

## • 临床研究 •

## 藻酸盐敷料与 mEGF联合应用对难愈性创面 bFGF影响的随机对照试验

毕擎<sup>1</sup>, 夏冰<sup>1</sup>, 朱丹杰<sup>1</sup>, 许励<sup>2</sup>, 邱斌松<sup>1</sup>, 徐文娟<sup>2</sup>, 章水均<sup>1</sup>, 洪剑飞<sup>1</sup>  
(1. 浙江省人民医院骨科, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江省人民医院病理科)

**【摘要】** 目的: 探讨联合应用藻酸盐敷料 (alginate dressing) 与冻干鼠表皮生长因子 (mouse epidermal growth factor, mEGF) 对难愈性创面碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 表达的影响, 评价其疗效。方法: 采用前瞻性、随机、对照设计方法, 选择经常规换药抗炎治疗 1 个月创面仍未愈合的 18 例患者, 年龄 18~61 岁, 平均 36.4 岁; 男 12 例, 女 6 例; 足部 11 例, 小腿 3 例, 手 4 例。随机分成 3 组: 藻酸盐敷料与 mEGF 联合治疗组 (A 组)、mEGF 治疗组 (B 组)、常规治疗组 (C 组), 每组 6 例。治疗 7、14、21、28 d 后评价其创面愈合指数, 7 d 和 14 d 时行活组织检查常规病理学观察, 免疫组织化学 SP 法评定 bFGF 表达阳性细胞数目。结果: A、B 组创面愈合均明显, A 组较 B 组突出 ( $P < 0.05$ )。病理学检查显示: A 组创面修复细胞增殖明显, 表皮增厚, 上皮化活跃; B 组虽也有类似改变, 但不如 A 组显著。免疫组织化学 SP 染色显示: 3 组 bFGF 表达均有上调, 但以 A 组最为显著 ( $P < 0.05$ )。结论: 藻酸盐敷料与 mEGF 联合应用治疗难愈性创面, 能协同两者优势, 较单用 mEGF 疗效更佳。

**【关键词】** 藻酸盐; 表皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 创伤愈合; 随机对照试验

**Effects of alginate dressing and mouse epidermal growth factor combination therapy on expression of basic fibroblast growth factor in patients with refractory wound: a randomized controlled trial** BI Qing<sup>\*</sup>, XIA Bing, ZHU Dan-jie, XU Li, QIU Bin-song, XU Wen-juan, ZHANG Shui-jun, HONG Jian-fei<sup>\*</sup> Department of Orthopaedics, the People's Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310014 Zhejiang, China

**ABSTRACT** **Objective** To explore the influence of alginate dressing and mouse epidermal growth factor (mEGF) combination therapy on expression of basic fibroblast growth factor in patients with refractory wound and evaluate its clinical effect. **Methods** Eighteen patients of skin defects treated by change dressing for one month in this study. There were 12 males and 6 females aged from 18 to 61 years (mean 36.4 years). The wounds occurred at foot in 11, calf in 3 and the hand in 4. The patients were randomly divided into 3 groups (there were 6 cases in every group): alginate dressing and mEGF group (group A), mEGF group (group B) and control group (group C). Wound closure indexes were measured in 7, 14, 21, 28 days. The samples were harvested in 7, 14 days for pathologic examination and the positive staining cells of basic fibroblast growth factor (bFGF) were determined by SP immunohistochemical staining technique. **Results** Wound healing was promoted in group A and group B and the wound closure indexes was increased in group A ( $P < 0.05$ ). Pathological examination showed the epidermis was thicker in group A than that in group B. Treatment by the alginate dressing combined with the mEGF, angiogenesis was active and granulation was enhanced. The expression of the bFGF was shown in the fibroblasts, the blood capillaries and the basal layer of the epidermis in group A, B and C. There was significant difference between group A and group B ( $P < 0.05$ ), group B and group C ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Combination therapy of alginate dressing and mEGF have a better results than that with mEGF only in patients with refractory wound.

**Key words** Alginate; Epidermal growth factor; Basic fibroblast growth factor; Wound healing; Randomized controlled trials

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(10): 659-662 www.zggssz.com

严重创伤常常导致较大面积的皮肤缺损, 如何覆盖这些创面是一个非常重要的课题。临床常用自体皮转移、移植

和同种异体皮、异种皮以及其他生物材料覆盖来消灭创面, 然而这些方法很多患者心理上难以接受, 且存在增加创伤、引起排异反应等弊端。如何促进创面的自我修复来消灭皮肤缺损一直是人们不断探索的难题。我们的研究试图前瞻性地将藻酸盐敷料 (alginate dressing) 与冻干鼠表皮生长因

子 (mouse epidermal growth factor, mEGF) 联合应用于难愈性的皮肤创面, 通过观察其对组织病理和创面碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 表达的影响, 评价其疗效。

1 材料与方 法

1.1 药物、试剂与器材 藻酸盐敷料购自康乐保 (中国) 有限公司, 国药管械 (进) 字 2000 第 1694 号。冻干鼠表皮生长因子购自杭州天目北斗生物制药有限公司 (S19990001), 使用时配制成 5 000 IU/ml 4℃ 冰箱保存。SP 免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂、bFGF 试剂盒等均购自北京中山生物技术有限公司, 其他常用试剂由浙江省人民医院病理科提供。主要设备有德国 Leica 病理系统: RM2135 切片机, ST5020 自动染色机, ASP300 脱水机; 显微摄影系统 (Olympus BX51); MIAS 病理图像分析系统。

1.2 临床资料 因急性创伤所致皮肤缺损创面, 经常规换药抗炎治疗 1 个月仍未愈合, 且创面大于 12 cm<sup>2</sup> 而无感染者, 取得患者同意后纳入本研究。合并有糖尿病、严重心肾功能不全、严重消耗性疾病及其他全身情况较差的患者予以排除。

本组 18 例, 性别、年龄以及创面所在部位等一般资料见表 1。3 组一般资料经统计学分析, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各病例按年龄大小从小到大排序后, 根据随机数目表法分成 3 组: 藻酸盐敷料与 mEGF 联合治疗组 (A 组)、mEGF 治疗组 (B 组)、常规治疗组 (C 组), 每组 6 例。

表 1 各组平均年龄、性别、创面所在部位

Tab 1 The mean age, the sex and the position of the wound in different groups

组别	病例 (例)	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ )	性别 (例)		创面所在部位 (例)		
			男	女	足	小腿	手
A	6	36.6 ± 13.9	4	2	3	2	1
B	6	31.8 ± 12.1	2	4	5	1	0
C	6	40.8 ± 11.0	6	0	3	0	3

1.3 治疗方法 创面彻底清创后, 周围擦拭干净。A 组将 mEGF 以 100 IU/cm<sup>2</sup> 创面均匀喷洒于合适大小藻酸盐敷料上后覆盖; B 组用普通纱布代替藻酸盐敷料如前法处理; C 组用

凡士林纱布贴敷创面, 各组处理完毕后均覆以普通纱布。治疗过程中注意无菌操作。前 1 周左右创面渗出较多, 每日换药, 渗出减少后隔日换药。

1.4 评价指标及方法

1.4.1 取材及标本制备 治疗后 7、14 d 切取少量创面边缘组织, 10% 中性甲醛固定, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋后, 4 μm 厚连续切片备用。

1.4.2 创面愈合指数评定 治疗开始时和治疗后 7、14 d 用透明硫酸纸描记创面面积, 采用称重法计算创面愈合指数。愈合指数 = (治疗前重量 - 治疗后重量) / 治疗前重量

1.4.3 组织病理学观察 石蜡切片常规脱蜡至水后, 用苏木精 - 伊红 (HE) 染色法染色, 光镜下观察。

1.4.4 免疫组织化学染色 石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇液阻断内源性过氧化物酶活性, 10 min 蒸馏水洗 2 次, 各 5 min; 0.01 mol/L 柠檬酸液 (pH 6.0), 92~98℃ 下抗原热修复, 10 min; 冷却后放入 PBS 液; 3% 小牛血清室温下封闭非特异性抗原, 10 min; 滴加 bFGF 一抗, 4℃ 冰箱过夜; PBS 液冲洗后滴加生物素标记的二抗, 37℃ 孵育 30 min; PBS 液洗, 滴加 SP 液 37℃ 30 min; PBS 洗; 镜下控制 DAB 显色; 苏木精复染, 常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明、中性树脂封片, 显微镜下观察。以细胞染色中出现棕色为阳性, 同时设不加一抗的阴性对照。各样本 400 倍光镜下, 随机选择 5 个视野, 每个视野观察 100 个细胞, 统计阳性细胞数。

1.5 统计学分析 用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行统计学处理, 计量资料 ( $\bar{x} \pm s$ ) 均用单因素方差分析  $q$  检验, 计数资料用多个独立样本秩和检验。

2 结果

2.1 创面愈合指数 治疗后 7 d A、B 组均可见创面明显缩小, 与 C 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 14 d 时, A 组与 B 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), A 组有 3 例创面基本完成修复, B 组仅 1 例创面愈合, C 组创面缩小明显不如 A、B 组 ( $P < 0.05$ ); 21 d 时, A 组有 1 个创面未闭合, B 组有 3 例大体上愈合, C 组无一例闭合; 28 d 时, A 组所有创面均已基本愈合, B 组仍有 1 例未能闭合, C 组仅 2 例创口闭合。见图 1 表 2

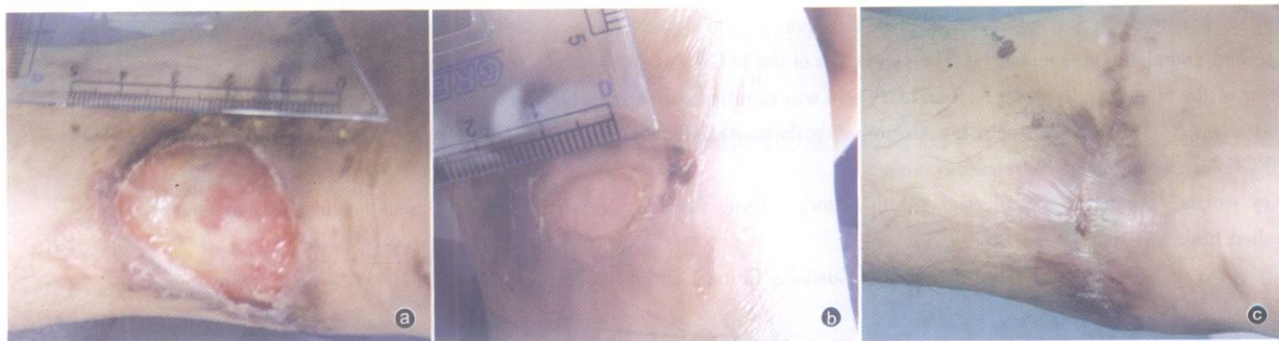


图 1 患者, 男, 车祸伤 ① 皮肤创面经 1 个月常规换药后 ② 经藻酸盐敷料与 mEGF 联合治疗后 7 d 创面, 已明显缩小 ③ 经藻酸盐敷料与 mEGF 联合治疗后 14 d 创面, 已基本完成上皮化, 创面闭合

Fig.1 A male patient was injured in a traffic accident ① the skin defect was treated by dressing changing for one month ② the wound surface obviously decreased after treatment with alginate dressing and mEGF for 7 days ③ the wound had surface had accomplished epithelization and the wound was healed by treatment with alginate dressing and mEGF for 14 days

表 2 不同时相创面愈合指数变化 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The change of the wound closure indexes in different times (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	7 d	14 d	21 d	28 d
A	37.83 ± 4.22 <sup>▲</sup>	85.00 ± 9.10 <sup>▲</sup>	94.33 ± 6.28 <sup>▲</sup>	99.17 ± 1.00 <sup>▲</sup>
B	32.17 ± 4.49 <sup>*</sup>	73.17 ± 7.44 <sup>*</sup>	85.17 ± 9.13 <sup>*</sup>	95.50 ± 5.54 <sup>*</sup>
C	23.83 ± 5.27	54.83 ± 8.45	64.83 ± 6.11	85.00 ± 7.80

注:与 C 组比较, \* P < 0.05; 与 B 组比较, ▲ P < 0.05

Note: Compared with group C, \* P < 0.05 compared with group B, ▲ P < 0.05

**2.2 组织病理学观察** 治疗后 7 d A、B 组均可见创面表皮增厚, 表皮角质增多增粗, 提示上皮再生活跃, 但 A 组还可见组织结构较为完整, 基底细胞层趋于柱状, 结合较为紧密, 成纤维细胞较多, 胶原排列较为有序, 有少量毛细血管生成。而 C 组几乎没有以上变化。治疗后 14 d A 组可见组织结构基本完整, 表皮层角化, 全层趋于修复, 基底细胞更趋于柱状, 成纤维细胞和胶原较前均明显增多, 并由较多毛细血管生成。B 组也有类似改变, 但不如 A 组明显。C 组较前有所改善, 但组织中毛细血管根少, 成纤维细胞数较少, 胶原排列紊乱。

**2.3 免疫组织化学观察** 免疫组织化学 SP 法染色发现, bFGF 染色阳性的细胞主要定位于成纤维细胞和血管内皮细胞。7 d 时, A、B 组 bFGF 染色阳性细胞均开始增多, A 组较为明显 (P < 0.05); 14 d 时, A、B 组阳性细胞表达继续增加, 仍以 A 组增加较为显著 (P < 0.05), C 组略有增多, 但与其与 A、B 组相比差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 2、3、表 3。

表 3 各组 bFGF 阳性染色细胞数变化 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 The change of the number of the positive staining cells of bFGF in different groups (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	7 d	14 d
A	46.50 ± 2.88 <sup>▲</sup>	60.83 ± 3.67 <sup>▲</sup>
B	41.83 ± 3.97 <sup>*</sup>	56.00 ± 3.41 <sup>*</sup>
C	33.50 ± 3.45	43.67 ± 4.32

注:与 C 组比较, \* P < 0.05; 与 B 组比较, ▲ P < 0.05

Note: Compared with group C, \* P < 0.05 compared with group B, ▲ P < 0.05

### 3 讨论

表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 最早是从鼠颌下腺中分离出的一种多肽, 是一种强效细胞增殖因子, 能够加速正常皮肤表皮更新, 促进损伤创面愈合。创伤后局部聚集的血小板释放大量无活性的 EGF, 该前体通过与细胞膜上酪氨酸激酶受体<sup>[1]</sup>或 G 蛋白偶联受体 (G, protein-coupled receptor, GPCR)<sup>[2]</sup>结合后活化, 将刺激信号传入细胞膜内, 经细胞内多种蛋白分子构成的信号传递途径, 将信号传入核内, 激活相应的靶基因, 导致细胞内游离 Ca<sup>2+</sup>增多, 促进糖酵解及 DNA、RNA 和蛋白质的合成, 从而促使与组织修复相关的表皮细胞、真皮成纤维细胞、血管内皮细胞和角化细胞等的分裂、增殖<sup>[3-4]</sup>, 趋化表皮细胞和成纤维细胞向创面迁移, 诱导胶原、聚葡萄糖胺和纤粘连蛋白等细胞外基质的合成与分泌<sup>[5]</sup>, 加速创面愈合。同时, EGF 的激活也能刺激其他内源性生长因子增多, 如碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子 (transforming growth factor

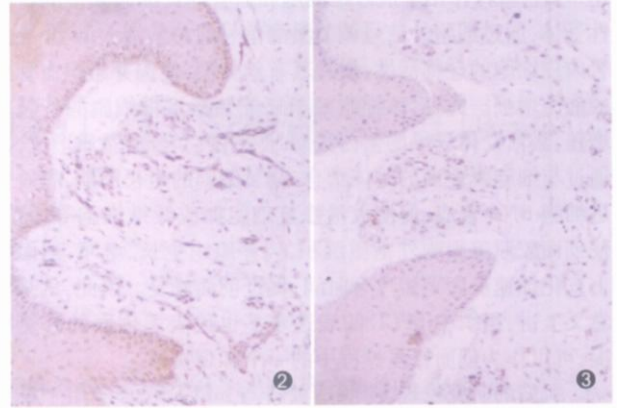


图 2 经藻酸盐敷料与 mEGF 联合治疗 14 d 后的创面, 可见较多成纤维细胞和血管内皮细胞表达 bFGF (× 400)

Fig.2 The expression of the bFGF in the fibroblasts and endothelial cell by treatment with alginate dressing and mEGF for 14 days (× 400)

图 3 经 mEGF 治疗 14 d 后的创面, 成纤维细胞和血管内皮细胞表达 bFGF 较少, 且上皮脚亦较少 (× 400)

Fig.3 The expression of the bFGF in the fibroblasts and endothelial cell by treatment with mEGF only for 14 days (× 400)

TGF) 等等, 以共同促进创面的愈合。

虽然创伤后局部 EGF 的受体大量增加<sup>[6]</sup>, 内源性 EGF 也在创面迅速积聚, 但由于组织中 EGF 的含量本来就较低, 加之创面组织炎症浸润和组织坏死对局部组织 EGF 的释放有一定的抑制作用, 故内源性的 EGF 往往难以满足创伤后组织自身修复过程的需要。于是有学者在创面局部适当的补充外源性 EGF, 与内源性 EGF 协同作用, 同时这样也可促进内源性 EGF 的表达, 从而刺激组织分泌更多的 EGF, 以最大限度地发挥 EGF 本身的生物学作用, 加速创面愈合。

有研究<sup>[7]</sup>表明, EGF 用于创面治疗时, 必须以一定的浓度持续作用于创面才能达到较为理想的结果。EGF 水剂治疗创面往往得不到理想的疗效, 原因之一在于水剂很容易流失, 尤其在一些分泌物较多的创面, 很快被稀释并随分泌物排出。Tanaka 等<sup>[7]</sup>认为 EGF 凝胶剂更适用于创面的治疗, 可在创面表面形成一层薄膜, 具有防止细菌污染的屏障作用。而且凝胶剂在创面停留时间较液体制剂长, 使 EGF 对创面各类细胞有连续刺激作用, 加速创面愈合。此外凝胶剂较为柔和, 可减轻敷料对创面的直接刺激, 它良好的保湿性、润滑性使创面保持一个湿润的环境, 这对创面的愈合是非常有利的<sup>[7-8]</sup>。然而 EGF 凝胶剂由于种种原因, 目前临床上还没有广泛使用。

藻酸盐敷料<sup>[9]</sup>与普通纱布比较非常柔软, 其原料是从海藻中提取的藻蛋白酸, 它是一种类似纤维素的不能溶解的多糖, 在制作敷料时它被转换成一种钙盐。藻酸盐具有极强的吸收性, 能吸收相当于自身重量 20 倍的液体, 能有效控制渗液并延长使用时间。在与伤口接触时, 藻酸盐中的钙离子能置换伤口渗液中的钠离子, 从而在伤口表面形成一层稳定的网状凝胶, 能保持创面湿润且不粘创面, 保护暴露的神经末梢, 减轻疼痛。藻酸盐敷料的这些特点与 EGF 凝胶剂非常相似。

bFGF同 EGF一样在创伤愈合过程中发挥着重要的作用<sup>[10]</sup>,它直接作用于成纤维细胞和血管内皮细胞膜上的特异性受体,通过细胞外信号调节激酶信号通路激活 c-fos介导血管内皮细胞的迁移活性,促进其有丝分裂,使肉芽组织血管生成能力增强。此外,该细胞因子还能刺激多种细胞的分裂与增殖,激活受体分子的蛋白激酶,促进蛋白合成、基质形成,并通过与细胞膜表面的受体结合,调节细胞的生长周期,有效促进细胞 DNA合成,促使大量修复细胞如成纤维细胞等增殖,使创面胶原等细胞外基质沉积,肉芽组织生长、增厚,创面再上皮化加速从而缩短愈合时间,促进创面修复。因此,从某种意义上讲,组织中 bFGF的表达水平也代表了创面的修复状况,可以作为创面修复过程中的一个客观指标。

我们的研究发现,藻酸盐敷料与 mEGF联合应用于难愈性的皮肤缺损创面,能明显上调 bFGF的表达水平,刺激创面肉芽组织及其毛细血管生长,促进创面修复细胞增殖。通过与单独应用 mEGF治疗和常规治疗比较,发现该治疗组合,能协同两者优势,克服 mEGF在创面存留时间短、容易丢失的不足,极大地发挥 mEGF促进创面上皮化的生物学作用,能更好地促进创面的愈合。

参考文献

1 Tran KT, Griffith L, Wells A. Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing *Wound Repair Regen* 2004, 12(3): 262-268.  
 2 Schäfer B, Marg B, Gschwind A. Distinct ADAM metalloproteinases reg-

ulate G protein-coupled receptor induced cell proliferation and survival *J Biol Chem*, 2004 279(46): 47929-47938  
 3 Minura Y, Itoh H, Jinin M, et al Epidermal growth factor affects the synthesis and degradation of type I collagen in cultured human dermal fibroblasts *Matrix Biol* 2006 25(4): 202-212  
 4 Haase J, Evans R, Pofahl R, et al Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by EGF-1 and EGF-dependent signalling pathways *J Cell Sci* 2003 116 3227-3238.  
 5 Minura Y, Itoh H, Jinin M. Epidermal growth factor induces fibronectin expression in human dermal fibroblasts via protein kinase C delta signalling pathway. *J Invest Dermatol* 2004 122(6): 1390-1398.  
 6 Repeytinger SK, Campagnaro E, Fuhrman J et al EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding *J Invest Dermatol* 2004, 123(5): 982-989.  
 7 Tanaka A, Nagate T, Matsuda H. Acceleration of wound healing by gelatin film dressings with epidermal growth factor *J Vet Med Sci* 2005, 67(9): 909-913.  
 8 Eriksson E, Vranckx J. Wound healing from laboratory to patients to gene therapy *Am J Surg* 2004 188: 36-41.  
 9 Bakrishan B, Mohanty M, Umashankar PR, et al Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 2005 26(32): 6335-6342.  
 10 Chodorowska G, Tomczyk M, Glowacka A. Basic fibroblast growth factor (b-FGF)- its biological role in physiologic and pathologic conditions *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska* 2004, 59(1): 286-291.

(收稿日期: 2006-10-10 本文编辑: 李为农)

## 《中国骨伤》2008年征订启事

《中国骨伤》杂志是中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的国家级专业性学术期刊,是中国期刊方阵双奖期刊。本刊办刊宗旨是坚持中西医并重原则,突出中西医结合特色,执行理论与实践、普及与提高相结合的方针。主要报道中医、西医和中西医结合在骨伤科领域的科研成果、理论探讨和临床诊疗经验,反映我国骨伤科在医疗、科研工作中的新进展,以促进国内外骨伤科的学术交流。

本刊主要设有专家述评、临床研究、基础研究、骨伤论坛、学术探讨、影像分析、诊治失误、经验交流、文献综述、手法介绍、继续教育园地、科研思路与方法、临床病例报告、国内外骨伤科医学动态以及医学书刊评价等栏目。

凡订阅本刊并参加继续教育园地试题答题者可获继续教育I类学分。

本刊为月刊,每月25日出版,期刊内页采用80g亚光铜版纸彩色印刷,国际通用16开大版本,80页,单价12.00元,全年价144.00元。国内外公开发行,全国各地邮局订阅,邮发代号:82-393。如错过征订机会,杂志社亦可代办补订(请直接汇款至杂志社),国内订户我们将负责免费邮寄。

地址:北京东直门内南小街甲16号《中国骨伤》杂志社,100700

电话:(010)84020925,64014411-2693 传真:(010)84036581

http://www.zggszz.com E-mail:zggszz@sina.com