

doi:10.13361/j.qdyxy.201602025

大鼠创伤皮肤组织 VEGF、PDGF 和 bFGF 表达及意义

刘晓彤¹, 沈若武¹, 卞明心¹, 李玲¹, 夏玉军¹, 杨永华²

(1 青岛大学医学院人体解剖学教研室, 山东 青岛 266071; 2 青岛市传染病医院)

[摘要] **目的** 检测背部创伤模型大鼠不同愈合时间时血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGF)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达,探讨其在创伤愈合过程中的作用。**方法** Wistar 大鼠 30 只,手术法切除背部 1 cm×1 cm 大小的皮肤全层组织建立背部创伤模型,分别在手术后第 3、5、7、10、14 天取创面组织检查,应用苏木精-伊红(HE)、Masson、巴氏染色观察创面组织病理改变,免疫组化法检测创面组织 VEGF、PDGF 和 bFGF 的表达。**结果** HE 染色显示,手术后 3 d 时创面炎性细胞浸润明显,毛细血管丰富。Masson 染色显示,手术后 5 d 时创面胶原纤维增生明显,缺损创面被填补完整后胶原纤维染色程度减弱。巴氏染色显示,手术后 10 d 时表皮组织完全覆盖创面,14 d 时创面中心表皮完全再生,可见分化成熟的基底层、棘层等细胞。免疫组化染色显示,VEGF 表达在手术后 3 d 时达高峰,之后逐渐下降($F=14.387, P<0.05$);PDGF 表达在手术后 5 d 时达高峰,之后逐渐下降($F=70.307, P<0.05$);bFGF 表达在手术后 10 d 时达高峰($F=24.821, P<0.05$)。**结论** 大鼠背部创伤模型诱导了愈合过程的发生,VEGF、PDGF 和 bFGF 的差异性表达在创伤愈合过程中发挥重要作用。

[关键词] 皮肤;伤口愈合;血管内皮生长因子 A;血小板源性生长因子;成纤维细胞生长因子 2;大鼠, Wistar

[中图分类号] R641 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2016)02-0209-04

EXPRESSIONS OF VEGF, PDGF AND bFGF IN WOUND CUTANEOUS TISSUE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RATS LIU Xiaotong, SHEN Ruowu, BIAN Mingxin, LI Ling, XIA Yujun, YANG Yonghua (Department of Human Anatomy, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To detect the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), in different healing period of back-wound rat models, and explore their role in the wound healing process. **Methods** Thirty Wistar rats were entered in this study. A back wound model in rats was created by cutting 1 cm×1 cm whole thickness of dorsal skin. Tissues from wound surface were obtained—on days 3, 5, 7, 10, and 14 after surgery—for staining of hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson's Trichrome and Papanicolaou (PAP) to observe the pathology of the wound surface, and using immunohistochemistry method to detect the expressions of VEGF, PDGF and bFGF.

Results HE staining indicated, 3 days after surgery, obvious inflammatory cell infiltration on wound surface with abundant capillaries. The Masson's Trichrome staining suggested that, 5 days after surgery, the collagen fibers increased significantly, and after the wound was completely healed, the staining of the fibers weakened. The PAP staining revealed that, 10 days after surgery, the wound surface was completely covered by epidermal tissue, and on day 14, regeneration of epidermis was completed on the center of the wound, and full-grown basilar cells, prickle cells and others could be seen. Immunohistochemistry staining demonstrated that the VEGF reached its peak 3 days after surgery, and then gradually declined ($F=14.387, P<0.05$); PDGF reached its peak 5 days after surgery, and then gradually declined ($F=70.307, P<0.05$); bFGF reached its peak 10 days after surgery ($F=24.821, P<0.05$). **Conclusion** The model of back wound in rats induces the occurrence of healing process, and the differential expressions of VEGF, PDGF and bFGF play an important role in the process of wound healing.

[KEY WORDS] skin; wound healing; vascular endothelial growth factor A; platelet-derived growth factor; fibroblast growth factor 2; rats, Wistar

创伤愈合是机体重要应激反应,主要包括炎症反应期、增殖期和瘢痕修复期 3 个时期^[1]。此过程需要多种生长因子的协同作用,从而使伤口快速愈

合。国内外的研究结果已证实,血管内皮生长因子(VEGF)具有促进毛细血管生成、加快新生血管增殖的作用,血小板源性生长因子(PDGF)能够促进肉芽组织形成和成纤维细胞的增殖,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)能够促进伤口收缩,加快创面的瘢痕修复^[2-4]。目前,关于上述因子的国内外研究多集中于单个因子在特定愈合时期的促愈合作用。本

[收稿日期] 2015-09-26; **[修订日期]** 2016-02-09

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J14LK10),青岛大学本科生创新实验项目

[作者简介] 刘晓彤(1992-),男,2011 级本科在读。

[通讯作者] 沈若武(1973-),男,硕士,副教授。

研究通过制备大鼠背部皮肤创伤模型,探讨完整愈合周期中 VEGF、PDGF 和 bFGF 的动态变化情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择成年健康清洁级 Wistar 大鼠 30 只,体质量 200~250 g,购自青岛市药品检验所实验动物中心。

1.2 背部创伤模型制备

采用手术法切除大鼠背部皮肤进行造模^[5]。首先以 100 g/L 的水合氯醛(3 mL/kg)进行腹腔麻醉,剃毛器剃除背部胸段两侧长毛,硫化钠脱毛剂脱掉短毛,暴露皮肤面积约 24 cm²。在胸段两侧暴露皮肤各做一个 1 cm×1 cm 的正方形标记,手术切除标记的皮肤全层至深筋膜,无菌棉球擦拭止血,生理盐水冲洗创面,切口及其边缘皮肤均匀涂抹碘剂,无菌纱布包扎。手术后大鼠单笼单只饲养,每日自由进食、饮水。

1.3 组织取材及染色方法

分别于创伤模型制备后 3、5、7、10 和 14 d 时进行灌流取材,切取以创面为中心的边长 2 cm 的正方形组织,每只大鼠取 2 块,置于 40 g/L 多聚甲醛中固定备用。将组织常规脱水、包蜡、切片,每块组织切 3 张切片,分别进行苏木精-伊红(HE)、Masson、巴氏染色以及 VEGF、PDGF 和 bFGF 的 SABC 免疫组织化学染色,光镜下观察。

1.4 VEGF、PDGF 和 bFGF 表达的图像分析

VEGF、PDGF 和 bFGF 免疫组织化学染色各取 3 张切片,每张切片于 400 倍镜下随机选取 5 个视野,应用 Simple-PCI 图像分析系统进行定量分析,取均值。VEGF 的表达以阳性细胞(胞浆出现棕色颗粒)百分比表示,阳性细胞百分比=阳性细胞数/视野总细胞数×100%;PDGF 和 bFGF 的表达以吸光度(A)值表示。

1.5 数据统计处理

应用 SPSS 20.0 软件进行统计处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 HE、Masson、巴氏染色

HE 染色显示,手术后 3 d 时,创面组织中大量炎性细胞浸润,毛细血管丰富,充血明显,肉芽组织增生不明显,毛囊少见,表皮纤薄、连接不连续;5 d

时,创面组织炎性细胞浸润减少,新生毛细血管减少,纤维结缔组织增生明显,肉芽组织突出生长,毛囊增加不明显,创面中心表皮未见,创缘表皮增厚明显;7 d 时,创面组织炎细胞减少,肉芽组织填补部分创面,创面中心肉芽组织纤薄,表皮组织向创面中央移行,覆盖部分创面;10 d 时,创面基本填平,炎性细胞浸润少见,真皮组织毛细血管减少,纤维结缔组织增粗肥厚,毛囊增多,伤口中央区表皮连续,周围表皮再生完全,真皮乳头出现;14 d 时,创面毛囊数量增加,创面中心表皮增厚,可见棘层、颗粒层等表皮细胞。

Masson 染色显示,手术后 3 d 时,胶原纤维在创面组织中显色不明显,无明显增生;5 d 时,胶原纤维在创缘组织中显色明显,增粗增厚,并凸向创面增殖;7 d 时,胶原纤维由创缘向创面中心增殖,沿皮下脂肪层形成薄层胶原纤维带;10 d 时,胶原纤维在创面组织中明显增粗增厚,填补大部分缺损创面;14 d 时,胶原纤维组织减少,染色程度变浅。

巴氏染色显示,手术后 3 d 时,表皮组织在创缘未见明显增殖;5 d 时表皮组织在创缘增殖明显,并向创面中心移行,未完全覆盖创面;7 d 时表皮组织继续向创面中心移行,未完全覆盖创面,创缘表皮增厚,出现角质层;10 d 时,表皮组织完全覆盖创面,创面中心表皮纤薄,增生不明显;14 d 时,表皮组织增生肥厚,可见分化成熟的基底层、棘层等细胞。

2.2 VEGF、PDGF 和 bFGF 免疫组化表达

VEGF 表达高峰出现在手术后 3 d 时,之后表达逐渐下调。手术后 3 d 时 VEGF 表达明显高于 5、7、10 和 14 d 时,5、7 d 时 VEGF 表达明显高于 10、14 d 时($F = 14.387, P < 0.05$)。PDGF 表达高峰出现在手术后 5 d 时,之后表达逐渐下调。手术后 5 d 时 PDGF 表达明显高于 3、7、10 和 14 d 时,手术后 7 d 时 PDGF 表达明显高于 10、14 d 时($F = 70.307, P < 0.05$)。bFGF 表达逐渐升高,在手术后 10 d 时达高峰。手术后 10 d 时 bFGF 表达明显高于 3、5、7 和 14 d 时,7 d 时 bFGF 表达明显高于 3、5 d 时($F = 24.821, P < 0.05$)。见表 1。

3 讨 论

创伤愈合是一个复杂的病理生理过程,多种生长因子的参与发挥了至关重要的作用。在创伤愈合与肿瘤发生方面,VEGF 是强有力的血管生长因子^[6]。在毛细血管生成阶段,VEGF 促进血管内皮

表 1 手术后不同时间 VEGF、PDGF 和 bFGF 免疫组化表达比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

时间	VEGF($\chi/\%$)	PDGF(A)	bFGF(A)
3 d	32.15 $\pm$ 3.84	0.31 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.02
5 d	28.22 $\pm$ 2.61	0.51 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.06
7 d	27.53 $\pm$ 1.69	0.44 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.08
10 d	26.31 $\pm$ 1.84	0.24 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.06
14 d	25.99 $\pm$ 1.99	0.21 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.07

细胞分裂与增殖,同时增加微静脉、小静脉的通透性,为血管内皮的迁移及血管形成提供物质基础,利于血管生成^[7-9]。血管生成后丰富的血供可为伤口愈合提供充足的氧气和营养物质,同时能够及时排除代谢废物,加快伤口愈合。夏鹏等^[10]的实验表明,VEGF 表达高峰出现在模型制备后第 4 天,之后表达量逐渐递减。周岁锋^[11]通过对局部组织溃疡观察显示,升高 VEGF 水平可降低炎症反应,改善血流,促进溃疡愈合。本实验 HE 染色显示,手术后 3 d 创面炎症反应较严重,毛细血管丰富,之后炎症反应逐渐减轻。免疫组化检测显示,VEGF 表达在术后 3 d 时达高峰,之后表达逐渐下调,提示 VEGF 水平的增高可能缩短炎症反应时间,使创面更快进入肉芽组织增殖期。

PDGF 来源于血小板的 α 颗粒,能引起纤维母细胞、平滑肌细胞和单核细胞的增生和游走,在机械性创伤和低氧组织中具有一定的保护作用^[12],可以显著促进肉芽组织增生,刺激血管生成和上皮化。肉芽组织在愈合过程中起至关重要的作用,PDGF 可以加速肉芽组织填埋创面,有利于上皮细胞的增殖移行,可为伤口的瘢痕修复打下基础^[13-15]。TY-RONE 等^[16]在兔耳朵皮肤的溃疡面注射 PDGF 的 DNA,结果显示 PDGF 能促进伤口收缩,加快伤口的愈合。郭素芬等^[17]研究显示,PDGF 和 bFGF 在促进平滑肌样细胞增殖方面具有时间和浓度依赖效应。本实验 Masson 染色显示,手术后 5 d 时创面组织大量胶原纤维增生。免疫组化检测显示,PDGF 表达在手术后 5 d 时达高峰,提示 PDGF 能够促进伤口的收缩,加快肉芽组织填埋,同时可能协同刺激 bFGF 的表达,促进肉芽组织血管增生与成熟,缩短肉芽增殖期,加快愈合。

bFGF 可由成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和软骨细胞分泌产生,其主要功能是促进微血管内皮的生长,从而加速新血管的生成,同时还可以增加伤口中的胶原含量,提高组织的修复机械力^[18-19]。吴维等^[20]研究表明,VEGF 和 bFGF 具有协同促血

管生成作用。本实验巴氏染色显示,手术后 3 d 时上皮组织再生极少,毛细血管增生丰富,术后 10、14 d 时上皮组织增厚成熟,分层清晰。免疫组化检测显示,bFGF 表达在手术后 10 d 时达高峰,说明 bFGF 的促血管生成作用在较低剂量时即可实现,其促上皮再生作用则需要较高表达量。在愈合早期,bFGF 低表达以促进血管生成;在瘢痕愈合期,bFGF 高表达以促进上皮再生,促血管生成作用反而被抑制。

本实验的结果显示,Wistar 大鼠皮肤全层切除伤口的愈合周期约为 2 周。VEGF 的表达高峰出现在模型制备后 3 d,之后其表达逐渐下降,说明创伤愈合早期创面组织对新生毛细血管的需求量最大,VEGF 高表达可能与毛细血管的大量增殖有关,建立良好的血液循环可为肉芽组织的形成提供物质基础。PDGF 的表达高峰出现在模型制备后 5 d,其表达呈现先增高后递减的趋势,而创伤愈合中期创面组织以肉芽组织增殖为主,PDGF 高表达可能与肉芽组织形成和伤口收缩有关,这有助于促进胶原纤维形成,加快缺损创面的填补。bFGF 的表达高峰出现在模型制备后 10 d,而在创伤愈合晚期创面以瘢痕形成与表皮再生为主,说明 bFGF 的高表达可能与瘢痕组织的增殖和表皮完全再生有关,这有助于进一步缩小创面,恢复创面缺损部的上皮功能,从而达到完全愈合。

综上所述,VEGF 能够在炎症反应期加快毛细血管的增殖,以创伤后 3 d 左右表达较高;PDGF 能够在增殖期促进肉芽组织的生长,以创伤后 5 d 左右表达较高;bFGF 对新生毛细血管的形成和表皮细胞的增殖具有重要作用,以创伤后 10 d 左右表达较高。3 种因子互相影响,协同促进创伤组织的修复再生。

[参考文献]

[1] 顾永峰. 皮肤创伤愈合过程的研究[J]. 亚太传统医药, 2010,6(7):165-166.

[2] 柏书博,王国栋,吴洋. 细胞因子对创伤愈合的影响[J]. 现代生物医学进展, 2011,11(17):3370-3372,3351.

[3] 王佳琪,王国栋,颜红柱,等. 生长因子在创伤愈合中作用的研究[J]. 创伤外科杂志, 2013,15(3):281-283,289.

[4] 薛盛中,刘保健,董万涛,等. 皮肤创伤愈合的分子机制研究进展[J]. 中医临床研究, 2014,6(23):139-140,142.

[5] 付万进,王晖,庞玉新,等. 皮肤创伤模型研究进展[J]. 广东药学院学报, 2013,29(2):214-218.

[6] 吕海锋,马炳奇,张顺,等. 胰腺癌组织 Stat3、(下转第 214 页)

载,对脑组织发挥保护作用。

[参考文献]

- [1] NIIZUMA K, YOSHIOKA H, CHEN H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 2010,1802(1):92-99.
- [2] RINTOUL G L, REYNOLDS I J. Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010,1802(1):143-150.
- [3] 王景辉,李梦青,刘桂敏,等. 磷酸肌酸的应用研究[J]. *天津药学*, 2004,16(1):60-62.
- [4] 郭丽,陈海丽,赵宗茂,等. 外源性磷酸肌酸对急性中型脑梗死的疗效评价[J]. *临床荟萃*, 2008,23(14):1016-1018.
- [5] 刘玉凤. 磷酸肌酸钠早期治疗新生儿缺氧缺血性脑病的疗效[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2009,17(9):108,67.
- [6] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. *Stroke*, 1979,10(3):267-272.
- [7] 王明山,冀翔宇,张丽娜,等. 短暂性脑缺血-再灌注损伤对老年大鼠海马 AQP4 及 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2007,23(3):223-225.
- [8] 刘红,王明山,高美华. 经颈动脉联合体表降温对短暂性全脑缺血大鼠血清 ICAM-1 和 IL-1 β 表达及神经功能影响[J]. *青岛大学医学院学报*, 2013,49(1):7-9.
- [9] CLARK J B, NICKLAS W J. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization[J]. *The Journal*

of Biological Chemistry, 1970,245(18):4724-4731.

- [10] 苏杭. 新生儿缺氧缺血性脑病的治疗现状与进展[J]. *中国医药导报*, 2009,6(23):167-168.
- [11] ADAMCZYK S, ROBIN E, SIMERABET M, et al. Sevoflurane pre- and post-conditioning protect the brain via the mitochondrial K⁺-ATP Channel[J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2010,104(2):191-200.
- [12] DESCHODT-ARSAC V, DIOLEZ P. Cardiac contraction energetics: a system's view[J]. *Heart*, 2011,97(24): i-e8.
- [13] 桂静,陈莹,李永凤,等. 磷酸肌酸钠对缺氧幼鼠脑组织中钙调蛋白、一氧化氮水平的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2012,47(1):63-66.
- [14] 张秀山,刘睎,张彦,等. 磷酸肌酸钠辅助治疗急性重型颅脑损伤的疗效评价[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2009,35(5):940-944.
- [15] VIKRAM D S, RIVERA B K, KUPPUSAMY P. In vivo imaging of free radicals and oxygen[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2010,610:3-27.
- [16] LIPSHULTZ S E, LIPSITZ S R, SALLAN S E, et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005,23(12):2629-2636.
- [17] 王光胜,耿德勤. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. *医学综述*, 2011,17(24):3753-3756.

(本文编辑 马伟平)

(上接第 211 页)

- HIF-1 α 与 VEGF 表达及意义[J]. *齐鲁医学杂志*, 2014,29(3):196-198,201.
- [7] 蔡源源,李光早. 血管内皮生长因子的调控及其作用研究进展[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2011,7(1):51-54.
- [8] 丁宁,崔芳芳. 血管内皮生长因子及其功能[J]. *中国计划生育学杂志*, 2011,19(3):189-191.
- [9] 尤程程,黄利鸣. VEGF 及其调控因素的研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011,27(12):1344-1346.
- [10] 夏鹏,童文祥,喻永敏,等. 大鼠皮肤切创愈合过程中 VEGF, TGF- β 1 蛋白的表达[J]. *重庆医科大学学报*, 2010,35(8):1167-1171.
- [11] 周岁锋. 眼镜蛇伤溃疡创面炎症细胞趋化及血管内皮因子表达的临床研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2015(9):1268-1270.
- [12] 周春清,姜红,许峰. 血小板生长因子对新生鼠缺血缺氧性脑损伤保护作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2010,46(5):431-433.
- [13] 闫国和,艾国平,邹仲敏,等. 血小板源性生长因子与组织修复[J]. *中国康复理论与实践*, 2007,13(1):39-41.
- [14] 何涛涛,蔡文琴. 血小板衍生生长因子 α 受体的研究进展[J].

解剖学杂志, 2010,33(1):128-130.

- [15] 袁瑞红,刘流,赵德萍,等. 血小板源生长因子对瘢痕成纤维细胞的影响[J]. *中华医学美容美容杂志*, 2010,16(1):38-40.
- [16] TYRONE J W, MOFORD J E, CHANDLER L A, et al. Collagen-embedded platelet-derived growth factor DNA plasmid promotes wound healing in a dermal ulcer model[J]. *Journal of Surgical Research*, 2000,93(2):230-236.
- [17] 郭素芬,杨向红. bFGF 和 PDGF-BB 对内皮祖细胞分化的内皮样细胞和平滑肌样细胞增殖和迁移的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011,19(9):735-743.
- [18] 宗宪磊,蔡景龙,姜笃银,等. 成纤维细胞生长因子在皮肤创面组织修复中的应用[J]. *中国医药生物技术*, 2008,3(1):54-57.
- [19] 姜宁,刘金钊,戚超,等. 关节腔注射褪黑素对大鼠骨性关节炎的影响[J]. *青岛大学医学院学报*, 2014,50(5):417-420.
- [20] 吴维,胡何节,邓福生,等. 血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子体外联合诱导外周血单个核细胞定向分化为血管内皮细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007,11(11):2094-2097.

(本文编辑 马伟平)