

碱性成纤维细胞生长因子在实验性硬脑膜重建中的应用

周 峰, 石忠松, 夏之柏, 黄正松

(中山大学附属第一医院神经外科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在实验性自体筋膜硬脑膜重建中的应用价值。【方法】取 SD 大鼠 35 只, 分成 5 组。其中 A 组 3 只, 直接将背部筋膜覆盖在硬膜外, B 组 5 只, 采用自体筋膜硬脑膜重建模型, 通过免疫组织化学方法观察这两组大鼠自体筋膜硬脑膜移植的愈合过程及细胞因子 bFGF 在其中的表达; C 组、D 组、E 组各 9 只, 分别进行自体筋膜硬脑膜重建, D 组加用外源性 bFGF, E 组仅用明胶海绵, 通过脑脊液漏研究、免疫组织化学方法研究外源性 bFGF 对自体筋膜重建硬脑膜愈合过程的影响并用 RT-PCR 方法研究内源性 bFGF mRNA 的表达情况。【结果】大鼠自体筋膜移植硬脑膜部位 bFGF 表达明显; C、D、E 组大鼠重建硬脑膜抵抗脑脊液漏压力值 (mmH₂O) 分别为 311 ± 75 , 497 ± 153 , 338 ± 88 , I 型胶原纤维表达值分别为 4.9 ± 0.8 , 10.9 ± 1.6 , 5.3 ± 0.9 , D 组均好于对照组 ($P < 0.05$); 内源性 bFGF mRNA 的表达没有明显变化。【结论】在自体筋膜移植硬脑膜的愈合过程中 bFGF 可能起了重要的作用; 外源性 bFGF 处理的大鼠其移植筋膜愈合要好于对照组。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子; 硬脑膜重建; 疾病模型, 动物; 大鼠

中图分类号: R65

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)06-0512-04

Application of Basic Fibroblast Growth Factor on Experimental Dural Reconstruction

ZHOU Feng, SHI Zhong-song, XIA Zhi-bo, HUANG Zheng-song

(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the experimental dural reconstruction achieved by a free fascial graft. 【Methods】A total of 35 SD rats were divided into 5 groups. In Group A ($n = 3$), a piece of fascia was put outside the intact dura mater. The dural reconstruction models were created in Group B ($n = 5$). The healing process and the effect of bFGF were studied by immunohistochemical method. In Group C, D, and E, (each $n = 9$) dural reconstruction models were made and exogenous bFGF was administered in group D but only gelfoam was given in group E. The effect of exogenous bFGF was studied by cerebrospinal fluid (CSF) leak experiment and immunohistochemical method. The expression of endogenous bFGF was studied by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). 【Results】The reconstructed dura was immunohistochemically stained with antibodies against bFGF. The pressure against CSF leak in group C, D, and E were 311 ± 75 , 497 ± 153 , and 338 ± 88 , respectively. The expression values of type-1 collagen fiber were 4.9 ± 0.8 , 10.9 ± 1.6 , and 5.3 ± 0.9 , respectively. There was statistical difference between group D and the other two groups ($P < 0.05$). There was no difference among the three groups in the expression of bFGF mRNA. 【Conclusions】bFGF may play an important role in the healing process of free fascial graft after reconstruction and exogenous bFGF could promote the process.

收稿日期: 2004-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300115)

作者简介: 周 峰 (1973 -), 男, 山东枣庄人, 博士生, 医师. E-mail: zhoufengd@hotmail.com

Key words: basic fibroblast growth factor; dural reconstruction; disease model; animal; rats

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(6): 512 - 515]

颅底重建是决定颅底手术成功的关键之一,自身的肌肉筋膜仍然是最为广泛接受的硬膜修补方式^[1],但自身肌肉筋膜硬脑膜重建修复术后,脑脊液漏、皮下积液及脑膜膨出的发生率仍然较高,如何提高重建成功率,依旧是临床的难题^[2]。I型胶原纤维是构成深筋膜细胞外基质的主要成分,其含量与组织的修复过程密切相关,含量增加意味着纤维化程度的增加及胶原组织强度的增加^[3]。近年来国外有学者在体外和体内实验中分别发现碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对于硬脑膜的愈合过程非常重要^[4,5],但还没有直接应用外源性bFGF来促进硬脑膜重建的研究报告。硫酸铝作为bFGF的稳定剂和载体,可以保护其不被降解从而增加并延长其生物学活性^[6]。本研究拟采用SD大鼠动物模型,观察自体筋膜硬脑膜移植的愈合过程及bFGF在其中的作用,并探讨外源性bFGF对自体筋膜重建硬脑膜愈合过程的影响。

1 材料与方法

1.1 自体筋膜硬脑膜重建动物模型的制作

参照Tachibana^[4]的方法,质量300~400g雄性SD大鼠(中山大学医学院实验动物中心提供),50~60mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。右顶部冠状缝和人字缝之间做9mm×6mm颅骨钻孔,剪除7mm×4mm硬膜,注意不要损伤脑表面。从该动物背部取一块8mm×5mm大小的游离深筋膜覆盖在硬膜缺损部位的表面,然后缝合伤口。1周后腹腔内大量注射戊巴比妥钠处死动物,小心分离移植的筋膜,作为标本。

1.2 实验动物分组

A组3只大鼠,开颅后不剪硬膜,直接取背部筋膜覆盖在硬膜外,B组5只大鼠,按以上方法进行自体筋膜硬脑膜重建,1周后处死动物取标本,100mL/L甲醛溶液固定,石蜡切片,分别进行bFGF、表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)、转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)的免疫组织化学检测及HE染色。C组9只大鼠,自体筋膜硬脑膜重建后1周处死,其中6只先进行脑脊液漏的研究,然后取标本,石蜡切片,进行I型胶原纤维的免疫组化分析;其余3只大鼠取标本放入液

氮中冻存,做RT-PCR研究。D组9只大鼠,自体筋膜硬脑膜重建后,在游离筋膜外表面覆盖浸泡了外源性bFGF(20AU)(重组牛bFGF)和100 μ g/mL的硫酸铝溶液共0.5mL的明胶海绵,明胶海绵的大小为8mm×5mm。1周后处死,其余同C组处理。E组9只大鼠,按以上方法行自体筋膜硬脑膜重建后,在游离筋膜外表面仅覆盖浸泡了硫酸铝溶液的明胶海绵。其余同C组。

1.3 移植后局部细胞因子表达的免疫组化(SABC法)研究

将A组、B组标本按说明书进行免疫组化研究,一抗及SABC试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司,bFGF、TGF- β_1 按1:100,EGF按1:200稀释。

1.4 脑脊液漏的研究

将C、D、E3组大鼠处死后评定移植的硬膜抗脑脊液漏的强度^[4]。在左侧顶骨部位钻小孔,打开硬膜,插入吸引器吸除脑组织,然后通过骨腊固定1个带三通接头的灌注管(大号注射针头)在小孔处,另外两个接口1个接测压计,1个接输液泵。通过输液泵以持续均匀压力向脑内灌注含美兰的生理盐水(灌注速度300mL/h),直至硬膜移植处渗漏出蓝色液体,此时压力计所显示的压力(mmH₂O)即为所要的数值。

1.5 胶原纤维的免疫组织化学分析

将1.4步骤所得石蜡标本,进行I型胶原的免疫组织化学染色。步骤同1.3。

1.6 RT-PCR技术检测移植筋膜内bFGF mRNA的表达情况

将C、D、E组保存在液氮中的标本,用EZNA总RNA提取试剂盒(Omega Bio-tek公司)提取总RNA,紫外分光光度计检测其纯度和浓度。取总RNA 1.0 μ g,以RevertAid第一链cDNA合成试剂盒(MBI Fermentas公司)进行逆转录反应。参照文献^[7]大鼠bFGF cDNA的引物为:上游5' AACGGC GGCTTCTCCTG3',下游5' AGCAGACATTGGAA GAAACA3',扩增片段长度354bp;内参照为大鼠 β -actin:上游5' ATTGTAACC AACTGGGACG3',下游5' TCTCCAGGGAGG AAGAGG3',扩增片段长度490bp(上海博亚生物技术有限公司合成)。PCR条件:初变性94 $^{\circ}$ C,2min;变性94 $^{\circ}$ C,60s;退火55 $^{\circ}$ C,60

s;延伸 72 °C,60 s;最后 72 °C,7 min,共 30 个循环。扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶(含 5 g/L 溴化乙锭)中电泳。

1.7 图象分析

采用 Kontron IBAS 2.5 全自动图象分析系统,显微镜下(10×20)随机选取 5 个视野,观测 I 型胶原免疫组织化学阳性反应产物灰度级(G_a)和面积($n, \mu\text{m}^2$)。测试区域的灰度级(G_A)和背景面积(m)。测试仪器的最大灰度分级(G_{max})为 256。并应用定量计算公式: $\text{PU} = |G_a - G_A| / (m + n) \times 100 / (G_{\text{max}} \times (1 - n))$,得出阳性单位(PU)。

对 RT-PCR 后琼脂糖凝胶电泳结果用 Gel Doc 2000 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司产品,Quantity One 分析软件)分析各组大鼠其 bFGF 条带和内参照 β -actin 条带的整合光密度比值即代表各组 bFGF mRNA 的相对表达量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行统计学处理,所有计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素设计资料的方差分析,两两比较采用 S-N-K 法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

各组自体筋膜移植大鼠筋膜内表面和脑组织之间均没有形成明显的粘连。

2.2 大鼠 bFGF、EGF、TGF- β_1 免疫组化结果

B 组 5 只大鼠均出现 bFGF 染色阳性结果(图 1),尤以移植筋膜表面及边缘部为明显。而 EGF、TGF- β_1 均染色阴性。A 组仅仅将筋膜放置在硬膜外,而没有损伤硬脑膜,其每个大鼠的移植筋膜各个因子的免疫组化结果均为阴性(图 2)。

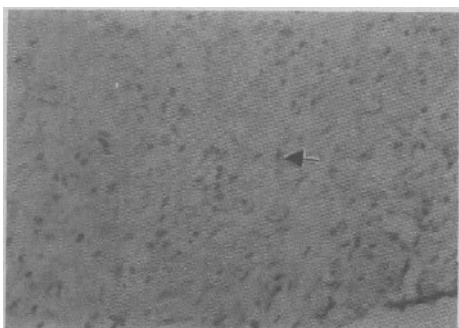


图 1 B 组大鼠移植筋膜 bFGF 免疫组化图

Fig. 1 Immunohistochemistry revealed the fascia of group B was immunoreactive for bFGF (200×)

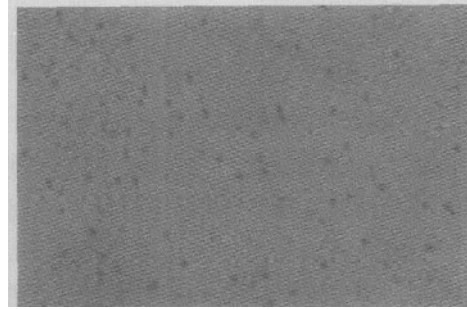


图 2 A 组大鼠移植筋膜 bFGF 免疫组化图

Fig. 2 Immunohistochemistry revealed the fascia of group B was immunonegative for bFGF (200×)

2.3 脑脊液漏的研究结果

C、D、E 各组大鼠测定的数值分别为 311 ± 75 , 497 ± 153 , 338 ± 88 , 各组间有统计学差异($F = 4.962$),D 组大鼠脑脊液漏压力值同 C 组、E 组比较有显著差异($P < 0.05$);E 组大鼠脑脊液漏压力值同 C 组比较没有统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 大鼠 I 型胶原纤维免疫组化结果

C、D、E 组大鼠的胶原纤维免疫组化 PU 值分别为 4.9 ± 0.8 , 10.9 ± 1.6 , 5.3 ± 0.9 。各组间有统计学差异($F = 16.123$),D 组与其它各组比较, $P < 0.05$ (图 3 A)。

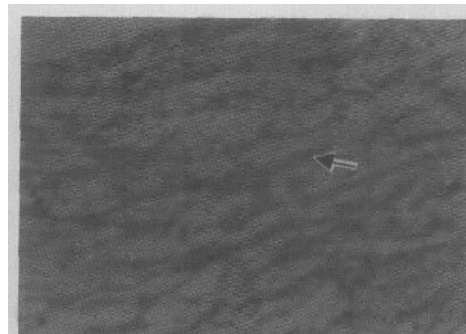


图 3 D 组大鼠移植筋膜 I 型胶原纤维免疫组化图

Fig. 3 The immunohistochemical staining of the fascia of group D for type I collagen fiber (200×)

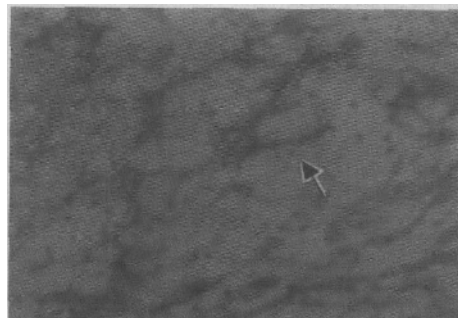


图 4 C 组大鼠移植筋膜 I 型胶原纤维免疫组化图

Fig. 4 The immunohistochemical staining of the fascia of group C for type I collagen fiber (200×)

2.5 RT-PCR 结果

C、D、E 各组 bFGF mRNA 表达无明显差异 (图 5)。

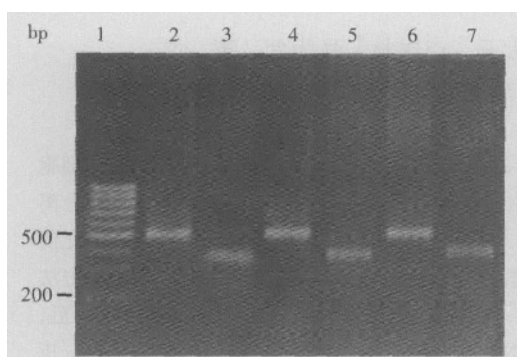


图 5 各组大鼠 bFGF 及 β -actin mRNA 表达的 RT-PCR 图

Fig. 5 The RT-PCR of bFGF and β -actin mRNA

Lane 1: DNA Marker; Lane 2, 4, 6: C, D, E β -actin; Lane 3, 5, 7: C, D, E bFGF

3 讨论

3.1 BFGF 与硬脑膜重建

颅底重建是决定颅底手术成功的关键之一。而硬脑膜的修复是重建的最基础一环, 不充分的硬膜封闭是许多 CSF 漏的直接原因^[2]。自身的肌肉筋膜仍然是最为广泛接受的硬膜修补方式^[1], 但自身肌肉筋膜修复后, 术后脑脊液漏、皮下积液及脑膜膨出的发生率仍然较高。成纤维细胞是创伤修复过程中最主要的功能细胞, 它的生物学行为是伤口愈合、愈合质量的基础与关键^[8, 9], 多种生长因子象 bFGF、EGF、TGF- β_1 都可以调控成纤维细胞的生物学行为, 而 bFGF 又是其中最受重视的一个因子。硬膜的愈合过程是硬膜创伤的边缘及相邻组织所诱导的成纤维细胞分裂增殖及结缔组织纤维形成的结果^[10]。Schick 等^[5]在硬脑膜体外培养中发现 bFGF 能够促进硬脑膜中成纤维细胞的增殖, 加速硬脑膜的愈合过程。Tachibana 等^[4]在硬脑膜重建的动物模型中同样发现局部有 bFGF 表达的增强。在此基础上本研究首先通过免疫组化方法检测了自体移植游离筋膜重建硬脑膜的愈合过程中细胞因子的表达情况。B 组大鼠移植筋膜中均出现了 bFGF 抗体的阳性染色, 且主要出现在筋膜的边缘和表面部位, 而另外两个在创伤愈合中同样受人瞩目的细胞因子 EGF、TGF- β_1 均表达阴性; A 组在硬膜完好情况下的筋膜移植也没有表现出这 3 种抗体的阳性染色。据此可以推断在自体筋膜移植硬膜的愈合过程中, bFGF 可能起了重要的作用; 而其来源则可能是硬膜损伤对其周围组织的刺激或者来源于脑脊液。

3.2 外源性 bFGF 的应用

外源性 bFGF 在体内的半衰期很短, 约 10 h, 故其应用受到了限制。硫酸铝分子结构上的双糖结构使之能与 bFGF 结合, 保护其不被降解, 增加并延长其生物学活性, 减少其用量。国内外已有不少成功应用硫酸铝结合 bFGF 的研究报告^[6]。在此基础上本文首次尝试应用外源性细胞因子 bFGF 来处理自体移植筋膜重建硬脑膜, 并分别从不同的角度比较了 C、D、E 3 组大鼠的愈合情况, 结果显示外源性 bFGF 处理的大鼠其移植筋膜愈合要好于对照组。术后早期移植筋膜胶原纤维结缔组织的形成, 不仅可以增加其强度而且有可能促进硬膜和其邻近骨、软组织的粘着有利于防止脑脊液漏的发生及皮下积液的发生率^[1]。而且本实验通过 RT-PCR 技术检测了局部 bFGF mRNA 的相对含量, 发现应用外源性 bFGF 组大鼠的局部 bFGF mRNA 表达同其它各组无明显差别, 故推测在此过程中主要是外源性 bFGF 在发挥作用, 内源性 bFGF 没有起主要作用。本实验为硬脑膜重建提供了新的思路, 可能会有助于提高重建成功率。

参考文献:

- [1] Mello L R, Feltrin L T, Fontes P T, *et al.* Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study [J]. *J Neurosurg*, 1997, 86(1): 143-50.
- [2] Nguyen T T, Delashaw J B. Complications of skull base surgery[J]. *Clin Plast Surg*, 1995, 22(3): 573-80.
- [3] 王海强, 黄耀添, 赵黎. 张应力对深筋膜 I、III 型胶原影响的实验研究[J]. *中国临床康复*, 2002, 6(2): 208-12.
- [4] Tachibana E, Saito K, Yoshida J. Evaluation of the healing process after dural reconstruction achieved using a free fascial graft[J]. *J Neurosurg*, 2002, 96(2): 280-6.
- [5] Schick B, Wolf G, Romeike B F, *et al.* Dural cell culture. A new approach to study duraplasty[J]. *Cell Tissues Organs*, 2003, 173(3): 129-37.
- [6] Duffy F J Jr, Maitz P K, Hergueter C A, *et al.* Maximizing flap survival in a prefabrication model using exogenous and endogenous FGF: a new approach[J]. *Microsurgery*, 1996, 17(4): 176-9.
- [7] Rashid M A, Akita S, Razzzque M S, *et al.* Coadministration of basic fibroblast growth factor and sucrose octasulfate facilitates the rat dorsal flap survival and viability[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 103(3): 941-8.
- [8] Ono I. Roles of cytokines in wound healing processes[J]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 1999, 100(9): 522-8.
- [9] Motohashi O, Suzuki M, Yanai N, *et al.* Thrombin and TGF- β promote human leptomeningeal cell proliferation *in vitro*[J]. *Neurosci Lett*, 1995, 190(2): 105-8.

(编辑 刘清海)