

# 疮灵液载入胶原促进慢性创面的愈合

姚昶, 江虹, 许岩磊, 朱永康(南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市 210029)

## 文章亮点:

前期研究表明, 疮灵液有较好的抗炎作用, 体外可抑制血小板聚集, 抑制血栓形成, 具有活血化瘀和促进伤口的愈合作用。本实验旨在通过检测疮灵液载入胶原对大鼠背部慢性创面的创面面积、创面渗液中炎症反应及创面肉芽组织中金属蛋白酶含量与胶原合成状况的影响, 结果表明疮灵液胶原能显著抑制慢性创面炎症细胞增殖与浸润, 抑制创面炎症因子持续分泌, 调节创面炎症反应, 促进慢性创面愈合, 较疮灵液疗效有所增强。

## 关键词:

生物材料; 材料相容性; 疮灵液; 胶原; 慢性创面; 炎症; 创面愈合; 江苏省自然科学基金

## 主题词:

胶原; 炎症; 白细胞介素6; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 基质金属蛋白酶类

## 基金资助:

江苏省自然科学基金(BK2010598); 江苏省中医药领军人才项目(LJ2009002); 江苏省高校优势学科建设项目II期(012062003010); 江苏省中医院高峰学术人才培养(y2014cr06)

## 摘要

背景: 前期研究表明, 疮灵液具有较好的抗炎作用, 可抑制血小板聚集及血栓形成, 促进伤口愈合。

目的: 观察将疮灵液载入胶原后对慢性创面愈合的影响。

方法: 在40只大鼠背部制作慢性创面模型, 造模后3d随机均分为4组, 对照组以载0.2 mL生理盐水纱布外敷创面, 疮灵液组以载0.2 mL疮灵液纱布外敷创面, 胶原组以胶原海绵覆盖创面, 疮灵液载入胶原组以载0.2 mL疮灵液胶原覆盖创面。造模时及造模后第3, 7, 15天测定创面面积, 创面分泌物中白细胞总数、白细胞介素6与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平, 创面肉芽中羟脯氨酸、基质金属蛋白酶1, 2, 9的水平。

结果与结论: 疮灵液载入胶原组、疮灵液组造模后第3, 7, 15天肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、基质金属蛋白酶1, 2, 9水平均低于对照组、胶原组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 造模后第3, 7, 15天白细胞总数显著低于对照组、胶原组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 前两组间各指标比较差异无显著性意义; 疮灵液载入胶原组造模后第3, 7, 15天羟脯氨酸水平高于其余3组( $P < 0.05$ ); 疮灵液载入胶原组造模后15d创面面积显著低于其余3组( $P < 0.01$ ); 造模后15d, 4组间白细胞介素6水平比较差异无显著性意义。表明疮灵液载入胶原能显著抑制慢性创面炎症细胞增殖与浸润, 抑制创面炎症因子与基质金属蛋白酶分泌, 促进慢性创面愈合。

姚昶, 江虹, 许岩磊, 朱永康. 疮灵液载入胶原促进慢性创面的愈合[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(34): 5518-5522.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.34.021

## Chuanglingye-loaded collagen promotes chronic wound healing

Yao Chang, Jiang Hong, Xu Yan-lei, Zhu Yong-kang (Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** It has been shown that *Chuanglingye* has good anti-inflammatory effects, inhibits platelet aggregation and thrombus and improve wound healing.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of *Chuanglingye*-loaded collagen on regulating inflammation and healing process of chronic wounds.

**METHODS:** Forty rats were selected to make chronic wound models and randomly divided into four groups at 3 days after modeling: control group, collagen group, *Chuanglingye* group, *Chuanglingye*-loading collagen group, 10 rats in each group, respectively treated with 0.2 mL normal saline, 0.2 mL *Chuanglingye*, collagen and *Chuanglingye*-loaded collagen. The size of wounds was measured when modeling and at 3, 7 and 15 days after modeling. Amount of white blood cells, interleukin-6 level and tumor necrosis factor- $\alpha$  level in wound exudates were detected. The levels of hydroxyproline and matrix metalloproteases (MMPs), including MMP-1, MMP-2, MMP-9, in the granulation tissue, were also detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 3, 7, 15 days after modeling, the amount of white blood cells and levels of interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , MMP-1, MMP-2, MMP-9 were significantly lower in the *Chuanglingye*-loaded collagen group and *Chuanglingye* group compared to the control group and collagen group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). But there was no significant difference between *Chuanglingye*-loaded collagen group and

姚昶, 男, 1967年生, 上海市人, 博士, 主任中医师, 主要从事创伤修复专业研究。

通讯作者: 姚昶, 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市 210029

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)34-05518-05

稿件接受: 2015-05-28

http://www.crter.org

Yao Chang, M.D., Chief physician, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Yao Chang, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Accepted: 2015-05-28

*Chuanglingye* group. The level of hydroxyproline in the granulation tissue was significantly higher in the *Chuanglingye*-loaded collagen group than the other three groups at 3, 7, 15 days after modeling ( $P < 0.05$ ), and the size of wound in the *Chuanglingye*-loaded collagen group was significantly lower than that in the other three groups at 15 days after modeling ( $P < 0.01$ ). In addition, no significant difference was found among the four groups at 15 days after modeling. These findings indicate that *Chuanglingye*-loaded collagen can significantly depress proliferation and infiltration of inflammatory cells on the wound surface, decrease levels of inflammatory factors and MMPs in wound exudates, and thus promote the healing of chronic wounds.

**Subject headings:** Collagen; Inflammation; Interleukin-6; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Matrix Metalloproteinases

**Funding:** the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2010598; the Leading Personnel of the Traditional Chinese Medicine in Jiangsu Province, No. LJ2009002; Stage II Preponderant Discipline Project in Jiangsu Universities, No. 012062003010; Peak Academic Talent Culture of Jiangsu Hospital of TCM, No. y2014cr06

Yao C, Jiang H, Xu YL, Zhu YK. *Chuanglingye*-loaded collagen promotes chronic wound healing. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(34):5518-5522.

## 0 引言 Introduction

临床上2个月以上仍未愈合的创面,称为慢性难愈性创面,简称慢性创面<sup>[1]</sup>。创面愈合是机体在组织损伤后,恢复其组织及功能完整性的一个及时有序连续过程。连续的愈合过程受到干扰,致愈合缓慢或缺陷即形成慢性创面,现今仍是外科临床治疗的难点之一<sup>[1-9]</sup>。慢性创面的病理生理机制目前尚不明确,创面炎症期的延长被认为是其形成的主导因素,据研究创面的细菌负荷、基质金属蛋白酶的过度表达与其形成有关<sup>[1, 4-13]</sup>。因此,减少炎症因子分泌,抑制创面多度的炎症反应,降低基质金属蛋白酶水平,均能有效促进慢性创面愈合<sup>[14-16]</sup>。

前期研究表明,疮灵液有较好的抗炎作用,体外可抑制血小板聚集,抑制血栓形成,具有活血化瘀和促进伤口愈合的作用。本实验旨在通过检测疮灵液载入胶原对大鼠背部慢性创面的创面面积、创面渗液中炎症反应及创面肉芽组织中基质金属蛋白酶含量与胶原合成状况的影响,探讨疮灵液载入胶原促进慢性创面愈合的作用机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机区组设计动物观察实验。

**时间及地点:** 于2012年6月至12月在江苏省中医院动物实验中心完成。

**材料:** 疮灵液(江苏省中医院制药厂生产,批号:950118, pH值7.4, 浓度生药1 g/mL); 胶原由Dr Suwelack Skin & Health Care公司馈赠,环氧乙烷消毒后备用; 塑胶环(购于绍兴市柯桥淘帘纺织品有限公司,环氧乙烷消毒后备用); 疮灵液胶原(将0.2 mL疮灵液均匀载入胶原, -50 °C冻干)、金黄色葡萄球菌(26003)(菌数为 $6 \times 10^8$ /mL, 卫生部微生物鉴定所)、大鼠白细胞介素6酶联免疫检测试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ 酶联免疫检测试剂盒、羟脯氨酸试剂盒、大鼠基质金属蛋白酶1, 2, 9定量检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

**实验动物:** SPF级雄性SD大鼠40只, 体质量200-220 g, 由江苏省中医院动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(苏)-2012-0047, 按“实验动物国家标准”饲养。

### 实验方法:

**慢性创面动物模型:** 于40只大鼠背部制造一直径2 cm皮肤缺损,至皮下深筋膜,将塑胶环(内径2 cm, 外径2.3 cm)与创缘缝合4针固定,于创面内注入菌数 $6 \times 10^8$ /mL的金黄色葡萄球菌0.2 mL, 1次/d, 连续3 d。创面出现脓性分泌物、肉芽肿胀现象,即为造模成功。

**实验分组:** 将造模成功40只大鼠随机均分为对照组、胶原组、疮灵液组、疮灵液载入胶原组,组内编号,造模3 d后,疮灵液载入胶原组以疮灵液胶原敷于创面,对照组、疮灵液组则分别以载入0.2 mL生理盐水、0.2 mL疮灵液的同等大小无菌纱布敷于创面,胶原组以同等大小胶原敷于创面。外敷双层无菌纱布并固定,隔日换药。

**主要观察指标:** 于造模时及造模后第3, 7, 15天进行以下检测。

**创面面积:** 于造模时及造模后第3, 7, 15天对创面拍照,用Image J软件分析测定创面面积。

**创面渗液中白细胞总数、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平:** 按Takayama等<sup>[17]</sup>方法,将创面覆盖辅料整体取下,以1 mL生理盐水冲洗,收集冲洗液,离心后取上清液40  $\mu$ L,按试剂盒(指示操作步骤测定450 nm处A值,通过标准曲线得出肿瘤坏死因子 $\alpha$ 与白细胞介素6水平(ng/L)的数值;用取分泌物涮洗上清液20  $\mu$ L,滴入计数盘中,用低倍镜计数四角大方格中的白细胞总数,按照下面公式计算: 白细胞/升=4大格白细胞总数 $\times 10^5$ 。

**创面肉芽组织中羟脯氨酸、基质金属蛋白酶1, 2, 9水平:** 取创面肉芽组织称质量后,予以低温(4 °C)匀浆,按试剂盒指示操作步骤测定450 nm处A值,通过标准曲线得出金属蛋白酶水平(ng/L),然后除以质量(g)换算成该标本的数值。

**统计学分析:** 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $t$ 检验,使用SPASS 18.0软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 40只大鼠均造模成功,进入结

果分析。

## 2.2 各组大鼠创面面积比较 见表1。

各组大鼠初始创面面积平均约 0.80 cm<sup>2</sup>, 造模后第 3 天, 对照组、胶原组创面面积较初始时增大, 疮灵液组及疮灵液载入胶原组则较初始时明显减小( $P < 0.05$ )。造模后第 7 天, 各组创面面积较初始时均开始减小, 疮灵液组与疮灵液载入胶原组显著小于对照组( $P < 0.01$ ), 胶原组与对照组无明显差别。造模后第 15 天, 各组创面面积较初始时均显著减小( $P < 0.01$ ), 胶原组、疮灵液组及疮灵液载入胶原组创面面积显著小于对照组( $P < 0.01$ ), 其中疮灵液载入胶原组显著小于胶原组与疮灵液组, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。

表1 各组大鼠创面面积比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{cm}^2$ )

Table 1 The wound size in each group

| 组别       | 造模当天      | 造模第 3 天                | 造模第 7 天                | 造模第 15 天                |
|----------|-----------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 0.81±0.11 | 1.01±0.14              | 0.77±0.12              | 0.63±0.07               |
| 胶原组      | 0.78±0.09 | 0.82±0.17              | 0.68±0.10              | 0.47±0.15 <sup>a</sup>  |
| 疮灵液组     | 0.78±0.11 | 0.67±0.16 <sup>a</sup> | 0.62±0.13 <sup>a</sup> | 0.48±0.13 <sup>a</sup>  |
| 疮灵液载入胶原组 | 0.81±0.06 | 0.55±0.06 <sup>a</sup> | 0.53±0.07 <sup>a</sup> | 0.30±0.10 <sup>ab</sup> |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与疮灵液组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

## 2.3 各组大鼠创面分泌物中白细胞总数的比较 见表2。

各组大鼠造模后第 3 天起至 15 d 创面分泌物中白细胞总数较初始时显著升高( $P < 0.05$ )。15 d 时, 胶原组创面分泌物白细胞总数虽低于对照组, 但差异无显著性意义, 高于疮灵液组及疮灵液载入胶原组( $P < 0.05$ ); 疮灵液组与疮灵液载入胶原组创面分泌物中白细胞总数显著低于对照组与胶原组( $P < 0.05$ ), 疮灵液组与疮灵液载入胶原组间比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表2 各组大鼠创面分泌物中白细胞总数的比较

( $\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^6 \text{L}^{-1}$ )

Table 2 The total number of white blood cells in wound exudates of each group

| 组别       | 造模后当天     | 造模第 3 天                  | 造模第 7 天                  | 造模第 15 天                |
|----------|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 5.06±0.03 | 38.90±2.14               | 26.21±1.21               | 9.29±2.03               |
| 胶原组      | 4.88±0.51 | 32.10±1.08 <sup>a</sup>  | 17.28±1.13 <sup>a</sup>  | 8.21±1.19               |
| 疮灵液组     | 5.29±0.13 | 12.88±1.12 <sup>ab</sup> | 13.16±2.17 <sup>ab</sup> | 6.88±1.37 <sup>ab</sup> |
| 疮灵液载入胶原组 | 4.95±0.17 | 13.60±0.94 <sup>ab</sup> | 15.24±2.23 <sup>ab</sup> | 6.06±0.90 <sup>ab</sup> |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与胶原组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.4 各组大鼠创面分泌物中白细胞介素 6 水平的比较 见表3。

各组大鼠造模后, 创面分泌物中的白细胞介素 6 含量较初始时持续升高, 至第 15 天时略低于初始水平。造模后第 3, 7 天, 疮灵液组及疮灵液载入胶原组白细胞介素 6 水平显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 胶原组与对照组造模后 3-15 d 比较差异无显著性意义。造模后第 15 天, 疮灵液载入胶原组与疮灵液组白细胞介素 6 水平比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表3 各组大鼠创面分泌物中白细胞介素 6 水平的比较

( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/L}$ )

Table 3 The level of interleukin-6 in wound exudates of each group

| 组别       | 造模当天         | 造模第 3 天                   | 造模第 7 天                   | 造模第 15 天     |
|----------|--------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
| 对照组      | 118.78±38.30 | 214.28±21.59              | 161.32±22.35              | 101.45±27.16 |
| 胶原组      | 116.04±32.08 | 198.29±18.35              | 167.45±22.27              | 107.11±19.78 |
| 疮灵液组     | 120.37±30.16 | 148.16±14.97 <sup>a</sup> | 121.38±20.08 <sup>a</sup> | 94.62±17.31  |
| 疮灵液载入胶原组 | 117.43±25.15 | 168.11±20.02 <sup>a</sup> | 127.29±18.37 <sup>a</sup> | 101.49±16.12 |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

## 2.5 各组大鼠创面分泌物中肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平的比较 见表4。

对照组大鼠造模后创面分泌物中肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平持续升高至第 15 天。胶原组肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平从造模后至第 7 天无明显变化, 第 15 天轻度降低, 明显低于对照组( $P < 0.01$ )。疮灵液组及疮灵液载入胶原组创面分泌物中肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平持续降低, 第 7 天起显著低于造模时及造模第 3 天( $P < 0.01$ ), 两组间比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 而疮灵液组及疮灵液载入胶原组较对照组及胶原组肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平显著降低( $P < 0.05$ )。

表4 各组大鼠创面分泌物中肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平的比较

( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/L}$ )

Table 4 The level of tumor necrosis factor- $\alpha$  in wound exudates of each group

| 组别       | 造模当天         | 造模第 3 天                    | 造模第 7 天                    | 造模第 15 天                  |
|----------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 对照组      | 148.12±20.67 | 216.14±30.57               | 177.36±15.25               | 164.14±18.07              |
| 胶原组      | 150.29±25.14 | 159.34±17.02 <sup>a</sup>  | 151.93±14.60 <sup>a</sup>  | 131.76±6.40 <sup>a</sup>  |
| 疮灵液组     | 139.93±29.27 | 134.12±19.21 <sup>ab</sup> | 109.71±18.52 <sup>ab</sup> | 90.19±9.26 <sup>ab</sup>  |
| 疮灵液载入胶原组 | 149.97±30.28 | 120.94±20.08 <sup>ab</sup> | 107.41±15.54 <sup>ab</sup> | 95.13±10.37 <sup>ab</sup> |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与胶原组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

2.6 各组大鼠创面肉芽组织中羟脯氨酸水平的比较 见表5。各组大鼠创面肉芽组织中羟脯氨酸水平在造模后第 3, 7, 15 天均显著低于造模时( $P < 0.01$ )。对照组在造模后羟脯氨酸水平无明显升高, 胶原组在造模后第 7, 15 天轻度升高; 疮灵液组及疮灵液载入胶原组在造模后第 7, 15 天升高明显( $P < 0.05$ ), 且显著高于对照组与胶原组( $P < 0.05$ ), 疮灵液载入胶原组造模后第 3, 7, 15 天的羟脯氨酸水平显著高于疮灵液组( $P < 0.05$ )。

表5 各组大鼠创面肉芽组织中羟脯氨酸水平的比较

( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{g/L}$ )

Table 5 The level of hydroxyproline in the granulation tissue of each group

| 组别       | 造模当天      | 造模第 3 天                 | 造模第 7 天                 | 造模第 15 天                |
|----------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 8.80±1.61 | 3.83±0.98               | 3.73±0.59               | 3.94±0.33               |
| 胶原组      | 8.88±1.83 | 3.65±0.77               | 3.84±0.42               | 4.12±1.21               |
| 疮灵液组     | 8.40±1.07 | 3.78±1.18               | 4.56±0.95 <sup>a</sup>  | 4.77±1.13 <sup>a</sup>  |
| 疮灵液载入胶原组 | 8.78±1.66 | 4.73±0.79 <sup>ab</sup> | 5.79±1.13 <sup>ab</sup> | 6.45±1.60 <sup>ab</sup> |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与疮灵液组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

## 2.7 各组大鼠创面肉芽组织中基质金属蛋白酶水平的比较 见表6-8。

对照组大鼠创面肉芽组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 9 的水平在造模后第 3 天均明显升高( $P < 0.01$ ), 在造模后第 7 天仍处于较高水平。胶原组造模后 3, 7, 15 d 的基质金属蛋白酶 1, 2, 9 的水平较对照组仅轻度降低。造模后第 3 天起, 疮灵液组与疮灵液载入胶原组基质金属蛋白酶 1, 2, 9 水平均显著降低, 与对照组、胶原组相比差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 疮灵液载入胶原组基质金属蛋白酶 1, 2, 9 水平仅轻度低于疮灵液组, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 6 各组大鼠创面肉芽组织中基质金属蛋白酶 1 水平的比较

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

Table 6 The level of matrix metalloprotease-1 in the granulation tissue of wounds

| 组别       | 造模当天      | 造模第 3 天                 | 造模第 7 天                 | 造模第 15 天                |
|----------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 4.26±0.91 | 6.72±1.46               | 3.58±0.21               | 3.18±0.80               |
| 胶原组      | 4.21±1.18 | 4.26±0.12 <sup>a</sup>  | 3.20±0.56               | 2.96±0.29               |
| 疮灵液组     | 4.32±1.37 | 2.95±0.70 <sup>ab</sup> | 1.74±0.16 <sup>ab</sup> | 1.61±0.24 <sup>ab</sup> |
| 疮灵液载入胶原组 | 4.37±0.87 | 2.83±0.60 <sup>ab</sup> | 1.45±0.43 <sup>ab</sup> | 1.26±0.37 <sup>ab</sup> |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与胶原组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 7 各组大鼠创面肉芽组织中基质金属蛋白酶 2 水平的比较

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

Table 7 The level of matrix metalloprotease-2 in the granulation tissue of wounds

| 组别       | 造模当天      | 造模第 3 天                 | 造模第 7 天                 | 造模第 15 天                |
|----------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 6.39±0.70 | 10.59±1.90              | 5.95±0.39               | 3.85±1.35               |
| 胶原组      | 6.38±1.57 | 8.95±1.19               | 5.72±1.20               | 3.54±0.16               |
| 疮灵液组     | 6.31±1.69 | 3.52±0.65 <sup>ab</sup> | 2.64±0.17 <sup>ab</sup> | 2.00±0.56 <sup>ab</sup> |
| 疮灵液载入胶原组 | 6.34±1.89 | 3.32±1.20 <sup>ab</sup> | 2.54±0.84 <sup>ab</sup> | 1.90±0.69 <sup>ab</sup> |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与胶原组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 8 各组大鼠创面肉芽组织中基质金属蛋白酶 9 水平的比较

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

Table 8 The level of matrix metalloprotease-9 in the granulation tissue of wounds

| 组别       | 造模当天        | 造模第 3 天                  | 造模第 7 天                  | 造模第 15 天                 |
|----------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组      | 33.27±10.65 | 52.15±4.93               | 35.83±5.90               | 20.06±8.22               |
| 胶原组      | 31.35±11.38 | 27.70±2.97 <sup>a</sup>  | 18.23±4.96 <sup>a</sup>  | 16.27±2.64 <sup>a</sup>  |
| 疮灵液组     | 31.44±5.53  | 19.80±1.30 <sup>ab</sup> | 12.71±2.16 <sup>ab</sup> | 10.80±1.81 <sup>ab</sup> |
| 疮灵液载入胶原组 | 30.67±5.56  | 19.83±3.24 <sup>ab</sup> | 10.25±0.48 <sup>ab</sup> | 9.50±2.42 <sup>ab</sup>  |

表注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与胶原组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

## 3 讨论 Discussion

慢性创面是临床治疗长期以来面临的一大难题, 在发达国家, 其发病率达 1%~2% 且仍呈现上升趋势<sup>[15]</sup>, 其迁延不愈的特点严重影响患者生活质量, 加重了患者经济及社会医疗资源负担。目前慢性创面的治疗方法主要有高压氧治疗、创面封闭负压引流、外科清创、外源性生长因子等, 细胞治疗与基因治疗是目前慢性创面治疗的热门研究方向, 但其疗效及安全性仍有待考证<sup>[6-7, 10, 18-19]</sup>。

疮灵液是南京中医药大学附属医院研制并广泛应用于临床的一种纯中药外用液制剂, 由大黄、诃子、红花、黄蜀葵花等药组成。大黄苦寒, 有清热解毒、燥湿收敛之功; 诃子酸涩, 收敛生肌且杀虫功效卓著; 红花活血化瘀, 消肿止痛; 黄蜀葵花利尿消肿排脓, 为“疮家要药”, 诸药合用行清热解毒, 活血化瘀, 收敛生肌, 消肿止痛之效<sup>[20-21]</sup>。其应用于临床已逾三十载, 安全有效, 无毒副作用, 对各种化脓性溃疡及慢性溃疡临床疗效显著<sup>[22-23]</sup>。前期研究证实疮灵液具有良好的抑菌抗炎, 促进创面愈合的作用<sup>[8, 21, 24]</sup>。

本实验参照Assadian等金黄色葡萄球菌感染体外创面方法建立大鼠慢性创面模型<sup>[25]</sup>。其中大鼠创面面积结果显示对照组创面愈合时间延迟, 疮灵液组及疮灵液载入胶原组在造模后第3天起即显著促进创面愈合, 胶原、疮灵液、疮灵液胶原均能促进慢性创面愈合, 其中以疮灵液载入胶原后疗效最佳, 明显优于胶原及疮灵液。

炎症反应的持续存在是影响慢性创面愈合的重要因素之一。创面分泌物中白细胞总数大体反应了创面的炎症反应状况。白细胞介素6与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 是创面愈合过程中参与炎症反应的两种重要细胞因子。大量研究表明, 慢性创面分泌物中白细胞介素6与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平持续增高, 促使慢性创面发生炎症反应作用, 延迟创面愈合<sup>[9, 26]</sup>。对照组大鼠创面分泌物中白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平持续增高的结果与其一致。疮灵液及其载入胶原后显著降低了创面分泌物中白细胞总数及白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平, 表明疮灵液能显著抑制慢性创面炎症细胞的增殖与浸润, 抑制慢性创面分泌物中炎症因子持续升高, 有效调节慢性创面炎症反应。

胶原是细胞外基质的主要成分, 是细胞生长的依附与支持物, 具有促进血管新生利于创面愈合的作用<sup>[24, 27]</sup>。创面内胶原合成与降解的动态平衡与创面愈合密切相关。羟脯氨酸作为胶原中的一种特征性蛋白, 是评价胶原含量的主要指标<sup>[28]</sup>。疮灵液载入胶原后组创面肉芽中羟脯氨酸含量显著高于疮灵液组, 说明疮灵液载入胶原能增加创面肉芽中胶原合成, 促进慢性创面愈合, 疮灵液载入胶原后疗效优于疮灵液。

基质金属蛋白酶是参与细胞外基质降解的一类蛋白酶, 其中基质金属蛋白酶1与表皮基底膜和肉芽组织的重建有关, 基质金属蛋白酶2可降解血管基底膜而参与血管新生, 对肉芽形成及重塑有重要作用, 基质金属蛋白酶9能降解基底膜和细胞外基质成分。研究表明基质金属蛋白酶水平与创面愈合及慢性创面形成密切相关, 其过度表达干预创面正常愈合过程, 导致创面炎症期延长, 延迟创面愈合<sup>[5-7]</sup>。研究认为基质金属蛋白酶水平可作为评估慢性创面愈合状态的潜在生物学指标<sup>[5]</sup>。疮灵液载入胶原组基质金属蛋白酶1, 2, 9水平较对照组、胶原组显著降低, 轻度低于疮灵液组, 表明疮灵液胶原能有效降低慢性创面基质金属蛋白酶水平, 作用稍强于疮灵液。

综上,本次实验结果表明疮灵液胶原能显著抑制慢性创面炎症细胞增殖与浸润,抑制创面炎症因子持续分泌,调节创面炎症反应,促进慢性创面愈合,较疮灵液疗效有所增强。

**作者贡献:** 姚昶进行实验设计,实验实施为江虹、许岩磊,实验评估为姚昶,资料收集为江虹、许岩磊,姚昶成文,朱永康审校,姚昶对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学要求。

**学术术语:** 疮灵液-是应用于临床的一种纯中药外用液制剂,由大黄、诃子、红花、黄蜀葵花等药组成。大黄苦寒,有清热解毒、燥湿收敛之功;诃子酸涩,收敛生肌且杀虫功效卓著;红花活血化瘀,消肿止痛;黄蜀葵花利尿消肿排脓,为“疮家要药”,诸药合用行清热解毒,活血化瘀,收敛生肌,消肿止痛之效。其应用于临床已逾三十载,安全有效,无毒副作用,对各种化脓性溃疡及慢性溃疡临床疗效显著。

**作者声明:** 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Mustoe TA,O'Shaughnessy K,Kloeters O.Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis.J Plast Reconstr Surg.2006;117:35-41.
- [2] Broughton G,Janis JE,Attinger CE.The basic science of wound healing. Plastic Reconstr Surg.2006;117(7):12-34.
- [3] Gottrup F.A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. Am J Surg.2004;187(5A):38-43.
- [4] Guo S, Dipietro LA. Factors Affecting Wound Healing. J Dent Res.2010;89(3):219-229.
- [5] Moore K,Huddleston E,Stacey MC,et al.Venous leg ulcers-the search for a prognostic indicator.Int Wound J.2007; 4: 163-172.
- [6] 石冰,谭家祺,陈绍宗.慢性创面的病理生理以及治疗[J].组织工程与重建外科杂志, 2006,2(1):58-60.
- [7] 尹松林,简华刚.慢性创面的特点与负压创面治疗技术[J].重庆医学,2012,41(8):813-815.
- [8] 任晓梅,姚昶,朱永康,等.疮灵液胶原对创面愈合的促进作用[J].山东医药,2013 53(43):27-29.
- [9] Martin JM,Zenilman JM,Lazarus GS.Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing.J Invest Dermatol.2010;130:38-48.
- [10] Vaalamo M,Mattila L,Johansson N,et al.Distinct populations ofstromal cells express collagenase- 3 (MMP- 13) and collagenase- 1 (MMP- 1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds.J Invest Dermatol.1997;109(1):96-101.
- [11] Wysocki AB,Staiano-Coico L,Grinnell F.Wound Fluid from chronic Leg Ulcers Contains Elevated Levels of Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 .J Invest Dermatol.1993;101: 64-68.
- [12] 张凯,朱家源,唐冰,等.慢性创面的病原菌调查分析[J].中华医院感染学杂志, 2012,22(11):2455-2457.
- [13] 常菲,杨长伟,路卫.难愈创面的发生机制和治疗进展[J].第二军医大学学报, 2007,28(11):1259-1261.
- [14] Lateef H,Stevens MJ,Varani J.All-trans-retinoic acid suppresses matrix metalloproteinase activity and increases collagen synthe- sis in diabetic human skin in organ culture. Am J Pathol.2004;165(1):167-174.
- [15] 石冰,李望舟,李学拥,等.封闭负压引流治疗中人慢性创面肿瘤坏死因子水平的变化[J].中国临床康复,2005,9(42):92-94.
- [16] 缪雪华,周勇,任伟业,等.胶原海绵促进肉芽生长与创面愈合实验研究[J].中国当代医药, 2012,19(10):26-30.
- [17] Takayama M,Kuramoto Y,Okuyama R,et al.The exudate of pressure ulcers contains a substantial amount of vascular endothelial growth factor. Tohoku J Exp Med.2010;221(4): 315-319.
- [18] Graham ID,Harrison MB,Nelson EA,et al.Prevalence of lower-limb ulceration: a systematic review of prevalence studies.Adv Skin Wound Care.2003;16:305-316.
- [19] Branski LK,Gauglitz GG,Herndon DN,et al.A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing.Burns. 2009;35:171-180.
- [20] Lau K,Paus R,Tiede S,et al.Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing.Exp Dermatol.2009;18:921-933.
- [21] 宋金斌,王朝晖,任菊琴,等.疮灵液的研制和临床应用[J].时珍国药研究,1996,7(5):318 -320.
- [22] 张爱华,陆茵,许慧琪,等.疮灵液的药理研究[J].江苏药学与临床研究,1997,1(4):14-18.
- [23] 杨能华.疮灵液治疗缺血性溃疡38例[J].南京中医药大学学报, 1997,13(5):310 -311.
- [24] 王朝晖,任菊琴,宋金斌,等.疮灵液用于溃疡的临床及实验研究[J].山西护理杂志,1997, 11(5):200-203.
- [25] 张宇轩,姚昶,朱永康,等.疮灵液载入胶原对血管新生影响的实验研究[J].南京中医药大学学报,2013,29(3):251-254.
- [26] Assadian O,Assadian A,Stadler M,et al.Bacterial growth kinetic without the influence of the immune system using vacuum-assisted closure dressing with and without negative pressure in an in viro wound model.Int Wound J.2010;7(4): 283-289.
- [27] Thomsen TR,Aasholm MS,Rudkjøbing VB,et al.The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. Wound Repair Regen.2010;18:38-49.
- [28] 张晶,姚昶,尹恒,等.生肌玉红膏促进下肢慢性创面愈合257例随机对照多中心临床研究[J].中医杂志,2013,54(1):35-38.