

慢性难愈合创面“缸口”的形成机制 和中医药治疗研究进展

马慧可 李 萍 陈 佳 林 燕 姚文涛 何秀娟

摘 要 慢性皮肤溃疡上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过度导致创面“缸口”形成,严重阻碍创面愈合。TGF- β /Smad 和 RAS/MAPK 信号通路可导致 EMT 过程和纤维化。中医药治疗慢性难愈合创面“缸口”具有优势和特色,研究发现其与阻断 TGF- β /Smad 和 RAS-MAPK 信号通路相关。本文就近年来创面“缸口”的形成机制与中医药治疗研究进展进行综述。

关键词 创面愈合 中医药 上皮间质转化 研究进展

中图分类号 R261

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.07.040

慢性难愈合创面是指因多种内在或外界因素导致创面长期处于溃烂、渗出或呈纤维化状态,不能按时完成正常的上皮化和及时的组织与功能修复,治疗4周后仍愈合缓慢或无明显愈合倾向的伤口^[1]。慢性难愈合创面主要包括感染性溃疡、放射性溃疡、创伤性溃疡、癌性溃疡、动静脉溃疡以及皮片或皮瓣移植术后的坏死创面等^[2]。慢性难愈合创面的发病机制包括慢性或过度炎症、修复细胞增殖受阻、局部高酶活性、氧化应激损伤以及生长因子分泌不足等^[3]。“缸口”是指溃疡长期难以愈合,疮口下陷不收、边缘高突增厚,皮缘形如大缸环口之状。“缸口”形成多发生在创面修复的重塑期,表皮与真皮未能同步恢复,表皮缺损部位愈合过快或角质形成细胞积聚过多导致上皮变硬变厚,创面形成“缸口”,从而导致伤口愈合延迟。临床研究发现“缸口”是导致慢性难愈合创面的重要影响因素,缸口的深度与临床疗效密切相关。动物研究发现,创缘与创面之间形成的角度越大,越有利于局部炎性渗出物引流、伤口收缩以及肉芽组织中纤维母细胞与新生毛细血管的生长。创缘与创面形成的角度过小的溃疡,临床上多将创缘皮肤适当切除,一方面有助于改善炎性渗出物在创面的引流与其在上皮处的过度积聚,从而促进上皮细胞的爬行,另一方面有助于创面暴露出更多的真皮组织,以改善迟滞的上皮组织的生长与创面局部的氧分压,从

而促进缺损组织的良性修复。因此,临床上及时并有效的处理创缘在极大程度上促进了慢性皮肤溃疡的愈合。

一、EMT 过度导致慢性难愈合创面“缸口”形成

伤口的愈合过程经历止血期、炎症期、增殖期和重塑期,4个阶段必须相互协调,且以正确的时间和顺序整合以实现正常的创面修复^[4]。在皮肤创面修复的增殖期和重塑期,表皮修复从创口边缘开始,涉及角质形成细胞的激活、迁移和增殖以覆盖新生肉芽组织,从而形成新生表皮并恢复表皮屏障功能,该过程被称为再上皮化,这也是伤口愈合过程中的关键阶段^[5,6]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)表现为细胞上皮特性逐渐丢失而表现出间质的特性,细胞运动和迁移能力增强^[7]。上皮特性的改变主要在于上皮细胞失去其原有的“上皮形态”,包括细胞-细胞间、细胞-外基质间和细胞-基底膜间的连接减弱,细胞极性消失,同时上调 Slug、Snail1、Snail2、Zeb1 和 Twist 等 EMT 相关基因。EMT 可分为3型:Ⅰ型 EMT 参与胚胎生成和器官发育;Ⅱ型 EMT 参与创面愈合、组织再生和器官纤维化;Ⅲ型 EMT 参与肿瘤形成和转移^[8]。其中,Ⅱ型 EMT 完全由损伤和炎症引起,一旦创面达到修复状态或炎症消退便会停止 EMT 的发生。在再上皮化过程中,皮肤创缘的角质形成细胞发生脱黏附,细胞骨架重排而变得疏松;这些改变同时使静止的角质形成细胞伸出板状伪足,实现细胞迁移^[9]。再上皮化完成后,角质形成细胞会恢复上皮细胞表型,重建紧密的细胞连接和屏障功能,因此,再上皮化过程中的部分 EMT 是可逆

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7212164)

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院、北京市中医药研究所

通信作者:何秀娟,电子邮箱:hexiujuan@bjzhongyi.com

的。在创面愈合早期,EMT 来源的肌成纤维细胞可以通过分泌细胞外基质和收缩伤口床来缩小创面^[2]。但是在创面愈合晚期,如果炎症持续刺激导致 EMT 无法及时消退,则会导致瘢痕形成。研究表明,转化生长因子 β (transforming growth factor - β , TGF - β) 是发生 EMT 的诱导因子,EMT 在皮肤创面愈合过程中参与炎症反应,促进成纤维细胞与血管增生,调节胶原合成等^[10]。因此,其对于适当的上皮化和细胞外基质沉积是必要的,但持续的从上皮细胞到肌成纤维细胞的过度转化将导致纤维化^[9]。

在皮肤创面愈合过程中,创缘上皮细胞迁移增强,细胞间黏附降低,角质形成细胞通过增殖、迁移驱动再上皮化,成纤维细胞介导局部结缔组织收缩,促进创面边缘闭合^[11]。再上皮化是创面愈合的关键组成部分,因此,参与再上皮化的角质形成细胞是创面修复的主要参与者^[12]。创面中的角质形成细胞通过细胞间黏附减少、细胞骨架蛋白重组以及基因重编程转换为具有间充质表型的细胞,从而实现再上皮化以恢复表皮屏障,这一过程是创面愈合的基础^[8]。波形蛋白(Vimentin)和 N - 钙黏蛋白(N - cadherin)的增多以及 E - 钙黏蛋白(E - cadherin)的减少可作为判断 EMT 发生及其进展程度的标志^[11]。在细胞极化条件下,E - cadherin 与相邻细胞结合,形成上皮屏障的细胞间复合物,在相邻细胞的细胞骨架之间形成桥梁。EMT 转录因子(如 Snail、Slug 和 Twist)与 E - cadherin 启动子区 E - boxes 结合,下调 E - cadherin 来实现 EMT^[13]。然而,失去 E - cadherin 的细胞则不能相互黏附,因此 E - cadherin 表达水平的改变是判断细胞迁移、肿瘤浸润转移与否的重要标准。Snail 与同一家族 Slug 可通过抑制 E - cadherin 来调节上皮再生过程中的角质形成细胞运动,减少细胞间黏附来实现 EMT^[9]。细胞骨架在经历特征性重组过程中,肌动蛋白介导应力纤维形成,以细胞角蛋白(cytokeratin, CK)为主的细胞骨架转变为以 Vimentin 为主的细胞骨架,调节细胞运动并发生 EMT^[14]。经 EMT 转化的细胞 MMP2 和 MMP9 上调,降解细胞外基质并促进细胞迁移。此外,局部降解的细胞外基质还会释放储存的生长因子如 TGF - β 1,促进细胞间充质表型的获得、侵袭和转移,进一步加强 EMT^[15]。

创面愈合过程中的 EMT 受到成纤维细胞生长因子、表皮细胞生长因子、肝细胞生长因子和 TGF - β 等多种信号通路的精细调节^[16]。TGF - β 调控细胞增殖、迁移、分化以及 EMT,参与损伤修复和致纤维

化。TGF - β 超家族中 TGF - β 1 与致纤维化密切相关。在慢性创面中,炎症巨噬细胞可分泌 TGF - β 1,刺激成纤维细胞增殖和合成细胞外基质,而皮肤创面边缘纤维化是慢性创面的重要发病机制^[17]。TGF - β 信号通路经 Smad 依赖型和 Smad 非依赖型通路发挥作用。TGF - β /Smad 信号通路中,TGF - β 配体结合 TGF - β R1、TGF - β R2 导致 Smad2 和 Smad3 磷酸化,之后与 Smad4 形成复合物并易位至细胞核,反式激活编码 ECM、基质金属蛋白酶、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和 Snail 基因的表达,最终促进 EMT 的形成^[18]。同样,骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)可结合 TGF - β 受体导致 Smad1 和 Smad5 磷酸化,也与 Smad4 形成复合物。同时,抑制性 Smad6 和 Smad7 也与 Smad2 和 Smad3 竞争性结合 TGF - β R1^[19]。这些 Smad 复合物(Smad2 - Smad3 - Smad4 和 Smad1 - Smad5 - Smad4)迁移到细胞核,并作为转录因子调节间充质状态相关基因的表达^[18]。研究发现,TGF - β R1/TGF - β R2、Smad2 - Smad3 - Smad4 失活均可以阻断 TGF - β 1 诱发 EMT。虽然 Smad3 可以诱发 EMT,但 Smad2 可以抑制 TGF - β 1 诱发 EMT,并且 Smad2 缺陷的角质形成细胞通过增强 Smad3 和 Smad4 活性而发生 EMT。因此,TGF - β 是致纤维化的主要调节因子。

创伤修复与肿瘤发生均有细胞增殖与分化、组织重塑与炎症反应等过程的参与,并且涉及多条共用信号通路。2020 年《Nature》报道,TGF - β 通过 RAS 反应元件结合蛋白 1(RAS responsive element binding protein 1, RREB1)协调 EMT 过程和纤维化^[20]。TGF - β 是 EMT 过程和纤维化的有效诱导因子,其依赖于迅速加速性肉瘤蛋白(rapidly accelerated sarcoma, RAS)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路来诱导 EMT 发生。RREB1 和 RAS 转录效应子是 EMT 中 TGF - β 激活的 Smad 转录因子的关键伴侣,之后被 MAPK 激活以促使 Smad 被募集 Snail,最后经染色质可极性诱导产生 EMT。在癌细胞中,TGF - β /Smad 和 RREB1 直接驱动 Snail,促进肿瘤内纤维化。因此,RREB1 促进 RAS 和 TGF - β 通路间的相互联系,诱导 EMT 过程和纤维化。

RREB1 编码的蛋白是一种转录因子,参与细胞增殖、转录调控和 DNA 损伤修复等生物过程,能结合下游基因启动子区的 Ras 反应元件(RAS - responsive

elements, RRE) 发挥作用,被认为是 RAS/RAF 信号通路转导的一个效应分子。RREB1 基因位于人类 6 号染色体(6p25),全长 144kb,编码的蛋白是具有 15 个锌指结构域的转录因子,目前已知存在 12 个异构体^[21]。RREB1 能诱导降钙素、p53、FSH 等基因的转录,抑制血管紧张素原、p16、hZIP1、PSA、HLA - G 等基因的转录。RREB1 和雄激素受体、C - Terminal 结合蛋白等核蛋白相结合,并参与 microRNA、lncRNA、circularRNA 等的调控。在实体肿瘤中 RREB1 与细胞迁移运动有关。MCF10A 乳腺上皮细胞敲低 RREB1 后细胞的迁移与表面活性受到抑制,从而形成紧密的细胞集落^[22]。因此,RREB1 减少细胞间黏附促使细胞迁移,而 RREB1 低表达可通过抑制细胞迁移,在抗纤维化与抗肿瘤方面发挥重要作用。因此,慢性皮肤溃疡局部炎症持续存在,RREB1 可能促进 TGF - β /Smad 和 RAS/MAPK 信号通路协同诱导 EMT 过程导致 EMT 过度甚至纤维化,是“缸口”形成的机制。

二、中医药抑制 TGF - β /Smad 和 RAS/MAPK 信号通路对 EMT 过度以及“缸口”的研究

慢性皮肤溃疡属中医“疮疡”范畴,中医药治疗疮疡显示了强大的生命力。疮疡的形成经历初起(初期)、成脓(中期)、溃后(脓成)3 个阶段,总则为早期为消,中期为托,后期为补。顾筱岩认为,若疔疮经久难愈,疮面凹陷,疮周紫黑,质地僵硬,有如“缸口”之状,仅用生肌之法,则肉芽浮起而致新肉不生;若局部采用垫棉压迫法,可使肉芽平伏,并配合缠缚疗法,用布绑扎小腿,利于气血畅通,促进疮面愈合,日久便可见效^[23]。创面愈合增殖期阶段的溃疡创面肉芽色淡白,疮周紫滞,致缸口形成,久不收敛,敛后复溃,管壁粗硬。郑勇等^[24]采用祛瘀生肌法,主张旧瘀宜通滞,因此在补阳还五汤之基础上加用虫类药物,如水蛭取搜剔络邪之功。水蛭善入则坚积易破,借其力以攻积久之滞,自有得而无害也。疮面愈合重塑期阶段,疮周形成较厚硬且弹性差的灰白组织,形成“缸口”,阻碍新生上皮组织在疮面的爬行,从而形成慢性难愈合疮面。阙华发^[25]认为,疮周有潜行性空腔时,采用垫棉疗法垫压空腔处,再以绷带加压缠缚,压紧患处,可促进皮肉黏合,利于创面愈合。对于“缸口”的处理,阙华发^[25]认为可采用煨脓湿润法,油膏厚敷创面厚硬组织,待其软化后机械清除,并外敷生肌敛疮药膏,可促进上皮生长,加速疮面愈合。

TGF - β /Smad 和 RAS/MAPK 信号通路诱导

EMT 过度导致慢性难愈合创面“缸口”形成。中药复方或中药提取物可在创面愈合早期阶段上调 TGF - β 或 TGF - β /Smad 信号通路来促进创面愈合,但其在创面修复后期通过抑制 EMT 过度来促进创面修复的具体机制还有待于深入研究。张臻等^[26]用益气化瘀方灌胃糖尿病大鼠,抑制 TGF - β /ALK5/Smad2/3 信号通路,促进糖尿病大鼠创面愈合并减少瘢痕形成。王振宜等^[27]将复黄生肌愈创油膏外用于糖尿病大鼠,在创面修复晚期,下调 TGF - β 、Smad3 表达,上调 Smad7 表达,促进创面愈合的同时阻止成纤维细胞过度增殖与迁移,从而减少瘢痕形成。孙桂芳等^[28]将生肌玉红膏体外干预人增生性瘢痕成纤维细胞(human hypertrophic scar fibroblast, hHSF),抑制 hHSF 增殖、 α - SMA 和 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白表达,显著下调 TGF - β /Smad 信号通路;临床实践表明,生肌玉红膏可促进创面愈合,广泛应用于糖尿病性溃疡以及烧烫伤,效果显著;体内实验表明,生肌玉红膏可抑制瘢痕增生,减少胶原沉积,减轻兔耳增生性瘢痕。同样,血竭素 B 临床可应用于烧烫伤,促进创面愈合;同时,血竭素 B 可下调 TGF - β 1/Smad 信号通路,减轻兔耳增生性瘢痕。王文淇等^[29]将断体地龙提取液作用于小鼠创面,在创面修复后期,TGF - β 下调,减少胶原沉积与瘢痕形成。这些数据表明,中药或中药提取物在促进创面愈合的同时,又可通过 TGF - β /Smad 信号通路发挥潜在的抑制瘢痕性增生的疗效。

赵炳南使用“治翻车”疗法治疗慢性皮肤溃疡疮周异常纤维化,疮面“缸口”板硬,利用黑布药膏的活血化瘀、软坚散结作用,缓慢软化创面痂皮,尽可能减小其对正常组织的损害^[30]。外用黑布药膏可打破慢性创面的愈合停滞状态,清除异常纤维化的肉芽组织,促进正常肉芽组织的生长,重新启动创面的愈合机制。黑布药膏中老黑醋的软坚解毒、蜈蚣的破瘀攻毒以及五倍子的收敛解毒起关键作用,全方共奏破瘀软坚、聚毒催脓之功,以消为主,消中带托,破中有立^[31]。另有研究表明,黑布药膏可显著降低局部组织中 TGF - β 1 的表达,从而起到抑制瘢痕增生和挛缩发生的作用。此外,黑布药膏中蜈蚣和五倍子可显著抑制瘢痕疙瘩胶原蛋白的合成与 hHSF 的增殖,减少其 DNA 与胶原的合成。因此,黑布药膏可抑制 TGF - β 表达和成纤维细胞活性,从而发挥抗皮肤纤维化的作用。因此,TGF - β /Smad 信号通路是调控创面愈合与抗 EMT 过度的关键机制,从该通路出发,

进行中医药在 EMT 过度所致的慢性创面的疗效及药效基础研究具有广阔的研究前景。

三、展 望

EMT 经过了近 40 年的发展,但皮肤 EMT 的相关文章比例不足 3%,对创面修复的研究也是针对如何促进 EMT,而对抑制或逆转皮肤 EMT 的研究仍比较欠缺。中医药一方面可加速创面愈合,一方面可通过抑制 EMT 与抗纤维化作用提高创面修复能力,从而有助于慢性难愈合创面“缸口”愈合。因此,抑制 TGF-β/Smad 和 RAS/MAPK 造成的 EMT 过程和纤维化可能成为促进创面愈合新的治疗靶点,将为研究中医药治疗慢性难愈合创面“缸口”的作用基础和理论内涵提供新的思路 and 方向。

参考文献

1 陈端凯, 单云龙, 唐乾利. 从细胞外微环境探讨 MEBT/MEBO 对慢性难愈合创面的修复作用[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2019, 31(4): 236-239

2 Liao X, Liang JX, Li SH, *et al.* Allogeneic platelet-rich plasma therapy as an effective and safe adjuvant method for chronic wounds[J]. J Surg Res, 2020, 246(2): 284-291

3 Yoon DS, Choi Y, Jang Y, *et al.* SIRT1 directly regulates SOX2 to maintain self-renewal and multipotency in bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2014, 32(12): 3219-3231

4 Li N, Yang YJ, Qian HY, *et al.* Intravenous administration of atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial infarction: role of CXCR4[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(6): 1058-1070

5 何秀娟, 张金超, 刘青武, 等. 免疫细胞调控创面愈合的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(9): 13-16

6 Raja, Sivamani K, Garcia MS, *et al.* Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing[J]. Front Biosci, 2007, 12(5): 2849-2868

7 Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. J Cell Biol, 1982, 95(1): 333-339

8 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428

9 Stone RC, Pastar I, Ojeh N, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(3): 495-506

10 Kosla J, Dvorak M, Cermak V. Molecular analysis of the TGF-β controlled gene expression program in chicken embryo dermal myofibroblasts[J]. Gene, 2013, 513(1): 90-100

11 Nakamura M, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin[J]. J Dermatol Sci, 2011, 61(1): 7-13

12 Chen X, Shi Y, Shu B, *et al.* The effect of porcine ADM to improve the burn wound healing[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(11): 2280-2291

13 Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epitheli-

al-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications[J]. Mol Cancer, 2016, 15(2): 18-31

14 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890

15 Bieri B, Moses HL. TGF-β and cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(1-2): 29-40

16 Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84

17 Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF-β) isoforms in wound healing and fibrosis[J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(2): 215-222

18 Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. Cell Res, 2009, 19(2): 156-172

19 Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF-β family signaling[J]. Sci Signal, 2019, 12(570): 1-58

20 Su J, Morgani SM, David CJ, *et al.* TGF-β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1[J]. Nature, 2020, 577(7791): 566-571

21 Thiagalingam A, De Bustros A, Borges M, *et al.* RREB-1, a novel zinc finger protein, is involved in the differentiation response to Ras in human medullary thyroid carcinomas[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(10): 5335-5345

22 Melani M, Simpson KJ, Brugge JS, *et al.* Regulation of cell adhesion and collective cell migration by hindsight and its human homolog RREB1[J]. Curr Biol, 2008, 18(7): 532-537

23 上海中医学院中医文献研究所. 外科名家顾筱岩学术经验集[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1987: 149-150

24 郑勇, 唐汉钧. 唐汉钧教授辨证治疗带状疱疹拾萃[J]. 中医药学刊, 2005, 23(3): 404-406

25 阙华发. 慢性难愈性疮面的中医外治策略[J]. 中医外治杂志, 2018, 27(1): 3-5

26 张臻, 阙华发. 益气化痰法中药对糖尿病大鼠肉芽增生期创面 TGF-β/ALK5/Smad2/3 通路的影响[J]. 新中医, 2015, 47(6): 270-272

27 王振宜, 肖秀丽, 唐汉钧, 等. 复黄生肌愈创油膏对糖尿病大鼠创面肉芽组织中 TGF-β1 与 smad3、smad7 mRNA 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(4): 60-64

28 孙桂芳, 张晓芬, 陈亚峰, 等. 生肌玉红膏通过下调 TGF-β1/Smads 抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原分泌[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1590-1593

29 汪文琪, 胡海聪, 张志千, 等. 断体地龙提取液促进小鼠创伤愈合作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(7): 1449-1453

30 北京中医医院. 赵炳南临床经验集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 277-278

31 曹为, 曲剑华. 赵炳南黑布药膏特色治疗瘢痕疙瘩经验[J]. 北京中医药, 2019, 38(10): 956-958

(收稿日期: 2022-07-18)

(修回日期: 2022-07-31)