

引文格式:王甜,张金嵩. 异体脱细胞真皮基质后巩膜加固术后组织相容性及bFGF表达的变化[J]. 眼科新进展, 2015, 35(10): 921-923. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2015. 0251

【实验研究】

异体脱细胞真皮基质后巩膜加固术后组织相容性及 bFGF 表达的变化

王甜 张金嵩

Histocompatibility and expression of bFGF after posterior scleral reinforcement by using allogeneic acellular dermal matrix in rabbits
WANG Tian, ZHANG Jin-Song

【Key words】 acellular allogeneic dermal; posterior scleral reinforcement; histocompatibility; basic fibroblast growth factor

【Abstract】 Objective To observe the histocompatibility and changes of bFGF after posterior scleral reinforcement by using allogeneic acellular dermal matrix in rabbits. **Methods** Eighteen rabbits were randomly divided into 3 groups: postoperative 1 month group, postoperative 2 months group, postoperative 3 months group, 6 rabbits in each group. The left eyes of 18 rabbits were set as the experimental groups, which were operated the posterior scleral reinforcement surgery by using the allogeneic acellular dermal, and the right eyes were set as control group, which were operated the same operation as the experimental group without the allogeneic acellular dermal. The two eyeballs of each rabbit were enucleated, the histological pathological changes were observed by HE staining, and the expressions of bFGF in scleral were evaluated by immunohistochemical staining. **Results** In the postoperative 3 months group, the boundary of acellular dermal strip were more vague than postoperative 1 month and 2 months groups, the surface had some dense fibrous connective tissue membrane. However, in the corresponding region of control group, the sclera and fascia were closely connected without congestive reaction. In the postoperative 1 month and 2 months groups, the sclera were not destructed. And in the sclera collagen fiber, some inflammatory cells were infiltrated. However, in the corresponding region of control group, the inflammatory cells were few. In the postoperative 3 months group, receptor sclera collagen were still not damaged, and the fusion zone of the reinforcement strip and receptor sclera had obvious hyperplasia of connective tissue. And in the corresponding region of control group, the inflammatory cells were few. At the postoperative 1 month, 2 months and 3 months, the expression of bFGF in the reinforced area were higher than that in the corresponding area of control eyes, the differences were statistically significant ($t = 2.598, 1.989, 5.092; P = 0.027, 0.048, 0.001$). **Conclusion** In the posterior sclera reinforcement applications, allogeneic acellular dermal matrix has good biocompatibility. The increased expression of bFGF may be associated with allograft acellular dermal matrix reinforcement effect on the rabbit scleral.

【关键词】 异体脱细胞真皮; 后巩膜加固术; 组织相容性; 碱性成纤维细胞生长因子

【摘要】 目的 观察异体脱细胞真皮基质后巩膜加固术后不同时期的组织相容性、巩膜碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达的变化。**方法** 18只日本大耳白兔随机分为术后1个月、2个月、3个月组, 每组6只, 左眼为实验眼, 行异体脱细胞真皮后巩膜加固术, 右眼为自身对照眼, 行与实验组相同手术操作但不放置加固材料。大体观察实验眼与对照眼标本情况, HE染色病理切片观察其组织形态学变化, 免疫组织化学法观察实验眼加固区巩膜与对照眼相应区巩膜bFGF的表达。**结果** 术后1个月、2个月实验眼受体巩膜无溶解破坏, 巩膜胶原纤维有炎症细胞浸润, 而对照眼相应区域巩膜内少量炎症细胞浸润; 术后3个月实验眼脱细胞真皮条带边界较术后1个月、2个月稍模糊, 条带表面有纤维结缔组织膜, 而对照眼相应区无充血, 筋膜与巩膜连接较紧密。术后3个月实验眼受体巩膜胶原仍无破坏, 加固条带与受体巩膜融合区结缔组织增生, 而对照眼相应区域巩膜内炎症细胞减少。术后1个月、2个月、3个月实验眼加固区巩膜bFGF的表达高于对照眼相应区域巩膜, 差异均有统计学意义($t = 2.598, 1.989, 5.092, P = 0.027, 0.048, 0.001$)。**结论** 异体脱细胞真皮基质后巩膜加固术后组织相容性较好, 巩膜bFGF的表达增加可能与异体脱细胞真皮基质的加固作用有关。

后巩膜加固术是使用加固材料加固眼球后极部巩膜薄弱部分, 特别是加固对应黄斑区的后极部巩膜的一种手术。它既不损伤眼内组织结构, 安全性又好, 是目前预防病理性近视进一步发展、保护现有视力的有效方法。后巩膜加固术的效果和预后, 与加固材料的选择有很大关系。理想的加固材料应当

具有无毒、组织相容性好,有一定的弹性和韧性,易获取或合成,易保存与消毒,价格低,术中应用方便等特点^[1]。目前俄罗斯临床医师在临床上已经采用各种各样的加固材料,其中异体脱细胞真皮基质(allogeneic acellular dermal matrix, Allo-ADM)应用最为广泛,其用于眼部组织缺损、畸形修复,并未发现移植排斥,临床效果理想^[2-7]。有研究发现,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)具有刺激巩膜成纤维细胞增生的作用^[8]。本研究应用兔后巩膜加固术模型,探讨 Allo-ADM 加固后的组织相容性以及加固区域巩膜组织 bFGF 表达的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 日本大耳白兔 18 只 36 眼(郑州大学实验动物中心提供)随机分成 3 组:术后 1 个月、2 个月、3 个月组,每组各 6 只 12 眼。左眼为后巩膜加固组(实验眼),放置 Allo-ADM 加固材料,右眼为自身对照眼,行与左眼相同手术操作但不放置加固材料。耳缘静脉空气栓塞法处死每组动物,无菌摘取双眼,去除角膜、虹膜、晶状体、玻璃体、脉络膜组织,实验眼沿加固条带剪取巩膜及附着的加固材料,对照眼剪取对应区域巩膜,置于液氮中,并于 -80 °C 冰箱内保存。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色切片观察加固区域组织相容性 取出实验眼及对照眼巩膜标本,并进行修剪后置于体积分数 10% 福尔马林溶液中固定 48 h,常规石蜡包埋切片,HE 染色后置于光镜下观察形态。

1.2.2 受体巩膜 ELISA 法检测加固区域 bFGF 的分泌水平 采用 ELISA 法进行 bFGF 检测,兔抗 bFGF 抗体购自武汉博士德公司(工作浓度为 1 : 100),按试剂盒说明书进行相关操作。结果采用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件计算 bFGF 的相对含量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对符合正态分布的计量资料采用完全随机设计的单因素方差分析,符合配对的组间资料采用配对 *t* 检验,设检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察 术后 1 个月,实验眼真皮条带平整

贴附于自体巩膜上,无溶解现象,部分与受体巩膜连接紧密,部分连接不紧密,边界清晰,可轻微推动;对照眼相应区域无异常分泌物,筋膜与巩膜的连接疏松,无明显充血、渗出。术后 2 个月,实验眼真皮条带与自体巩膜的连接较前紧密、不易推动,条带表面有纤维结缔组织膜包裹;对照眼相应区域筋膜与巩膜之间连接疏松,无充血、渗出。术后 3 个月,实验眼真皮条带边界较前稍模糊,与巩膜连接较紧密,条带表面有较致密纤维结缔组织膜(图 1);对照眼相应区域无充血,筋膜与巩膜连接较紧密。



Figure 1 Allo-ADM and receptor scleral were closely fused at 3 postoperative months 术后 3 个月 Allo-ADM 与受体巩膜融合

2.2 HE 染色 术后 1 个月,实验眼受体巩膜无溶解破坏,巩膜胶原纤维有炎症细胞浸润,主要为淋巴细胞,加固条带胶原基质粗壮且排列规则,近巩膜区域开始有成纤维细胞和淋巴细胞长入,加固条带周围可见炎症细胞浸润(图 2A),而对照眼相应区域巩膜内少量炎症细胞浸润。术后 2 个月,实验眼受体巩膜胶原仍无溶解破坏,巩膜内的成纤维细胞增多,大量淋巴细胞及成纤维细胞向加固条带内长入,融合区附近可见少量新生血管,加固条带周边胶原纤维较杂乱疏松,可见一定程度溶解破坏现象(图 2B),而对照眼相应区域巩膜胶原排列好,浸润的炎症细胞减少。术后 3 个月,实验眼受体巩膜胶原无破坏,加固条带的胶原纤维较前溶解稍增加,原中心部淋巴细胞开始减少,加固条带与受体巩膜融合区结缔组织增生(图 2C),而对照眼相应区域巩膜内炎症细胞减少。

2.3 bFGF 表达 对照眼相应区域巩膜可见 bFGF 弱表达,实验眼加固区巩膜 bFGF 阳性染色表达增强,

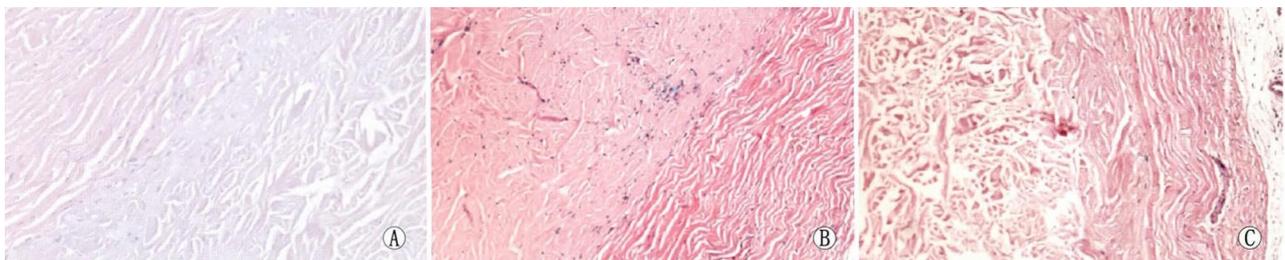


Figure 2 Tissue pathological sections of reinforcement area after operation(HE, $\times 200$) . A: 1 month; B: 2 months; C: 3 months 术后加固区组织病理切片(HE, $\times 200$) . A: 1 个月; B: 2 个月; C: 3 个月

与对照眼相比,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$,见表1)。

表1 实验眼加固区域巩膜与对照眼相应区域巩膜 bFGF 含量比较

Table 1 Comparison of bFGF content in reinforcement area corresponding sclera of experimental group and corresponding area of control group ($\bar{x} \pm s$)

Time	Experimental group	Control group	t	P
1 month	0.251 ± 0.021	0.223 ± 0.016	2.598	0.027
2 months	0.268 ± 0.019	0.245 ± 0.023	1.989	0.048
3 months	0.283 ± 0.017	0.220 ± 0.019	5.092	0.001

3 讨论

本研究结果显示,用 Allo-ADM 对日本大耳白兔行后巩膜加固术后1个月、2个月、3个月,受体巩膜完整无破坏,加固材料与受体巩膜贴附良好,组织形态学检查可见成纤维细胞及炎症细胞向加固材料内转移,术后3个月时可见加固材料内炎症细胞减少。术后1个月、2个月、3个月加固区域 bFGF 表达高于对照眼相应区域巩膜。

后巩膜加固术的效果和预后,不仅与加固区域是否得当有紧密的联系,同时也与加固材料的选择密切相关。Allo-ADM 是将真皮进行生化处理,将可被宿主识别并引起较强免疫排斥反应的各种细胞成分(毛囊、汗腺、皮脂腺、表皮细胞和成纤维细胞、血管内皮细胞等)尽量脱去,而细胞外基质成分和三维框架结构则被完全保留,因此可用作填充组织缺损、覆盖创面、引导组织再生和充当支架等的材料。Allo-ADM 可诱导宿主细胞的长入,并对纤维细胞增生、新生血管形成有促进作用^[9]。有研究显示^[10-12],Allo-ADM 用于眼部组织缺损、畸形修复,临床效果理想。本研究 HE 染色提示后巩膜加固早期,加固条带内有炎症反应,成纤维细胞及淋巴细胞长入,随着时间延长,淋巴细胞减少,炎症反应有停止趋势。

近视眼动物模型的相关研究已经证实,在形觉剥夺性或离焦诱导性近视的发生、发展过程中,眼轴是逐渐延长的。其中巩膜胶原蛋白纤维超微结构发生改变,其直径变小、密度变低,从而引起巩膜纤维层厚度降低。此过程中,各种细胞因子通过不同的信号转导通路作用于巩膜成纤维细胞,使其分泌的胶原蛋白和糖蛋白等细胞外基质总量下降,从而造成巩膜生物力学的改变,在原眼内压的作用下引起了巩膜的扩张,眼轴的延长。在众多的细胞因子中,已经证实 bFGF 在近视的病理生理改变过程中可以作用于巩膜组织成纤维细胞。如形觉剥夺性小鸡近视眼模型眼球后极部巩膜组织中 bFGF 的表达明显低于正常眼^[13]。有学者研究发现不同浓度的外源性 bFGF 可刺激人眼巩膜成纤维细胞增生^[14]。bFGF 在急性炎症期和肉芽组织形成,以及再上皮化和

组织重塑中起到了重要作用^[15]。在本研究中,术后不同时期实验眼和对照眼都出现了不同程度的 bFGF 表达,从实验数据中可以看出术后不同时期实验眼都要高于对照眼,这说明了手术创伤的炎症反应本身刺激了巩膜组织中 bFGF 的表达增加,这可能是巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞共同释放的;同时也说明了脱细胞真皮后巩膜加固术更加有效地刺激了巩膜组织中 bFGF 的高表达,从而进一步促进胶原蛋白等细胞外基质的合成增加,提示 bFGF 可能在后巩膜加固术中起着重要的作用。

综上所述,Allo-ADM 后巩膜加固术后,受体巩膜无破坏,随时间延长,与受体巩膜有适应趋势。巩膜 bFGF 的表达增加可能与 Allo-ADM 对兔的加固作用有关。但由于本实验研究时间较短,样本量偏小,可能会对实验结果造成一定影响,在以后的研究中可扩大样本量、延长观察时间,进一步观察远期效果,以期获得更具临床意义的实验结论。

参考文献

- 1 张金嵩. 高度近视[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 323-324.
- 2 Lattari V, Jones LM, Varcelotti JR, Perry JD. The use of a permanent dermal allograft in full thickness burns of the hand and foot: a report of three cases [J]. *J Burn Care Rehabil*, 1997, 18(2): 147-155.
- 3 Srivastva A, DeSagun EZ, Jennings LJ, Goldberg RA. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats [J]. *Ann Surg*, 2001, 233(3): 400-408.
- 4 姜笃银, 钱春华, 周兵, 付小兵. 不同脱细胞方法对无细胞真皮基质抗原成分的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(6): 35-37.
- 5 潘川云, 徐家钦, 陈彦堃, 李松龄, 陈思环, 吴多能, 等. 烧伤早期切痂异体真皮基质与自体皮浆复合移植的临床应用[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(7): 410-412.
- 6 黄智勇, 陈大夫, 王晓, 易成刚. 异体脱细胞真皮基质在烧伤后遗畸形中的应用[J]. 中国美容医学, 2006, 15(7): 772-774.
- 7 霍然, 付洪滨, 吕仁荣, 李强, 王德昌, 王明青, 等. 脱细胞真皮基质在胸部瘢痕疙瘩治疗中的应用[J]. 中国临床康复, 2004, 18(4): 474.
- 8 Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2000, 7(3): 165-197.
- 9 刘德伍, 李国辉, 邹萍, 刘德明. 表皮细胞、成纤维细胞复合脱细胞真皮基质构建组织工程皮肤[J]. 中国临床康复, 2004, 8(8): 1439-1441.
- 10 Liu Z, Ji J, Zhang J, Huang C, Meng Z, Qiu W, et al. Corneal reinforcement using an acellular dermal matrix for an analysis of biocompatibility, mechanical properties, and transparency [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(9): 3326-3332.
- 11 Levin F, Turbin RE, Langer PD. Acellular human dermal matrix as a skin substitute for reconstruction of large periocular cutaneous defects [J]. *Ophthalm Plast Reconstr Surg*, 2011, 27(1): 44-47.
- 12 Shorr N, Perry JD, Goldberg RA, Hoening J, Shorr J. The safety and applications of ocellular human dermal allograft in ophthalmic plastic and reconstructive surgery: a preliminary report [J]. *Ophthalmic Plastic Reconstr Surg*, 2000, 16(3): 223-230.
- 13 McBrien NA, Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22(3): 307-338.
- 14 傅亚娜, 周翔天, 付小莹, 王教, 吕帆, 胡廷宁, 等. 碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子对人巩膜成纤维细胞的生长调控研究[J]. 眼视光学杂志, 2008, 10(3): 186-189.
- 15 郑瑾, 余振珏, 周国民. EGF 与 bFGF 对体外大鼠巩膜成纤维细胞增殖的影响[J]. 复旦大学学报, 2006, 33(3): 301-304.