DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.022

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0922-03

bFGF mRNA在穿孔鼓膜的表达及意义

郭 睿,张学渊 (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

提 要:目的 研究鼓膜穿孔后成纤维细胞生长因子表达的可能变化特征与规律,探讨成纤维细胞生长因子在鼓膜穿孔修复过程中的作用。**方法** ①选择120只健康Wistar大鼠,随机分为6个序列组,分别为正常对照组,损伤后1、4、6、8、10 d组,每组动物20只。②RT-PCR和原位杂交方法检测bFGF mRNA在鼓膜的表达。**结果** ①原位杂交方法检测bFGF mRNA的表达,定位于上皮下结缔组织层,且急性穿孔组有时效性。②RT-PCR方法检测鼓膜穿孔后bFGF mRNA的表达规律,同样具有明显时效性。③bFGF mRNA的积分光密度值急性穿孔组与正常对照组bFGF mRNA的表达量差异有显著性($P<0.001$)。**结论** ①bFGF mRNA在急性穿孔后的鼓膜上有明显表达,表明其在急性穿孔鼓膜的愈合过程中可能意义重大。②bFGF mRNA在急性穿孔后鼓膜上的表达具有时序性,为医疗干预时机的选择提供了时间上的可能依据。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子;鼓膜

中图法分类号: R394.3;R764.29 **文献标识码:** A

Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in tympanic membrane perforation

GUO Rui, ZHANG Xue-yuan (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of expression of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane perforation and evaluate its effect on the repairment of tympanic membrane perforation. **Methods** ① 120 healthy Wistar rats were randomly divided into groups of 1, 4, 6, 8, 10 d after perforation and normal control with 20 for each. ② RT-PCR and *in situ* hybridization were used to investigate the expression of bFGF mRNA in tympanic membrane perforation. **Results** The expression of bFGF mRNA was observed in submucosal connective layer of the perforated tympanic membrane. The amount of its expression was different at each interval after acute tympanic membrane perforation. The expression of bFGF mRNA increased rapidly in acute tympanic membrane perforation. **Conclusion** ① bFGF might be important in the process of perforated tympanic membrane repairment. ② The expression of bFGF mRNA are apparently time regulated in acute tympanic membrane perforation.

Key words: basic fibroblast growth factor; tympanic membrane

鼓膜穿孔的修复机制作为耳科学的一个研究热点,近年来,国外学者在分子水平进行了大量的研究工作,发现bFGF在鼓膜穿孔修复过程中可能起重要的作用[1~3]。但目前对该因子在鼓膜穿孔修复过程中的作用及意义,尚处于一个早期的认识过程中,尤其是缺乏对bFGF在鼓膜穿孔修复过程中表达规律的动态研究,导致是否可应用bFGF来治疗鼓膜穿孔及如何应用bFGF来促进鼓膜穿孔的愈合等问题显得尤为突出。因此,研究bFGF在鼓膜穿孔修复过程中的表达规律,对于促进鼓膜穿孔修复的研究及改进临床治疗手段具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组 选用成年,健康,耳镜检查鼓膜正常,体重200 g左右的Wistar大鼠120只,雌雄不限,随机分成6组:正常对照,穿孔后1、4、6、8、10 d,每组20只动物,40耳。分别进行原位杂交技术和RT-PCR技术检测bFGF mRNA。其中RT-PCR技术部分,每2耳一个单位。

1.1.2 试剂 bFGF探针成套检测试剂盒,bFGFR检测试剂盒(上述试剂盒均提供阳性对照片),DAB显色试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司。TRIzol总RNA提取试剂盒购于美国GibcoBRI公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠鼓膜急性穿孔模型的建立 ①麻醉:麻醉剂采用846合剂与氯胺酮混合试剂,比例为2/1,肌肉注射,剂量为0.5 ml/100 g。②手术方法:动物称重后,于下肢肌肉注射相应剂量麻醉药物。待动物麻醉后,固定于操作台。耳周脱毛,消毒,于耳屏前做切口,切除部分软组织,显露鼓膜,于手术显微镜下取2 mm直径的探针在鼓膜紧张部做穿刺,镜下用显微手术器械去除穿孔边缘膜组织,造成直径约2 mm的穿孔,术后关闭切口。急性鼓膜穿孔模型:分别于穿孔后1、4、6、8、10 d取材。动物给予青霉素16万U,肌注,1/d,预防感染。取材:动物断头后,沿颅骨中线剪开,剥离双侧听骨泡,无菌条件下,于显微镜下剥下鼓膜组织,用于原位杂交的大鼠鼓膜,用4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋。用于RT-PCR的大鼠鼓膜,冻存于液氮中直至RNA的提取。

作者简介:郭 睿(1971-),男,河北省保定市人,硕士,主治医师,主要从事耳科学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754405

收稿日期:2000-11-07;修回日期:2001-03-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2　原位杂交及 RT-PCR 检测 bFGF mRNA　　其具体方法为成熟技术，不再赘述，结果进行计算机图像分析处理。

1.3　统计学处理

采用 STAT4.0 软件进行方差分析。

2　结果

2.1　原位杂交

原位杂交结果显示，正常鼓膜细胞排列规则，结构完整，在结缔组织层无 bFGF mRNA 表达的阳性信号，而在急性损伤后的标本上有大量 bFGF mRNA 表达的阳性信号，且随着损伤时间的推移其表达逐渐增强，后又逐渐减弱，直至消失。穿孔第 1 天组可见少量阳性信号，而穿孔第 4、6 天则可见胞浆内明显的阳性信号，到第 8 天达到高峰，可见大量阳性信号，穿孔第 10 天组的阳性信号则明显减弱。绘成曲线图 1。采用 STAT4.0 软件方差分析处理，结果表明，bFGF mRNA 在穿孔后不同时间鼓膜上的表达量差异有非常显著性（$P<0.001$），急性穿孔组与正常对照组样本的表达量差异有非常显著性（$P<0.001$）。

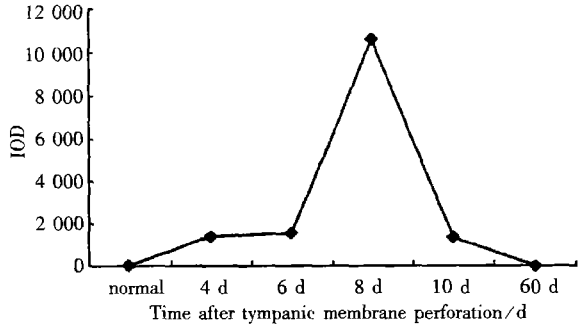


图 1　bFGF mRNA 的表达变化曲线　（原位杂交法）

Fig 1　The expression of bFGF mRNA（*in situ* hybridization）

2.2　RT-PCR

结果绘成曲线，见图 2。bFGF mRNA 在鼓膜穿孔后不同时间的表达量差异有非常显著性（$P<0.001$）。急性穿孔组与正常对照组样本的表达量差异有非常显著性（$P<0.001$）。bFGF mRNA 在鼓膜穿孔修复过程中的表达具有时序性的规律，从穿孔后第 1 天开始出现少量表达，以后逐渐增多，到第 8 天左右达到高峰，后逐渐减少，消失。

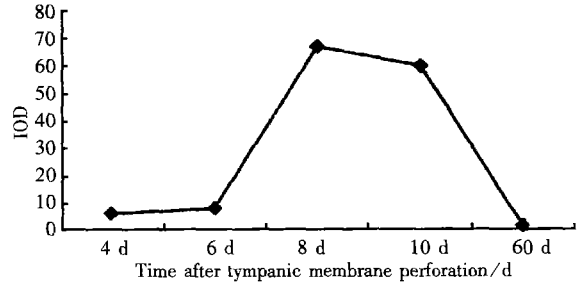


图 2　bFGF mRNA 的表达变化曲线　（RT-PCR）

Fig 2　The expression of bFGF mRNA　（RT-PCR）

3　讨论

鼓膜穿孔后的修复过程是一个较为复杂的多因素影响的病理过程。其中 bFGF 在鼓膜穿孔修复过程中起很大作用，其在鼓膜损伤的早期便出现，并刺激膜结构的细胞增殖，纤维的增生，新血管的生成等，加速穿孔鼓膜的愈合。

鼓膜穿孔的修复为一个复杂的生物过程，包括：上皮再生，上皮迁移，成纤维细胞再生，纤维合成及疤痕形成。bFGF 在该修复过程意义重大，首先刺激内皮细胞与血管的生成，刺激成纤维细胞增生，诱发蛋白酶及胶原酶的产生。胶原酶是细胞外基质新血管生成所必需的，则 bFGF 可增加损伤后的胶原合成。本组实验通过穿孔后修复过程中的系列取材，发现鼓膜纤维层中成纤维细胞大量增生，大量的纤维组织沉积。考虑鼓膜穿孔修复过程中，纤维层的增生是穿孔愈合的重要因素之一。

据国外文献资料显示，bFGF 从 1974 年发现至今，直到 90 年代初，才有人研究其在正常鼓膜及穿孔鼓膜中的作用[1~3]，发现该因子在鼓膜穿孔修复过程中存在，及可加速鼓膜穿孔的修复。还有学者利用 bFGF 抗体去干扰穿孔鼓膜的愈合以及比较 bFGF 与其他因子在穿孔鼓膜愈合过程中的差异[4~7]。但对于该因子作用的具体机制尚不十分清楚，对该因子在鼓膜穿孔修复过程中的意义，尚处于一个早期的认识过程中。尤其是缺乏对该因子在鼓膜穿孔修复过程中表达的动态观察，因子及受体的出现是否存在一定的规律，以及急，慢性穿孔修复过程是否存在明显的差异等。缺乏一个系统性的，深入的研究。本实验建立鼓膜急性损伤的动物模型，并采用原位杂交技术及 RT-PCR 技术针对该因子进行了核酸水平上的定位，定量表达的系统研究，应用计算机图像分析技术对病理切片，凝胶电泳照片进行了分析统计处理，从动态的角度进行了时序性的分析。从一个比较系统的角度对该因子，及其受体在鼓膜损伤过程中进行动态观察，同时比较鼓膜急性损伤修复过程中该因子表达的差异。本实验结果表明在急性鼓膜穿孔修复过程中 bFGF mRNA 于穿孔后第 1 天开始出现少量表达，第 4 天出现明显表达，第 8 天达到高峰，后渐下降，同步于鼓膜的愈合过程。本实验利用原位杂交及 RT-PCR 两种方法检测鼓膜穿孔后不同时间 bFGF mRNA 的表达量，得到了基本相同的结果，发现了急性鼓膜穿孔修复过程中 bFGF mRNA 表达的规律，即存在一个明显的时序性，从穿孔后开始，由低到高，1 周左右达到高峰，然后逐渐减少，消失。基于上述研究，提示在治疗鼓膜穿孔时，可根据一定的时间规律，制定相应的治疗计划。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Friedman N R, Wright C G, Pawlowski K S, *et al*. Effect of basic fibroblast growth factor on perforated chinchilla tympanic membranes[J]. Ear Nose Throat J, 1997, 76(8): 559 - 564.

[2] Ozkaptan Y, Gerek M, Simsek S, *et al*. Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl, 1997, 1: S2 - 5.

[3] Mondain M, Renard N, Ryan A. Neutralizing antibodies against basic fibroblast growth factor influence the healing of traumatic tympanic membrane perforations[J]. ORL J Otoihinolaryngol Relat Spec, 1995, 57(1): 28 - 32.

[4] Chauvin K, Bratton C, Parkins C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 1999, 121(1): 43 - 47.

[5] Peschen M, Grenz H, Grothe C, *et al*. Patterns of epidermal growth factor receptor, basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta3 expression in skin with chronic venous insufficiency[J]. Eur J Dermatol, 1998, 8(5): 334 - 338.

[6] Birck A, Kirkin A F, Zeuthen J, *et al*. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic melanoma from the same patients[J]. Melanoma Res, 1999, 9(4): 375 - 381.

[7] Khouw I M, van-Wachem P B, Plantinga J A, *et al*. TGF-beta and bFGF affect the differentiation of proliferating porcine fibroblasts into myofibroblasts *in vitro*[J]. Biomaterials, 1999, 20(19): 1 815 - 1 822.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2001)08-0924-01

小脑桥脑角恶性淋巴瘤1例报告

A case report of cerebellopontine angle lymphoma

仲召阳,王 东,陈 芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

患者女性,47岁,渐进性头晕头痛3月,加重伴恶心呕吐,站立不稳20 d入院。查体:右面部麻痹,右眼球外展不能,右眼视乳头水肿,右下肢及右上肢麻木,站立不稳,共济失调,肌力Ⅳ级,CT发现左侧小脑桥脑角有一类圆形均质密度稍高影,肿瘤边缘较清楚,瘤体周围有不规则的低密度影,增强后肿瘤密度均匀增高,相近颅骨无破坏,听神经管未受侵犯。MRI T1加权像显示右小脑桥脑角有一低密度肿块,T2加权像显示等密度肿块,向第四脑室和桥脑挤压。血管造影术显示该肿瘤无血管,脑脊液细胞学检查蛋白≥1.0 g/L,淋巴细胞在(0 ~ 100) × 10^6/L,没有检查出瘤细胞,外周血象及浅表淋巴结未发现有异常。手术发现肿瘤3 cm × 3 cm大小,暗红色,位于右侧小脑半球内侧,向前长入桥脑角。

病理检查:瘤组织切面灰白色,质嫩。光镜观察:肿瘤细胞体积小,弥漫分布,圆形,卵圆形,胞浆少,核深染,核仁不明显,细胞异型性明显,核分裂像易见,部分区域有假菊形团样排列,有灶性出血和坏死。免疫组化染色:LCA(++);CD20(++);GFAP(-);S-100(-);CEA(-) EMA(-)。诊断:小脑桥脑角原发性恶性淋巴瘤(B细胞型)。

讨论

中枢神经系统的恶性淋巴瘤比较少见,发生于小脑桥脑角者文献报道只有16例,12例原发(包括本例),4例继发。AIDS患者发病前后[1],接受脏器移植行免疫抑制治疗者,有遗传性免疫缺陷者以及患有其它免疫病者如系统性红斑狼疮,胶质细胞瘤等易患中枢神经系统淋巴瘤。现已证实,EB病毒感染能促发中枢神经系统淋巴瘤形成。

小脑桥脑角淋巴瘤有三种生长方式[2]:①中轴以外的小脑桥脑角恶性淋巴瘤(7例);②中轴以内的向小脑桥脑角延伸(4例);③软脑膜淋巴瘤表现为桥小脑角病变(5例)。12例原发的有4例发生在中轴以内,有5例发生中轴外,有3例发生于软脑膜。4例继发的小脑桥脑角淋巴瘤中有3例发生于中轴以内(75%),1例为软脑膜淋巴瘤,3/4的软脑膜淋巴瘤为原发性淋巴瘤,有1例发生于小脑桥脑角两侧。关于组织起源目前尚无定论,Shibata[3]认为,颅内淋巴瘤起源于蛛网膜下腔和脉络丛的血管周淋巴网状细胞,沿着Virchow-Robin间隙(魏罗二氏隙)浸润,侵犯深部脑组织,Hochberg[1]则认为,颅内淋巴瘤有两种起源,一种是非肿瘤性的淋巴细胞在中枢神经系统反应性聚集所致;另一种为淋巴结和结外的B细胞发生间变而成为肿瘤。

免疫组化技术证明小脑桥脑角恶性淋巴瘤大多属于B细胞系列,文献中16例小脑桥脑角恶性淋巴瘤中只有8例做了免疫组化研究,结果全为B淋巴细胞源性。发生于小脑桥脑角的恶性淋巴瘤要与转移性癌,小脑的髓母细胞瘤相鉴别。转移性小细胞癌呈巢团状分布,免疫组化EMA阳性,小脑的髓母细胞瘤是由密集的未分化的瘤细胞组成,可见有假菊形团结构及灶状或地图样坏死,免疫组化S-100阳性,而它们LCA均阴性。说明LCA、EMA、S-100可作为中枢神经系统淋巴瘤病理诊断的重要辅助手段。

关键词:小脑;恶性淋巴瘤;病理诊断
中图法分类号:R733.4 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Hochberg F H, Miller D C. Primary central nervous system lymphoma[J]. J Neurosurg, 1988, 68(6): 835 - 853.

[2] Nishimura T, Uchida Y, Fukuoka M, *et al*. Cerebellopontine angle lymphoma: a case report and review of the literature[J]. Surg Neurol, 1998, 50(5): 480 - 486.

[3] Shibata S. Sites of origin of primary intracerebral malignant lymphoma[J]. Neurosurgery, 1989, 25(1): 14 - 19.

(编辑 薛国文)

作者简介:仲召阳(1977-),男,江苏省连云港市人,医师,主要从事骨肉瘤与血管生成关系方面的研究。电话:(023)68757374

收稿日期:2000-05-10;修回日期:2000-10-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net