维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0533－03

新鲜羊膜与保存羊膜中 HGF、bFGF 表达的对照研究

鲁 静,赵 敏,张 琪,胡 柯,秦应祥

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究肝细胞生长因子(HGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在新鲜和两种保存羊膜中的表达,探讨新鲜和保存羊膜的生物学活性差异。方法:取健康剖宫产产妇胎盘羊膜,随机分成三组:新鲜组、DMEM/甘油－80℃保存组、纯甘油4℃保存组(保存 1、3 个月),应用免疫组织化学方法,检测 HGF、bFGF 在各组羊膜中的表达。结果:HGF、bFGF 主要分布于羊膜上皮层。HGF 在 DMEM/甘油组和纯甘油组保存 1、3 个月时的表达明显低于新鲜羊膜组,统计学上差异有显著性($P<0.0001$),bFGF 在两组保存 3 个月时的表达明显低于新鲜羊膜组,统计学上差异有显著性($P<0.01$)。结论:羊膜经 DMEM/甘油－80℃、纯甘油 4℃保存后,HGF、bFGF 减少,并随保存时间的延长活性逐渐下降。

【关键词】新鲜羊膜;保存羊膜;肝细胞生长因子;碱性成纤维细胞生长因子;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R321.4;R779.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－01－06

Comparative study on the expressions of HGF and bFGF between fresh and preserved amniotic membranes

LU Jing, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expressions of hepatocyte growth factor (HGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in fresh and two preserved amniotic membranes (AM), and to explore their biological vitality. *Methods*: The amniotic membranes from the healthy puerperia with abdominal delivery were randomly divided into three groups: fresh group, DMEM/glycerol preserved group at －80℃ and glycerol preserved group at 4℃ (for 1 and 3 months). Immunohistochemical method was used to investigate the changes in the expressions of HGF and bFGF among the three groups. *Results*: HGF and bFGF were distributed in the epithelium of AMs mostly. The expressions of HGF in both preserved AMs for 1 and 3 months decreased significantly compared with fresh AM ($P<0.0001$), and the expressions of bFGF in both preserved AMs for 3 months decreased significantly compared with fresh AM ($P<0.01$). *Conclusion*: HGF and bFGF both decrease in AMs preserved in DMEM/glycerol at －80℃ and in glycerol at 4℃, and their vitality declines gradually with preserving time.

【Key words】Fresh amniotic membrane; Preserved amniotic membrane; HGF; bFGF; Immunohistochemical

羊膜移植是近年来治疗眼表疾病的新兴疗法,临床上已广泛应用,在基础研究方面也是眼科界的研究热门。关于新鲜羊膜和保存羊膜孰优孰劣的问题,一直以来观点不一,众说纷纭。二者的最大区别体现在羊膜上皮细胞及其细胞因子质与量的关系上。在冻存过程中,保存羊膜的上皮细胞已经灭活,其所含有的各种活性成分可能出现效价衰减。故人们推测新鲜羊膜可能比保存羊膜具有更强的生物活性作用。本研究采用免疫组织化学方法,检测肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)分别在新鲜羊膜、DMEM/甘油－80℃和纯甘油 4℃保存后 1、3 个月的羊膜中的表达,比较新鲜和保存羊膜的生物学活性,探讨 HGF、bFGF 在眼表重建中的作用。

1 材料与方法

1.1 新鲜羊膜的制备

新鲜羊膜取自健康剖宫产产妇的胎盘,产前血清学检查排除乙肝、丙肝、梅毒及获得性免疫缺陷综合征。取材均在

作者介绍:鲁 静(1972－),女,主治医师,硕士,主要研究方向:角膜病及眼表疾病

基金项目:重庆市科委科学基金资助课题(渝科委计:2003－23)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

无菌操作下完成。将胎盘羊膜面用无菌生理盐水冲洗干净，自羊膜与绒毛膜间的潜在空隙钝性剥离羊膜，上皮面朝上置于无菌方盘中，抗生素生理盐水浸泡(含庆大霉素 0.1 万 U/ml、二性霉素 B 2.5μg/ml)20min。将羊膜平铺于手术粘贴巾的纸片上，上皮面朝上，剪成 3.5cm×3.5cm 小块，连同纸片放入装有平衡盐溶液的羊膜容器中(经高压消毒的中性硅玻璃瓶)，4h 内检测。

1.2 保存羊膜的制备与保存

将上述剪成小块的新鲜羊膜，按两种方法进行保存。

1.2.1 DMEM/甘油深低温保存法：

将羊膜片放入装有灭菌的 DMEM/甘油液(DMEM：甘油体积比为 1∶1)的羊膜容器中(同上)，封闭瓶口置 −80℃深低温冰箱保存。用前室温自然解冻，并在平衡盐溶液中浸泡复水。

1.2.2 甘油 4℃保存法：

将羊膜片放入装有消毒纯甘油的羊膜容器中(同上)，24h 后取出羊膜片，转移到另一纯甘油瓶中，封闭瓶口置于 4℃保存。用前在平衡盐溶液中浸泡复水。

1.3 SABC 法免疫组织化学染色

新鲜羊膜 4h 内、保存羊膜保存后 1、3 个月时，取出标本，保存羊膜在平衡盐溶液中浸泡复水 30min，将羊膜自纸片上揭下，剪成小块后 4%甲醛固定、石蜡包埋、5μm 连续切片，采用 SABC 法，行 HGF、bFGF 的半定量免疫组织化学测定。一抗为 HGF、bFGF 兔抗人多克隆抗体，工作浓度 1∶100，二抗为生物素化山羊抗兔 IgG(均购自博士德生物工程有限公司)。HGF 免疫组织化学染色采用石蜡切片热修复抗原程序。bFGF 采用酶消化程序。严格按照试剂盒说明书操作。以出现棕黄色染色为阳性反应。显微镜观察、照相并应用图像分析系统(成都电子科技大 GD−8 型软件)随机测量 6 个高倍视野中羊膜上皮层 HGF、bFGF 的单位面积阳性积分光密度值(area integral optical density：IOD/μm^2)。

1.4 统计学处理

采用 SAS 8.1 统计处理软件。各保存组与新鲜组比较：采用方差分析中 Dunnett t 检验；两种保存方法保存 1、3 个月相互比较：采用单因素方差分析，多个均数之间两两比较的 q 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性标准取 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 羊膜组织中 HGF、bFGF 免疫组化检测结果

HGF、bFGF 主要分布于羊膜上皮层，另外，HGF 在纤维母细胞层，bFGF 在基质层也有少量分布。新鲜及两种方法保存 1、3 个月羊膜上皮层 HGF、bFGF 表达测定结果及相互比较见表 1、2 及图 1～4。

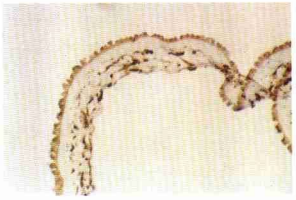


图 1 HGF 在新鲜羊膜中的表达

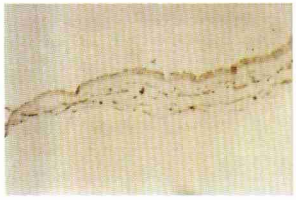


图 2 HGF 在 DMEM/甘油保存 1 月羊膜中的表达



图 3 bFGF 在新鲜羊膜中的表达

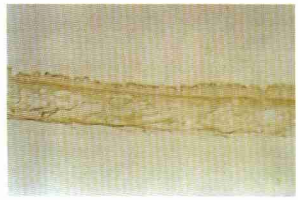


图 4 bFGF 在纯甘油保存 3 月羊膜中的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 两种保存羊膜上皮层 HGF、bFGF 表达与新鲜羊膜比较（$\bar{x} \pm s$，IOD/μm^2）

组别	HGF	P	bFGF	P
新鲜	1.1466 ± 0.1909		2.1439 ± 0.6073	
DMEM/甘油深低温（1m）	0.5268 ± 0.1307	<0.0001	1.9728 ± 0.4085	>0.05
DMEM/甘油深低温（3m）	0.3790 ± 0.3799	<0.0001	1.2796 ± 0.5106	<0.01
纯甘油 4℃（1m）	0.2673 ± 0.2280	<0.0001	1.7325 ± 0.4824	>0.05
纯甘油 4℃（3m）	0.0599 ± 0.0556	<0.0001	1.1240 ± 0.4357	<0.01

表 2 HGF、bFGF 表达在两种保存方法及不同保存时间间的相互比较（$\bar{x} \pm s$，IOD/μm^2）

	组 别	1 个月	3 个月	P
HGF	DMEM/甘油深低温	0.5268 ± 0.1307	0.3790 ± 0.3799	<0.0001
	纯甘油 4℃	0.2673 ± 0.2280	0.0599 ± 0.0556	<0.0001
	P	<0.0001	<0.0001	
bFGF	DMEM/甘油深低温	1.9728 ± 0.4085	1.2796 ± 0.5106	>0.05
	纯甘油 4℃	1.7325 ± 0.4824	1.1240 ± 0.4357	>0.05
	P	>0.05	>0.05	

HGF 的表达在各组均明显低于新鲜羊膜组，统计学上差异有显著性（$P<0.0001$）。但 bFGF 的表达在两种方法保存 1 个月时与新鲜羊膜组比较差异无显著性（$P>0.05$），在保存 3 个月时才明显低于新鲜羊膜组，差异有显著性（$P<0.01$）。

HGF 的表达在两种保存法保存 3 个月时明显低于保存 1 个月时，相同时间内纯甘油组亦明显低于 DMEM/甘油组，差别均有显著性（$P<0.0001$）。但 bFGF 的表达无论在两种保存法保存 1 个月与 3 个月之间还是在相同时间内不同保存法之间差别均无显著性（$P>0.05$）。

3 讨 论

羊膜以其独特的组织学结构，特殊的免疫学特性，以及复杂的生物学特性在眼科领域，尤其是眼表重建中发挥了重要作用。许多学者提出，羊膜不仅可作为理想的生物支架，而且其有活性的上皮细胞还可发挥更多的积极作用。新鲜羊膜带有完整的上皮层，可立即重建眼表上皮，而且不发生免疫排斥反应，有活性的羊膜本身可以表达多种生长因子[1]，其中 HGF 和 bFGF 是较主要的两种生长因子。HGF 具有刺激上皮细胞生长，增加细胞的能动性有利于眼表上皮修复的重要作用。Koizumi 测得 HGF 是其检测的羊膜生长因子中含量最高的，从而推断羊膜上皮细胞产生的 HGF 可能是影响角膜伤口愈合的最主要因素[2]。bFGF 对角膜上皮细胞、角膜基质细胞、角膜内皮细胞的增殖移行趋化有促进作用，对术后伤口愈合的影响持续时间较长，贯穿于术后伤口愈合的全过程，对眼表损伤促修复作用显著。Koizumi[2]等在 DMEM/甘油 - 80℃ 保存 1 月的羊膜中检测到 HGF 和 bFGF 的 mRNA 表达。

本研究选取两种重要的生长因子（HGF、bFGF）作为检测目标，检测其在新鲜羊膜和两种常用的保存羊膜中的表达，结果显示，羊膜中的 HGF 在经两种方法保存后，其表达均显著低于新鲜羊膜，且随保存时间的延长，表达下降更明显，统计学上有非常显著意义（$P<0.0001$）；不过两种保存法之间比较，DMEM/甘油组比纯甘油组下降程度要低得多（$P<0.0001$），说明前者对羊膜的保存效果好些。bFGF 在保存 3 个月时才与新鲜羊膜出现统计学上的显著差异（$P<0.01$），而在两种方法之间无论是 1 月还是 3 月，差别均无显著意义（$P>0.05$）。这一方面说明冻融过程对保存羊膜上皮的生长因子有破坏作用，另一方面提示 HGF 较 bFGF 更容易受到破坏。但因为 HGF 和 bFGF 的检测采用了不同的实验操作程序，其中可能存在误差，这一结论尚有待证实。我们的结果更进一步印证了 Sato[1] 和 Koizumi[2] 的研究。本研究还观察到生长因子不仅表达于羊膜上皮层，基质层也有少量表达。

羊膜在眼表重建中发挥重要作用，新鲜羊膜比保存羊膜更有优势[3]。但也有学者提出或许羊膜在移植中仅起到基底膜的作用，对生长因子在羊膜的疗效中是否起了作用表示怀疑，认为尚有待确定[4]。一些临床观察也表明：在重建眼表过程中，新鲜和冻存羊膜移植的作用、病程及预后基本一致[5,6]。我们在临床也曾使用 DMEM/甘油和纯甘油两种保存法的羊膜做眼表移植，均（下转第 551 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

取如下防治措施:(1)维持有效循环血量:液体以胶体为主,如出血多可输血;加快输液,扩容维持中心静脉压 10～14cmH_2O,尤其是在下腔静脉和门静脉阻断前应快速扩容。(2)适当应用血管活性药物以维持血压在正常或稍高水平:可在开放血管前持续输入多巴胺 3～5ug/(kg·r)或去甲肾上腺素 0.01～0.03ug/(kg·h)。(3)及时发现和纠正酸碱平衡及电解质紊乱。(4)无肝期间可减少麻醉药用量,以防止麻醉过深而引起血压下降。

参 考 文 献

[1] Starzl TE, Show BM, Brock DR, et al. orthotopic liver tansplantation in 1984[J]. Transplant PROC, 1985; 17: 150.

[2] Frederick W, Dehme FW, Prier JE, et al. Textbook of Large animal Surgery[J]. Baltimore: Willians & Wilkins, 1974; 87～130.

[3] Carmichael FJ, Lindop MJ, farman JV, et al. Anaesthesia for hepatic transplantation: cardiovascular and metabolic alterations and their management[J]. Aneth Analg, 1995, 64(2): 108～116.

[4] Load M, Clowes GH, Nespoli A. Encephalopathy, oxygen consumption visceral amino acid clearance, and mortality in cirrhotic surgical patients[J]. Am J Sury, 1984, 147(4): 542－550.

[5] Aldrete JA. Liver tromsplantation: intraoperative and anesthetic management. In: Arias A, Prys－Robertsc, editor. Recent progress in anaesthesiology and resuscitation[J]. Oxford: Black－wull, 1976; 387.

[6] Bowes JB, Zucker MB, et al. Anesthesia for liver transplantation in the pig[J]. Res Vct Sci; 1969; 10(6): 569.

[7] Aldrete A, Levine DF, Gingrich JF, et al. Experience in anesthesia for liver transplantation[J]. Anesth Analg, 1969; 48(5): 802.

[8] Forman JV. Anesthesia for transplant surgery[J]. Int Anesthesiol Clin, 1978; 16(1): 92.

[9] Carmichael FJ, Lindop MJ, Farman JV, et al. Anesthesia for hepatic transplantation: cardiovascular and metabolic alterations and their management[J]. Anesth Analg, 1995; 64(2): 108.

[10] 谢普提摩斯. 谢　逊. 家畜解剖学[M]. 北京: 科学出版社, 1992; 530－533.

[11] Rlankenstijn JD, Groenland TH, Baumgartner D, et al. Intraoperative hemodynamics in liver transplantation comparing orthotopic with heterotopic transplantation in the pig[J]. Transplantation, 1990; 49(4): 665－658.

(上接第 535 页)

收到较好效果。本实验结果显示生长因子在保存羊膜中效价显著下降,这至少可以认为在保存羊膜中生长因子的作用极其有限甚至不起作用。由于目前临床上大多应用保存羊膜作为移植材料,保存羊膜重建眼表的作用机制是否取决于其他的活性成分,需要我们做进一步的研究。

(通讯作者:赵敏,联系方式:重庆医科大学附属第一医院眼科,邮编:400016; E－mail: minzhao2002@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Sato H, Shimazaki J, Shinozaki N, et al. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998; 39(suppll 989): S428.

[2] Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. Curr Eye Res, 2000; 20(3): 173－177.

[3] 陈家祺,周世有,黄　挺,等. 新鲜羊膜重建严重瘢痕期和炎症期眼表的临床研究[J]. 中华眼科杂志, 2000; 36(1): 13－17.

[4] Baum, Jules M. D. Amniotic Membrane Transplantation: Why is it Effective[J]. Cornea, 2002; 21(4): 339－341.

[5] Mejia LF, Acosta C, Santamaria JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface[J]. Cornea, 2001; 20(7): 773－774.

[6] Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison[J]. Br J Ophthalmol, 2001; 85(8): 905－907.