论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0704-04

封闭负压引流技术对人慢性创面组织中 C-ski 及 Smad3 表达的影响

曾 勇,简华刚,宗建春,秦开秀 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院急诊科)

[摘要] **目的** 观察封闭负压引流技术(vacuum-assisted closure,VAC)治疗慢性创面前后创缘组织中 C-ski 及 Smad3 表达的改变,从创面愈合启动方面探讨 VAC 促进创面愈合的机制。**方法** 临床选取慢性创面病例 14 例,分别于治疗前,治疗后 1、4、7 d 取创缘全层皮肤组织,应用免疫组织化学检测样本组织的 C-ski 及 Smad3 的表达变化,应用 RT-PCR 检测样本组织中 C-ski mRNA 和 Smad3 mRNA 的变化。**结果** 治疗前创缘组织中 C-ski 的表达较少,治疗后逐渐增加,治疗后第 4 天起较治疗前显著增加($P<0.05$)。相反,治疗前创缘组织中 Smad3 的表达较多,治疗 1 d 后轻微减少,治疗 4 d 和 7 d 后显著减少($P<0.05$),C-ski mRNA 和 Smad3 mRNA 的表达趋势同其蛋白一样。C-ski 阳性表达与 Smad3 阳性表达呈显著负相关($r=-0.873$,$P<0.01$)。**结论** VAC 治疗后,能够使创缘组织中的 C-ski 表达增加并且抑制了 Smad3 的表达。

[关键词] 封闭负压引流技术;慢性创面;C-ski;Smad3

[中图法分类号] R364.3; R605; R641 **[文献标志码]** A

Vacuum-assisted closure up-regulates C-ski and down-regulates Smad3 in human wound tissue

Zeng Yong, Jian Huagang, Zong Jianchun, Qin Kaixiu (Department of Emergency, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of vaccum-assisted closure (VAC) on the expression of C-ski and Smad3 in the human wound margin tissue and to explore their significance in triggering the wound healing. **Methods** Fourteen patients, 9 males and 5 females with chronic wound admitted in our department from April 2007 to April 2009 were enrolled into the study after signed an informed consent, and the full-thickness skin defects were collected before treatment, and 1, 4 or 7 d after treatment. Immunohistochemistry (IHC) was carried out to detect the expressions of C-ski and Smad3, and RT-PCR was used to determine their mRNA expressions of C-ski and Smad3. **Results** IHC results showed that there existed little C-ski in the wound margin tissue before treatment, and after treatment, it were gradually increased. Compared with before treatment group, the differences in 4 and 7 d after treatment were markedly significant ($P<0.05$). Conversely, there expressed more Smad3 in the wound margin tissue before treatment, and the difference between before treatment group and 1 d after treatment were statistically significant ($P>0.05$). Compared with above groups, the differences in 4 and 7 d after treatment groups were markedly significant ($P<0.05$). RT-PCR results suggested the same tendency with the IHC results. Also, the results showed there was a negative correlation between C-ski and Smad3 ($r=-0.873$, $P<0.01$). **Conclusion** VAC accelerates the course of wound healing through improving the expression of C-ski and inhibiting the expression of Smad3.

[Key words] vacuum-assisted closure; chronic wounds; C-ski; Smad3

Corresponding author: Jian Huagang, Tel: 86-23-63693399, E-mail: hgjian@sohu.com

封闭负压引流技术(vacuum-assisted closure, VAC)对各类创面都有明显的治疗效果。研究证实 VAC 可以清除坏死组织和引流液,促进血管生长及肉芽组织形成,增加创面局部血流,促进慢性创面愈合[1,2],但其机制仍待深入研究。原癌基因在组织修复过程中发挥重要的作用。原癌基因 C-ski 可以结合转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)的下游转录因子 Smad3,从而逆转 TGF-β1/Smad3 对上皮细胞的抑制作用[3]。研究显示,Smad3 基因缺失可以使小鼠皮肤的创伤愈合加快[4,5],并且可以保护小鼠皮肤减轻由电离辐射引起的伤害[6]。因此,本

[通信作者] 简华刚,电话:(023)63693399,E-mail:hgjian@sohu.com

实验我们通过对患者慢性创伤的创面进行VAC处理，然后采用RT-PCR及IHC方法检测创缘组织中C-ski及Smad3表达的改变，探讨VAC是否能够通过诱导C-ski的表达，抑制Smad3表达来影响创面愈合，从创面愈合启动方面探索VAC促进创面愈合的机制。

1 资料与方法

1.1 主要试剂

RNAiso Plus（提取总RNA）及RT-PCR试剂盒购于上海生工，引物及人actin内参均由上海生工合成。C-ski及Smad3抗体及免疫组化通用试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 研究对象

选取2007年4月至2009年4月本院创伤烧伤科收治的慢性创面患者为试验对象，共14例（男性9例，女性5例，年龄18～60岁），其中外伤后创面缺损伴感染6例，肢体小面积深度烧伤后溃疡形成2例，骶尾部褥疮3例，小腿静脉淤滞性溃疡3例。慢性创面诊断标准为：创面形成1个月以上，经传统保守治疗无愈合。纳入对象无其他系统严重疾病，病程40 d至8个月，且征得患者的同意。

1.3 方法

1.3.1 创面治疗　碘伏消毒创周及创面，清除创面坏死组织，依创面形状剪裁医用海绵，置于创面，塑料引流管带侧孔的一端插入海绵，另一端引出创面并连接到负压吸引装置（吸痰器），创面及创周围手术贴膜完全封闭，负压调整为－100 mmHg，我科采用间歇式吸引，即每小时吸引20 min。在创面治疗后1、4、7 d后更换聚氨酯海绵、医用贴膜、引流管。

1.3.2 标本收集　分别在创面治疗前，治疗后1、4、7 d，在创缘切取约6 mm×3 mm×2 mm的全层皮肤组织。将组织块均分为2份，1份10%甲醛固定，石蜡包埋，切片，用于免疫组化检测；1份冻存于－80 ℃液氮冰箱，用于RT-PCR。

1.3.3 RT-PCR　人Smad3上游引物：5′-AGGGCTTTGAGGCTGTCTACC-3′，下游引物：5′-GTCCACGCTGGCATCTTCTG-3′，产物384 bp。人C-ski上游引物：5′-TTGTTTTCAAGTTGGAGGAG-3′，下游引物：5′-AAGATAGCAATGCCATTTAG-3′，产物大小为478 bp。内参β-actin引物序列：上游引物5′-CTCGTCATACTCCTGCTTGCTG-3′，下游引物5′-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3′，产物大小为546 bp。然后提取细胞总RNA，RT-PCR按照试剂盒上说明完成。条件为：94 ℃预变性2 min，然后94 ℃ 0.5 min，60 ℃ 0.5 min，72 ℃ 1 min，共35个循环。反应结束后，取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，并用Quantity One软件进行扫描半定量分析，以所测得样品光密度积分值与β-actin光密度积分值的比值为样本半定量值。

1.3.4 免疫组化检测Smad3及C-ski蛋白表达　每组各时间点样本切片3张，分别用于HE染色和Smad3及C-ski的免疫组化染色。阳性表达的细胞以细胞质和细胞核内出现棕黄色颗粒为标准。在光镜10×40视野下，每张切片随机取5个视野，分别计数视野中的Smad3以及C-ski的阳性细胞数，采取双人计数，得出平均值，取5个视野计数之和的平均值为Smad3及C-ski阳性表达的相对含量。

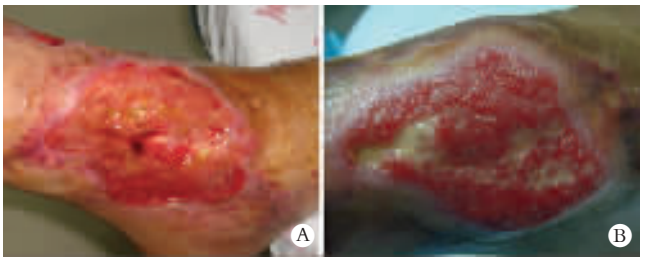
1.4 统计学分析

结果以$\bar{x} \pm s$表示，用SPSS 10.0统计软件进行t检验，并对Smad3和C-ski的阳性表达进行线性相关分析。

2 结果

2.1 VAC治疗前后的大体观察

治疗前肉芽组织晦暗而薄，均有渗液，触之不易出血。治疗后1 d，创面较前清洁，渗液减少。治疗后第4天，创面清洁，渗液明显减少，创面有新生颗粒状肉芽组织生成，表面可见到由敷料紧密贴附形成的网格状压痕。治疗后第7天，创面有大量鲜红色肉芽组织生成，外观红润，触之易出血，表面富有出血点，创缘被环形薄层新生上皮覆盖，白色透明（图1）。

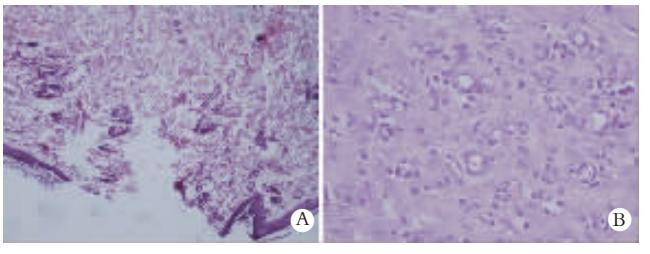


A：治疗前1 d；B：治疗后7 d

图1 VAC治疗前后创面组织的大体肉眼观察

2.2 VAC治疗前后病理学观察

VAC治疗前1 d，镜下可见创面中央主要为脂肪组织，细胞水肿并有少量炎性细胞浸润，还可见大量细胞碎片。VAC治疗1 d后，治疗组创面中已有少量纤维母细胞和血管内皮细胞出现，并有炎性细胞浸润，此后创面中的成纤维细胞和血管内皮细胞逐渐增多。在治疗后7 d，创面中出现大量的由炎性细胞和成纤维细胞和血管内皮细胞组成的肉芽组织，细胞水肿消失（图2）。

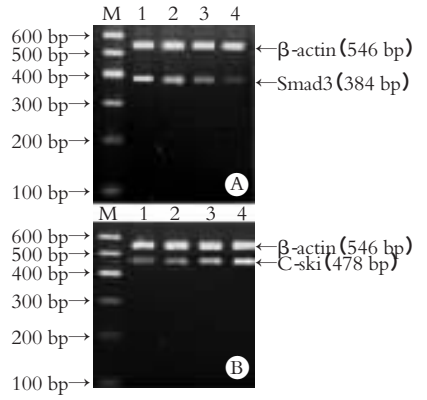


A：VAC治疗前1 d（×200）；B：VAC治疗后7 d（×400）

图2 VAC治疗前后创面组织的病理形态学观察（HE）

2.3 VAC治疗后Smad3和C-ski mRNA的表达

RT-PCR结果显示：治疗前创缘组织有较多Smad3 mRNA表达；治疗1 d后，Smad3 mRNA含量轻微减少，差异无统计学意义（$P>0.05$）；治疗4 d和7 d后显著减少，与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。而C-ski mRNA的表达则刚好相反：在治疗前创缘组织中含有较少C-ski mRNA，随着治疗的时间的推移，C-ski mRNA的表达逐渐增强，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图3、表1。



M:标准;1:治疗前;2:治疗后1 d;3:治疗后4 d;4:治疗后7 d

图3 RT-PCR检测VAC治疗对创缘组织中Smad3 mRNA(A)和C-ski mRNA(B)表达的影响

表1 VAC治疗前后创缘组织中Smad3 mRNA和C-ski mRNA表达的变化($n=14$, $\bar{x}\pm s$)

基因	治疗前	治疗后1 d	治疗后4 d	治疗后7 d
Smad3 mRNA	0.983±0.025	0.899±0.031	0.554±0.019[a]	0.349±0.028[a]
C-ski mRNA	0.337±0.030	0.605±0.022	0.775±0.023[a]	0.893±0.014[a]

a:$P<0.05$,与治疗前比较

2.4 创缘组织中C-ski及Smad3蛋白的表达

VAC治疗前创缘组织可见C-ski及Smad3的阳性表达细胞,两者都表达于成纤维细胞的细胞核和细胞质中。治疗1 d后,C-ski的阳性表达细胞数开始增加,但差异无统计学意义($P>0.05$);随着治疗时间的延长,阳性表达细胞数明显增加,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$);相反,Smad3的阳性表达细胞数在治疗1 d后轻微减少,治疗4、7 d后显著减少($P<0.01$),7 d时达到最低。见表2。

表2 治疗前后创缘组织中C-ski和Smad3蛋白阳性表达的变化($n=14$, $\bar{x}\pm s$)

蛋白	治疗前	治疗后1 d	治疗后4 d	治疗后7 d
C-ski	26.71±4.83	32.14±3.75	45.00±3.72[a]	56.71±4.39[a]
Smad3	85.28±4.74	74.85±4.78	59.42±3.81[a]	49.57±4.86[a]

a: $P<0.01$,与治疗前比较

2.5 线性相关分析

对C-ski蛋白阳性细胞数与Smad3蛋白阳性细胞数进行线性相关性分析,结果显示,C-ski蛋白与Smad3蛋白呈直线负相关($r=-0.873$, $P<0.01$)。

3 讨论

VAC是新兴发展起来的一种创面治疗新技术,目前被广泛应用于各类急、慢性伤口,尤其适用于各类传统的外科方法无效的慢性难愈性伤口以及不能立即施行确定性外科创面关闭方法如皮瓣的移植等伤口[7,8]。尽管VAC治疗创面愈合的作用已经十分明确,但是其机制仍不清楚。近年来,人们发现某些原癌基因与创面的愈合有着密切联系:陈绍宗等[9]应用VAC处理人的慢性创面过程中发现,原癌基因C-jun在治疗后的表达逐渐减弱,而另外2种原癌基因C-myc和Bcl-2则迅速增强。石冰等[10]研究也发现VAC能够抑制原癌基因C-fos的表达。因此,研究原癌基因的表达有助于了解创面愈合的启动过程。

C-ski也是一种原癌基因,是成纤维细胞的调节因子,能促进成纤维细胞的快速增殖。中胚层来源的皮肤成纤维细胞是创伤愈合重要的修复细胞,因此C-ski的表达能促进皮肤的愈合。Smad3是成纤维细胞重要的调节因子,它可以通过促进P21、P15的表达抑制细胞周期的进展,通过调节与Bcl-2相关的一些蛋白(如Bad、Bim、Bcl-XL)等机制参与不同细胞凋亡的调控[11,12]。C-ski是细胞内Smad3重要的辅阻遏子[13],它可以通过抑制Smad3的活性来调节细胞的增殖和凋亡。研究证实,在大鼠的皮肤成纤维细胞内,C-ski主要通过Smad3来促进细胞的增殖[14,15]。而在人的慢性创伤经过VAC处理前后,创缘组织中C-ski和Smad3的表达有着怎样的变化却不清楚。

因此,本实验以人慢性创面为研究对象,通过RT-PCR和免疫组化等方法检测了VAC治疗前后创缘组织中,C-ski和Smad3在基因和蛋白水平上的变化。本研究结果显示,慢性创伤后未经VAC治疗,创缘组织中的C-ski mRNA表达较弱,且在创缘组织中的成纤维细胞中的表达也弱;而Smad3 mRNA的表达较强,在成纤维细胞中的表达也呈强阳性。随着VAC对创面的治疗,创缘组织中的C-ski mRNA以及成纤维细胞的蛋白水平都显著增强,而Smad3 mRNA和蛋白表达水平则逐渐减弱($P<0.05$);而且,研究还发现C-ski和Smad3的表达呈负相关($r=-0.873$)。这进一步说明VAC不仅通过提高C-ski的表达,而且还增强了对Smad3的抑制作用,进而导致Smad3的转录活性的减弱,从而促进纤维细胞的增殖和创面的修复。

综上所述,C-ski和Smad3在创面愈合的过程中都发挥了不同的重要的作用,进一步提高C-ski的表达水平或/和抑制Smad3的表达对于创面愈合将有积极的意义。

参考文献:

[1] Sepulveda G, Espindola M, Maureira M, *et al*. Negative-pressure wound therapy versus standard wound dressing in the treatment of diabetic foot amputation. A randomised controlled trial [J]. Cir Esp, 2009, 86(3): 171-177.

[2] Baharestani M, Amjad I, Bookout K, *et al*. V. A. C. Therapy in the management of paediatric wounds: clinical review and experience[J]. Int Wound J, 2009, 6(Suppl 1): 1-26.

[3] Boone B, Haspeslagh M, Brochez L. Clinical significance of the expression of c-Ski and SnoN, possible mediators in TGF-beta resistance, in primary cutaneous melanoma[J]. J Dermatol Sci, 2009, 53(1): 26-33.

[4] Ashcroft G S, Yang X, Glick A B, *et al*. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response [J]. Nat Cell Biol, 1999, 1(5): 260-266.

[5] 毛春明, 杨晓, 张莉, 等. Smad3基因缺失加快的小鼠皮肤创面收缩速度机制研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8(26): 5538-5540.
[6] Flanders K C, Sullivan C D, Fujii M, *et al*. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation [J]. Am J Pathol, 2002, 160(3): 1057-1068.
[7] Simek M, Nemec P, Zalesak B, *et al*. Vaccum-assisted closure in the treatment of sternal wound infection after cardiac surgery[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2007, 151(2): 295-299.
[8] Blume P A, Walters J, Payne W, *et al*. Comparison of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure with advanced moist wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a multicenter randomized controlled trial[J]. Diabetes Care, 2008, 31(4): 631-636.
[9] 陈绍宗, 曹大勇, 李金清, 等. 封闭负压引流技术对创面愈合过程中原癌基因表达的影响[J]. 中华整形外科杂志, 2005, 21(3): 197-200.
[10] 石冰, 陈绍宗, 段晓莉, 等. 封闭负压引流技术对人慢性创面创缘组织中c-fos表达的影响[J]. 实用美容整形外科杂志, 2002, 13(6): 330-332.
[11] Yang Y A, Zhang G M, Feigenbaum L, *et al*. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2 [J]. Cancer Cell, 2006, 9(6): 445-457.
[12] Wildey G M, Patil S, Howe P H. Smad3 potentiates transforming growth factor beta(TGFbeta)-induced apoptosis and expression of the BH3-only protein Bim in WEHI 231 B lymphocytes [J]. J Biol Chem, 2003, 278(20): 18069-18077.
[13] Suzuki H, Yagi K, Kondo M, *et al*. C-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements [J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5068-5076.
[14] 刘霞, 李平, 张恩, 等. C-ski对大鼠皮肤成纤维细胞增殖的调节作用及机制[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(5): 559-564.
[15] 刘霞, 李平, 张恩, 等. C-ski和Smad3在大鼠皮肤成纤维细胞辐射性损伤中的变化及意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15): 1455-1457.

(**收稿**:2009-09-22;**修回**:2009-11-10)
(编辑 张 维)

(上接703页)

图:心率失常-心房纤颤;③化验检查:血常规、尿常规、尿素氮、肌酐、血糖、凝血系列、血钠、血氯、血气分析、血氨均正常,血钾3.22 mmol/L,肝功能:各项转氨酶正常,肝炎系列正常;④超声心动图提示风心病、二尖瓣狭窄,射血分数68% ;⑤肝超声提示肝脏形态大小正常,肝脏实质性密度增高。入院诊断:大面积脑梗死,风湿性心脏病,心率失常-心房纤颤,肝硬化。入院后给以清除自由基、活血化淤、抗血小板聚集、纠正电解质紊乱等治疗。入院后第3天意识状态较前加重,呈浅昏迷状态,余神经系统查体同入院时无变化,考虑为脑水肿所制意识障碍加重,加强了脱水降颅压,症状无好转,复查血常规、尿常规、电解质、血糖、尿素氮、肌酐正常,血氨60 μmol/L,血气分析结果提示呼吸性碱中毒合并代谢性酸中毒,床旁脑电图提示大量慢波,考虑同时合并肝性脑病,给以加用杜密克口服、白醋灌肠通便排氨,支链氨基酸静点降低血氨,同时给以对症支持等治疗,经治疗后患者病情好转出院。

2 讨论

急性重症脑卒中是指直径>5.0 cm或跨二叶的大面积脑梗死;脑出血量>50 ml或脑室、丘脑、小脑出血;脑干出血或梗死;平均动脉压>19.3 kPa或昏迷的脑卒中患者。根据本组2例患者的发病形式及影像学改变,诊断急性重症脑卒中成立。肝性脑病是严重肝病引起的,以代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调的综合病症[1],其主要临床表现是轻微的认知功能障碍、精神错乱和行为失常、睡眠障碍、扑翼样阵颤、腱反射亢进、肌张力增高、锥体束征阳性、昏睡甚至昏迷,化验血氨增高。急性重症脑卒中及肝性脑病同时并存时很难鉴别,尤其是化验血氨正常时,更容易误诊。病例1大量右侧颞顶叶脑出血诊断明确,患者在早期出现的精神症状,正处在脑出血急性期,且当时查血氨正常,认为因脑叶出血及脑水肿所致精神症状,但在脑出血基本吸收状态下仍有明显的精神症状,甚至出现了意识障碍加重;患者既往有肝硬化病史,首先应考虑为肝性脑病(HE),但化验血氨无明显增高。肝性脑病的发病机制目前仍不十分清楚,神经系统氨中毒曾认为是发生本病的主要原因。但研究发现,昏迷的发生、发展与氨含量并不平行,提示脑部功能障碍不仅是氨中毒因素[2]。大量的研究及临床实验证实脑电图在肝性脑病早期诊断中具有重要价值[3-5],脑电图据病情发展具有一定特点,主要为背景脑电图慢波化、δ波和三相波的出现,在肝性脑病早期,基本节律变慢,仍可见到α节律突然可转变为5~7 Hz或5~8 Hz节律的慢波,随着意识障碍加深可出现高波幅的δ波和与肝性脑病有关的特异性三相波。随后给患者进行了脑电图检查,提示有明确的三相波,是肝性脑病的特异性表现。患者在早期出现的精神症状可能同时合并肝性脑病,如果当时查脑电图可能对HE早期诊断有一定的意义,但当时我们忽视了这一点。病例2病情加重时为发病后第3天,正好为水肿高峰期,当时考虑病情加重与脑水肿有关,因患者有肝硬化病史当时考虑要除外肝性脑病,查血氨及脑电图证实存在肝性脑病,给以积极早期治疗后病情逐渐好转,如果单纯考虑因脑水肿引起症状加重可能会延误治疗。

因此,当患者出现用神经科原发疾病不能解释的症状时,要多考虑有无其他疾病所致的神经症状。尤其要注意患者的既往史,对于急性重症脑卒中及肝硬化同时并存,要及时进行脑电图检查;早期诊断、及时处理有利于患者的预后。

参考文献:

[1] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 463.
[2] 陆伦根. 肝性脑病的发病机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(5): 304.
[3] 张海霞. 120例肝硬化患者脑电图与临床相关因素的分析[J]. 现代医药卫生, 2002, 18(1): 6-7.
[4] Shawcross D, Jalan R. Dispelling myths in the treatment of hepatic encephalopathy[J]. Lancet, 2005, 365(9457): 431-433.
[5] 孙钦建, 王爱华, 珠梅佳, 等. 肝性脑病患者的EEG、CT和MRI研究[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(11): 1759-1761.

(**收稿**:2009-12-18;**修回**:2010-01-20)
(编辑 汪勤俭)