

本文引用:周 畅,陈 丽,胡晋婷,王霄霜,杨丁丁,王婷婷,高岚天,周忠志,陈 聪.复方 ANBP 对小鼠皮肤移植创面愈合的疗效观察[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):546-549.

复方 ANBP 对小鼠皮肤移植创面愈合的疗效观察

周 畅¹,陈 丽¹,胡晋婷¹,王霄霜¹,杨丁丁¹,王婷婷¹,高岚天¹,周忠志^{2*},陈 聪^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

〔摘要〕目的 观察复方ANBP[由仙鹤草(*Agrimonia eupatoria*, A),藕节(*Nelumbo nucifera Gaertn*, N),乳香(*Boswellia carteri*, B)和蒲黄(*Pollen Typhae*, P)组成]对皮肤移植创面愈合的促进作用。**方法** 选用40只雌性C57BL/6小鼠,制成背部直径1.2 cm圆形全层皮肤缺损小鼠模型,后进行自体原位皮肤移植术,随机分为对照组和实验组,实验组给予复方ANBP粉末敷于皮肤移植区,对照组不予处理。通过肉眼、HE染色观察比较两组皮肤移植区14 d及21 d时皮肤愈合情况,计算创面愈合率并进行统计学分析。**结果** (1)皮肤移植14 d、21 d后,实验组小鼠创面愈合率高于对照组($P<0.05$)。(2)HE染色结果:皮肤移植14 d,实验组较对照组皮肤移植交界处平坦、表皮浅且连接紧密;皮肤移植区表皮层变薄、新生毛囊数量较多且发育良好。皮肤移植21 d,实验组较对照组皮肤移植交界处皮下组织紧密呈更强的收缩感;皮肤移植区毛囊更成熟、发育趋于完善,出现了明显的毛干、皮脂腺等皮肤附属器。**结论** 复方ANBP能够加快皮肤移植区与周围皮肤衔接,加速皮肤移植愈合,促进皮肤附属器发育及皮肤塑形,提高愈合质量。

〔关键词〕 中药复方;皮肤移植;创面愈合

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.05.007

Therapeutic Effects of Compound ANBP on Wound Healing in Mouse Skin Grafts

ZHOU Chang¹, CHEN Li¹, HU Jinting¹, WANG Xiaoshuang¹, YANG Dingding¹, WANG Tingting¹,

GAO Lantian¹, ZHOU Zhongzhi^{2*}, CHEN Cong^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the improvement of compound ANBP [(*Agrimonia eupatoria*, A), (*Nelumbo nucifera Gaertn*, N), (*Boswellia carteri*, B), (*Pollen Typhae*, P)] for the wound healing of skin grafting. **Methods** Forty female C57BL/6 mice were used to create a 1.2 cm round full-thickness skin defect wound on the back of each mouse. Autologous skin transplantation was performed and randomly divided into a control group and an experimental group. The experimental group was given compound ANBP powder applied to the skin grafting area and the control group was not treated. The skin tissue healing of the 2 groups of skin grafting at 14 d and 21 d was observed and compared by naked eye and HE staining, and the wound healing rate was calculated and statistical analysis was performed. **Results** (1) After 14 d and 21 d of skin grafting, the wound healing rate of the experimental group was higher than the control group ($P<0.05$). (2) HE staining results showed that at 14 d of skin grafting, the experimental group had a flat skin at the junction of the skin graft, and the epidermis was shallow and tightly connected; the epidermal layer of the skin graft area became thinner, and the number of new hair follicles was larger and the development was good. At 21 d of skin grafting, the experimental group had a stronger contraction of the subcutaneous tissue at the skin graft junction than the control group; the hair follicle in the skin graft area was more mature and developed, and there was

〔收稿日期〕2020-01-22

〔基金项目〕国家自然科学基金(8197152223);湖南省教育厅科研项目(18A207);湖南省长沙市科技局项目(kq1801047);国家级大学生创新创业训练计划项目(201710541003);湖南中医药大学中西医结合学科中西医结合一级学科研究生开放基金项目(2018ZXYJH33,2018ZXYJH37)。

〔作者简介〕周 畅,男,在读本科生,研究方向:中医中药药作用研究。

〔通讯作者〕* 周忠志,男,主任医师,E-mail:3z_cl@163.com;陈 聪,女,副教授,E-mail:50634383@qq.com。

obvious hair shaft structure and sebaceous gland. **Conclusion** Compound ANBP can accelerate the connection between the skin graft area and the surrounding skin, accelerate the healing of skin grafts, promote the development of skin appendages and skin shaping, and improve the quality of healing.

[**Keywords**] Chinese compound formula; skin grating; wound healing

皮肤移植术是一种广泛应用于临床的有效治疗手段,但如何提高植皮后创面愈合率仍需进一步探索^[1-2]。目前,多种细胞生长因子、负压引流技术、干细胞疗法均被应用于提高皮肤移植创面愈合率,促进创面愈合^[3-6]。但是,从中医药角度出发,将具有综合作用的中药应用于皮肤移植创面仍然比较少见。中药 ANBP 是由仙鹤草(*Agrimonia eupatoria*, A), 藕节(*Nelumbo nucifera Gaertn*, N), 乳香(*Boswellia carteri*, B)和蒲黄(*Pollen Typhae*, P)4 味中药组成的复方制剂,是本课题组治疗创伤的经典中药方,中医认为其具有收敛止血、活血祛瘀、消肿生肌的功效,前期研究已证实^[7-8]:复方 ANBP 在兔耳增生性瘢痕模型和小鼠背部皮层缺损模型中有促愈抑疤作用,但其能否促进皮肤移植创面愈合尚不清楚。本课题组通过观察不同组别小鼠皮肤移植 14 d、21 d 时创面愈合情况,将两组创面愈合率进行统计学分析,探究复方 ANBP 对皮肤移植创面愈合的影响,为其运用于皮肤移植治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

选用 40 只成年雌性 C57BL/6 小鼠(4~6 周、18~22 g),由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验期间动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院(许可证号:SYXK 湘 2015-0003)SPF 级实验室,温度维持在 20~22 ℃。所有的小鼠饲养及操作均遵循国家卫生研究院关于实验室动物伦理准则和使用指南。

1.2 主要药物、试剂与仪器

复方 ANBP 由湖南中医药大学第一附属医院制剂室按照本课题组已有方法制备^[7]。水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,250 g/瓶;批号 Q/12HB 4218-2009);4%多聚甲醛(长沙市开福区灏扬生物试剂经营部,500 mL/瓶;批号 AR1068);切片机(厂家:LEICA;型号:RM2235);摊片机(厂家:LEICA;型号:HI1210)。

1.3 造模与分组

完成小鼠适应性喂养 3 d 后,以 3.5 mL/kg 的剂量腹腔注射 10%水合氯醛麻醉小鼠,于小鼠背部

正中剃毛形成 1 个 4 cm×4 cm 正方形裸皮区域,用络合碘与酒精消毒处理后在小鼠背部正中用打孔器创设 1 个直径为 1.2 cm 的圆形全层皮肤缺损区域,将取下来的皮片放入准备好的生理盐水中浸润以保持活力。尽可能清除背部创口区肌肉上层无血运的深筋膜,促进创面血液循环。取出浸泡于生理盐水中的皮片,去除皮下脂肪、筋膜、血管等皮下组织,直至皮片尽可能仅包含表皮层呈半透明状态,将其覆盖于创口处。随后开始植皮,用 4-0 的无菌缝合线、人用皮肤移植三角针进行缝合,边缘缝 6~8 针。将造模成功小鼠随机分为对照组($n=20$)和实验组($n=20$),将复方 ANBP 粉末均匀敷于实验组植皮区域,对照组不予处理。最后对移植区采用无菌纱布条加压包扎,于 10 d 拆包。观察到皮片成活则视为造模成功。术后分笼饲养,实验过程中实验组有 1 例由于麻醉不耐受死亡,对照组中有 2 例由于皮片感染未能成活,均视为造模失败停止后续观察。

1.4 肉眼和 HE 染色观察创面组织变化

肉眼观察并拍照记录皮肤移植区皮片存活状态。计算皮肤移植区创面愈合率,创面面积使用 Image Pro Plus 软件测量。

创面愈合率=(原始创面面积-测量时创面面积)/原始创面面积×100%

分别于皮肤移植 14 d、21 d 采用 10%的水合氯醛麻醉,在小鼠背部切取以皮肤移植区为中心、深至肌层的 2 cm×2 cm 标本,用 4%多聚甲醛固定,常温保存,分别从两组 14 d、21 d 不同时间点选取 6 份标本,送至湖南中医药大学医学院实验室,制成切片,行 HE 染色,观察两组皮肤移植区皮肤显微结构形态和创面组织变化。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析,两个样本间的比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 复方 ANBP 对皮肤移植创面愈合影响的肉眼观察

对照组:皮肤移植 14 d,皮片部分红肿,坏死组

织面积大呈黄黑色,皮片下渗出物多,且与周围正常皮肤界限明显。皮肤移植 21 d,创面基本愈合,但被毛稀疏,毛发颜色暗沉无光泽。与对照组相比,实验组皮肤移植 14 d,皮片坏死面积明显小于对照组,皮片下基本无渗出物且与周围正常皮肤颜色一致;皮肤移植 21 d,创面完全愈合,被毛丰富浓密,颜色黑亮。见图 1。

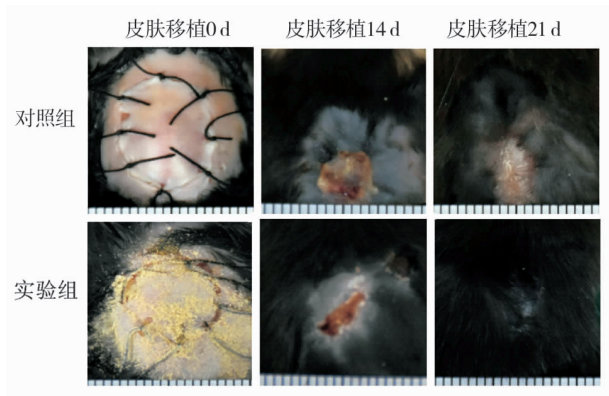


图 1 复方 ANBP 对皮肤移植创面愈合影响的肉眼观察

2.2 复方 ANBP 对皮肤移植创面愈合率的影响

两组皮肤移植术后 14 d、21 d 创面愈合率差异均具有统计学意义且实验组明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 小鼠皮肤移植术后 14 d、21 d 创面愈合率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

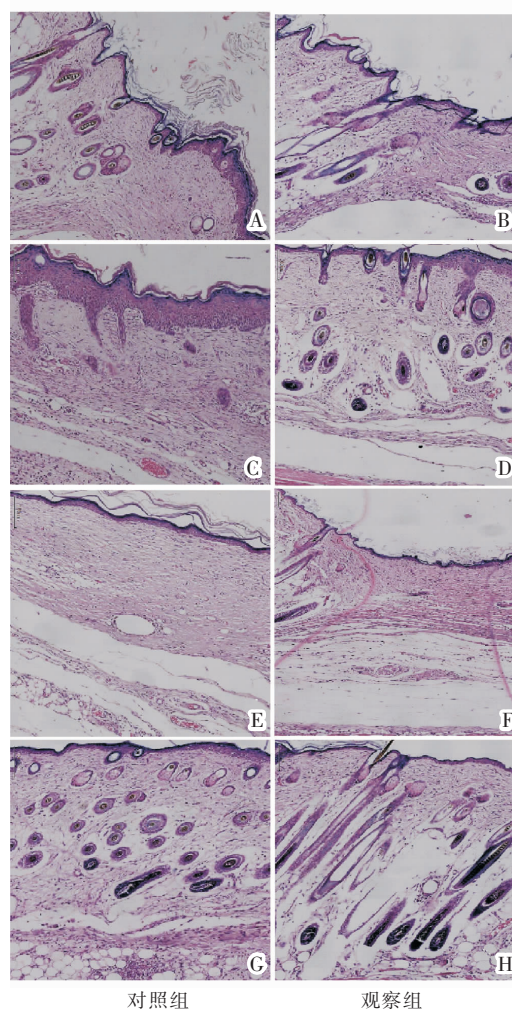
组别	n	14 d	21 d
对照组	6	81.8±1.1	89.5±1.5
实验组	6	91.2±1.3*	97.6±0.8*

注:与对照组相比,* $P < 0.05$

2.3 HE 染色观察皮肤移植区创面组织变化

皮肤移植 14 d,对照组皮肤移植交界处表皮嵴深浅不一、连接不平坦,皮肤移植区表皮颗粒层增厚,存在伸入真皮乳头层的钉突,真皮层结构紊乱,胶原纤维走向杂乱,可见充血毛细血管,均匀分布大量炎症细胞,新生毛囊较少,深筋膜结缔组织排列疏松。实验组皮肤移植交界处表皮嵴深度均匀而平坦,真皮层胶原纤维排列有序,结构清晰,炎症细胞在真皮层散在分布,可见较多发育良好的新生毛囊,真皮浅层可见少量皮脂腺,深筋膜结缔组织排列紧密,皮肤结构层次更清晰(见图 2A-2D)。

皮肤移植 21 d,对照组皮肤移植交界处胶原过度沉积,真皮组织厚而松散,皮肤移植区真皮层毛囊多但毛球发育幼稚。与对照组相比,实验组皮肤移植交界处胶原排列紧密规则,真皮层有明显的张力收缩感,皮肤移植区可见大量发育成熟毛囊、皮脂腺等皮肤附属器官较多(见图 2E-2H)。



注:A、B 和 E、F 分别为 14 d、21 d 的皮肤移植交界处;C、D 和 G、H 分别为 14 d、21 d 皮肤移植区

图 2 皮肤移植后组织 HE 染色结果($\times 40$)

3 讨论

皮肤移植术是目前临床治疗各种创面的有效手段,保证移植皮片的存活即提高皮肤移植愈合率是手术成功的关键。近年来,多种创新型皮肤移植技术如 Meek、微粒皮肤移植技术的出现以及多种临床广泛使用于创伤治疗的技术与疗法如生长因子、负压引流技术等也被广泛地应用于皮肤移植的辅助治疗中。然而,皮肤移植愈合过程是受多种因素影响的,不同细胞、基质及细胞因子参与的复杂过程^[9-12]。本课题组前期研究基础证实复方 ANBP 应用于临床创伤愈合具有一定的疗效,但其对于皮肤移植创面的影响尚不清楚。本实验肉眼观察到与对照组相比,实验组皮肤移植 14 d,皮片红肿、坏死面积小,皮片下渗出物少,且与周围正常皮肤衔接更好,皮片存活状态较好;皮肤移植 21 d,实验组创面基本愈合,皮肤平整,质软且被毛丰富浓密,颜色黑亮。皮肤移植

14 d、21 d 实验组皮肤移植愈合率均高于对照组,以上结果提示:复方 ANBP 可以促进小鼠皮肤移植愈合。

HE 结果显示:与对照组相比,实验组皮肤移植 14 d,实验组皮肤移植交界处更加平坦连接紧密,皮肤移植区表皮层变薄趋于正常皮肤组织且出现较多新生毛囊,提示复方 ANBP 有利于皮肤移植皮片与周围皮肤衔接,加速皮肤移植愈合。皮肤移植 21 d,实验组皮肤移植交界处皮肤结构紧密,皮层变薄,有收缩趋势,皮肤移植区大量毛囊发育成熟、形成皮脂腺、立毛肌等皮肤附属器官,胶原排列疏松有序,表明复方 ANBP 利于皮肤移植皮肤结构趋于成熟、功能逐渐完善,提高愈合质量。此外,我们推测复方 ANBP 在皮肤移植愈合后期可能具有促进创面收缩、降低纤维化的作用,这种作用应用于人体创伤面修复过程中可能具有抑制瘢痕的效果。

总之,本实验通过建立小鼠背部全层皮肤原位自体移植模型,观察比较创面愈合情况,运用复方 ANBP 加速皮肤移植皮片与周围皮肤的衔接、促进毛囊等皮肤附属器的发育和成熟,提高愈合质量,但复方 ANBP 对小鼠皮肤移植创面愈合的治疗机制有待进一步验证。

参考文献

- [1] 罗高兴,袁志强,彭毅志,等.中国烧伤患者住院收治标准(2018版)[J].中华烧伤杂志,2018,34(11):759-760.
- [2] 黄跃生,肖光夏,汪仕良,等.我国烧伤医学 60 年回顾与展望[J].中华烧伤杂志,2018,34(7):437-441.
- [3] 李东杰,邓虎平,孙天骏,等.负压封闭引流技术在烧伤患儿颈部及躯干创面植皮术中的应用[J].中华烧伤杂志,2017,33(1):43-45.
- [4] 梁大宁,熊 力.下肢慢性溃疡创面植皮术后应用重组人表皮生长因子灌洗联合封闭负压引流技术的临床效果研究[J].中国医师杂志,2016,18(11):1725-1728.
- [5] 江碧川,高 优,张新合,等.慢性溃疡创面植皮术后应用重组人表皮生长因子灌洗联合封闭负压引流技术的临床效果[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2015,10(4):34-37.
- [6] 王 娟.脂肪间充质干细胞对皮肤移植成活过程的影响[D].2016.
- [7] HOU Q, HE W J, HA O H J, et al. The four-herb chinese medicine ANBP enhances wound healing and inhibits scar formation via bidirectional regulation of transformation growth factor pathway[J]. PLoS ONE, 2014,9(12):e112274.
- [8] HOU Q, HE W J, CHEN L, et al. Effects of the four herb compounds ANBP on wound healing promotion in diabetic mice[J]. The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2015,14(4):200-205.
- [9] 李建武,薛宏斌,高栋梁,等.多种细胞生长因子联合应用对烧伤创面愈合的影响[J].中国现代医药杂志,2016,18(1):17-20.
- [10] 廖米荣,王慧利,郭正祥.纳米银敷料联合重组牛碱性成纤维细胞生长因子对深Ⅱ度烧伤创面炎症因子及 EGF、VEGF 表达的影响[J].中国现代医生,2018,56(30):89-92.
- [11] 郭小伟,张家平,黄跃生.表皮细胞迁移与创面愈合[J].中华损伤与修复杂志,2016,11(3):186-190.
- [12] 张文恺,许 超,姜 献,等.中药在创面愈合中促创面生长因子表达的研究进展[J].中国中医药现代远程教育,2018,16(19):148-150.

(本文编辑 苏 维)