

新型复合敷料促进大鼠Ⅱ°烧伤创面 再上皮化的疗效研究

李百川 曹松申 李红丽

摘要 目的 研制一种兼顾抗炎和促进表皮快速再上皮化的新型复合型敷料,并观察其在Ⅱ°烧伤创面中的疗效。**方法** 建立创面损伤模型,将样本随机分成正常、损伤和治疗3个组。治疗组创面在伤后即给予敷料处理。分别于伤后1、3、7、14天测量各组各时期创面的面积,计算创面愈合率。取各组创面皮肤组织,比较各组皮肤组织内总Ca²⁺浓度及活性氧的差异,并用放射免疫法检测TNF-α、IL-1β及IL-6分泌情况。**结果** 新型复合型敷料明显缩短创面愈合时间,由损伤组29.46±4.38天缩短为25.39±3.12天($P<0.05$)。并于伤后14天促进创面皮岛形成,增加愈合率($P<0.05$)。复合型敷料能有效降低损伤后创面组织Ca²⁺浓度,降低炎性因子和ROS水平,两组各时期各指标比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 新型复合敷料可有效加快表皮再上皮化修复,并阻断伤后胞内钙离子浓度升高,减少炎性因子释放,抑制氧化应激反应,为皮肤创面修复提供新的治疗方式。

关键词 复合型敷料 钙离子浓度 再上皮化 创面愈合

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.027

Research of the Curative Effect about New Compound Dressing in Promoting Epithelial Repaired of II° Burned Wound in Rats.

Li Baichuan, Cao Songshen, Li Hongli. Department of Histology and Embryology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract Objective To develop a new compound dressing which can both anti-inflammation and promote skin quickly epithelial repairing, and then study the curative effect. **Methods** First, the wound injury model was established. The samples were randomly divided into normal, injury and treatment group which were treated with dressing after injury. Next, the wound skin tissues were taken in injured after 1 days, 3 days, 7 days and 14 days. Then, each area of the wound was measured and the wound healing rate were calculated. Total Ca²⁺ concentration and the difference of active oxygen in skin tissue between each groups were compared. The secretion of TNF-α, IL-1 and IL-6 were detected by RIA method as follow. **Results** The new compound dressing can effectively shorten healing time, which is 25.39±3.12days (the treatment group) comparing with 29.46±4.38days (the injury group) ($P<0.05$). And it promotes the formation of skin island in 14days and increase the healing rate ($P<0.05$). Besides, the new compound dressing can effectively reduce the total Ca²⁺ concentration, lower the level of the inflammation factors and the ROS after injury, the results of each period of two groups were significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** New compound dressings can effectively promote skin epithelial repairing, block intra-cellular calcium ion channels, reduce the release of inflammation factors and inhibit the reaction of oxidative stress, which provide a new treatment for wound repair.

Key words Compound dressing; Calcium antagonist; Epithelial; Wound healing

创面覆盖物对促进创面愈合具有积极作用,不仅能维持内环境稳定,避免因频繁纱布换药引起的二次感染,也可以使残存上皮再生,加速创面愈合^[1,2]。目前常用的创面覆盖物有很多,比如生物合成材料、

动物性材料等,而银离子敷料是其中运用较广的一种创面覆盖物,具有抗菌谱广、无毒、抗菌持久的优点,能有效控制感染^[3]。但单独在创面处应用银离子敷料,无法解决组织修复细胞活性低、表皮再上皮化能力差的问题^[4]。

近年来大量研究表明,表皮再生能力下降,尤其是表皮干细胞增殖、迁移、分化障碍,是导致创面愈合难的重要因素之一^[5-7]。影响表皮干细胞增殖、迁移的因素有很多,比如SDF-1、整合素、P物质、基质蛋白等,其中Ca²⁺作为胞内重要的第2信使,在调节细

作者单位:400038 重庆,第三军医大学组织学与胚胎学教研室(李百川、曹松申、李红丽);350003 福州,中国人民解放军61716部队门诊部(李百川);830075 乌鲁木齐,中国人民解放军93968部队医院(曹松申)

通讯作者:李红丽,教授,博士生导师,电子信箱:lihongli@tmmu.edu.cn

胞活动及功能中发挥着重要作用^[8]。Bikle 等^[9]研究发现,当皮肤急性损伤时,表皮 Ca^{2+} 浓度梯度发生异常,出现胞内钙超载,炎性反应加重,导致表皮屏障功能障碍,进而影响表皮干细胞的迁移分化,甚至诱导细胞凋亡。因此,降低胞内钙离子浓度对减轻炎性反应、恢复表皮功能具有积极作用。Ryanodine 是一种钙离子通道受体阻滞剂,研究发现,早期在损伤组织处运用 Ryanodine,能有效降低胞内 Ca^{2+} 浓度,减轻炎性反应,改善预后^[10~12]。

因此,本研究研制了一种以银离子敷料为基础,联合钙通道受体阻滞剂 Ryanodine 和表皮生长因子 EGF 的复合型敷料,以求达到既能抗菌抗感染,又能降低胞内 Ca^{2+} 浓度、控制炎性反应、提高 ESCs 活力,从而促进表皮再上皮化的目的。并在 Wistar 雄性成年大鼠中进行实验证实,为后续研发敷料提供依据。

材料与方法

1. 动物及分组:(1)实验动物:清洁级健康 Wistar 雄性成年大鼠 45 只,体重 176.2~233.9g,平均体重 $213.4 \pm 26.7\text{ g}$,由第三军医大学实验动物中心提供,同期培养。(2)实验分组:取 40 只大鼠,随机分为损伤组与治疗组,每组 20 只。另取 5 只大鼠常规饲养,作为对照组。各组大鼠体重相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

2. 模型建立:禁食,消毒皮肤,背部净毛,2% 利多卡因腹腔内注射麻醉,再将底径 2cm 的缺底圆形塑料杯紧贴背部皮肤,用 100℃ 开水烧灼 15s,形成一个圆形创面。损伤后 6h,将配置的药物均匀涂抹在治疗组创面皮肤处,再覆以银离子敷料(Fire - Maple 公司)。损伤组每日常规换药 1 次,直至创面愈合。损伤组模型与治疗组模型见图 1、图 2。



图 1 损伤组模型

3. 取材:分别于损伤后 1、3、7、14 天,取损伤组与治疗组创面边缘组织(约 $1.0\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$),及同期正常组皮肤组织,置于 PBS 缓冲液中冰冻保存。将各



图 2 治疗组模型

时期皮肤组织匀浆,离心取上清液,置于干燥管内。与此同时,在无菌条件下取各时相各组大鼠的静脉血,置于干燥管内,离心取上层血清于 -70°C 低温冰箱内保存。

4. 实验方法:(1)创面愈合率的检测:用面积测量法:测量各组各时期创面面积,计算创面愈合率,即($\text{治疗前残余创面总面积} - \text{换药时未愈创面面积}$)/ $\text{治疗前残余创面总面积} \times 100\%$ 。并记录创面形成至愈合的时间(天)。(2)总 Ca^{2+} 浓度的检测:用荧光法:选择组织钙离子浓度荧光定量检测试剂盒(上海语燕生物技术有限公司),按照步骤依次加入清理液(Reagent A)、裂解液(Reagent B),离心后,取上清液。利用荧光酶标仪(22°C)激发波长 485nm,散发波长 520nm,根据获得的相对荧光单位,计算样品 Ca^{2+} 浓度^[13]。(3)ROS 值测定:利用活性氧检测试剂盒:将 PBS 液保存的各时期皮肤组织,匀浆后离心,取上清液,置于干燥管内。选择 S0033 活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),损伤组与治疗组加入 DCFH - DA 作为荧光探针,对照组加入活性氧阳性对照试剂 Rosup。利用分光光度计(722s 型,上海精密科学仪器有限公司),激发波长 520nm,测定损伤后各组 ROS 的生成。(4)炎性因子测定:用放射免疫法:将低温保存的大鼠血清,利用放射免疫法测定其 TNF - α 、IL - 1 β 及 IL - 6 浓度(pg/L)。试剂盒由美国 DPC 公司提供。

5. 统计学方法:选择 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行分析,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,计量资料比较采用 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 损伤组与治疗组创面愈合情况比较:(1)复合型敷料缩短创面愈合时间:创面处皮肤脱落至皮肤完全再上皮化愈合完成时间相比,治疗组明显少于损伤

组,治疗组为 25.39 ± 3.12 天,损伤组为 29.46 ± 4.38 天,差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。(2)复合型敷料能有效促进皮岛形成:图4A为损伤1天后损伤组情况,图4B为损伤1天后治疗组情况。经比较可以发现,大体上已能初步发现治疗组的优势,治疗组水疱隆起程度降低,边界开始不清。图4C为损伤3天后损伤组情况,图4D为损伤3天后治疗组情况。对比可以发现,大体上发现治疗组比损伤组愈合效果更佳,治疗组损伤组织表面明显较平整,充血缓解,损伤面积开始变小。图4E为损伤14天后损伤组情况,图4F为损伤14天后治疗组情况。对比可以发现,两组损伤处坏死皮肤均已脱落,肉眼可见溃疡形成,但治疗组溃疡上有皮岛形成。(3)复合型敷料增加创面愈合率:损伤2天后创面处受损表皮已开始脱落,其后进入修复阶段。损伤1天时,损伤组创面愈合率为 $1.38\% \pm 0.65\%$ 、治疗组为 $2.89\% \pm 0.97\%$;损伤

7天时,损伤组创面愈合率为 $13.30\% \pm 5.46\%$ 、治疗组为 $41.91\% \pm 9.58\%$;损伤14天时,损伤组 $20.21\% \pm 5.28\%$,治疗组 $54.03\% \pm 8.25\%$,各时期两组结果比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图5。复合敷料组创面愈合情况均优于损伤组。

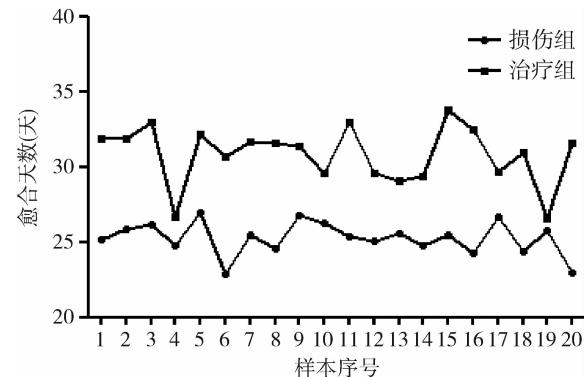


图3 损伤组与治疗组创面愈合时间比较

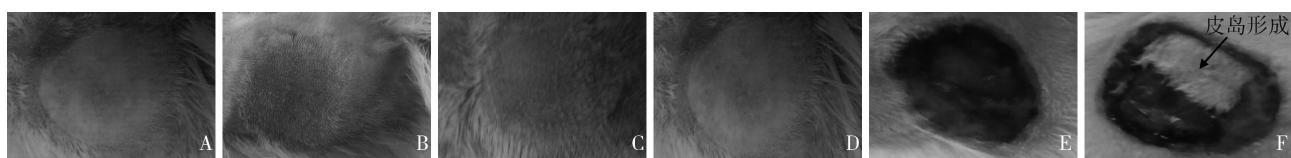


图4 损伤组与治疗组创面愈合情况

A. 1天后损伤组;B. 1天后治疗组;C. 3天后损伤组;D. 3天后治疗组;E. 14天后损伤组;F. 14天后治疗组

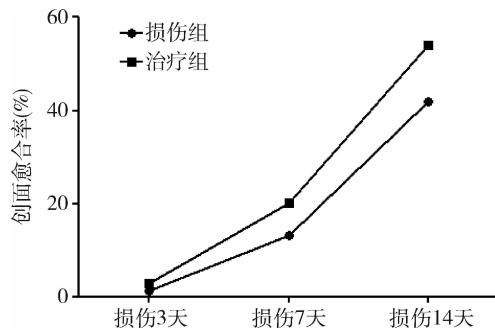


图5 各时间点损伤组与治疗组创面愈合率比较

与损伤组比较, * $P < 0.01$

2. 复合型敷料能有效降低组织 Ca^{2+} 浓度:经测定,损伤后1、3、7、14天,治疗组的 Ca^{2+} 浓度均低于损伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3组各时期 Ca^{2+} 浓度见图6。

3. 皮肤组织创伤区域炎性反应的情况:(1)复合型敷料减轻炎性因子释放:3组炎性因子变化比较,损伤组血清中的炎性因子 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 及 $\text{IL}-6$ 浓度均有不同程度的升高,其中 $\text{IL}-1\beta$ 、 $\text{IL}-6$ 浓度升高更为明显。治疗组炎性因子虽有所增高,但明显

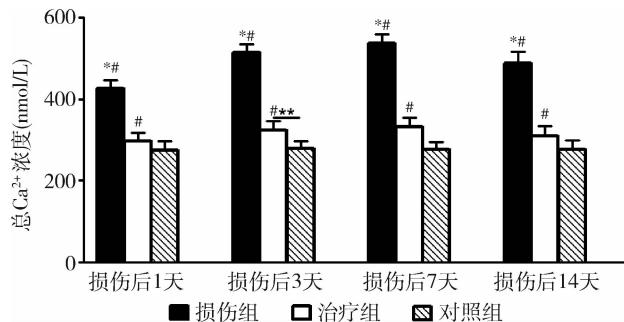


图6 3组各时期组织总 Ca^{2+} 浓度的比较

与治疗组比较, * $P < 0.05$;与对照组比较, # $P < 0.05$

低于损伤组(表1~表3)。(2)复合型敷料减轻氧化应激反应:利用分光光度计,检测损伤后各时期各组的ROS值,结果见表4。损伤后1、3、7、14天,损伤组ROS反应均明显强于治疗组,结果比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

创伤后引起的机体内病理变化与皮肤屏障的损害密切相关,因此使用创面覆盖物,及时封闭、修复缺损皮肤成为创伤后治疗的重要环节^[14]。银离子能有

表 1 3 组各时期 TNF- α 值比较 (pg/L)

| 组别 | n | 损伤后 1 天 | 损伤后 3 天 | 损伤后 7 天 | 损伤后 14 天 |
|-----|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 5 | 2.18 ± 1.01 | 2.53 ± 0.97 | 2.12 ± 0.85 | 2.33 ± 0.91 |
| 损伤组 | 20 | 10.69 ± 2.13 *# | 11.45 ± 2.27 *# | 10.96 ± 2.62 *# | 10.54 ± 2.84 *# |
| 治疗组 | 20 | 4.22 ± 1.04 * | 3.83 ± 1.14 * | 3.74 ± 1.09 * | 3.56 ± 1.18 * |

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与治疗组比较, # $P < 0.05$

表 2 3 组各时期 IL-1 β 值比较 (pg/L)

| 组别 | n | 损伤后 1 天 | 损伤后 3 天 | 损伤后 7 天 | 损伤后 14 天 |
|-----|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照组 | 5 | 4.25 ± 1.34 | 4.83 ± 1.21 | 4.62 ± 1.10 | 4.39 ± 1.58 |
| 损伤组 | 20 | 163.28 ± 18.55 *# | 165.49 ± 19.24 *# | 162.63 ± 15.47 *# | 160.38 ± 16.09 *# |
| 治疗组 | 20 | 89.34 ± 10.59 * | 86.92 ± 12.06 * | 85.74 ± 11.62 * | 82.19 ± 10.17 * |

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与治疗组比较, # $P < 0.05$

表 3 3 组各时期 IL-6 值比较 (pg/L)

| 组别 | n | 损伤后 1 天 | 损伤后 3 天 | 损伤后 7 天 | 损伤后 14 天 |
|-----|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照组 | 5 | 3.52 ± 1.28 | 3.67 ± 1.13 | 3.41 ± 1.18 | 3.39 ± 1.26 |
| 损伤组 | 20 | 484.26 ± 20.59 *# | 473.51 ± 25.22 *# | 471.39 ± 24.73 *# | 465.95 ± 21.80 *# |
| 治疗组 | 20 | 128.12 ± 17.17 * | 126.37 ± 17.96 * | 123.52 ± 16.49 * | 119.63 ± 16.78 * |

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与治疗组比较, # $P < 0.05$

表 4 3 组各时期 ROS 值比较

| 组别 | n | 损伤后 1 天 | 损伤后 3 天 | 损伤后 7 天 | 损伤后 14 天 |
|-----|----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 对照组 | 5 | 0.13 ± 0.03 | 0.14 ± 0.02 | 0.14 ± 0.05 | 0.15 ± 0.03 |
| 损伤组 | 20 | 0.96 ± 0.15 *# | 0.87 ± 0.21 *# | 0.53 ± 0.17 *# | 0.44 ± 0.15 *# |
| 治疗组 | 20 | 0.82 ± 0.17 * | 0.63 ± 0.16 * | 0.48 ± 0.14 * | 0.42 ± 0.17 * |

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与治疗组比较, # $P < 0.05$

效对抗细菌生长,利于构建一个抗菌环境,避免细菌滋生,使用银离子敷料相比传统的纱布换药对创面愈合有极大促进作用。

而损伤后,体内炎性反应加剧,表皮干细胞活性降低,其影响因素是多方面的,故单独依靠某一因素,均较难促进创面较好较快愈合。本实验运用的新型复合型敷料,以银离子敷料为基础,联合钙离子通道受体阻滞剂 Ryanodine、EGF 等因素,能有效促进创伤部位皮岛形成,受损皮肤再上皮化,有效控制炎性反应,获得满意疗效。

EGF 是一种能够刺激细胞生长活性的细胞因子,在创伤早期予以 EGF 的刺激,能够起到加速创面残留表皮干细胞增殖,达到促进上皮化修复的功用。本研究结果显示,损伤后 1 天、3 天,治疗组创面损伤程度明显较轻,在损伤后 2 天创面处皮肤开始脱落后,其后各时期治疗组创面愈合率均优于损伤组。创面处皮肤脱落至皮肤完全再上皮化完成时间相比,治疗组明显少于损伤组,治疗组为 25.39 ± 3.12 天,损

伤组为 29.46 ± 4.38 天,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

已有研究显示 Ca^{2+} 作为胞内重要的第 2 信使,在调节表皮干细胞增殖、迁移等细胞活动及功能中发挥着重要作用^[8]。在生理状态时,胞内 Ca^{2+} 浓度较低,处于动态稳定^[15,16]。当损伤发生早期,细胞内炎性反应加剧,胞内钙离子浓度增多,容易引起钙超载,对细胞膜、肌质网、线粒体等结构造成损坏,并影响细胞的正常生命活动,甚至诱导凋亡。ryanodine receptor 是一种细胞内质网膜上的钙离子通道受体,共有 3 个亚型,广泛分布于表皮各层,当其被激活时,可以触发内质网中的钙释放,导致胞内 Ca^{2+} 浓度的短暂性升高^[10]。本研究使用的钙通道阻断剂 ryanodine,目的就是作用于 ryanodine receptor,从而降低胞内 Ca^{2+} 浓度。研究结果证实各时期治疗组的 Ca^{2+} 浓度均比损伤组低 ($P < 0.05$)。由此可见,由于治疗后特异性阻断了钙离子内流,使胞内 Ca^{2+} 浓度降低,避免了钙超载,从而减轻了炎性反应,促进创面修复。Scheff

等^[17]研究发现,在大鼠的背根神经节受损引起疼痛时,持续的炎性反应导致持续且大量的钙离子增高,而运用钙通道阻滞剂后,炎性反应明显得到控制,与笔者的研究结论一致。

创伤后,机体的氧化应激反应会随之增强,过高的氧化应激会加重机体的损伤^[18]。本研究观察到复合型敷料能有效减轻氧化应激反应,控制炎性反应。损伤后,1、3、7、14天,损伤组ROS反应均检测到明显高于治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,烧伤是一种严重的应激反应,在损伤后将诱发机体全身炎性反应^[17]。TNF- α 、IL-1 β 及IL-6是炎性反应过程中非常重要的细胞因子,也被称为促炎因子,其浓度可有效反映炎性发生情况。结果显示,损伤组血清中的炎性因子TNF- α 、IL-1 β 及IL-6浓度均有不同程度的升高,其中IL-1 β 、IL-6浓度升高更为明显。治疗组炎性因子虽有所增高,但明显低于损伤组。

综上所述,本研究研制的新型复合敷料,初步证明是有效的,可有效加速创面愈合,促进表皮再上皮化。但其具体调控机制还有待于笔者开展进一步实验证实。

参考文献

- 贾赤宇. 创面覆盖物[J]. 中华损伤与修复杂志, 2007, 2(5): 262-265
- 李俊亮, 王凌峰. 创面覆盖物的应用现状[J]. 中华临床医师杂志, 2009, 3(7): 1192-1195
- 刘韬, 徐海栋. 银离子敷料促慢性创面愈合效应[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(42): 7494-7500
- Bin Ahmad M, Lim JJ, Shameli K, et al. Antibacterial activity of silver bionanocomposites synthesized by chemical reduction route [J]. Chem Cent J, 2012, 6(1): 101
- Baars S, Bauer C, Szabowski S, et al. Epithelial deletion of podoplanin is dispensable for re-epithelialization of skin wounds. Exp Dermatol. 2015, 24(10): 785-787
- 李建福, 付小兵, 盛志勇, 等. 创面愈合过程中表皮干细胞的分布特征及意义[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(7): 588-589
- 吕淑坤. 表皮干细胞在组织工程创面修复中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(27): 5126-5130
- 吴艳, 陈璨, Peter ME, 等. 钙离子对表皮屏障功能的调节[J]. 临床皮肤科杂志, 2010, 39(2): 135-136
- Bikle DD, Chang S, Crumrine D, et al. 25 Hydroxyvitamin D1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis[J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(4): 984-992
- Denda S, Kumamoto J, Takei K, et al. Ryanodine receptors are expressed in epidermal keratinocytes and associated with keratinocyte differentiation and epidermal permeability barrier homeostasis[J]. J Invest Dermato, 2012, 132(1): 69-75
- Her C, McCaffrey JE, Thomas DD, et al. Calcium - dependent structural dynamics of a spin - labeled RyR peptide bound to calmodulin [J]. Biophys J, 2016, 111(11): 2387-2394
- Zhong X, Sun B, Vallmitjana A, et al. Suppression of ryanodine receptor function prolongs Ca^{2+} release refractoriness and promotes cardiac alternans in intact hearts[J]. Biochem J, 2016, 473(21): 3951-3964
- 黄邵洪, 荣健, 王淑云, 等. 大鼠在体心肌缺血再灌注损伤组织间液钙离子动态与胞膜钠钙交换体表达[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2012, 41(1): 76-79, 98
- Wilkinson LJ, White RJ, Chipman JK, et al. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety[J]. J Wound Care, 2011, 20(11): 543-549
- Kutchukian C, Lo Scudato M, Tourneur Y, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca^{2+} release defects and prolongs survival in myotubularin - deficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(50): 14432-14437
- Celli A, Mackenzie DS, Crumrine DS, et al. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion activates XBPI and controls terminal differentiation in keratinocytes and epidermis[J]. Br J Dermatol, 2011, 164(1): 16-25
- Scheff NN, Lu SG, Gold MS. Contribution of endoplasmic reticulum Ca^{2+} regulatory mechanisms to the inflammation - induced increase in the evoked Ca^{2+} transient in rat cutaneous dorsal root ganglion neurons[J]. Cell Calcium, 2013, 54(1): 46-56
- 逄冬冬, 李军峰, 郝好杰, 等. 炎症激活间充质干细胞源微泡对糖尿病慢性创面愈合的促进作用观察[J]. 解放军医学杂志, 2016, 41(7): 528-533
- 沈锐, 冯祥生, 宋红梅, 等. 早期重度烧伤患者血清中炎症因子异常及其意义[J]. 中华损伤与修复杂志, 2011, 6(6): 908-912

(收稿日期: 2017-07-02)

(修回日期: 2017-07-12)

关于审稿专家及作者提供银行卡号的启事

由于本单位财务规定,今后发放审稿费和稿费要通过银行转账,希望审稿专家和作者及时登陆医学研究杂志网页 www.yxyjzz.cn, 通过专家审稿或者作者投稿版块登录,于个人信息设置中进入修改个人信息版块,在个人介绍中填写银行卡号、开户支行名称及卡主姓名(最好提供建设银行储蓄卡。如果是其他银行的储蓄卡还要提供支行名称和行号),以便及时为您发放审稿费和稿费,或者将上述信息发到本杂志邮箱 yxyjzz@imicams.ac.cn,如未进行银行卡号登记则无法发放审稿费。联系电话:010-52328674(尹老师)