

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20131117

RhaFGF联合 rhEGF 促进兔耳全层皮肤缺损创面愈合的实验研究

张敏珠, 果磊

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察重组人酸性成纤维细胞生长因子(recombinant human acidic fibroblast growth factor, rhaFGF)联合重组人表皮细胞因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)对创面愈合的影响。**方法:**建立兔耳全层皮肤缺损创面模型,随机分为 A 组(rhaFGF 60 U/cm²+rhEGF 20 U/cm²)、B 组(rhaFGF 60 U/cm²)、C 组(重组牛碱性成纤维细胞生长因子 60 U/cm²)和 D 组(等量生理盐水),共 4 组。采用透明薄膜描记法记录建模后不同时间点各组创面愈合面积,计算创面愈合率,并记录创面愈合时间。在第 3、7、14 天取创面组织,作 HE 染色,观察不同时相点创面愈合情况。**结果:**A 组创面愈合时间为(13.33±0.12) d,与其他组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。A 组创面愈合率与其他组比较,差异具有统计学意义。造模后第 3、7 天,HE 染色示 A 和 C 组创面成纤维细胞、毛细血管生成较 B、D 组丰富。第 14 天, A 组创面基本愈合,成纤维细胞、毛细血管较其他组少。**结论:**rhaFGF 联合 rhEGF 对兔耳创面愈合有促进作用,可促进创面肉芽组织生长、毛细血管与上皮形成。在创面愈合后期,毛细血管及成纤维细胞生成数目少,有可能减少瘢痕形成。

【关键词】重组人酸性成纤维细胞生长因子;重组人表皮细胞生长因子;重组牛碱性成纤维细胞生长因子;创面愈合;瘢痕

【中国图书分类法分类号】R264

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-04-22

Experimental study of rhaFGF combined with rhEGF in promoting wound healing of rabbits' ears with full-thickness skin injury

ZHANG Minzhu, GUO Lei

(Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effects of recombinant human acidic fibroblast growth factor(rhaFGF) and recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) on wound healing of rabbits' ears with full-thickness skin injury. **Methods:** Models of rabbits' ears with full-thickness skin injury were made and randomly divided into four groups: group A(rhaFGF 60 U/cm²+rhEGF 20 U/cm²), group B(rhaFGF 60 U/cm²), group C(recombinant bovine basic fibroblast growth factor 60 U/cm²) and group D(equivalent normal saline). The reagents in the brackets were given every two days. Wound healing rate and time were respectively recorded at different time points through hyaline membrane tracing. Wound tissues were obtained on the 3rd, 7th and 14th d to evaluate wound healing state through HE staining. **Results:** Wound healing time was statistically different between group A((13.33±0.12) d) and other groups ($P<0.05$). Wound healing rate was also statistically different between group A and other groups. HE staining showed that on the 3rd and 7th d after modeling, growth of fibroblasts and capillary was more vibrant in group A and C than that in group B and D. On the 14th d after modeling, wound was almost healed in group A and fibroblasts and capillary of group A were relatively rare compared with those in other groups. **Conclusions:** rhaFGF combined with rhEGF can promote wound healing in rabbits' ears. Combination of the two drugs can stimulate the growth of granulation tissue, capillary formation and re-epithelialization. In the later stage of wound healing, capillary and fibroblasts grow slower, which may reduce the possibility of scar formation.

【Key words】recombinant human acidic fibroblast growth factor; recombinant human epidermal growth factor; recombinant bovine basic fibroblast growth factor; wound healing; scar

作者介绍:张敏珠, Email: 251499821@qq.com,

研究方向:创面愈合与瘢痕防治。

通信作者:果磊, Email: cqguolei@sina.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:2010BB5394)。

创面愈合是指机体受损后,在多种细胞因子、细胞、组织、系统共同参与下,经历炎症、增殖、重新塑形 3 个阶段的过程。对创面愈合具有促进作用的细胞因子联用是否能更进一步促进创面愈合;其发生机制对创面相关物质表达的影响等是近年来研究的热点。重组人酸性成纤维细胞生长因子(recombinant human acidic fibroblast growth factor,rhAFGF),对源于中胚层和神经外胚层的细胞和组织具有营养和促分化作用^[1]。重组人表皮生长因子(recombined human epidermal growth factor,rhEGF)具有较强的促进有丝分裂和细胞趋化作用^[2]。本课题旨在研究联合应用该 2 种细胞因子促进创面愈合的可行性,并探寻其机制,为临床应用、新药研制等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 rhAFGF 和 rhEGF,由四川华迈科技发展有限公司提供。重组牛碱性成纤维细胞生长因子(recombinant bovine basic fibroblast growth factor,rbFGF),由珠海亿胜生物制药有限公司提供。

1.1.2 动物 新西兰大耳白兔 16 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,SCX(渝)2007-0001,雌雄不限,体质量(2.2 ± 0.2) kg。

1.2 方法

1.2.1 创面模型制作^[3]及给药方法 实验前 3 d,将兔双耳腹侧用 100 g/L 硫化钠脱毛。术前 15 min,速眠新肌注麻醉(0.2 ml/kg),俯卧位固定。1%碘伏消毒,在兔耳腹侧以其中轴为对称线,从上至下、左右对称做 4 个直径约为 1.72 cm 的圆形全层皮肤缺损创面,保留软骨膜,创面压迫止血。创面间隔约 1.5 cm。16 只兔子造模 128 个创面。

造模当日和次日,每只实验动物肌注青霉素 4 000 U/只各 1 次。造模后即开始用药,无菌敷料覆盖,隔日换药,直至创面愈合。每次换药时将纱布揭开,创面处理后,用移液器将配好的药物浸润单层无菌纱布外敷创面,待作用 5 min 后,再用无菌纱布包扎。单笼喂养,自由饮水与摄食。

1.2.2 分组 将实验动物按随机数字表法随机分成 4 组^[4],每组 32 个创面。A 组:rhAFGF(60 U/cm²)+rhEGF(20 U/cm²);B 组:rhAFGF(60 U/cm²);C 组:rbFGF(60 U/cm²);D 组:等量生理盐水。

1.2.3 评价指标与方法

1.2.3.1 创面愈合率及愈合时间 模型建立后第 3、7、10、14 天,每组随机选取 3 个标本,用涤纶投影薄膜覆盖创面,描绘

剖缘形态,在方格计算纸上计算出创面面积,以造模面面积为原始面积,根据以下公式计算出创面愈合率:愈合率=[(原始面积-未愈面积)/原始面积]×100%。观察各组创面愈合时间,直至各组所有模型创面完全愈合。

1.2.3.2 HE 染色 造模后第 3、7、14 天,每组随机选取 3 个标本。10%中性甲醛溶液固定过夜。标本依次以不同浓度的酒精:70%、85%、95% I、95% II、100% I、100% II,进行梯度脱水;二甲苯脱脂、透明。将组织浸入石蜡中包埋。做 4 μm 厚切片。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 联合用药实验创面大体观察

造模后各组创面未见明显渗血。第 1、2 天,创面开始结痂,可见淡黄色分泌物浸润外敷料,未见明显脓性分泌物,创周略肿。第 3 天,各组创面出现收缩,创缘形状较规则,新鲜肉芽生长。A 组创面红润,肉芽组织生长活跃,呈红色、坚实,无明显分泌物,创面收缩快于其他组,于第 14 天基本愈合,形成的瘢痕较软、较薄,色泽较淡。其余组创面愈合相对缓慢,在第 14 天仍有部分未愈合。以 D 组最为明显,第 14 天创面全部未愈合。

2.2 创面愈合时间

详细情况见表 1。

表 1 各组创面愈合时间比较($\bar{x} \pm s, d$)

Tab.1 Comparison of wound healing time between groups ($\bar{x} \pm s, d$)

组别	创面愈合时间
A 组	13.33 ± 0.12
B 组	13.63 ± 0.10
C 组	14.18 ± 0.11
D 组	15.40 ± 0.09

注: $F=8.673, P=0.037$;A、D 组比较 $P=0.000$;A、B 组比较 $P=0.009$;A、C 组比较 $P=0.000$;B、D 组比较 $P=0.000$;C、D 组比较 $P=0.000$

2.3 创面愈合率

在第 3 天,A、C 组愈合率明显高于 D 组($P<0.05$)。在第 7、10、14 天,A、B、C 组差异均有统计学意义($P<0.05$)。A 组术后第 3 天创面愈合率为(22.75 ± 1.88)%,与 B 组比较无明显差异;第 7 天以后差异具有统计学意义($P<0.05$)。A、C 组比较,在第 3、7 天,A 组在数值上虽然高于 C 组,但差异无统计学意义;在第 10、14 天,A 组创面愈合率分别为(86.07 ± 1.50)%、(98.30 ± 1.16)%,明显高于 C 组,差异具有统计学意义($P<0.05$),详见表 2。

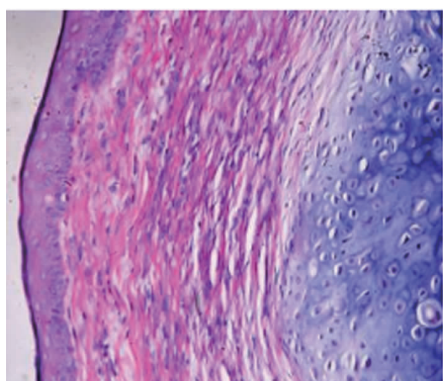
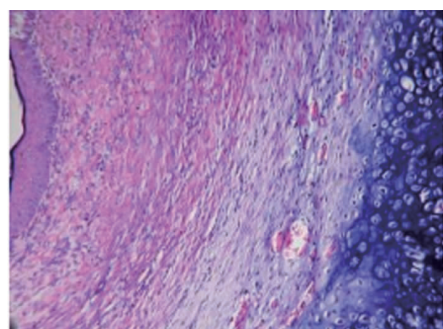
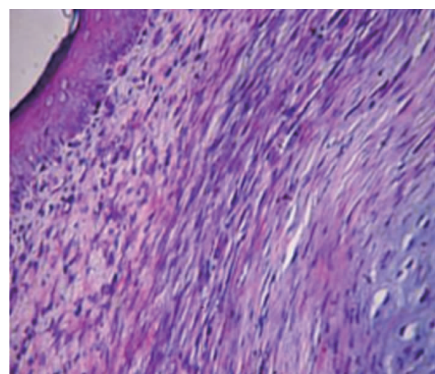
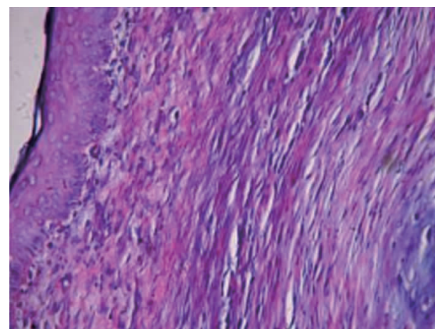
表 2 各组各时间点创面愈合率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)Tab.2 Comparison of wound healing rate between group at different time points ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
A 组	22.75 $\pm$ 1.88	64.17 $\pm$ 2.78	86.07 $\pm$ 1.50	98.30 $\pm$ 1.16
B 组	21.36 $\pm$ 3.47	63.10 $\pm$ 2.01	80.73 $\pm$ 1.51	93.85 $\pm$ 1.33
C 组	21.92 $\pm$ 2.51	55.66 $\pm$ 1.51	79.47 $\pm$ 1.86	87.92 $\pm$ 1.32
D 组	16.54 $\pm$ 2.15	40.80 $\pm$ 2.50	70.41 $\pm$ 2.09	82.21 $\pm$ 1.84

注: $F=9.107, P=0.029$; 第 3 天, A、B 组比较 $P=0.526$, A、C 组比较 $P=0.701$, A、D 组比较 $P=0.018$; 第 7 天, A、B 组比较 $P=0.057$, A、C 组比较 $P=0.002$, A、D 组比较 $P=0.000$; 第 10 天, A、B 组比较 $P=0.006$, A、C 组比较 $P=0.002$, A、D 组比较 $P=0.000$; 第 14 天, A、B 组比较 $P=0.005$, A、C 组比较 $P=0.000$, A、D 组比较 $P=0.000$

2.4 组织学观察

造模后第 3 天, 各组创面可见创面内新生毛细血管(blood capillary, BC)、成纤维细胞(fibroblast, FB)已形成, 较多炎症细胞浸润。但 A、C 组创面肉芽组织灶更明显, 细胞及血管含量更丰富。第 7 天, A 组 FB、BC 较其他组丰富, 上皮细胞增殖明显; B、C 组较 D 组创缘上皮增殖明显, 创面 FB 及 BC 数量更多, 炎性细胞减少。第 14 天, A 组创面新生表皮细胞已覆盖创面, 并可见明显角化, 创面组织中 FB 大部分转化为纤维细胞, BC 数少于其余 3 组(图 1); C 组 FB 增殖尚较活跃, 纤维细胞数目亦较多, BC 数较多, 创面内面可见大量新生血管朝治疗创面方向生长(图 2); B 组组织学情况介于 A、C 组之间(图 3)。D 组 FB 及纤维细胞数目多, BC 数量较 B 组小但多于 A 组(图 4)。治疗组创面愈合情况明显优于 D 组。

图 1 A 组第 14 天 HE 染色 (200 $\times$)Fig.1 HE staining of group A on the 14th d (200 $\times$)图 2 C 组第 14 天 HE 染色 (200 $\times$)Fig.2 HE staining of group C on the 14th d (200 $\times$)图 3 B 组第 14 天 HE 染色 (200 $\times$)Fig.3 HE staining of group B on the 14th d (200 $\times$)图 4 D 组第 14 天 HE (200 $\times$)Fig.4 HE staining of group D on the 14th d (200 $\times$)

3 讨论

创面愈合及瘢痕的防治一直是临床及科研工作的两大难题。如何联用各种细胞因子作用创面, 达到既能促进创面愈合又减少瘢痕形成这种理想愈合的状态是近年研究的热点。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)是一类对中胚层和神经外胚层来源的各种类型的细胞具有促分裂作用的活性多肽。目前研究较多的是 bFGF 和 aFGF。bFGF 已经广泛应用于临床。aFGF 最初由 Thomas 于 1984 年从牛脑中分离纯化,

它具有促进有丝分裂活性和非促有丝分裂两大活性。近年来,由于它具有既能促进创面的愈合^[1,6]又与瘢痕的形成有关^[7]等多种优势成为研究热点。据报道^[8],rhEGF 可以通过促进血管的生长,促进病灶的修复。促进表皮细胞、BC、角质细胞增生的增生^[2,5,9],也可通过增加其他内源性的物质例如转化生长因子等的合成以加速创面的愈合。

作者在预实验取得 2 种细胞因子的适宜浓度后,观察 rhaFGF 联合 rhEGF 对兔耳全层皮肤缺损创面的修复作用。联合用药实验结果表明,rhaFGF 联合 rhEGF 应用于兔耳全层皮肤缺损创面,可促进创面愈合,缩短创面愈合时间。与对照组相比,A 组早期就能促进创面修复,其促进作用主要集中在早中期(第 4~10 天)。这可能是因为 rhaFGF 和 rhEGF 早中期快速促进创面愈合的作用叠加所致。在创面愈合的早中期,B 组与 A 组差异不明显,但是在晚期有明显统计学差异。推断这是因为 A 组联合应用 rhEGF 所致。D 组虽然在中晚期(第 7~14 天)有明显促进创面愈合的趋势,但仍低于 A 组。

通过组织学的观察,在早中期,A、B、C 组创面 FB 及 BC 数目较 D 组多,炎性细胞较 D 组少。这是用药组促进创面愈合的原因。伤后第 14 天,A 组创面基本愈合,组织中相对其他实验组存在较少的 FB 和 BC,因此推断其能减少创面愈合后瘢痕形成;C 组 FB 增殖尚较活跃,纤维细胞数目亦较多,与 A 组相比更易形成瘢痕。

实验证明,联合应用细胞因子(rhaFGF+rhEGF)优于单独用药,为临床工作、制药工业等提供新的思路和理论依据。

参 考 文 献

- [1] 刘 忻,马 嵘,马 珂,等.重组人酸性成纤维细胞生长因子对创面愈合的作用[J].中国药科大学学报,2008,39(1):87-90.
Liu X, Ma R, Ma K, et al. Effect of recombinant human acidic fibroblast growth factor on wound healing[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2008, 39(1): 87-90.
- [2] 郝 杰,彭 波,杨云霞,等.重组人表皮生长因子加速皮肤创伤修复的实验研究[J].中国美容医学,2009,18(B03):46-48.
Hao J, Peng B, Yang Y X, et al. A Study of recombinant human epidermal growth factor(rhEGF)improving experimental wound healing[J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2009, 18(B03): 46-48.
- [3] 冯登超,杨喜明,薛宏斌.建立更加稳定和有效的兔耳瘢痕模型[J].中国美容医学,2009,18(2):191-194.
Feng D C, Yang X M, Xue H B, et al. Establishment of an animal model for hypertrophic scar[J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2009, 18(2): 191-194.
- [4] 李校堃,许 华,付小兵,等.重组人酸性成纤维细胞生长因子促进创伤愈合的研究[J].中国药科大学学报,2002,33(4):312-315.
Li X K, Xue H, Fu X B, et al. Study on recombinant human acidic fibroblast growth factor(rhaFGF) in promoting wound healing[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2002, 33(4): 312-315.
- [5] 刘云召,郝 杰,赵洪文,等.重组人表皮细胞生长因子对人皮肤细胞增殖作用的研究[J].四川生理科学杂志,2008,30(3):112-113.
Liu Y Z, Hao J, Zhao H W, et al. Study of the recombinant human epidermal growth factor(rhEGF)on the proliferation of epidermal cells and wound healing[J]. Sichuan Journal of Physiological Sciences, 2008, 30(3): 112-113.
- [6] Xie L, Zhang M, Dong B, et al. Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 93(3): 396-403.
- [7] 陈 伟,付小兵,周 岗,等.增生性瘢痕内 3 种成纤维细胞生长因子及其受体基因的表达[J].中华实验外科杂志,2004,21(9):1111-1113.
Chen W, Fu X B, Zhou G, et al. Gene expression of fibroblast growth factors and their receptors in proliferative and mature hypertrophic scars[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2004, 21(9): 1111-1113.
- [8] Cheng X, Wang Z, Yang J, et al. Acidic fibroblast growth factor delivered intranasally induces neurogenesis and angiogenesis in rats after ischemic stroke[J]. Neurol Res, 2011, 33(7): 675-680.
- [9] Zhang S, Zeng Y, Qu J, et al. Endogenous epidermal growth factor (EGF), contributing to the maintenance of the integrity of sertoli-germ cell anchoring junction, is required for early recovery from acute testicular ischemia/reperfusion(IR) injury[J]. Reproduction, 2012. doi:10.1530/REP-12-0336[Epub ahead of time]

(责任编辑:唐秋姗)