

本文引用:李艳华,唐智军,夏 锴,余挽澜,殷延陵,曹 卉,王 超,彭裕坤,蒋模威.复方鸡子黄油膏对大鼠创面修复中 EGFR、FN、TGF- β 1 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(12):1449-1452.

复方鸡子黄油膏对大鼠创面修复中 EGFR、FN、TGF- β 1 表达的影响

李艳华¹,唐智军^{1*},夏 锴¹,余挽澜¹,殷延陵¹,曹 卉²,王 超²,彭裕坤²,蒋模威¹

(1.湖南中医药大学附属常德医院,湖南 常德 415000;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕目的 观察复方鸡子黄油膏对大鼠创面修复不同时期创面组织中表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)、纤维结合蛋白(fibronectin, FN)含量及转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)表达的影响。方法 选取雌雄各半实验大鼠 40 只,随机分为空白组、模型组、龙珠软膏组(龙珠组)、复方鸡子黄油膏组(鸡子黄组),除空白组外,每组予以小面积全层皮肤缺损创面造模,造模成功后各组予以相应干预,连续 14 d,除空白组随机取背部皮肤组织外,其他 3 组均分别于第 7、14 天取创面组织制作切片并同时免疫组化测定 EGFR、FN、TGF- β 1。结果 治疗后第 7、14 天鸡子黄组 EGFR、FN、TGF- β 1 含量均高于其他各组($P < 0.05$)。结论 复方鸡子黄油膏通过提高创面 EGFR、FN、TGF- β 1 的含量促进局部组织再生而起修复作用。

〔关键词〕 复方鸡子黄油膏;创面损伤修复;表皮生长因子受体;纤维结合蛋白;转化生长因子 β 1

〔中图分类号〕 R285.5; R641 **〔文献标志码〕** A **〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.12.006

Effects of Compound Jizhuang Ointment on Expression of EGFR, FN and TGF- β 1 in Excisional Wounded Rats

LI Yanhua¹, TANG Zhijun^{1*}, XIA Kai¹, YU Wanlan¹, YIN Yanling¹, CAO Hui², WANG Chao², PENG Yukun², JIANG Mowei¹

(1. Changde Affiliated Hospital to Hunan University of Chinese Medicine, Changde, Hunan 415000, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of Compound Jizhuang Ointment on expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), fibronectin (FN) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the granulation tissue at different stages of a rat model of excisional wound. **Methods** A total of 20 male and 20 female experimental rats were selected and randomly divided into a blank group, a model group, a Longzhu Ointment group (Longzhu group), a Compound Jizhuang Ointment (Jizhuang group). Except the blank group, each group was modeled with a small area full-thickness skin defect wound. After successful modeling, each group was intervened for 14 consecutive days accordingly. For the blank group, the back skin tissue was randomly taken. For the other 3 groups, wound tissue was taken for section at 7 days and 14 days and immunohistochemical method was used to determine EGFR, FN and TGF- β 1. **Results** The expression of EGFR, FN and TGF- β 1 of the Jizhuang group at 7 days and 14 days were significantly higher than other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound Jizhuang Ointment can repair the wound by increasing the content of epidermal growth factor receptor, fibronectin, and transforming growth factor β 1 in the wound surface to promote local tissue regeneration.

〔Keywords〕 Compound Jizhuang Ointment; excisional wound healing; epidermal growth factor receptor; fibronectin; transforming growth factor- β 1

〔收稿日期〕 2019-06-29

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2015JJ6087);湖南省中医药管理局项目(201631)。

〔作者简介〕 李艳华,女,副主任医师,研究方向:中医肛肠。

〔通讯作者〕 *唐智军,男,主任医师,硕士研究生导师, E-mail:937731510@qq.com。

创伤修复是指机体由于外伤或其他原因造成皮肤等组织出现离断或缺损后,局部组织通过再生、重建进行修补恢复的一系列病理生理过程。现代研究表明生长因子参与调控创伤修复的全过程^[1]。我国传统医学对如何促进创面修复有着独特的理解和丰富的临床经验,尤其是在创面的外治上充分发挥着中医药的优势。因此,充分发挥外用中药有效促进创面愈合的特长,探讨生肌理论,具有重要的意义。复方鸡子黄油膏是我院肛肠科传统换药制剂,经临床应用,发现其能减轻创面疼痛、减少创面渗出、促进创面愈合^[2],但其具体作用机制尚不明确。本研究拟通过建立大鼠机械创伤模型,观察复方鸡子黄油膏对大鼠创面修复不同时期局部肉芽组织中表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)、纤维结合蛋白(fibronectin, FN)、转化生长因子 β 1(transf-orming growth factor- β 1,TGF- β 1)含量的影响,从分子水平探讨复方鸡子黄油膏促进创伤修复的部分机制,为该方剂今后的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康SD大鼠,雌雄各半,质量为200~300 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002。

1.2 药品与试剂

复方鸡子黄油膏(由本院制剂室提供,其处方由鸡子黄、麻油、煅石膏、血竭等8味中药组成,并按一定配比、特定方法熬制而成。规格:20 g/盒);龙珠软膏(武汉马应龙股份有限公司规格:15 g/支,批号:170203)。ELISA试剂盒购自江苏晶美生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

JJ-12J脱水机:武汉俊杰电子有限公司;JB-P5包埋机:武汉俊杰电子有限公司;D1008E掌上离心机:谷歌生物;RM2016病理切片机:上海徠卡仪器有限公司;冻台:武汉俊杰电子有限公司。

1.4 造模及干预

1.4.1 动物造模^[3]与分组 雌雄各半实验大鼠40只,

适应性饲养1周后,随机分为4组:空白组(不造模,不予任何药物干预)、模型组(仅造模,不予任何药物干预)、龙珠软膏组(龙珠组)、复方鸡子黄油膏组(鸡子黄组)。除空白组外,所有动物造模前1天,在大鼠的背部,用电剃刀备皮,剃毛面积约为7 cm \times 4 cm。次日,使用10%水合氯醛按0.3 mL/100 g腹腔注射麻醉,麻醉成功后在脱毛处常规消毒,选择背中部脊柱两侧各旁开1 cm,距肩胛骨以下2 cm处制备创面,用创伤制作器切割两个直径约为18 mm圆形创口,深及皮下深筋膜层,形成机械创伤动物模型。

1.4.2 干预 除空白组及模型组外,各组均匀涂相应药膏0.5 mm厚于创面上,再以无菌纱布覆盖,布胶带“#”形固定,每日换药1次,至造模成功后第14天。

1.5 样本的制备

除空白组外,每组动物造模成功后第7天、第14天分别取左侧、右侧背部创面以愈合创面中心为圆点直径18 mm的圆形组织,空白组随机取相应部位同样大小背部皮肤组织,同批4组标本每块组织均匀分成2份,一份制作组织匀浆,另一份用10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片,切片厚5 μ m。

1.6 指标检测

1.6.1 皮肤组织形态学观察 观察各组创面治疗后外观,拍照时相机距离创面约8 cm。

1.6.2 酶联免疫吸附(enzyme-linked immuno sor-bent assay,ELISA)法EGFR、FN、TGF- β 1检测 制作组织匀浆后的样本,采用ELISA法检测EGFR、FN、TGF- β 1浓度,按试剂盒操作步骤进行。

1.6.3 免疫组化法EGFR、FN、TGF- β 1检测 福尔马林固定,石蜡包埋切片后样本进行免疫组化染色程序后封片,显微镜检并图像采集,图像分析EGFR、FN、TGF- β 1信号表达强度。免疫组化结果测定:阳性染色为棕色颗粒,定位于胞浆和/或胞膜。显微镜下进行组织学观察。随机选取10个高倍视野,观察每个视野下的阳性细胞数,计算阳性表达率。

1.7 统计学处理

所有数据采用统计软件SPSS 22.0进行统计分析,计量资料“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,各组数据进行方差齐性检验,符合正态性及方差齐性时用单因素方差分析的

方法,多组之间的比较采用 *Dunnett's* 检验进行组间的两两比较,方差不齐时采用校正 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 造模成功动物数量

实验共使用 SD 大鼠 40 只,实验过程中动物无死亡,实验样本全部纳入结果分析。

2.2 皮肤组织形态学观察

大体观察见鸡子黄组大鼠创面基本愈合,龙珠组大鼠创面缩小,模型组大鼠创面愈合缓慢。见图 1。

2.3 各组大鼠创面组织中不同时相点 EGFR、FN、TGF- β 1 的表达情况

2.3.1 ELISA 法分析 除空白组外,各组创面组织中 EGFR、FN、TGF- β 1 表达均逐渐上升,组内比较,第 14 天均高于第 7 天($P < 0.05$);模型组高于空白组($P < 0.05$);龙珠组、鸡子黄高于模型组($P < 0.05$),鸡子黄组高于龙珠组($P < 0.05$)。见表 1。

2.3.2 免疫组化法分析 免疫组织化学染色阳性区域表现为棕黄色或棕褐色沉淀,在第 7、14 天,各组创面组织中 EGFR、FN、TGF- β 1 表达水平:鸡子黄组>龙珠组>模型组>空白组。见图 2-4。

3 讨论

由于致伤物机械力的作用而使人体产生的器官组织结构的破坏和(或)功能障碍称为机械性损伤,机械性损伤最常见于皮肤,皮肤损伤后,创面愈合慢,可能导致感染,甚至癌变,因此,加速创面愈合不仅可以减少感染机会,而且可以减少患者痛苦。

EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一,在细胞生理过程中发挥重要的调节作用。目前有实验研究表明皮肤愈合过程中表皮生长因子(epidermal-growthfactor, EGF)对上皮细胞生长起主导作用,对创

面愈合中后期的再上皮化有着特殊效果,同时还可促进成纤维细胞的非胶原性蛋白合成,选择性抑制 I 型胶原产生,促进伤口愈合^[4-7]。

FN 具有特别的分子结构,对胶原、肌动蛋白、纤维和其它分子有很高的亲合能力,它不仅可以协助网状内皮系统清除异物,而且可以在创口愈合中与胶原和纤维连接而决定伤口的关闭和(或)愈合^[8]。FN 具有粘性吸附的作用,可以包裹部分细菌及组织碎片并由巨噬细胞消化,加速机体清除伤口内异物,还可以作为移行细胞接触的临时基质,另外,FN 先于胶原物质沉积于伤口并使伤口收缩,成为明胶基质的骨架,加速伤口愈合。

TGF- β 1 作为转化生长因子中的一员,在创面修复中起重要作用。它作为成纤维细胞最强的趋化因子,在促进成纤维细胞增殖、迁徙、分化中起重要作用,TGF- β 1 趋化成纤维细胞向基底迁徙增殖,促进成纤维细胞分泌胶原蛋白及纤维连接蛋白形成临时的细胞外基质(extracellularmatrix, ECM),从而促进肉芽组织形成^[9]。TGF- β 1 趋化上皮细胞分裂增殖,增加角化细胞的运动性,利于完整上皮覆盖及胶质沉积^[10]。同时,可促进血管内皮生长因子、血小板源性生长因子等作用的发挥,从而间接促进新生血管形成^[11]。

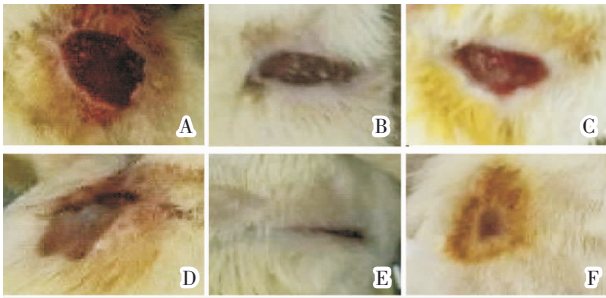
研究结果显示,经龙珠软膏及复方鸡子黄油膏涂搽治疗 14 d 的机械创伤大鼠其创面近愈合,而模型组创面愈合差,与模型组及空白组比较,龙珠软膏组及复方鸡子黄油膏组创面组织中 EGFR、FN、TGF- β 1 表达均增加,而复方鸡子黄油膏组增加更为明显。

复方鸡子黄油膏是湖南中医药大学附属常德医院肛肠科传统换药制剂,通过本次实验结果可以证实,复方鸡子黄油膏可以提高创面 EGFR 含量,从而

表 1 各组大鼠创面组织中不同时相点 EGFR、FN、TGF- β 1 表达的比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL, $n=10$)

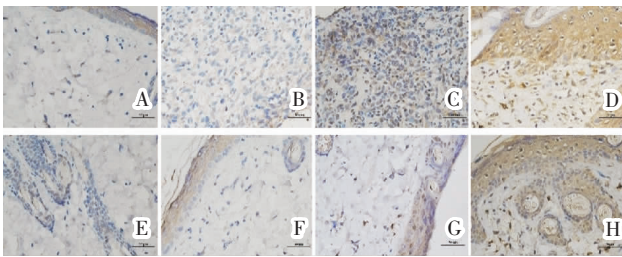
组别	7 d			14 d		
	EGFR	FN	TGF- β 1	EGFR	FN	TGF- β 1
空白组	971.54 \pm 81.32	894.02 \pm 70.63	155.46 \pm 20.75	958.27 \pm 67.69	890.00 \pm 75.56	155.36 \pm 17.20
模型组	1 366.27 \pm 124.57 Δ	1065.70 \pm 106.50 Δ	217.67 \pm 14.42 Δ	1512.45 \pm 128.91	1 248.56 \pm 90.45 Δ	239.37 \pm 14.47
龙珠组	1 727.65 \pm 88.42 ∇	1424.79 \pm 107.47 ∇	267.96 \pm 11.13 ∇	2037.56 \pm 61.61 ∇ *	1 751.40 \pm 102.60 ∇ *	309.54 \pm 14.476 ∇ *
鸡子黄组	1 914.52 \pm 75.49 $\#$	1585.04 \pm 83.17 ∇ $\#$	287.76 \pm 9.78 ∇ $\#$	2256.15 \pm 159.84 ∇ $\#$ *	1 908.65 \pm 58.54 ∇ $\#$ *	336.03 \pm 11.21 ∇ $\#$ *

注:组内与 7 d 相比,* $P < 0.05$;与空白组相比, $\Delta P < 0.05$;与模型组相比, $\nabla P < 0.05$;与龙珠组相比, $\#P < 0.05$



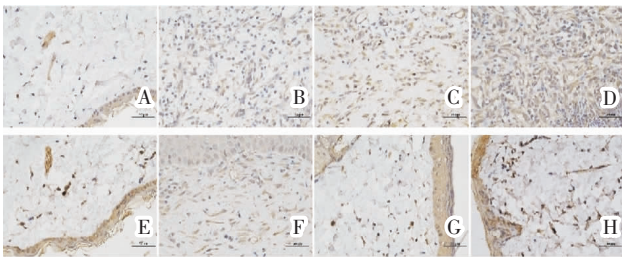
注:A、B、C和D、E、F分别为第7天及第14天模型组、龙珠组、鸡子黄组

图1 各组创面治疗后外观照片



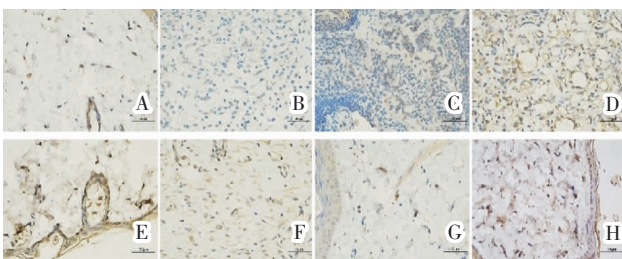
注:A、B、C、D和E、F、G、H分别为第7天及第14天空白组、模型组、龙珠组、鸡子黄组

图2 各组创面及空白组相应部位组织中EGFR表达显微图(免疫组化,×400)



注:A、B、C、D和E、F、G、H分别为第7天及第14天空白组、模型组、龙珠组、鸡子黄组

图3 各组创面及空白组相应部位组织中FN表达显微图(免疫组化,×400)



注:A、B、C、D和E、F、G、H分别为第7天及第14天空白组、模型组、龙珠组、鸡子黄组

图4 各组创面及空白组相应部位组织中TGF-β1表达显微图(免疫组化,×400)

增加其与EGF的结合,促进非胶原性蛋白合成。复方鸡子黄油膏同时提高FN和TGF-β1的表达,利

用FN的粘附特性构建基质骨架,促进成纤维细胞增殖分化,形成肉芽组织,促进伤口愈合。但是,EGFR、FN、TGF-β1只是众多复杂信号通路中的一部分,且本研究在大鼠创面愈合的整个过程中仅选择了2个时相点进行标本采集和检测,不能完全阐述完整的创面愈合过程,且未行HE染色,因此,有关复方鸡子黄油膏促愈的具体作用机制,仍需从完整的信号通路及病理等方面进一步研究探讨。

参考文献

- [1] YOUNG A, MCNAUGHT C E. The physiology of wound healing[J]. Surgery (Oxford), 2011, 29(10): 475-479.
- [2] 唐智军, 刘 淳, 孔祥建, 等. 复方蛋黄油膏对低位单纯性肛瘘术后创面愈合影响的临床研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(10): 12-14, 23.
- [3] 赵京禹, 付小兵, 雷永红. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备[J]. 创伤、炎症、修复, 2008, 9(1): 64.
- [4] 罗肇林, 梁自乾. 表皮生长因子受体在糖尿病性创面修复中的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(5): 721-723.
- [5] BEMIER J, BONNER J, VERMORKEN J B, et al. Consensus guidelines for the management of radiation dermatitis and coexisting acne-like rash in patients receiving radiotherapy plus EGFR inhibitors for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Annals of Oncology, 2008, 19(1): 142-149.
- [6] WOLLENBERG A, KROTH J, HAUSCHILD A. Cutaneous side effects of EGFR inhibitors - appearance and management. [J]. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2010, 135(4): 149-154.
- [7] THULA T T, SCHULTZ G, TRAN-SON-TAY R, et al. Effects of EGF and bFGF on Irradiated Parotid Glands [J]. Annals of Biomedical Engineering, 2005, 33(5): 685-695.
- [8] 肖 赫, 李雅嘉, 王 华, 等. 纤维连接蛋白在糖尿病足溃疡中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2017, 11(37): 5474-5475.
- [9] DEMIDOVA-RICE T N, HAMBLIN M R, HERMAN I M. Acute and Impaired Wound Healing[J]. Advances in Skin & Wound Care, 2012, 25(7): 304-314.
- [10] 王少霞, 任俊辉, 杨蕾蕾, 等. 皮肤创伤修复过程中TGF-β1及胶原表达变化的定量研究[J]. 中国体视学与图像分析, 2015, 20(1): 58-67.
- [11] 武 姗. 转化生长因子β及其受体在糖尿病足创面愈合过程中作用机制的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(6): 569-572.