

本文引用:李文华,伍伟明,刘筱,杨敏,周雯婷,曾娟妮.美洲大蠊提取液对慢性难愈合创面 I/III 型胶原蛋白调控研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):250-253.

美洲大蠊提取液对慢性难愈合创面 I/III 型胶原蛋白调控研究

李文华¹,伍伟明¹,刘筱¹,杨敏¹,周雯婷¹,曾娟妮^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

〔摘要〕目的 观察美洲大蠊提取液对大鼠慢性难愈合创面组织中 I/III 型胶原蛋白的表达,探讨其促愈机制。方法 将 48 只 SPF 大鼠随机分为急性创面对照组,慢性创面模型组、贝复济阳性组及美洲大蠊实验组,药物干预 5、7、11 d 后分批留取创面组织并处死,运用 PCR 方法测定创面组织中 I/III 型胶原蛋白 mRNA 的表达。结果 I、III 型胶原在各组中的表达趋势曲线一致,第 5 天,对照组表达最高,模型组最低,从第 5 天开始,美洲大蠊实验组中 I、III 型胶原中表达呈上升趋势并高于阳性组,第 7 天达到高峰后逐渐稳定下降,第 11 天略低于阳性组($P<0.01$)。结论 美洲大蠊提取液能有效提高大鼠难愈合创面前中期 I/III 型胶原蛋白的表达从而促进创面愈合,并在后期能有效降低胶原蛋白的过度表达而减少瘢痕形成。

〔关键词〕 美洲大蠊提取液;慢性难愈合创面;I 型胶原蛋白;III 型胶原蛋白

〔中图分类号〕R285.5;R393 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.005

Study of American Cockroach Extraction Solution in Regulating the Type I/III Collagen of Chronic Wound

LI Wenhua¹, WU Weiming¹, LIU Xiao¹, YANG Ming¹, ZHOU Wenting¹, ZENG Juanni^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effect of American Cockroach extraction solution on the expression of type I/III collagen in tissue of the chronic wound in rats, and to investigate the healing mechanism. Methods The 48 SPF rats were randomly divided into the acute wound control group (control group), the chronic wound model group (model group), the positive group and the experimental group. The research group kept a part of wound tissue in batches on 5th, 7th, 11th day after drug intervention and executed the whole rats finally. Expression quantity of type collagen I/III mRNA in wound tissue was measured by polymerase chain reaction (PCR). Results The curves of expression variation of collagen type I and III were consistent in each group. On the 5th day, the expression quantity in the control group was highest and the model group's was lowest. Collagen type I/III of the experimental group was on the rise from the 5th day and it was higher than that of positive group, it kept steadily after reaching the peak on the 7th day, and it was slightly lower than that of the positive group on 11st day ($P<0.01$). Conclusion American cockroach extraction solution could improve the expression of type I/III collagen of skin tissue in the middle time of the chronic wound healing of rats effectively, and it could reduce the excessive expression of collagen effectively so as to reduce the scar formation.

〔Keywords〕 American cockroach extraction solution; chronic wound; type I collagen; type III collagen

〔收稿日期〕2017-11-07

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81503585)。

〔作者简介〕李文华,女,在读硕士研究生,医师,研究方向:肛肠病的防治与研究。

〔通讯作者〕* 曾娟妮,女,硕士,副主任医师,E-mail:575826199@qq.com。

慢性难愈合创面是指创面在各种内外因素作用下不能通过正常的愈合进程达到解剖和功能上的完整,从而进入一种病理性炎症反应状态,最终导致经久难愈^[1]。临床上多指各种原因形成的创面经 30 d 以上治疗未能愈合,也无愈合倾向者^[2]。主要见于大面积创面烧伤、糖尿病溃疡、压迫性溃疡等。随着患病率的逐年上升,皮肤难愈合创面的长期护理耗费了高昂的治疗费用及医疗资源,给患者造成了精神、身体的双重痛苦。研究者也针对病因病理展开了大量研究,近年生物分子技术的快速发展,使创面愈合的方法在细胞外基质、干细胞、转基因干细胞水平等方面的研究取得了一定成果,但其靶向性、高效性及安全性尚未完全解决,在临床上的应用仍需要一定过程,因此,在外科创面修复中亟待寻找一种安全、有效、价廉的方法。已经证实在影响创面愈合的诸多因素中,生长因子的分泌^[3]及细胞外基质成分(extracellular matrix, ECM)的合成/降解^[4]在创面愈合过程中起着至关重要的作用^[5]。ECM 对细胞的迁徙、增殖、分化和组织的重构有着重要作用^[6],而胶原蛋白是 ECM 的主要组分,在皮肤中主要是 I、III 型胶原。美洲大蠊具有养阴生肌、通利血脉等作用,其提取物已经逐渐应用于临床慢性皮肤溃疡并取得了较好的修复疗效,但其促愈机制的实验研究报道仍然很少。课题组在前期实验中发现美洲大蠊提取液在肉芽生长期上调 TGF 及 VEGF 表达来加速创面愈合^[7],基于此,本实验利用 PCR 检测肉芽组织胶原蛋白 I、III 型胶原,进一步研究美洲大蠊的促愈机制,丰富中医外治方法及理论。

1 实验材料

1.1 实验动物

2 月龄、体质量为 200~250 g 的 SPF 级大鼠 48 只,雌雄各半,由湖南中医药大学动物中心提供(合格证号:43004700026384),混合饲料单笼饲养,适应性喂养 1 周。

1.2 主要实验药物及试剂

美洲大蠊提取液 100 mL/瓶(商品名:康复新,编号:B14000063390)由四川好医生药业集团生产,贝复济 15 mL/瓶(国药准字 S10980075)珠海亿胜生物制药有限公司生产。DNA Marker(Fermentas 公司批号:SM0672);Trizol(美国 GIBCO 公司批号:15596-026);Real-time PCR mix(thermo fisher 公司批号:4367659);Gold View 核酸染料、琼脂糖粉、氯仿、引物由上海生物工程有限公司提供。

1.3 主要实验仪器

F2 微量移液器(美国 thermo fisher 公司);

ChemiDoc MP 凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司);TGradientPCR 仪(德国 Biometra 公司);BioPhotometer D30 核酸蛋白分析仪、5810R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)

2 方法

2.1 大鼠创面分组与模型的建立

48 只大鼠中随机取 12 只建立大鼠急性创面对照组(简称对照组),其余 36 只制备慢性难愈合创面模型,再随机均分为美洲大蠊实验组(简称实验组)、贝复济阳性对照组(简称阳性组)、模型组,各组均为 12 只。急性创面对照组模型:对照组大鼠在造模区常规备皮,然后行全层皮肤切除,但不使用药物干预处理;慢性难愈合创面模型制备:参照付小兵^[8]全层皮肤缺损法经改进制成大鼠慢性难愈合创面模型。大鼠腹腔注射盐酸胺酮(100 mg/kg)麻醉后,在腰椎正中偏上备皮,用直径约为 2 cm 的硬币标记面积造模,无菌条件下在造模区用外科方法作两条深达筋膜、直径为 2 cm 的全层皮肤缺损开放性创面,即刻皮下注射醋酸氢化可的松(6 mg/100 g)。

2.2 创面换药及取材

各组换药前均以 1/5 000 呋喃西林液清洁创面 2 次,每日换药 2 次。实验组及阳性组分别使用美洲大蠊体提取液纱条(0.2 mL/cm²)、贝复济药物纱条(60 U/cm²),模型组及对照组外敷两层生理盐水纱布(0.2 mL/cm²),然后加盖纱布并胶布固定。分别在 5、7、11 d 3 个时间点每组随机取 3 只大鼠,均采用相同部位,平行创面剪取 0.5 cm×0.5 cm 大小深达真皮层创面组织,质量约 50 mg,置于 10%甲醛溶液进行固定中备用。所有大鼠均在第 11 天取材后统一处死。

2.3 指标及检测方法

2.3.1 RT-PCR 检测 I/III 型胶原的引物设计 根据超纯 RNA 提取试剂盒的要求提取样本的总 RNA 并按说明进行操作, I 型胶原引物序列:上游 5'-TGAGCCAGCAGATTGAGAAC-3', 下游 5'-CCAGTGTCCATGTCGCAGA-3', PCR 扩增片段长度为 470 bp; III 型胶原引物序列:上游 5'-TTCCTTTGTCTAATCTTGTCA-3', 下游 5'-TAGCACCAT TGAGACATTTTGA-3', PCR 扩增片段长度为 224 bp;β-actin(内参定量)引物序列为:上游 5'-GC-TATTTG GCGCTGGACTT-3', 下游 5'-GCGGCTCG-TAGCTCTTCTC-3', PCR 扩增片段长度为 495 bp。

2.3.2 RNA 提取及逆转录 从固定的肉芽组织中提取 RNA 并反转录得到 cDNA,并以该 cDNA 为模板,用针对目的基因设计合成的 PCR 引物进行 real-time PCR,以检测组织中目的基因的表达。1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 纯度各组样本总 RNA 浓

度在 0.301~0.568 $\mu\text{g/mL}$, A260/A280 在 1.821~1.945 间,符合实验要求。第一链 cDNA 合成:取 1.0 μg Total RNA 加 Nuclease-Free Water 到无 RNA 酶的 EP 管中,混匀后离心,70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min,立即置于冰上;按一定比例将其他试剂加入反应体系中(冰上进行),混匀,短暂离心;42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,然后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 10 min 使 Reverse Transcriptase 失活;将得到 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3.3 I/III 型胶原的 PCR 检测 (1)按照一定比例配制反应体系 20 μL :将 12 \times Real-time PCR mix/2 \times PCR mix/10 μL 、cDNA 模板 1 μL 、上下游引物各 1 μL 、ddH₂O 7 μL 混匀;(2)扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min 预变性;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 扩增 40 cycle,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.3.4 指标测定 以 1.2% 琼脂糖凝胶,在 0.5 \times TBE 缓冲溶液中电泳进行 PCR 产物鉴定,ChemiDoc MP 凝胶成像分析仪在反射紫外灯下全自动图像扫描,分析 I/III 型胶原蛋白 mRNA 光密度值结果。

2.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 17.0 统计分析软件处理,该计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态分布,方差齐,则多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验,反之采用 Kruskal Wallis *H* 检验, $P<0.05$ 表示有统计学差异, $P<0.01$ 表示统计有显著意义。

3 结果

3.1 I/III 型胶原蛋白 mRNA 表达

从表 1、表 2 可以看出, I/III 型胶原蛋白 mRNA 表达趋势呈一致,第 5~11 天,模型组、阳性组、实验组 I/III 型胶原蛋白 mRNA 相对表达量显著低于对照组,模型组最低($P<0.01$),第 5~7 天,实验组 I/III 型胶原蛋白 mRNA 高于阳性组($P<0.01$),第 11 天,实验组 I/III 型胶原蛋白 mRNA 相对表达量低于阳性组($P<0.01$)。

3.2 I/III 型胶原蛋白的比值

各组的 I 型胶原蛋白在修复过程中基本占主体地位, I/III 型胶原蛋白的比值,对照组最高,阳性组最低,模型组的在第 7 天两者比值表达略低于第 5、11 天;实验组的 I/III 型胶原蛋白比值呈逐渐上升趋势。结果见表 3。

各组中,各阶段 I/III 型胶原蛋白的比值,对照组最高,阳性组最低。对照组前 7 天呈上升,而后下

表 1 大鼠创面胶原 I/GAPDH mRNA 光密度比值($n=12, \bar{x}\pm s$)

组别	5 d	7 d	11 d
对照组	0.618 \pm 0.005 ^{###}	0.659 \pm 0.002	0.674 \pm 0.002 ^{###}
模型组	0.284 \pm 0.001 ^{△△###}	0.256 \pm 0.005 ^{△△}	0.258 \pm 0.006 ^{△△###}
阳性组	0.318 \pm 0.007 ^{△△###}	0.318 \pm 0.003 ^{△△###}	0.418 \pm 0.006 ^{△△###}
实验组	0.359 \pm 0.008 ^{△△###**}	0.387 \pm 0.006 ^{△△###**}	0.386 \pm 0.005 ^{△△###**}
<i>F</i> 值	5524	6565	4947

注:与对照组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$;与阳性组比较,** $P<0.01$;组内与第 7 天比较,### $P<0.01$ 。

表 2 大鼠创面胶原 III/GAPDH mRNA 光密度比值($n=12, \bar{x}\pm s$)

组别	5 d	7 d	11 d
对照组	0.415 \pm 0.005 ^{###}	0.410 \pm 0.002	0.426 \pm 0.002 ^{###}
模型组	0.222 \pm 0.005 ^{△△###}	0.252 \pm 0.004 ^{△△}	0.216 \pm 0.005 ^{△△###}
阳性组	0.300 \pm 0.006 ^{△△###}	0.360 \pm 0.006 ^{△△###}	0.395 \pm 0.003 ^{△△###}
实验组	0.388 \pm 0.004 ^{△△###**}	0.390 \pm 0.002 ^{△△###**}	0.378 \pm 0.005 ^{△△###**}
<i>F</i> 值	1105	1373	2062

注:与对照组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$;与阳性组比较,** $P<0.01$;组内与第 7 天比较,### $P<0.01$ 。

降趋势,表明前中期 I 型胶原蛋白占主体,后期稍有下降;模型组第 5 天在修复过程中,两者比值达到最高,第 7 天下降,而后又逐渐上升,表明前期 I 型胶原蛋白占主导,中期比率相对下降,后期 III 型胶原蛋白比率上升;阳性组在修复过程中的前 7 天两者比重相差不大,第 7 天以 III 型胶原为主体;实验组中两者比值呈逐渐上升趋势,表明前中期 III 型胶原的比重较大,而后期相对下降,以 I 型胶原蛋白为主体,见表 3。

表 3 I/III 型胶原蛋白的比值 ($n=12, \bar{x}/\bar{x}$)

组别	5 d	7 d	11 d
对照组	1.49	1.61	1.58
模型组	1.28	1.02	1.19
阳性组	1.06	0.88	1.06
实验组	1.07	1.10	1.24

3.3 PCR 检测 I/III 型胶原蛋白 mRNA 电泳结果

I/III 型胶原蛋白 mRNA 表达电泳结果,第 1~3 泳道是急性创面对照组,第 4~6 泳道是慢性创面模型组,第 7~9 泳道是贝复济阳性组,第 10~12 泳道是美洲大蠊提取液实验组,可反映出 4 组之间 I/III 型胶原蛋白基因条带大小和亮度有一定的差异及趋向性,对照组条带大小及亮度明显高于其余三组;对照组、模型组、阳性组 I/III 型胶原蛋白基因条带第 5、7 天大体一致,第 11 天亮度最高,而实验组呈现一定上升趋势,且第 7 天条带大小及亮度最高,见图 1-3。



图1 GAPDH



图2 I型胶原蛋白电泳图



图3 Ⅲ型胶原蛋白电泳图

注:从左右泳道分别为1~3急性创面对照组;4~6慢性创面模型组;7~9贝复济阳性组;10~12美洲大蠊提取液实验组。

4 讨论

胶原蛋白是一种结构呈三维螺旋状的纤维蛋白质,所形成的螺旋如网状般相互聚合,能坚固地支撑组织结构,使创面富有强韧弹性,占人体蛋白总量的30%,主要分布于皮肤、黏膜等。其在器官的营养、组织修复、细胞分化等方面发挥重要作用,促进成纤维细胞的分化及加快新生血管、基质的形成,进一步激活巨噬细胞的吞噬功能从而提高机体免疫力,显著减少了创面的感染率。此外,胶原蛋白的降解产物—羟基脯氨酸是机体修复细胞所必须的氨基酸,能为创面的修复提供丰富的营养物质^[9],促进肉芽组织生长。而其中I、Ⅲ型胶原在创面修复过程与修复质量中起着至关重要的作用,I型胶原粗大且扩张能力强,Ⅲ型胶原纤细且柔韧性好^[10]。I型胶原占主体,决定组织的高韧性,Ⅲ型胶原包绕于外周,决定组织的柔韧性和弹性,Ⅲ型胶原比I型胶原纤维纤细。I型胶原占胶原总量的80%~85%,Ⅲ型胶原占胶原总量的15%~20%,Ⅲ型胶原含量越高,胶原纤维越细,弹性越好,瘢痕越轻,但胶原过度沉积也是瘢痕愈合形成的直接原因^[11-12]。因此,I、Ⅲ型胶原含量的比值关系决定最终的修复质量。在创面愈合早期,Ⅲ型胶原蛋白对创面的修复发挥着重要的作用,Ⅲ型胶原相对I型胶原相应的比率上升,肉芽组织及早期瘢痕富含Ⅲ型胶原而富有弹性;之后,I型胶原蛋白比例上升并占绝对优势,组织强度增高使瘢痕明显。但若是I、Ⅲ型胶原含量大量增加,明显高于正常皮肤组织,则会造成明显的瘢痕疙瘩。

美洲大蠊提取液,是基于云南大理白族人民使用蜚蠊治疗恶疮的有效经验从蜚蠊药材中分离、精制而成的生物制剂。现代药理研究证明其具有消除炎性水肿、提高机体免疫力、加快坏死组织脱落、促进肉芽组织生长及血管增生等多种作用,从而可加速各类溃疡及慢性难愈合创面的修复进程;而在中医药研究中,美洲大蠊提取物具有通利血脉、散瘀活

血、养阴生肌的作用,包含着中医扶正驱邪相辅相成的治疗法则,其通利、散瘀的成分能有效的祛除局部的瘀血邪毒,疏通经络,通利血脉,达到通则不痛的目的。临床观察上已证实该药物外用可快速激活局部免疫细胞,缩短创面愈合时间^[13-14]。此外,笔者在临床中将美洲大蠊提取物外用于肛管难愈合创面,取得满意疗效^[15]。并在前期实验研究^[7]发现美洲大蠊提取液能提高慢性难愈合创面VEGF的表达,从而加速创面的修复。

本实验显示,第1~7天美洲大蠊提取液加速I、Ⅲ型胶原蛋白mRNA的表达,第7天达到峰值,且I型胶原占主体、Ⅲ型胶原相对比值较大,说明前中期美洲大蠊提取液能促进胶原合成,加速创面愈合;第7~11天,I型胶原蛋白比例稍上升,但总胶原mRNA表达缓慢下降,说明美洲大蠊提取液能进一步促进创面的组织化、且有效降低创面愈合后期胶原含量,从而减少瘢痕形成。

参考文献:

- [1] 杨宗城.中华烧伤医学[M].北京:人民卫生出版社,2008:256.
- [2] 姜玉峰,付小兵.体表慢性难愈合创面的研究进展[J].感染·炎症·修复,2011(1):59-61.
- [3] YOKO T, HIDEFUMI M, HIDEKI S, et al. Expression and effects of epidermal growth factor on human periodontal ligament cell[J]. Cell Tissue Res, 2014(357):633-643.
- [4] WIGHT T N, POTTERPERIGO S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?[J]. American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology, 2011, 301(6):950-955.
- [5] 马慧军,贾赤宇,魏蓉,等.胶原蛋白凝胶促皮肤创面修复的临床研究[J].中国美容医学杂志,2011,20(2):235-236.
- [6] CLAUSE K C, BARKER T H. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(5):830.
- [7] 曾媚妮,刘筱,伍伟明,等.美洲大蠊提取液对大鼠难愈合创面VEGF表达影响的研究[J].中国民族民间医药,2016,25(19):64-66.
- [8] 付小兵,孙同柱,盛志勇.几种用于创伤修复研究的动物模型[J].中华实验外科杂志,1999,16(5):479-480.
- [9] 王晓芹,王贵波,李晓辉.创面敷料及其对愈合的影响研究进展[J].中国临床康复,2002,6(4):574-575.
- [10] 何泽亮.结缔组织生长因子对创面再生和瘢痕愈合中I、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响[D].兰州:兰州大学,2015.
- [11] 郝剑,易成刚,陶谏.中药治疗慢性难愈性创面的研究进展[J].中国美容医学,2005,14(6):775-777.
- [12] 张民福,许春鹏.急性运动创伤中应用碱性成纤维细胞生长因子促伤口愈合的疗效观察[J].福建体育科技,2007,26(4):34-35.
- [13] 李莉,唐文华,徐月芳.康复新液治疗头面部烧伤36例效果观察[J].齐鲁护理杂志,2010,16(23):57-58.
- [14] 魏强,杨运芳.康复新液治疗复发性阿弗他溃疡112例近期疗效观察[J].中国健康月刊·A版,2010:235-236.
- [15] 伍伟明,金丽颖,王真权,等.康复新液治疗肛管难愈合创面的临床研究[J].中医药导报,2015,21(22):71-73.