DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.042
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001


文章编号:1000-5404(2001)02-0211-04

论著

# EGF、bFGF对兔自体穿透角膜移植伤口愈合的影响

戴 超,刘 翔 (第三军医大学附属新桥医院眼科,重庆 400037)

提 要:目的 观察表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对自体家兔穿透性角膜移植(PKP)术后伤口愈合的影响。方法 利用家兔自体穿透性角膜移植模型,采用测量伤口愈合强度、液闪计数、AgNORs染色、VG染色和电镜等方法,观察家兔PKP术后伤口愈合情况。结果 ①EGF、bFGF、EGF+bFGF点眼均能增加伤口所能承受的极限压力和$^3$H-TdR的掺入率。②bFGF和EGF+bFGF点眼能刺激伤口处成纤维细胞及其所分泌的胶原纤维呈比较规则的排列。结论 ①EGF、bFGF、EGF+bFGF点眼均能增加PKP术后伤口愈合的强度,增加伤口愈合时DNA的合成。②术后14 d以后EGF和bFGF联合点眼对伤口愈合的促进作用仅相当于单独用bFGF点眼的水平。③bFGF能提高PKP术后伤口愈合的质量。

关键词:表皮生长因子;碱性成纤维细胞生长因子;穿透性角膜移植;伤口愈合
中图法分类号:R779.65 文献标识码:A

# Effects of EGF and bFGF on wound healing after penetrating keratic autoplasy in rabbits

DAI Chao, LIU Xiang (Department of Ophthalmology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract**: Objective To observe the effects of epithelial growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on wound healing of the penetration keratoplasty (PKP) with autograft in rabbits. Methods After the establishment of penetrating keratic autograft model on 24 rabbits, they were equally divided into EGF-, bFGF-, EGF+bFGF-treated and control groups. The wound healing of all the animals were observed with healing intensity, liquid scintillation counter, AgNORs staining, VG staining and transmission electron microscopy. Results ①EGF, bFGF, and EGF+bFGF increased the limiting pressure of the wounds and the $^3$H-TdR incorporation. ②The fibroblast cells and its secreting proliferative collagen in both the bFGF group and EGF+bFGF group were more well-arranged. Conclusion ①EGF, bFGF, EGF+bFGF can obviously elevate the intensity of wound healing after PKP and enhance the synthesis of DNA. ②The effect of this agent combination is just as the same as bFGF applied alone 14 d after the operation. ③bFGF can improve the quality of wound healing after PKP.

**Key words**: EGF; bFGF; wound healing; penetrating keraoplasty

临床上穿透性角膜移植(Penetration keratoplasty, PKP)术后大多数伤口愈合时间长,术后角膜拆线时间常需3~12个月[1]。有实验表明,表皮生长因子(Epithelial growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)能促进角膜的损伤修复[2,3],而EGF、bFGF对PKP术后这种特殊的角膜伤口愈合的影响,临床用药的时间以及二者有无协同效应,协同效应的大小等,目前尚未见国内外的有关报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与主要试剂

新西兰白兔:体重2.0~2.5 kg,附属新桥医院动物室提供。鼠表皮生长因子(mEGF):本校复合伤研究所提供。重组牛碱性成纤维细胞生长因子(bFGF):珠海东大生物制药有限公司提供。$^3$H-脱氧胸腺嘧啶($^3$H-TdR):购自北京原子能研究所。

### 1.2 动物分组与动物模型的制备

取24只新西兰白色家兔,随机分为EGF、bFGF、EGF+bFGF和对照4个组,每组6只12只眼,各组再随机分到8、14、21 d 3个时相点取材观察。

1%戊巴比妥钠兔耳缘静脉注射麻醉,行常规PKP手术,角膜植片和植床均为直径6 mm,角膜植片旋转180°后用10-0进口尼龙线连续缝合。待动物清醒后送回动物房专人颗粒饲料喂养。一眼术后6~14 d再行另一只眼手术。

### 1.3 点眼

术后第1天开始点眼,对照组用等渗盐水,EGF组用5 μg/ml的mEGF(鼠表皮生长因子),bFGF组用2 400 U/ml的bFGF,EGF+bFGF组用5 μg/ml的mEGF和2 400 U/ml的bFGF点眼,3次/d,在14、21 d时相组者同时用$^3$H-TdR 3.7×10$^5$ Bq/ml点眼3次/d,共14 d。每种药物均每次滴约50 μl。

### 1.4 测压

将拆线后的兔俯卧于测压台上,将一次性输液器的针头在距角膜缘后3~5 mm处刺入眼球,并将针头从玻璃体经晶体插入前房,打开三通,然后打开自动抽注机向眼球内匀速注水,直至伤口裂开,压力表的压力不再增加而是突然下降时,记录最高的压力值(在测14 d组和21 d组时先将压力表的压力调到20 kPa)。

### 1.5 角膜取材送检

在距角膜伤口2mm处剪去周边角膜,将中央带伤口的角膜取1/2置于清洁的青霉素瓶内作液闪计数用,另1/2在伤口

作者简介:戴 超(1966-),男,四川省泸州市人,硕士,住院医师,主要从事角膜病方面的研究。电话:(023)68755385
收稿日期:2000-04-04;修回日期:2000-07-20

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

处剪出约 1 mm× 1 mm, 用 30 g/L 的冷戊二醛固定, 剩余部分用 10%甲醛固定。所有标本均置 4 ℃冰箱保存待用。

### 1.6 $^3$H-TdR 掺入液闪计数

将取下的 1/2 角膜分别称重、匀浆、液闪计数。

### 1.7 形态学观察

常规固定、脱水、包埋、切片, VG 和 AgNORs 染色, 光镜及电镜观察, AgNORs 染色切片进行成纤维细胞计数(伤口处随机选 5 个视野, ×400), 每个组 4 张切片共 20 个视野, 取其平均数(用每个高倍视野的细胞数表示)行统计学处理。

### 1.8 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPLM 软件包行多因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 兔自体 PKP 术后伤口愈合强度的测量

各处理组与对照组比较差异均显著; EGF+bFGF 组与 EGF 组比较差异有显著性, 与 bFGF 组比较在术后 14、21 d 差异不显著。

表 1 PKP 术后伤口愈合强度的变化($p$/kPa, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of wound intensity after PKP($p$/kPa, $\bar{x}\pm s$)

| Group | $n$ | 8 d | 14 d | 21 d |
|---|---|---|---|---|
| Control | 4 | 24.13±2.32 | 53.88±2.95 | 94.75±5.24 |
| EGF | 4 | 33.63±2.89 ** | 88.75±8.54 * | 142.50±20.21 * |
| bFGF | 4 | 36.50±3.19 ** | 122.66±19.98 **△ | 250.00±23.45 **△△ |
| EGF+bFGF | 4 | 48.00±2.68 **△△☆☆ | 125.00±14.72 **△ | 267.50±21.02 **△△ |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* EGF; ☆☆: $P<0.01$ *vs* bFGF

### 2.2 $^3$H-TdR 掺入液闪计数

各处理组与对照组比较差异均显著; EGF+bFGF 组与 EGF 组比较差异显著, 与 bFGF 组比较差异不显著, 见表 2。

### 2.3 AgNORs 染色成纤维细胞计数

各处理组与对照组比较在术后 8、14 d 差异均显著; EGF+bFGF 组、bFGF 组与 EGF 组 14 d 比较差异均显著性; 而 EGF+bFGF 组与 bFGF 组比较差异不显著, 见表 3(经方差齐性检验, 方差不齐, 经对数代换 $x=\ln x$)。

表 2 PKP 术后$^3$H-TdR 掺入率(Bq/mg $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Incorporation rate of $^3$H-TdR after PKP(Bq/mg $\bar{x}\pm s$)

| Group | $n$ | 14 d | 21 d |
|---|---|---|---|
| Control | 4 | 3.3±0.75 | 3.55±0.64 |
| EGF | 4 | 4.84±0.49 * | 5.78±0.88 * |
| bFGF | 4 | 7.90±0.49 **△△ | 8.10±0.49 **△ |
| EGF+bFGF | 4 | 8.01±0.88 **△△ | 8.39±0.31 **△△ |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* EGF

表 3 AgNORs 染色成纤维细胞计数($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Number of fibroblast cells by AgNORs staining after PKP ($\bar{x}\pm s$)

| Group | $n$ | 8 d | 14 d | 21 d |
|---|---|---|---|---|
| Control | 4 | 1.19±0.51 | 2.33±0.50 | 3.30±0.41 |
| EGF | 4 | 1.69±0.68 * | 2.34±0.62 ** | 2.76±0.51 |
| bFGF | 4 | 3.34±0.56 **△△ | 3.40±0.39 | 3.37±0.42 |
| EGF+bFGF | 4 | 2.22±0.70 **☆ | 3.46±0.46 **△△ | 3.39±0.46 |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △△: $P<0.01$ *vs* EGF; ☆: $P<0.05$ *vs* bFGF

### 2.4 PKP 术后的形态学观察

2.4.1 VG 染色 术后 14、21 d 见各处理组伤口处的胶原纤维量均较对照组多, bFGF 和 EGF+bFGF 组伤口处新生的胶原纤维排列较为规则, 而 EGF 组和对照组排列较紊乱, 见图 1、2。

2.4.2 AgNORs 染色 在术后 8、14 d 见各处理组伤口处成纤维细胞较对照组多, bFGF 和 EGF+bFGF 组还可见成纤维细胞及其所分泌的胶原排列较规则, EGF 和对照组排列紊乱, 见图 3、4。

2.4.3 透射电镜观察 术后 8、14 d 见各处理组成纤维细胞核内染色质颗粒较多, 线粒体多体积大, 粗面内质网多, 核糖体密集, 术后 21 d, bFGF 和 EGF+bFGF 组见线粒体和粗面内质网均减少, 而对照组和 EGF 组的线粒体和粗面内质网仍多; 另外, bFGF 和 EGF+bFGF 组可见胶原纤维排列较为丰富规则, 对照组相对较少且排列紊乱, 见图 5。

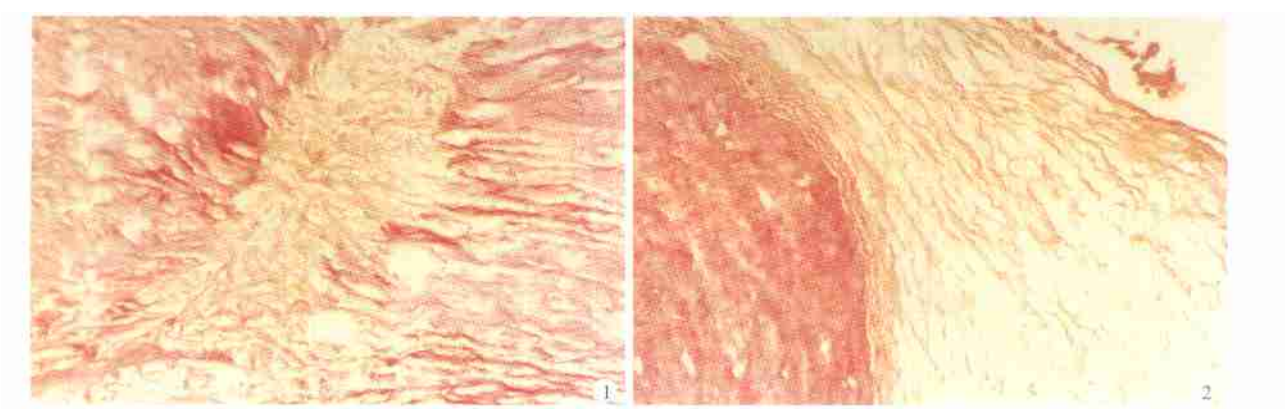


图 1 EGF 组 14 d VG 染色结果 胶原纤维排列紊乱 (× 200)

**Fig 1 EGF group 14 d VG staining** Arrangement of regenerative collagen irregular (× 200)

图 2 EGF+bFGF 组 14 d VG 染色结果 胶原纤维排列较为规则 (× 200)

**Fig 2 EGF+bFGF group 14 d VG staining** Arrangement of regenerative collagen rather regular (× 200)

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





图 3　EGF 组 14 d AgNORs 染色结果　成纤维细胞少且排列紊乱　(× 1 000)

**Fig 3　EGF group 14 d AgNORs staining**　Regenerative fibroblast rare and irregular　(× 1 000)

图 4　EGF+ bFGF 组 14 d AgNORs 染色结果　增生的成纤维细胞排列较规则　(× 1 000)

**Fig 4　EGF+ bFGF group 14 d AgNORs staining**　Regenerative fibroblast regularly arranged　(× 1 000)

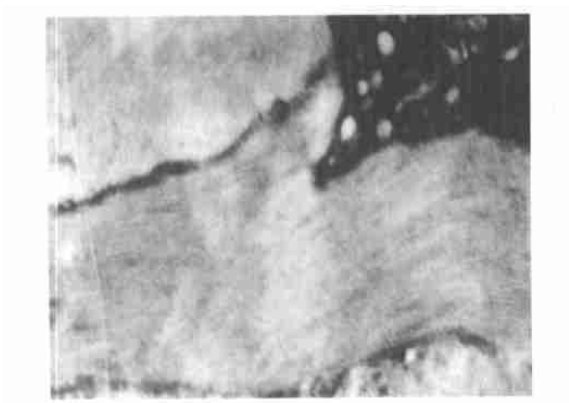


图 5　EGF+ bFGF 组 21 d 透射电镜结果　胶原排列规则, 线粒体和内质网减少　(× 10 000)

**Fig 5　EGF+ bFGF group 21 d TEM**　Arrangement of collagen regular; endoplasmic reticulum and mitochondria reduced　(× 10 000))

## 3　讨论

EGF 作为一种作用广泛的上皮细胞分裂素, 同时又是内皮细胞、角膜细胞和上皮细胞发生迁移、增殖和分化的刺激剂[4,5]。Hongo 等[2] 还发现角膜上皮细胞对 EGF 最敏感, 内皮细胞次之, 角膜细胞最低, 但转化生长因子 $\beta_1$(TGF$\beta_1$)能促进 EGF 对角膜细胞的促生长作用, 而 TGF$\beta_1$ 本身对这 3 种细胞的生长均无影响。Usuki 等[6] 用 EGF 点眼发现 EGF 能增加伤口 1、2、3、7 d $^3$H-TdR 在角膜细胞的整合和加速角膜基质伤口愈合, 他们的发现与本实验结果有相似之处。这可能与角膜本身存在的 TGF$\beta_1$ 促进了 EGF 对角膜细胞的增殖作用有关。bFGF 作为角膜组织的正常生理成分, 在正常角膜组织全层中都有分布, 正常状态下主要以无或低活性形态存在于细胞间质中[7]。角膜损伤后伤口处 bFGF 表达增强[8], 可通过自分泌和旁分泌方式影响角膜损伤的修复[4]。本实验结果显示, bFGF 在术后早期(术后 8 d)即能明显地增加伤口愈合的强度, 并且 bFGF 点眼组伤口的抗张力强度随时间的延长迅速升高, 并且使伤口处成纤维细胞的数量已迅速地达到高峰, 增加术后$^3$H-TdR 在角膜伤口愈合的掺入率, 提示 bFGF 能增强 PKP 术后伤口愈合所必需的 DNA 合成增加。

本实验发现, EGF 和 bFGF 联合点眼在 PKP 术后早期对伤口愈合的促进作用比较明显, 而在术后 14 d 以后, 这种联合用药所取得的效果和单独应用 bFGF 点眼相当。这可能与 EGF 主要是刺激角膜上皮细胞增殖[1], 移行和分化有关; 其次, 在术后早期 EGF 可能容易通过角膜伤口渗入到伤口深部, 刺激角膜内皮细胞的增殖, 促进 PKP 术后的内皮伤口提前闭合, 为角膜伤口基质的愈合提供了一个更好的微环境, 角膜上皮和内皮的愈合又能促进基质细胞的增殖; 而在没有外源性 EGF 条件下, 角膜上皮和内皮在 PKP 术后 3～4 d 就已愈合, 这时 EGF 点眼对 PKP 术后伤口愈合的影响作用降低。bFGF 主要是促进基质成纤维细胞的增殖、移行和分化, 其对 PKP 术后伤口愈合的影响持续时间较长, 对基质成纤维细胞的增殖、移行和分化的促进作用贯穿于 PKP 术后伤口愈合的全过程, 且通过对各组 VG 和 AgNOs 染色的形态学观察, 发现联合点眼组和 bFGF 眼成纤维细胞的分布排列及其产生胶原的排列更接近于正常的角膜原板层, 而对照组和 EGF 组排列紊乱, Gospodarowicz[9] 的研究发现与本实验的结果比较吻合。提示 bFGF 能刺激角膜基质的成纤维细胞呈相对比较规则的板层排列, 使 PKP 术后伤口的愈合质量更高。

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

参考文献：

[1] 李凤鸣 主编. 眼科全书[M]. 北京：人民卫生出版社, 1996. 1 336～1 337.

[2] Hongo M, Itoi M, Yamaguchi N, *et al*. Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit corneal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor-beta1 [J]. Exp Eye Res, 1992, 54(1): 9—16.

[3] Pandholi S, Tullo A, Khaliq A, *et al*. The effect of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelia cells and keratocytes[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(1): 1—8.

[4] Ishida K, Yamashita H, Katagiri H, *et al*. Regulation of glucose transporter1(GLUT1) gene expression by epidermal growth factor in bovine corneal endothelial cells[J]. Jpn J Ophthalmol, 1995, 39(3): 225—232.

[5] Nakamura M, Nishida T, Ofuji K, *et al*. Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea[J]. Exp Eye Res, 1997, 65(3): 321—329.

[6] Usuki Y, Katakami C, Yamamoto M, *et al*. The effect of epidermal growth factor on keratoctyes during healing of penetrating incision[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1995, 99(11): 1 209—1 213.

[7] Wilson S E, Lloyd S A, He Y G. Fibroblast growth factor-1 receptor messenger RNA expression in corneal cells[J]. Cornea, 1993, 12(3): 249—254.

[8] Faktorovich E G, Badawi D Y, Maloney R K, *et al*. Growth factor expression in corneal wound healing after excimer laser keratectomy[J]. Cornea, 1999, 18(5): 580—588.

[9] Gospodarowicz D, Greenburg G. The effects of epidermal and fibroblast growth factors on the repair of corneal endothelial wounds in bovine corneas maintained in organ culture[J]. Exp Eye Res, 1979, 28(2): 147—157.

（编辑 陈聪连）

# 经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)02-0214-01

## 血栓性血小板减少性紫癜1例报告

## Report a case of thrombotic thrombocytopenic purpura

王 新，张 玉景 （第三军医大学附属新桥医院肾内科，重庆 400037）

患者女性，22岁，重庆市人，因发热30 h，全身瘀斑10 h于1999年7月26日入院。患者不明诱因畏寒、发热，无尿频、尿急、尿痛、腹痛及腰痛。体温最高达40 ℃。院外诊断为“感冒”。予以“青霉素、奈替米星、柴胡”等治疗，体温降至正常，但出现牙龈出血，全身散在出血点，注射部位大片瘀斑，月经量增多，巩膜黄染，呈进行性加深，伴恶心、呕吐、嗜睡，呕吐咖啡色胃内容物，尿液为洗肉水样，尿量逐渐减少，出现少尿无尿。

查体：发育正常，消瘦，贫血貌，精神萎靡。全身皮肤可见散在黄豆大小瘀斑，注射部位可见大片瘀斑，巩膜黄染，颈无抵抗，双肺呼吸音清晰，心界不大，心率76次/min，心律齐。舟状腹，肝肋下2 cm，质软，触痛，双肾区轻叩痛。血常规白细胞2.9×$10^9$/L，红细胞2.03×$10^{12}$/L，血红蛋白54 g/L，血压中未见破碎细胞。网织红细胞7.4%，血小板47×$10^9$/L，尿常规蛋白卅，红细胞卄。白陶土部分凝血酸原时间(KPTT)393 s(37.6 s)凝血酶原时间(PT)15.7 s(13.6 s)，凝血酶时间(TT)18.5 s(16.2 s)，凝血时间(CT)9 min 26 s。肾功能：BUN 26.83 mmol/L，Cr 868.9 μmol/L。肝功能：谷草转氨酶(AST)86 IU/L，总胆红素(TBIL)29.0 μmol/L，直接胆红素(DBIL)14.6 μmol/L，间接胆红素(IBIL)14.3 μmol/L。血沉91 mm/h，乳酸脱氢酶(LDH)267 IU/L，α-羟丁酸脱氢酶(HBDH)318 IU/L，Coombs试验阴性。B超：双肾体积稍增大，形态饱满，实质增厚，回声增强，皮髓质界面清晰，肾锥体肿大，实质与窦区边界欠清晰，窦区变窄。双肾血流灌注良好，动脉阻力指数稍增高。骨髓报告：骨髓中红系高度增生，红系55%，粒/红比例1.5∶1，巨核细胞形态正常，全片37个。

治疗：入院后，给予新鲜血浆，全血输注，糖皮质激素，血液透析，抗感染，保护胃粘膜等治疗。病情逐渐好转，全身瘀斑瘀点消退，尿量增多，肾功能正常，胸水、腹水吸收，B超肝脏大小正常，贫血改善，治愈出院。

### 讨论

TTP临床表现为血小板减少性紫癜，溶血性贫血，肾脏血栓性微血管病，神经系统症状及发热五联综合征。其诊断并无特异指标可作依据，病理学检查亦无特异性[1,2]，阳性有助于诊断，阴性不能除外。故，只能根据临床表现与实验室检查所见，在除外其他类似疾病的基础上，求得确诊[3]。本病的病因，发病机制及临床表现等，均与溶血性尿毒症综合征(HUS)有共同之处，有作者认为HUS与TTP为同一种疾病，在小儿表现为HUS在成人表现为TTP，所以两者鉴别诊断并不十分重要[4]。此患者有血小板减少，微血管性溶血性贫血，及神经系统轻微受累的表现，并有发热，急性肾功能衰竭，网织红细胞增高等，本例TTP诊断不难[5]。同时应与原发性血小板减少性紫癜加以区别，原发性血小板减少性紫癜无肾功能衰竭，无黄疸，无精神障碍等，两者鉴别不难。另外，应与Evans综合征加以区分，Evans综合征系自身免疫性溶血性贫血，伴有血小板减少，可有紫癜等出血症状，抗人球蛋白试验阳性[6]。

文献报道，TTP目前病因不详，可能与感染，遗传因素，药物因素等有关，但感染与TTP关系未能阐明，而遗传因素在TTP发作中占重要作用。据报道，TTP病死率高，1964年以前，271例

（下转216页）

作者简介：王 新(1968—)，男，重庆市人，主治医师，主要从事肾病临床方面的研究，现在南川市人民医院内二科。电话：(023)71413487

收稿日期：2000-01-20；修回日期：2000-07-25

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