

# CGF中VEGF、TGF- $\beta$ 1含量测定及其对软组织创伤愈合影响的实验研究

王天祥 邹高峰 李超 翟孝雅 石昌艳

【摘要】目的：测定浓缩生长因子 (CGF) 中 VEGF 和 TGF- $\beta$ 1 含量，观察其对软组织创伤愈合、减少愈合瘢痕方面的影响。方法：健康雄性杂种犬 6 只，抽取静脉血，制备 CGF，双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测静脉血、CGF 中 VEGF 和 TGF- $\beta$ 1 的含量，数据应用 SPSS 12.5 软件统计分析。分别在实验犬的双侧后腿的大腿内侧制作 2 个短径为 2 cm、长径为 3 cm 深及皮下筋膜层的椭圆形创面，其上覆盖 CGF 膜 (实验组)，不覆盖任何膜 (空白对照组)。分别于术后 7、14、21、28 d 通过大体观察和组织学观察对比创面的生长愈合情况。结果：静脉血、CGF 中 VEGF 浓度分别为  $(63.59 \pm 14.41)$ 、 $(335.15 \pm 38.11)$  pg/ml。TGF- $\beta$ 1 浓度分别为  $(56.19 \pm 14.55)$ 、 $(18950 \pm 7500)$  pg/ml。大体观察：术后 7 d，肉芽组织生长情况实验组 > 空白对照组；炎症反应实验组 < 空白对照组。术后 7~28 d，两组的椭圆形创面均逐渐缩小，但实验创面缩小较明显并无明显瘢痕。组织学观察：实验组创面较早形成成熟的皮肤组织。结论：CGF 中 VEGF 和 TGF- $\beta$ 1 含量较静脉血分别提高了  $(21.90 \pm 2.44)$ 、 $(7.59 \pm 2.03)$  倍，且能明显缩短软组织损伤愈合时间，减少瘢痕形成，提高愈合质量。

【关键词】浓缩生长因子；血管内皮生长因子；转化生长因子- $\beta$ 1；软组织；愈合

中图分类号 R274.3

文献标识码 B

文章编号 1674-6805(2013)10-0140-02

浓缩生长因子 (concentrate growth factors, CGF) 是一种富含浓缩血小板及纤维蛋白的的修补生物材料，CGF 的获取是经过特殊离心机制备而成，制备出的物质分为三层：上层为血清 (PPP)，中层为 CGF，下层为红细胞层 (RBC)<sup>[1]</sup>。本研究分别通过对静脉血、CGF 中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta$ 1) 含量测定，并对犬软组织损伤修复的观察，探讨其促进软组织损伤愈合、减少愈合瘢痕方面的能力，为进一步的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验标本、仪器及试剂

1.1.1 实验标本 健康一岁龄雄性杂种犬 6 只，体质量 20~22 kg。

1.1.2 主要仪器及试剂 速眠新 II 注射液 (军事医学科学院军事兽医研究所提供)；Medifuge (Silfradent 意大利) 离心加速机；SHHW21.Cr 600 三用电热恒温箱 (北京长安科学仪器厂)；

TECAN 全自动酶标扫描仪 (奥地利泰康公司)；VEGF、TGF- $\beta$ 1 检测 ELISA 试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 静脉血的抽取 分别抽取每只实验犬的静脉血 36 ml，分别注入 9 ml 的试管 (Medifuge 离心加速机特殊匹配试管，真空负压，不含抗凝剂等任何添加剂) 中，共计 4 支，注满后勿摇动。

1.2.2 CGF 的制备 选择其中 2 支试管，立即放入 Medifuge 离心加速机的转筒中，按预定程序制备出 CGF，其中一支试管用于模具压制，获得 CGF 薄膜，另外一支试管用于双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定 VEGF、TGF- $\beta$ 1 的浓度<sup>[2]</sup>。

1.2.3 非抗凝静脉血 4 保存，充分凝集后 3000 r/min 离心 20 min，取上层离心液转移到 EP 管中，用于检测静脉血 VEGF、TGF- $\beta$ 1 含量。

1.2.4 将 Medifuge 离心加速机制备的 CGF，再次常温静置 60 min，3000 r/min 离心 20 min，吸取上层离心液转移到 EP 管中，用于检测 CGF 中 VEGF、TGF- $\beta$ 1 含量。

大庆油田总医院 黑龙江 大庆 163001

佳木斯大学口腔医学院

年龄、职业等诸多因素为患者开具科学的配镜处方，从医学的角度讲，配戴眼镜的目的除了获得良好的矫正视力以外，还要达到舒适的目的，通过缓解视疲劳防止近视进一步发展。青少年调节力较强，单纯通过传统的电脑验光及主观插片的方式确定眼镜度数存在着一定的盲目性<sup>[4]</sup>。

本研究中医学验光中的散瞳验光及主导眼检查进行了研究。通过复方托吡卡胺对睫状肌进行麻痹，在验光时完全放松调节，发现所有青少年患者且无论其戴镜习惯如何，屈光度与未散瞳相比均有所下降。通常认为，对同一个体而言，主导眼与非主导眼相比其视线更短也更为精确，因此用眼强度也相对较大，当主导眼矫正不足时患者更容易出现主观上的视物不清等不适，与本研究结果相一致。因此在为患者配置眼镜对度数进行调整的过程中，应尽量保持主导眼足量矫正，使其获得良好的舒适性。

总之，在对青少年进行验光配镜的过程中，笔者认为采取医学验光更能满足患者眼视光学方面的要求。

## 参考文献

- [1] 周红星，李俊宁，劳琨，等. 医学验光和常规验光的对比研究 [J]. 国际眼科杂志，2008，8(8)：1705-1706.
- [2] 张丽敏，林安岭，韩晶岩. 医学验光的临床应用 [J]. 内蒙古医学杂志，2007，39(2)：228-229.
- [3] 陈翔，林智，赖欣婕，等. 托品酰胺滴眼液对睫状肌麻痹效果的客观观察 [J]. 眼视光学杂志，2008，10(2)：135.
- [4] 蓝方方，沈降，李琪瑶，等. 医学验光在临床中的应用研究 (附 40 例报告) [J]. 广西医学，2009，31(1)：70-71.

(收稿日期：2012-12-12) (编辑：陈春梅)

1.2.5 检测指标及方法 双抗体夹心 ABC-ELISA 法定量分析静脉血及 CGF 中 VEGF、TGF- $\beta$ 1 浓度(根据试剂盒操作步骤测定)。

1.2.6 动物实验 用速眠新 成功麻醉实验犬后(100 U/ml, 0.1~0.2 ml/kg), 在实验犬的双侧后腿的大腿内侧分别制作 2 个短径为 2 cm、长径为 3 cm 深及皮下筋膜层的椭圆形创面, 实验组其上覆盖 CGF 膜, 并进行简单的缝合固定, 空白对照组无特殊处置, 自行愈合。所有实验创面均用无菌纱布加压包扎, 术后实验犬给予庆大霉素肌注 3 d, 预防感染。

1.2.7 大体观察与组织学观察 每日观察记录伤口的生长情况, 伤口渗出量, 损伤处的炎症反应; 分别于术后第 7、14、21、28 天随机切取三组标本(每只实验犬的单侧后腿为一组), 4% 甲醛液固定, HE 染色, 组织学观察。

### 1.3 公式

利用如下公式, 计算 VEGF 富集系数 (VEGF enrichment factor, VEEF)、TGF- $\beta$ 1 富集系数 (TGF- $\beta$ 1 enrichment factor, TEF)。VEEF=CGF 中 VEGF 浓度/静脉血中 VEGF 浓度; TEF=CGF 中 TGF- $\beta$ 1 浓度/静脉血中 TGF- $\beta$ 1 浓度; VEEF=21.90 $\pm$ 2.44; TEF=7.59 $\pm$ 2.03。

### 1.4 统计学方法

分析软件为 SPSS 12.5, 计量资料结果以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, CGF 中的 VEGF、TGF- $\beta$ 1 含量比较采用配对 t 检验, 行差异显著性分析。显著性水准为  $\alpha=0.05$ 。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 静脉血、CGF 中 VEGF、TGF- $\beta$ 1 含量

静脉血、CGF 中 VEGF、TGF- $\beta$ 1 含量比较, 详见表 1。

表1 静脉血、CGF中VEGF、TGF- $\beta$ 1含量 ng/L

	VEGF	TGF- $\beta$ 1
静脉血	18.12 $\pm$ 3.56	7.95 $\pm$ 1.32
CGF	339.26 $\pm$ 15.03 <sup>*</sup>	49.36 $\pm$ 11.12 <sup>#</sup>

\* 与静脉血组比较, P<0.05; # 与静脉血组比较, P<0.05

### 2.2 大体观察结果

术后第 7 天, 实验组创面清洁, 有较多肉芽组织生长, 伤口周围未见明显炎症反应; 空白对照组创面周围有较明显的炎症反应。术后第 14 天, 实验组创面基本愈合, 无明显瘢痕; 空白对照组仍可见明显炎症浸润。术后第 21 天, 实验组创面完全愈合, 无明显瘢痕形成; 空白对照组创面明显缩小。术后第 28 天, 空白对照组创面才基本愈合, 有明显瘢痕形成。

### 2.3 组织学观察结果

术后第 7 天, 实验组: 大量新生血管、上皮细胞、成纤维细胞形成, 吞噬细胞较多, 大量胶原形成; 空白对照组: 新生毛细血管稀少, 成纤维细胞、巨噬细胞、胶原纤维形成少。术后第 14 天, 实验组: 表皮细胞分化较成熟, 成纤维细胞、吞噬细胞较多; 空白对照组: 表皮细胞未见明显黑素细胞, 胶原纤维形成较少, 新生的血管稀少。术后第 21 天, 实验组: 胶原纤维较少, 新生血管较多, 表层棘层细胞增生呈乳头状; 空白对照组: 新生表皮较薄, 棘层细胞排列规则, 表皮轻度角化, 真皮胶原纤维较多, 新生毛细血管、成纤维细胞少, 基底部可见黑素细胞。术后第 28 天, 实验组: 创面形成成熟的皮肤组织, 真皮层纤维排列整齐, 少量胶原纤维形成且排列规则, 纤维细胞较多, 毛细血管形态、分布均正常, 真皮乳头层可见表皮细胞排列规则, 形态正常; 空白对照组: 仍可见大量胶原纤维,

排列形态均不规则, 真皮乳头层消失, 毛细血管较少。

## 3 讨论

软组织再生医学是指寻找有效方法, 促进机体自我修复与再生, 以维持、修复、再生或改善损伤组织和其功能。生长因子是一类生物介质, 在相应靶细胞表面高度亲合性受体的介导下, 调节不同类型细胞增殖、分化、趋化、代谢、免疫应答及物质合成, 在软、硬组织修复中发挥及其重要的作用。CGF 中富含由血小板分泌的所有创伤愈合过程有关的蛋白生长因子。本研究采用浓缩生长因子提高创伤周围生长因子含量的方法, 激发自身愈合能力, 达到组织自身愈合。

本项实验采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定静脉血、CGF 中 VEGF、TGF- $\beta$ 1 浓度。CGF 与静脉血相比 VEGF 的含量增加了 (21.90 $\pm$ 2.44) 倍, TGF- $\beta$ 1 的含量增加了 (7.59 $\pm$ 2.03) 倍, 说明 CGF 中含有极高的 VEGF、TGF- $\beta$ 1 含量。

血管内皮生长因子 (VEGF) 是促进血管内皮细胞有丝分裂的细胞因子, 也是促进血管新生最重要的生长因子, VEGF 具有促进血管内皮细胞增殖, 增加血管通透性及抑制细胞凋亡的功能<sup>[3]</sup>。赵建华等<sup>[4]</sup>发现 VEGF 是促进血管生成的直接相关因子, 可以促进血管的新生和侧支循环的建立。转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) 是促进细胞分裂、增殖和趋化的重要的生长因子。贾赤宇等<sup>[5]</sup>研究发现 TGF- $\beta$ 1 明显加速愈合初期 (3 d) 的上皮细胞的增殖, 明显促进上皮细胞增殖分化的启动, 且在不影响愈合速度的前提下, 导致 I/II 胶原比例下降, 在一定程度上抑制后期增生性瘢痕形成。本组将覆盖 CGF 膜的实验创面和空白对照创面愈合情况进行对比研究, 早期愈合阶段实验组与对照组相比, 创面炎症浸润较少, 肉芽组织形成较多; 从愈合时间来看, 实验创面于 14~21 d 时已基本愈合, 而空白对照创面则需在 21~28 d 时达到相似的愈合程度; 从大体观察来看, 28 d 时覆盖 CGF 膜的实验组创面未见明显的瘢痕形成, 而空白对照组可见明显瘢痕并伴少量瘢痕性挛缩; 从组织学观察来看, 28 d 时实验组已形成成熟的皮肤组织, 而空白对照组仍可见大量胶原纤维, 且排列、形态均不规则。

CGF 实验组创面较对照组生长因子含量成几何倍数, 且 CGF 拥有独特的三分子和多分子浓缩形成的网状结构, 使得红细胞、白细胞、血小板及相应抗体更易于趋化、附着、增殖, 且可以持久的释放生长因子。实验结果表明 CGF 含有更高的 VEGF、TGF- $\beta$ 1 浓度, 并能够促进软组织快速愈合, 减少术后瘢痕形成。

## 参考文献

- [1] Luigi F, Gala F, Ramon B, et al. Growth factors, CD34 Positive Cells, and Fibrin Network Analysis in Concentrated Growth Factors Fraction[J]. Microscopy Research and Technique, 2011, 74(8): 772-777.
- [2] Dong-Seak Sohn. The effect of concentrated growth factors on ridge augmentation[R]. DENTALINC, 2009: 34-40.
- [3] 王玖玖. Survivin/VEGF 在白血病中的表达及临床意义 [R]. 中国医科大学内科学, 2007.
- [4] 赵建华, 唐金海, 孟凡青, 等. 乳腺癌组织和血清中内皮细胞抑制素 VEGF 表达与肿瘤血管生成 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 10(2): 23-26.
- [5] 贾赤宇, 陈璧. EGF, TGF- $\beta$ 1, 抗 TGF- $\beta$ 1 中和抗体对大鼠“深烫伤创面愈合的影响” [J]. 第四军医大学学报, 1999, 8(5): 64-67.

(收稿日期: 2012-12-21) (编辑: 程旭然)