

## · 基础研究 ·

## 富血小板血浆在促进兔烫伤创面愈合中 bFGF VEGF 的表达及意义

胡以信<sup>1</sup>, 袁杰<sup>2</sup>, 邹勇<sup>1</sup>, 郭力<sup>3△</sup>, 刘兵<sup>1</sup>

(1. 四川省宜宾市第二人民医院整形烧伤科 644000; 2. 四川省宜宾市妇幼保健院儿科 644000;

3. 泸州医学院附属医院整形烧伤科, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨富血小板血浆 (PRP) 在促进兔烫伤创面愈合碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达及意义。方法 将 24 只大白兔分为对照组和实验组, 对照组用磺胺嘧啶银 (SD-Ag), 实验组用 PRP。在 7、10、14 d, 两组分别随机选取 4 只大白兔麻醉处死后取材, 行创面愈合率比较、HE 染色及免疫组织化学检测。结果 7、10、14 d 实验组创面愈合率均较对照组高 ( $P < 0.05$ )。7 d 时, 实验组肉芽组织灶显著, 细胞及血管数量密集。10 d 时, 实验组可见毛细血管量及成纤维细胞较对照组更为丰富。14 d 时, 实验组显示大部分成纤维细胞转化为纤维细胞而毛细血管数减少。7、10 d bFGF 及 VEGF 阳性细胞数两组均增高, 实验组明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 14 d bFGF 及 VEGF 阳性细胞数两组均逐步下降 ( $P > 0.05$ )。结论 PRP 可以促进大白兔烫伤创面愈合, 主要机制是明显增加早期创面中 bFGF 及 VEGF 表达。

**关键词:**富血小板血浆; 烫伤创面; 碱性成纤维细胞生长因子 2; 血管内皮生长因子类; 兔

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.35.025

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)35-4297-02

## Significance of platelet rich plasma in promoting bFGF and VEGF expression in would healing of rabbit buns

Hu Yixin<sup>1</sup>, Yuan Jie<sup>2</sup>, Zou Yong<sup>1</sup>, Guo Li<sup>3△</sup>, Liu Bing<sup>1</sup>

(1. Department of Plastic Surgery Burns, the Second People's Hospital of Yibin City, Yibin, Sichuan 644000, China;

2. Department of Pediatrics, Maternal and Child Health Hospital of Yibin City, Yibin, Sichuan 644000, China;

3. Department of Plastic Surgery Burns, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To discuss the significance of platelet rich plasma in promoting bFGF and VEGF expression in would healing of rabbit buns. **Methods** The 24 rabbits were randomly divided into control group and experimental group. The sulfadiazine silver paint to the wound for control group and the platelet rich plasma gel evenly spread to the wound for experimental group. At 7th, 10th, 14th day, 4 rabbits of each group were randomly selected to sacrificed after anaesthesiaed, wound healing rate was compare in 2 groups, HE staining and testimmunohistochemistry were conducted in each group. **Results** At 7th, 10th, 14th day, the wound healing rate of experimental group were higher than those of control group. At 7th d, the focal granulation, cells and vessels intensive were more significant in experimental group than in control group, at 10th day, the wound fibroblast cells and capillary number are more significant in experimental group, and at 14th day, the most of fibroblasts translate into fiber cell and the capillary number decreased, the fibroblasts proliferation was still active and fiber cell was less in the control group. At 7th, 10th day, the expression of bFGF and VEGF were both higher, but experimental group is obvious higher than control group ( $P < 0.05$ ), but at 14th day, the expression of bFGF and VEGF were gradually declined and was not obvious statistics differences in the two group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The platelet rich plasma could promote the big white rabbit scald wound healing, while the main mechanism maybe the expression of bFGF and VEGF increased in the early.

**Key words:** platelet-rich plasma; burn wound; basic fibroblast growth factor 2; vascular endothelial growth factor; rabbits

目前临床治疗 II 度烫伤创面, 尤其是深 II 度, 基本利用包扎及暴露疗法, 患者治疗时间长, 经济压力大, 且后期遗留明显瘢痕, 影响容貌及功能。所以, 探讨烫伤创面新的临床治疗思路, 是目前临床亟待解决的问题<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外许多学者发现富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 在创面愈合及软组织修复方面表现出独特疗效, 且明显改善创面修复质量。目前, 富血小板血浆已成功应用于骨与软组织缺损修复、心脏外科手术及口腔颌面外科等<sup>[2]</sup>, 并取得满意效果。本研究前期实验证明, PRP 治疗兔烫伤创面有明显的效果, 并且操作方便可行, 创面愈合明显, 不易形成瘢痕, 且愈合质量好<sup>[3]</sup>。但是 PRP 在烫伤创面愈合过程中的分子机制及变化规律如何, 目前尚不清楚。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 随机将 24 只健康普通大白兔 (四川泸州医学院中心实验室提供) 分为对照组及实验组, 每组为 12 只, 平均

体质量分别为 (2.66 ± 0.53) kg、(2.75 ± 0.52) kg, 雄雌不限。两组体质量比较, 差异有无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**1.2 PRP 凝胶的制作** 实验前 1 d, 参照 Sonnleither 法制作 PRP<sup>[4]</sup>, 1~24 号试管分别对应 1~24 号兔子, 制作 PRP 的流程遵循无菌操作要求。动物麻醉后, 从兔耳中动脉抽取 8 mL 血液装入有 1 mL 枸橼酸钠抗凝剂的 10 mL 注射器中, 摇匀, 放入离心试管中, 第 1 次 160 × g 离心 20 min。全血离心后分为两层, 下层为红细胞上层为上清液, 两层交界处可见一浅黄色的薄层, 即 PRP 层。吸出交界面下红细胞 6 mm 以上全部上清液, 置入另外一支离心试管, 摇匀。第 2 次 400 × g 离心 15 min 后, 吸出 3/4 上清液, 余下 1 mL 摇匀即为 PRP。用 2 mL 注射器先后吸入 1 mL PRP, 0.1 mL 凝血剂 (由 1 000 U 凝血酶与 1 mL 质量分数为 10% 的氯化钙混合而成) 和少许空气 (有利于 PRP 凝固), 6~10 s 后即形成 PRP 凝胶。

**1.3 动物模型**<sup>[5]</sup> 以 4% 硫化钠脱毛, 2% 戊巴比妥钠

(30 mg/kg)沿耳静脉麻醉。兔背部以 92℃ 恒温水浴作用 10 s,制作每侧面积约 7 cm×10 cm(面积约 20%)的深Ⅱ度烫伤创面,深度经组织学证实。实验组于实验后 1 h 腹腔注射复方氯化钠 30 mL/kg 以抗休克。实验后 6 h 内,实验组用 PRP 凝胶外覆创面,防止 PRP 凝胶丢失,创面再以生物半透膜粘贴,最后缝线固定,避免生物半透膜边缘掀起脱落。对照组创面外涂磺胺嘧啶银(SD-Ag),其他处理同实验组。本实验中,PRP 凝胶及 SD-Ag 均只使用 1 次。

#### 1.4 方法

**1.4.1 组织学检测** 7、10、14 d 两组分别随机选取 4 只大白兔,麻醉处死。切取每个前后创缘及创面中央 3 点全层皮肤,并于 4% 多聚甲醛固定、乙醇脱水、石蜡包埋及切片,制作 5 μm 切片并行苏木素-伊红染色(HE)染色,镜下观察表皮、真皮结构。

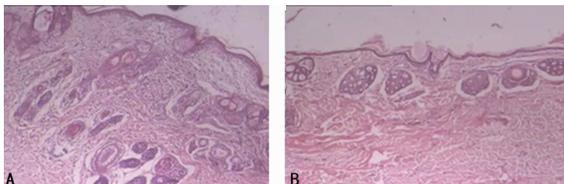
**1.4.2 真皮组织碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的表达测定** 应用链霉菌抗生物蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase,SP)法,以细胞质或(和)细胞核中着棕色者为阳性细胞,具体操作方法遵照试剂说明书。bFGF 及 VEGF 的半定量测定:在 400 倍光镜下观察 7、10、14 d 免疫组织化学结果,随机选取 5 个视野,每个视野观察 100 个细胞,计数阳性细胞数,利用医学图像分析系统,进行半定量测定。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 创面愈合率比较** 创面愈合率=[(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积]×100%<sup>[6]</sup>。实验表明,创面面积随时间延长而逐渐缩小。7、10、14 d 时,对照组创面愈合率分别为:(22.33±1.67)%、(32.33±1.07)%、(39.33±1.27)%,而实验组分别为:(34.93±1.18)%、(47.93±1.38)%、(58.83±1.91)%。两组创面愈合率在对应时间点比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 组织学变化** 100 倍光镜下观察 HE 染色标本。7 d 两组创面呈现炎性细胞浸润,并可见成纤维细胞、新生毛细血管,而实验组肉芽组织灶更显著,细胞及血管数量更密集。10 d 实验组可见毛细血管量及成纤维细胞较对照组更为丰富。14 d 实验组显示大部分成纤维细胞转化为纤维细胞而毛细血管数少,大量新生表皮细胞覆盖伤口,并呈现角化,对照组中成纤维细胞增殖仍较活跃而纤维细胞数量较少,见图 1。

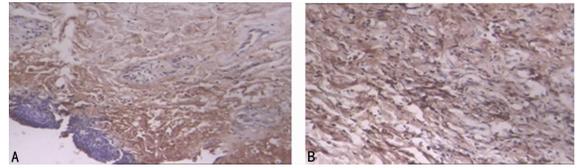


A: 对照组; B: 实验组。

图 1 两组创面 14 d 时组织学变化比较(HE 染色,×100)

**2.3 半定量测定 bFGF、VEGF 的表达结果** 在 400 倍光镜下观察 7、10、14 d 免疫组织化学结果,随机选取 5 个视野,每个视野观察 100 个细胞,计数阳性细胞数,进行半定量对比。结果表明 7、10 d bFGF、VEGF 阳性细胞数两组均增高,实验组明显高于对照组( $P < 0.05$ ),而 14 d 时,除对照组 VEGF 外,

bFGF、VEGF 阳性细胞数两组均逐步下降( $P > 0.05$ ),见图 2,表 1。



A: 对照组; B: 实验组。

图 2 两组创面 14 d 时 VEGF 的表达(免疫组织化学染色,×400)

表 1 两组创面不同时间点愈合 bFGF、VEGF 的阳性表达率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间点	bFGF 的阳性表达率		VEGF 的阳性表达率	
	实验组	对照组	实验组	对照组
7 d	31.34±5.4 <sup>a</sup>	20.80±2.4	34.34±3.4 <sup>a</sup>	21.48±2.9
10 d	69.65±2.8 <sup>a</sup>	39.50±2.6	61.50±2.3 <sup>a</sup>	35.56±2.8
14 d	55.75±8.3 <sup>b</sup>	47.56±7.4	55.56±3.1 <sup>b</sup>	45.56±3.7

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P > 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

PRP 是由全血离心获得的血小板浓缩物,大量研究已证实其中含有多种可促进组织生长的细胞因子,如 VEGF、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)、bFGF、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)等<sup>[7]</sup>,是被一致认为具有广大开发空间的生长因子库<sup>[8]</sup>。目前,PRP 已成为多个医疗领域应用的重要辅助手段,而且操作简便,副作用少,开拓了创面治疗的新时代。PRP 作为一个组织密封剂和药物传递系统<sup>[9]</sup>,能够避免生长因子受创面微环境变化及接触时间短而影响其发挥生物活性。本研究中,实验组使用 PRP 覆盖创面,PRP 通过血小板释放大量外源性的 VEGF 及 bFGF,而且在局部较长时间保持高浓度生长因子。

大量实验证实,影响新生组织生存和重建的主要因素是维持组织的血液供应,而维持局部血供的物质基础是血管再生,内皮细胞的增殖就是这一关键环节<sup>[10]</sup>。其中 PRP 中含有的高浓度 VEGF 是目前已知最强的血管生长促成因子,它对维持血管内皮的通透性、整体性及血管形成有极其重要的作用<sup>[11]</sup>。本实验以一定浓度 PRP 作用于烫伤创面,结果显示在第 7、10 天,实验组细胞及血管数均较对照组丰富,说明 PRP 是良好的血管生成促成剂<sup>[12]</sup>。bFGF 可以刺激内皮细胞的增殖、迁移,促进新血管的形成和发育,在创面愈合过程中起着重要的作用<sup>[13]</sup>,但可能需要其他因子协同下才能发挥其作用,同时受到其他与创面愈合相关因素的影响<sup>[14]</sup>。本实验结果显示,在第 7、10、14 天,VEGF 及 bFGF 的表达变化趋势基本一致,早期均有高浓度表达,推测二者间存在相互协同作用,使二者生物活性发挥最大作用。

综上所述,PRP 能够明显促进烫伤创面愈合,其主要机制为 PRP 作为一个组织密封剂和药物传递系统,增加创面早期 VEGF 及 bFGF 的表达,且使其持久发挥生物活性功效,从而促进创面的愈合<sup>[15]</sup>。

## 参考文献:

[1] 杨宗城. 烧伤救治中值得关注的几个(下转第 4301 页)

编码的信息含义<sup>[10-13]</sup>。

综上所述,异丙酚通过改变大鼠下丘神经元 FSL-A 函数曲线位置从而影响听觉对声音强度的信息传递,但不改变对其编码的信息含义。

#### 参考文献:

- [1] Neubauer H, Heil PA. Physiological model for the stimulus dependence of first-spike latency of auditory-nerve fibers[J]. *Brain Research*, 2008(1220):208-223.
- [2] Tan XD, Wang X, Yang WG, et al. First spike latency and spike count as functions of tone amplitude and frequency in the inferior colliculus of mice[J]. *Hear Res*, 2008, 235(1/2):90-104.
- [3] Mei HX, Cheng L, Tang J, et al. Bilateral collicular interaction: modulation of auditory signal processing in amplitude domain. [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e41311.
- [4] Jen PH, Wu CH, Wang X. Dynamic temporal signal processing in the inferior colliculus of echolocating bats[J]. *Front Neural Circuits*, 2012(6):27.
- [5] Macias S, Mora EC, Hechavarría JC, et al. Properties of echo delay-tuning receptive fields in the inferior colliculus of the mustached bat[J]. *Hear Res*, 2012, 286(1/2):1-8.
- [6] Macias S, Hechavarría JC, Kössl M, et al. Neurons in the inferior colliculus of the mustached bat are tuned both to echo-delay and sound duration[J]. *Neuroreport*, 2013, 24(8):404-409.
- [7] Orton LD, Poon PW, Rees A. Deactivation of the inferior colliculus by cooling demonstrates intercollicular modula-

tion of neuronal activity[J]. *Front Neural Circuits*, 2012(6):100.

- [8] Brown AM, Skamaruskas J, Lister T, et al. Differential susceptibility of astrocytic and neuronal function to 3-chloropropanediol in the rat inferior colliculus[J]. *J Neurochem*, 2011, 116(6):996-1004.
- [9] Heil P, Irvine DR. First-spike timing of auditory-nerve fibers and comparison with auditory cortex[J]. *J Neurophysiol*, 1997, 78(5):2438-2454.
- [10] Phillips DP. Factors shaping the response latencies of neurons in the cat's auditory cortex[J]. *Behav Brain Res*, 1998, 93(1/2):33-41.
- [11] VanRullen R, Guyonneau R, Thorpe SJ. Spike times make sense[J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(1):1-4.
- [12] Clarkson C, Juárez JM, Merchán MA. Transient down-regulation of sound-induced c-fos protein expression in the inferior colliculus after ablation of the auditory cortex[J]. *Front Neuroanat*, 2010(4):141.
- [13] Kirby AE, Middlebrooks JC. Unanesthetized auditory cortex exhibits multiple codes for gaps in cochlear implant pulse trains[J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2012, 13(1):67-80.
- [14] Liu X, Lauer KK, Ward BD, et al. Propofol disrupts functional interactions between sensory and high-order processing of auditory verbal memory[J]. *Hum Brain Mapp*, 2012, 33(10):2487-2498.

(收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-10-10)

(上接第 4298 页)

- 问题[J]. *中华烧伤杂志*, 2007, 23(5):321-323.
- [2] 袁霆, 张长青, 李四波, 等. 富血小板血浆促进骨修复的理论研究与临床实践[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(5):190-192.
- [3] 胡以信, 袁杰, 邹勇, 等. 富血小板血浆对兔烫伤创面愈合的实验研究[J]. *临床医药实践*, 2012, 21(9):686-688.
- [4] Akhundov K, Pietrmaggi G, Waselle L, et al. Development of a cost-effective method for platelet-rich plasma (PRP) preparation for topical wound healing [J]. *Ann Burns Fire Disasters*, 2012, 25(4):207-213.
- [5] 彭旦明, 刘雯. 烧(烫)伤动物模型的建立及评价[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(9):1712-1713.
- [6] 陈学玲, 刘宇飞. 祛腐生肌膏促进感染创面愈合作用的实验研究[J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(11):722-724.
- [7] Zhang J, Middleton KK, Fu FH, et al. HGF mediates the anti-inflammatory effects of PRP on injured tendons[J]. *Plos One*, 2013, 8(6):1371-1376.
- [8] 黄谦, 吴涛, 金丹, 等. 不同比例激活富血小板血浆对其生长因子浓度及人骨髓基质干细胞增殖的影响[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2008, 10(10):965-969.
- [9] Fufa D, Shealy B, Jacobson M, et al. Activation of platelet-rich plasma using soluble type collagen[J]. *J Oral Maxil-*

*lofac Surg*, 2008, 66(4):684-690.

- [10] 马桂芳, 李惠芬, 杨李. 胃腺癌组织中 HDGF、VEGF 的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(22):2253-2255.
- [11] Lee HW, Reddy MS, Geurs N, et al. Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits[J]. *J Periodontol*, 2008, 9(4):691-696.
- [12] 张云松, 何井华, 戴丽冰. 富血小板血浆对血管内皮细胞增殖及血管形成的影响[J]. *实用医学杂志*, 2011, 7(27):1145-1147.
- [13] He S, Xia T, Wang H, et al. Multiple release of polyplexes of plasmids VEGF and bFGF from electrospun fibrous scaffolds towards regeneration of blood vessels[J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(7):2659-2669.
- [14] Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Sustained ERK[correction of EKR] inhibition by EGFR targeting therapies is a predictive factor for synergistic cytotoxicity with PDT as neoadjuvant therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(3):2659-2670.
- [15] 刘晓韬, 洪小芳, 张志文, 等. 富血小板血浆治疗慢性难愈伤口效果分析[J]. *当代医学*, 2013, 19(9):61-62.

(收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-10-01)