指标变化差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。换血后患儿白细胞低于换血前($P<0.05$),余血常规指标变化差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。24 例患儿换血过程中生命体征平稳,无出血、感染等不良反应发生,随访半年,均无神经系统后遗症发生。

表 1 换血前后血胆红素比较 ($\bar{X}\pm S$) $\mu\text{mol/L}$

	<i>n</i>	总胆红素	直接胆红素	间接胆红素
换血前	30	469.73±45.36	54.08±17.2	415.65±34.03
换血后	30	245.60±15.31	31.58±7.04	214.03±14.18
<i>t</i>		4.463	2.435	4.228
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

表 2 换血前后生化指标比较 ($\bar{X}\pm S$) mmol/L

	<i>n</i>	血糖	钾	钠	钙
换血前	30	3.90±0.26	4.12±0.15	136.56±0.77	1.11±0.77
换血后	30	4.97±0.34	4.00±0.13	137.82±0.62	1.10±0.02
<i>t</i>		-1.614	0.512	-1.094	0.457
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 3 换血前后血常规指标比较 ($\bar{X}\pm S$)

	<i>n</i>	白细胞($\times 10^9/L$)	血红蛋白(g/L)	血小板($\times 10^9/L$)
换血前	30	30.79±9.37	137.42±7.24	223.00±19.70
换血后	30	17.67±4.99	163.42±5.27	83.25±10.34
<i>t</i>		2.300	-1.837	4.367
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

高胆红素血症是新生儿期常见病,严重可致胆红素脑病^[4]。此外,胆红素还可以引起其他形式的轻型神经系统损伤,表现为一个或多个系统功能障碍,如认知、学习、运动障碍或者仅表现为耳聋或听觉障碍。换血是治疗重症高胆红素血症最迅速有效的方法,主要用于重症母婴血型不合的溶血病,其可及时换出抗体和致敏红细胞、减轻溶血、降低血清胆红素浓度,防止胆红素脑病,同时纠正贫血,防止心力衰竭^[5]。我院换血时采用红细胞悬液和 AB

型血浆配合输血,总胆红素、间接胆红素及直接胆红素在换血后均显著下降,内环境显著改善,24 例患儿均无核黄疸及严重并发症发生,且其中 3 例患儿胆红素脑病早期症状明显改善。该治疗血红蛋白、血糖、血钙、血钾及血钠无明显改变,虽对白细胞影响明显,但临床上无出血倾向,未出现感染增多,监测 3~5 d,均恢复正常。其中 1 例患儿在气管插管机械通气下行换血术,换血过程顺利,故当患儿生命体征不稳定,为避免重症高胆红素血症导致核黄疸等严重后遗症,可采用此换血术,但术中需密切监测生命体征;另有 1 例患儿并发房间隔缺损,动脉导管未闭及肺动脉高压,为预防心衰,换血前给予西地兰 1/2 量治疗后,换血过程顺利。因此法属于成分换血,其所含的血小板白细胞极少,换血过程中,体内血小板和白细胞被大量置换出,出现换血后白细胞明显下降,但可自然恢复,且无出血及 DIC 出现,但应注意监测^[6-7]。为改善溶血后贫血,换血术后,根据情况则多输红细胞 10~15 mL/kg。

综上,输液泵全自动控制外周动静脉同步换血治疗新生儿重度高胆红素血症,可迅速降低总胆红素水平,减轻溶血,改善贫血,避免胆红素脑病等严重后遗症的发生。且该方法具有简单、实用及安全等优点,值得推广应用。

参考文献

- [1]邵肖梅,叶鸿瑛,丘小汕.实用新生儿学[M].第 4 版.北京:人民卫生出版社,2011:1
- [2]中华医学会儿科学分会新生儿学组.新生儿病理性黄疸诊疗原则的专家共识[J].中华儿科杂志,2010,48(9):685-686
- [3]金汉珍,黄德珉,官希吉.实用新生儿学[M].第 3 版.北京:人民卫生出版社,2003:308-313
- [4]王冬菊,肖昕,肖小敏.黄疸新生儿血清神经元特异性烯醇化酶和脑干听觉诱发电位变化及其临床意义[J].实用儿科临床杂志,2009,24(14):1108-1111
- [5]龙丽华,李禄全,余加林,等.影响换血疗法治疗新生儿高胆红素血症疗效及不良事件发生的多因素分析[J].实用儿科临床杂志,2011,26(14):1096-1098
- [6]Peters JW,Koot HM,de Boer JB,et al.Major surgery within the first 3 months of life and subsequent biobehavioral pain responses to immunization at later age: a case comparison study[J].Pediatrics,2003,111(1):129-135
- [7]Gaitini LA,Somri M,Vaida SJ,et al.Does the addition of fentanyl to bupivacaine in caudal epidural block have an effect on the plasma level of catecholamines in children[J].Anesth Analg,2000,90(5):1029-1033

(收稿日期:2013-08-05)

(上接第 3 页)

- [14]Clark JA,Leung KS,Cheng JC,et al.The hypertrophic scar and microcirculation properties[J].Burns,1996,22:447-450
- [15]Wu WS,Wang FS,Yang KD,et al.Dexamethasone induction of keloid regression through effective suppression of VEGF expression and keloid fibroblast proliferation[J].J Invest Dermatol,2006,126:

1264-1271

- [16]宋保强,鲁开化,张阳,等.兔耳增生性瘢痕血管生成及腺病毒转基因重组血管生成抑制因子 1[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(1):70-74

(收稿日期:2013-10-08)