

· 基础研究 ·

表皮生长因子在急性鼻窦炎黏膜修复过程中的作用及机制

王鹏举, 沈莹

(湖北省襄樊市中心医院耳鼻咽喉科, 湖北襄樊 441021)

摘要: **目的** 观察表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)对实验动物急性鼻窦炎鼻窦黏膜的愈合作用, 以及其受体在鼻窦黏膜愈合过程中的表达变化。**方法** 在鼻窦炎动物模型建立后将兔麻醉, 打开上颌窦前壁, 在内镜下于上颌窦底做一黏膜缺损区。左侧上颌窦为对照组, 每天用生理盐水处理窦腔; 右侧上颌窦为实验组, 每天应用含 EGF 的生理盐水进行窦腔处理。并取未经任何处理的兔子作为正常组。在实验开始后 1、2、3、4 周, 各随机处死 6 只动物, 比较观察两侧上颌窦黏膜创面愈合情况, 以及表皮生长因子受体表达情况。**结果** 实验组 EGF 可有效促进鼻窦黏膜创面愈合, 创面上皮化明显高于对照组, 并且局部创缘表皮生长因子受体(EGFR)表达显著高于对照组。**结论** EGF 可通过刺激局部组织 EGFR 的表达从而促进鼻窦黏膜上皮化。

关键词: 表皮生长因子; 鼻窦黏膜; 创面愈合; 鼻窦炎动物模型

中图分类号: R765.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)01-0016-05

Effect and mechanism of epidermal growth factor in healing of nasal sinus mucosa in acute sinusitis

WANG Peng - ju , SHEN Ying

(Department of Otorhinolaryngology , Center Hospital of Xiangfan City , Xiangfan 441021 , China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of epidermal growth factor (EGF) on the healing of sinus mucosa impairment and the expression of EGF-receptor in sinus mucosa. **Methods** The model rabbits with rhinogenic sinusitis were anaesthetized, the anterior maxillary wall of each rabbit was opened surgically and mucosa defects were made at the inferior maxillary wall. For each rabbit, the right maxillary sinus was chosen as experimental side (experimental group) and treated with mixture of EGF and normal saline; the left sinus as control side (control group) and treated with normal saline only. At the time-points of 1, 2, 3 and 4 weeks after surgery, every time 6 rabbits were sacrificed, then the healing status of maxillary sinus mucosa and the expression of EGF-receptor in both groups were observed and comparatively analysed. **Results** EGF could enhance the healing of mucosa defects. The epithelialization rate and expression of EGF-receptor in the experimental group were higher than those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** EGF can facilitate the epithelialization of sinus mucosa via stimulating the expression of EGF-receptor.

Key words: Epidermal growth factor; Sinus mucosa; Wound healing; The model rabbits with sinusitis

表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)是最早报道的一类多肽生长因子, 对多种细胞具有促增殖作用, 能加速上皮及黏膜

基金项目: 湖北省科技攻关计划项目(2007AA402C27)。

作者简介: 王鹏举, 男, 主任医师, 副教授, 硕士。

通讯作者: 王鹏举, Email: wangpju@sohu.com.

组织的再生和修复^[1]。以往研究表明,EGF能促进皮肤溃疡、角膜损伤、口腔溃疡、外伤性鼓膜穿孔等创面的修复与愈合^[2-3]。然而,对EGF是否参与鼻腔鼻窦黏膜创伤的修复以及其作用机制如何目前报道较少。本研究在动物实验的基础上探讨EGF在急性鼻窦炎鼻窦黏膜修复过程中的作用及其机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

体重2~3 kg健康新西兰大白兔30只,雌雄不限。动物单独分笼喂养、自由饮水、进食。随机取6只作为正常组,余24只进行实验处理。

1.2 材 料

表皮生长因子(EGF)为美国Sigma公司产品,用生理盐水配制成20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF溶液;小鼠抗表皮生长因子受体(EGFR)单克隆抗体以及S-P超敏试剂盒,美国MBI公司产品,购自上海生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建立急性鼻窦炎动物模型 24只动物适应性喂养3 d。肌注氯胺酮(50 mg/kg)麻醉,将Merocel高分子膨胀海绵(美敦力公司)剪成大小为0.3 cm \times 0.22 cm \times 2.5 cm海绵条,完全植入动物双鼻腔内,再注入5 ml金黄色葡萄球菌菌液使之膨胀阻塞鼻腔^[4]。所有动物对鼻腔填塞耐受性较好,无1只非正常死亡。

1.3.2 鼻窦手术模型的建立 在鼻窦炎动物模型的基础上进行模拟鼻窦手术,该过程必须严格无菌操作,具体方法如下:兔鼻背正中先行备皮。动物肌注氯胺酮(50 mg/kg)麻醉后,常规消毒、铺巾,沿鼻背正中线切一纵长切口,向两侧分离皮下组织及骨膜。用磨钻打开双侧上颌窦前壁,在直径2.7 mm鼻内镜直视下,于双侧上颌窦底做0.5 cm \times 0.55 cm大小的黏膜缺损区,用碘复消毒手术创面,将骨膜、皮肤逐层缝合。左侧上颌窦为对照侧,右侧上颌窦为实验侧,分别做以下处理。

1.3.3 药物治疗 实验组应用20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF生理盐水进行治疗。治疗时严格无菌操作,用1 ml注射器抽取20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF生理盐水0.5 ml于上颌窦前壁注入上颌窦内,每天1次。对照组操作相同,只是用生理盐水代替EGF生理盐水注入上颌窦内。在治疗开始后1、2、3、4周各随机处死6只动物。

1.4 观察指标

1.4.1 鼻内镜检查 动物处死后,打开左右上颌窦,用直径2.7 mm鼻内镜对手术区进行观察,比较两侧上颌窦黏膜缺损区愈合情况,以肉眼观察黏膜缺损区完全上皮化为愈合标准,计算左右两侧上颌窦内创面愈合数。

1.4.2 免疫组化染色 动物处死后,打开左右上颌窦,在内镜下切取创缘及周围健康黏膜,10%甲醛固定,常规石蜡包埋,常规切片,采用SP超敏免疫组化试剂盒染色,微波修复抗原,步骤按照试剂盒说明进行,以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.4.3 结果判断 细胞膜和细胞浆出现棕黄色颗粒者为EGRF阳性细胞,根据染色强度^[5]分为弱阳性(淡黄色),中等阳性(棕色),强阳性(棕褐色)。应用多媒体彩色免疫组化病理图像分析系统对染色结果进行定量分析,在实验组、对照组及正常组黏膜切片中随机选取5张切片,每张切片选5个高倍视野($\times 400$),均以胞膜和胞浆出现棕黄色为阳性细胞,计数阳性细胞,取其均值。

1.5 统计学方法

采用SPSS10.0统计软件,对实验组、对照组及正常组第1、2、3、4周黏膜EGRF阳性细胞进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 内镜检查情况

术后第1周,实验组与对照组黏膜创面无明显区别,以出血、渗出、水肿、结痂为主;术后第2周,分泌物减少,水肿减轻,创面边缘出现黏膜上皮增生,实验组上颌窦表现更为明显;术后第3周,实验组9只兔子

上颌窦黏膜缺损区完全上皮化, 对照组有 3 只; 术后第 4 周, 实验组 21 只兔子上颌窦黏膜缺损区完全上皮累及 15 个, 对照组为 6 只。经过 χ^2 检验, 4 周后实验组、对照组上颌窦黏膜创面愈合率有显著差异。

2.2 免疫组化染色

正常上颌窦黏膜上皮及杯状细胞可见少量阳性颗粒, EGRF 呈弱阳性表达(图 1); 药物治疗后 1 周, 实验组与对照组之间上颌窦邻近创面的黏膜上皮细胞比较差异不明显, 可见少量棕色颗粒, EGFR 呈中等强度阳性表达(图 2)。药物治疗 2 周, 实验组黏膜上皮细胞 EGFR 表达明显增强, 棕褐色颗粒细胞明显增多; 而对照组 EGFR 阳性细胞的染色虽比 1 周后增强, 但棕褐色颗粒细胞数较实验组少(图 3)。3 周后实验组黏膜上皮细胞 EGFR 强阳性表达, 对照组 EGFR 阳性细胞的染色细胞数也明显增多。第 4 周后随着创面的上皮化, 实验组愈合区域 EGFR 表达明显减弱, 又呈现弱阳性局灶性表达。

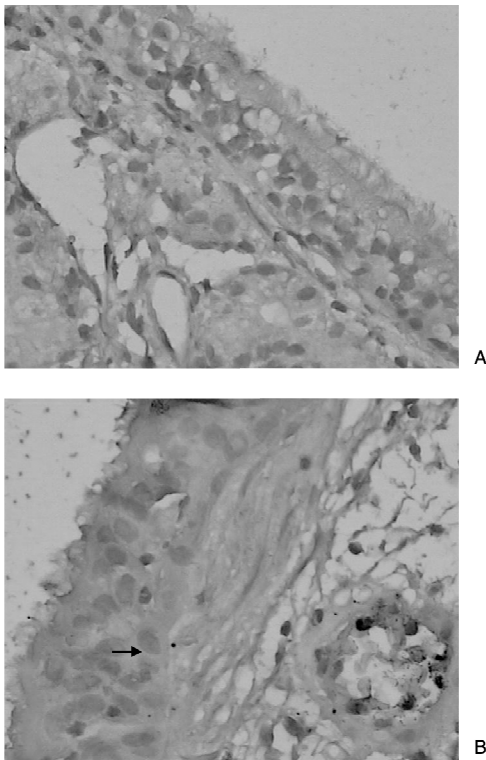


图 1 EGFR 免疫组化 (SP 染色, $\times 400$)

A. PBS 阴性对照; B. 正常兔上颌窦黏膜 EGFR 弱阳性表达

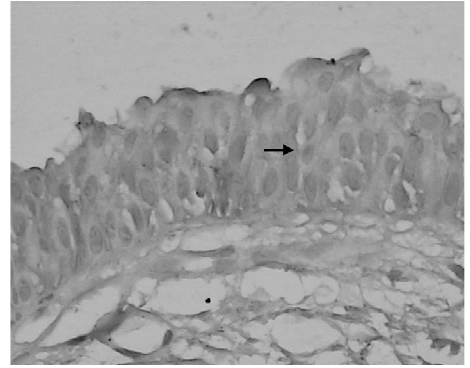


图 2 术后 1 周实验组鼻窦黏膜创缘 EGFR 的表达增强, 胞浆内可见少量棕色颗粒 (SP 染色, $\times 400$)

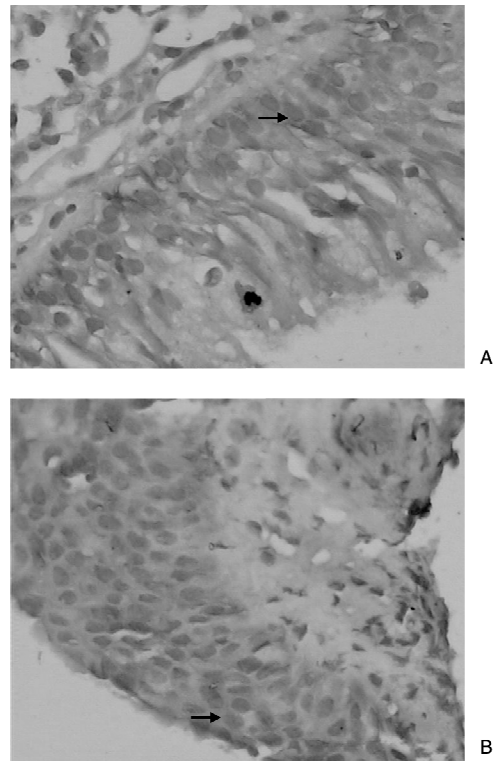


图 3 术后 2 周 EGFR 免疫组化 (SP 染色, $\times 400$)

A. 对照组鼻窦黏膜创缘呈中等强度表达; B. 实验组鼻窦黏膜创缘呈强阳性表达

2.3 不同时间正常组、对照组及实验组 EGFR 阳性细胞比较

不同时间正常组、对照组及实验组 EGFR 阳性细胞数见表 1。术后第 1 周, 虽然对照组黏膜创缘上皮细胞 EGFR 表达有所增强, 但 EGFR 阳性细胞数与正常黏膜的差异无显著性 ($P > 0.05$); 而实验组黏膜

创缘 EGFR 呈强阳性表达,阳性细胞数与正常组、对照组相比有显著性差别 ($P < 0.05$)。术后第 2 周,实验组 EGFR 的表达达到高峰,实验组 EGFR 阳性细胞数明显高于对照组,两侧阳性细胞数差异有显著性,且与正常组也有显著性差别 ($P < 0.05$)。术后第 3 周,实验组 EGFR

的表达仍维持在高水平,对照 EGFR 的表达也到达高峰,两组阳性细胞数的差异无显著性 ($P > 0.05$);术后第 4 周,实验组 EGFR 的表达有所减弱,实验组 EGFR 阳性细胞数与正常组无显著性差异 ($P > 0.05$),而对对照组 EGFR 阳性细胞数与正常组、实验组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 1 不同时间 EGFR 在各组鼻窦黏膜创面边缘中阳性表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
正常组	27.4±1.05	25.7±1.26	26.8±2.04	28.4±2.1
对照组	32.0±1.50	40.1±1.6*	59.4±1.1*	56.7±1.53*
实验组	49.1±2.15 [▲]	63.2±2.06 ^{▲*}	62.4±1.74*	40.2±2.1
F 值	3.672	9.218	9.573	5.724

注:▲ 与对照组、正常组比较 $P < 0.05$; * 与正常组比较 $P < 0.05$

3 讨论

EGF 是由 53 个氨基酸构成的单链多肽,它是由 Cohen 于 1962 年从雄性颌下腺中分离提取了一种可刺激生长的活性物质,并发现多种组织来源的细胞增殖有明显促进作用^[1]。EGF 与其受体结合后,促进表皮细胞和纤维母细胞、炎症细胞的化学趋向移动、分化、增殖,在维护上皮组织完整和创伤愈合中起重要作用^[5]。以往研究已表明,EGF 在治疗皮肤溃疡、角膜损伤、胃溃疡、骨折、外伤性鼓膜穿孔方面有很好作用,其基因合成产物重组人表皮生长因子也已用于创伤外科和眼科临床^[2-3]。但对 EGF 在鼻腔、鼻窦黏膜创伤修复过程中的作用以及作用机制研究甚少。

本研究先用膨胀海绵阻塞动物鼻腔建立急性鼻源性鼻窦炎动物模型,然后在内镜下模拟鼻窦炎手术,造成鼻窦黏膜缺损,观察 EGF 对鼻窦黏膜创伤修复的影响。结果发现,在正常鼻窦黏膜细胞中有 EGF 及其受体的表达,这与以往报道一致^[6]。EGFR 主要定位于假复层纤毛柱状细胞、杯状细胞的细胞膜、细胞浆中,但染色较浅。在急性炎症后,黏膜创缘 EGFR 的表达开始增强,但由于干预方式不同,实验组与对照组上颌窦黏膜创缘 EGFR 的表达也出现不同的变

化。在用 EGF 处理的右上颌窦,黏膜创缘 EGFR 在术第 2 周既到达表达高峰,一直持续到第 3 周,第 4 周后开始减弱;而用生理盐水处理的左侧上颌窦黏膜创缘 EGFR 的表达高峰出现在第 3 周。可见外源性应用 EGF 可以促进黏膜创面早期表达 EGFR,且无论是实验组还是对照组,局部 EGFR 表达具有一定规律性,既在创伤中期达到最大值,以后恢复至正常水平^[2]。从上颌窦创面愈合情况看,早期双侧黏膜创面无明显区别,以出血、渗出、水肿、结痂为主;第 2 周后,双侧黏膜创面即出现不同变化,EGF 处理的右侧黏膜创面愈合情况明显好于左侧,说明使用外源性的 EGF 能促进鼻窦黏膜创面早期修复,加速创面上皮化形成,缩短上皮化时间。

创面愈合过程有四个阶段即止血阶段、炎症阶段、增生阶段和重塑阶段。影响因素有年龄、营养、创面面积和全身性疾病等,同时又受生长因子的调控。EGF 是重要的创面修复因子,在促进创面上皮化方面具有明显优势。研究认为,EGF 是成纤维细胞的催化剂和促分裂剂,刺激其增殖并合成胶原纤维,促进伤口愈合。EGF 促进创面愈合的分子机制主要在于:EGF 与细胞膜上的 EGF 受体结合后,通过受体的自磷酸化、激活蛋白 G 和磷酸脂酶 C 等一系列生化反应,改变细胞内的钙离子浓度,促进糖酵解

及蛋白质 RNA 和 DNA 的合成,从而促使细胞分裂和增值。烫伤创面应用 EGF 可加速毛细血管的重建,增加胞外基质的沉积,促进角化细胞的迁移,从而能促进体表创面愈合及再上皮化^[7-8]。在创面修复时,虽 EGFR 数量增加,内源性 EGF 也在修复位点聚集,但内源性的 EGF 含量普遍较低,即使所有积累在创面的内源性 EGF 均能与受体结合,其分子环境中 EGF 仍达不到最适水平,难以满足细胞增殖和生长的最大需要。因此,理论上外源性 EGF 应用于术后创面,可补充内源性细胞因子的不足,提高愈合速度。本实验中,给予 EGF 处理的右侧上颌窦创面上皮化率明显高于左侧,显示了 EGF 的促愈作用,同时在伤后早期右侧黏膜创缘即可见强阳性颗粒,反映了 EGF 对 EGFR 的诱导合成作用。正是由于这种对 EGFR 的诱导作用,外源性 EGF 与细胞表面的 EGF 受体(EGFR)结合而发挥作用,促进了黏膜创面的早期愈合。

在本研究中未发现应用 EGF 后黏膜出现息肉等异常增生现象,表明外源性应用 EGF 虽然可以通过促进创面局部 EGFR 的早期表达来促进组织愈合,但 EGFR 的表达仍然是处于机体自身调控机制下,未发现过度表达引起组织异常增生。说明组织修复是一个复杂而有序的生物过程,每一个修复阶段都受到机体精细的调节,生长因子由于受到剂量以及应用时间的限制,在其中仅起一个“促进”作用,并不能决定组织修复的最后方向。

功能性鼻内镜手术是治疗慢性鼻窦炎、鼻息肉的最理想方法,其目的是恢复鼻窦黏膜形态和功能。术腔的上皮化是评定手术疗效的重要依据标准。手术仅仅是整个治

疗方案中的第一步,手术后紧接着就是上皮再生恢复阶段的开始。手术创面愈合(或称为上皮化)时间的长短受到许多因素的影响,如病变特点、病情轻重、手术范围、手术医师的手术经验等。如何促进术腔早日上皮化,是广大鼻科医生及患者共同关注的话题。通过本研究有效地证明了 EGF 可通过诱导局部组织表达其受体从而促进鼻窦黏膜创面愈合,为临床应用 EGF 提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Laato M, Niinkoski J, Lundberg C, et al. Effect of epidermal growth factor (EGF) on experimental granulation tissue[J]. *J Surg Res*, 1986, 41(3): 252-255.
- [2] 杨海玲,孙正,刘晓勇,等.表皮生长因子对口腔溃疡愈合的促进作用及机理探讨[J].*北京口腔医学杂志*,2004,12(2):70-72.
- [3] 杜晓燕,林刃舆.表皮生长因子及其受体在中耳慢性鼓膜穿孔病变中的作用[J].*中华耳鼻咽喉科杂志*,2004,39(11):669-671.
- [4] 王鹏举,沈莹.实验性鼻窦炎的病理及细菌学变化[J].*中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2008,14(4):268-272.
- [5] Grzybowski J, Oldak E, Janiak MK. Local application of G-CSF, GM-CSF and EGR in treatment of wounds[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 1999, 53(1): 75-86.
- [6] Lee HM, Choi JH, Chae SH, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and its ligands in chronic sinusitis[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2003, 112: (2) 132-138.
- [7] Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, et al. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(21): 7340-734.
- [8] Ando Y, Jensen PJ. Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration[J]. *J Invest Dermatol*, 1993, 100(5): 633-639.

(修回日期:2009-12-15)