

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.34.013 [http://www.crter.org]

曹东阳, 姚昶, 陈德轩, 卞卫和, 张晓清, 尹恒, 郭檬檬. 皮下植入生肌玉红胶原后的血管新生与瘢痕抑制[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(34):6144-6151.

皮下植入生肌玉红胶原后的血管新生与瘢痕抑制***

曹东阳¹, 姚昶², 陈德轩², 卞卫和², 张晓清², 尹恒³, 郭檬檬¹(¹南京中医药大学2011级硕士研究生, 江苏省南京市 210029; ²江苏省中医院, 江苏省南京市 210029; ³南京中医药大学2012级博士研究生, 江苏省南京市 210046)

文章亮点:

1 创伤胶原代谢的结果直接影响创面的修复质量, 在创面愈合过程中起主要作用的是 I、III型胶原, I型胶原起支架作用, III胶原型包绕于外周决定胶原纤维的直径大小和弹性好坏, III型胶原含量越高, 胶原纤维越细, 弹性越好, 瘢痕越轻, I、III型胶原的比例与创面修复质量好坏密切相关。

2 将生肌玉红膏的有效成分提取载入修饰后胶原, 检测了 I、III型胶原的分泌及两者的比例观察生肌玉红胶原抑制瘢痕的作用, 观察其促进血管新生的效果并探讨其作用机制。

3 生肌玉红胶原可显著促进周围组织微血管新生, 提高血管内皮生长因子与血管生成素 1 的表达, 同时协同调节胶原形成及 I、III型胶原的比例, 减少瘢痕愈合。

4 首次评价生肌玉红胶原促进血管新生的疗效及对组织愈合瘢痕形成的影响, 探查了生肌玉红胶原对组织愈合过程的大体与微环境变化的影响, 今后可进一步探讨生肌玉红胶原对缺血性创面血管新生与胶原合成的影响。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; 生肌玉红胶原; 血管新生; I型胶原; III型胶原; 血管内皮生长因子; 血管生成素 1; 国家自然科学基金

摘要

背景: 前期研究显示生肌玉红胶原促进血管新生与组织愈合的疗效显著好于生肌玉红膏及单纯胶原或明胶。

目的: 探察兔皮下植入生肌玉红胶原促进血管新生与修复的疗效与机制。

方法: 在新西兰兔背部两侧对称制作皮下口袋模型, 并对称植入生肌玉红胶原(实验组)与胶原(对照组), 于术后 3, 7, 14, 28, 56 d 取植入标本及标本周围组织, 制作病理切片观察标本周围组织修复状况, 测定胶原内血红蛋白水平, 免疫荧光与 CD34 染色标记法观察周围组织微血管新生情况, Western Blot 法检测血管内皮生长因子、血管生成素 1 的表达, 免疫组织化学法观察周围组织 I、III型胶原的分泌及两者的比例。

结果与结论: 实验组标本周围皮下血管增多, 胶原周围组织随着时间推移炎性渗出减少, 肉芽组织增生, 到 28 d 时已形成成熟的纤维结缔组织, 并且促进微血管新生作用及血红蛋白水平高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 术后 3, 7 d 血管内皮生长因子、血管生成素 1 表达高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 实验组 I 型胶原分泌与对照组相当, 但术后 28, 56 d III型胶原的分泌高于对照组($P < 0.05$), 且术后 28, 56 d I、III型胶原的比例低于对照组($P < 0.01$)。表明生肌玉红胶原可显著促进周围组织微血管新生, 提高血管内皮生长因子与血管生成素 1 的表达, 同时协同调节胶原形成及 I、III型胶原的比例达到减少瘢痕愈合的作用。

Angiogenesis and scar inhibition after subcutaneous implantation of Shengji Yuhong collagen

Cao Dong-yang¹, Yao Chang², Chen De-xuan², Bian Wei-he², Zhang Xiao-qing², Yin Heng³, Guo Meng-meng¹ (¹Postgraduate Student of Grade 2011, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ²Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ³Doctoral Student of Grade 2012, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Shengji Yuhong collagen showed good curative effect of promoting angiogenesis and tissue healing compared with Shengji Yuhong Gao and collagen alone or gelatin alone.

OBJECTIVE: To explore the curative effect and mechanism of subcutaneous implantation of Shengji Yuhong collagen in rabbits in promoting angiogenesis and repair.

METHODS: Shengji Yuhong collagen as the experimental group and collagen as the control group was implanted inside the rabbit subcutaneous pockets of the back of New Zealand rabbits. The implanted samples and surrounding tissues were obtained at 3, 7, 14, 28 and 56 days following surgery. Pathological sections were made and the repair of surrounding tissue was observed. Hemoglobin levels in collagen were measured. Immunofluorescence and CD34 dyeing marking method were utilized to observe capillary angiogenesis. Western

曹东阳★, 男, 1988年生, 河南省南阳市人, 汉族, 南京中医药大学在读硕士, 主要从事中医外科与创伤修复研究。

通讯作者: 姚昶, 博士, 主任医师, 博士生导师, 江苏省中医院, 江苏省南京市 210029
yaochang67@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)34-06144-08

收稿日期: 2012-12-08
修回日期: 2013-01-06
(20121008005/GW-Q)

Cao Dong-yang★, Studying for master's degree, Postgraduate Student of Grade 2011, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Yao Chang, M.D., Chief physician, Doctoral supervisor, Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
yaochang67@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30973596*; the Kangyuan TCM Technology Innovation Foundation, No. HZ1009KY*; the TCM Leading Talent Foundation of Jiangsu Province, No. LJ2009002*

Received: 2012-12-08
Accepted: 2013-01-06

blot assay was employed to examine vascular endothelial growth factor and angiogenin-1 expression.

Immunohistochemistry was used to observe the secretion of type I and III collagen on the surrounding tissues.

RESULTS AND CONCLUSION: The experimental group showed increased subcutaneous vascularization. There were reduced inflammatory exudation, granulation tissue hyperplasia, and mature fiber connective tissue at 28 days.

Angiogenesis and hemoglobin contents were greater in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At 3 and 7 days following surgery, vascular endothelial growth factor and angiogenin-1 expression was greater in the experimental group than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The secretion of type I collagen was identical between the experimental and control groups. However, the secretion of type III collagen was higher in the experimental group than in the control group at 28 and 56 days ($P < 0.05$), and the proportion of type I and III collagen was lower in the experimental group than in the control group at 28 and 56 days ($P < 0.01$). These suggested that *Shengji Yuhong* collagen can significantly promote angiogenesis in the surrounding tissues with the possible mechanisms of adjusting the protein expression of vascular endothelial growth factor and angiogenin-1. At the same time, it has the function of regulating collagen formation with better ratio of type I and type III collagen to acquire higher quality of wound healing with reduced scar formation.

Key Words: biomaterials; material biocompatibility; *Shengji Yuhong* collagen; angiogenesis; type I collagen; type III collagen; vascular endothelial growth factor; angiogenin-1; National Natural Science Foundation of China

Cao DY, Yao C, Chen DX, Bian WH, Zhang XQ, Yin H, Guo MM. Angiogenesis and scar inhibition after subcutaneous implantation of *Shengji Yuhong* collagen. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(34):6144-6151.

0 引言

任何距血管超过5 mm的细胞必需有血液供应才能存活, 高水平、快速的血管化一直是创伤修复研究的一个基本课题。

胶原作为生物体各种结缔组织的主要组成成分, 已成为组织工程中应用最广的生物材料^[1]。胶原经过修饰后可以提高组织相容性及促进血管生成^[2]。前期研究将生肌玉红膏提取液载入修饰后的胶原制成生肌玉红胶原, 其促血管新生与组织愈合疗效显著好于生肌玉红膏及单纯胶原或明胶^[3-7]。进一步研究发现生肌玉红膏提取液1.6 g/L载入修饰后胶原的疗效最佳。

实验拟于兔背部皮下植入前期最佳浓度生肌玉红膏提取液载入胶原, 考察其不同时间对周围组织血管新生的作用及机制。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计, 动物实验。

时间及地点: 于2011-08-17/12-20 在南京中医药大学动物实验中心、江苏省中医院病理实验中心, 南京医科大学公共卫生学院分子毒理研究室完成。

材料:

生肌玉红膏: 江苏省中医院院内制剂[苏药制字Z04000396]。

胶原: 由Dr Suwelack Skin & Health Care公司(Billerback, 德国)提供, 为I型牛胶原, 由冻干法制成, 孔径在15-25 μm 之间, 成孔率约98%。

实验动物: 成年雄性新西兰白兔, 体质量2.5 kg, 由江苏省农业科学院动物中心提供, 许可证号: SYXK(苏)2007-0017。

生肌玉红胶原皮下植入促血管新生与修复实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Rabbit Anti-Collagen Type-1(BA0325)、Rabbit Anti-Collagen Type-3(BA0326)	Boster 公司
即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒(KIT-5030)、DAB 显色试剂	福州迈新生物公司
血红蛋白标准品(29895、SERVA)	德国 Sigma 公司 H2500
氧化高铁血红蛋白试剂盒, 批号 20110106	南京建成生物工程研究所
CD34 免疫组织化学试剂盒	Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国
β -actin 小鼠单克隆抗体、兔抗 VEGF、FITC 标记的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、 β -actin 兔多克隆抗体	武汉博士德公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司
MiniSee 图像采集系统	江苏康克新柏有限公司
ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪	ABI 公司, 美国
紫外分光光度计	Eppendorf 公司, 德国
蛋白核酸定量仪	Smartspec 3000 型
免疫荧光显微镜	日本奥林巴斯
凝胶成像系统	日本 Kodak

实验方法:

生肌玉红胶原的制备: 生肌玉红膏处方: 甘草60 g、白芷60 g、当归60 g、紫草60 g、血竭24 g; 提取液制备过程简述: 将甘草、白芷、当归、紫草加体积分数70%乙醇回流提取2次, 加入24 g血竭超临界CO₂萃取物摇匀, 并定容至1 000 mL制成质量浓度为1.6 g/L的生肌玉红膏提取液。将胶原制成直径为10 mm×10 mm、厚度为2 mm长方体后, 予以肝素修饰后加入0.5 mL生肌玉红膏提取液, 环氧乙烷消毒后备用^[8]。

动物实验过程: 取10只成年新西兰白兔, 背部电动剃毛刀脱毛, 体积分数75%乙醇消毒, 在背部两侧对称点设计各5个切口, 相距3 cm, 切开皮长度1.0-1.5 cm,

皮下向两侧游离形成“口袋”，剪除“口袋”底部肌肉筋膜，植入胶原标本，配对设计，左侧植入生肌玉红胶原(实验组)，右侧对称植入胶原(对照组)；缝合切口，分笼饲养。术后前3 d每日每兔注射青霉素 20×10^4 U。分别于术后3, 7, 14, 28, 56 d各随机处死2只兔子，仔细切取样品周围约0.5 cm范围的组织，各标本部分置入甲醛溶液中固定，部分根据实验需要于超低温冰箱 -80 °C保存，待检测。考虑创伤修复的血管新生在术后56 d时已退化，故此时间点不再检测有关血管新生指标，仅检测I、III型胶原合成的情况。

一般情况观察：术后观察兔进食、活动、体质量及切口愈合情况。

组织学观察：将固定好的各组组织脱水、包埋后制成蜡块，并切出厚约4 μm 切片，行苏木精-伊红染色，在光学显微镜下观察炎细胞浸润及肉芽增殖情况。

免疫荧光实验：采用血管内皮生长因子免疫荧光标记法，两组胶原标本自兔背部于各时间点取出组织切片后进行免疫荧光血管标记。于免疫荧光显微镜下观察，拍照记录。

微血管计数观察^[9]：按照CD34免疫组织化学试剂盒说明书标记两组各时间段埋植胶原周围组织内微血管。光镜下观察微血管生长情况，于400倍镜下每张切片取5个视野，采用MIAS-200彩色病理图像分析系统进行单位肉芽组织切片面积内的微血管计数，取均值。

血红蛋白检测：采用氰化高铁血红蛋白试剂盒光度计法测定^[10]，两组胶原标本自兔背部于各时间点取出后，浸入2 mL蒸馏水内5 min以去除表面血液，然后将标本再进入2 mL蒸馏水内24 h以洗出标本内血红蛋白，蒸馏水中血红蛋白含量吸收光度峰值为410 nm，血红蛋白吸收光度标准曲线由人体血红蛋白标准品测量获得。

Western Blot法检测血管内皮生长因子与血管生成素1水平：抽提两组术后3, 7, 14, 28 d所取标本蛋白质，Western Blot膜的封闭和抗体孵育，化学发光法检测，膜与化学发光底物孵育，经X射线片曝光显影。图片扫描保存为电脑文件，并用image-Pro Plus 6专业图像分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化，目的蛋白的灰度值除以内参GAPDH/Actin的灰度值以校正误差，所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。

I、III型胶原免疫组织化学标记吸光度值测定：按照I、III型胶原检测试剂盒说明书标记两组各时间段的组织切片胶原组织。检测试剂：Rabbit Anti-Collagen Type-1; Rabbit Anti-Collagen Type-3。免疫组织化学标记方法步骤按Chambers^[11]方法操作。免疫组织化学标记结果评判：I、III型胶原蛋白分布于细胞浆及间质，呈棕黄色，阴性不着色。以HPIAS-1000彩色病理图文报告系统定量分析阳性表达的强弱。简要方法：在Leica DM 1000显微镜($\times 20$)亮度调节锁定后，将组织切片置

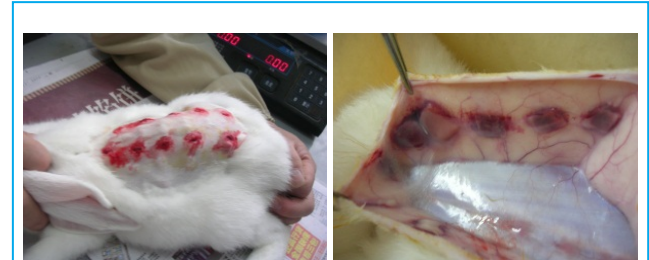
于显微镜平台上，首先测量切片中有盖玻片但无组织块区域的吸光度值作为背景灰度。光镜下观察切片，由TK-C1381彩色JVC摄像头将胶原图像输入HPIAS-1000彩色病理图文报告分析系统，经过图像采集后，每张切片随机选1个视野，测定10个胶原图像的吸光度值之和，每种单抗皆随机观察10张切片，按组别计算阳性反应的平均吸光度值。实验中测得的吸光度值与其对应的抗原实际表达强弱成正比关系，即吸光度值愈高则抗原表达愈强，反之则愈弱。

主要观察指标：两组周围组织修复状况、胶原内血红蛋白水平、周围组织微血管新生、血管内皮生长因子、血管生成素1的表达、周围组织I、III型胶原的生长及两者的比例。

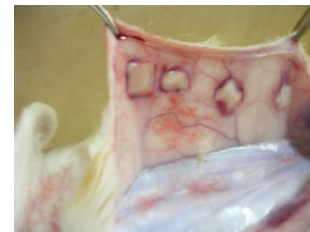
统计学分析：采用SPSS11.0 统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用t 检验；检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况观察结果 10只兔均存活至实验完成。术后家兔进食、活动良好，无体质量减轻，切口愈合良好。随着时间增加，各组埋植的胶原均有不同程度降解，28 d后胶原被周围组织较密实包裹，见图1。



A: 左侧植入生肌玉红胶原为实验组, B: 植入28 d时实验组胶原颜色鲜红, 右侧对称植入胶原为对照组, 标本之 有较多血液供应, 周围血管生长较多 间距离5 cm 以上以防互相影响

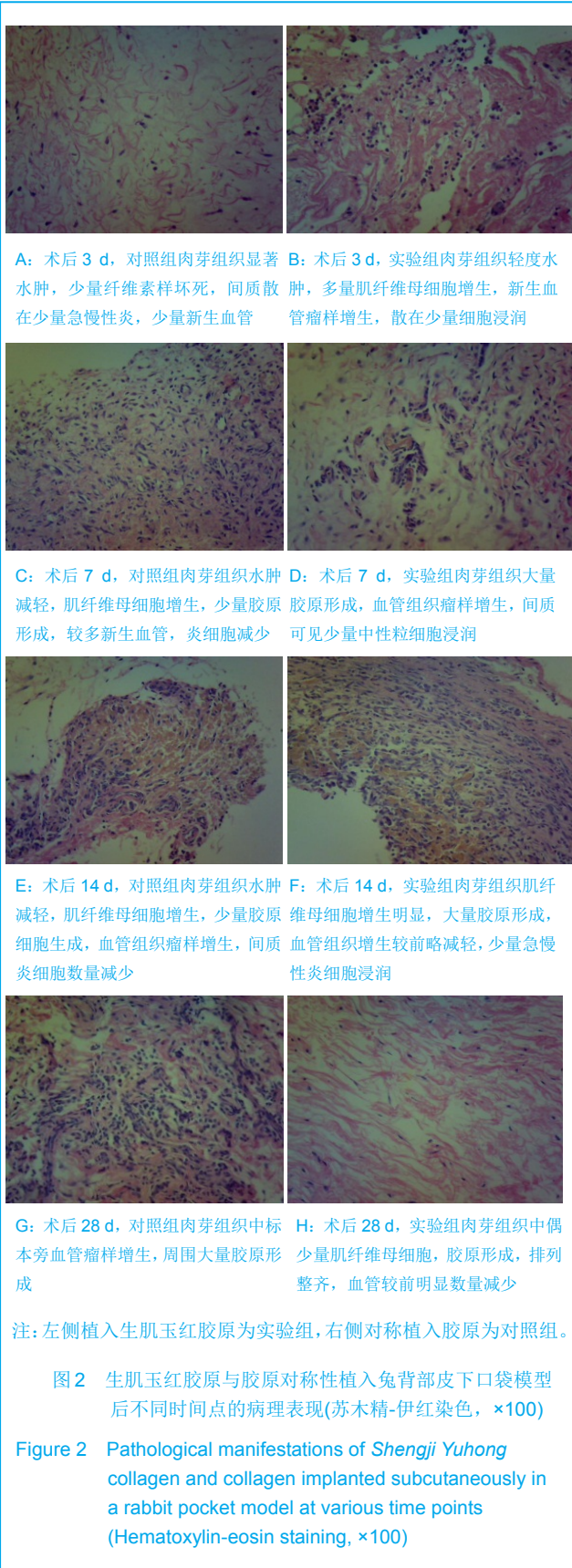


C: 植入28 d时对照组胶原颜色淡白, 血液供应较少, 周围血管生长较少

图1 生肌玉红胶原与胶原对称性植入兔背部皮下“口袋”模型的大体标本表现

Figure 1 Macroscopic manifestation of Shengji Yuhong collagen and collagen symmetrically implanted subcutaneously in a rabbit pocket model

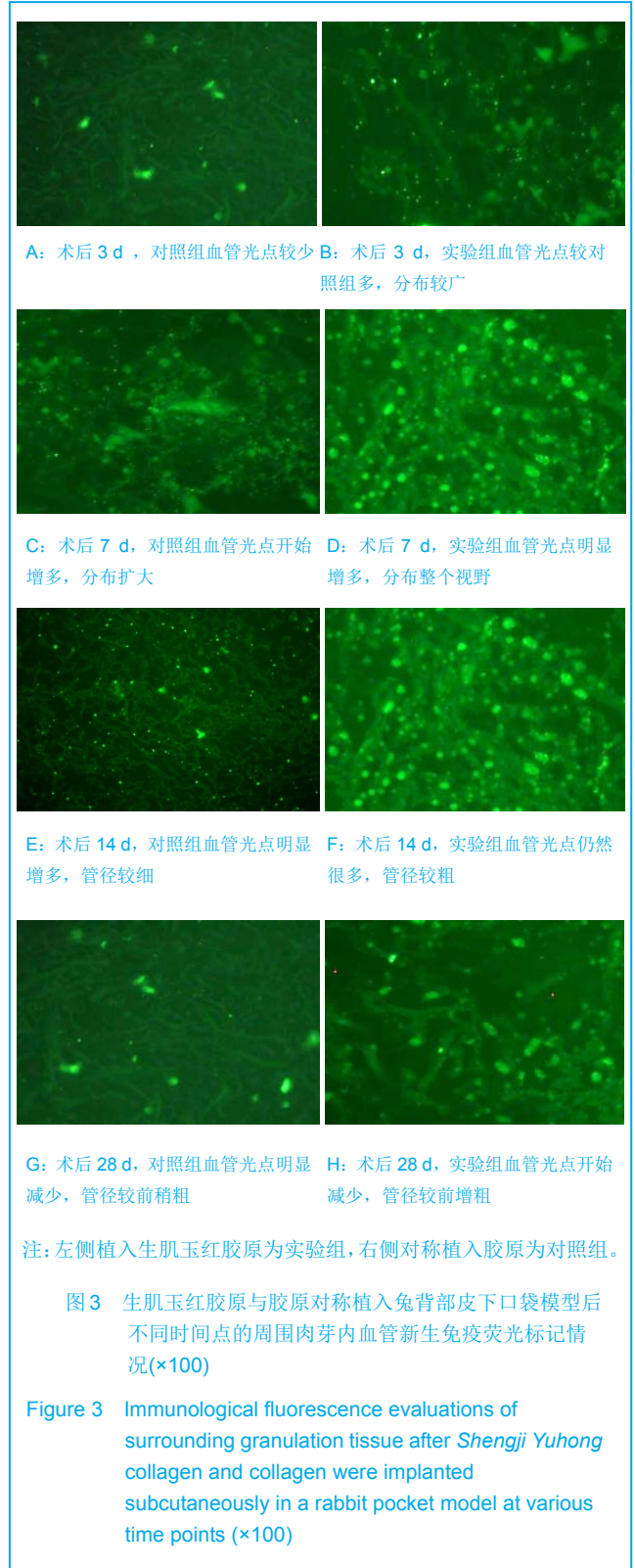
2.2 组织学观察结果 见图2。



术后第3天, 兔背部创面肉芽组织渗出物较少, 渗出物主要成分为血凝块、坏死组织和炎细胞, 炎细胞以淋巴细胞和巨噬细胞为主; 实验组成纤维细胞数量增多, 肉芽组织较丰富, 细胞排列极性, 有向创口聚集迁

移趋势。术后7 d, 肉芽组织生长旺盛, 达高峰。实验组成纤维细胞数量明显增多, 细胞排列极性明显。术后第14-28天, 成纤维细胞逐渐变为纤维细胞, 极性也逐渐消失, 炎性细胞减少并逐渐消失, 肉芽组织逐渐成熟为纤维结缔组织, 实验组细胞间胶原纤维较对照组增多, 排列较对照组整齐, 具体见图2。

2.3 免疫荧光实验观察结果 见图3。



免疫荧光标记血管显示, 实验组各时间点光点多于对照组, 以7, 14 d最为显著; 随着时间延长, 管径逐渐变粗, 而光点数量逐渐减少, 提示微血管逐步退化, 具体见图3。

2.4 CD34 标记胶原制剂近旁组织微血管计数结果 实验组各时间点微血管计数均明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且术后14 d微血管新生数目明显高于其他各时间点, 显示出随着肉芽生长微血管逐渐增多, 14 d后出现逐渐减少、闭合、退化的过程, 见表1。

表1 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点的胶原周围组织 CD34 标记微血管计数

Table 1 Counting of CD34-labeled microvessels surrounding collagen at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model ($\bar{x} \pm s, n=10$, number)

时间	对照组	实验组	P
术后3 d	8.80±1.30	12.40±2.07	0.000 306
术后7 d	11.00±2.73	16.40±2.30	0.005 069
术后14 d	22.60±3.04	26.40±2.40	0.031 011
术后28 d	12.40±1.14	18.60±1.51	0.000 061

注: 左侧植入生肌玉红胶原为实验组, 右侧对称植入胶原为对照组; 实验组各时间点微血管计数均明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 术后14 d前随着肉芽生长微血管逐渐增多, 14 d后出现逐渐减少、闭合、退化的过程。

2.5 胶原标本内血红蛋白检测结果 术后3, 7, 14, 28 d实验组胶原内血红蛋白水平显著高于对照组 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 均显示出生肌玉红胶原具有刺激血管新生与发生的作用; 术后28 d时间点胶原内血红蛋白含量与术后3 d相当, 可能为胶原内并未形成肉芽组织, 且毛细血管逐渐减少、闭合、退化所致, 见表2。

表2 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点的胶原内血红蛋白水平

Table 2 Amounts of hemoglobin in collagen at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model ($\bar{x} \pm s, n=10$, mg/L)

时间	实验组	对照组	P
术后3 d	23.35±2.33	13.78±2.11	< 0.05
术后7 d	69.67±4.35	17.93±1.98	< 0.01
术后14 d	81.27±4.67	27.07±2.35	< 0.01
术后28 d	23.10±3.23	16.48±1.23	< 0.05

注: 左侧植入生肌玉红胶原为实验组, 右侧对称植入胶原为对照组; 实验组各时间点胶原内血红蛋白水平显著高于对照组 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 显示出生肌玉红胶原具有刺激血管新生与发生的作用。

2.6 Western Blot检测血管内皮生长及血管生成素1结果 两组各时间点胶原旁肉芽组织提取的蛋白Western Blot检测结果见图4, 其目的蛋白血管内皮生长因子相对分子质量为23 000, 血管生成素1相对分子质量为70 000, 内参 β -actin相对分子质量为42 000。



注: 左侧植入生肌玉红胶原为实验组, 右侧对称植入胶原为对照组; 实验组血管内皮生长因子蛋白表达在术后第3天即达到最高峰值, 而后呈逐步下降趋势, 对照组在术后7 d达峰值, 然后逐步下降; 两组血管生成素1表达峰值均在术后7 d。

图4 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点胶原周围肉芽组织血管内皮生长因子、血管生成素1蛋白的表达

Figure 4 Protein expressions of vascular endothelial growth factor and angiogenin-1 in granulation tissue surrounding the collagen at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model

把所得结果经扫描仪扫描到计算机中通过软件 image pro-plus 6对血管内皮生长因子和血管生成素1进行半定量分析, 见表3。

表3 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点肉芽组织血管内皮生长因子、血管生成素1蛋白表达的半定量比值

Table 3 Half-quantitative ratio of protein expressions of vascular endothelial growth factor and angiogenin-1 at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间	血管内皮生长因子		血管生成素1	
	对照组	实验组	对照组	实验组
术后3 d	1.53±0.14	3.01±0.28 ^a	0.65±0.05	2.08±0.20 ^a
术后7 d	3.01±0.31	3.92±0.25 ^b	1.59±0.09	2.74±0.23 ^a
术后14 d	2.27±0.21	2.44±0.19	1.27±0.11	1.73±0.13 ^b
术后28 d	1.07±0.09	1.18±0.07	1.24±0.12	1.23±0.11

与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ 。

注: 左侧植入生肌玉红胶原为实验组, 右侧对称植入胶原为对照组; 结果表明创伤早期阶段生肌玉红胶原诱导血管内皮生长因子形成的作用显著。

结果显示: ①血管内皮生长因子蛋白的表达: 实验

组在术后第3天即达到最高峰值,而后呈逐步下降趋势;对照组在术后7 d达峰值,然后逐步下降。实验组术后3, 7 d表达显著高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表3。

②血管生成素1蛋白的表达:两组峰值均在术后7d,但实验组术后3, 7, 14 d表达明显强于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见表3。

2.7 I、III型胶原免疫组织化学标记不同时间点平均吸光度值检测结果 见表4-6。

表4 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点肉芽组织中I型胶原免疫组织化学标记平均吸光度值的变化

Table 4 Average absorbance of type I collagen in granulation tissue at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

时间	对照组	实验组
术后 3 d	8 438.56±245.56	8 655.67±189.56
术后 7 d	8 859.86±577.44	9 603.33±395.01
术后 14 d	8 220.00±349.35	8 658.00±394.34
术后 28 d	8 034.67±262.82	8 446.67±367.04
术后 56 d	7 794.33±252.21	8 178.33±181.09

注:左侧植入生肌玉红胶原为实验组,右侧对称植入胶原为对照组;同一时间实验组与对照组比较差异无显著性意义。

表5 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点肉芽组织中III型胶原免疫组织化学标记平均吸光度值的变化

Table 5 Average absorbance of type III collagen in granulation tissue at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

时间	对照组	实验组
术后 3 d	1 548.36±129.35	1 876.89±144.94
术后 7 d	3 574.67±250.82	3 922.67±408.15
术后 14 d	3 818.67±276.12	3 903.00±456.50
术后 28 d	1 777.33±93.46	3 216.00±356.79 ^a
术后 56 d	811.00±51.82	1 747.00±108.19 ^a

与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注:左侧植入生肌玉红胶原为实验组,右侧对称植入胶原为对照组;说明生肌玉红胶原对III型胶原的调节优势体现在组织修复的后期。

I型胶原:实验组各时间点I型胶原含量均稍高于对照组,二者均于术后7 d左右达最高峰值,然后逐步下降;但同一时间实验组与对照组I型胶原含量比较差异无显著性意义($P > 0.05$),而两组术后7 d吸光度值均高

于术后3 d,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表4。

III型胶原:两组术后3-7 d III型胶原含量呈现出明显上升趋势,7-14 d变化不明显,14-56 d呈下降趋势。实验组各时间点平均吸光度值均高于对照组,但3, 7, 14 d两组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。28, 56 d两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。两组组内7, 14 d的平均吸光度值均显著高于3, 28, 56 d,差异有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表5。

I、III型胶原的比值:术后3 d实验组与对照组I、III型胶原比值与正常皮肤组织相近(3.5-6): 1,但7-14 d比值下降明显,III型胶原比例上升,而28-56 d二者比值再度上升,但对对照组上升较快,并于56 d时间点超过正常成人皮肤组织比例。实验组28-56 d时I、III型胶原的比例明显低于对照组,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),见表6。

表6 生肌玉红胶原与胶原对称植入兔背部皮下口袋模型后不同时间点I、III型胶原比值的变化

Table 6 The ratio of type I and type III collagen at various time points after Shengji Yuhong collagen and collagen were implanted subcutaneously in a rabbit pocket model ($n=10$)

时间	对照组	实验组
术后 3 d	5.45	4.61
术后 7 d	2.48	2.45
术后 14 d	2.15	2.22
术后 28 d	4.52	2.63 ^a
术后 56 d	9.61	4.68 ^a

与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。

注:左侧植入生肌玉红胶原为实验组,右侧对称植入胶原为对照组;表明生肌玉红胶原促进了III型胶原的分泌,从而降低了新生组织中胶原I/III的比值,让组织修复更接近于生理修复,减少瘢痕形成。

3 讨论

体外实验无法考查血管新生对周围组织、器官的影响,因此体外实验不能代替体内实验^[12]。在体内实验中,鸡胚尿囊膜由于无需特别的准备便能观察微血管结构变化,且具有费用低廉、操作简便可重复实验、无伦理方面的关注等优点,因而是一个筛选药物血管新生疗效较为理想的实验模型^[13],但受孵化周期限制只能植入标本7-9 d,单独的在体模型不能反映血管新生的在体变化^[14],动物实验可以延长标本植入时间,进一步考查标本对体内血管新生的影响。

实验结果显示,生肌玉红胶原植入兔背部皮下后近旁组织内造模后14 d微血管新生达到高值,之后作

用减弱;而胶原内血红蛋白含量与周围组织血管新生表现一致。Sun 等^[15]将碱性成纤维细胞生长因子结合胶原后植入大鼠皮下14 d 时毛细血管数平均为30个/视野。实验显示术后14 d时毛细血管数平均为26个/视野,提示生肌玉红胶原海绵可以达到与碱性成纤维细胞生长因子载入胶原相似的疗效。前期的组织相容性研究显示,扫描电镜显示生肌玉红胶原表面及内部结构呈现多孔状,胶原纤维有序排列,对血管细胞的形成有趋化引导作用,可长入微血管^[16]。这次实验研究表明,载入生肌玉红胶原具有诱导微血管长入的作用,表现为生肌玉红胶原内血红蛋白含量显著高于对照组。血管生成素1在血管的新生中可与血管内皮生长因子协同发挥作用,血管内皮生长因子作用于血管形成的早期,促进原始血管网的形成;血管生成素1则作用于随后的血管改建、塑形,促进形成成熟且有空间结构的血管网。当血管内皮生长因子的作用存在时,血管生成素1可增加毛细血管管径,重建基膜,促内皮细胞增生与迁移,刺激新生血管出芽^[17]。这次实验检测植入胶原周围组织血管内皮生长因子及血管生成素1的蛋白含量,实验组术后3-7 d时血管内皮生长因子含量即明显升高,而后逐渐下降,血管生成素1创伤后亦显著升高,持续时间较血管内皮生长因子蛋白表达长,术后14 d仍高于对照组。显示出创伤早期阶段生肌玉红胶原诱导血管内皮生长因子形成的作用显著,而血管生成素1的出现稍迟,表明生肌玉红胶原是通过提高周围组织中血管内皮生长因子及血管生成素1的表达促进血管新生及成熟^[18]。

创伤胶原代谢的结果直接影响创面的修复质量,在创面愈合过程中起主要作用的是I、III型胶原,I型胶原起支架作用,III型胶原包绕于外周决定胶原纤维的直径大小和弹性好坏,III型胶原含量越高,胶原纤维越细,弹性越好,瘢痕越轻,I、III型胶原的比例与创面修复质量好坏密切相关。实验结果显示,术后第3天I型胶原即明显升高,到第7天时达峰值,而后逐渐下降,实验组稍高于对照组,但是比较没有统计学意义。说明在创伤修复的各个时期,生肌玉红胶原相比较于单纯植入胶原对周围组织中I型胶原的调控无明显优势,在植入形成的创面中,根据课题组前期的研究结果推断生肌玉红胶原与修饰后胶原的植入可能增加了I型胶原的分泌,但其因创伤导致的自身分泌规律并没有受到干扰,因而两者无明显差异。III型胶原的分泌7 d较3 d有显著升高,至14 d后开始下降,实验组下降趋势较缓慢。在实验28, 56 d显示出较明显的差异性,说明生肌玉红胶原制剂对III型胶原的调节优势体现在组织修复的后期,实验显示,实验后期28-56 d二者比值再度上升,但对照组上升较快,并于56 d 时间点超过正常成人皮肤组织中I、III型胶原的比例。实验表明生肌玉红胶原促进了III型胶原的分泌,从而降低了新生组织中胶原

I/III型的比值,让组织修复更接近于生理修复,减少瘢痕形成。研究提示,增生性瘢痕内血管数及血管内皮生长因子含量高,因而抗血管新生可以减少瘢痕形成^[19-20]。同时,对创面修复而言,在炎症与增殖期早期改善血管新生与微循环有利于炎症细胞的消退,使修复的塑形期胶原增殖与减少瘢痕的形成^[21-22]。实验组织学观察实验组在造模后第7天标本周围成纤维细胞量最多,增殖活性最强,胶原的分泌作用最强,之后逐渐减弱,至28 d时,实验组胶原形成与对照组无差异,但排列整齐,血管成熟,数量减少,与I、III型胶原的比例的结果一致,也说明了生肌玉红胶原在组织修复塑形期可以提高愈合质量,减少瘢痕形成。

总之,生肌玉红胶原可显著促进周围组织微血管新生,从而促进创伤组织的血液循环,协同调节I、III型胶原的比例而发挥促进组织愈合并减少瘢痕愈合的作用。

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30973596); 康缘中医药科技创新基金(HZ1009KY); 江苏省中医药领军人才基金(LJ2009002)。

作者贡献: 姚昶进行实验设计,实验实施为曹东阳、陈德轩尹恒,实验评估为陈德轩、曹东阳,资料收集为张晓清、郭檬檬,姚昶、曹东阳成文,卞卫和、姚昶审校,姚昶对文章负责。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 蛋白质印迹法-Western Blot,它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法,其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色,通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息。与Southern Blot或Northern Blot杂交方法类似,但Western Blot法采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗。

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] Hong H, Stegemann JP. 2D and 3D collagen and fibrin biopolymers promote specific ECM and integrin gene expression by vascular smooth muscle cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2008;19(10):1279-1293.

- [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] 缪雪华,张宇轩,陈运,等.生肌玉红胶原海绵促进胶原合成与组织愈合的研究[J].南京中医药大学学报,2012,28(4):337-341.
- [4] 严婷婷,熊猛,周勇,等.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.
- [5] 李永刚,高卫卫,姚昶.生肌玉红明胶海绵对机械性大鼠创面微循环影响的实验研究[J].江苏中医药,2010,42(12):71-73.
- [6] 高卫卫,姚昶.生肌玉红明胶海绵治疗慢性下肢溃疡32例临床观察[J].江苏中医药,2010,42(3):46-47.
- [7] 姚昶,孙海舰,姚涌晖,等.生肌玉红明胶海绵促进机械性创面肉芽生长的实验研究[J].医学研究杂志,2009,38(5):62-65.
- [8] Markowicz M,Koellensperger E,Steffens GC,et al.The impact of vacuum freeze-drying on collagen sponges after gas plasma sterilization. *J Biomater Sci Polym Ed*.2006;17(1-2):61-75.
- [9] 唐昱,盛国太,钟志英,等.丹红注射液促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(3):3110-3111.
- [10] 姚昶,高卫卫,薛涛,黄芪、脉络宁注射液载入修饰胶原对鸡胚尿囊膜血管新生的协同促进作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(34):6342-6346.
- [11] Chambers MS.Clinical commentary on prophylactic treatment of radiation-induced xerostomia.*Arch Otolaryngol Head Neck Surg*.2003;129(2):251-252.
- [12] Ribatti D,Nico B,Vacca A,et al.Chorioallantoic membrane capillary bed : a useful target for studying angiogenesis and antiangiogenesis in vivo.*Anat Rec*.2001;264(4):317-324.
- [13] 姚昶,薛涛,朱永康,等.鸡胚绒毛尿囊膜模型在微血管实验研究中的应用[J].微循环学杂志,2005,15(4):70-73.
- [14] Cimpean AM,Ribatti D,Raica M. A brief history of angiogenesis assays. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):377-382.
- [15] Sun B,Chen B,Zhao Y,et al.Crosslinking heparin to collagen scaffolds for the delivery of human platelet-derived growth factor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.2009;91(1):366-372.
- [16] 陈德轩,朱永康,姚昶.生肌玉红膏载入修饰后胶原的生物相容性研究[J].中华中医药学刊,2012,30(6):1234-1236.
- [17] 钟爱梅.自体脂肪移植和血管形成[J].中国美容医学,2006,15(3):341-343.
- [18] 柳晖,陈武鹏,徐华,等.联合VEGF和Ang-1基因治疗促进移植皮瓣血管化的实验研究[J].现代医院,2009,9(5):25-27.
- [19] 向军,王西樵,刘英开,等.烧伤后瘢痕组织中成纤维细胞ET-1表达及血管新生和胶原分布研究[J].上海交通大学学报:医学版,2010,30(7):839-842.
- [20] 沈锐,利天增,祁少海,等.靶向血管治疗增生性瘢痕的实验研究[J].中华整形外科杂志,2003,19(4):254-257.
- [21] Reinke JM,Sorg H.Wound Repair and Regeneration.*Eur Surg Res*.2012;49(7):35-43.
- [22] Wilgus TA,DiPietro LA.Complex roles for VEGF in dermal wound healing. *J Invest Dermatol*.2012;132(2):493-494.