DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.021

文章编号: 1000-5404(1999)11-0831-03

颌面部爆炸伤愈合过程中 VEGF和 bFGF含量变化的实验研究

张从纪[1],李慧增[1],周树夏[2],杨 军[1] ([1]第三军医大学附属西南医院口腔科,重庆 400038;[2]第四军医大学口腔医学院,西安 710032)

【提要】 目的: 探讨颌面部软组织爆炸伤愈合过程中血管内皮细胞生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在伤口渗液中含量的动态变化,以及其对上述创伤愈合中血管再生过程的刺激作用。方法: 采用改进的家兔颌面部爆炸伤动物模型,以 KTY-04型雷管为爆炸源,复制颌面部爆炸损伤,选用聚乙烯醇(PVA)海绵收集伤口渗液,双抗体夹心酶(ELISA)法检测其中 VEGF和 bFGF含量。结果: 颌面部爆炸伤伤口渗液中 VEGF含量在伤后第 1周内稳步上升,于伤后第 1天起和正常血清组比较,差异明显,伤后第 3天达到(2.9± 2.7)ng/ml,差异非常显著($P<0.01$),伤后 7d达峰值。伤口渗液中 bFGF的含量在伤后 6h即达到峰值,为(565± 436)pg/ml,并在之后 1~ 2d内迅速下降,于伤后 3~ 5d基本达到正常血清水平,伤后 7d略有上升。结论: VEGF和 bFGF参与颌面部爆炸伤愈合过程中血管再生的两个不同阶段,二者有协同作用,bFGF刺激血管再生的启动,并诱导 VEGF的合成,VEGF则调节和维持之后的血管再生过程。

关键词 血管内皮生长因子;碱性成纤维细胞生长因子;颌面外伤;爆炸伤
中图法分类号 R782.4 文献标识码 A

颌面部爆炸伤是平时意外事故以及战伤的主要伤类,如何促进创伤愈合,缩短患者的疗程,一直是口腔颌面外科的研究重点。颌面部爆炸伤的愈合包括纤维组织形成、胶原沉积和血管再生等过程。其中血管再生是创伤愈合过程中重要的一环,血管再生相关因子: 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)以及碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)在此过程中具有广泛的调节作用。VEGF可以特异作用于内皮细胞,促进其增殖,并提高血管通透性和改变细胞外基质[1]。bFGF参与了胚胎发育、肿瘤生长、创伤愈合等多种生理和病理过程[2,3]。然而,对于它们在颌面部爆炸创伤中含量变化和作用目前尚不清楚。为此,我们观察了 bFGF和 VEGF在家兔颌面部爆炸伤伤口渗液中的含量变化及其对创伤愈合过程的影响作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选用新西兰白兔 60只,雌雄不拘,体重 2.0~ 2.5kg,平均 2.1kg 随机分为伤后 6h、1、2、3、5、7d组,每组 10只。实验前进行 1周饲养,实验前 3d连续测体温,脉搏,呼吸,经统计学分析,个体间无明显差异。

1.2 家兔颌面部爆炸伤动物模型的制备

根据我科建立的颌面部爆炸伤动物模型加以改进[4]。采用我科与国营八四五厂合作研制的 KTY-04型瞬发纸质电雷管为爆炸源。雷管外径 8.4mm,内径 6.2mm,长度 54mm,导线长 2m,其爆炸参数为爆热 5066J/g,爆轰气体体积为 620ml/g,爆炸释放能量为 2026.4J。家兔以 3%的戊巴比妥钠(30mg/kg,IV)麻醉,面部剪毛备皮,俯卧于致伤架上,头偏向一侧。将雷管置于距侧面平面颊部 5cm处,雷管长轴垂直于表面皮肤。以直流电引爆雷管,造成面颊部软组织缺损性创伤,伤口平均大小为 3cm× 4cm× 4cm,有或无与口腔相通。术后动物给予庆大霉素(2×10^4 u·kg^{-1}·d^{-1})常规抗菌治疗,以排除严重感染对实验结果的影响。

1.3 伤口渗液标本的采集

动物致伤后立即清伤缝合,3%双氧水与生理盐水交替冲洗伤口,切除坏死组织,如有伤口与口腔相通则先行关闭口内伤口。分层缝合肌层、皮下和皮肤,在皮下层放置 4个直径为 1.0cm,厚 0.5cm的聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA)海绵,PVA海绵置入前经流水漂洗过夜,而后煮沸 30min消毒,置入时先浸入无菌的生理盐水中。于各时相点取出 PVA海绵,同一时相组中,每 8个 PVA海绵合为一个标本。取出后离心,取上清,-70℃保存[5]。对照组标本来源: 动物于伤前 1d取血清作为对照。

1.4 标本中 VEGF及 bFGF含量的测定

采用抗体夹心 ELISA法检测标本中 VEGF的含量。VEGF和 bFGF测定应用双抗体夹心酶(ELISA)法,VEGF ELISA试剂盒以及 bFGF ELISA试剂盒由美国 Santa Cruz生物试剂公司提供,灵敏度为 1.0pg/ml 操作按说明书进行。每个标本检测 2次,取其平均值。

1.5 实验数据处理

所有数据均用均数± 标准差表示,统计学处理应用 SPSS for Windows软件包进行 t检验,$P<0.05$或 $P<0.01$视为两组差异有显著性或非常显著性差异。

2 结果

实验结果如表 1、2所示。颌面部爆炸伤伤口渗液中 VEGF

作者简介: 张从纪,男,31岁,住院医师,博士研究生
收稿日期: 1999-03-29;修回日期: 1999-09-29

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

含量在伤后第 1周内稳步上升,于伤后第 1天起和正常血清组比较,差异明显,伤后第 3天达到(2.9± 2.7) ng/ml,差异非常显著 $P<0.01$,之后其含量逐步增高。颌面部爆炸伤伤口渗液中 bFGF的含量在术后 6 h即达到峰值,为(565± 436) pg/ml,并在之后 1~ 2 d内迅速下降,于伤后 3~ 5 d基本达到正常血清水平,伤后 7 d略有上升。

表 1 颌面部爆炸伤伤口渗液中 VEGF的含量(ng/ml)

Tab 1 Content of VEGF in wound discharge of maxillofacial blast injury(ng/ml)

	Normal sera	Time after blast injury					
		6 h	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
VEGF	0.4± 0.2	0.7± 1.0	0.9± 0.8	1.1± 1.7	2.9± 2.7	4.0± 2.0	6.1± 0.8
t^*		2.301	2.713	2.740	3.442	3.541	4.605
P		> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01

*: *vs* normal sera

表 2 颌面部爆炸伤伤口渗液中 bFGF的含量(pg/ml)

Tab 2 The content of bFGF in wound discharge during maxillofacial blast injury (pg/ml)

	Normal sera	Time after blast injury					
		6 h	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
bEGF	20.5± 0.8	265± 436	257± 110	130± 74	40± 27	49± 42	68± 1.1
t^*		4.464	3.960	3.581	2.043	2.284	2.667
P		< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05	> 0.05	< 0.05

*: *vs* normal sera

3 讨论

在颌面部爆炸伤愈合过程中,血管再生是其重要的一个环节,细胞生长因子对这一过程的发生和发展具有重要的调节作用。VEGF是新近发现的一类作用于血管内皮细胞的糖蛋白,是主要的血管生成因子之一,具有强烈的促进内皮细胞增殖,诱导血管生成的作用。目前认为,VEGF参与许多病理、生理过程,包括肿瘤生长,增生性视网膜病,以及创伤愈合等[6]。bFGF分布于体内多种细胞,以自分泌和旁分泌方式促进细胞自身与周围细胞的增殖、分化、蛋白质合成等行为,bFGF可以促进上皮组织的生成和损伤的再修复[2]。

颌面部爆炸伤中,伤口渗液可以认为是创伤组织细胞生长的内环境。实验中采用 PVA海绵进行创伤伤口渗液的收集,PVA海绵组织相容性较好,对伤口组织不会造成明显的刺激作用,对实验结果的影响较小[5]。爆炸伤常伴有严重的感染,尤其是口腔颌面部,其感染的发生率较高[4],为此,动物在致伤后给予常规抗菌素治疗,以排除严重感染对实验结果的影响。另外,实验中未检测伤口渗液中蛋白酶对 VEGF和 bFGF生物活性的影响。伤口渗液体中含有较高的蛋白酶,如金属蛋白酶等。虽然本实验未检测标本中蛋白酶活性水平,但从实验结果看,伤口渗液中蛋白酶的作用仍不足以消除生长因子(如 VEGF和 bFGF)的生物活性,因此,对实验结果无明显影响。实验以正常血清为对照是考虑到正常情况下,组织的生长环境与血清基本相同,并且血清较易采集。机体创伤后血清中多种细胞因子的含量也增加,但低于局部的损伤组织,目前报道较多[5,6,10],本实验着重探讨颌面部爆炸伤后局部组织 VEGF和 bFGF的含量变化。

本实验提示:伤口渗液中 bFGF的含量在术后 6 h达到峰值,为(565± 436) pg/ml,并在之后 1~ 2 d内迅速下降。而 VEGF在伤后第 1周内,其含量稳步上升,于术后第 3天达到(2.9± 2.7) ng/ml,和正常血清相比差异明显,术后 7 d达峰值,为(6.1± 0.8) ng/ml,这与创伤愈合过程中生长血管形成的时间相似,创伤愈合过程中新生血管首先发生于伤后 2~ 3 d,伤后 1~ 2周达到高峰。

bFGF对创伤后早期刺激血管再生有重要的作用,bFGF含量在伤后几小时达到峰值,之后随 VEGF的开始升高而下降,这提示,VEGF和 bFGF在创伤愈合过程中具有协同作用,以产生持续的刺激血管再生作用,bFGF刺激血管再生的启动,而 VEGF使其保持生长。

bFGF的前体存在于正常组织中,在创伤过程中由于细胞受损或由于酶的作用(如纤维蛋白酶等)而释放[4]。由于多种细胞均带有 bFGF受体,因此 bFGF可以激发创伤早期的多种反应,包括内皮细胞和成纤维细胞的增殖和迁移。这在 VEGF等介质因子开始合成时,血管再生和胶原沉积已经启动。与 bFGF的受体广泛分布不同,VEGF受体只分布于内皮细胞,在创伤愈合的增殖期和成熟期,VEGF成为主要的血管再生刺激因子,调节血管生长[6,7]。本结果提示,在伤口血管再生的早期,内皮细胞的增殖由 bFGF诱导,后期毛细血

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

管的生长和分化由 VEGF调节。

VEGF在伤口中的反应受到多种机制的调节,其中 bFGF对其有直接的调节作用,因为 bFGF可以上调 VEGF的产生,二者具有协同的作用[8]。此外,其它一些生长因子如血小板衍化生长因子(PDGF)和转化生长因子β(TGFβ)等也可上调 VEGF的表达[9]。另一个调节伤口中 VEGF生成的因素是局部缺氧,VEGF已被证实是缺氧诱导的因子,实验表明,创伤在修复早期具有特定的缺氧特性,由于伤口氧含量的不同,血管再生长作用也不同,VEGF被认为是其调节因素,在创伤早期缺氧阶段,VEGF的表达呈上升,之后,随着新生血管的完成和伤口再灌注的恢复而下降[9,10]。

我们的实验证实,在颌面部爆炸伤愈合过程中,VEGF和 bFGF可能参与血管再生的两个不同阶段,二者有协同作用,bFGF刺激血管再生的启动,并诱导 VEGF的合成,VEGF则调节和维持之后的血管再生过程。

参考文献

[1] Zhang Q X, Magovern C J, Mack C A, *et al*. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis[J]. J Surg Res, 1997, 67(2): 147

[2] Dellian M, Witwer B P, Salehi H A, *et al*. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment[J]. Am J Pathol, 1996, 149(1): 59

[3] Walter F, Ullrich G, Suleyman E, *et al*. Vascular endothelial growth factor: A possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia[J]. Blood, 1997, (6): 1870

[4] 史文进,李慧增,孙　远,等.颌面部爆炸伤软组织缺损早期修复的实验研究[J].实用口腔医学杂志,1996, 12(4): 264

[5] Sawai T, Usui N, Sando K, *et al*. Hyaluronic acid of wound fluid in adult and fetal rabbits[J]. J Pediatr Surg, 1997, 32(1): 41

[6] Nissen N N, Polverini P J, Koch A E, *et al*. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing[J]. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1445

[7] Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease[J]. Am J Physiol, 1997, 273(5 Pt 2): 2091

[8] Brown L F, Detman M, TognazziK, *et al*. Uterine smooth muscle cells express functional receptors(flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor[J]. Lab. Invest, 1997, 76(2): 245

[9] Carmeliet P, Moons L, Ploplis V, *et al*. Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the plasmanogen gene[J]. J Clin Invest, 1997, 99(2): 200

[10] Carmeliet P, Moons L, Stassen J M, *et al*. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice[J]. Am J Pathol, 1997, 150(2): 761

(编辑　王　红)

Study of the changes of VEGF and bFGF content during healing stage of maxillofacial wounds in rabbits

ZHANG Cong-ji, LI Hui-zeng, ZHOU Shu-xia, YANG Jun (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To determine the content of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in the wound discharge of maxillofacial soft tissue blast injury and to study their effects on angiogenesis during wound healing. Methods: The rabbit model of maxillofacial soft tissue blast injury was established with the KTY-04 blasting cap. Wound discharge was collected with polyvinyl alcohol sponge and its content of VEGF and bFGF was determined with ELIZA. Results: VEGF content in wound discharge was increased steadily in the first week after injury. The content was significantly higher in the wound discharge than in the normal serum on the 1st day after injury, it was 2.9± 2.7 ng/ml on the 3rd day and it reached the peak value on the 7th day ($P < 0.01$). bFGF content in wound discharge reached the peak value (565± 436 pg/ml) in the 6th hour after injury, was decreased rapidly in the first 1~ 2 days, returned to the normal serum level in the 3rd to 5th day and was slightly elevated on the 7th day after injury. Conclusion: VEGF and bFGF take part in 2 angiogenic cascades with synergistic action during the healing stage of maxillofacial blast injury. bFGF stimulates the initial angiogenesis and induces the production of VEGF. The subsequent and more prolonged stimulus to angiogenesis comes from VEGF.

Key words vascular endothelial growth factor (VEGF); basic fibroblast growth factor (bFGF); maxillofacial injury; blast injury; rabbit

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