

实验研究

创面愈合中外用中药对免疫活性细胞氧化代谢功能的影响

——假脓长肉作用机制研究之三

天津骨科研究所(300211) 李秀兰 纪根媛 赵凤仪 师宜健

摘要 本文采用化学发光技术(Chemiluminescence—CL),检测外用中药在创伤愈合中对中性粒细胞(PMN)、淋巴细胞(Ly)、创面渗出细胞的氧化代谢功能,以及创面渗出液对正常 PMN 和淋巴细胞—CL 的影响。实验结果表明,外用中药可激活 PMN 和淋巴细胞产生—CL;与对照组比较呈极显著差异($P < 0.01$)。在创面愈合中 PMN 率先活化而后激活淋巴细胞持续到愈合期。创面渗出细胞有较强的—CL 活性,外用中药组优于对照组($P < 0.01$)。外用中药组创面渗出液可作为 PMN 和淋巴细胞的激活因子,具有与酵母聚糖(Zymosan)和刀豆球蛋白—A(ConA)雷同的作用,而对照组则作用极弱。

关键词 创伤和损伤 中医药疗法 免疫,细胞 假脓长肉

本文以—CL 峰值作指标,评价吞噬细胞的氧化杀菌作用和淋巴细胞早期转化阶段的氧化代谢功能^[1]。目的在于探讨免疫活性细胞的功能状态及对伤口愈合的积极意义。探索“假脓长肉”作用的确切含意。

材料与方 法

1. 材料

(1)酵母聚糖(Zymosan Sigman)浓度为 10mg/ml。

(2)鲁米诺(Luminol 德国)用 Hank's 液制备成 0.04mM。用于 PMN—CL 检测;用 0.01mMPBS 和三乙胺(10:80)加入鲁米诺 20mg,使用前用 0.01MPBS 稀释 10 倍。浓度为 0.2mM。

(3)刀豆球蛋白 A (Con A Sigman),用 PH7.2Hank's 液加 20%胎牛血清配制,浓度为 0.5mg/ml。

(4)取生肌膏、玉红膏和黄连膏各 500g 所相当的中药,加水浸煮三次。将三次药液合并,反复浓缩,低温静止,获取上述各组药液 50ml。用前作 50 倍稀释。

(5)大耳白兔(天津实验动物中心),健康,1.5~1.75kg,雌雄各半。

2. 方法

(1)创伤模型^[2]:将实验动物随机分为 4 组。对照组(在无菌条件下创面换凡士林油纱);生肌膏组;玉红膏组;黄连膏组换各组中药膏 500mg/cm² 创面。

(2)PMN—CL 实验:取家兔耳静脉血 50ml,肝素抗凝。调整细胞数为 $2 \times 10^6/cm^3$ 。在容积为 4ml 的小塑料瓶内依次加入 Hank's 液 1ml;全血 20 μ l;0.04mM 鲁米诺 1ml,37℃ 恒温 30 分钟,立即加入酵母聚糖 100ul。LKB1215 型液闪仪中计数。样品计数 5 秒钟,循环周期 10 分钟。

(3)淋巴细胞—CL 实验:在 4ml 容积的小塑料瓶中加入 Hank's 液 1ml,待测全血 20 μ l;0.2mM 鲁米诺 200ul;37℃ 温浴 10 分钟;加 ConA200ul,立即液闪计数。计数 5 秒钟,循环周期 5 分钟。

(4)创面渗出细胞—CL 实验(创面细胞获取参见研究之二):分别在术后第 4、7、14、21 天取出钢管,用 Hank's 液 500ul 冲洗管内棉花团。冲洗液 1000rPM 离心 10 分钟。上清液作为 PMN 和 Ly 的激活因子。沉淀细胞加入 Hank's 液 1ml 制成细胞悬液。作台盼兰染色活细胞计数和渗出细胞—CL。方法同 PNM—CL。

(5)创面渗出液作为 PMN 和淋巴细胞的激活因子实验:选用①Zy 加 10%正常血清;②Zy 加 10%血清加 10%对照组渗出液;③Zy 加 10%血清加 10%实验组(生肌膏组)渗出液;④Zy 加 10%对照组渗出液;⑤Zy 加 10%实验组渗出液,5 组制剂作为 PMN—CL 激活因子。选用①ConA200 μ l;②ConA 150 μ l 加对照组渗出液 50 μ l;③ConA150 μ l 加实验组渗出液 50 μ l;④对照组渗出液 50 μ l;⑤实验组渗出液 50 μ l,5 组制剂作为淋巴细胞—CL 的激活因子。

将上述各 5 组因子,按照 PMN—CL 和淋巴细胞—CL 检测方法,观察其作为激活因子的活性。

结果

1. 在创面愈合中 PMN—CL 动态变化

PMN—CL 峰值出现在反应后 10 分钟,在创伤愈合中 PMN 具有动态变化,7、14、21 天用药组与对照组有显著性差异($P < 0.01$)。在创面愈合中外用中药生肌膏、玉红膏和黄连膏的 PMN—CL 动态变化规律一致。

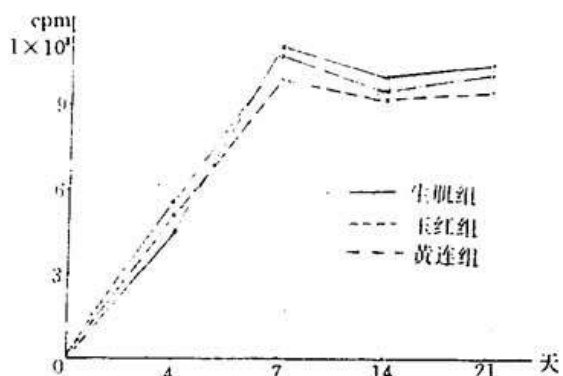


图1 外用中药同 PMN—CL 动态

F 检验 $P > 0.05$ (见图 1)。实验结果表明,外用中药对外周血 PMN—氧化代谢功能具有显著的增强作用。

2. 在创伤愈合中淋巴细胞—CL 动态变化

在加入 ConA 2 分钟后,淋巴细胞的—CL 出现高峰,而后迅速降至本底(见图 2)。在创伤愈合中,创伤后 4 天淋巴细胞—CL 峰值极低;而 4 天以后淋巴细胞—CL 迅速出现高峰且持续至愈合期。t 检验结果显示 $P < 0.01$ (见图 3)。外用中药生肌膏、玉红膏和黄连膏在创伤愈合中对淋巴细胞—CL 均有显著影响,其动态变化规律均为创伤后 7~14 天出现持续高峰,且生肌膏组更为明显(见图 4)。

3. 创面细胞—CL 动态变化

将各组创面细胞作—CL 动态观察,发现创面细胞均有较强的一—CL 现象。在创伤愈合中药物组与对照组比较均有极显著性差异 $P < 0.01$ 。各中药组对创面细胞的影响一致。实验结果表明,“假脓长肉”作用与局部细胞功能活跃密切相关,(见表 1)。

4. 创面渗出液作 PMN 和 Ly 激活因子实验

Zymosan 经正常血清调理可使 PMN—CL 增加数百倍。将等量创面渗出液加等量血清激活 Zymosan,不改变 PMN—CL。将创面渗出液单独作为 Zymosan 的调理素时,渗出液中药组的 PMN—CL 显著高于对照组, $P < 0.01$ 。证明中药组渗出液与对照组不同,其自身含有 Zymosan 调理素或 PMN 激活因子。进而可增强 PMN—CL,(见表 2)

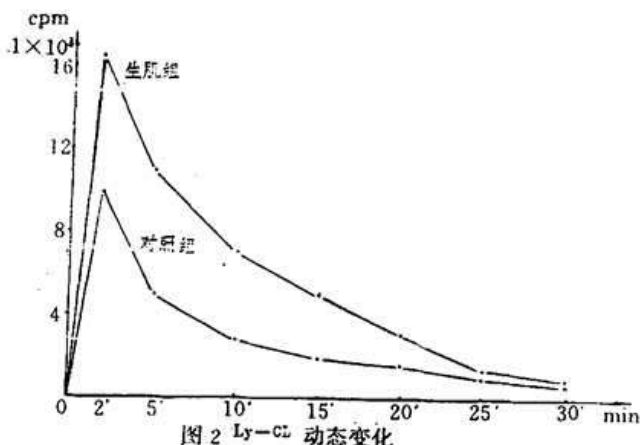


图2 Ly—CL 动态变化

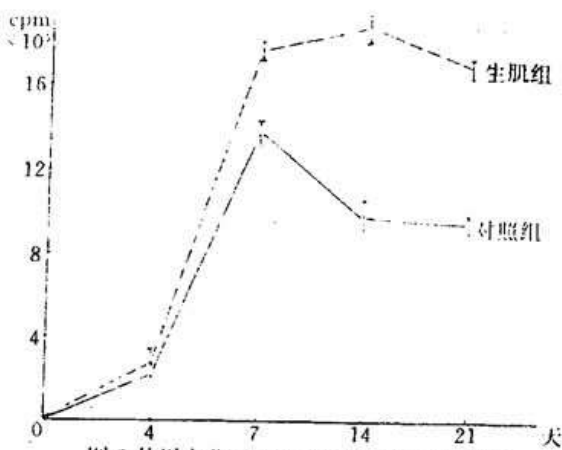


图3 外用中药在创伤愈合中 LY—CL 动态

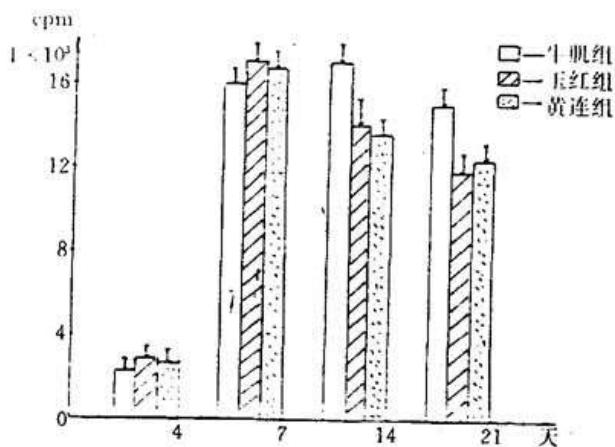


图4 外用中药同 LY—CL 动态

表 1 创伤渗出细胞 CL df=5 X±SD

组别	4 天	7 天	14 天	21 天
对照组	1596.00±288.49	5946.00±620.68	1690.00±166.81	1800.00±492.15
生肌膏	6126.00±1196.46	9660.00±1170.00	3384.00±320.00	2664.00±692.18
玉红膏	2694.00±507.92	8088.00±1443.00	2690.00±450.24	2249.00±360.29
黄连膏	2926.00±551.54	8670.00±1654.62	2836.00±342.00	620.00

表 2 创伤渗出液对 PMN-CL 峰值影响 $df = 5\bar{x} \pm SD$

组别	CPM	P ₁	P ₂
1	4572.00 ± 305.47		
2	4362.00 ± 500.63	P > 0.05	
3	4410.00 ± 144.24	P > 0.05	P > 0.05
4	1338.00 ± 178.19	P < 0.001	
5	4092.00 ± 505.17	P < 0.05	P < 0.01

注:组别 1. Zy+10%血清;2. Zy+10%血清+10%创面渗出液(对照);3. Zy+10%血清+10%创面渗出液(实验);4. Zy+10%创面渗出液(对照);5. Zy+10%创面渗出液(实验)

ConA 是淋巴细胞的有丝分裂原,具有使淋巴细胞转化的能力。观察创面渗出液对淋巴细胞-CL 激活能力的影响。其结果显示,创面渗出液可激活淋巴细胞,但活化能力低于 ConA。而药物组渗出液明显优于对照组。提示创面渗出液可作为淋巴细胞的激活因子或含有类似 ConA 的物质。(见表 3)。

表 3 渗出液对 Ly-CL 影响 $df = 5 \quad \bar{X} \pm s = 5$

组别	CPM	P ₁	P ₂
1	7018.00 ± 797.61		
2	5331.00 ± 223.44	P < 0.01	
3	5587.00 ± 177.47	P < 0.01	P < 0.05
4	4296.00 ± 424.26	P < 0.01	
5	5482.00 ± 153.72	P < 0.01	P < 0.05

注:组别 1. ConA 200 μ l;2. ConA 150 μ l + 50 μ l 渗出液(对照组);3. ConA 150 μ l + 50 μ l 渗出液(实验组);4. 渗出液 200 μ l(对照组);5. 渗出液 200 μ l(实验组)。

讨论

1972 年 Allen 首次发现了吞噬细胞具有 CL 现象以后^[3],1978 年 Wrogean 等报道了有关外周血淋巴细胞和小鼠脾细胞在 ConA 刺激下可迅速产生反应而暴发 CL。CL 峰值可以作为评价吞噬细胞、淋巴细胞免疫状态和体液调理素水平的重要指标^[4]。

我们观察到外用中药均可激活外周血 PMN 和淋巴细胞的 CL。在创口愈合中表现为创伤早期首先激活 PMN,而后激活淋巴细胞并持续到愈合。众所周知,在创面愈合中首先表现为局部炎症反应和细胞增殖,应激反应可使骨髓提前释放出的幼稚单核细胞、PMN 和淋巴细胞入血^[5]。并由于微血管通透性增加和多种化学趋化物的招引而使其聚集到伤口。可见外周血 PMN 和淋巴细胞是创面免疫活性细胞的主要来源。外用中药激活 PMN 和淋巴细胞有利于吞噬杀菌、防止伤口感染。同时释放的免疫活性因子和淋巴因子直接参与机体的免疫反应,为加速伤口愈合提供必需的条件。

我们从脓液中分离出创面渗出细胞。发现创面细胞具有极强的一 CL 现象。实验以脓性渗出液作为激活

物,观察其对正常 PMN 和淋巴细胞的影响。我们意外的发现,外用中药组创面渗出液直接激活 Zymosan,产生了与血清一致的 PMN-CL 效应。而对照组则使 PNM-CL 降低 70%。又将外用中药组创面渗出液直接作用淋巴细胞,即产生了 ConA 雷同的淋巴细胞-CL 作用。然而,对照组渗出液淋巴细胞-CL 作用微弱。以上实验初步证明,外用中药组创面渗出液中含有维系细胞生存和功能状态的免疫活性物质。在创伤和炎症反应中免疫活性细胞的多种功能均会受到抑制,创伤血清中存在免疫抑制因子。抑制因子可直接作用封闭网状内皮系统,抑制吞噬细胞和淋巴细胞,从而导致广泛性免疫功能下降。提示外用中药组渗出液可能不含免疫抑制因子或含有大量免疫激活物。为维系伤口局部细胞形态和功能的完整性提供了良好的生理环境。应是“假脓长肉”之脓液的重要特征之一。

伤口愈合是生物赖以生存和自我修复的方式,是一个细胞与细胞、细胞与体液间相调节的极为复杂的过程^[6]。创伤应激反应和炎症介质,可使外周的 PMN 和淋巴细胞活化并向伤口趋化,活化的 PMN 和淋巴细胞释放巨噬细胞趋化因子等免疫活性物质,使巨噬细胞聚集于创面。巨噬细胞是合成和分泌纤维结合蛋白的重要场所。纤维结合蛋白可作用于成纤维细胞和肌成纤维细胞,使细胞增殖并加速胶原合成。因此,外用中药细胞之间和细胞与体液之间的调节作用系促进创面愈合的基础。是“假脓长肉”作用机制的一个重要方面。

参考文献

- Allen C, et al. Phagocytic activation of a Luminol-dependent Chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem and Biophys Res Commun* 1976; 69 (1):245~252.
- 李秀兰等,中性粒细胞在创伤愈合中氧化代谢功能的动态观察. *中国中医骨伤科杂志* 1993;1(1):7~10
- Allen C, et al. Evidence for the generation of in an electronic excitation states in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem and Biophys Res Commun* 1972;47(4):679-684.
- Allen C, et al. Liquid scintillation counting, recent application and development. *New York* 1980;377.
- Johnson W. J. et al. Macrophage activation in rat models of inflammation and arthritis. *Cell Immuno*, 1986;103:54-64.
- Loato M. et al. Inflammatory reaction and flood flow in experimental wounds inoculated with staphylococcus aureus. *Eur Surg Res.* 1988;20:33-39

Abstract of Original Articles

Analysis on pre- and postoperative somatosensory evoked potentials of diastematomyelia

Cheng Bin(程斌) Wang Kun-zheng(王坤正) Chen Jun-chang(陈君长) et al

Second Affiliated Hospital of Xian Medical University (710004)

Cortical somatosensory evoked potential (CSEP) examination stimulated from posterior tibial nerve were performed on 20 patients suffering diastematomyelia pre- and postoperatively, selecting 20 normal subjects as control group in the meanwhile. We found that CSEP changes were statistically significant between patients and normal subjects ($P < 0.05$). Postoperative P_{40} peak latencies and amplitudes changed significantly in patients and CSEP had apparent difference in bilateral lower extremities preoperatively. It showed that CSEP is a sensitive, reliable objective diagnostic parameter that may be used to establish the severity of neural damage and evaluate the operative efficacy. The mechanism of neural defect is discussed in the article.

Key words Diastematomyelia Somatosensory evoked potential

(Original article on page 5)

Clinico-pathological study on juvenile spontaneous scoliosis

Chen Zhong-qi(陈中奇) Yang Guang(杨广) Kong Xia(孔霞) et al

First Hospital of Jining City, Shandong Province (272111)

Thirty cases of spontaneous scoliosis were observed under light and ultra microscopic and immuno-histochemical examinations. The results indicated that the fascia, muscle of main depressive area of the trunk had adhesive degenerative phenomena, the pathological characteristics are infection, muscular fibrotic degeneration, connective tissue proliferation, adhesion and scar formation. It offers an objective foundation for comprehensive treatment.

Key words Scoliosis Ultrstructure Immuno-chemical histology

(Original article on page 7)

Influence of immuno-activity of cellular oxidation metabolic function of the external used Chinese herb during wound healing—Study on the mechanism of Wei Nong Zhang Rou(3)

Li Xiu-lan(李秀兰) Ji Gen-yuan(纪根媛) Zhao Feng-yi(赵凤仪) et al

Tianjin Institute of Orthopaedics (300211)

Oxidation metabolic function of neutrophils, lymphocytes, exudate cells of wound surface and the influence of wound surface exudation on normal neutrophils and lymphocytes were detected by means of chemiluminescence-Cl during application of Chinese herbs on wound healing. The results of experiments indicated that external applying of Chinese herbs can activate neutrophils and lymphocytes to produce-Cl. The difference is very evident ($P < 0.01$) as compared with control group. During wound healing neutrophils were activated at first then lymphocytes till healing stage. The exudation cells of the wound surface bears rather strong-Cl activity. Those of the ex-

ternal used Chinese herb group is superior than control group ($P < 0.01$). Exudation of external applied Chinese herb group can serve as activator of neutrophils and lymphocytes, it bears similar action as zymosan and canavaline A. There is very weak action in control group.

Key words Trauma and injury Traditional Chinese medicinal therapy
Immunology, cellular Wei Nong Zhang Rou

(Original article on page 9)

Biomechanical principal and clinical application of the novel annular external fixator

Huang Xiao-zhou(黄孝舟) Wang Yi-jin(王以进) Fan bin(凡道斌) et al
Chaohu District Orthopaedic Hospital, Anhui Province(238000)

Since June of 1986, 184 cases including 146 cases of fresh fracture; 16 cases, chronic fracture; 4, non-union; 13, elongation of bone; 5, genu varum malformation were treated by self-made novel annular external fixator with satisfactory therapeutic effect. Various modes of fixation with this fixator were examined with biomechanics, it shows that various number of pins, types, directions and locations were related with stability of the fixation.

Key words Fracture fixator, external Biomechanics

(Original article on page 12)

Analysis of remote therapeutic effect on surgical treatment of prolapse of lumbar intervertebral disc

Ran Yong-xin(冉永欣) Dai Zhi-he(戴志和)
Central Hospital of Shanghai Railway Bureau(200072)

From 1975 to 1994, 500 cases of prolapse of lumbar intervertebral disc were treated with fenestration operation of vertebral lamina and ligamentum flavum and total laminectomy two forms of operation. The results indicated that there is no difference between two forms of operation in the releasing of sciatic neuralgia. But the former bears advantage of minor injury, it can not only remove the prolapsed nucleus, removal of complex lesion around the disc and recovery of nervous function but also can maintain the stability of the spine. The rate of excellency and good is 98%.

Key words Prolapse of lumbar intervertebral disc Surgery, operation

(Original article on page 17)

欢迎订阅本刊 1994 年增刊

《中国骨伤》1994 年增刊(上、下集)已出版。增刊上集以临床为主,选题广泛,内容包括临床论著、实验研究、经验交流、外固定、手法介绍等。集中反映了骨伤科近年来的最新进展。每册定价 27.50 元(另加邮寄费 2.50 元)。

增刊下集为“脊柱性腰腿痛专集”。此刊汇集了参加 1994 年 10 月在浙江杭州市召开的“全国脊柱性腰腿痛专题学术讨论会”各位专家、学者的学术论文 150 篇。内容丰富,学术水平较高。每册定价 20.00 元(包括邮寄费)。

欲购者,请寄款至:100700 北京市东直门内北新仓 18 号《中国骨伤》编辑部收,务请写清收刊者详细地址、姓名及所在地邮政编码,注明“购 1994 年增刊及册数”。另外,本刊 1993 年增刊“骨科外固定专集”尚有余册,每册定价 25.00(含邮寄费)。