临床研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0238-05

复方烫疡油促进深Ⅱ°烫伤创面愈合、减少瘢痕形成的实验研究

罗 聪[1],安 洪[2],刘传康[1],李 明[1],范 伟[2],杨正钦[3],杨 洲[4]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院骨科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016; 3. 重庆医科大学药理学教研室,重庆 400016;4. 川北医学院附院普外科,南充 637100)

【摘 要】目的:观察复方烫疡油(Fu fang tang yang you,FTY)促进小鼠创面愈合、减少瘢痕形成的作用,并探讨其作用机制。方法:采用小鼠深Ⅱ°烫伤模型。创面外用复方烫疡油治疗,并用表皮生长因子(Recombinant human epidermal growth factor,rhEGF)、磺胺嘧啶银霜、芝麻油(赋形剂)作疗效对比,用生理盐水作空白对照。测定创面组织创伤后 8、12、24、48、72h 干湿重比例以了解组织创伤后水肿情况;透明膜描绘 - 求积议测定创面伤后 3、7、14 h 创面愈合情况;并用免疫组织化学法观察Ⅰ、Ⅲ型胶原、TGF-β1 (Transforming growth factor-β1, TGF-β1)的变化;TUNEL 法定量观察组织细胞的凋亡指数;原位杂交观察胶原酶(Marix Metalloproteianse 1,MMP-1)及金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)mRNA 的表达。结果:复方烫疡油能减轻创面炎症,降低创伤组织水肿,改善Ⅰ、Ⅲ型胶原比例,减少瘢痕形成,促进创面愈合。结论:复方烫疡油具有抗炎、抗感染,促进创面愈合,减轻瘢痕形成的作用。

【关键词】烧伤;愈合;瘢痕;复方烫疡油

【中国图书分类法分类号】R644 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-24

The experimental study of effects of fu fang tang yang you on healing and reducing the proliferation scars of deep partial thinkness burn in rats

LUO Cong, et al

(*Department of Orthopaedic Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects and the therapeutic mechanism of Fu Fang Tang Yang of You (FTY) on wound healing and reducing the proliferation scar of deep partial thinkness nurn in rats. Method 120 kun-ming rats were employed as the model. Deep partial thinkness burn wounds(3 cm^2 per wound) were made on the back of each rat by 108℃ steam. The wound rats were divided into five groups. Four groups underwent(groupA,B,C,D) local treatment with FTY, rhEGF, Sulfadiazine silver cream and Vegetable oil, respectively. The control group E was localy treatment with applied the normal saline. Each wound area was calculated by dry/wet weight at 8,24,48,72 h after injury. Histological examination: Determination of TGF-β1, type of collagen Ⅰ, Ⅲ with immunohistochemistry. Expression of MMP-1, TIMP-1 were testd by in situ hybridiz-ation and image analgsis at 3,7,14 past-burn days. The apoptosis index was exmined by TUNEL technique. Results:Treatment with FTY could protect the remains of cells and tissues in wound, alleviate inflammatory response, decrease the level of tissues edema, reduce the formation of proliferation scars and accelerate the process of wound healing. Conclusion. FTY could promote the wound healing of deep partial thinkness burn with less scar formation.

【Key words】Burn; Wound healing; Scar; Fu Fang Tang Yang You

创面愈合是医学中最古老的课题之一。各种皮肤组织创伤、感染及溃疡属常见病、多发病。其中的发生、发展及预后机制是一种十分复杂的生物学过程,受许多细胞因子的影响。其中表皮生长因子(Recombinant human epidermal growth factor,rhEGF)、转化生长因子β1(Transforming growth factor-β1, TGF-β1)、胶原酶(Marix Metalloproteianse 1,MMP-1)、及金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1,TIMP-1)对创面愈合及瘢痕形成具有重要作用[1-3]。复方烫疡油(Fufang tang yang you,FTY)是中医治疗烧烫伤、皮肤溃疡的验方。是虎杖、大黄等中药,经特殊的方法炮制而成,临床应用发现其具有抗感染、

作者介绍:罗 聪(1966-),讲师,博士,研究方向:创伤组织修复及骨组织工程方面研究。

通讯作者:安 洪,男,教授,E-mail: anhong1106@sohu.com。

基金项目:重庆大学研究生教育创新基金(2004A028)。

促进创面愈合及减少瘢形成等优点，但其作用机制尚不清楚。为此，我们进行了一系列动物实验，探寻其促进创面愈合、减少瘢痕形成机制，旨在对此药的临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物皮肤深Ⅱ烫伤模型制备

选 100 只昆明小鼠（重庆医科大学动物实验中心提供）每组 20 只，雌雄不拘，体重（30±2）g。背部脱毛消毒后，麻醉下，用 108℃蒸气烫 8 s 致深Ⅱ度烫伤[4]，面积控制在 3 cm^2 左右。

1.2 动物创面水肿程度测定

另选 25 只昆明小鼠深Ⅱ烫伤造模后，于 8、12、24、48、72 h 分别取创面皮肤全层。称量湿重，记录。标本经烘箱 80℃烘烤 48 h 后称量干重，得干／湿比重。

1.3 小鼠皮肤深Ⅱ烫伤后分组创面治疗

A 组（20 只）FTY 组：用复方烫疡油外涂治疗。

B 组（20 只）rhEGF 组：用外用重组人表皮生因（rhEGF）治疗。

C 组（20 只）磺胺组：用磺胺嘧啶银霜外涂治疗。

D 组（20 只）赋形剂组：用灭菌后的赋形剂（芝麻油）外涂治疗。

E 组（20 只）生理盐水组：用生理盐水外涂治疗。

以后每天按上述药物各组分别治疗 1 次。

1.4 创面愈合的界定

创面愈合是指创面完全上皮化，未愈面积以创面边缘为界计算残留面积。

1.5 动物创面面积测定

按设计时间用消毒透明膜描绘创面边缘，用求积议（地方国营哈尔滨光学议器厂 QCG-1 型）测量残留创面面积，愈合面积用百分数表示，公式为：愈合面积（%）=（初次面积－当日面积）/初次面积[5]。

1.6 创面组织学检测

伤后 3、7、14 d 分别取创缘组织，用 4%多聚甲醛 +0.1%DEPC 固定 24 h，石腊包埋，切片作：（1）常规苏木精－伊红染色。（2）Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组织化学检测。（3）TGF-β1 免疫组织化学检测。（4）TUNEL 法定量观察组织细胞的调亡指数（AI），计算方法：在 400× 高倍镜下 200 个细胞中调亡细胞所占百分数。（5）MMP-1 原位杂交检测。（6）TIMP-1 mRNA 原位杂交检测。

1.7 图像分析半定量分析

采用重庆大学 Tiger920G 图像分析软件系统，对免疫组化、原位杂交结果进行分析。

Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组织化学结果用 20 倍放大下随机选 5 个测定区域，按一定域值测定平均面密度值表示。

TGF-β1、组织切片 MMP-1、TIMP-1 mRNA 免疫组织化学检测结果用 20 倍放大下随机选 5 个测定区域，按一定域值分割阳性细胞，测定组织中 TGF-β1 和 MMP-1、TIMP-1mRNA 表达的平均积分光密度值表示。

1.8 统计学处理

所获资料用 SAS.6.12 统计软件作统计处理。所有数据用均数 + 标准差（$\bar{x}+s$）表示，采用重复测量方差分析和方差分析。$P<0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结 果

2.1 创面愈合情况

观察可见 FTY 组烫伤后组织水肿较轻、创面痂皮 24 h 内即干燥、周围组织炎症反应轻，组织干湿重比与其它组比较有显著差异（$P<0.01$）（表 1）。烫伤后 1 周内 FTY 组创伤面积减小明显快于其它组（图 1）。rhEGF 组创面如无感染，72 h 水肿消褪后，创面愈合也较快，90%愈合时间与 FTY 组相近，且均快于其它组（表 2）。统计分析显示有显著差异（$P<0.05$）（表 2）。

2.2 创面组织学检测

2.2.1 常规苏木精-伊红染色 FTY 组和 rhEGF 组创面组织切片中创缘的表皮细胞、残存的毛囊上皮细胞，较其它组（磺胺嘧啶银霜、植物油、生理盐水）增生活跃，且细胞层次多，真皮浅层有核细胞数明显增多。FTY 组创面分泌物少、炎症相对较轻；光镜

表 1 小鼠创面干、湿重量比 [干/湿，(g)]

组别	创面数	伤后时间(h)				
		8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
FTY 组	10	3.55±0.02	3.83±0.05	4.17±0.03	3.86±0.05	3.72±0.04
rhEGF	10	5.04±0.07	5.84±0.04	6.26±0.06	6.57±0.10	6.57±0.03
磺胺组	10	5.53±0.09	5.98±0.05	6.59±0.04	6.83±0.07	6.89±0.05
赋形组	10	4.75±0.06	5.45±0.05	6.30±0.10	6.67±0.04	6.70±0.02
盐水组	10	4.76±0.05	6.14±0.11	6.85±0.04	6.77±0.05	6.57±0.04

注：方差分析（Q 检验），FTY 组干、湿重比明显低于其它组，有显著性差异（$P<0.01$）。

表 2　小鼠创面愈合率与愈合时间关系

组别	创面数	愈合时间(d)	
		愈合 60%	愈合 90%
FTY 组	20	6.26 ± 0.03	11.92 ± 0.30
rhEGF	20	8.05 ± 0.04	12.01 ± 0.08
磺胺组	20	8.05 ± 0.03	13.51 ± 0.05
赋形组	20	8.67 ± 0.05	13.97 ± 0.33
盐水组	20	8.78 ± 0.03	14.01 ± 0.12

下炎性细胞数目相对较少。

2.2.2　Ⅰ、Ⅲ型胶原表达　FTY 组和 rhEGF 组Ⅰ型胶原纤维排列稀、密度低，Ⅲ型胶原表达较弱。Ⅰ/Ⅲ比值较其它组低。磺胺嘧啶银霜、植物油、生理盐水Ⅰ型胶原纤维较粗，排列密度高，呈棕黄色，过度增生的Ⅰ胶原纤维呈漩涡状（图 2）。Ⅲ型胶原纤维较细，呈网状（图 3）。Ⅰ/Ⅲ值较高（表 3）。

2.2.3　TGF-β1 表达　FTY 组 TGF-β1 表达随时间稳定地逐渐减少；rhEGF 组于伤后第 3 d TGF-β1 表达增高，第 7 d 最高，之后渐减少；磺胺嘧啶银霜、植物油、生理盐水组随时间渐增多，第 14 d 仍无明显下降。见表 4。

2.2.4　MMP-1、TIMP-1 mRNA 表达　FTY 组和 rhEGF 组中 MMP-1 相近，表达较强，其它组 MMP-1 表达较弱（表 4）。而 FTY 组和 rhEGF 组 TIMP-1mRNA 表达相近，明显低于磺胺嘧啶银霜、植物油、生理盐水组。统计分析显示有显著性差异（$P<0.01$）（表 5）。

2.2.5　凋亡指数　凋亡细胞在表皮、真皮及皮下纤维结缔组织中均可见到，第 7 d 达高峰，之后渐下降。FTY 组凋亡指数明显高于其它组，有显著性差异（$P<0.05$）。凋亡指数在其它组以生理盐水组>植物油>磺胺嘧啶银霜>FTY 组顺序数值第减（详见表 5）。

3　讨　论

FTY 主要由虎杖、大黄等中药组成，经特殊的炮制方制作而成，富含虎杖大黄素、大黄酸、大黄素等成份。在临床应用中，发现其具有抗炎、抗过敏[6]、镇痛、促进伤口愈合及减少瘢痕形成的作用。同时具有改善微循环，降低血管通透性，抗菌及减轻水肿作用。其作用机制如下。

3.1　早期组织细胞的保护作用

在烧烫伤早期强烈热损伤至部分组织结构破坏、细胞变性、坏死。局部微循环障碍、血管通透性增加，伴有炎性因子、氧自由基大量释放，残留细胞水电解质及能量代谢障碍。在分子水平表现为细胞 DNA 损伤，染色质再分布，细胞酶活性下降。而复方

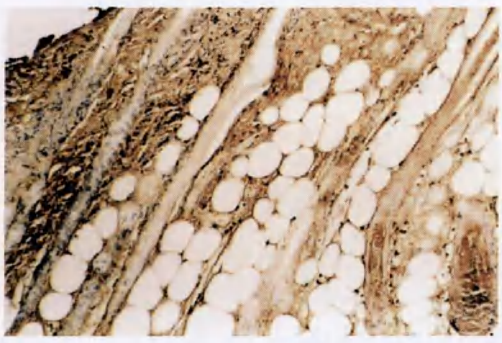


图 1　Ⅰ型胶原纤维免疫组化图（14 d）

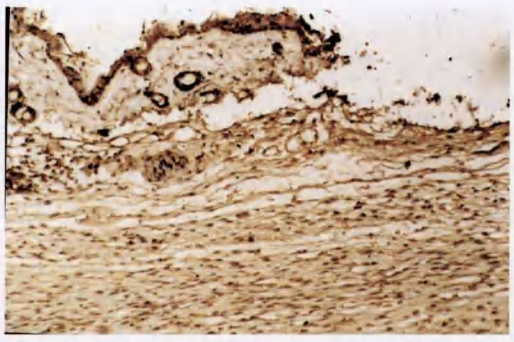


图 2　Ⅲ型胶原纤维免疫组化图（14 d）

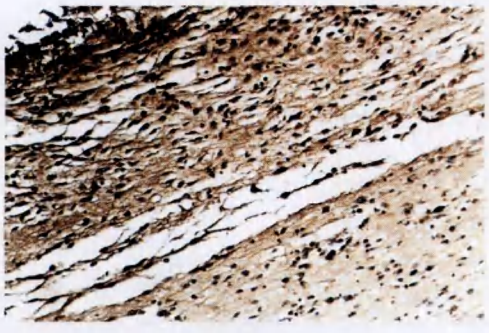


图 3　Ⅰ型胶原纤维免疫组化图（14 d）

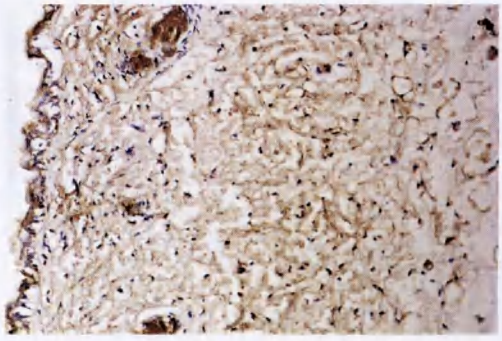


图 4　Ⅲ型胶原纤维免疫组化图（14 d）

表 3 小鼠创面瘢痕Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组织化学检测

组别	创面数	Ⅰ、Ⅲ型胶原（面密度）比例		
		3 d	7 d	14 d
FTY 组	20	2.42 ± 0.11	1.58 ± 0.09	1.28 ± 0.12
rhEGF	20	3.19 ± 0.15	2.35 ± 0.10	1.69 ± 0.05
磺胺组	20	2.85 ± 0.14	2.77 ± 0.14	2.47 ± 0.11
赋形组	20	1.93 ± 0.14	2.85 ± 0.16	2.61 ± 0.11
盐水组	20	1.79 ± 0.12	3.08 ± 0.17	2.96 ± 0.18

注：方差分析（Q 检验），FTY 组与 rhEGF 组Ⅰ、Ⅲ型胶原比例相近，均明显低于其它组，有显著性差异（$P<0.01$）

表 4 小鼠创面瘢痕 TGF-β1、MMP-1、TIMP-1 免疫组化检测

组别（创面，20）	TGF-β1、PCNA 平均积分光密度								
	3 d			7 d			14 d		
	TGF-β1	MMP-1	TIMP-1	TGF-β1	MMP-1	TIMP-1	TGF-β1	MMP-1	TIMP-1
FTY 组	204.6 ± 3.8	28.0 ± 1.2	172.5 ± 7.9	165.7 ± 9.0	24.6 ± 2.8	142.7 ± 7.3	75.3 ± 6.6	22.3 ± 2.0	89.2 ± 7.1
rhEGF	257.5 ± 7.1	43.8 ± 1.8	187.0 ± 7.1	233.8 ± 7.3	40.6 ± 2.1	167.3 ± 10	103.1 ± 9.8	41.5 ± 2.3	97.3 ± 5.8
磺胺组	292.1 ± 5.8	44.4 ± 1.8	300.1 ± 47	323.3 ± 6.1	44.5 ± 3.1	343.7 ± 5.5	211.2 ± 8.4	51.3 ± 3.6	271.4 ± 6.6
赋形组	302.7 ± 7.6	41.0 ± 1.8	347.2 ± 20	351.0 ± 9.4	46.0 ± 2.2	418.7 ± 6.4	315.3 ± 32	50.2 ± 3.4	301.2 ± 8.6
盐水组	404.7 ± 8.3	16.1 ± 1.0	339.1 ± 48	357.6 ± 28	21.0 ± 0.6	422.0 ± 7.7	309.1 ± 6.0	22.3 ± 2.8	323.2 ± 7.5

注：方差分析（Q 检验），表 5 示：FTY 组 TGF-β1 表达明显低于其它组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；14 d 时 FTY 组与 rhEGF 组 TIMP-1 表达无显著性差异（$P>0.05$）

表 5 小鼠创面组织凋亡指数（apoptotic index，AI，%）

组别	创面数	凋亡指数（AI，%）		
		3 d	7 d	14 d
FTY 组	20	3.74 ± 0.39	18.20 ± 0.57	13.43 ± 0.70
rhEGF	20	1.61 ± 0.24	2.14 ± 0.39	1.74 ± 0.29
磺胺组	20	2.72 ± 0.37	2.96 ± 0.37	2.10 ± 0.42
赋形组	20	5.64 ± 0.52	4.91 ± 0.56	3.99 ± 0.61
盐水组	20	6.29 ± 0.52	6.46 ± 0.53	5.48 ± 0.75

注：将凋亡指数按公式 $2\mathrm{Sin}^{-1}\sqrt{P}$ 转换（P 值为凋亡指数原始数据的分数转换而成的弧度），用方差分析（Q 检验）。得 FTY 组凋亡指数在 7 d 以后与其它组有显著差异（$P<0.01$）

烫疡油中的大黄素是 TNF-α、IL-1、IL-2、IL-6、IL-12 的抑制剂[1~3]，能通过抑制内毒素诱生的 IL-12mRNA 过度表达，能抑制细胞内白三烯（LT-C4，LT-B4）的生物合成；FTY 油中的大黄酸具有显著提高细胞色素 aa、b、c、c1 含量，增加 ATP 的生成；而且大黄素还有促进细胞内 DNA 核苷切除修复功能，有对抗紫外线对细胞 DNA 的损伤功能[7]。同时大黄素能快速而短暂地诱导凋亡蛋白酶级联反应的活性[8]，促使受损细胞凋亡，减少坏死，减轻炎性因子释放[9]。本实验亦发现 FTY 组创面渗出物少、炎症相对较轻；光镜下炎性细胞数目相对较少；FTY 组在各时期凋亡细胞标记率均明显高于其它组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。因此，FTY 此时表现为修复 DNA 损伤、抑制局部氧化应急反应和抑制炎症，有利于组织细胞修复缺损。本实验观察到组织切片中创缘的表皮细胞、残存的毛囊上皮细胞，较其它组（磺胺

嘧啶银霜、植物油、生理盐水)增生活跃,且细胞层次多,真皮浅层有核细胞数明显增多。提示复方烫汤油有促进伤口愈合的作用,而非赋形剂的作用。

3.2 改善微循环,减轻组织水肿

FTY 中大黄酸能够抑制内皮纤维蛋白深酶原激活剂抑制剂(因子)(PAI-1)mRNA 的过程表达,因而有促进血管内膜功能及结构的恢复。大黄素对多种血管有舒张作用,能降低苯福林、5-羟色胺、和 KCl 的缩血管作用[10]。本实验对创伤组织干湿重比例测定结果(表 1)显示 FTY 具有减少血液淤滞,减轻组织水肿作用。

3.3 减少瘢痕形成的作用

增生性瘢痕是真皮组织损伤后组织异常修复的结果,主要表现为成纤维细胞外基质合成增加、降解不足;Ⅰ、Ⅲ型胶原比例失调,而 TGF-β1 在瘢痕形成中起重要作用[10]。本实验显示 FTY 处理后组织基质中Ⅰ、Ⅲ型胶原比例部分恢复(表Ⅲ),TGF-β1 表达降低,与其它组对照,有显著性差异($P<0.05$)。大黄素能快速而短暂地诱导凋亡蛋白酶级联反应的活性[8,9],促使成纤维细胞凋亡,减少瘢痕形成。我们同时观察到经 FTY 治疗后组织中TGF-β1、MMP-1、TIMP-1 之间的关系,发现 TGF-β1 与 TIMP-1 表达成正相关,而 MMP-1 表达则相反。提示 FTY 油减少瘢痕形成的作用与抑制 TGF-β1 表达有关,进而 MMP-1 表达增高,同时 TIMP-1 表达降低,使 MMP-1 的活性增高,胶原分解增强[11]。

综上所述,FTY 促进伤口愈合及减少瘢痕形成可能的作用机制为:早期组织细胞的保护作用;改善微循环,减轻组织水肿;调节Ⅰ、Ⅲ型胶原比例失调等。由于本次实验观察时间不长,要明确此药的作用机理,尚需进一步细致、深入的实验研究。

参 考 文 献

[1] 黎 鳌.烧伤治疗学[M].第 2 版.北京:人民军医出版社,1995.

[2] 罗 聪,安 洪,刘传康,等,复方烫疡油对兔耳瘢痕形成的影响[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(3):380-383.

[3] 王光毅,夏照帆,朱世辉,等.应用表皮生长因子治疗深Ⅱ度烫伤的远期临床疗效观察[J]. 中华烧伤杂志,2003,19(3):167-168.

[4] 黎 鳌,杨宗城,萧光夏,等.实验烧伤外科学[M].重庆大学出版社,1995.28-103.

[5] 黄 康,陈玉林.创面愈合评价指标进展[J]. 中国修复重建外科杂志,2001,15(2):126-129.

[6] Kim D H,Park E K,Bae E A. Metabolism of rhaponticin and chrysophanol 8-O-beta-D- gluco- pyranoside from the rhizome of rheum undulatum by human intestinal bacteria and their antiallergic actioms[J]. Biol pharm Bull,2000,23(7):830-833.

[7] Chang L C,Sheu H M,Huang Y S,et al. A novel function of emodin: enhancement of the nucleotid excision repair of UV-and cisplatin-induced DNA damage in human cells[J]. Biochem-pharmacol,1999,58(1):49-57.

[8] Chen Y C, Shen S C, Lee W R,et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade,but independent of reactive oxygen species production[J]. Biochem Pharmacol,2002,64(12):1713-1724.

[9] Wu Y X, Tu X,Lin G H,et al. Emodin-mediated protection from acute myocardial infarction via inhibition of inflammation and apoptosis in local ischemic myocardium[J]. Life Sciences,2007,81(17-18):1332-1338.

[10] Zhu J,Liu Z,Huang H,et al. Rhein inhibits transforming growth factor deta 1 induced plasmin-ogen activator inhiditor-1 in endothelial cells[J]. Chin Med,2003,116(3):354-359.

[11] Tamura T,Kosaka N,Ishiwa J,et al. Rhein,an active Metabolite of diacerein,down-regulates the production of pro-matrix-metalloproteinases-1,-3,-9and-13 and up-regulates the production of tissue inhiditor of metallopoteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage,2001,9(3):257-263.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

欢迎投稿,欢迎订阅

邮发代号 78-132