doi:10.11659/jjssx.04E019050

·基础研究·

甘草酸对切口愈合模型大鼠促进切口愈合及防止瘢痕形成效果的研究

陈志勇,李栋梁,余雪丰,刘姗姗,吴 萍,黄洁清 (涪陵中心医院烧伤整形科,重庆 408099)

[摘 要] **目的** 研究甘草酸促进胶原合成对切口愈合模型大鼠瘢痕形成及切口愈合的效果。**方法** 选择50只SD健康大鼠,随机分为空白对照组、模型组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组10只。模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组均建立切口愈合模型,30 min后对低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠分别静脉注射10 mg/kg、15 mg/kg、30 mg/kg甘草酸,术后3 d、7 d、14 d观察各组大鼠变化。进行组织切片、HE染色,观察大鼠病理组织学变化,检测创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA表达量及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、PTEN/AKT/VEGF信号通路蛋白表达量,计算愈合瘢痕面积、创面愈合率及愈合时间,并进行组间比较。**结果** 术后3 d、7 d、14 d低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGFR2、p-AKT蛋白表达量均高于模型组,PTEN蛋白表达量低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGFR2、p-AKT蛋白表达量均高于低剂量组,PTEN蛋白表达量低于低剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGFR2、p-AKT蛋白表达量均高于中剂量组,PTEN蛋白表达量均低于中剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。术后3 d、7 d、14 d低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率均高于模型组大鼠,创面愈合时间短于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d中剂量组、高剂量组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率均高于低剂量组,创面愈合时间短于低剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d高剂量组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率均高于中剂量组,创面愈合时间短于中剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 甘草酸通过作用于PTEN/AKT/VEGF信号通路,减轻切口创面炎性浸润,促进胶原合成、创面愈合,防止瘢痕形成,且呈剂量依赖。

[关键词] 甘草酸;胶原合成;切口愈合;瘢痕形成

[中图分类号] R62 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-04-09

[基金项目] 重庆市涪陵区科技计划项目(FLKJ,2016ABB1067)

[通信作者] 黄洁清,E-mail:czy1002008@163.com

[6] Baksh D,Yao R,Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow[J]. Stem Cells,2007,25(6):1384-1392. doi:10.1634/stemcells.2006-0709.

[7] Frohman EM,Racke MK,Raine CS. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis[J]. N Engl J Med,2006,354(9):942-955. doi:10.1056/NEJMra052130.

[8] Laroye C,Gibot S,Reppel L,et al. Mesenchymal stromal/stem cells:a new treatment for sepsis and septic shock? [J]. Stem Cells,2017,35(12):2331-2339. doi:10.1002/stem.2695.

[9] Ouyang H,Xue Y,Lin Y,et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis[J]. Nature,2014,511(7509):358-361. doi:10.1038/nature13465.

[10] Graw J. Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates[J]. Dev Genet,1996,18(3):181-197. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:33.0.CO;2-5.

[11] Rishali G,Longmei Z,Takele T,et al. Human embryonic stem cell derived mesenchymal stem cells:an alternative mesenchymal stem cell source for regenerative medicine therapy[J]. Regen Med,2014,9(4):453-465. doi:10.2217/rme.14.13.

[12] Nardi NB,da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells:isolation,in vitro expansion and characterization[J]. Handb Exp Pharmacol,2006,174:249-282. doi:10.1007/3-540-31265-X_11.

[13] 候天勇,罗 飞,许建中. 山羊骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定[J]. 局解手术学杂志,2008,17(6):376-378. doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2008.06.003.

[14] 王红均,张其彬,伍 莉,等. H5N1型禽流感NS1基因在HEK293细胞中的表达及稳定细胞系的构建[J]. 中国兽医学报,2018,38(11):2125-2130. doi:10.16303/j.cnki.1005-4545.2018.11.16.

[15] Jimenez A,Davies J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces[J]. Nature,1980,287(5785):869-871. doi:10.1038/287869a0.

[16] Tzameret A,Sher I,Belkin M,et al. Epiretinal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells rescues retinal and vision function in a rat model of retinal degeneration[J]. Stem Cell Res,2015,15(2):387-394. doi:10.1016/j.scr.2015.08.007.

[17] Lan Y,Kodati S,Lee HS,et al. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2012,53(7):3638-3644. doi:10.1167/iovs.11-9311.

(编辑:刘 艺)

Effect of glycyrrhizic acid on promoting wound healing and preventing scar formation in wound healing model rats

CHEN Zhi-yong, LI Dong-liang, YU Xue-feng, LIU Shan-shan, WU Ping, HUANG Jie-qing (Department of Burn and Plastic Surgery, Fuling Central Hospital, Chongqing 408099, China)

Abstract: Objective To study the effect of glycyrrhizic acid on promoting wound healing and preventing scar formation in wound healing model rats. **Methods** A total of 50 healthy SD rats were randomly divided into blank control group, model group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group, with 10 rats in each group. The wound healing model was established in model group, low-dose group, middle-dose group and high-dose group. The rats in low-dose group, middle-dose group and high-dose group were injected with 10 mg/kg, 15 mg/kg, 30 mg/kg glycyrrhizic acid intravenously 30 minutes later. The changes of rats in each group were observed at 3 days, 7 days and 14 days after operation. Histopathological changes of rats were observed by histological section and HE staining. The mRNA expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ, VEGF, bFGF, EGF were detected. Signaling pathway protein expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ, PTEN/AKT/ VEGF in wound tissue were detected. The healing scar area, wound healing rate and healing time were calculated and compared among the 5 groups. **Results** The mRNA expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ, VEGF, bFGF, EGF and protein expression of collagen type Ⅰ, Ⅲ, VEGFR2 and p-AKT in low-dose group, middle-dose group and high-dose group at 3, 7 and 14 days after operation were higher than those in model group, and the protein expression of PTEN was lower than that in model group, the differences were significant ($P<0.05$). The mRNA expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ, VEGF, bFGF, EGF, the protein expression of VEGFR2 and p-AKT in middle-dose group and high-dose group at 3, 7 and 14 days after operation were higher than those in low-dose group, and the protein expression of PTEN was lower than that in low dose group, the differences were significant ($P<0.05$). The mRNA expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ, VEGF, bFGF, EGF, the protein expression of VEGFR2 and p-AKT in high-dose group at 3, 7 and 14 days after operation were higher than those in middle-dose group, and the protein expression of PTEN was lower than that in middle dose group, the differences were significant ($P<0.05$). The healing scar area, wound healing rate in low-dose group, middle-dose group and high-dose group at 3, 7 and 14 days after operation were higher than those in model group, and the healing time of wound was shorter than that of the model group, the differences were significant ($P<0.05$). The healing scar area, wound healing rate in middle-dose group and high-dose group at 3, 7 and 14 days after operation were higher than those in low-dose group, and the healing time of wound was shorter than that of the low-dose group, the differences were significant ($P<0.05$). The healing scar area, wound healing rate in high-dose group at 3, 7 and 14 days after operation were higher than those in middle-dose group, and the healing time of wound was shorter than that of the middle-dose group, the differences were significant ($P<0.05$). **Conclusion** Glycyrrhizic acid acting on PTEN/AKT/VEGF signaling pathway can reduce inflammatory infiltration, promote collagen synthesis and wound healing, and prevent scar formation. And it is in a dose-dependent manner.

Keywords: glycyrrhizic acid; collagen synthesis; incision healing; scar formation

多种原因导致的皮肤切口创面的治疗是目前临床上较为常见的问题,如何有效促进切口愈合并减少瘢痕的形成逐渐成为人们所关注的焦点。随着分子生物学的发展、高新技术的应用,切口愈合修复的基础研究呈现为细胞、分子、基因逐层递进趋势[1]。有研究表明,胶原蛋白在创面炎症期可有效促进创面血栓形成、伤口收缩以及促血小板产生凝血作用,而胶原蛋白在创面增生期可促进肉芽生长、使得体内的胶原再生,并增强创口渗出物的吸收,另外胶原蛋白在创面的重构期会重新形成上皮细胞的支架,诱导胶原纤维、成纤维母细胞的产生,可有效减少创面瘢痕的形成,促进血管新生[2-3]。甘草属于一种药用植物,其中甘草酸为甘草的水溶性提取物,甘草酸具有抗炎、抗氧化、抗病毒以及促创面愈合等药理作用[4-5]。本研究通过建立切口愈合模型大鼠,观察甘草酸通过促进胶原合成对切口愈合大鼠瘢痕形成及切口愈合的作用,以期为临床上切口创面治疗提供新的方向。

1 材料与方法

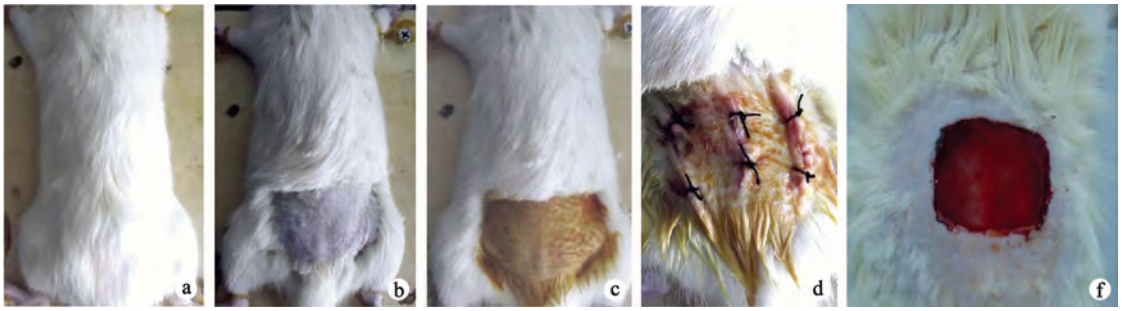
1.1 材料

选择 50 只 SD 健康大鼠,由南京君科生物有限公司提供。年龄 6 ~ 12 个月,平均(9.5 ± 0.2)个月;体质量 200 ~ 300 g,平均(231.0 ± 5.5)g;饲养温度为 22 ~ 25 ℃,室内湿度 35% ~ 40%,饲养室定时进行紫外线照射消毒。统一给予标准饲料,允许大鼠自由活动,饲养时间为 1 周。所有大鼠在年龄、体质量上差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究所做实验均获得我院伦理委员会批准。

主要药物及试剂:甘草酸(山东亚仁生物科技有限公司);小鼠抗大鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原抗体(武汉博士德公司);兔抗人 VEGF、bFGF、EGF 抗体、兔抗大鼠 PTEN、VEGFR2 抗体(上海恒斐生物科技有限公司);HE 染色剂、PBS 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组、建模及给药 50只大鼠中随机选取10只作为空白对照组,其余40只大鼠参照秦伟夫等[6]研究实验中切口愈合大鼠模型的建立方法,建立切口愈合模型大鼠(图1)。大鼠均进行背部脱毛处理,将20%乌拉坦注射于大鼠腹腔进行麻醉,麻醉后固定,在大鼠背部脱毛脊柱两侧旁1 cm处进行常规消毒处理,模型组和甘草酸组大鼠消毒处理后切开皮肤、皮下组织,深达肌层,之后进行止血处理,使用3号丝线间断缝合伤口。建模成功后将40只大鼠随机分为模型组和低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组10只,术后30 min对低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠分别静脉注射10 mg/kg、15 mg/kg、30 mg/kg甘草酸,模型组、空白对照组不做任何处理。术后3 d、7 d、14 d观察各组大鼠变化。



a:建模1;b:建模2;c:建模3;d:建模4;e:创面皮肤取材

图1 建立切口愈合模型

1.2.2 样本采集 在术后3 d、7 d、14 d分别随机断头处死各组中6只大鼠,分别取切口处含其两侧1 cm范围内全层皮肤组织,于切口垂直方向分为三部分,其中1/3标本入4%多聚甲醛固定,行OTC包埋做冰冻切片,1/3标本入10%中性福尔马林固定,做石蜡包埋,其余1/3标本于液氮冷冻后,放入-68 ℃冰箱保存。

1.2.3 切片及染色 取10%中性福尔马林中固定的大鼠创面组织,进行HE染色处理,使用光学显微镜进行图像分析。

1.2.4 荧光定量RT-PCR检测Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA的水平 取冰冻的切片采用荧光定量RT-PCR技术检测Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA水平,严格按照定量PCR仪的操作说明书进行。依次加入2.5 μL稀释10倍的PCR缓冲液、1.5 μL $MgCl_2$ 溶液、0.5 μL上游引物和下游引物,最后加水配成总体积为25 μL的反应体系。于94 ℃反应1 min,55 ℃反应1 min,72 ℃反应1 min,进行35个循环;72 ℃反应延长5 min,重复最少3次。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算出需要检测的Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA表达量。

1.2.5 PTEN/AKT/VEGF通路蛋白表达量检测 取液氮中冷冻后的大鼠创面组织,采用Western blot法检测大鼠创面组织中PTEN/AKT/VEGF通路蛋白表达量,将采集到的标本研磨后加入蛋白缓冲液,进行常规蛋白提取,采取BCA法进行定量分析。50 μg的蛋白样品上样后SDS-PAGE电泳,将蛋白电转到PVDF膜,使用5%的脱脂奶粉TBST进行避光封闭1 h,洗涤之后加入一抗稀释溶液(PTEN、VEGFR2、p-AKT按照1∶1 000比例进行稀释),4 ℃过夜保存,洗涤后加入二抗稀释溶液(PTEN、VEGFR2、p-AKT按照1∶5 000比例进行稀释),在温床中孵育1 h后再次洗涤,加入发光液ECL,曝光2~3次,取重叠值。使用软件分析蛋白条带灰度值。内参蛋白是GAPDH。

1.2.6 2组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率、愈合时间评价 统计模型组、低剂量组、中剂量组和高剂量组中剩余4只大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率以及愈合时间。愈合瘢痕面积:建模后3 d、7 d、14 d使用涤纶投影薄膜覆盖大鼠创面,计算创面面积,作为愈合瘢痕面积。创面愈合率:治疗后3 d、7 d、14 d,使用刻度标尺标定大鼠创面,计算创面面积及创面愈合率。创面愈合率=(治疗前创面面积-治疗后3 d、7 d、14 d创面面积)/治疗前创面面积×100%。记录2组大鼠创面愈合时间,求平均值。

1.3 统计学处理

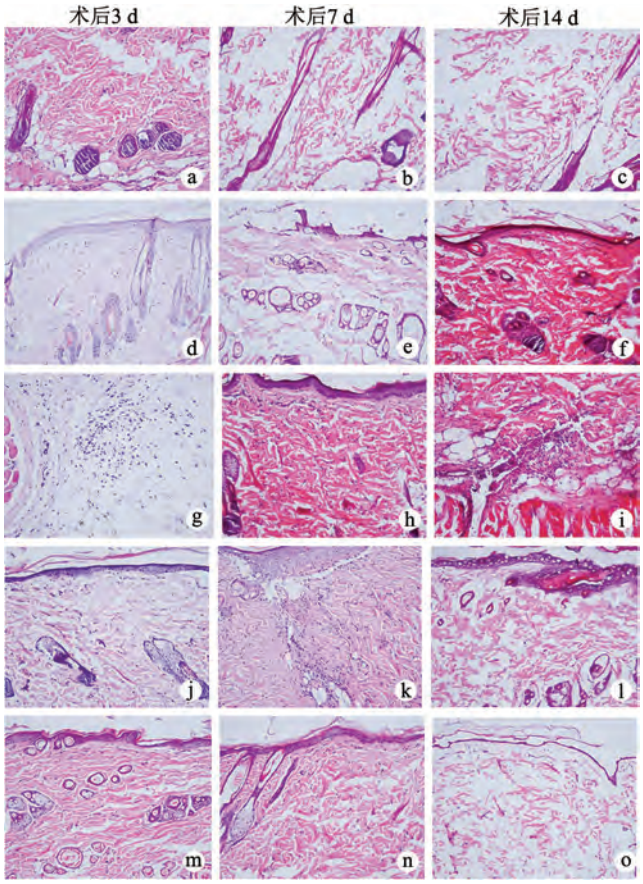
采用SPSS 19.0软件进行统计分析处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用F检验,2组间比较采用独立样本t检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学观察

术后3 d、7 d、14 d空白对照组切口组织无炎性细胞浸润。术后3 d模型组大鼠可见创面组织存在

明显水肿和大量炎性细胞浸润,巨噬细胞减少,无增生的成纤维细胞和新生的毛细血管;低剂量组、中剂量组有较多的坏死组织、少量血凝块、肉芽组织、新生毛细血管和成纤维细胞增生伴轻微水肿,存在大量炎性细胞浸润;高剂量组坏死组织较少,有较为明显的肉芽组织填充,存在增生的成纤维细胞、新生的毛细血管和大量的炎性细胞浸润。术后 7 d 模型组仍有少量炎性细胞浸润,间质胶原纤维增生伴部分区域玻璃样变性;低剂量组、中剂量组出现粗大的新生胶原纤维,分布均匀但排列紊乱;高剂量组有大量的新生粗大毛细血管和增生的成纤维细胞,有少量的炎性细胞浸润,间质胶原纤维增生。术后 14 d 模型组大鼠可见排列紊乱的纤维细胞,胶原纤维增生不明显;低剂量组、中剂量组毛细血管数目较术前无明显增加,成纤维细胞也减少、体积偏小,间质中有少量均匀胶原纤维,但排列无序;高剂量组新生表皮角质化明显,出现新生毛囊及其他皮肤附属器、大量纤维细胞、少量的炎性细胞浸润。各组大鼠病理组织 HE 染色图见图 2。

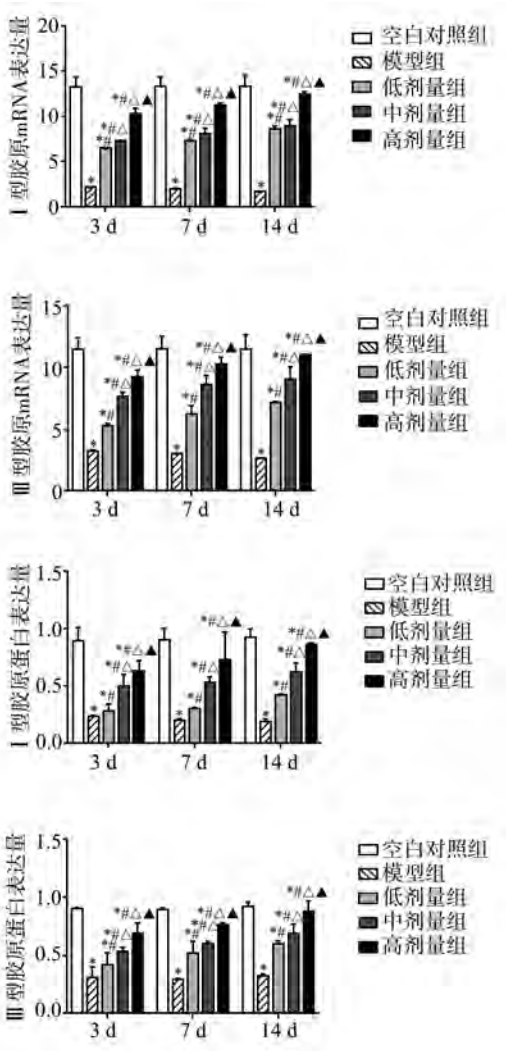


a~c:空白对照组;d~f:模型组;g~i:低剂量组;j~l:中剂量组;m~o:高剂量组

图 2 各组大鼠创面病理组织学 HE 染色(×200)

2.2 各组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原 mRNA 及蛋白表达量比较

术后 3 d、7 d、14 d 模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原 mRNA 和蛋白表达量均低于空白对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后 3 d、7 d、14 d 低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原 mRNA 和蛋白表达量均高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后 3 d、7 d、14 d 中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原 mRNA 和蛋白表达量均高于低剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后 3 d、7 d、14 d 高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原 mRNA 和蛋白表达量均高于中剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与低剂量组比较,$P<0.05$;▲:与中剂量组比较,$P<0.05$

图 3 各组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原 mRNA 和蛋白表达量比较

2.3 各组大鼠创面组织中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达量比较

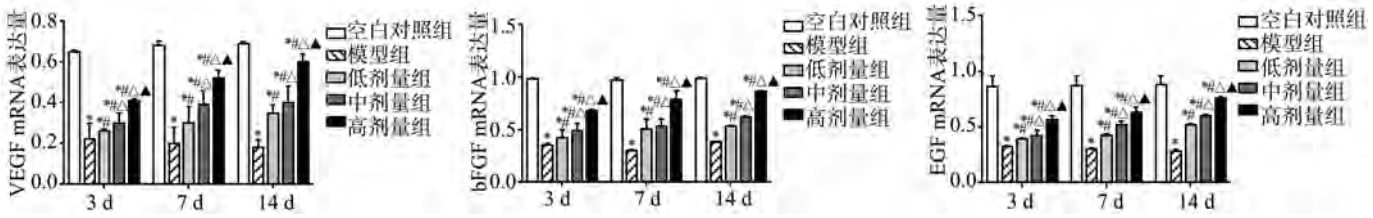
术后 3 d、7 d、14 d 模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达量均低于空白对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达量均高于模型组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后3 d、7 d、14 d 中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达量均高于低剂量组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 高剂量组大鼠创面组织中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达量均高于中剂量组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见图 4。

2.4 各组大鼠创面组织中 PTEN/AKT/VEGF 通路蛋白表达量比较

术后 3 d、7 d、14 d 模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中 PTEN 高于空白对照组，VEGFR2、p-AKT 蛋白表达量均低于空白对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中 PTEN 蛋白表达量均低于模型组，VEGFR2、p-AKT 蛋白表达量高于模型组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中 PTEN 蛋白表达量低于低剂量组，VEGFR2、p-AKT 蛋白表达量高于低剂量组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 高剂量组大鼠创面组织中 PTEN 蛋白表达量均低于中剂量组，VEGFR2、p-AKT 蛋白表达量高于中剂量组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见图 5。

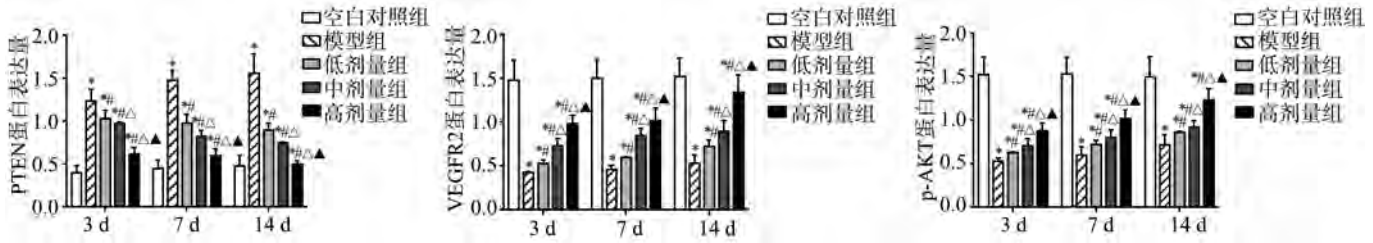
2.5 各组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率、创面愈合时间比较

术后 3 d、7 d、14 d 低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面愈合率高于模型组大鼠，创面愈合时间和愈合瘢痕面积均少于模型组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 中剂量组、高剂量组大鼠创面愈合率均高于低剂量组，创面愈合时间和愈合瘢痕面积均少于低剂量组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；术后 3 d、7 d、14 d 高剂量组大鼠创面愈合率均高于中剂量组，创面愈合时间和愈合瘢痕面积均少于中剂量组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见图 6。



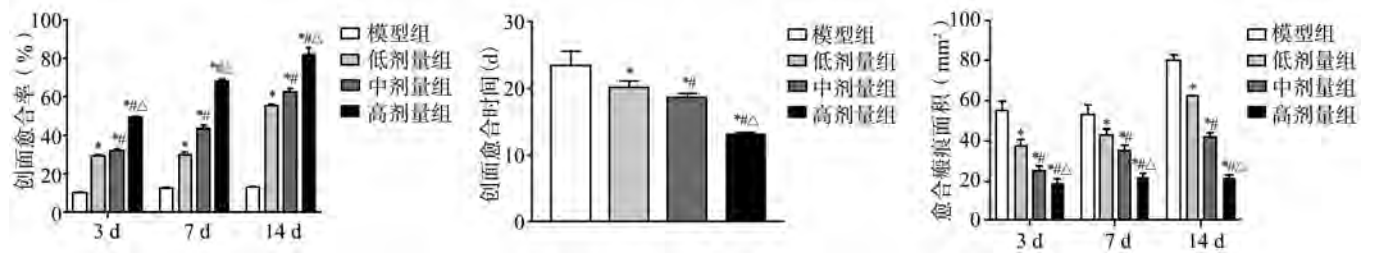
*：与空白对照组比较，$P<0.05$；#：与模型组比较，$P<0.05$；△：与低剂量组比较，$P<0.05$；▲：与中剂量组比较，$P<0.05$

图 4 各组大鼠创面组织中 VEGF、bFGF、EGFmRNA 表达量比较



*：与空白对照组比较，$P<0.05$；#：与模型组比较，$P<0.05$；△：与低剂量组比较，$P<0.05$；▲：与中剂量组比较，$P<0.05$

图 5 各组大鼠创面组织中 PTEN/AKT/VEGF 通路蛋白表达量比较



*：与模型组比较，$P<0.05$；#：与低剂量组比较，$P<0.05$；△：与中剂量组比较，$P<0.05$

图 6 各组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率、创面愈合时间比较

3 讨论

创面愈合属于一个较为复杂的过程,此过程虽然复杂但高度有序,临床研究认为创面愈合主要的过程包括炎症期、增生期及重塑期[7-9]。本研究通过建立切口愈合模型大鼠,并给予不同剂量甘草酸,观察甘草酸对切口模型大鼠瘢痕形成、切口愈合以及对抑制胶原合成的作用,以期为临床上促进切口愈合、减少瘢痕形成提供新的药物治疗方向。

甘草作为一种天然的药物,其不同提取物具有不同的药理性质,其提取物包括甘草酸、黄酮类、糖类等,其中甘草酸为甘草的主要提取物,属于甘草的主要成分,具有广泛的药理作用,如抗氧化、抗病毒、抗炎等,目前甘草酸已广泛应用于多种疾病的辅助治疗中[10-12]。细胞外基质的主要成分为胶原,其中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原占血管中胶原的80% ~90%。有研究认为,抑制胶原合成后可作用于内膜,并对内膜增生进行抑制,可起到防止再狭窄的作用[13-14]。胶原蛋白参与创面愈合的炎症期、增生期及重塑期,其中胶原蛋白在创面炎症能够促进创面血栓的形成,加快伤口收缩,促进血小板产生凝血作用;胶原蛋白在创面增生期可加快机体内胶原的再生、排列以及对创面的渗出物进行吸收,可有效促进创面肉芽组织的生长;胶原蛋白在创面的重构期会促进上皮细胞支架的形成,诱导并产生异胶原纤维、成纤维母细胞,可形成新生瘢痕组织,促新生血管[15-18]。正常水平的胶原蛋白可有效促进创面愈合、抑制瘢痕形成,但在发生创伤后,机体胶原会异常增多,出现异常的高表达现象,因此对于创面切口愈合的治疗可通过促进成纤维细胞Ⅰ、Ⅲ型前胶原mRNA的表达,来抵抗切口纤维化作用,进而促进切口愈合[19-20]。刘杰等[21]在其研究中使用含胶原蛋白的海绵用于大鼠子宫切口愈合,结果显示,胶原蛋白可在一定程度上抗切口纤维化,促进切口愈合。本研究对切口愈合模型大鼠注射不同剂量的甘草酸进行治疗,在术后3 d、7 d、14 d对大鼠创面组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA及蛋白表达量进行检测,结果显示,术后3 d、7 d、14 d甘草酸高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达量均高于模型组大鼠,创面愈合率明显增高,愈合时间和瘢痕面积明显减少。此结果提示甘草酸可能是通过促进Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达来促进创口愈合,且呈现为剂量依赖。

PTEN属于一种具有双特异性磷酸酶活性的基因,位于人类染色体10q23上,具有脂质磷酸酶、磷酸酶活性。在创面愈合过程中,创面闭合的主要条件为创面周围细胞生长、增殖,而PTEN在此过程中起到关键作用[22-24]。有研究表明,通过抑制PTEN的异常高表达可在一定程度上促进细胞的迁移,达到促进创面愈合的目的[25]。AKT属于一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其介导的信号通路在细胞增殖中有着重要的调节作用,可以通过诱导细胞HIF-1和VEGF的表达来对血管生成过程进行调控[26-27]。有研究表明,当AKT被激活后会促进VEGF的表达,VEGF表达升高后会通过与其受体VEGFR-2结合的方式反馈PI3K/AKT信号通路,进而对AKT活化作用起到促进作用[28]。而PTEN通过其磷酸酶活性来对PI3K/AKT信号通路的活化作用进行抑制,进而抑制VEGF的表达和血管生成。VEGF的主要受体为VEGFR-2,通过激活VEGFR-2对内皮细胞进行调控[29-30]。本研究对大鼠PTEN/AKT/VEGF通路蛋白进行检测,结果显示,高剂量的甘草酸可在最大程度上调控其通路蛋白的表达,抑制下游VEGF、bFGF、EGF等因子的异常表达,促进创面愈合。

本研究结果显示,使用甘草酸对切口愈合模型大鼠进行干预后,大鼠创面炎性细胞浸润现象有所减轻,创面愈合较为理想且可预防瘢痕形成,呈剂量依赖,其机制可能与PTEN/AKT/VEGF信号通路有关,但目前临床上并没有研究证实甘草酸可通过作用于PTEN/AKT/VEGF信号通路促进创面愈合,因此本研究结论还需后续实验进一步研究证实。

[参考文献]

[1] Scalise A, Calamita R, Tartaglione C, et al. Improving wound healing and preventing surgical site complications of closed surgical incisions: a possible role of incisional negative pressure wound therapy. A systematic review of the literature[J]. Int Wound J,2016,13(6):1260 - 1281. doi:10.1111/iwj.12492.

[2] Hoop CL, Zhu J, Nunes AM, et al. Revealing accessibility of cryptic protein binding sites within the functional collagen fibril[J]. Biomolecules,2017,7(4):76. doi:10.3390/biom7040076.

[3] Liu D, Nikoo M, Boran G, et al. Collagen and gelatin[J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2015, 6: 527 - 557. doi: 10.1146/annurev-food-031414 - 111800.

[4] Yang R, Wang LQ, Yuan BC, et al. The pharmacological activities of licorice[J]. Planta Med,2015,81(18):1654 - 1669. doi:10.1055/s - 0035 - 1557893.

[5] Zhao YJ, Lv B, Feng XD, et al. A perspective on biotransformation and de novo biosynthesis of licorice constituents[J]. J Agric Food Chem, 2017,65(51):11147 - 11156. doi:10.1021/acs.jafc.7b04470.

[6] 秦伟夫,蒋俊和. 乌鳢复元汤促进术后大鼠切口愈合的实验研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2010,8(10):189 - 190. doi:10.

3969/j.issn.1672-2779.2010.10.166.

[7] Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, et al. Biology and biomarkers for wound healing[J]. Plast Reconstr Surg,2016,138(3 Suppl):18-28. doi:10.1097/PRS.0000000000002682.

[8] Knight R, Spoors LM, Costa ML, et al. Wound healing in surgery for trauma (whist): statistical analysis plan for a randomised controlled trial comparing standard wound management with negative pressure wound therapy[J]. Trials,2019,20(1):186. doi:10.1186/s13063-019-3282-y.

[9] Lik P, Nejc D. Management of hard-to-heal wounds arising as a result of surgical oncology treatment-usage of the modern wound dressings[J]. Pol Przegl Chir,2019,91(1):10-13. doi:10.5604/01.3001.0012.8304.

[10] Zhao X, Wu Y, Wang D. Effects of glycyrrhizic acid on the pharmacokinetics of pristimerin in rats and its potential mechanism[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet,2018,43(1):63-68. doi:10.1007/s13318-017-0423-0.

[11] Hou S, Zhang T, Li Y, et al. Glycyrrhizic acid prevents diabetic nephropathy by activating ampk/sirt1/pgc-1α signaling in db/db mice[J]. J Diabetes Res,2017,2017:2865912. doi:10.1155/2017/2865912.

[12] Wang YM, Du GQ. Glycyrrhizic acid prevents enteritis through reduction of NFκB p65 and p38MAPK expression in rat[J]. Mol Med Rep,2016,13(4):3639-3646. doi:10.3892/mmr.2016.4981.

[13] Harada D, Nagamachi S, Aso K, et al. Oral administration of l-ornithine increases the content of both collagen constituting amino acids and polyamines in mouse skin[J]. Biochem Biophys Res Commun,2019,512(4):712-715. doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.147.

[14] Felician FF, Yu RH, Li MZ, et al. The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish Rhopilema esculentum[J]. Chin J Traumatol,2019,22(1):12-20. doi:10.1016/j.cjtee.2018.10.004.

[15] Kim M, Lee YS, Yoo YM, et al. Exogenous CLASP2 protein treatment enhances wound healing in vitro and in vivo[J]. Wound Repair Regen,2019,27(4):345-359. doi:10.1111/wrr.12713.

[16] Sasaki H, Hokugo A, Wang L, et al. Neuronal PAS domain 2 (Npas2)-deficient fibroblasts accelerate skin wound healing and dermal collagen reconstruction[J]. Anat Rec (Hoboken),2019. doi:10.1002/ar.24109.

[17] Franck CL, Senegaglia AC, Leite LMB, et al. Influence of adipose tissue-derived stem cells on the burn wound healing process[J]. Stem Cells Int,2019,2019:2340725. doi:10.1155/2019/2340725.

[18] Schanuel FS, Saguie BO, Monte-Alto-Costa A. Olive oil promotes wound healing of mice pressure injuries through NOS-2 and Nrf2[J]. Appl Physiol Nutr Metab,2019. doi:10.1139/apnm-2018-0845.

[19] 朱伟东,王富生,王志远. 瘢痕组织中胶原蛋白提取及纯化研究[J]. 医学信息,2018,31(17):84-85. doi:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.17.025.

[20] 陈丹玲,梁海英,易 菁,等. Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达与子宫瘢痕愈合的相关性研究[J]. 中国妇幼健康研究,2017,28(12):1707-1709. doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2017.12.065.

[21] 刘 杰,陶雯琪,陶敏芳,等. 胶原蛋白海绵对大鼠子宫切口愈合的影响[J]. 中国妇幼保健,2017,32(10):2207-2209. doi:10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2017.10.57.

[22] Han Z, Chen Y, Zhang Y, et al. MiR-21/PTEN Axis promotes skin wound healing by dendritic cells enhancement[J]. J Cell Biochem,2017,118(10):3511-3519. doi:10.1002/jcb.26026.

[23] Zhang P, Lu X, Shi Z, et al. miR-205-5p regulates epithelial-mesenchymal transition by targeting PTEN via PI3K/AKT signaling pathway in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Gene,2019,710:103-113. doi:10.1016/j.gene.2019.05.058.

[24] Chen SR, Cai WP, Dai XJ, et al. Research on miR-126 in glioma targeted regulation of PTEN/PI3K/Akt and MDM2-p53 pathways[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(8):3461-3470. doi:10.26355/eurrev_201904_17711.

[25] Hu J, Kan T, Hu X. Sirt3 regulates mitophagy level to promote diabetic corneal epithelial wound healing[J]. Exp Eye Res,2019,181:223-231. doi:10.1016/j.exer.2019.02.011.

[26] Zhang EY, Gao B, Shi HL, et al. 20(S)-Protopanaxadiol enhances angiogenesis via HIF-1α-mediated VEGF secretion by activating p70S6 kinase and benefits wound healing in genetically diabetic mice[J]. Exp Mol Med,2017,49(10):e387. doi:10.1038/emm.2017.151.

[27] Liu X, Yang Y, Guo X, et al. The antiangiogenesis effect of pirfenidone in wound healing in vitro[J]. J Ocul Pharmacol Ther,2017,33(9):693-703. doi:10.1089/jop.2017.0007.

[28] Song N, Zhao Z, Ma X, et al. Naringin promotes fracture healing through stimulation of angiogenesis by regulating the VEGF/VEGFR-2 signaling pathway in osteoporotic rats[J]. Chem Biol Interact,2017,261:11-17. doi:10.1016/j.cbi.2016.10.020.

[29] Taira K, Nadatani Y, Hirano S, et al. Large skin ulcer and delayed wound healing around a colostomy in a patient with metastatic colorectal cancer receiving vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor therapy[J]. Case Rep Oncol,2019,12(2):370-375. doi:10.1159/000500412.

[30] Wang CG, Lou YT, Tong MJ, et al. Asperosaponin VI promotes angiogenesis and accelerates wound healing in rats via up-regulating HIF-1α/VEGF signaling[J]. Acta Pharmacol Sin,2018,39(3):393-404. doi:10.1038/aps.2017.161.

(编辑:贺绍梅)