

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.12.018 [http://www.crter.org]
罗秋燕, 李慧智, 边文玲, 王莉莉. 红花注射液保存人胎羊膜贴敷皮肤切口[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(12):2210-2217.

红花注射液保存人胎羊膜贴敷皮肤切口**

罗秋燕, 李慧智, 边文玲, 王莉莉

新乡医学院第三附属医院妇产科, 河南省新乡市 453003

文章亮点:

- 1 中药红花内服或静脉给药可促进血管内皮生长因子水平增加, 但外用贴敷创口能否引起血管内皮生长因子增加却鲜有报道。
- 2 实验首次发现了中药红花联合羊膜外用对损伤早期可增强血管内皮生长因子表达, 同时减少感染率, 二者具有协同作用。
- 3 实验采用更为科学的积分吸光度反应组织中血管内皮生长因子的表达情况, 弥补了以往单纯应用定性指标的不足, 使结果更加客观。从而为实现对促进切口愈合、减少瘢痕形成的干预和治疗奠定基础。
- 4 结果证实, 经红花注射液保存后的人胎羊膜在大鼠皮肤切创愈合的早期阶段, 可促进创缘周围血管内皮生长因子的表达, 将其贴附创面能明显减少创口的感染率、促进创口的愈合。

关键词:

生物材料; 细胞外基质材料; 人胎羊膜; 红花注射液; 切创愈合; 血管内皮生长因子; 瘢痕; 省级基金; 生物材料图片文章

摘要

背景: 血管内皮生长因子参与创伤组织修复, 可促进与创面愈合。

目的: 观察红花注射液保存人胎羊膜对大鼠皮肤切创愈合中感染率及血管内皮生长因子表达的影响。

方法: 建立大鼠皮肤切创模型, 建模后随机分成4组, 分别以纱布、羊膜、及红花注射液处理过的胎儿羊膜贴敷在切口表面, 于切创后2, 3, 5, 7 d取大鼠切口皮肤组织应用免疫组织化学染色, 通过计算机图像分析系统检测大鼠切口皮肤组织中血管内皮生长因子的表达情况, 同时观察切口感染率。

结果与结论: 切创后2, 3 d, 红花+羊膜组的血管内皮生长因子的表达明显高于其他3组($P < 0.05$)。切创后5 d, 红花+羊膜组感染率(5%)较其他3组明显减少($P < 0.05$)。结果证实, 经红花注射液保存后的人胎羊膜在大鼠皮肤切创愈合的早期阶段, 可促进创缘周围血管内皮生长因子的表达, 将其贴附创面能明显减少创口的感染率、促进创口的愈合。

第一作者并通讯作者: 罗秋燕*, 女, 1978年生, 汉族, 吉林省吉林市人, 2002年长春中医学院毕业, 硕士, 主治医师, 讲师。

luoqiuyan2002@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344(2013)12-02210-08

收稿日期: 2012-12-19

修回日期: 2013-01-16

(20121022004/WJ·W)

Safflower injection-preserved human amniotic membrane is applied in skin wound

Luo Qiu-yan, Li Hui-zhi, Bian Wen-ling, Wang Li-li

Department of Gynecology and Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Vascular endothelial growth factor can participate in tissue repair and promote wound healing.

OBJECTIVE: To observe the infection rate and vascular endothelial growth factor expression during the healing of rat skin wound following treated with human amniotic membrane preserved by the safflower injection.

Luo Qiu-yan★, Master,
Attending physician, Lecturer,
Department of Gynecology and
Obstetrics, the Third Affiliated
Hospital of Xinxiang Medical
University, Xinxiang 453003,
Henan Province, China

Corresponding author: Luo
Qiu-yan, Department of
Gynecology and Obstetrics, the
Third Affiliated Hospital of
Xinxiang Medical University,
Xinxiang 453003, Henan
Province, China
luoqiuyan2002@163.com

Supported by: the Financial
Assistance Project from Henan
Science and Technology
Bureau, No. 082102310084*

Received: 2012-12-19
Accepted: 2013-01-16

METHODS: Rats were randomly divided into four groups after skin wound modeling. The wounds were stuck with gauze, amniotic membrane and amniotic membrane saved with safflower injection. Skin tissue samples of rats were taken at 2, 3, 5, 7 days after wound for immunohistochemical staining. Then the expressions of vascular endothelial growth factor and infection rate were detected with auto image analysis system.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression of vascular endothelial growth factor was much higher in the rats treated with human amniotic membrane saved with safflower injection than the others at days 2 and 3 after wound ($P < 0.05$). The infection rate of skin wound in the rats treated with human amnion saved with safflower injection (5%) was less than that of the other groups at day 5 after wound ($P < 0.05$). Results showed that the human amniotic membrane preserved by safflower injection could not only enhance the expression of vascular endothelial growth factor around the area of injury in the initial stage, but also reduce the infection rate of skin wound, thereby promoting wound healing in rats.

Key Words: biomaterials; extracellular matrix materials; human amniotic membrane; safflower injection; wound healing; vascular endothelial growth factor; scar; provincial grants-supported paper; biomaterial photographs-containing paper

Luo QY, Li HZ, Bian WL, Wang LL. Safflower injection-preserved human amniotic membrane is applied in skin wound. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(12): 2210-2217.

0 引言

由于各种因素的影响, 中国剖宫产率逐年提高, 随之带来的剖宫产切口感染问题及切口的修复过程中细胞因子的研究亦逐步受到重视。探索创伤修复过程的形成机制以求达到理想的组织修复, 一直是外科基础研究的重要课题。

组织的创伤修复首先通过肉芽组织增生, 溶解吸收损伤局部的坏死组织及其他异物, 并填补组织缺损, 此后肉芽组织转化为胶原纤维为主的瘢痕组织, 修复便告完成。肉芽组织和瘢痕组织的形成过程包括: 血管生成, 成纤维细胞增殖和迁移, 细胞外基质成分的积聚和纤维组织的重建。创伤修复是一个复杂而有序的生物学过程, 每一个修复阶段均受到机体精细的调节, 其中血管内皮生长因子被认为是作用最强、特异性最高的调控因子。血管内皮生长因子又称血管通透因子, 是一种同型二聚体糖蛋白^[1], 其主要生物学功能: ①促进血管生存和血管发生, 诱导新血管形成。②维持血管正常状态和完整性, 增加血管通透性。③促进血浆蛋白在细胞基质中沉积, 增加组织血流灌注以及改善组织缺血状态^[2-4]。

人胎羊膜是一种天然高分子生物材料, 系胎盘即中药紫河车的一部分(羊膜的胎儿面), 是胎盘中细胞生长、分化最活跃的部分, 具有益气养血之功效。羊膜外敷具有防御功能, 减少切口感染率, 对创面愈合具有促进作用。羊膜还含胶原、糖蛋白、蛋白多糖、整合素和板层体等多种成分, 它能表达多种上述生长因子及其mRNA的相关蛋白, 能为细胞的增殖、分化提供丰富的营养成分, 有利于细胞的生长繁殖。羊膜外用具有防御功能, 可阻止细菌入侵、免疫排斥反应低^[5]。现在它已被广泛应用于外科、皮肤科、眼科及泌尿生殖科等等。

血管内皮生长因子已在周围血管疾病、肿瘤、糖尿病、创伤修复及组织重建领域得到广泛研究和初步应用。有研究表明, 活血化瘀中药内服促进血管内皮生长因子水平增加, 但外用贴敷创口能否引起血管内皮生长因子增加鲜有报道。鉴于此, 实验主要观察红花液保存胎膜贴敷创口后对创口感染率及血管内皮生长因子的影响, 以期为促进切口愈合、减少瘢痕形成的干预和治疗奠定基础。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2010年1月至2011年1月在新乡医学院基础医学院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 健康成年清洁级SD雄性大鼠80只, 体质量300–400 g, 由新乡医学院实验动物中心提供, 动物许可证号SCXK(豫)2010-0019。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

羊膜: 新鲜人羊膜均取自新乡医学院第三附属医院妇产科健康剖宫产产妇的胎盘(年龄、孕产胎次等影响因素除外), 根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书^[6]。选择产前血清学检查已排除艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎及梅毒等传染性疾病, 无胎膜早破、胎粪污染, 羊水澄清的胎盘。无菌条件下用生理盐水反复冲洗去除血凝块, 通过羊膜与绒毛膜间的潜在空隙进行钝性分离羊膜, 无菌生理盐水反复漂洗后剪成6 cm×3 cm小块, 放入体积分数0.1%的洗必泰中浸泡消毒10 h备用, 使用前再次用无菌生理盐水冲洗^[7]。

红花注射液: 红花注射液为中药红花有效成分提取物, 含有红花黄色素、红花醌苷、红花素及新红花苷; 20 mL/支, 每毫升注射液相当于红花原生药0.5 g, 由山西亚宝药业集团股份有限公司提供, 国药准字Z14020783, 局部外敷创面。

将上述处理过的部分羊膜片置入红花注射液中浸泡12 h后取出, 转移到消毒后的中性硅玻璃瓶内, 封闭瓶口置于4 °C冰箱中保存备用。

红花注射液保存人胎羊膜贴敷大鼠皮肤切口实验的试剂及仪器:

Reagents and instruments for rat skin wound stuck with safflower injection-preserved human amniotic membrane:

试剂及仪器	来源
免疫组织化学 SP 试剂盒	北京博奥森生物技术有限公司, 中国
DAB 显色剂、抗原修复液、多聚赖氨酸	北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国
生物显微镜	Olympus BHS 型, 日本
轮转式组织切片机	Leica RM2016 型, 德国
图像分析软件	Media Cybernerics, 美国

方法:

大鼠皮肤创模模型的建立及分组: 将符合纳入标准的全部80只大鼠经体积分数5%水合氯醛0.5–0.7 mL/kg腹腔麻醉。消毒铺巾后在背中线旁约1 cm处做长约4 cm纵行切口, 止血后间断缝合皮下组织及皮肤, 切口表面干燥、无渗血渗液。建模成功后, 将80只大鼠随机分成4组: 对照组、羊膜组、红花组及红花+羊膜组, 每组20只, 同时每组又设创伤后2, 3, 5, 7 d共4个时间点, 每个时间点5只。

对照组用纱布覆盖切口并包扎; 红花组、羊膜组、红花+羊膜组分别将红花注射液、处理过的羊膜(胎儿面)贴敷在切口表面, 纱布覆盖、包扎。分笼饲养, 3 d后换药, 羊膜组与红花+羊膜组不换羊膜敷料。分别于创伤后2, 3, 5, 7 d处死大鼠进行实验。

血管内皮生长因子免疫组织化学染色: 采用免疫组织化学SP法检测切口皮肤组织中血管内皮生长因子的表达。步骤如下: 取材后均放入40 g/L多聚甲醛中固定12 h后, 常规切片、脱蜡、水化。0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)抗原热修复15 min, 置于体积分数3% H₂O₂中, 室温下孵育10 min, PBS冲洗5 min×3次, 体积分数5%正常山羊血清封闭, 室温下孵育15 min。大鼠抗人血管内皮生长因子单克隆抗体作为一抗(1:400, 北京中杉金桥生物技术有限公司, SC-7269), 4 °C过夜后37 °C孵育1 h, PBS冲洗5 min×3次, PBS代替一抗作为阴性对照。滴加二抗, 37 °C孵育20 min, PBS冲洗5 min×3次。链霉卵白液, 37 °C孵育15 min, PBS冲洗5 min×3次。DAB显色5 min, 自来水冲洗, 苏木精复染, 体积分数1%的盐酸乙醇分化, 自来水冲洗, 脱水透明, 中性树脂胶封固, 过夜干燥。免疫组织化学SP法染色、DAB显色均按说明书进行^[8-10]。

染色后, 在高倍显微镜(x400)下观察并采集信号, 用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行形态定量分析检测吸光度, 并记录其平均值, 即积分吸光度。观察结果: 10%以上细胞质呈棕黄色者为血管内皮生长因子阳性表达, 10%以下为阴性表达; 吸光度越大, 表示其含量越高^[11]。

切口感染诊断标准: 根据国家卫生部医改司医院感染监测小组制定的医院感染诊断标准, 切口处有红、肿、热、痛、脓性分泌物是切口感染的主要诊断依据^[12]。

主要观察指标: 在每次换药和取材前大体观察大鼠生命体征及创面情况并记录, 包括: 肉芽的生长情况、是否有新鲜的血管生成、有无渗液等; 愈合过程中皮瓣的颜色、质地、组织水肿、坏死、炎症情况及有无肿胀。

若大鼠皮肤切口处出现上述感染指征, 即可判定出现切口感染。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用率表示。结果数据采用SPSS 13.0统计学软件进行数据处理, 组间数据的比较采用因素方差分析和 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入大鼠80只均进入结果分析, 无死亡及脱失值。

2.2 大鼠创缘皮肤组织血管内皮生长因子的表达 切创后2, 3 d, 红花+羊膜组的皮肤组织血管内皮生长因子积分吸光度明显高于其他3组($P < 0.05$)。切创后5, 7 d, 4组的血管内皮生长因子表达均差异无显著性意义

($P > 0.05$)。见表1。

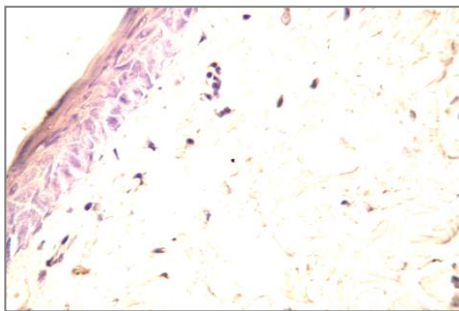
表 1 切创后大鼠皮肤组织血管内皮生长因子积分吸光度变化
Table 1 The integral absorbance value of vascular endothelial growth factor after rat skin injury ($\bar{x} \pm s, n=5$)

切创后时间(d)	对照组	羊膜组	红花组	红花+羊膜组
2	0.71±0.09	0.79±0.08 ^a	2.74±0.13 ^a	3.69±0.39 ^a
3	0.69±0.11	0.67±0.06 ^a	1.91±0.09 ^a	3.78±0.18 ^a
5	0.65±0.05	0.70±0.08	0.71±0.08	0.74±0.10
7	0.46±0.04	0.42±0.02	0.43±0.04	0.43±0.04

与同一损伤时间对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

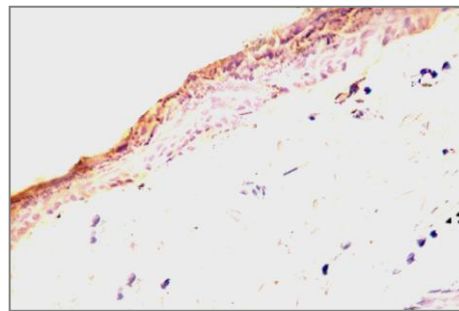
注: 切创后 2, 3 d, 红花+羊膜组的血管内皮生长因子积分吸光度明显高于其他 3 组。

以创后2 d为例, 4组创面皮肤组织免疫组织化学染色情况, 见图1。



注: 对照组 VEGF 阳性细胞较少。

A: 对照组



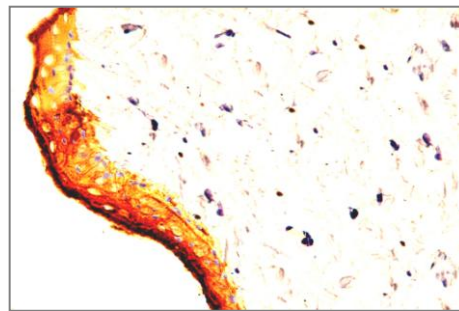
注: 羊膜组 VEGF 阳性细胞数多于对照组。

B: 羊膜组



注: 红花组 VEGF 阳性细胞数多于羊膜组。

C: 红花组



注: 红花+羊膜组的皮肤组织血管内皮生长因子积分吸光度明显高于其他 3 组。

D: 红花+羊膜组

图 1 创伤后 2 d 大鼠创面组织血管内皮生长因子的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

Figure 1 Expression of vascular endothelial growth factor on the wound surface at 2 d after injury (Immunohistochemistry staining, $\times 400$)

2.3 大鼠切口感染情况 切创后5 d, 按照前述切口感染标准来判定切口感染情况、计算感染率。红花+羊膜组感染率(5%)较其他3组明显减少($P < 0.05$), 见表2。

表2 大鼠切口感染率的比较

Table 2 Comparison of wound infection rates among the four groups (n=20)

组别	感染例数(n)	感染率(%)
对照组	10	50 ^b
羊膜组	5	25 ^{ab}
红花组	5	25 ^{ab}
红花+羊膜组	1	5 ^a

与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与红花+羊膜组相比, ^b $P < 0.05$ 。

注: 红花+羊膜组感染率较其他3组明显减少。感染率: 出现感染创面面积/原始创面面积×100%

3 讨论

血管内皮生长因子与创面愈合关系: 损伤早期增高血管内皮生长因子, 使缺血组织重新建立血运而存活并促进肉芽形成是本课题研究的主要目的。促进伤口愈合和减少瘢痕形成是很多研究人员所希望达到的目的, 血管内皮生长因子是一种功能强大并能产生多种生物学效应

的细胞因子, 对血管再生起着关键的作用。

红花与血管内皮生长因子的关系: 红花为菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥花, 临床上常以水煎入药, 具有活血通络、散肿止痛之功效^[13]。现代研究表明: 红花主要含有黄酮醇、苷类、脂肪酸等成分, 可抑制血小板聚集、抗血栓形成、促进纤维蛋白溶解、扩张外周血管等; 而红花注射液则具有抗炎、抗凝、抗缺氧作用, 能显著抑制二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导的血小板聚集, 促进纤维蛋白溶解, 抑制血栓形成, 同时无明显的毒不良反应。在临床上广泛应用于心脑血管、血液系统、创伤感染及跌打损伤等疾病^[14-17]。红花内服或静脉应用增强血管内皮生长因子表达促进创伤愈合^[18], 抑制血栓形成。同时由于剖宫产子宫内膜血窦开放, 红花内服及静脉应用可引起子宫出血过多, 这就限制了红花在剖宫产创伤修复中的内服及静脉应用^[19]; 但红花创伤局部外用能否增强血管内皮生长因子含量未见报导。本次实验发现: 红花组的感染率明显低于对照组; 切创后2, 3 d, 创口边缘血管内皮生长因子表达较对照组明显增强, 均有统计学意义; 故红花外用可增强血管内皮生长因子表达、减少切口感染、促进创伤愈合。考虑与红花等活血化瘀药物具有正向调高血管内皮生长因子水平, 从而促进创面微血管新生增殖, 加快毛细血管重建塑形, 达到促进创面愈合的作用。

近年来有关血管内皮生长因子与创面愈合关系的研究(按主题排序):

题目	作者	期刊	发表时间
紫草油促进创面愈合与血管内皮生长因子表达的临床研究	王朝亮等	中国全科医学	2008-09-15
经血管内皮生长因子基因修饰的脂肪干细胞移植促进皮瓣预构的实验研究	李华	南方医科大学	2010-03-09
胶原结合血管内皮生长因子(CBD-VEGF)在促进大鼠糖尿病溃疡愈合中的作用	燕辛	南京大学	2011-05-08
在缺血性创面愈合过程中血管内皮生长因子比碱性成纤维细胞生长因子重要	乔亮	国外医学(创伤与外科基本问题分册)	2000-02-15
血管内皮生长因子与肺癌的关系	陈公琰等	中华肿瘤杂志	2005-08-30
血管内皮生长因子 165 真核基因转染载体转染的骨骼肌细胞	董刚等	中国组织工程研究	2012-09-09
枸杞多糖对肝癌细胞及其细胞内血管内皮生长因子的抑制作用	张芙蓉	广西医科大学	2011-05-01
血管内皮生长因子的作用及其在烧伤创面修复中的意义	缪玉兰等	中华烧伤杂志	2006-12-20
补益气血方剂对大鼠慢性难愈性创面血管内皮生长因子及血管生成的影响	阙华发等	中西医结合学报	2008-10-15
siRNA 对视网膜母细胞瘤血管内皮生长因子基因抑制作用的实验研究	刘德荣	山东大学	2009-05-21
环氧合酶 2、骨形态形成蛋白 2 和血管内皮生长因子在异位骨化组织中的表达	田建等	中国组织工程研究	2012-10-14
血管内皮生长因子与人非小细胞肺癌的相关性研究	黄礼年	山东大学	2010-05-11
低分子肝素对电烧伤大鼠组织血管内皮生长因子与血小板内皮细胞黏附分子表达的影响	蒋南红等	中华损伤与修复杂志(电子版)	2012-06-01
血管内皮生长因子在人胚胎干细胞神经分化过程中的作用及相关机制研究	焦淑洁	华中科技大学	2009-05-01

近年来有关红花与血管内皮生长因子的关系研究(按主题排序):

题目	作者	期刊	发表时间
在缺血性创面愈合过程中血管内皮生长因子比碱性成纤维细胞生长因子重要	乔亮	国外医学(创伤与外科基本问题分册)	2000-02-15
胶原结合血管内皮生长因子(CBD-VEGF)在促进大鼠糖尿病溃疡愈合中的作用	燕辛	南京大学	2011-05-08
腺相关病毒介导转化生长因子 $\beta 1$ 和血管内皮生长因子联合转染促进糖尿病溃疡愈合的生物学效应(英文)	赛佳明等	中国临床康复	2006-12-28
畸胎瘤细胞源性生长因子和血管内皮生长因子在鼻咽癌中的表达及临床意义	李景丽	重庆医科大学	2012-03-01
血管内皮生长因子在动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中模型大鼠脑组织中的表达研究	皇甫斌	山西医科大学	2012-06-01
骨折局部注射结缔组织生长因子后骨保护素和血管内皮生长因子的表达	丁明聪等	中国组织工程研究	2012-11-25
环氧合酶 2、血管内皮生长因子 C/血管内皮生长因子受体 3 与肺癌淋巴转移	王东昌	河北医科大学	2009-03-01
糖尿病足部非缺血性皮肤溃疡与巨噬细胞功能障碍关系的研究	曾展军	南方医科大学	2008-04-15
低分子肝素对电烧伤大鼠组织血管内皮生长因子与血小板内皮细胞黏附分子表达的影响	蒋南红等	中华医学会烧伤外科学分会 2012 年学术年会论文汇编	2012-10-19
血管内皮生长因子基因导入促进大鼠骨折愈合的研究	白晓峰等	第四届中国国际暨第七次全国口腔颌面外科学术会议论文集	2005-10-01
紫草油促进创面愈合与血管内皮生长因子表达的临床研究	王朝亮等	中国全科医学	2008-09-15
小鼠角质细胞生长因子缺失对创面愈合的影响	彭程	中南大学	2011-05-01
难愈创面治疗中血管内皮生长因子的研究现状	郝春光等	中华医学会烧伤外科学分会 2012 年学术年会论文汇编	2012-10-19
血管内皮生长因子基因在家兔动脉粥样硬化斑块中的表达	汤乃梅等	北京医科大学学报	1993-12-27
hPDGF-A/hBD ₂ 基因修饰 BMSCs 生物学特性及促进创伤愈合的实验研究	冯一梅	第三军医大学	2008-05-01
紫草油促进创面愈合与血管内皮生长因子表达的临床研究	王朝亮等	第五届全国烧伤救治专题研讨会烧伤后脏器损害的临床救治论文集	2007-06-01
粒细胞集落刺激因子动员骨髓来源细胞促进创面修复的实验研究	王钰	第二军医大学	2009-05-01
五谷虫干粉对大鼠皮肤创面愈合及血管生成影响的实验研究	赵泽旭	大连医科大学	2010-04-01
蜕皮甾酮乳膏对家兔创面愈合作用的影响	李钰珑	南方医科大学	2008-04-01
mTOR 信号通路与创伤愈合的相关性研究	崔文慧	重庆医科大学	2012-05-01

羊膜外敷与创面炎性反应关系: 中性粒细胞能吞噬细菌和伤口中的坏死组织, 中性粒细胞的浸润在伤后24 h 达到高峰, 而后随着单核细胞进入伤口, 其数量减少。单核细胞破坏细菌和坏死组织后转变成巨噬细胞, 巨噬细胞也是伤口愈合过程中所必须的^[20]。羊膜以其来源广泛、价格低廉、应用操作简便、生物组织相容性好, 且存在的伦理问题少等特有的优点和生物学活性, 已成为理想的生物材料^[21]。本次实验结果显示: 羊膜组的感染率、炎性细胞的表达亦明显低于对照组。但是其取材、保存和使用需遵循严格的医学标准。由于新鲜羊膜存在着安全隐患问题, 而且也不能保证随时供应, 使其在临床的应用受到很大限制, 目前多种保存羊膜的方法在临床上均有成功的报道。羊膜作为生物支架制成的真皮替代物在临床中的应用也会遇到种种困难。如何更能保持

羊膜的生物活性, 改良人工羊膜制备及贮存方法以及构建更加适于并能有效附载种子细胞及其分化所需生物环境的组织工程载体材料, 都将通过各种基因修饰等技术使之成为可能。

羊膜与红花联合应用在促进创面愈合中的作用: 以往研究表明: 皮肤切创愈合过程中, 血管内皮生长因子于创后 2 d 开始表达并逐渐增强。本次实验首次发现了中药红花联合羊膜外用在损伤早期可增强血管内皮生长因子表达, 同时减少感染率, 二者具有协同作用。考虑可能与以下因素有关: ①二者联合使用, 可以覆盖创面行成一个闭合环境, 防止了细菌污染, 使机体自身的防御能力在局部得以最大限度的发挥, 达到抗菌、消炎、减少感染的目的。②羊膜含有高水平的表皮生长因子

(epidermal growth factor, EGF)、角蛋白细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)、肝细胞生长因子(hypatocyte growth factor, HGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等多种生长因子^[22], 羊膜与红花联合应用, 可以促进细胞黏附、迁移、增殖和分化等生命功能, 维持细胞生长, 阻止上皮细胞凋亡, 从而达到促进上皮组织生长、加速创面愈合的目的。③羊膜是一个良好的半透薄膜, 为膜内包裹细胞提供所需营养物质浓度, 与周围神经许旺细胞基底膜成分相似, 用经红花注射液保存过的羊膜覆盖创

面, 使其隔绝了与外界的接触, 减少了水分的蒸发, 可保持创面一定的湿度、减轻创面浅表神经的暴露因冷热及机械性刺激引起的疼痛, 而且对许旺细胞的贴壁黏附、分裂增殖以及许旺细胞的髓鞘化有着重要作用^[23], 因此具有明显减轻或消除创面疼痛的作用。因此经红花注射液保存后的胎羊膜外用贴敷创面, 不仅安全, 而且价格低廉; 在减少切口感染、促进创面愈合、减少增生性瘢痕方面有一定潜力, 两者联合应用更值得进一步研究和探索, 为大家以后的研究提供了很好的理论基础及方向。

近年来有关羊膜注射液与红花联合治疗创面愈合的研究(按主题排序):

题目	作者	期刊	发表时间
局部应用不同浓度胰岛素湿敷对烫伤创面愈合的影响	刘波	南方医科大学	2008-4-15
自拟熏洗方对肛肠术后创面愈合疗效观察	苑士利	湖北中医药大学	2012-5-25
锌—金属硫蛋白对深Ⅱ度烫伤大鼠创面愈合影响的实验研究	王达	第三军医大学	2009-05-1
NO生成剂对糖尿病小鼠创面愈合的促进作用	任校峰	第三军医大学	2010-05-1
黄芪汤促进湿热下注型肛瘘术后创面愈合的临床研究	胡士强	福建中医药大学	2012-06-1
血小板衍生生长因子在皮肤创面愈合中的调控机制及药物作用研究	王玫	第二军医大学	2009-05-1
小鼠角质细胞生长因子缺失对创面愈合的影响	彭程	中南大学	2011-05-1
Ang II产生和受体表达在创面愈合过程中的变化及意义	吴姮君	暨南大学	2010-05-21
整合素连接激酶在烧伤创面愈合过程中的表达和作用研究	李罡	暨南大学	2010-06-11
五谷虫干粉对大鼠皮肤创面愈合及血管生成影响的实验研究	赵泽旭	大连医科大学	2010-04-1

近年来有关羊膜注射液与红花联合治疗创面愈合的研究(按主题排序):

题目	作者	期刊	发表时间
应用红花注射液治疗冠心病心绞痛临床疗效分析	曹学辉	求医问药	2012-08-24
骨髓基质干细胞与微粒皮组织促进创面愈合的实验研究	熊兵	南方医科大学	2008-04-15
红花注射液保存人胎羊膜移植预防肌腱粘连	郝东明等	中医正骨	2005-08-20
IGF-I和HSV-tk联合基因转移优化创面愈合的研究	杨磊	第一军医大学	2004-04-01
人羊膜负载人羊膜间充质干细胞对SD大鼠皮肤创面愈合的影响	霍双枝等	中国医学科学院学报	2011-12-30
观察生肌散油纱条治疗肛肠疾病术后创面愈合的临床疗效	李国华	中外医疗	2012-12-21
白竭散促进肛瘘术后创面愈合的临床研究	毛细云等	中医药临床杂志	2012-12-20
红花注射液在四肢骨折愈合康复中的应用	申美平等	中国社区医师(医学专业)	2012-05-25
丹参注射液外用对创面愈合影响的实验研究	陈建常等	新疆医学	1997-04-15
不同剂量红花注射液与2种输液的配伍稳定性	梁琳莉	柳州医学	2006-06-30
红花注射液生物活性测定方法的研究	陈晨	中国药品生物制品检定所	2011-07-01

总之, 本次实验首次发现红花及用红花注射液保存的羊膜外敷提高皮肤切创后早期血管内皮生长因子的表达, 减少创口的感染率, 促进切口愈合, 以红花配羊

膜效果更佳, 两者有协同作用。随着研究的不断深入, 加上与新技术的完美结合, 各种保存形式的羊膜在各种组织工程中的应用必将组织修复带入一个新的领域。

基金资助: 河南省科技厅资助项目(082102310084)。

作者贡献: 所有作者均参与了本次实验的実施和评估, 均对文章负责。

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。

伦理批准: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Jiang S, Di Y, Chen XL. Yanke Xinjinzhan. 2011;31(7):609-611.
姜双, 底煜, 陈晓隆. MMP-2和VEGF在视网膜新生血管的表达[J]. 眼科新进展, 2011, 31(7):609-611.
- [2] Hua CH, Shen SF. Zhongguo Fuyou Baojian. 2011;26(22):3468-3470.
华彩虹, 申素芳. 羊膜对大鼠皮肤切创愈合中TGF- β 表达的影响[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(22):3468-3470.
- [3] White P, David WT, Steven F, et al. Deletion of the homeobox gene prx-2 affects fetal but not adult fibroblast wound healing responses. Invest Dermatol. 2003;120(1):135-144.
- [4] Huang CX, Shen ZY. Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue. 2002;16(1):64-69.
黄晨显, 沈祖尧. 血管内皮细胞生长因子的研究及在组织修复中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(1):64-69.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [6] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.
- [7] Guo EQ. Beijing: People's Military Medical Press. 2000.
郭恩覃. 现代整形外科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [8] Zhao WH, Huang TY, Li XJ, et al. Zhongguo Zhongyi Gushangke Zazhi. 2002;10(5):46.
赵文海, 黄铁银, 李新建, 等. 新鲜羊膜移植治疗创伤性足部严重皮肤缺损[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(5):46.
- [9] Zhu HB, Zhang L, Wang ZH, et al. Therapeutic effects of hydroxysafflor yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms. Asian Nat Prod Res. 2005;7(4):603-613.
- [10] Ren Y, Wang J. Zhongguo Linchuang Jiepouxue Zazhi. 2008;26(suppl 4):150-151.
任媛, 王军. 羊膜在组织工程皮肤的研究进展[J]. 中国临床解剖学杂志, 2008, 26(Suppl 4):150-151.
- [11] Xiong H, Zuo YJ, Luo ZY, et al. Zhongyi Zhenggu. 2004;16(4):8-10.
熊辉, 左亚杰, 罗志勇, 等. 桃红四物汤对实验性骨折愈合过程中VEGFmRNA表达的影响[J]. 中医正骨, 2004, 16(4):8-10.
- [12] Shen FJ, Liu RG, Yang SH, et al. Zhongguo Gushang. 2004;17(5):260-262.
沈冯君, 刘日光, 杨述华, 等. 活血补肾中药对培养成骨细胞VEGF活性的影响[J]. 中国骨伤, 2004, 17(5):260-262.
- [13] Yang L, Zhang ZY, Li YP, et al. Hebei Zhongyiyao Xuebao. 2004;19(3):26-29.
杨蕾, 张志云, 李云鹏, 等. 红花提取物对自发性高血压大鼠血压影响的实验研究[J]. 河北中医药学报, 2004, 19(3):26-29.
- [14] Pei YN. Shizhen Guoyiguoyao. 2005;16(2):144-146.
裴永娜. 红花的药理作用和临床应用[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2):144-146.
- [15] Sun JB, Jiang XD, Zhang PX, et al. 2004;24(7):650-651.
孙佳彬, 江旭东, 张鹏霞, 等. 红花总黄素对衰老模型小鼠肝线粒体的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(7):650-651.
- [16] Zhao Q, Du JS, Han XM, et al. Zhongguo Shiyang Zhenduanxue. 2004;8(1):21-23.
赵晴, 杜建时, 韩雪梅, 等. 大鼠急性全脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡及红花保护作用的研究[J]. 中国实验诊断学, 2004, 8(1):21-23.
- [17] Xia P, Dong WX, Yu YM, et al. Chongqing Yikedaxue Xuebao. 2010;35(8):1167-1170.
夏鹏, 董文祥, 喻永敏, 等. 大鼠皮肤切创愈合过程中VEGF, TGF- β 1蛋白的表达[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(8):1167-1170.
- [18] Tang R, Du SH. Zhongguo Linchuang Yaolixue yu Zhilixue. 2006;11(3):282-285.
唐蓉, 杜胜华. 红花对大鼠肾间质纤维化和肾功能的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(3):282-285.
- [19] He YL, Dai W, Sun M, et al. Zhongguo Linchuang Baojian Zazhi. 2004;7(3):169-172.
何来英, 戴伟, 孙明, 等. 红花水提取物的安全性研究[J]. 中国临床保健杂志, 2004, 7(3):169-172.
- [20] Liu YL, Song XR. Zhongguo Zhongliu Shengwu Zhilixue Zazhi. 2004;11(3):229-232.
柳永蕾, 宋现让. 乏氧诱导因子-1与肿瘤乏氧的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(3):229-232.
- [21] Liu PY, Liu K, Wang XT, et al. Efficacy of combination gene therapy with multiple growth factor cDNAs to enhance skin flap survival in a rat model. DNA Cell Biol. 2005;24(11):751.
- [22] Yu GY, Gao SZ, Zhang TT, et al. Renmin Junyi. 2008;51(2):79-80.
于广远, 高素珍, 赵婷婷, 等. 人胎羊膜对糖尿病难愈性创面愈合影响的应用研究[J]. 人民军医, 2008, 51(2):79-80.
- [23] Zhang P, Ji L, Li JP, et al. Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2010;20(11):1665-1668.
张鹏, 纪亮, 李静平, 等. MMP-1和TIMP-1在人增生性瘢痕中的动态变化[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(11):1665-1668.