

# 体内胶原网架生物学转归中碱性成纤维细胞生长因子的表达\*\*\*

王建宁, 孙玉刚, 徐杰, 韩凉

## Expression of basic fibroblast growth factor in biological transition of collagen lattice *in vivo*

Wang Jian-ning, Sun Yu-gang, Xu Jie, Han Liang

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250001, Shandong Province, China

Wang Jian-ning, Associate chief physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250001, Shandong Province, China  
wjn1966@163.com

Correspondence to: Xu Jie, Physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250001, Shandong Province, China  
xujie\_bzmc@126.com

Received: 2010-06-12  
Accepted: 2010-08-10

济南市口腔医院颌面外科, 山东省济南市 250001

王建宁, 男, 1966年生, 山东省文登市人, 汉族, 1989年西安医科大学毕业, 副主任医师, 主要从事口腔颌面外科、牙体牙髓病、牙周病的研究。  
wjn1966@163.com

通讯作者: 徐杰, 医师, 济南市口腔医院颌面外科, 山东省济南市 250001  
xujie\_bzmc@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2010)47-08824-03

收稿日期: 2010-06-12  
修回日期: 2010-08-10  
(20100312020/W·Y)

### Abstract

**BACKGROUND:** As a new dermal substitute, acellular dermal matrix (ADM) has been extensively used in repair of tissue defects. But there are no reports about the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) during long-dated biological transition of ADM.  
**OBJECTIVE:** To discuss the rule of the bFGF expression in long-dated biological transition of collagen lattice *in vivo*.  
**METHODS:** A total of 21 Wistar rats were applied to prepare ADM. A wound at 2.5 cm×2.5 cm was made to deep fascia surface on left side of spine cord in 84 rats. ADM was transplanted to the back of Wistar rats, while contralateral normal skin served as the control. Samples were acquired at 3, 5, 7, 10 days, 2, 3, 4, 6, 8, 10 weeks, 4, 6, 8, 10 months after operation. The bFGF expression was detected using immunohistochemical method.  
**RESULTS AND CONCLUSION:** Expression of bFGF came to appear in 3 days, and reached the peak in 10 days, then became stable in 4 weeks, after 8 weeks the expression of bFGF was the same with normal skin. In the course of long-dated biological transition of ADM, its rebuilding begins from the border of ADM gradually to the center; the rebuilding will become stable at 6-8 weeks after transplantation, then the ADM is considered to be autologous tissue and participates in the metabolic process of normal tissue.

Wang JN, Sun YG, Xu J, Han L. Expression of basic fibroblast growth factor in biological transition of collagen lattice *in vivo*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(47):8824-8826.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 脱细胞真皮基质作为一种新型的真皮替代物, 用于组织缺损的修复, 但对于脱细胞真皮基质在长期生物学转归过程中碱性成纤维细胞生长因子的表达变化规律, 国内外尚未见相关报道。  
**目的:** 观察体内胶原网架长期生物学转归中碱性成纤维细胞生长因子的表达变化规律。  
**方法:** 选用成年雄性 Wistar 大鼠 21 只用于制备脱细胞真皮基质。取 84 只大鼠, 于脊柱左侧作一深至深筋膜表面、面积为 2.5 cm×2.5 cm 的创口, 回植脱细胞真皮基质至成年雄性 Wistar 大鼠背部皮下, 以对侧正常皮肤做对照。于术后 3, 5, 7, 10 d, 2, 3, 4, 6, 8, 10 周, 4, 6, 8, 10 个月取材, 采用免疫组织化学方法检测碱性成纤维细胞生长因子的表达。  
**结果与结论:** 碱性成纤维细胞生长因子 3 d 时开始出现阳性表达, 并于 10 d 达到峰值, 4 周后趋于稳定, 8 周后各组未见明显变化, 与正常皮肤表达一致。提示在脱细胞真皮基质长期的生物学转归过程中, 脱细胞真皮基质的改建首先从周边开始逐渐向中央迁移, 并于 6~8 周后改建趋于稳定, 被视为自身组织, 并参与机体正常组织代谢过程。  
**关键词:** 碱性成纤维细胞生长因子; 脱细胞真皮基质; 吸光度; 免疫组织化学; 转归  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.47.020

王建宁, 孙玉刚, 徐杰, 韩凉. 体内胶原网架生物学转归中碱性成纤维细胞生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(47):8824-8826. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)是去除了真皮中具有抗原性的细胞成分, 而保留了原有胶原纤维、基底膜、弹力纤维等结构的真皮胶原网架。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在单纯切割伤口或其他类型皮肤创面内的高水平表达是创面愈合的重要始动和促进因素<sup>[1-2]</sup>。实验通过回植ADM于大鼠背部皮下, 采用免疫组织化学方法, 阐述bFGF在ADM构建过程中生物学效应及表达规律。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009-01/2010-02在滨州医学院完成。

**材料:** 成年雄性Wistar大鼠105只, 体质量(300±25)g, 由山东大学实验动物中心提供, 合格证号SCXR(鲁)20080004。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准<sup>[3]</sup>。

**实验方法:**

**ADM的制备:** 取成年雄性Wistar大鼠, 21只

用于制备ADM(2.5 U/mL Dispase 4 °C 孵育60 h, 0.5% Triton X-100 常温振荡脱细胞60 h)。

**取材、制备皮片:** 大鼠称质量后行体积分数3%水合氯醛溶液(10 mL/kg体质量)腹腔注射, 全麻成功后, 取其俯卧位、四肢及头部固定于实验台上; 用温肥皂水浸湿毛皮并洗去污垢, 组织剪剪去背部鼠毛, 范围约5 cm×6 cm; 剪毛区略湿润后涂擦脱毛膏2次, 厚约1 mm, 每次作用3 min, 刮除脱毛膏及残留发根, 蒸馏水洗涤脱毛区后, 体积分数75%乙醇消毒术区; 15#尖刀片切取全层皮片, 去除部分皮下组织, 修剪皮片成大小约4.5 cm×5 cm, 双蒸水洗涤后置入1 g/L新洁尔灭溶液内浸泡30 min脱脂。在无菌条件下用, 用双面胶将皮肤的表皮面粘于鼓式取皮机(使用前需高压蒸气消毒)鼓面上, 反取成厚约0.6 mm的皮片, 组织剪修成约2 cm×2 cm大小皮片, 共50片, 浸泡于含双抗抗菌溶液的生理盐水中30 min。

**去除表皮及脱细胞:** 皮片随机分成5组, 每组10片, 4 °C下置入2.5 U/mL Dispase分别孵育24, 48, 60, 72, 84 h, 取出皮片, 眼科镊小心地揭去表皮后, 每组再分别投入0.5% Triton X-100溶液中并置于脱色摇床上24, 48, 60, 72, 84, 150 r/min, 常温振荡脱去细胞, 每8 h换0.5% Triton X-100溶液1次。实验筛选结果孵育60 h组可以完整去除表皮、彻底脱除细胞成分、基底膜及胶原支架完整, 是一种合格的真皮替代物, 符合试验要求, 故选此组皮片为实验皮片。

**漂洗:** 分别于各时间点将皮片取出, 无菌条件下采用PBS液振荡漂洗3次, 2 h/次, 得ADM; 再浸于含双抗抗菌溶液的生理盐水中抗菌处理30 min, 取出后置入250 mL无菌生理盐水中, 密封4 °C冰箱储存。

**动物分组及处理:** 剩余84只大鼠于其背部脊柱左侧作一长约2 cm与脊柱平行的梯形切口, 切开皮肤全层及皮肌至深筋膜表面, 钝性分离, 形成足够面积(约2.5 cm×2.5 cm)空隙, 将制备好的ADM (2.0 cm×2.0 cm)真皮面向上植入空隙, 平展, 0号丝线固定四角于深方筋膜上, 将皮瓣覆盖ADM, 间断对位缝合背部皮肤创口。同时对侧正常皮肤做对照。

**检测bFGF:** 术后3, 5, 7, 10 d, 2, 3, 4, 6, 8, 10周, 4, 6, 8, 10个月取材, 每个时间点取6只。修剪并切取ADM和表面皮肤复合标本(约1.0 cm×0.3 cm), 40 g/L多聚甲醛固定, 流水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后行3~5 μm切片, 防脱载玻片捞片, 58~60 °C恒温干燥箱烤片1 h后, 采用免疫组织化学SABC法, 按照试剂盒说明操作, 用PBS代替一抗工作液做阴性对照, 检测bFGF的表达, 分析其不同时间点bFGF表达及ADM血管化规律。

**染色结果判读及测定:** bFGF: 阳性定位于胞浆内及包膜上, 正常皮肤内bFGF为弱阳性, 主要分布在炎症修复细胞、表皮基底细胞、毛囊上皮细胞、成纤维细胞及血管

内皮细胞的胞膜及胞浆中; 在排除非特异性染色的前提下, 深褐色颗粒为强阳性, 棕黄色颗粒为阳性, 黄色颗粒为弱阳性, 与背景同色(黄白色)为阴性。

**平均吸光度值测定:** 每个时间点染5张切片, 每张切片随机选取5个高倍镜视野(×400), 使用IPP图像分析软件测定每个视野下染色细胞的吸光度, 计算方法如下:

$$T = \frac{\text{投射光(物体平均灰度)}}{\text{入射光(标定最亮处平均灰度)}}$$

$$\text{平均吸光度} = Lg(1/T)$$

平均吸光度越低说明阳性表达越强, 以每张切片5个视野A值的平均值作为该时间点的测量值。对照组以正常皮肤做同样的观测处理。

**主要观察指标:** 不同时间点bFGF的表达。

**设计、实施、评估者:** 实验设计为第一作者, 干预实施为第二、三作者, 评估为第三、四作者, 均经过正规培训, 采用了盲法评估。

**统计学分析:** 由第三作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 采用随机区组设计的多个样本均数比较的方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用大鼠84只, 无脱失, 全部进入结果分析。

**2.2 bFGF表达变化规律** 见图1。

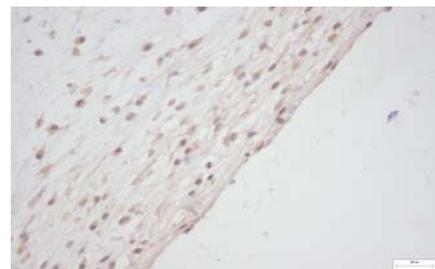


Figure 1 Basic fibroblast growth factor immunohistochemical staining (×400)  
图1 bFGF免疫组织化学染色(×400)

术后3 d即出现阳性表达, 主要集中在ADM周边的炎症修复细胞: 中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等, 随着植入时间增加, 阳性细胞逐渐由周边向中央迁移, 阳性表达持续增强至10 d, 并于该时间点达到高峰, 此时炎症修复细胞明显减少, 阳性表达主要集中在纤维母细胞、成纤维细胞、长梭形细胞、内皮细胞等, 阳性表达持续峰值到2周开始表达减弱, 4~6周阳性细胞减少逐渐趋于平稳, 主要集中在成纤维细胞、血管内皮细胞, 8周后各组表达平稳, 基本达到正常皮肤含量。各时间点ADM中bFGF平均吸光度见表1。

表 1 各时间点 ADM 中 bFGF 平均吸光度值比较  
Table 1 Comparison of the average absorbance (A) of basic fibroblast growth factor in acellular dermal matrix at different time points (x±s, n=6, A)

Time	Basic fibroblast growth factor	Time	Basic fibroblast growth factor
3 d	0.166±0.019 <sup>a</sup>	8 wk	0.179±0.020
5 d	0.154±0.023 <sup>a</sup>	10 wk	0.181±0.011
7 d	0.132±0.025 <sup>a</sup>	4 mon	0.182±0.032
10 d	0.103±0.016 <sup>a</sup>	6 mon	0.184±0.015
2 wk	0.122±0.030 <sup>a</sup>	8 mon	0.182±0.022
3 wk	0.139±0.011 <sup>a</sup>	10 mon	0.183±0.025
4 wk	0.152±0.018 <sup>a</sup>		
6 wk	0.165±0.024 <sup>a</sup>		
F			77.65
P			0.05

<sup>a</sup>P < 0.05, vs. normal skin; A value for normal skin: 0.184±0.041

### 3 讨论

早在1979年Erol和Spira就通过研究移植动静脉瓣大鼠模型发现新生血管从植入的动静脉祥萌出,从而形成新的毛细血管床,证实了bFGF促进新生血管形成可能与血管内皮细胞的表达有关<sup>[4-5]</sup>。

本实验中, bFGF于术后3 d即可以出现阳性表达,随着bFGF对毛细血管内皮细胞迁移和增殖的刺激作用,血管内皮细胞的标记因子CD34于术后5 d即开始表达,表明血管新生开始;随着bFGF阳性表达持续增强至10 d达到高峰,血管内皮细胞紧随其后于2周达到高峰,并且血管内皮细胞在bFGF的刺激下,逐渐由“饱满状”竖立于血管腔内壁变成“扁平状”贴附管腔内壁,血管数目也达到最高值,随着bFGF逐渐减弱并趋于稳定,血管内皮细胞及血管计数也达到平稳。此变化规律说明新生血管内皮细胞在bFGF的刺激下开始增生、表达,但由于bFGF发挥其刺激血管新生需要一定量浓度及时间,所以内皮细胞阳性表达及新生血管计数达到峰值需在bFGF之后。bFGF在ADM生物学转归过程中其促进血管生成的可能机制为:促进内皮细胞分裂、生长,并延长内皮细胞的寿命;刺激内皮细胞胶原酶和纤维蛋白酶降解基底膜,并诱导毛细血管内皮细胞向三维胶原基质中增殖,形成毛细血管腔状结构。

国内王晶等<sup>[6]</sup>通过观察bFGF对缺氧条件下培养的人脐静脉内皮细胞增殖的影响,结果发现bFGF可增加缺氧内皮细胞S期细胞数、PI值,说明bFGF可逆转缺氧导致的内皮细胞增殖能力下降,为bFGF用于临床血管再生性治疗提供理论依据。Hall等<sup>[7]</sup>通过三维纤维凝胶促进血管再生试验发现: bFGF不仅能刺激毛细血管内皮细胞迁移和增殖,形成毛细血管芽,同时还可以促进外溶酶原激活物和胶原酶的分泌,对损伤部位的细胞外基质部分降解,以利于毛细血管向创伤区长入。

本实验发现在ADM植入后3 d, bFGF开始主要是由创伤局部的巨噬细胞产生,回植5 d时bFGF达到一定浓度后,即可以有效刺激伤口底部及边缘未分化的间充质细胞或静止的纤维细胞转变为成纤维细胞,而成纤维细胞以自分泌和旁分泌的形式产生bFGF,从而形成“协同刺激”效应。bFGF于术后1周达到峰值,而后成纤维细胞数量及合成胶原能力继续增加,并于2周成纤维细胞达到峰值,随后可能由于“接触抑制”作用而数量减少,4周至2个月bFGF阳性细胞减少逐渐趋于平稳,主要集中在成纤维细胞、血管内皮细胞,2个月后各组表达平稳,基本达到正常皮肤含量。早期在bFGF浓度较小时,成纤维细胞呈幼稚状态,具体表现如下:胞体较大,两端常有突起,胞浆略嗜碱性,核大呈椭圆形,淡染,核仁明显;随着bFGF浓度增加,对成纤维细胞刺激作用加强,成纤维细胞数目达到峰值后开始停止分裂,逐渐开始合成并分泌前胶原蛋白,在细胞外周逐渐形成胶原纤维,细胞渐变成长梭形;此外成纤维细胞还伴随着bFGF由周边向中央迁移后组间向中央伸张。

Wang等<sup>[8]</sup>研究证实了在皮肤创伤愈合过程中, bFGF主要刺激成纤维细胞增殖、分化和合成新的细胞外基质,使胶原含量增高,刺激成纤维细胞、内皮细胞分泌胶原酶、纤维酶原激活酶分解胶原,通过胶原纤维的合成与分解使胶原含量在新生血管、结缔组织中达到相对平衡;此外bFGF还能刺激创面所有修复细胞的增殖,在创伤早期,创伤局部的巨噬细胞和内皮细胞等释放bFGF,刺激成纤维细胞和角化细胞增殖、迁徙,引起炎症细胞和创缘细胞迁徙到创面,诱导蛋白酶、胶原酶以及各种细胞因子的产生。

这些细胞因子之间往往具有相同或者相似的作用,ADM改建是各种因子相互作用的结果。

### 4 参考文献

- [1] Tsai YH, Chen CW, Lai WF, et al. Phenotypic changes in proliferation, differentiation, and migration of chondrocytes: 3D in vitro models for joint wound healing. *J Biomed Mater Res A*. 2009, 19. [Epub ahead of print].
- [2] Waqner W, Wehrmann M. Differential cytokine activity and morphology during wound healing in the neonatal and adult rat skin. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(6):1342-1351.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [4] Damico FM. Angiogenesis and retinal diseases. *Arq Bras Oftalmol*. 2007;70(3):547-553.
- [5] Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr Drug Targets*. 2003;4(2):159-179.
- [6] Wang J, Yin L Y, Li GS, et al. Influence of bFGF on the Proliferation of Hypoxia Cultured Endothelial Cell Medical. *J Wuhan University*. 2002;23(4):299-300.
- [7] Hall H. Modified fibrin hydrogel matrices: both, 3D-scaffolds and local and controlled release systems to stimulate angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2007;13(35):3597-3607.
- [8] Wang XT, Liu PY, Xin KQ, et al. Tendon healing in vitro: bFGF gene transfer to tenocytes by adeno-associated viral vectors promotes expression of collagen genes. *Hand Surg [Am]*. 2005;30(6):1255-1261.