

血管内皮细胞生长因子应用于羟基磷灰石眶内植入物的研究

方 腾 李秋明 卢建香 舒华娥 刘 芳 毋海燕

Effects of endothelial growth factor on fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite orbital implants

Fang Teng, Li Qiuming, Lu Jianxiang, Shu Hua'e, Liu Fang, Wu Haiyan. Department of Ophthalmology, Second Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454001, China

Abstract Objective The hydroxyapatite (HA) implanting surgery is a deal way for orbital reconstruction. Researches showed that the rejection after HA implanting surgery is associated with the delayed fibrovascularization of implants. The aim of this study was to investigate the effects of different doses of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite orbital implants. **Methods** The hydroxyapatite orbital spheres embedded by quadriceps femoris fascia were implanted into 24 New Zealand white rabbits. The rabbits were divided into 4 groups randomly. The implants were treated with 0.5, 1.5 and 2.5 g/L VEGF solution prepared by normal saline solution prior to the surgery, and the eye drops with the same concentration of VEGF were topically used after surgery for 28 days respectively in 3 groups. In the control group, the untreated implants were used and normal saline solution was administered after surgery at the same way. The implants were harvested at postoperative 2, 3 and 4 weeks. The fibrovascular growth status in implants was graded based on the mean fibrovascular length at 3:00, 6:00, 9:00 and 12:00 position of hydroxyapatite orbital spheres under the light microscopy. The use of animal followed the Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** The fibrovascular length was gradually increased with the enhance of concentration of VEGF in various postoperative time points. The fibrovascular length in 0.5, 1.5 and 2.5 g/L VEGF groups was obvious increased in comparison with control group. No significant rising of fibrovascular proliferation was found in every group in 14 days ($F = 34.12, P > 0.05$) and 28 days ($F = 27.67, P > 0.05$) of postoperation. However, significant differences in fibrovascular proliferation were seen in 21 days ($F = 4.21, P < 0.05$). There was no significant differences in mean grade of fibrovascular length in 14 days ($H = 0.072, P > 0.05$). However, significant differences in fibrovascular grade were found in 21 days ($H = 3.684, P < 0.05$) and 28 days ($H = 4.318, P < 0.05$). **Conclusion** The VEGF at the concentration of 1.5 and 2.5 g/L promotes the fibrovessel ingrowth into hydroxyapatite orbital implants in 4 weeks after the implantation.

Key words vascular endothelial growth factor; hydroxyapatites; orbital implants

摘要 目的 观察不同质量浓度的血管内皮生长因子(VEGF)对羟基磷灰石(HA)植入物纤维血管化的作用。**方法** 将24只新西兰白兔随机分为A、B、C、D4组,每组6只。各组均采用自体深筋膜覆盖HA植入物植入兔眼眶。A组为对照组,B、C、D组将HA义眼台植入前分别浸泡于质量浓度为0.5、1.5、2.5 g/L VEGF溶液中,术后分别点用上述不同质量浓度VEGF滴眼液,每日4次,连续28 d。术后14、21、28 d各组取出2个HA植入物行组织学病理学检查,比较植入物纤维血管化的情况。**结果** 术后14 d,各组间纤维血管长度的平均值差异无统计学意义($F = 34.12, P > 0.05$);术后21 d,各组间纤维血管长度的平均值差异有统计学意义($F = 4.21, P < 0.05$);术后28 d,各组间纤维血管长度的平均值差异无统计学意义($F = 27.67, P > 0.05$)。术后14 d,各组HA植入物纤维血管化程度级别差异无统计学意义($H = 0.072, P > 0.05$);术后21 d,各组HA植入物纤维血管化程度级别差异有统计学意义($H = 3.684, P < 0.05$);术后28 d,各组HA植入物纤维血管化程度级别差异有统计学意义($H = 4.318, P < 0.05$)。**结论** 质量浓度为1.5 g/L及2.5 g/L的VEGF对HA植入物术后早期的纤维血管化具有促进作用。

关键词 血管内皮生长因子; 羟基磷灰石; 眼眶植入物

分类号 R 988.1 R 777.5 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0780-04

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)义眼台植入术是较理想的眼窝重建手术,但由于眼球壁前 1/6 的角膜区缺损或巩膜不同程度的萎缩,常需要异体巩膜来遮盖修补义眼台前端暴露部分。但是部分患者由于免疫排斥反应,使异体巩膜溶解坏死,导致义眼台暴露,其根本原因与植入物纤维血管化迟缓关系较大^[1]。目前对于植入物暴露缺乏有效的预防方法,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有促进新生血管生成的作用,本研究将 VEGF 应用于自体深筋膜覆盖的 HA 植入物中,观察不同质量浓度的 VEGF 对 HA 植入物纤维血管化的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植入材料 采用国产天然 HA 义眼台(博奥普 4000 型,北京金点睛科技有限公司),直径为 22 mm,孔径为 200 μm ,质量 4~5 g。将其在生理盐水中浸泡 5 min 后,从中央分成鼻侧和颞侧,分别用手术刀片将其加工制作成 2 个直径为 7~9 mm 的球形 HA。高温消毒,备用。

1.1.2 VEGF 溶液及滴眼液的制备 采用国产 VEGF (000279-R1,北京赛驰生物科技有限公司),用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)分别配制 0.5、1.5、2.5 g/L 的 VEGF 溶液和滴眼液。

1.1.3 动物分组 健康成年新西兰白兔 24 只(郑州实验动物中心提供),体重 1.75~3.00 kg;分为 A、B、C、D 4 组,每组 6 只,右眼为术眼。术前将各组已覆盖有自体深筋膜的 HA 植入物分别浸泡于生理盐水和 0.5、1.5、2.5 g/L VEGF 溶液 10 mL 的容器中,各组 HA 植入物均浸润 10 min。动物的使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 方 法

1.2.1 手术方法 手术均由同一操作者完成。用 25 mg/kg 氯丙嗪和 50 mg/kg 氯胺酮将动物麻醉。将右后下肢外侧兔毛剪掉 10 mm \times 40 mm 的区域,碘伏消毒铺巾,于股四头肌外侧中下 1/3 处切开皮肤,平行肌纤维取 10 mm \times 30 mm 的股四头肌深筋膜片备用;间断缝合伤口。用 1:20 庆大霉素和生理盐水混合液冲洗右眼结膜囊;常规消毒铺巾,开睑器开睑;沿角膜缘环形剪开球结膜,分离筋膜囊,暴露眼外肌,将眼外肌分离并做预置缝线后剪断肌肉,剪断视神经后将眼球完整摘除,用纱布块置于眼窝内压迫止血约 3 min,用处理好的自体深筋膜倒扣缝合包裹置于 HA 的前部(图 1),将其分别浸泡在不同质量浓度的 VEGF 溶液

中 10 min,使其直接位于肌锥内。将包装 HA 的塑料薄膜剪一小孔,直径 4~6 mm,义眼台底部正对孔洞放置,将用塑料薄膜包裹的 HA 植入眶内;眼外肌对位缝合后,用 5/0 丝线间断缝合筋膜囊和结膜。结膜囊置凡士林纱条,1/0 缝线缝合上下睑。

1.2.2 术后处理 术后 48 h 拆除兔上下睑缝线,取出结膜囊内凡士林纱条,A 组术后点用生理盐水,B、C、D 组分别点用 0.5、1.5、2.5 g/L 的 VEGF 滴眼液,每日 4 次,连续 28 d。

1.2.3 植入物的取材 各组分别于术后 14、21、28 d 处死 2 只动物,取出眶内植入物,将植入物从中间切开,分成鼻侧和颞侧,将颞侧部分置于 10% 甲醛液中固定,脱钙,石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,光镜下观察。

1.2.4 植入物纤维血管化的分级及其程度的判定标准 纤维血管化的程度由病理科医师进行判定。采用半定量方法计算纤维血管长入的情况,光镜下测定每个 HA 植入物标本的 3:00、6:00、9:00、12:00 方位的纤维血管长度,即纤维血管自 HA 植入物表面长入球内的距离,取其 4 个数值的平均值,进行分级。HA 植入物纤维血管化的分级^[2]:0 级为 HA 植入物球内无纤维血管长入;1 级为纤维血管长度 ≤ 1.4 mm;2 级为纤维血管长度 1.5~2.8 mm;3 级为纤维血管长度 2.9~4.2 mm;4 级为纤维血管长度 4.3~5.6 mm;5 级为纤维血管长度 ≥ 5.7 mm。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件对数据进行统计学处理,各测试指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据的方差齐性检验采用 Levene 分析,术后各组 HA 植入物纤维血管长度平均值的比较采用单因素方差分析,术后 HA 植入物纤维血管化程度级别的比较采用 Krustal-Wallis H 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 术后 HA 植入物纤维血管长度

A 组术后第 3 天、B 组术后第 5 天各有 1 只兔死亡;A 组术后 15 d、B 组术后 9 d、C 组术后 21 d 时各有 1 只兔眼发生植入物暴露,裂隙灯检查均见结膜囊内有较多分泌物,D 组未见植入物暴露。各组分别在第 14、21、28 天取出 2 只 HA 行组织病理学检查;术后 14 d 可见新生血管肉芽和大量炎性细胞(图 2),术后 21 d 可见新生血管、肉芽组织增多和少量炎性细胞(图 3),术后 28 d, D 组可见新生血管的管腔(图 4),术后 28 d, D 组新生血管和肉芽组织明显增多而炎性细胞显著减少(图 5)。各组纤维血管组织长入 HA 球

内的平均距离见表1。术后14 d,各组间纤维血管长度的平均值比较,差异无统计学意义($F = 34.12, P > 0.05$);术后21 d,各组间纤维血管长度的平均值比较,差异有统计学意义($F = 4.21, P < 0.05$);术后28 d,各组间纤维血管长度的平均值比较,差异无统计学意义($F = 27.67, P > 0.05$)。

表1 各组在不同时间HA长入纤维血管长度的平均值($\bar{x} \pm s, mm$)

Table 1 The mean fibrovascular length in different time and different groups($\bar{x} \pm s, mm$)

Group	Eyes	Fibrovascular length in postoperation		
		14 d	21 d	28 d
Control	5	0.63 ± 0.12	1.31 ± 0.16	2.35 ± 0.32
0.5 g/L VEGF	5	1.69 ± 0.14	1.77 ± 0.23	2.08 ± 0.31
1.5 g/L VEGF	6	1.77 ± 0.36	1.98 ± 0.29	3.25 ± 0.08
2.5 g/L VEGF	6	1.75 ± 0.21	3.65 ± 0.12	5.83 ± 0.34
<i>F</i>		34.12	4.21	27.67
<i>P</i>		>0.05	<0.05	>0.05

(One-way ANOVA)

2.2 术后HA植入物纤维血管化程度

各组在不同时间HA长入纤维血管程度的比较见表2。术后14 d,各组HA植入物纤维血管化程度比较差异无统计学意义($H = 0.072, P > 0.05$);术后21 d,各组HA植入物纤维血管化程度级别差异有统计学意义($H = 3.684, P < 0.05$);术后28 d,各组HA植入物纤维血

管化程度比较差异有统计学意义($H = 4.318, P < 0.05$)。

表2 各组在不同时间HA长入纤维血管程度级别的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of fibrovascular grade in different time and different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	Eyes	Grade of fibrovascular in different time		
		14 d	21 d	28 d
Control	5	1.37 ± 4.36	2.29 ± 7.24	3.21 ± 17.22
0.5 g/L VEGF	5	0.28 ± 6.53	1.73 ± 6.64	2.93 ± 15.79
1.5 g/L VEGF	6	0.39 ± 7.21	2.37 ± 9.31	2.34 ± 19.35
2.5 g/L VEGF	6	1.31 ± 12.50	1.24 ± 14.21	4.31 ± 20.21
<i>H</i>		0.072	3.684	4.318
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05

(Kruskal-Wallis *H* rank sum test)

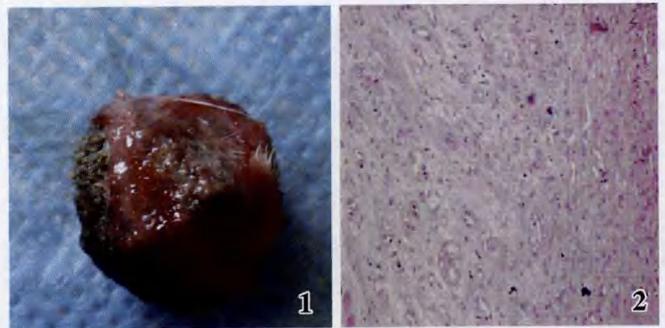


图1 深筋膜包裹的HA 图2 术后14 d可见新生血管肉芽和大量炎性细胞(HE ×40)

Fig.1 The hydroxyapatite orbital spheres embedded by quadriceps femoris fascia Fig.2 The new blood vessels bud and lots of inflammatory cells were found in 14 days after surgery under the light microscope(HE ×40)

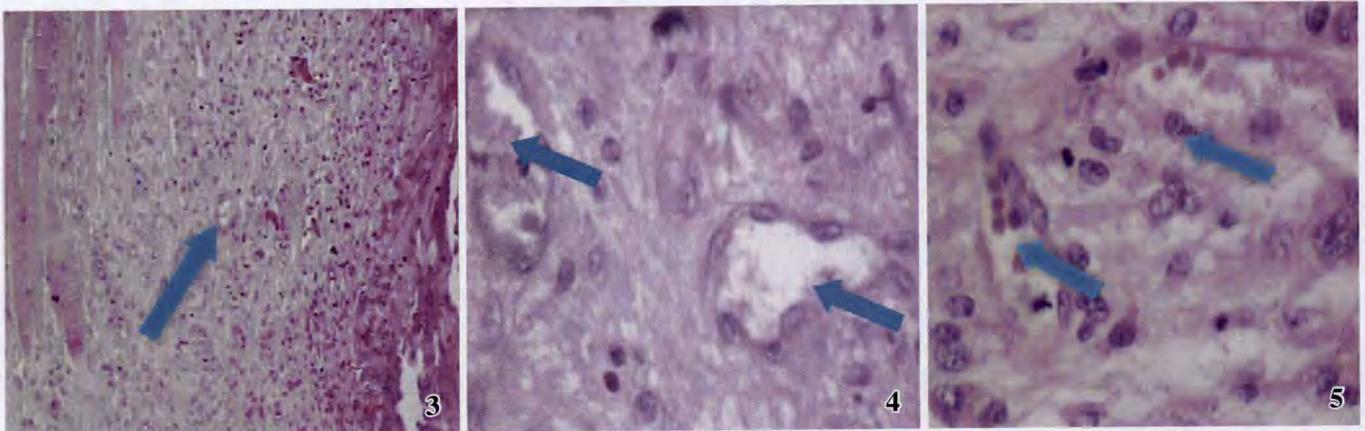


图3 术后21 d可见新生血管增多,肉芽增多和少量炎性细胞(箭头)(HE ×40) 图4 新生血管的管腔(箭头)(HE ×400) 图5 术后28 d新生血管增多,肉芽增多和少量炎性细胞(箭头)(HE ×100)

Fig.3 A lot of new blood vessels, granulation tissue and fewer inflammatory cells were seen in 21 days after surgery under the light microscope (arrow) (HE ×40) Fig.4 This photo was to exhibit the cavity of new blood vessels (arrow) (HE ×400) Fig.5 The new blood vessels and granulation tissue were obviously increased, but inflammatory cells were decreased in 28 days after surgery under the light microscope (arrow) (HE ×100)

3 讨论

各种原因导致的盲均有不同程度的眼球萎缩、眼窝凹陷,影响面部美观,义眼台植入术是主要的治疗方

法^[3]。通常术后放置合适的义眼片能达到近似健眼的逼真效果,但传统的手术方法及义眼片放置有如下常见的并发症:(1)感染。(2)排异反应,需手术取下义眼台。(3)因异物巩膜液化、坏死而暴露、感染^[4]。

Arvanitis 等^[5]报道 HA 植入眼眶后植入物暴露的发生率可达 23.5%。此外,在基层医院异物巩膜来源困难,部分患者需要二期手术。

发生植入物暴露标本的组织学检查发现纤维血管长入植入物的量较少,是其植入物暴露的主要原因^[6]。Buettner 等^[7]研究发现当植入物前极暴露时,前极部无纤维血管长入。本研究结果显示,暴露的 HA 植入物内可见大量炎性细胞浸润,纤维血管组织仅在其外周部,植入物中央部未见纤维血管组织。因此,植入物暴露的原因可能为植入物纤维血管化进展迟缓所致,如尽早促进 HA 植入物纤维血管化,可减少 HA 植入物暴露的发生率。

VEGF 也被称作血管渗透因子(vascular permeability factor, VPF)或血管调素,是一种特异作用于血管内皮细胞的强效多功能细胞因子^[8]。VEGF 与 VEGF 受体-21、VEGF 受体-22 及 Nrp21、Nrp22 结合,能诱导内皮细胞分裂、增生、迁移和形成管腔^[9]。在生理状态及肿瘤血管生成中,VEGF 是内皮细胞的一种强力的生存因子,可以诱导内皮细胞中抗凋亡蛋白的表达^[10]。VEGF 可增加内皮的渗透性,也可作用于内皮型一氧化氮合酶而增加一氧化氮的合成,从而引起血管舒张。VEGF 绝大部分作用于内皮细胞,也可通过结合造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)、单核细胞、造骨细胞及神经细胞上的 VEGF 受体发挥作用^[11]。VEGF 除了促进血管新生,还可以诱导 HSC 的骨髓动员、单核细胞分化、造骨细胞的成骨化及神经元保护^[12]。VEGF 特异性地作用于内皮细胞,使其分裂增生、转移,增加血管通透性,促进或诱导新生血管形成。其促进血管内皮细胞的有丝分裂作用是通过存在于内皮细胞表面 VEGF 的特异性受体所介导的^[13]。

本研究结果显示,1.5 g/L 及 2.5 g/L 的 VEGF 溶液对 HA 植入物术后早期的纤维血管化具有促进作用,术后 21 d 及 28 d 时,其纤维血管长入植入物的距离与对照组比较,差异无统计学意义,但其纤维化程度较对照组致密,而 0.5 g/L 的 VEGF 溶液对 HA 植入物的纤维血管化无促进作用。C 组和 D 组于术后第 14 天的纤维血管化较快,而 A 组于术后第 28 天时纤维血管化快。因此,本研究认为 VEGF 对术后早期的纤维血管化有促进作用;其最小适宜质量浓度为 1.5 g/L。

HA 义眼台植入物的良好覆盖对避免术后义眼台的脱出及暴露有重要意义,因此本研究在术中采取了

自体深筋膜减张缝合,使义眼台获得最大范围覆盖,避免了术后 HA 义眼台的脱出。

本研究在术后早期点用 VEGF 滴眼液,使其通过结膜创口渗透至植入物内,旨在早期促进植入物的纤维血管化。因此,对于缺乏自体巩膜或异物巩膜来源不足的情况下,采用自体深筋膜覆盖 HA 植入物是一种较好的选择;对于植入物暴露的患者,可局部应用 VEGF 滴眼液,以促使 VEGF 进入植入物尽快血管化。

参考文献

- 1 Nicaeus TE, Tolentino MJ, Adamis AP, et al. Sucralfate and basic fibroblast growth factor promote endothelial cell proliferation around porous alloplastic implants in vitro[J]. *Ophthalmol Plast Reconstr Surg*, 1996, 12(4): 235 - 239
- 2 黄丹平, 刘金凌, 李永平, 等. 碱性成纤维细胞生长因子应用于羟基磷灰石眶内植入物的研究[J]. *中华眼科杂志*, 2001, 37(5): 387 - 389
- 3 Shields CL, Shields JA, de Potter P. Hydroxyapatite orbital implant after enucleation. Experience with initial 100 consecutive cases[J]. *Arch Ophthalmol*, 1992, 110(3): 333 - 338
- 4 Remulla HD, Rubin PA, Shore JW, et al. Complications of porous spherical orbital implants[J]. *Ophthalmology*, 1995, 102(4): 586 - 593
- 5 Arvanitis P, Stratoudakis A, Alexandrou C. Secondary orbital implant insertion in an anophthalmic patient after orbital reconstruction[J]. *Orbit*, 2007, 26(4): 275 - 277
- 6 Goldberg RA, Holds JB, Ebrahimpour J. Exposed hydroxyapatite orbital implants: report of six cases[J]. *Ophthalmology*, 1992, 99(5): 831 - 836
- 7 Buettner H, Bartley GB. Tissue breakdown and exposure associated with orbital hydroxyapatite implants[J]. *Am J Ophthalmol*, 1992, 113(7): 669 - 673
- 8 Kempf VA, Lebeidziejewski M, Alitalo K, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angioimmunitis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections[J]. *Circulation*, 2005, 111(8): 1054 - 1062
- 9 Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(7): 1040 - 1050
- 10 Levine RJ, Maynard SE, Qain C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia[J]. *New Engl J Med*, 2004, 350(7): 672 - 683
- 11 杨怀新, 丁正平, 麦才铿, 等. 碱性成纤维细胞生长因子诱导角膜新生血管形成的实验研究[J]. *中国实用眼科杂志*, 1997, 15(11): 734 - 737
- 12 Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an antivascular endothelial growth factor antibody, of metastatic renal cancer[J]. *New Engl J Med*, 2003, 349(5): 427 - 434
- 13 Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 3657 - 3662

(收稿:2008-11-09 修回:2009-07-28)

(本文编辑:尹卫靖)