

· 基础研究 ·

十宝散促进软组织损伤修复过程中 b-FGF 及 TGF- β_1 表达的实验研究

赵道洲¹, 史文字¹, 张鹏贵², 张春雷²

(1. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃中医学院)

【摘要】 目的: 观察中药十宝散对家兔的软组织损伤模型中创面肉芽组织 b-FGF 及 TGF- β_1 表达的影响, 从分子水平探讨中药外用制剂促进软组织修复的机制。方法: 采用经典的全层皮肤切割伤造模, 用 8% 硫化钠脱去术野皮肤, 常规消毒, 硫苯妥钠 30 mg/kg 腹腔内麻醉。剪开皮肤, 钝性剥离以暴露腓肠肌, 在距肌腱止点 1/3 处用手术刀做不完全锐性切割, 做一长 0.8 cm, 宽 0.4 cm 的切口, 压迫止血。治疗组外敷十宝散并包扎, 清洁换药组常规清洁换药, 空白组仅换敷料。收集不同时期的肉芽组织, 高倍镜下进行病理切片观察, 用 SABC 法检测创面中 b-FGF 及 TGF- β_1 蛋白表达, 在 400 倍光镜下观察, BI-2000 图像分析系统分析, 结果以平均灰度值表示。结果: 在同一取材的条件下, 3 组 b-FGF 蛋白表达在创伤后 6 d 存在差异 ($P < 0.05$), TGF- β_1 蛋白表达在创伤后 10、14 d 存在差异 ($P < 0.05$)。同时, 肉芽组织的生长状况在同一时期取材时间的条件下存在组间不同, 在不同取材时间的条件下存在组内差异。结论: 本实验证明中药十宝散能够通过刺激创面内细胞产生内源性生长因子, 进而促进创面的修复。

【关键词】 软组织损伤; 伤口愈合; 中药疗法; 成纤维细胞生长因子; 转化生长因子 β

Effects of Shibao Powder (十宝散) on promoting the expression of b-FGF and TGF- β_1 in the repair of soft tissue injuries ZHAO Dao-zhou*, SHI Wen-yu, ZHANG Peng-gui, ZHANG Chun-lei. *The TCM Hospital of Gansu, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of Shibao Powder (十宝散) on the expression of b-FGF and TGF- β_1 in granulation tissues of rabbit models with soft tissue injuries, so as to explore mechanism of external Chinese drugs for repairing of soft tissues in molecular levels. **Methods:** The rabbit models were established by classical method of full-thickness skin wounds. After 8% sodium sulfide was used and routine disinfection completed, intra-peritoneal anaesthesia was adopted. The skin was cut to expose gastrocnemius muscle, and incomplete sharp dissection was made near the tendon insertion. The length of the incision was 0.8 cm and the width was 0.4 cm. The rabbits in the experimental group were treated with spread of Shibao Powder (十宝散) at the wound; the rabbits in clean group were treated with routine dressing changes and disinfection; and the rabbits in the control group were treated with dressing changes only. The granulation tissues in different stages were collected and observed with high power microscope. The expression of Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1) protein and b-FGF protein in wound tissues were detected using StreptA-ridin-Biotin-Complex (SABC) method. **Results:** The results showed that the expression of b-FGF protein had significant differences among 3 groups at the 6th day after trauma ($P < 0.05$). The TGF- β_1 protein expression also had significant differences among 3 groups at the 10th and 14th days after trauma ($P < 0.05$). At the same time, the growth states of granulation tissues had difference among 3 groups at the same trauma stage, and within the same group among different trauma stages. **Conclusion:** This experimental study shows that Shibao Powder (十宝散) is effective to promote the repair of soft tissues after trauma by stimulating production of endogenous growth factor from cells in wound.

Key words Soft tissue injuries; Wound healing; Treatment with Chinese herbs; Fibroblast growth factor; Transforming growth factor beta

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(9):667-668 www.zggszz.com

骨骼肌损伤后的修复一直是研究的重点, 而开放性软组织损伤的治疗已成为目前面临的主要课题, 我们从分子生物

学水平进一步研究十宝散的作用机制, 证明中药十宝散能够通过刺激创面内细胞产生 b-FGF 及 TGF- β_1 进而促进创面的修复, 为临床推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 日本大耳白兔 30 只, 均为成年雄性, 体重为

基金项目: 甘肃省科技厅科学事业费资助项目 (编号: QS061-C33-21)

通讯作者: 赵道洲 Tel: 0931-2359221 E-mail: swy_tony@163.com

表 1 十宝散对 b-FGF, TGF-β₁ 表达的蛋白平均灰度值的影响(̄x±s)

Tab.1 Effects of Shibao Powder(十宝散) on average grey scale value of b-FGF and TGF-β₁(̄x±s)

组别	动物数 (只)	灰度值					
		b-FGF			TGF-β ₁		
		6 d	10 d	14 d	6 d	10 d	14 d
治疗组	10	121.514±3.441	134.211±12.325	142.211±11.233	126.655±3.521	131.522±5.639	140.186±7.231
清洁组	10	146.233±3.564	135.213±6.321	141.386±5.327	122.451±5.786	135.455±6.717	145.215±8.963
空白组	10	133.214±5.789	138.211±8.964	136.954±6.716	121.507±4.630	142.182±10.811	148.321±12.842

(2.05±0.15) kg, 兰州生物制品研究所动物实验中心提供(合格证证书第 14-004 号)。

1.2 实验试剂及用药 十宝散: 组成成分包括煅龙骨 15 g, 海螵蛸 15 g, 赤石脂 10 g, 乳香 15 g, 没药 15 g, 血竭 15 g, 儿茶 10 g, 冰片 10 g 等, 由甘肃省中医院提供, 生产批号为甘卫普制准字(94)113-4 号。SABC 免疫组化试剂染色盒(产品编号: SA1022-兔 IgG, 武汉 Boster 公司)。EGF 抗体(产品编号: BA0290, 0.1 ml 200 μg/ml, 武汉 Boster 公司), DNA 显色试剂盒, b-FGF(产品编号: SA1022-兔 IgG, 武汉 Boster 公司), TGF-β₁(产品编号: SA1022-兔 IgG, 武汉 Boster 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及饲养 实验动物由培育室转移至实验操作间, 进行适应性饲养。将家兔称重编号随机分组: 十宝散组 10 只, 清洁换药组 10 只, 空白组 10 只。单笼(40 cm×40 cm×60 cm)饲养, 普通饲料喂养, 饮水, 定期清洁逐个笼具, 保持室内适宜温度、湿度及卫生清洁(由兰州陆军总院动物实验室饲养)。

1.3.2 模型制作^[1] 8%硫化钠脱去术野皮肤, 常规消毒, 硫苯妥钠 30 mg/kg 腹腔内麻醉, 剪开皮肤, 钝性剥离以暴露腓肠肌, 在距肌腱止点 6.5 cm 处用手术刀做不完全锐性切割。做一长 0.8 cm, 宽 0.4 cm 的切口, 压迫止血, 十宝散组外敷十宝散并包扎, 清洁换药组常规清洁换药, 空白组造模后定期取材。

1.3.3 取材 治疗组(十宝散组)在创面清洁换药完备后予十宝散, 阳性对照组(清洁换药组)单纯清洁换药, 空白组(未治疗)仅换敷料即可。造模后第 2 天开始第 1 次治疗, 换药, 每隔 2 d 1 次, 于第 6, 10, 14 天每隔 4 d 分别取材, 在取材后同时治疗, 换药。取材后 10%甲醛固定标本, 脱水后进行常规石蜡制作并切片备用。

1.4 观测指标及方法 采用 SABC 免疫组化试剂染色对各切片进行 b-FGF 及 TGF-β₁ 蛋白含量检测。逐步进行如下操作: 切片常规脱蜡至水; 30% H₂O₂ 1 份+蒸馏水 10 份混合, 室温 5~10 min 以灭活内源性; 热抗原修复; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体, 不洗; 滴加适度一抗(兔 IgG), 4 ℃过夜。PBS(pH 7.2~7.6)洗 2 min, 3 次; 滴加适度二抗(生物素化山羊抗兔 IgG), 20~37 ℃ 20 min。PBS(pH 7.2~7.6)洗 2 min, 3 次; 滴加试剂 SABC, 20~37 ℃ 20 min。PBS(pH 7.2~7.6)洗 5 min, 4 次; DAB 显色, 使用 DAB 显色试剂盒(AR1022)。取 1 ml 蒸馏水, 加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片。室温显色, 镜下控制反应时间, 一般在 5~

30 min。标本着色与显色时间有关, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 400 倍镜下观察。BI-2000 图像分析系统分析, 结果以平均灰度值表示。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件, 3 组间灰度值比较采用单因素 3 水平方差分析, 各组间比较进行 Daunt-t 检验。

2 结果

3 组在不同时期促进肉芽组织中 b-FGF 及 TGF-β₁ 表达的灰度分析结果见表 1。由表 1 得出: 对于 b-FGF 表达, 在兔创伤后 6 d 治疗组与空白组、清洁组比较差异均有统计学意义, F=59.065, P<0.05, 说明伤后 6 d 中药十宝散促进了 b-FGF 的表达。创伤后 10、14 d 3 组灰度值比较差异无统计学意义, 对 b-FGF 表达的影响无明显差别。对于 TGF-β₁ 的表达, 在兔创伤后 10、14 d 显示治疗组与空白组、清洁组比较差异有统计学意义, F=58.154, P<0.05, 说明伤后 10、14 d 中药十宝散促进了 TGF-β₁ 的表达。创伤后 6 d 显示治疗组与空白组、清洁组 TGF-β₁ 表达差异无统计学意义。

3 讨论

十宝散是甘肃省中医院治疗软组织损伤的验方, 能活血化瘀、煨脓长肉、祛腐生肌, 其中冰片能清热解毒、防腐生肌; 乳香、没药, 活血止痛、消肿生肌; 血竭, 化瘀止血, 生肌敛疮。龙骨, 煨用研用, 吸湿敛疮, 生肌。海螵蛸、赤石脂, 收敛止血、敛疮生肌。研究表明, b-FGF 是一种多种生物学活性的创伤愈合因子^[2]。在皮肤创面的愈合过程中, 肌成纤维细胞的分布影响着伤口的收缩及愈合^[3]。外用 b-FGF 能增加创面中 TGF-β₁ 含量^[4], 使成纤维细胞转变为成肌纤维细胞, 成肌纤维细胞参与 ECM 沉积, 创面收缩加快, 愈合时间缩短。十宝散刺激创面各种细胞, 促使产生各种生长因子, 不同时期不同生长因子表达规律不同, 在创伤修复中依据机体需要调节不同生长因子的表达, 使软组织修复的速度和质量提高, 促进修复。

参考文献

- 付小兵, 孙同柱, 盛志勇. 几种用于创伤修复研究的动物模型. 中华实验外科杂志, 1999, 16(5): 479-480.
- 巫国辉, 李小林. 重组人表皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子联合应用促进创面愈合. 整形再造外科杂志, 2005, 4(2): 233.
- 毕国华. 碱性成纤维细胞生长因子促进皮肤创伤愈合的动物实验研究. 黑龙江医学, 2003, 27(4): 273-275.
- 刘志君, 徐辉. 转化生长因子 β 与创伤愈合. 重庆医学, 2004, 33(6): 927-929.

(收稿日期: 2007-11-09 本文编辑: 连智华)