

## · 实验研究 ·

## 兔缺血性肢体 bFGF 动脉内灌注实验研究

张 靖, 杨文铎

【摘要】 目的 评价局部动脉内灌注碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)改善兔部分缺血的血管重建、血液灌流和肢体功能的功效。方法 选用成年雄性新西兰大白兔 27 只,外科结扎右股动脉各主要分支,制成右后肢部分缺血模型。每只兔子的左后肢作为非缺血对照组。27 只兔子随机分成 3 组,动脉内灌注 bFGF 组( $n=9$ )、静脉内灌注 bFGF 组( $n=9$ )和动脉内灌注生理盐水组( $n=9$ )。在动物模型制备当即及术后 8、15 d 分别给药或生理盐水 1 次,每次经动脉或静脉内给予 bFGF 的量为  $10\ \mu\text{g}$ (4 ml),或静脉给予同等量的生理盐水。各治疗组间以及组内缺血与非缺血肢体间的差异由以下指标评价:①术后 22 d 缺血区肌肉组织的血管断面数(VSC)、血管断面面积(VSS)和血管断面周长(VSP)的测算;②缺血肢体毛细血管再充盈时间的测定;③缺血肢体的功能和营养的观察。各组间的统计差异使用单侧检验的方差分析和  $t$  检验。结果 动脉内灌注 bFGF 组的 VSC、VSS 及 VSP 值较静脉内给药组和生理盐水组显著增高( $P<0.01$ )。术后 22 d 所有动脉内灌注 bFGF 组缺血肢体的毛细血管再充盈时间、新生生长、功能及外观均接近正常,而生理盐水组的肢体缺血性表现、毛细血管再充盈时间和肢体功能却无明显改善。静脉内给药组的各项评价指标与生理盐水组无统计学差异。结论 本实验研究证实经动脉内局部灌注 bFGF 法可明显促进缺血肢体的血管生长和血液灌流从而改善其局部血液供应。因此认为临床应用动脉内灌注 bFGF 治疗外周血管缺血性病变,是可取得比静脉内给药法更好的疗效。

【关键词】 成纤维细胞生长因子;碱性;灌注;动脉内;兔;动物模型

**Experimental study on intra-arterial infusion of basic fibroblast growth factor in the ischemic limbs of rabbit model** ZHANG Jing, YANG Wen-duo. Department of Radiology, Children's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510120, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect of intra-arterial infusion of basic fibroblast growth factor (bFGF) on improving neovascularization, vascular perfusion and the function of partially ischemic limbs of rabbits. **Methods** Twenty-seven New Zealand male rabbits were selected. Partial ischemia model was induced by surgical ligation of the primary branches of right femoral artery in each animal, and the left hind limb of each animal was served as a nonischemic control. Then, 27 rabbits were randomly assigned to three groups: intra-arterial (IA) infusion of bFGF ( $n=9$ ), intravenous (IV) infusion of bFGF and IA infusion of saline ( $n=9$ ). Infusion was separately performed immediately after vascular ligation, 8th and 15th days post-surgery with  $10\ \mu\text{g}$  (4 ml) of bFGF per-time (or the same volume of saline). The differences between three groups and between ischemic and nonischemic limbs of the same group were compared and evaluated by the following indexes: (1) vessel section count (VSC), vessel section surface area (VSS) and vessel section perimeter (VSP) in the field of ischemic muscle tissues taken at 22nd day postoperatively; (2) capillary refilling time of ischemic limbs; and (3) functional and trophic changes of ischemic limbs. Statistical differences were evaluated by one-way ANOVA and T test. **Results** VSC, VSS and VSP of the IA-bFGF group were significantly increased than those of the IV-bFGF and IA-saline groups ( $P<0.01$ ). At 22nd day postoperatively, the capillary refilling time, new hair growth, the appearance and function of all ischemic limbs in IA-bFGF group were approximately normal. However, in IA-saline group, the ischemic changes, capillary refilling time and the function of ischemic limbs were not improved significantly. All the indexes of IV-bFGF group showed no difference statistically from those of IA-saline group. **Conclusions** This experimental study identifies that intra-arterial infusion of bFGF may significantly promote neovascularization and vascular perfusion in ischemic limbs, suggesting that a better effect may be obtained with IA-infusion bFGF than that of IV-infusion bFGF. (J Intervent Radiol, 2005, 14: 67-70)

作者单位 510120 广州市儿童医院放射科介入室(张 靖);江西医学院第一附属医院放射科(杨文铎)

通讯作者 张 靖

【Key words】 Fibroblast growth factor, basic; Infusions, intra-arterial; Rabbit: Animal model

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是动物和人体组织中存在的一种微量蛋白,对多种中胚层和神经外胚层来源的细胞具有广泛的生物学活性,是一种多功能细胞因子<sup>[1,2]</sup>。研究显示,冠状动脉内灌注 bFGF 或直接心肌注射 bFGF,可改善心脏的收缩功能,缩小心肌梗死面积,增加梗死区小动脉和毛细血管数量等作用<sup>[3,4]</sup>。但外源性 bFGF 对外周血管缺血性疾病的作用研究较少。本研究通过使用 bFGF 局部动脉内灌注兔后肢缺血模型,观察其对缺血组织血管重建及功能恢复的影响,并与静脉内使用 bFGF 相比较,旨在揭示局部动脉内灌注 bFGF 改善外周血管缺血性疾病的作用,并探讨一种理想的给药方式。

## 材料与方法

### 一、实验对象、分组及药物准备

实验选用成年雄性新西兰大白兔 27 只(由江西医学院动物科学部提供),体重为 2.5~3.0 kg,平均 2.7 kg。按处理因素完全随机化分为三组,每组 9 只。局部动脉内灌注 bFGF(IA-bFGF),经兔耳缘静脉给予 IV bFGF;经局部 IA 给予生理盐水组(IA-Saline)。每组兔子再以左后肢作为非缺血对照组。本实验采用重组牛 bFGF(rb-bFGF),为每支 8 ml,含 rb-bFGF 20  $\mu$ g,由深圳亿胜生物制品有限公司提供。

### 二、动物模型制备<sup>[5,6]</sup>

成兔肌注氯胺酮(50 mg/kg)获得麻醉效果后,无菌条件下经右侧腹股沟韧带中点作一纵形皮肤切口,暴露股动脉后,自股动脉起始部分离股动脉及其各分支,在股动脉各主要分支起始处,用 4# 丝线逐支结扎,制成兔右后肢部分缺血模型。左后肢作为非缺血对照。

### 三、分组实验过程

(一)IA-bFGF 组 兔后肢部分缺血模型制备后,暴露右股动脉主干,使用 4.5# 儿科头皮针在直视下逆行进针穿刺右股动脉,使针尖抵髂外动脉腹股沟韧带上方 1 cm(相当于髂内动脉开口处),缓慢手推注入 bFGF 4 ml(10  $\mu$ g)。分别在制备缺血模型后立即、术后第 8、15 天用上法各给药 1 次,共给药 3 次。

(二)IV-bFGF 组 兔后肢部分缺血模型制备后,经耳缘静脉注入 bFGF 4 ml(10  $\mu$ g)。分别在制备缺血模型后立即、术后第 8、15 天用上法给药 1 次,

共给药 3 次。

(三)IA-Saline 组 兔后肢部分缺血模型制备后,同 IA-bFGF 组操作、给药时间、给药次数,但给予生理盐水 4 ml。

四、功能、外观改变及毛细血管再充盈时间(capillary refilling time)的观测

实验开始后每日观察实验兔一般健康状况。观察内容包括:皮肤和甲床颜色、切口愈合情况、新毛生长情况及右后肢运动持重情况,并作记录。用毛细血管再充盈时间观测缺血肢体的微循环灌流情况,在术后第 8、15 及 22 天分别进行测评。毛细血管再充盈时间测量方法由 2 名有经验的术者在双盲下完成:一术者用手对兔缺血右后肢甲床施加一定压力(以使甲床变白为度),10 s 后放开;另一术者手执秒表,观测甲床由白转红的时间<sup>[5]</sup>。

### 五、组织学检查及形态计量分析

术后第 22 天做完各项观察及评价后处死实验兔,取 1 cm×1 cm 大小的双侧后肢腓肠肌中段肌肉组织,以甲醛固定,石蜡包埋,按横断切片,片厚 4  $\mu$ m,每间隔 10 张取 1 张,共取 3 张,分别行 HE 染色。使用 CMIAS8 型真彩色电脑全自动图像分析系统(北京航空航天大学提供),在 400 倍视野下(统计场为 3852.54  $\mu$ m<sup>2</sup>)对切片行形态计量分析:计数固定统计场内血管断面数(vessel section count, VSC),计算固定统计场内血管断面总面积(vessel section surface area, VSS)及固定统计场内血管断面周长总和(vessel section perimeter, VSP)。

### 六、统计分析

各组数据均以  $\bar{x} + s$  表示,组内缺血与非缺血肢体参数间比较使用 *t* 检验,各组缺血肢体测量参数间比较使用单侧方差分析(one-way ANOVA)。组间比较使用 Student-Newman-Keuls 检验,对各组参数间进行 Bartlett 检验。

## 结果

### 一、外观及功能改变

术后 15 d, IA-bFGF 组 9 只中 7 只功能和外观有明显改善,其余 2 只亦见中等度改善,主要表现为剃毛区新毛生长较多,皮肤和甲床呈粉红色,切口愈合良好、无溃疡发生,缺血肢体行走及持重有明显改善。术后 22 d, IA-bFGF 组缺血肢体与非缺血对照肢体在功能与外观方面已非常接近。IA-Saline 组兔

缺血后肢外观和功能在整个实验中无明显改善 ,表现为 :皮温低 ,皮肤和甲床颜色呈暗紫色 ,新毛生长极少 ,切口多数愈合不良 ,重度跛行无明显改善。

二、毛细血管再充盈时间

表 1 显示各组兔缺血后肢在术后第 8、15 和 22 天的毛细血管再充盈时间。术后第 15、22 天 IA-bFGF 组比 IV-bFEF 组和 IA-Saline 组毛细血管再充盈时间有显著缩短 ,差异有显著性(  $P < 0.001$  )。术后第 22 天 IA-bFGF 组的毛细血管再充盈时间已基本正常。IV-bFGF 组比 IA-Saline 组的毛细血管再充盈时间稍有缩短 ,但其差异无显著性(  $P > 0.05$  )。

表 1 各组缺血后肢毛细血管再充盈时间比较

观察时间	IA-bFGF ( sec )	IV-bFGF ( sec )	IA-Saline ( sec )
术后第 8 天	14.71 ± 0.95	15.44 ± 1.14	15.68 ± 0.97
术后第 15 天	6.01 ± 0.86 *	14.78 ± 0.76	15.42 ± 1.10
术后第 22 天	3.30 ± 0.47 *	13.60 ± 1.48	14.37 ± 1.84

注 : \* IA-bFGF 组比 IV-bFGF 及 IA-Saline ,  $P < 0.001$

三、组织分析与形态计量

表 2 显示各组在 400 倍视野下 VSC、VSS 及 VSP (固定统计场为  $3852.54 \mu\text{m}^2$  )

IA-bFGF 组兔缺血肢体比非缺血肢体以及比 IV-bFGF、IA-Saline 组的 VSC、VSS 及 VSP 值均明显增高 ,其差异有显著性(  $P < 0.01$  )。IV-bFGF 组缺血肢体 VSC、VSS 和 VSP 值稍高于 IA-Saline 缺血肢体 ,但差异无显著性(  $P > 0.05$  )。

讨 论

一、bFGF 的作用

bFGF 是 FGF 家族的成员 ,为 146 个氨基酸组成、分子质量  $18 \times 10^3 \text{ ku}$  的小蛋白质分子。其等电点为 9.6 ,碱性 ,对热和酸敏感 ,易被蛋白酶降解 ,与肝素有特异性亲和力<sup>[7]</sup>。bFGF 在体内分布极为广泛 ,脑、心、肝、肾、肾上腺、骨、眼和胎盘等都有 bFGF 存在。在心血管系统中 ,血管内皮细胞、心肌细胞和平滑肌

细胞均有合成 bFGF 的能力。bFGF 是一种多功能的细胞因子 ,在体内的生物学功能相当广泛。它可作用于内皮细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、卵巢颗粒细胞、上皮细胞、肾上腺皮质及髓质细胞、骨细胞、晶状体和角膜上皮细胞等 ,因而具有以下多种作用 :①促进血管生成 ;②诱导中胚层形成 ;③促进肢体再生 ;④参与创伤修复过程 ,促进软组织、软骨组织和骨组织等损伤的修复 ;⑤具有神经营养作用 ,促进脑、脊髓组织损伤修复 ;⑥作用于中枢神经系统 ,抑制胃酸和胃蛋白酶的分泌 ,有利于溃疡的愈合 ;⑦影响内皮细胞功能 ,控制高血压和动脉粥样硬化 ;⑧影响免疫细胞活性 ,调节免疫系统功能等<sup>[8]</sup>。外周血管缺血性疾病的有效药物治疗是要求增加局部组织血液灌流、减少组织缺氧 ,从而改善肢体功能。在外周血管缺血性疾病治疗中的成血管概念来自几种专司正常和病理血管生长的多肽的最新发现 ,其中 bFGF 是体内最为有效的血管生长因子之一<sup>[9-11]</sup>。但目前的实验及临床研究多局限于局部注射或全身静脉给药 ,存在着药物用量较大、疗效不显著及潜在的致瘤性等问题。本研究使用缺血组织局部供血动脉的 bFGF 灌注 ,以观察其对缺血组织的血液灌流、血管重建以及缺血肢体外观与功能的影响。

二、缺血性疾病的 bFGF 局部动脉内灌注

bFGF 可趋化血管内膜的各类细胞 ,并诱导这些细胞表达组织重建所需的血浆酶原激活剂、胶原酶和蛋白水解酶等 ;这些酶类通过促使血管基底膜降解和刺激内膜各类细胞增殖与迁移 ,诱导血管内皮细胞长入胶原基质中形成管腔并促进神经元及新生血管共同生长<sup>[6,12]</sup>。这一作用在缺血性疾病(如心梗、股骨头缺血性坏死及间歇性跛行等)中具有重要意义<sup>[13-15]</sup>。研究结果显示<sup>[3]</sup> ,缺血心肌的 bFGF 局部动脉内灌注 ,可改善心脏的收缩功能 ,缩小梗死区面积 ,增加缺血区小动脉和毛细血管数量 ,增加侧支循环血流量。本研究结果显示 :IA-bFGF 组兔缺血肢体血液灌流、功能、外观均较对照组有明显改善 ;

表 2 组织形态计量分析

参数	IA-bFGF		IV-bFGF		IA-Saline	
	缺血	非缺血	缺血	非缺血	缺血	非缺血
VSC	10.72 ± 3.88 *	6.94 ± 2.02	7.72 ± 2.54	7.22 ± 2.07	6.78 ± 2.02	6.28 ± 1.87
VSS( $\mu\text{m}^2$ )	45.52 ± 11.05 *	29.22 ± 10.36	35.01 ± 8.66	30.53 ± 7.03	26.92 ± 5.34	31.06 ± 10.36
VSP( $\mu\text{m}$ )	9.41 ± 0.95 *	8.11 ± 1.19	8.76 ± 1.61	8.64 ± 1.13	8.02 ± 0.95	8.63 ± 1.83

注 : \* 比各组非缺血肢体及 IA-Saline 组缺血肢体 ,  $P < 0.01$

骨骼肌在高倍视野一定统计场内的血管断面数、血管断面面积及血管断面周长均明显增高,差异有极显著性( $P < 0.01$ );毛细血管充盈时间也较其他各组均明显缩短。表明 IA-bFGF 可刺激缺血组织血管生长、侧支循环形成并改善局部血液供应,从而在外周血管缺血性疾病的治疗作用中可能取得较好的疗效。此外,相同剂量的 bFGF 动脉内灌注比静脉内给药能形成较高的局部浓度,作用范围局限,有利于降低药物不良反应,提高耐受性及减少治疗费用。因此,我们认为外周血管缺血性疾病应用 bFGF 治疗时,应尽可能采用动脉内灌注方法。

本研究结果证实 IV-bFGF 组兔缺血肢体外观、功能、毛细血管充盈时间以及 VSC、VSS 和 VSP 值的改善,与 IA-Saline 组无差异,说明 IV-bFGF 改善缺血组织血液供应及血管重建的效果不佳。但 Rakue 等<sup>[16]</sup>对犬股动脉结扎后静脉内团注 bFGF 20  $\mu\text{g}$  的实验结果显示实验组的血管分支及数量均有明显增加,与本研究结果不一致。可能与给药剂量及时间不同等有关,有待进一步研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, et al. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res*, 2003, 57 : 8-19.
- [ 2 ] 李志欣, 贺能树, 张云亭, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠局灶性脑缺血的保护作用与 bax 表达. *介入放射学杂志*, 2001, 10 : 164-166.
- [ 3 ] Sakakibara Y, Tambara K, Sakaguchi G, et al. Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 24 : 105-111.
- [ 4 ] Unger EF, Banai S, Shou M, et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol*, 1994, 266 : H1588-H1595.
- [ 5 ] Hopkins P, Bulgrin P, Sims L, et al. Controlled delivery of vascular endothelial growth factor promotes neovascularization and maintains limb function in a rabbit model of ischemia. *J Vasc Surg*, 1998, 27 : 886-895.
- [ 6 ] Pu LL, Holme KR, Symes JF. Heparinase enhances collateral vessel development in the ischemic limb. *Int Surg*, 2002, 87 : 260-268.
- [ 7 ] Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L, et al. Transloklin is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol*, 2003, 5 : 433-439.
- [ 8 ] Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor: chemical structure and biologic function. *Clin Orthop*, 1990, 157 : 231-248.
- [ 9 ] Miyatake M, Ishikawa K, Katori R. Basic fibroblast growth factor increased regional myocardial blood flow and limited infarct size of acutely inaracted myocardium in dogs. *Angiology*, 1998, 49 : 381-390.
- [ 10 ] Battler A, Scheinowitz M, Hasdai K, et al. Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 22 : 2001-2006.
- [ 11 ] Frank W, Roger J, Elazer R, et al. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early result. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65 : 1540-1544.
- [ 12 ] Ruth L, William C, Ndoye A. Regulation of new blood vessel growth into ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 1998, 28 : 919-928.
- [ 13 ] Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, et al. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36 : 1239-1244.
- [ 14 ] Udelsion JE, Dilsizian V, Laham RJ, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation*, 2000, 102 : 1605-1610.
- [ 15 ] Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 2000, 85 : 1414-1419.
- [ 16 ] Rakue H, Nakajima H, Katoh T, et al. Enhanced angiogenesis and growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hind limb insufficiency. *Jpn Circ J*, 1998, 62 : 933-939.

( 收稿日期 2003-11-07 )

作者: 张靖, 杨文铎  
作者单位: 张靖(510120, 广州市儿童医院放射科介入室), 杨文铎(江西医学院第一附属医院放射科)  
刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC PKU**  
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY  
年, 卷(期): 2005, 14(1)  
被引用次数: 0次

参考文献(16条)

1. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium 2003
2. 李志欣, 贺能树, 张云亭 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠局灶性脑缺血的保护作用与bax表达 [期刊论文] - 介入放射学杂志 2001
3. Sakakibara Y, Tambara K, Sakaguchi G Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor 2003
4. Unger EF, Banai S, Shou M Basic fibroblast growth factor inhances myocardial collateral flow in a canine model 1994
5. Hopkins P, Bulgrin P, Sims L Controlled delivery of vascular endothelial growth factor promotes neovascularization and maintains limb function in a rabbit model of ischemia 1998
6. Pu LL, Holme KR, Symes JF Heparinase enhances collateral vessel development in the ischemic limb 2002
7. Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L Translokine is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking 2003
8. Gospodarowicz D Fibroblast growth factor: chemical structure and biologic function 1990
9. Miyatake M, Ishikawa K, Katori R Basic fibroblast growth factor increased regional myocardial blood flow and limited infarct size of acutely inaracted myocardium in dogs 1998
10. Battler A, Scheinowitz M, Hasdai K Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor inhances angiogenesis in infracted swine myocardium 1993
11. Frank W, Roger J, Elazer R Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early result 1998
12. Ruth L, William C, Ndoe A Regulation of new blood vessel growth into ischemic skeletal muscle 1998
13. Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial 2000
14. Udelson JE, Dilsizian V, Laham RJ Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease 2000
15. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris 2000
16. Rakue H, Nakajima H, Katoh T Enhanced angiogenesis and growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hind limb insufficiency 1998

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfsxzz200501022.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200501022.aspx)

授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: 24fc37db-4e74-436e-9fdb-9e1c000100d4

下载时间: 2010年10月27日