

血管内皮生长因子基因修饰对裸鼠移植皮肤替代物的影响

谢卫国 Werner Lindenmaier Stefan Gryzybowski Hans-Gunther Machens

【摘要】 目的 了解血管内皮生长因子(VEGF)基因修饰对皮肤替代物移植后的影响。方法 将 72 只裸鼠分为实验组,以含 VEGF 目的基因的腺病毒载体转染人成纤维细胞(Fb),将其接种于 Integra 人工皮后移植于裸鼠创面;绿色荧光蛋白(GFP)对照组,用于转染 Fb 的腺病毒载体不含 VEGF 目的基因,但含与实验组相同的指示标记物 GFP 基因片段;Fb 对照组,接种于 Integra 人工皮的 Fb 未行基因转染,其他处理与前两组完全相同;无细胞对照组,所移植的 Integra 人工皮未接种 Fb,每组 18 只。评估实验组及各对照组移植物的成活情况、血管化过程及组织学变化。结果 实验组移植术后移植皮片新生血管形成情况明显优于各对照组($P < 0.05$),术后早期移植皮片与创面贴附较牢固,分离时易引起出血。实验组移植皮片成活率(100.0%)显著高于 GFP、Fb、无细胞对照组(分别为 83.3%、75.0%、77.8%, $P < 0.01$),而感染率低于各对照组($P < 0.05$)。结论 基因修饰所致 VEGF 高表达明显促进了移植皮肤替代物的血管化过程,提高了移植成活率。

【关键词】 基因; 内皮生长因子; 皮肤移植

Influence of vascular endothelial growth factor gene modification on skin substitute grafted on nude mice

XIE Wei-Guo*, Werner Lindenmaier, Stefan Gryzybowski, Hans-Gunther Machens. *Department of Burns, The NO. 3 Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene modification on skin substitute grafted on nude mice. Methods Human fibroblasts were transfected with VEGF adenovirus vector. Then the genetic modified fibroblasts were seeded on patches of Integra artificial skin. Twenty-four hours later, the Integra patches were grafted onto full-thickness skin defects on nude mice. Seventy-two nude mice were divided into experiment ($n = 18$, E, with fibroblasts seeded on Integra which were transfected by adenovirus containing VEGF in advance), GFP control ($n = 18$, the fibroblasts were transfected with adenovirus containing labelled GFP segment as same as that in E group, but containing no VEGF gene), Fb control ($n = 18$, without gene transfection), and control ($n = 18$, no fibroblast was seeded on Integra) groups. The survival rate, the revascularization process and the histological changes in the grafts in gene modified group (experimental group) and control groups were observed and analyzed. Results The revascularization condition in the experimental group was much better than that in the control group. The grafts adhered firmly to the wound during early postoperation stage, and were more prone to bleed when separated from the wound. The survival rate was obviously higher, while the infection rate was much lower in experimental group (100.0%) compared with the control groups (83.3%, 75.0%, 77.8%, respectively) ($P < 0.05$). Conclusion High expression of VEGF by gene modification can promote the vascularization process of skin substitute, hence improve the grafting result.

【Key words】 Gene; Endothelial growth factors; Skin transplantation

皮肤移植后的血管化过程不仅关系到其移植成活率,也决定着其成活后的功能状态,影响到最终治疗效果。笔者采用基因转染技术处理人工皮肤,通过在裸鼠皮肤缺损模型上进行移植实验,研究高表达血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对移植血管化过程的作用及其对

移植结果的影响,为进一步改善组织工程化皮肤替代物的临床应用效果提供依据。

材料与 方法

1. 动物来源及主要试剂:清洁级无胸腺裸鼠(丹麦 Taconic 公司)72 只,7~8 周龄,雌性,体重 22~26 g。DMEM 培养液、MCDB131、胶原酶 D、胰蛋白酶等购自美国 Gibco 公司。Integra 人工皮(简称 Integra)购自美国 Integra Life Science 公司。含目的基因 VEGF 的腺病毒载体由德国生物技术研究中心提供。

2. 细胞培养:人体皮肤成纤维细胞(fibroblast,

作者单位:430060 武汉市第三医院烧伤科(谢卫国);Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Department of Molecular Biotechnology, Braunschweig, Germany (Werner Lindenmaier); Burn unit, Plastic and Hand Surgery, Medical University of Lubeck, Germany (Stefan Gryzybowski, Hans-Gunther Machens)

Fb) 来源于健康儿童包皮环切术所切包皮(供者知情同意)。将其用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,去除皮下脂肪,剪成 5 mm × 5 mm 大小,加 0.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L 乙二胺四乙酸适量,置 4 ℃ 冰箱 16—18 h,剥离表皮。将真皮块剪碎,以胶原酶 D 消化 3 h,过滤弃渣,加含体积分数 5% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 重新悬浮并收集 Fb,常规培养及传代。选择第 3—6 代细胞用于实验。

3. 基因转染及移植 Integra 准备:以皮肤取样器钻取直径 15 mm 的 Integra 圆片,硅膜面朝下置 24 孔培养板中,加 1 ml DMEM,置培养箱内备用。将 Fb 接种于底面积 150 cm² 培养瓶中,隔日换液直至细胞接近融合,吸出培养液。按病毒感染复数(MOI)为 100 计算所需 VEGF 腺病毒载体用量,用 5 ml 含体积分数 2% FBS 的 PBS 稀释后加入 Fb 培养瓶中,置摇床以 1—3 r/min 速度摇晃转染。1 h 后加培养基置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱。培养 24 h 后消化、分离细胞,以 5 × 10⁵/ml 密度接种于 24 孔培养板中的 Integra 上,再培养 24 h 后用于移植实验。

4. 动物移植实验及分组:将裸鼠分为实验组(接种于 Integra 的 Fb 事先以含 VEGF 基因的腺病毒转染)、绿色荧光蛋白(GFP)对照组(Integra 上接种有转染的 Fb,用于转染 Fb 的腺病毒载体不含 VEGF 目的基因,但含与实验组相同的指示标记物 GFP 基因片段)、Fb 对照组(接种于 Integra 的 Fb 未行基因转染,其他处理与前两组完全相同)、无细胞对照组(所移植的 Integra 未接种 Fb),每组 18 只。以 30 g/L 氯胺酮(100 mg/kg)及 Rampun(5 mg/kg)腹腔注射麻醉裸鼠;于其背部正中两侧各切除直径 15 mm 圆形全层皮肤。将 Integra 硅膜面向外移植于创面,缝合固定,外以透明贴环绕躯干固定。

5. 移植术后行大体观察及移植结果评估:术后每日观察裸鼠全身及创面情况。按以下标准行移植皮片结果评估:(1)具有以下 3 项,判定为移植成活:移植皮片呈均匀淡红色,与创面贴附好;移植皮片下无积液;全层皮肤结构完整,无破溃及脱落。(2)具有以下 4 项中任意 2 项以上,判定为移植皮片感染:创缘有明显红肿炎症反应;移植皮片呈黄色、黄白或黄褐色,其下积液、积脓;移植皮片因非机械力原因而破溃或脱落;组织病理学检查提示炎症感染。(3)创面收缩率:每只裸鼠于手术结束时及处死后以数码相机拍摄创面照片,图像输入计算机,用图像自动分析软件(武汉千屏影像有限公司)计

算创面收缩率。

6. 组织病理学检测:术后第 3、7、14 天每组各处死 3 只裸鼠,取移植皮片标本,分别行常规 HE 及免疫组织化学染色。一抗为羊抗 CD31/PECAM 多克隆抗体,染成棕色者为阳性,每张切片在镜下随机选取 5 个视野,图像结果输入计算机,以图像自动分析系统计算阳性区域百分比。

7. 统计学处理:部分数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计分析软件,行方差分析或卡方检验。

结 果

1. 大体观察:2 只裸鼠(GFP 对照组)术后死于复苏不良,1 只(无细胞对照组)死于皮下气肿所致的呼吸困难。死亡动物未计入最终统计结果。其余实验动物对手术及移植物耐受良好,麻醉复苏后可自由活动,未见中毒、过敏及移植排斥反应等,术后第 2 天起可见移植皮片呈均匀淡红色(图 1)。



图 1 实验组裸鼠术后对移植物耐受良好

Fig 1 The Integra pieces survived well after grafting

2. 移植结果评估:各组裸鼠移植结果见表 1。实验组成活率明显高于各对照组($P < 0.01$),而感染率则低于各对照组($P < 0.05$)。各对照组之间移植成活率及感染率差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组、GFP 对照组、Fb 对照组及无细胞对照组的创面收缩率分别为(9.8 ± 2.6)%、(12.7 ± 3.2)%、(10.9 ± 2.5)% 及(13.4 ± 1.9)% ,实验组低于各对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组裸鼠移植皮片成活及感染情况

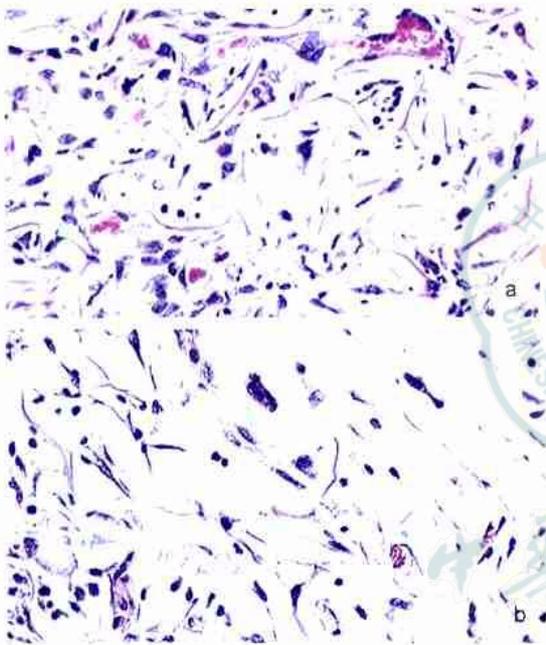
Tab 1 The infection and survival rates of the grafts in each group

组别	移植皮片数(片)	成活皮片数(片)	成活率(%)	感染皮片数(片)	感染率(%)
实验组	36	36	100.0 ^a	2	5.6 [*]
GFP 对照组	36	30	83.3	5	13.9
Fb 对照组	36	27	75.0	8	22.2
无细胞对照组	36	28	77.8	7	19.4

注:与各对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

3. 移植物组织病理学观察:术后第 3 天光镜下可见移植皮片与受床相连处有新生血管芽增生,分

离标本时见实验组移植皮片与创面贴附较牢固,分离时易引起出血,各对照组分离较容易,很少引起出血。第 7 天各组移植皮片中可见新生血管形成,实验组血管数量多于各对照组;第 14 天实验组的血管数量及管径明显大于各对照组(图 2)。各对照组之间各时相点血管的数量及分布状况无明显差别。免疫组织化学定量分析与光镜相似,术后第 7、14 天实验组移植皮片内新生血管数量及管径大小明显高于各对照组 ($P < 0.05$, 图 3)。术后各时相点均可见移植皮片内有一定程度的中性粒细胞、淋巴细胞及少量单核细胞浸润。Fb 的形态及数量各组之间无明显不同。



注:a 为实验组,b 为 GFP 对照组

图 2 术后 14 d, 实验组的血管数量及管径大于 GFP 对照组 HE $\times 400$

Fig 2 Better revascularization was seen in VEGF gene modified group compared with the control HE $\times 400$

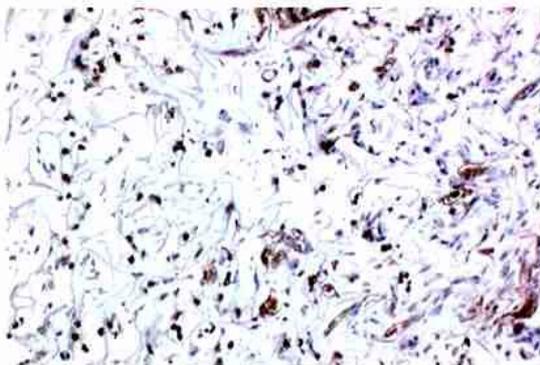


图 3 术后 14 d, 实验组 Integra 中可见密集微血管网抗 CD31 免疫组织化学染色 $\times 300$

Fig 3 Desified blood vessels were seen in Integra 14 days after the grafting Immunohistochemical staining $\times 300$

讨 论

游离移植皮片不论厚度如何,都包含不同管径的血管组织,它对移植成活率起着极重要的作用。移植的早期是靠创面渗出的血浆供给营养,但很快新生的毛细血管就与皮片内原有的血管网沟通,建立移植皮肤赖以成活的供血系统。缺乏血管丛结构使移植皮片得不到及时和足够的营养,再灌注所需时间延长,缺血损伤加重,感染机会增加,是导致移植失败的重要原因^[1]。目前所有的研究成果或正在研究的各种人工皮肤、组织工程化复合皮肤、脱细胞真皮支架等,都不具备血管结构,因此其移植成活率不尽人意,远低于活体皮肤移植^[2]。

VEGF 是作用于血管内皮细胞的生长因子,它具有促进血管内皮细胞分裂、增殖及诱导血管生成的作用;在体外研究中,VEGF 对皮肤微血管内皮细胞起促进有丝分裂的作用,并诱导内皮细胞向细胞外基质迁移^[3]。1994 年 Koekel 等^[4]提出了 VEGF 治疗血管生成这一概念。此后 VEGF 在组织缺血性疾患的治疗方面受到广泛重视,在促进缺血性肢体建立侧支循环,挽救缺血性皮瓣及改善缺血性冠心病的血供等方面均显示出一定的临床价值^[5,6]。本研究以人体皮肤 Fb 为靶细胞,通过腺病毒载体介导 VEGF 基因转染,观察其对移植皮肤替代物血管化的影响。结果显示,局部高表达 VEGF 的实验组移植成活率高于各对照组,而感染率则较低。表明基因修饰所致高表达 VEGF 通过促进移植血管化,提高了移植的成活率。体外培养 Fb 行基因转染后 3—5 d,VEGF 表达达高峰,持续 10—14 d 后逐渐消失。其培养液上清对体外培养的血管内皮细胞有明显的促增殖作用。腺病毒载体介导的基因转染效率高,持续时间较短,临床使用较安全,其用于促进移植皮肤替代物血管化时,早期高表达,10—14 d 后表达消失,既可促进早期血管形成和皮片成活,又避免了长期稳定表达可能造成的潜在危险(如过度血管化、致瘤等),接近理想的临床使用要求。

Integra 其外层硅膜可起临时表皮的作用,防止体液蒸发;内层胶原海绵状结构作为真皮支架,可诱导宿主新生血管及 Fb 等长入,逐渐形成新的永久性真皮组织^[7]。但 Integra 尚存在明显不足,一是缺乏永久性表皮结构,一般要待移植成活后 2 周左右揭去表层硅膜,移植自体薄断层皮片。而培养的表皮角质细胞因对创面血管化程度及无菌要求高,不宜移植于 Integra 上^[2]。因此 Integra 并不能真正节省

患者的自体皮源,治疗周期偏长。二是 Integra 本身不含任何活体细胞及血管结构,缺乏生物活性,移植后无法主动刺激和加速创面的血管化及愈合过程,因此移植成活率不尽理想^[7,8]。将组织工程技术及基因治疗方法相结合,有可能为解决当前组织工程化皮肤替代物的不足提供新的思路。大面积皮肤缺损患者入院后首先取少量自体皮进行体外 Fb 及表皮角质细胞培养,将其行基因转染后接种于 Integra 上,再移植于创面。由于基因修饰的人工皮大量表达 VEGF,其血管化过程加快。2—3 周后培养的自体表皮细胞已形成膜片,此时揭去硅膜进行移植,成活率可望大大提高。若患者有足够供皮区,也可行自体刃厚皮移植。采用这一治疗方案可以节约自体皮源,确保移植皮片成活,缩短治疗周期。而较好的血管化和营养状态能促进新生真皮的形成,有利于提高创面修复质量。

参 考 文 献

1 Dorothy M, Supp P, Sheila M, et al. Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol*, 2000, 114:5 - 13.

2 Heimbach D, Luterma A, Burke JF, et al. Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial. *Ann Surg*, 1988, 208: 313 - 320.

3 Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, et al. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanism involving the $\alpha v \beta 3$ integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol*, 1996, 149:293.

4 Kockel, Weich H, Brandner G, et al. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*, 1994, 9:936.

5 Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J*, 2002, 66:1077 - 1086.

6 Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998, 97:1114 - 1123.

7 Heimbach DM, Warden GD, Luterma A, et al. Multicenter postapproval clinical trial of integra (r) dermal regeneration template for burn treatment. *J Burn Care Rehabil*, 2003, 24:42 - 48.

8 Grant I, Green C, Martin R. Strategies to improve the take of commercially available collagen/glycosaminoglycan wound repair material investigated in an animal model. *Burns*, 2001, 27:699 - 707.

(收稿日期:2004 - 03 - 10)
(本文编辑:张 红)

· 病例报告 ·

小儿烧伤合并蛛网膜下腔出血一例

彭煜 吴勇 姜松

患儿男,3岁,沸水烫伤全身多处。伤后烦躁哭闹,饮入大量高浓度蔗糖水(具体浓度不详)。伤后38h尿少、抽搐,送入当地医院救治。予以静脉滴注50g/L葡萄糖盐水200ml、100g/L葡萄糖300ml及抗生素后,患儿逐渐昏迷,抽搐加重,转入笔者单位,此时昏迷、抽搐已持续近6h。查体:患儿体温39.2℃,呼吸30次/min,心率130次/min。深昏迷,角弓反张,双侧瞳孔等大正圆(直径0.3cm),对光反射迟钝,颈抵抗阳性,双肺可闻及痰鸣音,心律齐,肝脾不肿大,克尼格征、布鲁辛斯基征、巴宾斯基征阴性。创面分布于胸腹部及双大腿,腐皮已脱落,创面基底红白相间,渗出少,创周炎症不明显。白细胞 $25.9 \times 10^9/L$,中性粒细胞0.55,血红蛋白98g/L, $K^+ 3.6 \text{ mmol/L}$, $Na^+ 128 \text{ mmol/L}$, $Cl^- 98 \text{ mmol/L}$, $Ca^{2+} 1.95 \text{ mmol/L}$,尿素氮5.6mmol/L,肌酐80 $\mu\text{mol/L}$,二氧化碳结合力20mmol/L,血糖8.6mmol/L。头颅CT示脑组织灰质、白质密度降低,脑池、脑沟缩小或闭塞,部分脑沟及环池内见浅淡高密度影,脑室系统形态尚可,脑中线居中。诊断:(1)深Ⅱ度烧伤,总面积18%TBSA。(2)蛛网膜下腔出血。(3)脑水肿。反复追问病史,排除头部外伤史。给予甘露醇、西咪替丁、地塞米松、高效抗生素、苯巴比妥钠治疗,

并行气管切开术,创面外用磺胺嘧啶银。治疗3d后,患儿转为浅昏迷状,抽搐及角弓反张消失,复查头颅CT示蛛网膜下腔出血及脑水肿明显减轻。治疗3周后,患儿清醒,四肢活动正常,语言清晰,创面愈合,治愈出院。

讨论 烧伤合并蛛网膜下腔出血目前少见报道。本例患儿伤后早期饮入大量高浓度蔗糖水,导致高糖性高渗血症,脑组织脱水过快,颅内负压增加,脑血管受机械牵拉扭曲,脑皮质与蛛网膜之间的静脉断裂出血。烧伤后早期由于大量体液渗出, Na^+ 丧失较多,体液呈低渗状态^[1];加之随着血糖代谢的进行,血浆渗透压进一步下降,水分迅速进入细胞内,引起严重的脑水肿^[2]。本例患儿抢救成功的关键在于:早期诊断、及时治疗脑水肿;在脱水治疗基础上采取镇静、防治水及电解质紊乱、控制感染等措施;后期辅以促醒、给予扩张脑血管药物、营养支持等,患儿病情逐步好转,最终治愈出院。

参 考 文 献

1 黎鳌,杨宗城,主编. 烧伤治疗学. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1995.305 - 308.

2 董声焕,主编. 现代儿科危重病医学. 北京:人民军医出版社,1999.462 - 470.

(收稿日期:2004 - 04 - 12)
(本文编辑:罗 勤)

作者单位:636001 巴中市人民医院烧伤科(彭煜),神经外科(吴勇),儿科(姜松)