

· 基础研究 ·

黄芪丹参超微颗粒凝胶对大鼠创面愈合影响的实验研究

张文恺¹, 涂冬鹏¹, 许超², 王书卿¹, 姜献¹, 周红云¹

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005)

摘要 目的: 观察黄芪丹参超微颗粒凝胶对大鼠创面愈合的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法: 将 90 只 SD 大鼠随机分成模型组、敷贴组和凝胶组, 每组 30 只。在所有大鼠背部制成直径约 1.8 cm 的圆形全层皮肤切除开放创面。纱布止血, 碘伏消毒后, 模型组创面以无菌纱布包扎、敷贴组创面以爱力敷湿性敷贴包扎、凝胶组创面涂抹 0.5 g 黄芪丹参超微颗粒凝胶后用无菌纱布包扎, 隔天换药 1 次。分别于造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天, 从各组随机选取 6 只大鼠, 计算创面愈合率, 并切取创面全层皮肤组织制成切片, 计算创面修复组织中新生毛细血管数量和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 含量。造模后第 15 天, 计算剩余 6 只大鼠创面愈合率, 待创面完全愈合后处死。结果: ①创面愈合率。造模后第 1 天, 各组大鼠创面均无明显变化, 未计算创面愈合率。造模后第 3 天、第 7 天、第 11 天、第 15 天, 3 组大鼠的创面愈合率总体比较, 差异均有统计学意义[造模后第 3 天: $(11.53 \pm 0.36)\%$, $(12.41 \pm 0.27)\%$, $(13.37 \pm 0.60)\%$, $F = 27.127$, $P = 0.000$; 造模后第 7 天: $(38.21 \pm 0.46)\%$, $(38.72 \pm 0.72)\%$, $(38.81 \pm 0.24)\%$, $F = 22.971$, $P = 0.000$; 造模后第 11 天: $(87.23 \pm 0.12)\%$, $(87.40 \pm 0.31)\%$, $(88.55 \pm 0.50)\%$, $F = 25.437$, $P = 0.000$; 造模后第 15 天: $(93.38 \pm 0.26)\%$, $(93.45 \pm 0.41)\%$, $(94.27 \pm 0.43)\%$, $F = 10.526$, $P = 0.001$]。造模后第 3 天、第 7 天、第 11 天、第 15 天, 凝胶组的创面愈合率均高于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$) 和敷贴组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。造模后第 3 天, 敷贴组的创面愈合率高于模型组 ($P = 0.003$); 造模后第 7 天、第 11 天、第 15 天, 模型组和敷贴组的创面愈合率比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.059$, $P = 0.246$, $P = 0.690$)。实验结束时, 3 组大鼠创面均愈合, 均未出现创面感染及死亡。②创面修复组织中新生毛细血管数量。造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天, 3 组大鼠创面修复组织中新生毛细血管数量总体比较, 差异均有统计学意义[造模后第 1 天: (15.50 ± 0.55) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (16.17 ± 0.75) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (17.67 ± 0.82) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, $F = 14.457$, $P = 0.000$; 造模后第 3 天: (23.33 ± 1.03) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (23.83 ± 0.98) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (24.56 ± 1.69) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, $F = 19.085$, $P = 0.000$; 造模后第 7 天: (23.17 ± 1.17) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (24.17 ± 0.75) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (26.50 ± 1.38) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, $F = 13.739$, $P = 0.000$; 造模后第 11 天: (16.33 ± 0.82) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (16.33 ± 1.03) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, (18.50 ± 0.55) 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, $F = 13.852$, $P = 0.000$]。造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天, 凝胶组创面修复组织中新生毛细血管数量均高于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$) 和敷贴组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); 模型组和敷贴组创面修复组织中新生毛细血管数量比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.175$, $P = 0.363$, $P = 0.229$, $P = 1.000$)。③创面修复组织中 VEGF 含量。造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天, 3 组大鼠创面修复组织中 VEGF 含量总体比较, 差异均有统计学意义 (造模后第 1 天: 0.332 ± 0.192 , 0.340 ± 0.236 , 0.409 ± 0.267 , $F = 19.414$, $P = 0.000$; 造模后第 3 天: 0.456 ± 0.250 , 0.479 ± 0.459 , 0.560 ± 0.232 , $F = 16.559$, $P = 0.000$; 造模后第 7 天: 0.359 ± 0.244 , 0.387 ± 0.279 , 0.459 ± 0.476 , $F = 13.280$, $P = 0.000$; 造模后第 11 天: 0.229 ± 0.182 , 0.256 ± 0.334 , 0.326 ± 0.213 , $F = 23.516$, $P = 0.000$)。造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天, 凝胶组创面修复组织中 VEGF 含量均高于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$) 和敷贴组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$); 造模后第 1 天、第 3 天, 模型组和敷贴组创面修复组织中 VEGF 含量比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.378$, $P = 0.338$); 造模后第 7 天、第 11 天, 敷贴组创面修复组织中 VEGF 含量均高于模型组 ($P = 0.045$, $P = 0.016$)。结论: 黄芪丹参超微颗粒凝胶能促进大鼠创面愈合, 其作用可能与其上调创面修复组织中 VEGF 表达, 从而促进毛细血管增殖有关。

关键词 伤口愈合; 黄芪; 丹参; 血管内皮生长因子类; 毛细血管; 大鼠; 动物实验

Effects of ultrafine particle gel of astragalus membranaceus and salvia miltiorrhiza on wound healing in rats: an experimental study

ZHANG Wenkai¹, TU Dongpeng¹, XU Chao², WANG Shuqing¹, JIANG Xian¹, ZHOU Hongyun¹

1. The Second Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, Zhejiang, China

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2018ZA048)

通讯作者: 许超 E-mail: docxuchao@126.com

ABSTRACT Objective: To observe the effects of ultrafine particle gel of astragalus membranaceus and salvia miltiorrhiza on wound healing in rats and to explore its possible mechanism of actions. **Methods:** Ninety SD rats were randomly divided into model group, dressing group and gel group, 30 cases in each group. A 1.8 mm diameter round open wound was made by resecting full-thickness skin of the back of all rats. After hemostasis with gauze and disinfection with iodophor, the wounds of rats in model group and dressing group were bandaged with sterile gauze and ALLEVYN THIN(爱力敷) moist dressing respectively and the wounds of rats in gel group were bandaged with sterile gauze after application of 0.5 g ultrafine particle gel of astragalus membranaceus and salvia miltiorrhiza. The fresh dressings were changed for the wounds on alternate days. Six rats were randomly selected out from each group at the 1st, 3rd, 7th and 11th day after the modeling respectively, and their wound healing rates were calculated. The full-thickness skin tissues of wound were sectioned, and the number of neogenetic blood capillary and the content of vascular endothelial growth factor(VEGF) in the repaired tissues of wound were calculated. The wound healing rates of the last six rats in each group were calculated at the 15th day after the modeling, and the rats were executed after the wound healed completely. **Results:** The wound changed unobviously in rats of each group at the 1st day after the modeling, so the wound healing rate was not calculated. There was statistical difference in wound healing rate between the 3 groups in general at the 3rd, 7th, 11th and 15th day after the modeling respectively (11.53 ± 0.36 , 12.41 ± 0.27 , $13.37 \pm 0.60\%$, $F = 27.127$, $P = 0.000$; 38.21 ± 0.46 , 38.72 ± 0.72 , $38.81 \pm 0.24\%$, $F = 22.971$, $P = 0.000$; 87.23 ± 0.12 , 87.40 ± 0.31 , $88.55 \pm 0.50\%$, $F = 25.437$, $P = 0.000$; 93.38 ± 0.26 , 93.45 ± 0.41 , $94.27 \pm 0.43\%$, $F = 10.526$, $P = 0.001$). The wound healing rate was higher in gel group compared to model group and dressing group at the 3rd, 7th, 11th and 15th day after the modeling respectively ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$). The wound healing rate was higher in dressing group compared to model group at the 3rd day after the modeling ($P = 0.003$). There was no statistical difference in wound healing rate between model group and dressing group at the 7th, 11th and 15th day after the modeling respectively ($P = 0.059$, $P = 0.246$, $P = 0.690$). At the end of the experiment, the wound healed and no infection and death were found in rats of each group. There was statistical difference in the number of neogenetic blood capillary in repaired tissues of wound between the 3 groups in general at the 1st, 3rd, 7th and 11th day after the modeling respectively (15.50 ± 0.55 , 16.17 ± 0.75 , 17.67 ± 0.82 piece/mm²), $F = 14.457$, $P = 0.000$; 23.33 ± 1.03 , 23.83 ± 0.98 , 24.56 ± 1.69 piece/mm²), $F = 19.085$, $P = 0.000$; 23.17 ± 1.17 , 24.17 ± 0.75 , 26.50 ± 1.38 piece/mm²), $F = 13.739$, $P = 0.000$; 16.33 ± 0.82 , 16.33 ± 1.03 , 18.50 ± 0.55 piece/mm²), $F = 13.852$, $P = 0.000$). The number of neogenetic blood capillary in repaired tissues of wound was higher in gel group compared to model group and dressing group at the 1st, 3rd, 7th and 11th day after the modeling ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$), and there was no statistical difference in number of neogenetic blood capillary in repaired tissues of wound between model group and dressing group ($P = 0.175$, $P = 0.363$, $P = 0.229$, $P = 1.000$). There was statistical difference in the content of VEGF in repaired tissues of wound between the 3 groups in general at the 1st, 3rd, 7th and 11th day after the modeling respectively (0.332 ± 0.192 , 0.340 ± 0.236 , 0.409 ± 0.267 , $F = 19.414$, $P = 0.000$; 0.456 ± 0.250 , 0.479 ± 0.459 , 0.560 ± 0.232 , $F = 16.559$, $P = 0.000$; 0.359 ± 0.244 , 0.387 ± 0.279 , 0.459 ± 0.476 , $F = 13.280$, $P = 0.000$; 0.229 ± 0.182 , 0.256 ± 0.334 , 0.326 ± 0.213 , $F = 23.516$, $P = 0.000$). The content of VEGF in repaired tissues of wound was higher in gel group compared to model group and dressing group at the 1st, 3rd, 7th and 11th day after the modeling ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$; $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$). There was no statistical difference in content of VEGF in repaired tissues of wound between model group and dressing group at the 1st and 3rd day after the modeling ($P = 0.378$, $P = 0.338$). The content of VEGF in repaired tissues of wound was higher in dressing group compared to model group at the 7th and 11th day after the modeling ($P = 0.045$, $P = 0.016$). **Conclusion:** The ultrafine particle gel of astragalus membranaceus and salvia miltiorrhiza can promote wound healing in rats, and its mechanisms of action may be that it can up-regulate the expression of VEGF and promote the proliferation of blood capillary in repaired tissues of wound.

Keywords wound healing; astragalus membranaceus; salvia miltiorrhiza; vascular endothelial growth factors; capillaries; rats; animal experimentation

创面愈合包括凝血期、炎症期、肉芽组织形成期及组织重构期 4 个阶段, 涉及各种类型细胞、生物活性因子和细胞外基质的相互作用^[1]。任何一个阶段受到阻碍, 其自然愈合过程都会受到影响^[2]。临床干预对于创面愈合至关重要, 目前已有多种方法被用于

促进创面愈合^[3]。Yang 等^[4]的研究发现, 凝胶能在伤口部位交联, 并形成细胞基质。中药黄芪、丹参具有补气活血的功效, 是治疗难愈合性创面^[5]的常用中药。本研究观察了黄芪丹参超微颗粒凝胶对大鼠小面积全层皮肤缺损创面愈合的影响, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 8~10 周龄清洁级健康 SD 大鼠 90 只,雌雄各半,体质量 225~250 g,购自上海 BK 公司,实验动物合格证号:ACXK(沪)2018-0198。动物饲养和处置均在浙江中医药大学动物实验研究中心进行,饲养环境安静,自然照明,室温 22~26℃。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 黄芪、丹参饮片若干,购自浙江中医药大学滨江中医门诊部;戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司);4%多聚甲醛、HE 染色试剂盒、免疫组化试剂抗体 ARC10513anti-VEGF antibody、抗体 ab64238 DAB、免疫组化笔、封闭山羊血清(上海帛龙生物科技有限公司);玻璃酸钠注射液(山东博士伦福瑞达制药有限公司);爱力敷湿性敷贴(Smith & Nephew 公司);RM-2015 石蜡切片机、LEICADM500 三目生物显微镜、FSX-10-15 图像信号采集与分析系统(莱卡公司);DNP-9162 型电恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);光学显微镜(Olympus 公司);Tissue-Tek VIP5Jr 组织脱水机(Sakura 公司);KP-90N 求积仪(KOIZUMI 公司)。

2 方法

2.1 黄芪丹参超微颗粒凝胶制备 将黄芪、丹参饮片送往山东济南达微机械有限公司,用 XDW-6 低温细胞级超微粉碎机将饮片加工成直径 $<3\ \mu\text{m}$ 的超微颗粒,按照质量比 1:1 充分混匀。将黄芪、丹参混合颗粒与玻璃酸钠注射液按 50 mg:2 mL 的比例充分混匀制成凝胶制剂,分袋密封包装,每袋 0.5 g。将配制好的凝胶制剂送往浙江大学原子核农业科学研究所进行钴 60- γ 射线辐射消毒,辐射标准按照 1997 年卫生部发布的《 ^{60}Co 辐照中药灭菌剂量标准》执行。

2.2 动物分组及造模 将大鼠分为模型组、敷贴组、凝胶组,每组 30 只。常规饲养 2 周,确定脱毛位置无炎症及红肿等异常情况,腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠麻醉($1.5\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),参考赵京禹等^[6]的全层皮肤缺损法,在大鼠背部制成直径约 1.8 cm 的圆形全层皮肤切除开放创面,深达筋膜。

2.3 实验干预 创面先以纱布止血,碘伏消毒,模型组创面以无菌纱布包扎、敷贴组创面以爱力敷湿性敷贴包扎、凝胶组创面涂抹 0.5 g 黄芪丹参超微颗粒凝胶后用无菌纱布包扎。待大鼠清醒后,分组入笼喂养,自由进食饮水,隔天换药 1 次。

2.4 样本采集 分别于造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天,从各组随机选取 6 只大鼠。先以醋酸纸覆盖创面,用记号笔沿创面边缘标记创面范围,保存图片用以计算创面愈合率。再以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射全身麻醉,沿大鼠正常皮肤创缘切取全层皮肤组织,然后脱颈处死。造模后第 15 天,按照上述方法记录每组剩余 6 只大鼠的创面范围,待创面完全愈合后处死大鼠。

2.5 实验指标测定

2.5.1 创面愈合率 用求积仪绘测出先前在醋酸纸上标记的图形面积,计算创面愈合率。创面愈合率 = [(造模时创面面积 - 取材时创面面积) / 造模时创面面积] $\times 100\%$ ^[5]。

2.5.2 创面修复组织中新生毛细血管数量 将切取的全层皮肤组织在 4% 多聚甲醛固定 24 h,乙醇梯度脱水后常规石蜡包埋后切片。将切片置于 60℃ 恒温烤箱中烤片 2 h 后进行 HE 染色。步骤如下:二甲苯脱蜡 3 次,每次 5 min,乙醇梯度脱水,脱蜡脱水完成后纯水洗 2 次,每次 3 min,苏木精染液染色 5 min,纯水漂洗,1% 盐酸乙醇分化数秒后 0.5% 伊红液染色 1~3 min,最后脱水封片。每张切片在 200 倍光镜下采集 10 个视野的图像,统计新生毛细血管数量并求均值。

2.5.3 创面修复组织中血管内皮生长因子含量 将石蜡切片脱蜡复水,用 PBS 缓冲液孵育 5 min。抗原表面修复前加 3% 过氧化氢溶液于切片,湿盒孵育 10 min 后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,洗去残留的过氧化氢。将切片置入 0.01 mL 枸橼酸缓冲液,微波炉中档火力至沸腾后保持 8 min,再降到室温,重复 2 次。用 PBS 清洗 5 min,滴加 10% 山羊血清,室温湿盒封闭 30~60 min,再滴加一抗工作液,在冰箱内于 4℃ 孵育过夜。次日移去一抗后用 PBS 清洗,再滴加二抗工作液,室温孵育 30 min 后 PBS 清洗,DAB 显色后苏木精复染 2~5 min,之后以 1% 盐酸酒精分化数秒,流水洗后脱水封片。镜下观察并摄取图像。以胞质和胞膜内棕黄色颗粒为标准,使用 Image Pro Plus 软件用光密度法测定血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量。

2.6 数据统计 采用 SPSS24.0 软件进行数据分析。造模后不同时点 3 组大鼠创面愈合率及创面修复组织中新生毛细血管数量、VEGF 含量的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用

LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 创面愈合率 造模后第 1 天, 各组大鼠创面仍有渗血, 创面边缘均可见水肿 (图 1)。造模后第 3 天, 大部分大鼠创面已无活动性出血, 局部肿胀较之前消退, 伤口清洁干燥, 且均未见红、肿、热等明显炎症反应; 各组大鼠创面边缘均可见皱褶, 与其他 2 组相比, 凝胶组大鼠创面边缘皱褶较多且收缩明显 (图 2)。造模后第 7 天, 各组大鼠创面均结痂, 痂块呈深黑色; 凝胶组痂块周围软组织较其余 2 组紧皱, 痂块面积更小 (图 3)。造模后第 11 天, 凝胶组大鼠创面已基本愈合, 仅有少量痂块附着; 其余 2 组大鼠创面均剩部分痂面 (图 4)。造模后第 15 天, 凝胶组大鼠创面均已愈合, 创面均被毛发覆盖; 其余 2 组大鼠创面未愈合, 创面仍可见少量痂块 (图 5)。实验结束时, 3 组大鼠创面均愈合, 均未出现创面感染及死亡等。

造模后第 1 天, 各组大鼠创面均无明显变化, 未计算创面愈合率。造模后第 3 天、第 7 天、第 11 天、第 15 天, 3 组大鼠的创面愈合率总体比较, 差异均有

统计学意义。造模后第 3 天、第 7 天、第 11 天、第 15 天, 凝胶组的创面愈合率均高于模型组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$) 和敷贴组 ($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.000$)。造模后第 3 天, 敷贴组的创面愈合率高于模型组 ($P = 0.003$); 造模后第 7 天、第 11 天、第 15 天, 模型组和敷贴组的创面愈合率比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.059$, $P = 0.246$, $P = 0.690$)。见表 1。

3.2 创面修复组织中新生毛细血管数量 造模后第 3 天, 模型组创面修复组织中可见大量炎性细胞浸润, 主要为中性粒细胞、巨噬细胞等; 敷贴组创面修复组织中可见较多中性粒细胞存在; 凝胶组创面修复组织中可见大量炎性细胞浸润, 主要为中性粒细胞, 还有少许淋巴细胞和巨噬细胞散在分布, 新生毛细血管数量较其余 2 组多 (图 6)。造模后第 7 天, 凝胶组新生毛细血管数量较其余 2 组多, 敷贴组新生毛细血管较之前明显增多, 模型组可见少量新生毛细血管 (图 7)。其余时间点 3 组大鼠创面修复组织 HE 染色结果未见明显差异。

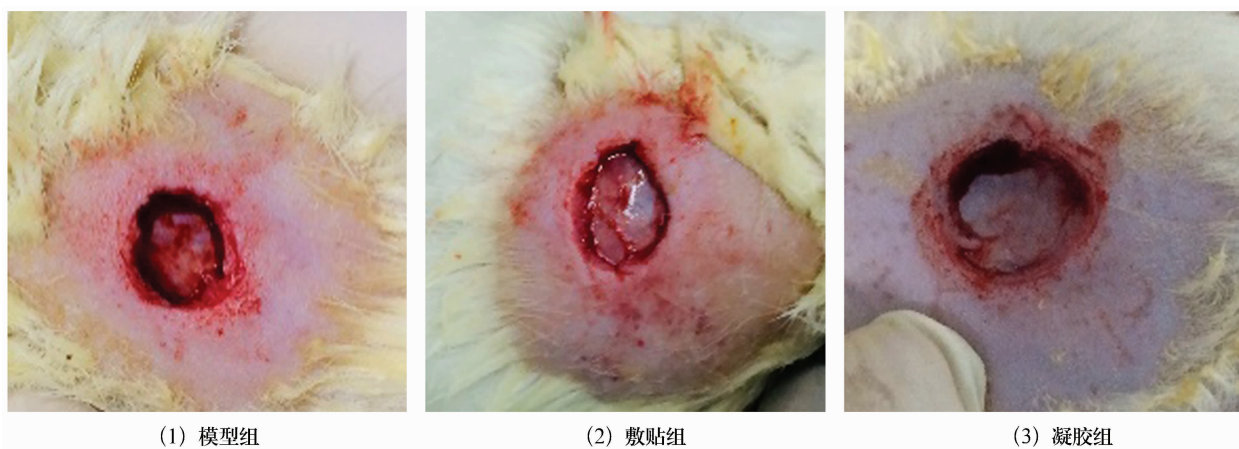


图 1 造模后第 1 天 3 组大鼠创面外观图片

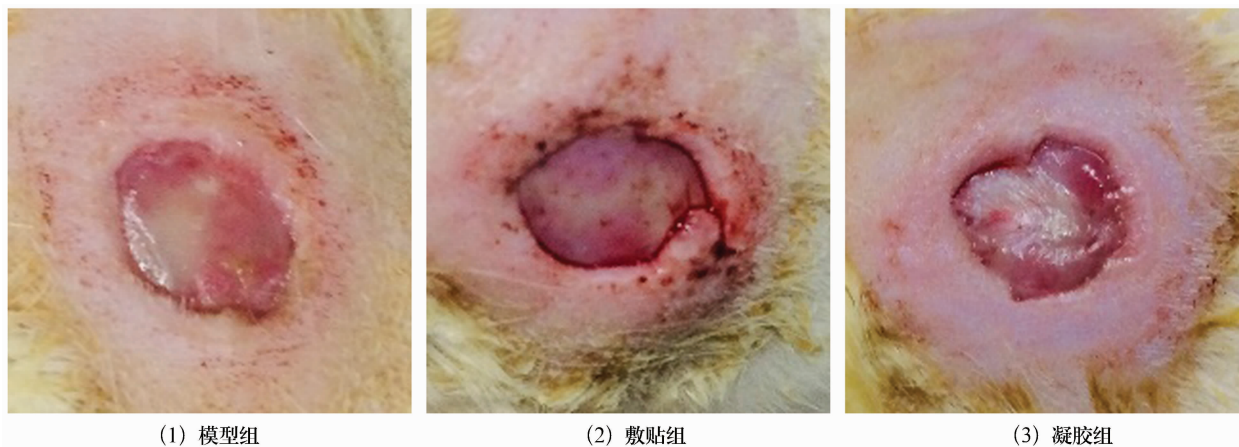


图 2 造模后第 3 天 3 组大鼠创面外观图片

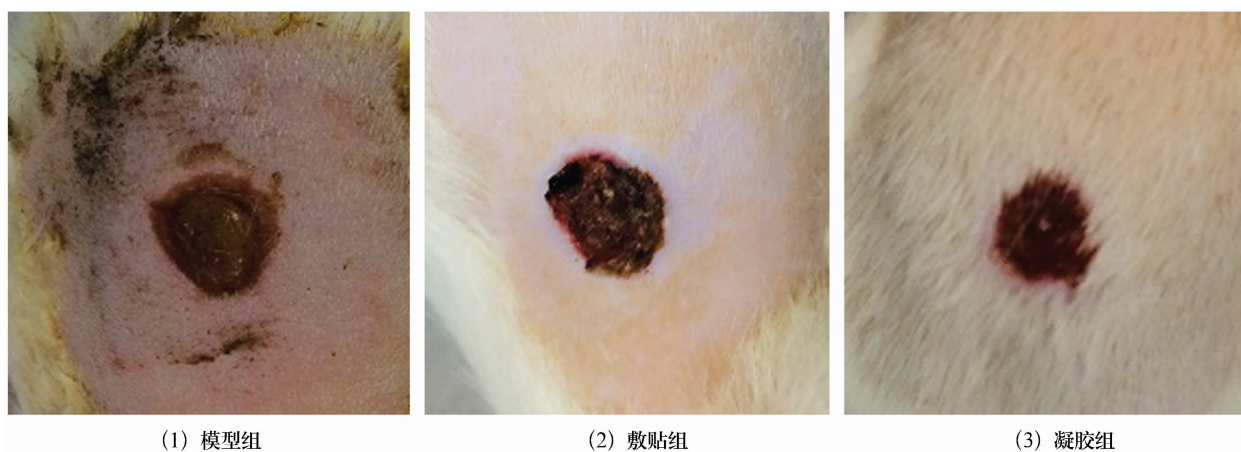


图 3 造模后第 7 天 3 组大鼠创面外观图片

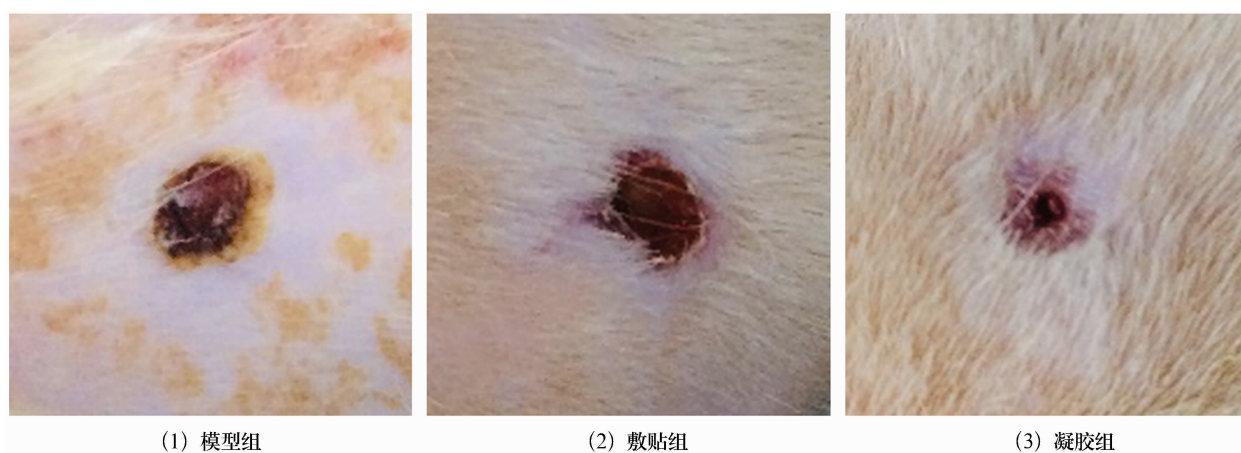


图 4 造模后第 11 天 3 组大鼠创面外观图片

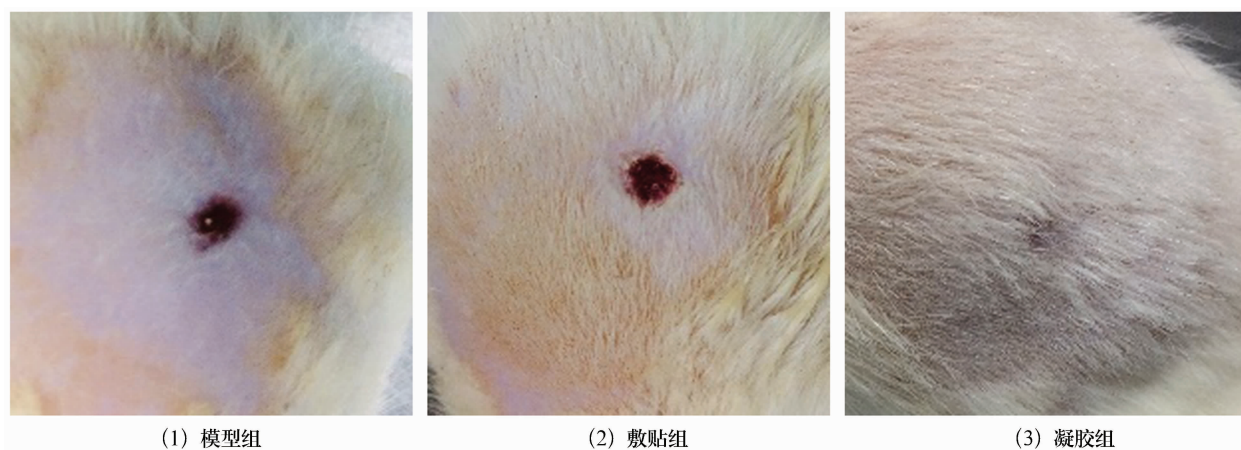


图 5 造模后第 15 天 3 组大鼠创面外观图片

表 1 3 组大鼠造模后不同时间创面愈合率

组别	样本量(只)	创面愈合率($\bar{x} \pm s$)			
		造模后第 3 天	造模后第 7 天	造模后第 11 天	造模后第 15 天
模型组	6	(11.53 ± 0.36) %	(38.21 ± 0.46) %	(87.23 ± 0.12) %	(93.38 ± 0.26) %
敷贴组	6	(12.41 ± 0.27) %	(38.72 ± 0.72) %	(87.40 ± 0.31) %	(93.45 ± 0.41) %
凝胶组	6	(13.37 ± 0.60) %	(38.81 ± 0.24) %	(88.55 ± 0.50) %	(94.27 ± 0.43) %
F 值		27.127	22.971	25.437	10.526
P 值		0.000	0.000	0.000	0.001

造模后第 1 天,各组大鼠创面均无明显变化,未计算创面愈合率

造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天,3 组大鼠创面修复组织中新生毛细血管数量总体比较,差异均有统计学意义。造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天,凝胶组创面修复组织中新生毛细血管数量均高于模型组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$)和敷贴组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$);模型组和敷贴组创面修复组织中新生毛细血管数量比较,差异均无统计学意义($P=0.175, P=0.363, P=0.229, P=1.000$)。见表 2。

3.3 创面修复组织中 VEGF 含量 造模后第 1 天、第

3 天、第 7 天、第 11 天,3 组大鼠创面修复组织中 VEGF 含量总体比较,差异均有统计学意义。造模后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天,凝胶组创面修复组织中 VEGF 含量均高于模型组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$)和敷贴组($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$);造模后第 1 天、第 3 天,模型组和敷贴组创面修复组织中 VEGF 含量比较,差异均无统计学意义($P=0.378, P=0.338$);造模后第 7 天、第 11 天,敷贴组创面修复组织中 VEGF 含量均高于模型组($P=0.045, P=0.016$)。见表 3、图 8。

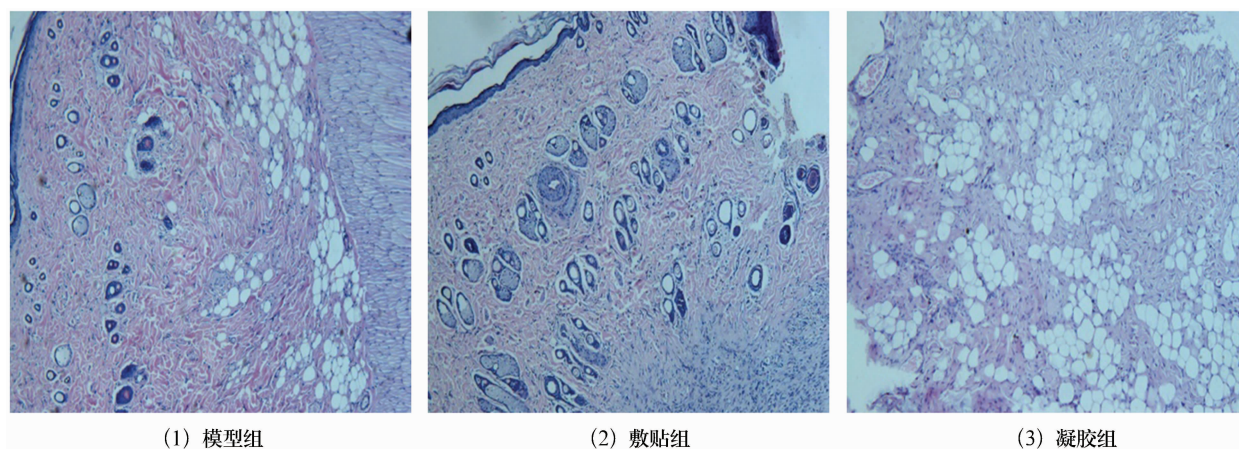


图 6 造模后第 3 天 3 组大鼠创面修复组织 HE 染色结果(×200)

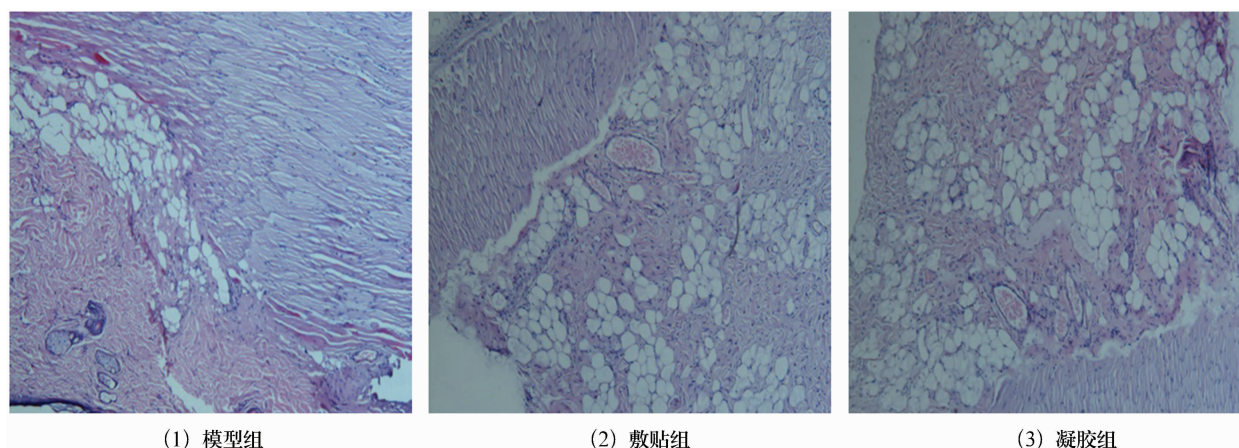


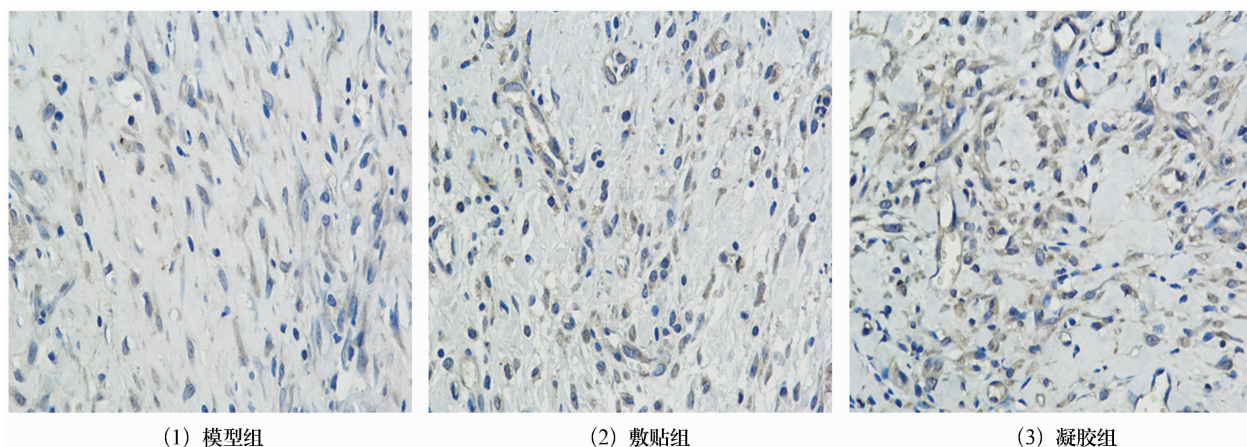
图 7 造模后第 7 天 3 组大鼠创面修复组织 HE 染色结果(×200)

表 2 3 组大鼠造模后不同时间创面修复组织中新生毛细血管数量

组别	样本量(只)	创面修复组织中新生毛细血管数量($\bar{x} \pm s$, 个·mm ⁻²)			
		造模后第 1 天	造模后第 3 天	造模后第 7 天	造模后第 11 天
模型组	6	15.50 ± 0.55	23.33 ± 1.03	23.17 ± 1.17	16.33 ± 0.82
敷贴组	6	16.17 ± 0.75	23.83 ± 0.98	24.17 ± 0.75	16.33 ± 1.03
凝胶组	6	17.67 ± 0.82	24.56 ± 1.69	26.50 ± 1.38	18.50 ± 0.55
F 值		14.457	19.085	13.739	13.852
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 3 组大鼠造模后不同时间创面修复组织中血管内皮生长因子含量

组别	样本量(只)	创面修复组织中血管内皮生长因子含量($\bar{x} \pm s$, OD 值)			
		造模后第 1 天	造模后第 3 天	造模后第 7 天	造模后第 11 天
模型组	6	0.332 ± 0.192	0.456 ± 0.250	0.359 ± 0.244	0.229 ± 0.182
敷贴组	6	0.340 ± 0.236	0.479 ± 0.459	0.387 ± 0.279	0.256 ± 0.334
凝胶组	6	0.409 ± 0.267	0.560 ± 0.232	0.459 ± 0.476	0.326 ± 0.213
F 值		19.414	16.559	13.280	23.516
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

图 8 造模后第 3 天 3 组大鼠创面修复组织中血管内皮生长因子免疫组化染色结果($\times 400$)

4 讨论

创面愈合从止血和炎症开始,这一阶段会募集血小板和免疫细胞以控制血液流失,并清除病原体^[7]。最初募集的免疫细胞在分泌趋化因子和生长因子方面起主要作用。天然创面环境由具有细胞黏附位点的细胞外基质平台、生长因子和各种类型的细胞组成^[8]。研究人员一直在开发各种类型的创面敷料,并试图模仿皮肤微环境^[9]。在针对创面愈合的 4 个阶段进行创面敷料的功能化过程中,使用特定的生物活性分子或材料以提供抗微生物特性,用于创面在最初阶段预防和清除细菌定植、结合生长因子(如表皮生长因子、VEGF 或血小板衍生生长因子等),以刺激中期细胞生长、增殖和迁移愈合。

在新生血管生成过程中,VEGF 被认为是最具主导调控地位的血管生成因子^[10-11]。在创面愈合早期,VEGF 不仅能促进血管内皮细胞及血管外膜成纤维细胞增殖,还能调节血管通透性,使血管内皮细胞加速迁移,从而促进创面毛细血管和肉芽组织生成,为创面提供营养物质,加快创面愈合^[12]。此外,VEGF 还能与血管内皮细胞表面的特异性受体结合,增强血管内皮细胞增殖能力,促进其分裂,进而诱导血管生成,从而促进创面愈合^[13]。

中医学理论认为,创面愈合是“腐祛肌生,肌平皮

长”的过程。目前已有不少有关中药促进创面愈合的研究。陈晓虎等^[14]为探讨黄芪促进血管生成的作用,将黄芪载入可降解的胶原支架内,发现黄芪具有与重组人体 VEGF 载入修饰的胶原相当的效果,并且与 VEGF 具有协同作用。丹参具有扩张血管、改善微循环、促进组织修复和再生、抗菌、抗纤维化等作用^[15],丹参酮 II A 是其中的有效成分。刘嘉楠等^[16]的研究发现,丹参酮 II A 磺酸钠注射液能促进烧伤植皮患者创面愈合,改善创面愈合质量。

本研究的结果表明,黄芪丹参超微颗粒凝胶能促进大鼠创面愈合,其作用可能与其上调创面修复组织中 VEGF 表达,从而促进毛细血管增殖有关。

5 参考文献

- [1] BIELEFELD K A, AMINI - NIK S, ALMAN B A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(12): 2059 - 2081.
- [2] SEAVEY J G, MASTERS Z A, BALAZS G C, et al. Use of a bioartificial dermal regeneration template for skin restoration in combat casualty injuries[J]. Regen Med, 2016, 11(1): 81 - 90.
- [3] CHOUHAN D, DEY N, BHARDWAJ N, et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: current status and advances [J]. Biomaterials, 2019, 216: 119267.

- [4] YANG Z, HE C, HE J, et al. Curcumin - mediated bone marrow mesenchymal stem cell sheets create a favorable immune microenvironment for adult full - thickness cutaneous wound healing[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1) : 21.
- [5] 庄兢, 杨宇, 丁力, 等. 脂肪来源干细胞联合胶原蛋白生物工程支架移植干预大鼠慢性难愈合性创面血管内皮生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(33) : 5274 - 5280.
- [6] 赵京禹, 付小兵, 雷永红, 等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备[J]. 感染、炎症、修复, 2008, 9(1) : 64.
- [7] CHOUHAN D, DEY N, BHARDWAJ N, et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration; current status and advances [J]. Biomaterials, 2019, 216: 119267.
- [8] YILDIRIMER L, THANH N T, SEIFALIAN A M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom - up approach [J]. Trends Biotechnol, 2012, 30(12) : 638 - 648.
- [9] BHARDWAJ N, CHOUHAN D, MANDAL B B. Tissue engineered skin and wound healing: current strategies and future directions [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(24) : 3455 - 3482.
- [10] CASTELLANI M L, GALZIO R J, FELACO P, et al. VEGF, substance P and stress, new aspects: a revisited study [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(3) : 229 - 237.
- [11] 胡泽华, 余昭芬, 黄谨, 等. 马桑水提取物对大鼠深 II 度烧伤创面微循环和氧化应激的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(1) : 50 - 56.
- [12] 王金杰, 俞倩丽, 范魏魏, 等. 舒尼替尼干预大鼠膝关节关节炎的实验研究[J]. 中医正骨, 2018, 30(1) : 1 - 5.
- [13] 屈纪富, 郝利, 孙薇, 等. 细胞因子在创伤愈合过程中的变化及其意义的研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5(1) : 74 - 76.
- [14] 陈晓虎, 姚昶, GROERGE A, 等. 黄芪植入可控降解胶原支架控释促血管生成的效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(31) : 6143 - 6148.
- [15] FANG J, XU S W, WANG P, et al. Tanshinone II - A attenuates cardiac fibrosis and modulates collagen metabolism in rats with renovascular hypertension [J]. Phytomedicine, 2010, 18(1) : 58 - 64.
- [16] 刘嘉楠, 何放, 钱明元, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对烧伤植皮创面愈合及瘢痕形成的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(7) : 1306 - 1308.

(收稿日期: 2019-04-29 本文编辑: 李晓乐)

· 通 知 ·

2019 年 SICOT 中国足踝外科专家论坛 暨洛阳正骨第三届足踝外科高峰论坛(第一轮通知)

尊敬的骨科同仁:

2019 年国际矫形及创伤研究协会(Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie, SICOT)足踝外科专家论坛暨洛阳正骨第三届足踝外科高峰论坛, 将于 2019 年 10 月 20 日在美丽的绿城郑州召开。本次会议由 SICOT 中国部足踝外科学会主办, 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)足踝外科诊疗中心承办, 中华医学会骨科学分会足踝外科学组、白求恩公益基金会足踝外科专业委员会、中国老年医学学会骨与关节分会足踝学组、河南省中西医结合学会骨伤科分会、《中医正骨》杂志、足踝工坊、骨先生网站协办。

会议将由俞光荣教授、武勇教授、徐海林教授等领衔的国内著名足踝外科专家团队, 针对足踝外科领域的学科热点和临床重点问题, 以专家论坛、专题讲座、病例讨论的形式, 与诸位参会医师进行交流、分享。

欢迎各位同仁积极参会交流, 相互学习, 相互借鉴, 共同推进足踝外科事业发展。

报到时间 2019 年 10 月 19—20 日

会议时间 2019 年 10 月 20 日

会议地点 郑州逸泉国际酒店(郑州市通泰路与陇海高架交汇处路东, 通泰路 1 号)

会议费用 大会免注册费。食宿统一安排, 费用自理。大会安排酒店为郑州逸泉国际酒店, 单间 360 元/天、标间 360 元/天。

联系人 明晓锋 18538209556, 刘晓东 18838222008, 霍纪宝 18538228862

张经理 15738898170(郑州逸泉国际酒店)

SICOT 中国部足踝外科学会
河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)

2019 年 7 月 19 日