研究报告

瑰及乳膏对大鼠 III 期压疮模型纤维结合蛋白及碱性成纤维细胞生长因子的影响

戢艳琼[1],郭俐宏[1],李梓香[1],陈德森[2*]

(1. 十堰市太和医院,湖北医药学院附属医院,湖北 十堰　442000; 2. 湖北医药学院基础医学院,湖北 十堰　442000)

【摘要】　目的　本研究旨在探讨瑰及乳膏对压疮模型大鼠压疮肉芽组织中纤维粘连蛋白(fibonectin,FN)及碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor,BFGF)水平的的影响机制。**方法**　在 128 只 SD 大鼠中随机取 32 只设为假手术组,另 96 只均在大鼠双侧臀肌下埋置磁片外加磁铁片循环压迫缺血-再灌注的方法建立大鼠 III 期压疮模型,4 d 后随机分为模型组、阳性对照组及瑰及乳膏组。假手术组和模型组外敷生理盐水纱布,阳性对照组外敷水胶体敷料,瑰及乳膏组在压疮部位外敷瑰及乳膏纱布。在治疗结束时统计压疮创面显效时间、压疮愈合速度和愈合率,并分别于治疗的第 3、7、14、21 天时检测大鼠尾静脉血的血清炎症介质白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)及 C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)的水平,采用固相夹心法酶联免疫吸附实验检测压疮肉芽组织中 FN 及 BFGF 水平。**结果**　瑰及乳膏组显效时间和愈合时间较阳性对照组缩短,创面愈合率和愈合速度较阳性对照组提高,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。在治疗第 14、21、28 天时,瑰及乳膏组静脉血 CRP 及 IL-1β、IL-6 均明显低于模型组和阳性对照组同期水平($P < 0.05$),BFGF 及 FN 均明显高于模型组和阳性对照组同期水平($P < 0.05$)。**结论**　瑰及乳膏可能通过抑制压疮创面炎症介质 IL-6、IL-1β 引起的炎症反应来减轻创面损伤,并提高 BFGF 及 FN 的合成来促进间质细胞的增殖和细胞外基质的合成,从而促进创面肉芽组织新生而加速创面组织修复。

【关键词】 III 期压疮模型;瑰及乳膏;碱性成纤维细胞生长因子;纤维结合蛋白;炎症介质

【中图分类号】 R-33　　**【文献标识码】** A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 08-0090-05

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.08.016

Effects of rose and cream on fibronectin and basic fibroblast growth factor in rat models with stage III pressure ulcer

JI Yanqiong[1], GUO Lihong[1], LI Zixiang[1], CHEN Desen[2*]

(1. Department of Internal Medicine-Cardiovascular, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine;
2. School of Basic Medicine, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

【Abstract】　Objective　The purpose of this study was to investigate the effects of rose and cream on fiber pressure ulcer granulation tissue in rat models of pressure ulcer in terms of adhesion protein (fibronectin, FN) and basic fibroblast growth factor (BFGF) levels and their associated mechanisms. **Methods**　A total of 128 SD rats were randomly selected for groups as follows: 32 in the sham operation group and the other 96 for groups with rat bilateral gluteal muscle implanted

[基金项目]十堰市太和医院基金项目(2017JJXM035)。

[作者简介]戢艳琼(1976—),女,副主任护师,本科。

[通信作者]陈德森(1970—),男,高级实验师,研究方向:中药制药与临床药理。E-mail:jobzhuaiping@163.com

under the external magnetic disk compression cycle method of ischemia reperfusion to establish stage III model. After 4 days, these 96 were randomly divided into a model group, a positive control group, and a rose and cream group. The sham operation group and model group were treated with physiological Shiomizu Sabu, the positive control group was treated with hydrocolloids, and the rose and cream group had Guiji cream gauze applied to bedsores. At the end of treatment, bedsore wound healing rate and healing speed were analyzed upon treatment for 3, 7, 14, and 21 d, along with determination of the levels of rat tail vein blood serum inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1β), IL-6, and C-reactive protein (CRP), and ELISA for FN and BFGF to determine the level of pressure ulcer granulation tissue, by the solid-phase sandwich method. **Results** The effective time and healing time of the rose and cream group were shorter than those of the positive control group, and the healing rate and healing speed of the cream group were higher than those of the positive control group ($P < 0.05$). Upon treatments for 14, 21, and 28 d, the rose and cream group venous blood CRP, IL-1β, and IL-6 levels were significantly lower than those of the model group and the positive control group ($P < 0.05$), while BFGF and FN were significantly higher than those of the model group and positive control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Rose and cream may reduce wound injury by inhibiting the inflammation caused by the ulcer wound inflammatory mediators IL-6 and IL-1β, increasing the synthesis of BFGF and FN to promote cell proliferation and extracellular matrix synthesis of stromal cells, promoting wound granulation tissue of newborns, and accelerating wound tissue repair.

【**Keywords**】 stage III model; rose and cream; basic fibroblast growth factor; fibronectin; inflammatory mediator

压疮是长期卧床或瘫痪患者常见的并发症之一,也是临床最常见的难愈性溃疡[1]。由于骨隆突部位、骶尾部皮肤和皮下组织缺乏脂肪组织且肌肉层较薄,长时间受压后会发生持续性缺血、缺氧,当体位改变时血流可以再通,局部受压处组织因反复缺血-再灌注而出现不可逆损伤,最终可导致缺血组织溃烂、坏死而发生难愈性溃疡(即压疮),有鉴于此,临床治疗压疮时应充分考虑组织缺血-再灌注损伤对压疮愈合过程的影响[2-3]。另外,持续性炎症反应引起胶原纤维过度降解也是压疮形成的重要诱因,故影响炎症介质 IL-1β、IL-6 及 CRP 的合成及释放均能在一定程度上改变压疮病理进程[4-5]。研究表明,FN 及 BFGF 在压疮愈合过程中起到重要的作用,增加压疮创面 FN 及 BFGF 水平有利于间质细胞的增殖和细胞外基质的合成,促进创面肉芽组织新生而加速压疮创面组织修复[6]。我院在治疗压疮时采用自制瑰及乳膏外敷,发现其对压疮临床疗效显著,本实验为探讨其治疗机制,采用缺血-再灌注的方法建立大鼠 III 期压疮模型,在压疮部位涂敷瑰及乳膏以研究其治疗压疮的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 128 只,体重(180 ± 10)g,由湖北医药学院实验动物中心提供[SCXK(鄂)2017-0008],在湖北医药学院实验动物中心屏障实验室完成实验[SYXK(鄂)2017-0031]。实验动物福利批号:湖北医药学院动(福)第 2017-64 号。自由进食、饮水,取用自然光照,动物房温度 24℃,湿度 60%~70%。

1.2 药品和试剂

瑰及乳膏由十堰市太和医院药剂科提供;FN 及 BFGF 的 ELISA 试剂盒均购自上海双赢生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及压疮模型的建立

采用随机数字表编号,随机取其中 32 只编为假手术组,另 96 只造模,4 d 时随机分为模型组、阳性对照组及玫及乳膏组。

96 只大鼠,禁食 12 h 并禁水 4 h 后腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉,然后剔除大鼠双侧臀毛,消毒(约 9 cm^2),切开臀部皮肤(长约 2 cm),切口应深至肌肉,钝性分离肌肉组织,将消毒磁片(直径 16 mm、厚 2 mm)植入到臀部肌肉下,分层缝合肌肉组织、筋膜及皮肤后消毒。术后 24 h,在植入磁片的皮肤处放置磁铁加压以造成局部组织缺血,2 h 后将外源磁铁取下恢复血流,30 min 后再次加压,反复 3 个循环,4 d 后以皮肤变黑、变硬及针刺不出血作为判断 III 期压疮成模标准[7]。本实验操作简单,成模率高(100%)。假手术组剔除臀毛消毒后不再做任何处理,所有动物均单笼喂养以防咬伤。

1.3.2 治疗给药

模型组、阳性对照组和瑰及乳膏组清创处理并治疗:先用生理盐水冲洗浸泡创面,再用 0.5% 碘伏

消毒,用无菌剪或手术刀片剪除或切除坏死结痂组织,暴露新鲜肉芽组织,用 3% 双氧水冲洗,最后再用 0.9% 氯化钠注射液彻底冲洗创面和周围皮肤,拭干后上药。阳性对照组外敷水胶体敷料后再覆盖无菌纱布。瑰及乳膏组将涂有厚度为 1 mm 的瑰及乳膏纱布覆盖在压疮表面。假手术组及模型组清创处理后外敷生理盐水纱布。四组均每天换药一次,连续治疗 21 d。

1.3.3 观察指标

统计各组压疮创面显效时间、压疮愈合速度和愈合率。压疮愈合速度 = 创面最终愈合时间/创面的最大直径。创面愈合率 = (原始创面面积 - 未愈合创面面积)/原始创面面积 × 100%。并于治疗的第 3、7、14、21 天时尾静脉取血检测血清炎症介质 IL-1β、IL-6 及 CRP 的含量。

1.3.4 固相夹心法酶联免疫吸附实验

分别于第 3、7、14、21 天从每组中随机选取 8 只动物处死,取压疮肉芽组织,采用固相夹心法酶联免疫吸附实验检测 BFGF 及 FN 的含量。检测时将肉芽组织制成匀浆,1000 r/min 离心 10 min,取上清液作为 FN 及 BFGF 的待测样品。BFGF 测定:将 BFGF 和生物素标记抗体同时温育,用 48 孔酶标板加样,加入稀释好后的标准品 50 μL 于反应孔、再加入待测样品 50 μL 于反应孔内。然后加入 50 μL 的生物素标记的抗体。盖上膜板后轻轻振荡混匀,37℃温育 1 h。弃孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 min 后弃洗涤液,用吸水纸拍干。以上操作重复 3 次。然后每孔加入 80 μL 亲和链酶素-HRP,轻轻振荡混匀,37℃温育 30 min。弃孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 s,弃洗涤液,用吸水纸拍干。以上操作重复 3 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μL 后轻轻振荡混匀,37℃温育 10 min。避免光照。取出酶标板,迅速加入 50 μL 终止液后立即测定。在 450 nm 波长处读取各孔的 OD 值、以吸光度 OD 值为纵坐标,相应的 BFGF 标准品浓度为横坐标,取得相应的标准曲线,根据 OD 值绘制的标准曲线换算出待测样品中 BFGF 的相应浓度(用 ng/mL 表示)。FN 检测方法同上。

1.4 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计分析软件对各组进行方差分析,实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组压疮显效时间、愈合时间、创面愈合率及愈合速度比较

如表 1、图 1 所示,与假手术组比,模型组显效时间和愈合时间延长、创面愈合率降低、愈合速度缓慢($P < 0.05$)。与模型组比,阳性对照组和瑰及乳膏组显效时间和愈合时间缩短、创面愈合率和愈合速度提高($P < 0.05$)。瑰及乳膏组显效时间和愈合时间较阳性对照组缩短、创面愈合率和愈合速度较阳性对照组提高($P < 0.05$)。

2.2 治疗对 CRP、IL-1β 和 IL-6 及组织 FN 及 BFGF 含量的影响

如图 2 所示,在治疗第 3、7、14、21 天时,与假手术组比,模型组血清 CRP、IL-1β 和 IL-6 均升高($P < 0.05$),FN 及 BFGF 降低($P < 0.05$),且在第 7、14 天时达到高峰,21 d 时有回落。与模型组相比较,阳性对照组和瑰及乳膏组在第 7、14、21 天时,血清 CRP、IL-1β 和 IL-6 随着治疗时间延长逐步降低($P < 0.05$),FN 及 BFGF 逐渐升高($P < 0.05$)。瑰及乳膏组与阳性对照组同期比,差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组显效时间、愈合时间、创面愈合率及压疮愈合速度比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table. 1 The effective time, healing time, and wound healing rate of each group were compared with the rate of pressure ulcer healing

组别 Groups	显效时间(d) Significant time	愈合时间(d) Healing time	创面愈合率(%) Wound healing rate	愈合速度(mm/d) Healing speed
模型组 Model group	13.15 ± 2.02	18.29 ± 2.57	36.13 ± 5.14	0.08 ± 0.01
阳性对照组 Positive control group	10.41 ± 2.57[a]	14.75 ± 2.96[a]	80.16 ± 6.08[a]	0.19 ± 0.05[a]
瑰及乳膏组 Rose and cream group	7.37 ± 2.15[ab]	11.26 ± 2.50[ab]	92.34 ± 7.64[ab]	0.28 ± 0.07[ab]

注:与模型组比较,[a]$P < 0.05$;与阳性对照组比较,[b]$P < 0.05$。

Note. Compared with the model group, [a]$P < 0.05$. Compared with the positive control group, [b]$P < 0.05$.

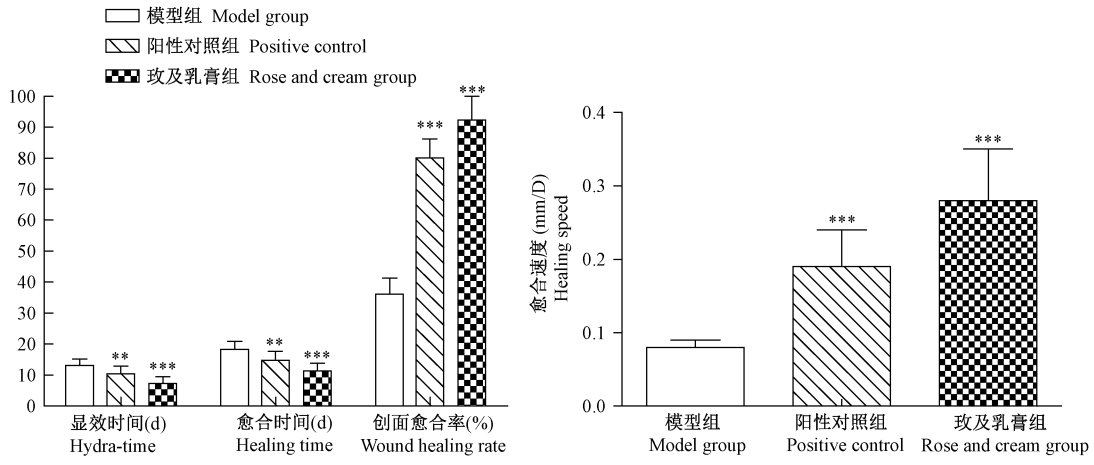

图 1　各组显效时间、愈合时间、创面愈合率及压疮愈合速度比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure. 1　The effective time, healing time, and wound healing rate of each group were compared with the rate of pressure ulcer healing

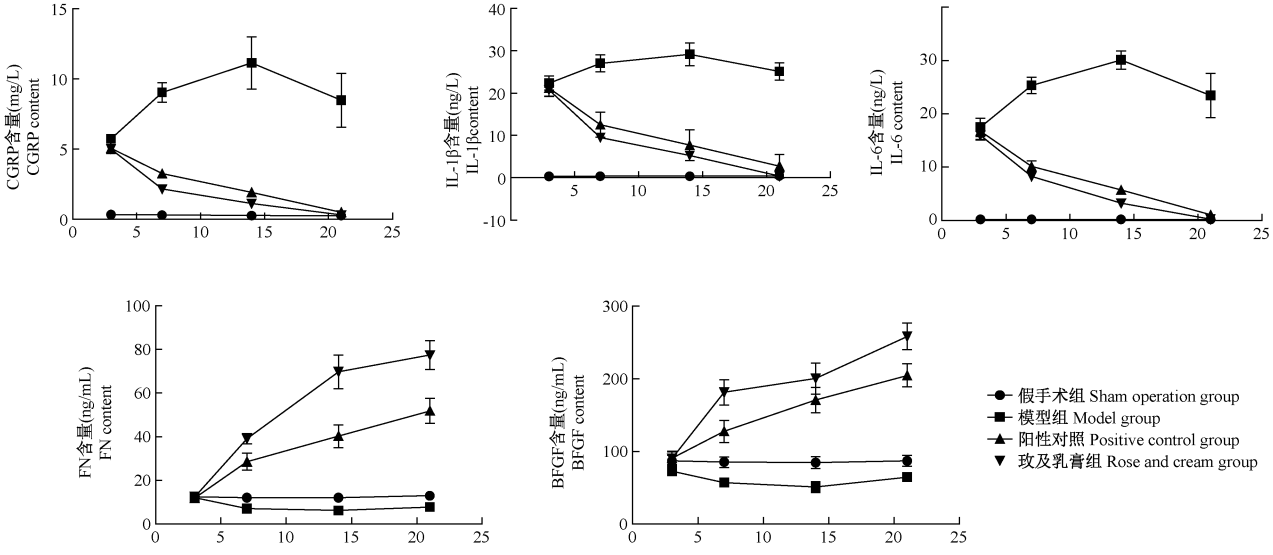

图 2　各组血清 CRP、IL-1β 和 IL-6 及组织 FN 及 BFGF 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure. 2　Comparison of serum CRP, IL-1β, and IL-6, and tissue FN and BFGF levels in each group

3　讨论

压疮又名压力性溃疡,具有难愈合性的特点,压疮一旦发生则经久不愈,III 期以上压疮常出现严重感染,皮肤失去正常功能,进而引起组织的破损及坏死,患者最终因全身器官功能衰竭而死亡,已成为截瘫患者的直接死亡原因之一[8-9]。大量动物实验研究证实,压疮的发生与骨隆突处皮肤和皮下组织长期受压后复灌造成的皮肤和皮下组织缺血-再灌注损伤有关,且皮肤损伤程度与缺血-再灌注损伤时间呈正相关[10]。FN 是一种能维持表皮细胞完整性及防御功能的胶原蛋白,主要由血管上皮细胞和纤维母细胞产生,广泛存在于细胞表面、基膜、相邻细胞间及结缔组织中,FN 与纤维蛋白原及胶原纤维结合后形成的基层胶原纤维-纤维蛋白复合物可促进压疮创缘上皮细胞增殖而加速压疮溃疡创面的修复[11]。BFGF 由巨噬细胞产生,通过 Bcl-2 途径抑制血管内皮细胞的凋亡,调节和促进血管内皮、神经纤维、上皮细胞及成纤维细胞生长,是一种的重要的促血管生长因子[12-13]。因此,在压疮的愈合过程中 FN 及 BFGF 均发挥着重要作用。此外,在压疮病理进程中,强炎症介质 IL-1β、IL-6 等也发挥着作用。研究表明,持续长时间存在的强炎症介质 IL-1β、IL-6 可诱导产生大量的破坏创面完整性的酶,这种酶会降解创面细胞基质及纤连蛋白进而导致创面经久不愈[14-15]。

本实验中使用的瑰及乳膏是我院药学部自制的外用乳霜,主要配方有中药当归、丹参、黄芪、白芨、黄连及辅料霍霍巴油、香精、乳化硅油、甘油、氮酮、十二烷基硫酸钠、羟苯乙酯、碳酸二辛酯等经过多道工艺配制而成,具有祛腐生肌、生肌敛疮、养血排毒、消肿排脓等功效,用于治疗压疮[16]。

在大鼠 III 期压疮皮肤处涂敷瑰及乳膏治疗后发现,瑰及乳膏组显效时间和愈合时间较阳性对照组缩短,创面愈合率和愈合速度较阳性对照组提高,在治疗第 14、21、28 天时,瑰及乳膏组静脉血 CRP 及 IL-1β、IL-6 均明显低于模型组和阳性对照组同期水平,FN、BFGF 均明显高于模型组和阳性对照组同期水平。这提示瑰及乳膏不仅能够有效治疗大鼠 III 期压疮,且这种治疗作用优于阳性对照组所使用的阳性药物水胶体。分析其可能机制是涂敷瑰及乳膏吸收后,中药黄连首先发挥抗菌消炎作用,使强炎症介质 IL-1β、IL-6 降低,从而降低炎症反应产生的破坏性酶对创面细胞基质及纤连蛋白的降解,减轻其对创面完整性的破坏,反应机体炎症水平的 CRP 降低有力的佐证了瑰及乳膏这一抗菌消炎作用。而方中黄芪可抑制压疮缺血再灌注损伤的炎症反应并增强其抗氧化损伤能力[17]。丹参可扩张局部血管、改善压疮创面微循环的作用[18]。当归、白芨等均具有祛腐生肌、生肌敛疮、消肿排脓、养血排毒之功效[19-20]。吸收后可能起到上调 FN 及 BFGF 的作用。BFGF 通过调节和促进血管内皮及成纤维细胞生长,而 FN 可促进压疮创缘上皮细胞增殖,两者均可促进血管内皮新生及成纤维细胞生长,加速压疮局部创面修复和肉芽组织新生[21]。在本实验中,阳性对照组所用水胶体敷料具有保湿作用,是目前常用的治疗创面溃疡(压疮)材料[22]。而瑰及乳膏中的辅料霍霍巴油、香精、乳化硅油、甘油、氮酮、十二烷基硫酸钠、羟苯乙酯、碳酸二辛酯等也具有保湿作用,可使坏死组织软化、溶解,还可吸收创面渗出物、促进肉芽组织生长的作用,且这种作用优于水胶体敷料,更加符合压疮“湿性愈合”的理论。

综上所述,瑰及乳膏可能通过抑制强炎症介质 IL-6、IL-1β 引起的炎症反应产生的破坏性酶对创面细胞基质及纤连蛋白的降解,改善压疮创面微循环、增加 FN 及 BFGF 等促表皮生长因子的合成来促进间质细胞的增殖和细胞外基质的合成,促进压疮肉芽组织生长、加速组织修复、提高压疮愈合速度和愈合率、缩短治疗时间,降低压疮恶化风险的发生。

参考文献:

[1] 李小寒,尚少梅. 基础护理学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社,2012:166-167.

[2] 刘泽洲,陈亮,于志红,等. 压疮的中医外治研究进展[J]. 北京中医药,2017,11(2):182-185.

[3] 王雪玲. 动物压疮模型及压疮形成的分子机制研究进展[J]. 护理学杂志,2011,26(7):90-92.

[4] 王 莹,代彦丽,朴金龙,等. 炎症因子、生长因子以及凋亡因子在压疮慢性难愈合性创面中的表达及作用[J]. 中国应用生理学杂志,2017,33(2):181-184,188.

[5] Martins VL, Caley M, O'Toole EA, et al. Matrix metal lproteinases and epidermal wound repairf[J]. Cell Tissue Res, 2013,351(2):255-268.

[6] 王雪玲,黄芳,侯勇,等. bfgf 对大鼠Ⅲ期压疮溃疡创面的疗效[J]. 齐鲁医学杂志,2015,30(6):720-722.

[7] Reid RR, Sull AC, Mogford JE, et al. Anovel murinemodel of cyclical cutaneousischem iareperfuson injury[J]. J Surg Res, 2004,116(1):172-180.

[8] 李小萍. 基础护理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:111-112.

[9] 王雪玲. 动物压疮模型及压疮形成的分子机制研究进展[J]. 护理学杂志,2011,26 (7):90-92.

[10] 马丽静,戴冬梅,刘卫,等. 水溶性壳聚糖膜治疗缺血-再灌注损伤致Ⅱ期压疮动物实验[J]. 护理研究,2013,27(23):2538-2540.

[11] 李学娟,陈泽彬,魏红,等. 大黄素对高糖培养的 GMC 增殖、FN 表达及 p38MAPK 的影响 [J]. 中国药理学通报,2014,30(2):233-238.

[12] 黄芳,杨晶金,王雪玲,等. VEGF 和 bFGF 在大鼠压疮模型中的表达及其意义[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(8):1504-1506.

[13] 叶建新,林航, 穆军山,等. bFGF 对血管性痴呆大鼠海马神经干细胞的影响 [J]. 中国比较医学杂志,2009,19 (11):1-4.

[14] 王莹,代彦丽,朴金龙,等. 炎症因子、生长因子以及凋亡因子在压疮慢性难愈合性创面中的表达及作用[J]. 中国应用生理学杂志,2017,33(2):181-184,188.

[15] 杨青,张连峰. 白介素家族细胞因子与干细胞动员[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (5):62-65.

[16] 马俐,滕敬华,程红霞,等. 瑰及乳膏联合 TDP 预防及治疗Ⅰ~Ⅱ期压疮的疗效[J]. 现代中西医结合杂志,2014,22(30):3411-3412.

[17] 张自珍,罗欣,于小华,等. 黄芪注射液抑制压疮缺血再灌注损伤大鼠的炎症反应并增强其抗氧化损伤能力[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(4):507-510.

[18] 吴静, 沈翠珍. 丹参素钠对压疮缺血再灌注损伤大鼠预防作用的实验研究[J]. 浙江中医杂志,2017,22(1):64-65.

[19] 王俊杰,王洋,沈伟烨,等. “瑰及”乳膏联合重组牛碱性成纤维细胞生长因子防治常见物理性皮肤病的应用研究[J]. 中国药物与临床,2015,15(5):662-663.

[20] 马俐,滕敬华,程红霞,等. 瑰及乳膏联合 TDP 预防及治疗Ⅰ~Ⅱ期压疮的疗效[J]. 现代中西医结合杂志,2014,22(30):3411-3412.

[21] 马俐,滕敬华,程红霞,等. 瑰及乳膏治疗压疮的疗效观察[J]. 检验医学与临床,2014,12(1):70-71.

[22] 高天烁,王建军,史瑞,等. 康惠尔水胶体敷料贴应用在老年压疮中的效果分析[J]. 山西医药杂志,2017,46(9):1116-1118.

〔收稿日期〕2018-02-15