

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.19.016

生肌玉红胶原对后肢缺血性创面模型大鼠血管新生的影响

顾云慧¹, 牟丹丹¹, 顾铭¹, 李晨², 张媿¹, 陈佳静¹, 叶小舟¹, 卞卫和^{2*}, 姚昶²

(1. 南京中医药大学研究生院, 江苏省南京市栖霞区仙林大学城仙林大道 138 号, 210046; 2. 江苏省中医院)

摘要 目的 探讨生肌玉红胶原促进慢性缺血性创面愈合的可能作用机制。方法 72 只大鼠随机分为空白组、对照组、实验组 3 组, 每组 24 只。所有大鼠建立大鼠后肢缺血性创面模型, 空白组直接缝合皮肤, 实验组以生肌玉红提取液 (0.5 g/ml, 50 μ l/只) 载入 10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 2 mm 长方体胶原放置血管离断缺损处的缺血肌肉组织处, 对照组将载入 50 μ l 生理盐水的相同大小胶原放置于血管离断缺损处的缺血肌肉组织处, 然后缝合皮肤。各组均观察 28 天。观察各组大鼠一般情况, 并分别于第 3、7、14、28 天检测大鼠后肢缺血创面处微血管计数及对照组与实验组植入标本内血红蛋白含量。结果 空白组大鼠后肢均有跛行, 部分苍白并见到肢端青紫, 实验组大鼠后肢无明显缺血表现。与空白组同时间点比较, 对照组第 14、28 天时微血管计数高于空白组, 实验组第 7、14、28 天时亦明显高于空白组 ($P < 0.05$)。与对照组同时间点比较, 实验组第 7、14 天时微血管计数明显升高 ($P < 0.05$)。实验组第 3、7、14、28 天植入标本内血红蛋白含量明显高于同时间点对照组 ($P < 0.05$)。结论 生肌玉红胶原可促进缺血性创面组织血管新生并改善其血流灌注, 可能为其促进慢性缺血性创面愈合的作用机制。

关键词 缺血性创面; 生肌玉红胶原; 血管新生; 血流灌注

慢性创面是临床常见的疾病, 以下肢多见, 主要表现为溃疡局部皮肤缺损、渗液、慢性组织增生及炎性反应, 多迁延不愈, 患者局部不适、功能障碍、影响外观, 严重影响患者生活质量^[1-2]。临床上一般认为 6~8 周末愈合的创面即可称为慢性创面, 是外科临床公认的治疗难题之一^[3]。Meta 分析显示, 影响愈合的两大关键因素为创面的感染及血液供应, 标准的治疗原则为积极清创与改善微循环^[4]。生肌玉红膏处方源自《外科正宗》, 临床多用于疮疡脓水将尽, 肉芽生长缓慢者。我们前期临床研究显示其治疗慢性体表溃疡疗效佳^[5-7], 将生肌玉红膏提取液载入胶原后可以进一步提高疗效^[8-9]。本研究探讨生肌玉红胶原改善微循环的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只, 7~8 周龄, 体重

200~220 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2008-0016。

1.2 实验药物及细菌

生肌玉红胶原处方: 甘草 60 g, 白芷 60 g, 当归 60 g, 紫草 60 g。以 70% 乙醇回流提取 2 次, 加入 24 g 血竭, 超临界 CO₂ 萃取物摇匀, 并定容至 1000 ml 制成浓度为 1.6 mg/ml 的生肌玉红膏提取液。胶原海绵 [国食药监械 (准) 字 2011 第 3640408 号] 由无锡贝迪生物工程有限公司提供, 为 I 型牛胶原。

1.3 主要试剂及仪器

10% 水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司 (批号: 20080325); 血红蛋白标准品购自德国 Sigma 公司 (批号: H2500); CD34 免疫组织化学试剂盒购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司 (批号: KIT-5030)。MIAS-200 彩色病理图像分析系统, 襄樊徕克生物电子仪器厂; Moor-FLPI 全景血流灌注系统购自北京吉安得尔科技有限公司; LEICA-Tek TEL 组织包埋中心购自日本 SALURA 公

基金项目: 国家自然科学基金 (81373646); 2010 年度康缘中医药科技
技创新基金 (HZ1009KY); 江苏高校优势学科建设工程项目

* 通讯作者: bweihe@163.com, (025) 86617141 转 70608

司; RM2235 型石蜡切片机购自德国 Leica 公司; DM 1000 光学显微镜购自德国 Leica 公司。

1.4 动物分组与干预方法

72 只大鼠采用随机数字表法分为空白组、对照组、实验组, 每组 24 只。所有大鼠参照文献 [10] 改进大鼠后肢缺血性创面模型, 简要过程如下: SD 大鼠 10% 水合氯醛 ($3 \sim 4 \mu\text{l/g}$) 腹腔注射麻醉固定后, 右侧腹股沟中点行约 2 cm 的纵行切口, 分离股动脉主干及分支血管, 在主干始部结扎并离断主干与各分支长度 $1 \sim 1.5 \text{ cm}$ 。之后空白组缝合皮肤, 实验组以生肌玉红提取液 (0.5 g/ml , $50 \mu\text{l/只鼠}$) 载入 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 长方体胶原放置血管离断缺损处的缺血肌肉组织处, 对照组将载入 $50 \mu\text{l}$ 生理盐水的相同大小胶原放置于血管离断缺损处的缺血肌肉组织处, 然后缝合皮肤。各组均观察 28 天。

1.5 观察指标及方法

1) 术后观察大鼠进食、活动、体重及切口愈合, 后肢坏死致残情况。2) 造模后第 3、7、14、28 天麻醉大鼠, 每个时间点取 6 只, 于血管离断处或胶原周围取肉芽组织 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$, 立即予以 -80°C 冷冻保存待测。大鼠后肢缺血创面处微血管计数: 按照 CD34 免疫组织化学试剂盒说明书标记各时点组织切片内微血管, 400 倍光镜下每张切片取 5 个视野, 采用 MIAS-200 彩色病理图像分析系统行单位肉芽组织切片面积内的微血管计数均值。大鼠后肢缺血处植入标本内血红蛋白检测: 采用光度计法测定, 对照组与实验组各时点标本取出后浸入 2 ml 蒸馏水内 5 min 以去除表面血液, 按试剂盒指示测定 410 nm 吸收光度值, 其标准曲线由人体血红蛋白标准品测量获得。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计, 数据以

($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

所有大鼠均存活, 手术切口愈合良好, 无感染发生。空白组 7 只大鼠右后肢端外观苍白, 3 天内苍白较明显; 5 只大鼠见到肢端青紫斑块, 所有大鼠均有右后肢拖拉、跛行状态, 持续 1~3 天; 3~7 天后大部分大鼠肢端苍白、青紫消失, 全部未出现肢端坏死、爪尖脱落等现象。对照组后肢缺血总体程度稍轻于空白组。实验组大鼠皮肤颜色正常, 未出现青紫斑块, 行走正常。

2.2 各组大鼠不同时间点缺血性创面周围组织微血管计数比较

表 1 示, 各组大鼠第 3 天缺血性创面周围组织微血管计数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白组同时间点比较, 对照组第 14、28 天时微血管计数高于空白组, 实验组第 7、14、28 天时亦明显高于空白组 ($P < 0.05$)。与对照组同时间点比较, 实验组第 7、14 天时微血管计数明显升高 ($P < 0.05$)。与本组前一时间点比较, 对照组在第 14 天微血管计数明显高于第 7 天 ($P < 0.05$), 而第 28 天与第 14 天比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 实验组第 7 天微血管计数高于本组第 3 天, 第 14 天亦高于本组第 7 天, 而第 28 天微血管计数较第 14 天明显减少 ($P < 0.05$)。

2.3 对照组和实验组大鼠不同时间点植入标本内血红蛋白含量比较

表 2 示, 实验组第 3、7、14、28 天植入标本内血红蛋白含量明显高于同时间点对照组 ($P < 0.05$); 实验组和对照组各时间点均较本组前一时间点植入标本内血红蛋白含量增高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点缺血性创面周围组织微血管计数比较 ($\text{根}/\text{m}^2$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
空白组	6	7.30 ± 1.20	8.00 ± 1.87	9.00 ± 2.15	10.00 ± 2.87
对照组	6	10.80 ± 2.87	11.00 ± 1.41	$15.00 \pm 1.85^* \Delta$	$13.00 \pm 2.52^*$
实验组	6	10.60 ± 2.73	$15.00 \pm 1.85^* \Delta \blacktriangle$	$21.00 \pm 2.85^* \Delta \blacktriangle$	$13.00 \pm 2.38^* \blacktriangle$

注: 与空白组同时间点比较, $*$ $P < 0.05$; 与对照组同时间点比较, Δ $P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$

表 2 对照组和实验组大鼠不同时间点植入标本内血红蛋白含量比较 (mg/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
对照组	6	15.88 ± 3.23	$37.63 \pm 4.35^\Delta$	$47.07 \pm 4.65^\Delta$	$49.54 \pm 5.67^\Delta$
实验组	6	$23.55 \pm 3.14^*$	$64.66 \pm 6.98^* \Delta$	$78.26 \pm 6.35^* \Delta$	$102.39 \pm 11.45^* \Delta$

注: 与对照组同时间点比较, $*$ $P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, Δ $P < 0.05$

3 讨论

生肌玉红胶原是将传统中医外用制剂生肌玉红膏原方去除毒性药物轻粉,采用醇提法提取其有效成分,形成液体后,按需要载入胶原,冷冻干燥后,去除乙醇,包装后 Co^{60} 消毒备用。生肌玉红胶原中紫草解毒消肿,白芷排脓止痛为君药;当归、血竭活血化瘀,生肌止痛,为臣药;甘草清热解毒,调和药性,为佐使药。诸药合用共奏解毒、祛腐、生肌之功效。胶原含有大量氨基酸,是细胞外基质的主要成分之一,对细胞分化、组织修复、器官的正常营养具有重要作用^[11]。生肌玉红膏去除轻粉减少了毒性,载入胶原后可以发挥传统生肌玉红膏与胶原促进愈合的优势,临床使用疗效优于传统生肌玉红膏^[8-9,12]。前期研究显示,生肌玉红胶原植入皮下,既促进血管新生与肉芽长入,又提高了组织相容性^[13]。

本研究在以上研究基础上,建立大鼠后肢缺血性创面模型,研究显示模型大鼠后肢端外观苍白,可见到肢端青紫斑块,伴拖拉、跛行状态,持续 1~3 天,未出现肢端坏死。实验组大鼠皮肤颜色正常,未出现青紫斑块,行走正常,说明生肌玉红胶原可改善模型大鼠的后肢缺血性创面的血液供应。创面周围肌肉组织微血管计数显示,实验组标本植入术第 7 天开始微血管新生数增多,而对照组在术后第 14 天时开始升高,并且实验组在第 7、14 天时微血管计数亦明显高于对照组,同时实验组标本内血红蛋白含量各时间点亦高于对照组,且随时间延长而升高更明显,显示出生肌玉红胶原具有良好的促进缺血组织血管新生与改善血流灌注的功效。总之,生肌玉红胶原可促进缺血性创面组织血管新生并改善其血流灌注,可能是其促进慢性缺血性创面愈合的作用机制。今后可进一步模拟糖尿病性、结核性、药物性(如类固醇激素)等慢性创面,探查生肌玉红胶原的可能作用机制。

参考文献

[1] FAZLI M, BJARNSHOLT T, KIRKETERP-MILLER K, et

al. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds [J]. Wound Repair Regen, 2011, 19(3):387-391.

[2] SINDRILARU A, PETERS T, WIESCHALKA S, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice [J]. J Clin Invest, 2011, 121(3):985-997.

[3] NUGENT R. Chronic diseases in developing countries: health and economic burdens [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1136:70-79. doi: 10.1196/annals.1425.027.

[4] LAZARUS G, VALLE F, MALAS M, et al. Chronic venous leg ulcer treatment: future research needs: identification of future research needs from comparative effectiveness review No. 127 [Internet]. Agency for Healthcare Research and Quality, 2013, Report No: 13(14)-EHC034-EF.

[5] 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.

[6] 施裕新,姚昶,张晓清,等.生肌玉红膏改善下肢慢性创面患者生活质量的双盲随机对照 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9):1992-1994.

[7] 尹恒,应语,姚昶,等.生肌玉红膏治疗下肢慢性溃疡祛腐生肌疗效的临床研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(2):121-124.

[8] 缪雪华,张宇轩,陈运,等.生肌玉红胶原海绵促进胶原合成与组织愈合的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(4):337-341.

[9] 曹鲁梅,樊玲丽,韩晓玲,等.生肌玉红胶原海绵对促进体表慢性创面愈合的作用 [J]. 齐鲁护理杂志, 2014, (7):36-37, 38.

[10] 杨盛家,陈兵,罗涛.大鼠后肢急性缺血模型的构建及评估 [J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(6):580-584.

[11] 乐音子,陈灵,任伟业,等.胶原海绵对创面愈合的影响 [J]. 中国基层医药, 2014, 21(13):1954-1956.

[12] 樊玲丽,曹鲁梅,韩晓玲,等.生肌玉红明胶海绵治疗Ⅲ期压疮疗效观察 [J]. 护理研究, 2013, 27(21):2231-2232.

[13] 陈德轩,朱永康,吴晓斌,等.生肌玉红膏载入修饰后胶原的生物相容性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(6):1234-1236, 1449.

Effect of Collagen Loading with Shengji Yuhong Ointment (生肌玉红胶原) on Angiogenesis in Model Rats with Hind Limb Ischemic Wound

GU Yunhui¹, MOU Dandan¹, GU Ming¹, LI Chen², ZHNAG Chi¹, CHEN Jiajing¹, YE Xiaozhou¹, BIAN Weihe¹, YAO Yong²

(1. Graduate School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046; 2. Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Hospital)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of the collagen loading with Shengji Yuhong Oint-

ment in promoting chronic ischemic wound healing. **Methods** Randomly divided 72 rats into the blank group, the control group and the experimental group, with 24 rats in each group. All rats were established into hind limb ischemic wound model. , with direct skin suture in the blank group, the oblong collagen (size: 10 mm 10 mm × 2 mm) was loaded with the *Shengji Yuhong* extract (0.5 g/ml, 50 μl/each) in the experimental group and placed it at the ischemic muscle tissue in the blood vessel defect, with the same size collagen loaded with 50 μl normal saline in the ischemic muscle tissue in the blood vessel defect in the control group. Then the skin was sutured. Twenty-eight days were observed in each group. Observed the general situation of rats in each group, detected the microvessel count in the rat's ischemic wound hind limb and hemoglobin content in implanted samples in the control group and the experimental group on the 3th, 7th, 14th day respectively. **Results** The rats in the blank group were hind limb claudication, partly pale and can see acrocyanosis, while rats in the experimental group had no obvious ischemic manifestations. Compared with the blank group, the microvessel count in the control group was higher than the blank group on the 14th and 28th day, and the microvessel count in the experimental group was significantly higher than that of the blank group on the 7th, 14th and 28th day ($P < 0.05$). Compared with the control group, the microvessel count was significantly increased in the experimental group on the 7th and 14th day ($P < 0.05$). The hemoglobin level of the implanted samples in the experimental group was significantly higher than that of the control group at the same time on the 3rd, 7th, 14th and 28th day ($P < 0.05$). **Conclusion** The collagen loading with *Shengji Yuhong* ointment can promote angiogenesis in ischemic wound tissue and improve blood flow perfusion, which may be the mechanism of promoting chronic ischemic wound healing.

Keywords ischemic wound; collagen loading with *Shengji Yuhong* ointment; angiogenesis; blood flow perfusion

(收稿日期: 2015-11-22; 修回日期: 2016-03-31)

[编辑: 邓 媛]

第二届全国中西医结合治疗肝病临床经验学术研讨会 暨中西医结合治疗肝病新进展及临床经验研修班通知

为了提升肝病防治水平,反映前沿学术新进展,交流中西医结合治疗肝病的最新经验,为广大医务工作者提供学习交流的平台,由世界中医药学会联合会肝病专业委员会中医杂志社主办,中国中医科学院教育处、中华中医药学会肝胆病分会协办,山东泰安市中医院肝病中心、北京兰亭毕至科技有限公司承办的“第二届全国中西医结合治疗肝病临床经验学术研讨会暨中西医结合治疗肝病新进展及临床经验研修班”(项目编号:J20163202046)拟于 2016 年 10 月 14-16 日在山东省泰安市(泰山)举行,现将相关事宜通知如下。

一、征文内容:1. 名老中医治疗肝病经验及案例分析;2. 常见肝病(如病毒性肝炎、肝硬化、肝癌、酒精性和非酒精性脂肪肝等)中西医结合治疗经验、诊治思路、用药心得、特色治疗方法等;3. 中西医结合治疗肝病的最新进展和述评;4. 中医学术论文写作与发表要点等;5. 其他相关肝病的研究成果等。

二、会议拟邀请专家:著名肝病专家、世界中医药学会联合会肝病专业委员会主任委员叶永安教授;首都医科大学北京地坛医院王融冰教授;首都医科大学北京佑安医院李秀惠教授;中华中医药学会肝病分会李筠教授;解放军 302 医院中西医结合诊疗中心主任肖小河教授;中国中医科学院西苑医院刘燕玲教授;首都医科大学北京中医医院张青教授;上海中医药大学肝病研究所孙明瑜教授;山东中医药大学附属医院尹常健教授;解放军八十八医院商庆华教授;北京中医药大学东直门医院杜宏波主任;山东省千佛山医院徐昌青教授;山东省泰安市中医院赵学印教授;中医杂志社副总编辑李春梅教授等。

三、征文要求:1. 论文除特约稿外,一般在 3000 字以内。未公开发表,主题明确,论据充分,注明单位姓名、联系方式;2. 论文格式为 Word 文本,采用电子投稿(huangzb1234@126.com);3. 论文截止日期为 2016 年 10 月 1 日;4. 为方便参会代表相互学习交流,优秀论文将收入大会汇编集,符合条件的优秀论文将推荐给《中医杂志》等行业核心杂志。无会议论文也可注册参会,参加学习的代表经考核合格授予国家级继续教育 I 类学分。

四、会议时间地点及费用:时间:2016 年 10 月 14-16 日,地点:山东省泰安市(具体地址另行通知),会务费:1200 元/人,学生 800 元/人。凡 2016 年 9 月 30 日前交纳会务费每人优惠 200 元。银行汇款:户名:北京兰亭毕至科技有限公司,开户行:建设银行北京工商大厦支行,帐号:11001085300059628259,联系人:廖勇(010-58200266)。食宿统一安排,费用自理。会议由北京兰亭毕至科技有限公司出具会务费发票。详情请登录《中医杂志》官网 www.jtcm.net.cn 查询或电话咨询。

五、会务组联系地址:1. 北京市东城区东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮编:100700。联系人:张博,010-64089188,13910162425;2. 北京市东城区海运仓 5 号北京中医药大学东直门医院,邮编:100700,联系人:甘大楠(13811370013);3. 山东省泰安市东岳大街 58 号泰安市中医院,联系人:亓勇,0538-6122959,13793806187,邮编:271000。