

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.07.006

· 基础研究 ·

碱性成纤维细胞生长因子复合胶原膜对大鼠硬腭软组织缺损区血管化的影响

刘双喜¹, 徐淑兰², 王彬婷¹, 陈灼庚¹

1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院·海南省口腔医学中心口腔种植科, 海南海口(570208); 2. 南方医科大学口腔医院口腔种植中心, 广东广州(510280)

【摘要】 目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)与胶原膜靶向结合修复大鼠硬腭软组织缺损创面的血管化情况。**方法** 6周龄雄性Wistar大鼠96只,在大鼠硬腭第三磨牙远中到第一磨牙近中建立直径为3 mm的硬腭软组织圆形缺损动物模型,随机分成4组,分别在4组大鼠的硬腭软组织缺损中植入靶向结合bFGF/胶原膜、游离结合bFGF/胶原膜、胶原膜、不植入胶原膜(空白对照组)。各组大鼠分别在术后1周、2周、4周、8周观察创面的愈合情况,并各组处死6只,HE染色比较新生血管数目。**结果** 植入后1周、2周、4周时,靶向结合bFGF/胶原膜组新生血管数分别为 8.94 ± 0.61 、 17.39 ± 2.08 、 11.22 ± 1.66 ,均分别显著高于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。8周时,靶向结合bFGF/胶原膜组新生血管数目为 4.17 ± 1.28 ,各组新生血管数目差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 靶向结合bFGF/胶原膜有较好的促创面愈合期血管新生作用,加速创面愈合。

【关键词】 碱性成纤维细胞生长因子; 胶原膜; 软组织缺损; 血管化; 新生血管; 靶向

【中图分类号】 R783.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)07-0440-05

【引用著录格式】 刘双喜,徐淑兰,王彬婷,等.碱性成纤维细胞生长因子复合胶原膜对大鼠硬腭软组织缺损区血管化的影响[J].口腔疾病防治,2018,26(7):440-444.

Effects of basic fibroblast growth factor combined with a collagen membrane on soft tissue defects vascularization in the hard palates of rats LIU Shuangxi¹, XU Shulan², WANG Binping¹, CHEN Zhuogeng¹. 1. Department of Implantation, Affiliated Haikou Hospital of Central South University Xiangya School, Stomatology Center of Hainan Province, Haikou 570208, China; 2. Implantation Center, Stomatological Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

【Abstract】 Objective To study the vascularization of the collagen-binding basic fibroblast growth factor (bFGF)-loaded collagen membranes in soft tissue repair in the hard palates of rats. **Methods** Ninety-six male 6-week-old Wistar rats were randomly divided into 4 groups, and 3-mm-diameter circular soft tissue defects were produced from the distal surface of the third molar to the mesial surface of the first molar in their hard palates. The defects were covered with a collagen-targeting bFGF/collagen membrane, a free bFGF/collagen membrane, a collagen membrane or no membrane (control group). Every 6th rat was randomly sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks in every group after surgery. Wound healing and the number of new blood vessels were measured by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** The numbers of new blood vessels in the collagen-targeting bFGF/collagen membrane group were 8.94 ± 0.61 , 17.39 ± 2.08 and 11.22 ± 1.66 at 1, 2 and 4 weeks after surgery, respectively, which were significantly greater than the values in the other groups ($P < 0.05$). At 8 weeks, the number of new blood vessels in the collagen-targeting bFGF/collagen membrane group was 4.17 ± 1.28 , and there was no significant difference in the numbers of new blood vessels between any of the

【收稿日期】 2017-10-18; **【修回日期】** 2018-06-09

【基金项目】 海南省自然科学基金项目(20168313);广东省科技计划项目(20140212)

【作者简介】 刘双喜,主治医师,硕士,Email:xi.er0806@163.com

【通信作者】 徐淑兰,主任医师,硕士,Email:xushulan@vip.163.com

groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Collagen-targeting bFGF/collagen membranes had a favorable effect on promoting angiogenesis during wound healing, and promoted wound healing.

【Key words】 Basic fibroblast growth factor; Collagen membrane; Soft tissue defect; Vascularization; Angiogenesis; Target

近年来,胶原膜被广泛应用于口腔黏膜缺损、牙龈缺损以及牙龈萎缩等情况的修复^[1-2]。在组织修复过程中,血管新生是极其重要的^[3]。有学者发现,多数生长因子对新生血管的形成皆有促进作用^[4]。其中,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是其中十分重要的调节因子之一^[5-6]。许多研究证实bFGF具有促进骨组织生长、韧带愈合以及促进骨-肌腱愈合等作用。但有关bFGF靶向结合胶原膜是否能促进硬腭软组织缺损修复时的新生血管形成报道少见,本研究采用胶原膜结合碱性成纤维细胞生长因子修复大鼠硬腭软组织的缺损,观察创面的愈合及新生血管化情况,为其应用于临床修复软组织缺损提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

96只6周龄雄性SPF级Wistar大鼠,体质量160~220g,购于中山大学实验动物中心,动物质量合格证号:SCXK(粤)2009-0011。

1.2 主要试剂和仪器

bFGF和胶原膜购于烟台正海生物技术有限公司,bFGF和胶原膜复合材料由中国科学院遗传与发育生物学研究所自主开发完成^[7],苏木精染色剂和伊红染色剂(广州秀威生物有限公司),光学显微镜(Olympus cx21型,日本)。

1.3 植入材料制备

①胶原膜:天然I型和III型胶原蛋白(牛源化)为主要成分的脱细胞真皮基质。膜的规格:长×宽×厚为5mm×7mm×1mm。

②靶向结合bFGF/胶原膜的制备:首先将bFGF应用基因工程的方式使其N端与胶原结合结构域(collagen binding domain, CBD)相连接,获得融合蛋白,再将10μg融合蛋白滴加均匀于胶原膜上,融合蛋白与胶原膜接触时,其胶原结合区域与胶原结合,bFGF被锚定于胶原膜上而不能发生自由扩散,随后冷冻干燥,最终获得靶向结合bFGF/胶原膜复

合材料,使得该材料具有靶向和缓释给药等功能。

③游离结合bFGF/胶原膜:直接将10μg的bFGF均匀滴加于胶原膜上,随后冷冻干燥而获得。

1.4 动物实验

10%的水合氯醛以0.3mL/100g的剂量以腹腔注射的方式麻醉Wistar大鼠,在大鼠硬腭第三磨牙远中到第一磨牙近中建立直径为3mm的硬腭软组织缺损动物模型,随机分成4组,分别在4组大鼠的硬腭软组织缺损中植入靶向结合bFGF/胶原膜(靶向结合bFGF/胶原膜组)、游离结合bFGF/胶原膜(游离结合bFGF/胶原膜组)、胶原膜(胶原膜组)、不植入胶原膜(空白对照组);缝线固定胶原膜。术后将所有大鼠分笼饲养,连续3d肌注5万单位的青霉素G。

1.5 标本制备

手术后1、2、4、8周时,于各组中分别随机抽取6只Wistar大鼠处死。将大鼠的上颌骨切下来后取其硬腭,观察创面愈合情况。在4%多聚甲醛中固定24~72h。随后4~6周用10%EDTA液进行脱钙处理,继而梯度酒精进行脱水处理,最后用石蜡包埋。

从每个标本的矢状面的中央切开后,从中央到两边切厚度为3μm的组织连续切片,经过HE染色后置于光镜下观察切片的情况。

1.6 组织切片观察新生血管情况

在10×40的高倍光学显微镜下观察HE染色后的切片,随机选3个视野进行新生血管的数目计数,新生血管计数的标准是^[8]:只有血管形态完整且在光镜下能看到管腔内有红细胞及管壁有内皮细胞才认定为血管,否则不予计数。将3个视野的血管计数后求其均数。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0软件分析数据,计量资料应用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点各处理组采用单因素方差分析进行比较,若计量资料为非正态分布,采用秩和检验。进一步两两比较采用LSD检验,检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大体观察

手术创面未出现感染现象,一期愈合无排斥反应,动物存活率为100%。

手术后1周时,部分大鼠的缝合区域有缝线脱落现象,无异常渗出的情况发生。4组创面均未完

全愈合,创面边缘稍红肿,无明显渗出液。

2周时,4组创面基本愈合,靶向结合bFGF/胶原膜组完全愈合,游离结合bFGF/胶原膜组与胶原膜组偶见小面积创面未愈合,空白对照组偶有小面积未愈合(图1)。

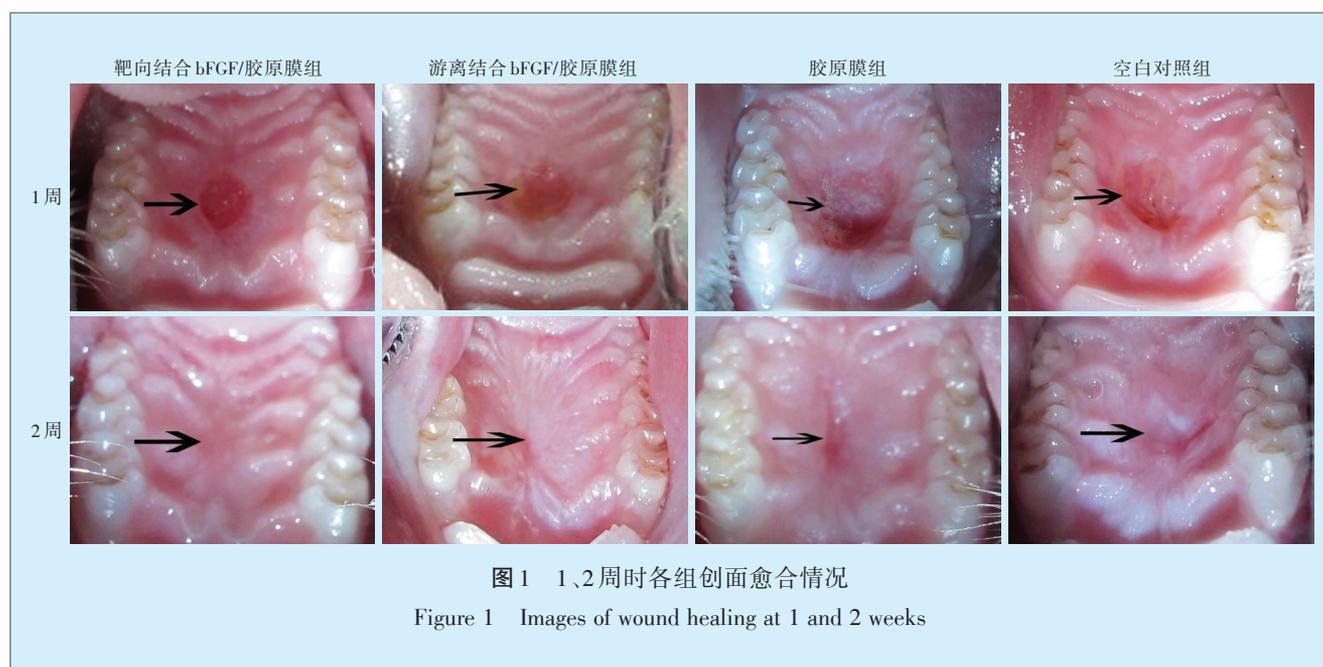


图1 1、2周时各组创面愈合情况

Figure 1 Images of wound healing at 1 and 2 weeks

2.2 HE染色结果

1周时,胶原膜未完全被降解,各组有不同程度的新生组织形成,但结构皆较为紊乱,均无成型上皮层形成。靶向结合bFGF/胶原膜组和游离结合bFGF/胶原膜组,均见大量的炎症细胞浸润,有大量的新生血管生成,血管扩张充血,可见间质水肿;胶原膜组也可见较多的炎症细胞,但新生的血管数量稍少,间质水肿明显;空白对照组的炎症细胞较多而新生血管数目少,间质水肿明显。

2周时,靶向结合bFGF/胶原膜组可仍见数量较多的扩张血管,排列较欠整齐,间质水肿较之前明显减少,可见较多的排列紊乱的新生胶原纤维,炎症细胞数量开始减少;在游离结合bFGF/胶原膜组和胶原膜组中也可观察到较多的扩张的新生血管,但明显少于靶向结合bFGF/胶原膜组,且排列稍紊乱,而空白对照组中新生血管数量最少,且炎症细胞数量仍较多,新生胶原纤维最少。

4周时,游离结合bFGF/胶原膜组、胶原膜组、空白对照组炎性细胞和新生血管减少,且可见一

定数量胶原纤维,但排列较紊乱。靶向结合bFGF/胶原膜组新生胶原纤维最多,且各结构排列较为整齐、紧密,新生血管数量与2周比明显减少。游离结合bFGF/胶原膜组和胶原膜组中新生血管数量相当,与2周相比有所减少,但少于靶向结合bFGF/胶原膜组,空白对照组新生血管数量最少。

8周时,靶向结合bFGF/胶原膜组的腭部软组织基本改建完成,游离结合bFGF/胶原膜组、胶原膜组组织排列稍欠整齐,空白对照组组织结构排列紊乱。

1周、2周、4周、8周各组新生血管计数见表1。方差分析结果显示:在第1、2、4周时,靶向结合bFGF/胶原膜组、游离结合bFGF/胶原膜组和胶原膜组分别与空白对照组比较,均具有显著性差异($P < 0.01$);靶向结合bFGF/胶原膜组与空白对照组比较,具有显著性差异($P < 0.01$);游离结合bFGF/胶原膜组与空白对照组比较,1周时,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而2周和4周时差异无统计学意义($P > 0.05$);在8周时,各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 各组术后各时间段新生血管数目
Table 1 Number of new blood vessels in each group at 1, 2, 4 and 8 weeks $n = 96, \bar{x} \pm s$

组别	术后时间			
	1周	2周	4周	8周
靶向结合bFGF/胶原膜组	8.94 ± 0.61 ¹⁾²⁾	17.39 ± 2.08 ¹⁾²⁾	11.22 ± 1.66 ¹⁾²⁾	4.17 ± 1.28
游离结合bFGF/胶原膜组	6.67 ± 1.01 ¹⁾³⁾	10.56 ± 1.31 ¹⁾	5.06 ± 0.71 ¹⁾	3.72 ± 1.00
胶原膜组	5.78 ± 0.40 ¹⁾	9.11 ± 1.67 ¹⁾	5.39 ± 1.02 ¹⁾	3.83 ± 1.09
空白对照组	4.33 ± 0.73	6.39 ± 0.74	4.56 ± 0.27	3.56 ± 0.78

注 术后1周、2周、4周、8周时靶向结合bFGF/胶原膜组、游离结合bFGF/胶原膜组和胶原膜组分别与空白对照组比较,1)为 $P < 0.01$;术后1周、2周、4周、8周时靶向结合bFGF/胶原膜组、游离结合bFGF/胶原膜组分别与胶原膜组比较,2)为 $P < 0.01$,3)为 $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 bFGF和胶原膜对软组织的修复作用

bFGF是一种碱性多肽,是FGFs家族中的一员,因其能促进成纤维细胞的分裂、增殖而命名^[9]。bFGF的细胞增殖效应^[10]主要表现在能促进中胚层与神经外胚层来源细胞分裂、分化,特别是能促进血管内皮细胞有丝分裂,从而介导新生血管形成^[11],具有促进血管形成的作用^[12]。缓释细胞生长因子使其局部浓度达到有效浓度,同时使有效浓度维持相对较长时间,以达到较好的促进效果是目前的研究热点。

胶原膜因具有良好的生物学性能而被广泛地用于颌面部组织的缺损修复。研究发现胶原膜可结合多种生长因子,形成生长因子缓慢释放系统,其中包括bFGF的结合,使得其在修复部位缓慢释放^[13]。本实验通过基因工程的方法使bFGF的N端连接一段序列为TKKTLRT的7肽,使之形成具有CBD的融合蛋白,将其置于胶原膜上时,其能与胶原靶向结合,形成靶向结合bFGF/胶原膜。这样可使得bFGF的自由扩散被限制,从而只在材料原位发挥效果。

目前的研究中,bFGF的应用剂量相差较大,从5 μg到400 μg不等。Liu等^[14]采用2 μg、10 μg、20 μg等不同浓度的bFGF修复大鼠全层皮肤缺损,结果显示新生血管与bFGF剂量不完全呈正相关,且发现2 μg和10 μg可能是最佳的剂量。但也有学者认为bFGF促进血管新生与剂量呈正相关,Doi等^[15]制备兔右肢股骨动脉损伤模型,分别对其应用不同剂量的bFGF,结果发现随着bFGF剂量的增加,兔股骨动脉损伤导致的右肢缺血影响逐渐减小,同时也发现该部位血管数量、密度以及组织灌注量与bFGF的浓度呈正相关。高剂量bFGF的使用,会产生不良反应,如肾脏毒性、血小板减少症

等^[16]。本研究参考以往文献中bFGF的使用量,选择每张胶原膜上结合10 μg bFGF,进行实验以验证靶向结合bFGF/胶原膜、游离结合bFGF/胶原膜和单纯胶原膜修复大鼠腭部软组织缺损是否存在差异,结果表明,在各个时间段,新生血管的数目最多的均是靶向结合bFGF/胶原膜组,其新生血管的数目在1周到8周的时间段是呈现先增后减的趋势,其中2周时新生血管数目最多,且出现了大面积的血管化的现象。

3.2 bFGF和胶原膜联合应用的修复效果

游离结合bFGF/胶原膜组中的bFGF仅仅依靠物理吸附作用存在于胶原膜上,由于胶原膜内部结构是一种疏松多孔结构,其一面光滑致密面,另一面则疏松多孔,因此其能通过物理学的方式吸附游离态的bFGF,但两者并未发生特异性结合,当游离结合bFGF/胶原膜覆盖创面进行修复时,胶原膜周围充满血液,而bFGF则通过血液在创面局部快速扩散,使得局部bFGF的浓度在短时间内偏高,但持续时间过短,而不能完全发挥其效应。尽管比胶原膜组中的新生血管稍多,但仍未达到令人满意的加速创面愈合的疗效。

本研究结果初步表明,靶向结合bFGF的胶原膜是软组织缺损中比较理想的修复材料,它不仅发挥胶原膜的支架作用,同时也能发挥bFGF的促血管生成作用。

参考文献

- Stratton S, Shelke NB, Hoshino K, et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering[J]. *Bioact Mater*, 2016, 1(2): 93-108.
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Buser D, et al. Combination of collagen barrier membrane with enamel matrix derivative-liquid improves osteoblast adhesion and differentiation[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2017, 32(1): 196-203.
- Ciarlillo D, Celeste C, Carmeliet P, et al. A hypoxia response ele-

- ment in the VEGFA promoter is required for basal VEGFA expression in skin and for optimal granulation tissue formation during wound healing in mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180586.
- [4] Sawada N, Arany Z. Metabolic regulation of angiogenesis in diabetes and aging[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(4): 290-307.
- [5] Moore JB, Zhao J, Fischer AG, et al. Histone deacetylase 1 depletion activates human cardiac mesenchymal stromal cell proangiogenic paracrine signaling through a mechanism requiring enhanced basic fibroblast growth factor synthesis and secretion[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(7): e006183.
- [6] Chang YC, Chang MC, Chen YJ, et al. Basic fibroblast growth factor regulates gene and protein expression related to proliferation, differentiation, and matrix production of human dental pulp cells [J]. *J Endod*, 2017, 43(6): 936-942.
- [7] Zhao W, Chen B, Li X, et al. Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 82(3): 630-636.
- [8] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 9-19.
- [9] Onuma Y, Higuchi K, Aiki Y, et al. A stable chimeric fibroblast growth factor (FGF) can successfully replace basic FGF in human pluripotent stem cell culture[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0118931.
- [10] Wu Q, Fang T, Lang H, et al. Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells and their effects on endothelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(4): 918-926.
- [11] Wang J, Qin B, Chen X, et al. Ultrasound molecular imaging of angiogenesis using vascular endothelial growth factor-conjugated microbubbles[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(3): 781-790.
- [12] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors[J]. *Science*, 1987, 235(4787): 442-447.
- [13] Qu Y, Cao C, Wu Q, et al. The dual delivery of KGF and bFGF by collagen membrane to promote skin wound healing[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(6): 1508-1518.
- [14] Liu Y, Cai S, Shu XZ, et al. Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15(2): 245-251.
- [15] Doi K, Ikeda T, Marui A, et al. Enhanced angiogenesis by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor in rabbit model of hind limb ischemia[J]. *Heart Vessels*, 2007, 22(2): 104-108.
- [16] Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, et al. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(3): 532-542.

(编辑 张琳, 曾曙光)

· 短讯 ·

《口腔疾病防治》杂志征稿及征订启事

《口腔疾病防治》是由南方医科大学口腔医院(广东省口腔医院)、广东省牙病防治指导中心主办,中南大学、郑州大学、南昌大学、重庆医科大学、福建医科大学等五所大学口腔医学院协办,月刊,CN 44-1724/R,ISSN 2096-1456,CODEN KJFOA4。主要报道国内外口腔医学研究新进展和口腔疾病防治新成果、新技术、新经验,服务口腔疾病预防治疗领域学术交流和口腔疾病防控工作。

本刊图随文走、全铜版纸彩色印刷,设有专家论坛、专家述评、专栏论著、基础研究、临床研究、防治实践、病例报告、综述等栏目。其中含有省级以上基金优秀论文录用后可3个月内快速发表。

本刊官网及投稿网址为 <http://www.kqjbfz.com>,本刊不收取审稿费,从2018年起对新投稿件录用后实行免费快速发表并支付稿酬。本刊没有授权或委托任何其他网站受理作者投稿,谨防诈骗。欢迎广大读者订阅。全国各地邮局均可订阅,邮发代号46-225。每月20日出版,定价为每册5.00元,全年60元。如错过邮局订阅时间,可直接向编辑部订购。请将款项汇入开户银行:广州市建行昌岗路支行,账号:44001430402050202779,户名:南方医科大学口腔医院,并且将订阅者的邮政编码、详细地址、姓名、订阅年度、份数及汇款回执扫描件发送至本刊邮箱(kqjbfz@126.com)。编辑部电话:020-84403311,传真:020-84445386,Email:kqjbfz@126.com。