

生肌玉红胶原海绵修复创面损伤***

严婷婷¹, 熊猛¹, 周勇², 姚昶²

Sheng Ji Yu Hong collagen matrices for repair of skin wound

Yan Ting-ting¹, Xiong Meng², Zhou Yong², Yao Chang²

Abstract

BACKGROUND: *Sheng Ji Yu Hong* collagen matrices can obviously promote wound healing.

OBJECTIVE: To observe the effect of *Sheng Ji Yu Hong* collagen matrices on rabbit skin wound healing.

METHODS: Three full-thickness skin wounds were made and repaired with *Sheng Ji Yu Hong* collagen matrices, BFGF agent, normal saline solution, separately. Healing time, healing ratio, number of fibroblasts, hemeoxygenase-1 level, transforming growth factor β 1 mRNA and protein expression, and proliferating cell nuclear antigen expression were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: *Sheng Ji Yu Hong* could promote the proliferation of fibroblasts more remarkably than BFGF agent and normal saline ($P < 0.05$), increase expressions of hemeoxygenase-1 level, transforming growth factor β 1 and proliferating cell nuclear antigen ($P < 0.05$), elevate healing rate ($P < 0.05$), and shorten healing time ($P < 0.05$). *Sheng Ji Yu Hong* collagen matrices can promote skin wound healing obviously, and the mechanism maybe relates to elevate the expression of hemeoxygenase-1 level and transforming growth factor β 1, and preserve the activity of prosthetic cells.

Yan TT, Xiong M, Zhou Y, Yao C. Sheng Ji Yu Hong collagen matrices for repair of skin wound. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(29):5367-5370. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 生肌玉红胶原海绵能显著促进创面愈合。

目的: 观察生肌玉红胶原海绵对兔皮肤创面愈合的影响。

方法: 在新西兰白兔背部制造3处全层皮肤缺损创面, 分别以生肌玉红胶原海绵、贝复剂(重组碱性成纤维细胞生长因子外用溶液)、生理盐水修复。观察各组创面愈合时间、创面愈合率, 检测创面修复组织内成纤维细胞数、血红素氧化酶1、转化生长因子 β 1 mRNA与蛋白及增殖细胞核抗原蛋白表达。

结果与结论: 与贝复剂、生理盐水比较, 生肌玉红胶原海绵可显著促进成纤维细胞增殖($P < 0.05$), 增加创面血红素氧化酶1、转化生长因子 β 1及增殖细胞核抗原的表达($P < 0.05$), 提高创面愈合率($P < 0.05$), 缩短创面愈合时间($P < 0.05$)。证实生肌玉红胶原海绵能够促进创面修复, 其作用机制可能是通过提高创面血红素氧化酶1、转化生长因子 β 1表达促进细胞增殖, 增加成纤维细胞等创面修复细胞。

关键词: 生肌玉红胶原海绵; 创面愈合; 血红素氧化酶1; 转化生长因子 β 1; 增殖细胞核抗原

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.29.012

严婷婷, 熊猛, 周勇, 姚昶. 生肌玉红胶原海绵修复创面损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(29):5367-5370. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

中医对体表溃疡的研究历史悠久, 早在《黄帝内经》上就从病机对创疡形成作出了系统阐述, 为后世治法的明确提供了理论依据^[1]。

生肌玉红膏药方源自《外科正宗》, 是“外科收敛药中神药”, 用后可使“腐肉易脱, 新肉即生, 疮口自敛”, 临床多用于疮疡脓水将尽, 肉芽生长缓慢者, 其主要成分为当归、紫草、血竭、白腊、白芷、甘草、轻粉, 具有活血解毒、润肤生肌的功效。但临床使用为油膏制剂, 以纱布为载体, 吸湿性差。胶原, 尤其是 I 型胶原, 是生物体各种结缔组织的主要成分, 具有促进组织愈合, 可体内降解且降解碎片具有组织相容性的特性, 已成为组织工程中应用最广的生物材料^[3]。将修饰后的胶原作为生肌玉红膏敷料载体,

可发挥两者促创面愈合的优势。

1 材料和方法

设计: 分组样本对比观察。

时间及地点: 于2010-09/2011-02在东南大学整形外科实验中心完成。

材料: 健康雄性新西兰白兔24只, 由南京农业科学院实验动物中心提供, 许可证号scxk(苏2007-0004), 体质量200~250 g, 实验前1周购入。生肌玉红膏由江苏省中医院药剂研究室提供, 批号Z11021309; 肝素修饰后的明胶海绵胶原由江苏省中医院药剂研究室提供。贝复剂(重组碱性成纤维细胞生长因子外用溶液)(国药准字SI0980077)、生理盐水(国药准字H32023209)、血红素氧化酶1、转化生长因子 β 1及增殖细胞核抗原免疫组织化学试剂盒购自武

¹Department of Plastic Surgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; ²Department of General Surgery, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Yan Ting-ting★, Studying for master's degree, Department of Plastic Surgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
yan_xiaomao@163.com

Correspondence to: Yao Chang, Associate chief physician, Department of General Surgery, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30973756*; Leading Talent Project of Traditional Chinese Medicine in Jiangsu Province, No. LJ200902*

Received: 2011-03-07
Accepted: 2011-05-09

¹东南大学附属中大医院整形外科, 江苏省南京市210009; ²江苏省中医院普外科, 江苏省南京市210009

严婷婷★, 女, 1982年生, 安徽省淮南市人, 汉族, 东南大学医学院在读硕士, 主要从事创面愈合研究。
yan_xiaomao@163.com

通讯作者: 姚昶, 副主任医师, 江苏省中医院普外科, 江苏省南京市210009

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)29-05367-04

收稿日期: 2011-03-07
修回日期: 2011-05-09
(20110307008/GW·W)

汉博士德生物工程公司。

实验方法:

生肌玉红明胶海绵的制备与消毒: 将生肌玉红膏(主要药物成分有当归、紫草、血竭、白腊、白芷、甘草, 去除轻粉)0.1 mL(含20 g剂量)均匀搅拌于肝素修饰后的明胶海绵胶原(直径3 cm, 厚度0.2 cm)中^[1], 接着行低温(-20 °C)冻干形成生肌玉红明胶海绵。药物制备后用玻璃器皿密封, 予⁶⁰Coγ射线辐照, 每周消毒1次。

实验动物造模: 健康新西兰白兔24只, 术前24 h禁食不禁水。兔耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉, 麻醉成功后, 剔除兔背部区域毛15 cm×20 cm, 用外科剪在兔背面脊柱旁约2 cm处制造直径为3 cm大小开放性全层皮肤缺损圆形创面, 至肌筋膜深层, 左侧1个, 右侧2个, 上下创口之间相距4 cm, 止血^[2]。

实验动物分组与干预方法: 将创面随机分为中药组、贝复济组、生理盐水组, 分别在创面上分别覆盖生肌玉红胶原海绵(含0.1 mL生肌玉红膏提取液), 贝复剂0.1 mL, 生理盐水0.1 mL, 无菌纱布包扎固定, 待清醒后单笼饲养。术后每组隔日换药1次, 剂量相同, 直至创面完全上皮化。

创面愈合率: 用标准透明方格胶片为直接测量术后创面面积, 然后以同样的方法计算出术后第3, 5, 7, 10, 14天未愈合创面的面积, 计算创面愈合率。

$$\text{愈合率} = (\text{原始创面面积} - \text{未愈合创面面积}) / \text{原始创面面积} \times 100\%$$

创面愈合时间: 记录各组造模后至创面愈合时间。

组织病理学检查: 伤后第3, 5, 7, 10, 14天取创面边缘至创面中心的宽约1cm修复组织, 固定后行苏木精-伊红染色用普通光镜观察, 在400倍数下, 各组标本任取5个视野, 计数每个视野内成纤维细胞的数目。

免疫组织化学染色检测血红素氧化酶1、增殖细胞核抗原、转化生长因子β1的表达水平: 按照DouSP免疫组织化学双染试剂盒说明操作步骤。空白对照实验用PBS代替一抗。阳性细胞胞浆被染成棕黄色。免疫组织化学图像分析应用美国Media Cybernetics 公司专业图片分析软件Image-Pro Plus 6.0。每张标本在×400高倍光镜下随机取5个视野, 测定血红素氧化酶1、转化生长因子β1平均积分吸光度值(IDP)及统计增殖细胞核抗原的阳性表达的细胞总数。

RT-PCR检测修复组织中血红素氧化酶1、转化生长因子β1 mRNA表达: 用凝胶图像分析仪进行半定量测定, 以血红素氧化酶1或转化生长因子β1与Actin的比值代表血红素氧化酶1或转化生长因子β1 mRNA的相对表达量。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS17.00处软件

进行统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据行t 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组创面愈合时间比较 各组创面愈合时间以中药组最短, 为(16.75±0.95) d; 生理盐水组最长, 为(22.00±0.81) d; 贝复剂组为(19.00±0.82) d。中药组创面愈合时间快于生理盐水组、贝复剂组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.2 各组创面愈合率比较 见表1。

表1 各组创面愈合率的比较
Table 1 Comparison of wound healing rate in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, %)

Time (d)	Normal saline group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3	11.00±2.05	12.95±2.94	15.50±1.97 ^a
5	20.27±1.77	28.00±2.21	36.07±1.84 ^a
7	39.62±1.62	47.05±1.19	57.42±2.34 ^a
10	48.50±1.42	57.77±1.35	72.12±2.53 ^a
14	61.92±2.37	82.65±1.51	92.97±1.04 ^a

^a $P < 0.05$, vs. other two groups

由表1可见, 术后第3天起, 各时相点创面愈合率都以中药组愈合率最高, 与生理盐水组、贝复剂组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 各组修复组织组织形态学观察结果 见表2。

表2 各组成纤维细胞数的比较
Table 2 The comparison of the number of fibroblasts ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, %)

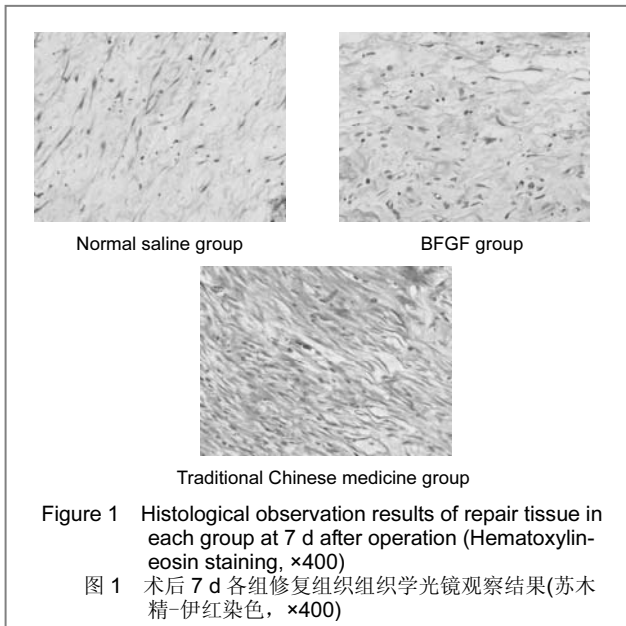
Time (d)	Normal saline group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3	20.80±7.56	30.80±6.14	52.80±5.71 ^a
5	32.80±3.70	45.40±7.76	61.60±6.50 ^a
7	40.80±3.19	56.20±6.76	71.40±10.16 ^a
10	44.20±7.39	60.20±8.40	77.80±9.31 ^a
14	28.80±5.11	42.00±4.84	55.60±7.92 ^a

^a $P < 0.05$, vs. other two groups

由表2可见, 生肌玉红胶原海绵促进成纤维细胞增殖作用最为显著, 各时相点生理盐水组、贝复剂组成纤维细胞数量均低于中药组($P < 0.05$)。

术后7 d, 生理盐水组镜下可见较多炎性细胞浸润, 梭状成纤维细胞少, 胶原纤维增生、排列紊乱。贝复剂组仍有炎性细胞浸润, 成纤维细胞增殖不显著, 排列紊乱。中药组有大量成纤维细胞, 胶原纤维开始平行排列, 且排列致密; 毛细血管数量较多, 见图1。

生理盐水组修复组织中血红素氧化酶1呈微弱阳性表达, 贝复剂组表达有所增加, 中药组表达最高, 与生理盐水组、贝复剂组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。各组修复组织血红素氧化酶1蛋白的表达见图2。



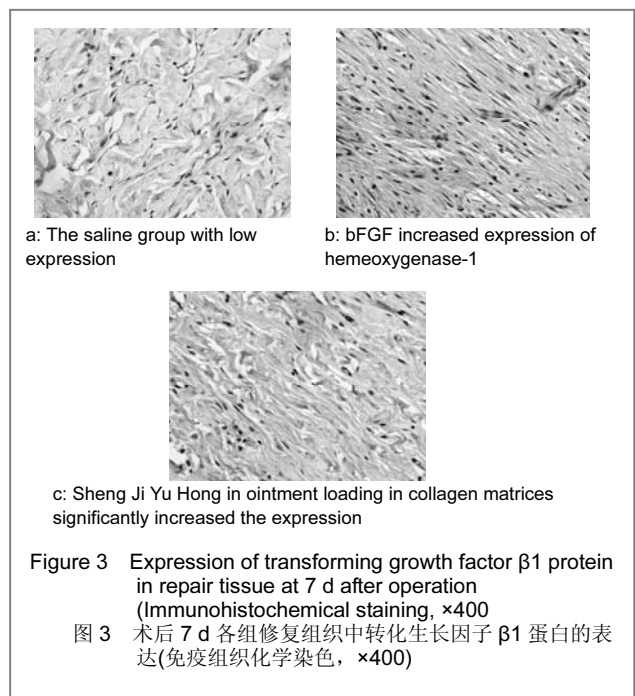
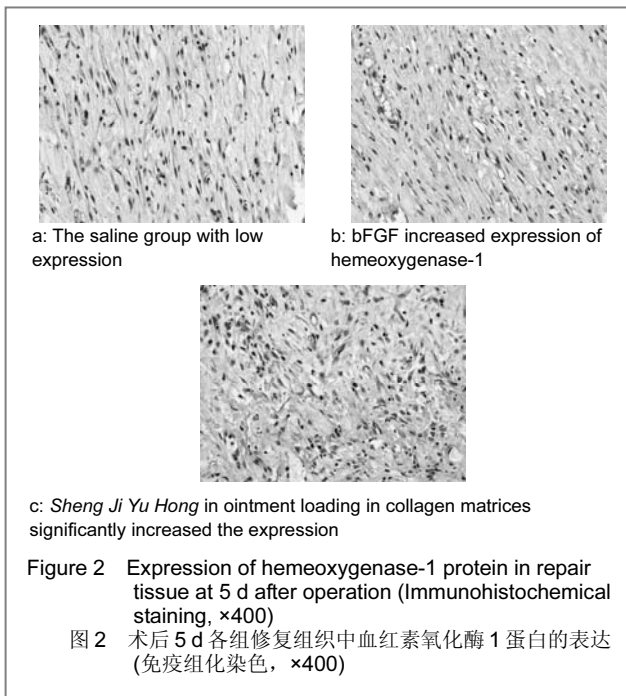
2.5 各组修复组织中转化生长因子β1蛋白的表达变化见表4。

表 4 各组修复组织中转化生长因子 β1 蛋白的比较
Table 4 Comparison of transforming growth factor β1 protein in repair tissue in each group (x±s, n=4, Integral absorbance values)

Time	NS group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3 d	0.10±0.13	0.14±0.11	0.21±0.24 ^a
5 d	0.12±0.00	0.16±0.00	0.22±0.19 ^a
7 d	0.14±0.00	0.16±0.00	0.27±0.00 ^a
10 d	0.15±0.00	0.18±0.00	0.25±0.00 ^a
14 d	0.12±0.01	0.14±0.00	0.23±0.02 ^a

^aP < 0.05, vs. other two groups

生理盐水组修复组织中转化生长因子β1呈微弱阳性表达, 贝复济组表达有所增加, 中药组表达最高, 与生理盐水组、贝复剂组比较, 差异有显著性意义(P < 0.05), 见图3。



2.4 各组修复组织中血红素氧化酶1蛋白的表达变化见表3。

表 3 各组修复组织中血红素氧化酶 1 蛋白的比较
Table 3 Comparison of hemeoxygenase-1 protein in repair tissue in each group (x±s, n=4, Integral absorbance value)

Time (d)	Normal saline group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3	0.12±0.13	0.15±0.10	0.20±0.18 ^a
5	0.12±0.00	0.18±0.00	0.21±0.18 ^a
7	0.13±0.00	0.18±0.01	0.23±0.21 ^a
10	0.15±0.12	0.19±0.00	0.24±0.21 ^a
14	0.09±0.00	0.17±0.00	0.19±0.13 ^a

^aP < 0.05, vs. other two groups

2.6 各组修复组织中增殖细胞核抗原的表达变化见表5。

表 5 各组修复组织中增殖细胞核抗原阳性细胞数的比较
Table 5 Comparison of proliferating cell nuclear antigen-positive cells number in repair tissue in each group (x±s, n=4, n)

Time (d)	Normal saline group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3	3.75±2.63	20.00±1.82	26.75±3.30 ^a
5	8.50±1.29	23.00±4.24	34.00±4.96 ^a
7	4.00±3.91	31.50±13.72	69.00±14.37 ^a
10	9.75±2.50	26.75±6.65	61.00±6.83 ^a
14	4.25±1.70	25.75±8.65	45.75±4.34 ^a

^aP < 0.05, vs. other two groups

2.7 各组修复组织中血红素氧化酶1与转化生长因子β1 mRNA的表达变化 见表6, 7。

表6 各组修复组织中血红素氧化酶1 mRNA 的比较
Table 6 Comparison of hemeoxygenase-1 mRNA in repair tissue in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Time (d)	Normal saline group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3	0.38±0.22	0.64±0.30	0.97±0.18 ^a
5	0.47±0.30	0.81±0.43	1.02±0.25 ^a
7	0.68±0.29	0.97±0.17	1.12±0.25 ^a
10	0.73±0.17	0.86±0.24	0.98±0.57 ^a
14	0.47±0.22	0.69±0.20	0.80±0.21 ^a

^aP < 0.05, vs. other two groups

表7 各组修复组织中转化生长因子β1 mRNA 的比较
Table 7 Comparison of transforming growth factor β1 mRNA in repair tissue in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Time (d)	Normal saline group	BFGF agent group	Traditional Chinese medicine group
3	0.28±0.17	0.57±0.22	1.05±0.20 ^a
5	0.51±0.02	1.00±0.77	1.43±0.17 ^a
7	0.82±0.25	1.10±0.18	1.28±0.02 ^a
10	0.72±0.25	1.04±0.12	1.30±0.38 ^a
14	0.59±0.18	0.76±0.29	0.91±0.42 ^a

^aP < 0.05, vs. other two groups

中药组修复组织中转化生长因子β1及血红素氧化酶1 mRNA表达均高于生理盐水组与贝复济组(P < 0.05)。

3 讨论

研究表明, 血红素氧化酶1及转化生长因子β1对创面愈合起关键作用。血红素氧化酶系统是创面愈合的分子开关, 损伤形成后创面出血、溶血及细胞损伤等可能导致游离的血红素和血红素蛋白聚集在此, 他们具有促炎症反应和促氧化反应的性质, 诱导黏附分子的表达, 引起血管通透性增加及白细胞的浸润^[5]。实验显示中药组创面伤后5, 7, 10 d 血红素氧化酶1的蛋白及mRNA表达均显著高于贝复剂组和生理盐水组(P < 0.05), 提示生肌玉红胶原海绵促进创面愈合是通过提高创面中血红素氧化酶1的水平, 增加血管通透性, 刺激血管内皮细胞加速血管化, 为创面提供血液等营养物质, 加快创面愈合速度。

在创面修复中, 转化生长因子β1作为炎性细胞与修复细胞间信号载体的肽类生长因子对修复行为进行了广泛的调控^[6-7], 本实验贝复剂组伤后3 d创面有少量转化生长因子β1表达, 并随时间的推移其表达量逐渐增加, 伤后10 d转化生长因子β1表达最多。而中药组转化生长因子β1开始表达和表达高峰的时间明显提前, 分别为伤后的第5天和第7天, 可见生肌玉红胶原海绵能有效增加转

化生长因子β1的表达, 从而促进创面愈合。

增殖细胞核抗原增殖细胞核抗原又被称为细胞周期蛋白, 是与细胞周期相关的核蛋白, 增殖细胞核抗原的表达与细胞的增殖状态密切相关^[8-9]。本实验中增殖细胞核抗原的阳性细胞数结果说明生肌玉红胶原海绵除了具有增加表达血红素氧化酶1及转化生长因子β1来促进创面愈合外, 还有很强的促进表皮、毛囊、内皮等细胞增殖的作用, 这也是生肌玉红胶原海绵比贝复剂更能促进皮肤缺损愈合的原因之一。

本实验同时证实中药组治疗创面面积缩小明显, 愈合速度快, 与生理盐水组及贝复剂组对照创面比较差异有显著性意义(P < 0.01); 局部应用生肌玉红胶原海绵使创面愈合时间较贝复济平均提前3d(P < 0.05), 较生理盐水平均提前6 d(P < 0.01), 表明局部应用生肌玉红胶原海绵具有促进表皮细胞增殖、分化、加速以表皮层修复为特点的创面愈合过程。组织学观察表明各时间段生肌玉红胶原海绵组成纤维细胞数明显多于盐水组及贝复剂组(P < 0.05)。生肌玉红胶原海绵能显著的提高创面中成纤维细胞数, 加速创面肉芽组织形成和上皮化, 缩短创面愈合时间, 显著促进皮肤创面愈合。

4 参考文献

- [1] Fu XB, Zhonghua Shiyuan Waikexue Zazhi. 1999; 16(5): 479. 付小兵. 几种用于创伤修复研究的动物模型[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(5): 479.
- [2] Yao C, Markowicz M, Pallua N, et al. The effect of cross-linking of collagen matrices on their angiogenic capability. *Biomaterials*. 2008; 29 (1): 66-74.
- [3] Hutmacher DW, Kirsch A, Ackermann KL, et al. A tissue engineered cell - occlusive device for hard tissue regeneration—a preliminary report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001; 21(1): 49-59.
- [4] Fu XB, W DW. Beijing: Renmin Junyi Chubanshe. 1997: 16. 付小兵, 王德文. 创伤修复基础[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997: 16.
- [5] Wagener FADTG, van Beurden HE, von den Hoff JW, et al. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood*. 2003; 102(2): 521.
- [6] Hanselmann C, Mauch C, Werner S. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? *Biochem J*. 2001; 353(Pt 3): 459
- [7] Goh L, Murphy SK, Mukherjee S, et al. Genomic sweeping for hypermethylated genes. *Bioinformadcs*. 2007; 23 (3): 281.
- [8] kong WJ, zhang S, Guo CK, et al. Effect of methylation-associated silencing of the death - associated peotein kinase gene on nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Drugs*. 2006; 17(3): 251.
- [9] Cheng B, Fu XB, Sheng ZY, et al. *Zhongguo Weizhong Bing Jijiu Yixue*. 2002; 14(7): 397. 程颺, 付小兵, 盛志勇, 等. 成纤维细胞生长因子对烫伤大鼠原癌基因和抑癌基因蛋白的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(7): 397.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金项目(30973756), 江苏省中医药领军人才项目(LJ200902)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计与实施, 实验评估为所有作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 第二、三作者审核, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。