

· 基础研究 ·

健脾益气法对严重创伤软组织损伤创面组织中碱性成纤维细胞生长因子和表皮生长因子的影响

何利雷, 陈逊文, 朱永展

(佛山市中医院骨科, 广东 佛山 528000)

【摘要】 目的: 采用眼眶静脉放血结合刀割法制备严重创伤的动物模型, 观察创面修复过程中创面组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)以及表皮生长因子(EGF)表达, 研究健脾益气法促进严重创伤大鼠软组织修复可能的作用机制。方法: 40 只 SD 健康成年大鼠, 采用眼眶静脉放血结合刀割法制备严重创伤软组织损伤模型, 然后将存活大鼠(33 只)随机分为健脾益气组、活血化瘀组、模型组。各组大鼠均在第 3、7、14 天取部分创面及少许周围的正常皮肤, 采用免疫组织化学染色后观察创面肉芽组织中 bFGF 和 EGF 表达。结果: 造模后 3、7、14 d, 健脾益气组、活血化瘀组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 表达均较模型组大鼠创面组织中的含量明显增强。与活血化瘀组相比较, 造模后 3、7 d, 健脾益气组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 含量较高($P < 0.05$); 但造模后 14 d, 两组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 的含量无明显差异($P > 0.05$)。结论: 健脾益气法具有增强严重创伤软组织损伤创面组织中 bFGF 和 EGF 表达的作用。

【关键词】 健脾益气; 软组织损伤; 碱性成纤维细胞生长因子; 表皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.07.018

Effect of reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) in the expression of bFGF and EGF in treating serious soft tissue injury HE Li-lei, CHEN Xun-wen, ZHU Yong-zhan. Department of Orthopaedics, Foshan Hospital of TCM, Foshan 528000, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: Using the method of bleeding from the orbital vein and lancing to make the animal model of trauma, and to observe the influence of reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) in the expression of bFGF and EGF in the reparative process of raw surface, in order to explore the possible mechanism of reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) in promoting the rehabilitation of soft tissue. **Methods:** Forty healthily adult SD rats were made to be traumatic model using the method of bleeding from the orbital vein and lancing. After operation, there were 33 rats survival, which were divided into the reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) group, the activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group and the model group randomly. The raw surface and ambient normal skin were taken at the 3rd, 7th and 14th days after operation to detect the expression of bFGF and EGF by immunohistochemical method. **Results:** At the 3rd, 7th and 14th days after operation, the expression of bFGF and EGF in the tissue of raw surface of the reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) group and the activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group was obviously higher than that of the model group ($P < 0.05$). Compared with the activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group, the expression of bFGF and EGF in the tissue of raw surface of the reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) group was higher ($P < 0.05$) in the 3rd and 7th day after operation. But in the 14th after operation, there was no significantly difference between reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) group and activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group. **Conclusion:** The method of reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气) can efficiently promote the expression of bFGF and EGF in raw surface of serious soft tissue injury.

Key words Reinforcing *Qi* strength spleen (健脾益气); Soft tissue injury; bFGF; EGF

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(7): 530-533 www.zggszz.com

创伤后的组织修复是医学中最古老的课题之一。近年来随着工业和交通的快速发展, 机械化程度的日益提高, 车祸、工伤也越来越多, 并且伤情也越来越严重和复杂。其中严重复合伤造成大量出现软

组织缺损、骨质外露、功能丧失, 成为骨伤科中的难治之症。其中相当一部分创伤患者合并软组织损伤, 软组织损伤修复时间和修复率直接影响到创伤整体的修复。目前软组织修复已成为国外医学界研究的重点课题之一, 且再次受到国内医学界的重视。中医药治疗此类疾病有一定的优势, 而“脾主四肢、肌肉”理论是中医理论的重要组成部分, 在骨折、筋伤或骨

基金项目: 广东省中医药管理局资助项目(编号: 101007)

通讯作者: 何利雷 E-mail: helilei_2001_0_0@163.com

科杂病中都有广泛应用^[1]。健脾益气中药有促进严重创伤软组织损伤修复的作用^[2-3],但其作用机制尚不明确,本文通过研究健脾益气法对严重创伤软组织修复及其创面组织中 bFGF 和 EGF 含量的影响以探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 水合氯醛(上海五联化工厂,批号:20070613), 安尔碘(上海利康消毒高科技有限公司,批号:20070428), 水溶性封片剂(中国广州晶美公司,批号:095072), 兔纤维母细胞生长因子 2、兔表皮生长因子、SABC(兔 IgG)-POD 试剂盒(批号:BA0437)和 DAB 显色试剂盒均由中国武汉博士德生物技术有限公司提供。Leica DMRA 显微镜, DC200 扫描仪, Leica Qwin550 图像分析系统, 光学显微镜(Olympus BX50 生物组织显微镜)。

1.2 中药水煎液组成及制备方法 参苓白术散加减组成: 桔梗 15 g, 党参 20 g, 白术 20 g, 云苓 40 g, 甘草 6 g, 薏苡仁 30 g, 砂仁(后下)20 g, 扁豆 30 g, 淮山 20 g, 黄芪 30 g。桃红四物汤组成及剂量: 桃红四物汤按 21 世纪课程教材《方剂学》中提供诸药剂量比例称量, 由桃仁、红花、当归、熟地、川芎、芍药组成。将参苓白术散加减的组成药物置于瓦质煮药罐中, 加水适量, 文火煎 30 min, 煎 2 次, 过滤后合并滤液, 再进行浓缩, 配制成 100% 口服液(每毫升中含生药 1 g)。桃红四物汤的煎药法同前。

1.3 动物模型的制备与分组方法 健康成年 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 月龄 2.5 个月, 体质量 180~200 g, 由广州中医药大学动物实验中心提供(动物许可证号: SCXK 粤 2003-0001)。饲养环境安静, 室温 18~30 °C, 自然照明。

采用眼眶静脉放血^[4]结合刀割法制作严重创伤软组织损伤大鼠模型。造模前, 大鼠禁食、禁水 6 h。造模时, 称量大鼠体重, 予 10% 水合氯醛腹腔注射全身麻醉(按 3.5 ml/100 g 体重)。麻醉成功后, 眼眶静脉取血。取血量为总血量的 20%。其计算公式为: 取血量=动物体重(g)×77.8×10⁻³ ml/g×20%。将实验大鼠左侧后腿部外侧及左臀部毛脱去, 用 0.2% 肥皂水清洁, 再用安尔碘进行消毒。然后用手术刀及眼科剪在大鼠的左侧臀部及左侧后腿部外侧制备 1 个圆形创面, 直径为 3 cm, 去除表皮、真皮和皮下结缔组织, 深至肌层, 使之形成一个“急性、开放、渗血”的创面。由于大鼠皮肤的张力作用, 将大鼠表皮及皮下组织切除后, 创面面积扩大为约 10 cm²。术后创面外敷无菌生理盐水湿纱布, 干纱布块压迫止血包扎固定。造模后所有大鼠单笼饲养, 饲养环境安静, 室温维持在 25 °C, 自然照明。术后 6 h 后正常进食和水。本组术

后 24 h 内死亡 7 只, 存活 33 只。将存活的大鼠编号后采用查数字表法随机分为 3 组, 每组 11 只, 分别为模型组、健脾益气组和活血化瘀组。

1.4 治疗方法 术后第 1 天即开始给药。健脾益气组: 根据大鼠体重, 按 2 ml/100 g 体重灌服 100% 参苓白术散加减水煎液, 每日 1 次。活血化瘀组: 根据大鼠体重, 按 2 ml/100 g 体重灌服 4.6 g 生药/20 ml 浓度的桃红四物汤水煎液, 每日 1 次。模型组: 根据大鼠体重, 按 2 ml/100 g 体重灌服蒸馏水, 每日 1 次。3 组大鼠均灌服药物或蒸馏水至创面愈合(创面完全上皮化)为止。

1.5 指标观察与方法

1.5.1 创伤后大鼠是否出现脾虚的症状体征 术后即开始观察实验大鼠是否出现脾虚的症状体征, 于术后第 3 天记录各组大鼠出现不同症状或体征的动物只数。

1.5.2 大体观察 每日观察各组大鼠创面色泽、颜色及表面渗液情况、肉芽组织生长情况以及表皮增生修复情况。

1.5.3 组织取材及 bFGF 和 EGF 表达检测 各组大鼠均在第 3、7、14 天, 于创面取部分创基及少许周围正常皮肤, 立即用 10% 甲醛固定 24~48 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 进行免疫组织化学染色后, 每张切片在 10 只 20 倍光镜下随机观察每一组动物同一部位切片, 选择 5 个不重复视野进行观察, 并联接图像分析系统, 测出每张切片内创伤组织 EGF、bFGF 染色百分比, 即染色面积。阳性物质在胞浆(膜上)内呈棕黄色细颗粒状, 细胞核为浅蓝色, 阴性对照为阴性。按染色后的阳性细胞显色强度将其分为无色、淡黄、黄色、棕黄色, 分别计为 0、1、2、3 分。然后将染色面积和染色强度相乘以计算出染色指数。如在同一切片中存在不同评分标准的视野, 则取最大值和最小值的平均值作为其染色指数评分。

1.6 统计方法 SPSS 11.0 软件包进行统计学处理, 用方差分析比较 3 组创面组织 bFGF 蛋白表达阳性染色指数和 EGF 蛋白表达阳性染色指数, 两组间数据比较采用 *q* 检验。3 组症状体征的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 3 组大鼠创伤后症状体征的比较 术后即开始观察实验大鼠是否出现脾虚的症状体征, 于术后第 3 天记录各组中大鼠出现不同症状或体征的动物只数并进行统计学处理(见表 1)。结果显示所有实验大鼠均出现了不同程度的脾虚症状和体征, 3 组大便溏泄、倦怠乏力和萎靡嗜睡的大鼠比较, 3 组间

表 1 3 组大鼠创伤后第 3 天症状比较(只)

Tab.1 Symptom of rats at the 3rd day after operation among three groups (rat)

组别	鼠数	食量减少	体重下降	大便塘泄	倦怠乏力	毛发不荣	萎靡嗜睡	眯眼	卷缩
模型组	11	11	11	3	10	11	10	9	8
健脾益气组	11	11	11	3	9	11	11	8	8
活血化瘀组	11	11	11	9	9	11	10	9	9

表 2 3 组大鼠创面组织 bFGF 和 EGF 蛋白的表达阳性染色指数的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Positive dye index of proteinic expression in tissue of raw surface of rats among three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 (只)	bFGF 蛋白表达阳性染色指数			EGF 蛋白表达阳性染色指数		
		术后第 3 天	术后第 7 天	术后第 14 天	术后第 3 天	术后第 7 天	术后第 14 天
模型组	11	9.36±2.20	10.42±2.47	9.81±2.46	11.24±2.03	10.58±2.31	10.69±2.57
健脾益气组	11	19.95±4.37*♦	22.04±5.12*◇	20.36±3.97▲□	24.87±5.54*△	25.16±5.06*▽	20.43±4.90▲▼*
活血化瘀组	11	14.01±3.22**	16.26±3.74*	18.90±3.94▲	17.08±4.26**	18.12±4.83*	19.51±3.94▲

注:术后 3 d,与模型组比较,* $P=0.000\ 0<0.05$;与活血化瘀组比较,♦ $P=0.001\ 7<0.05$,△ $P=0.001\ 4<0.05$ 。术后 7 d,与模型组比较,* $P=0.000\ 0<0.05$;与活血化瘀组比较,◇ $P=0.006\ 7<0.05$,▽ $P=0.003\ 3<0.05$ 。术后 14 d,与模型组比较,▲ $P=0.000\ 0<0.05$;与活血化瘀组比较,□ $P=0.396\ 9>0.05$,▼ $P=0.632\ 7>0.05$ 。与健脾益气组术后 7 d 相比较,* $P=0.037\ 6<0.05$

Note: At the 3rd day after operation, compared with model group, * $P=0.000\ 0<0.05$; compared with activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group, ♦ $P=0.001\ 7<0.05$, △ $P=0.001\ 4<0.05$. At the 7th day after operation, compared with model group, * $P=0.000\ 0<0.05$; compared with activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group, ◇ $P=0.006\ 7<0.05$, ▽ $P=0.003\ 3<0.05$. At the 14th day after operation, compared with model group, ▲ $P=0.000\ 0<0.05$; compared with activating blood circulation to dissipate blood stasis (活血化瘀) group, □ $P=0.396\ 9>0.05$, ▼ $P=0.632\ 7>0.05$. Compared with reinforcing Qi strength spleen (健脾益气) group at the 7th day after operation, * $P=0.037\ 6<0.05$

差异无统计学意义($P=0.332>0.05$)。

2.2 创面一般情况 手术后即刻 3 组大鼠创面内全层皮肤和皮下组织去除,暴露出白色筋膜,小血管丰富,少量渗血。模型组大鼠创面渗液较多,创面色泽暗红、肿,周围红肿,肿胀消退慢;术后 7 d 大部分创面组织仍为质软的肌肉组织;14 d 后组织出现少量质软、易碎的肉芽组织,但上皮生长较少,毛发长出较少。健脾益气组和活血化瘀组大鼠创面鲜活,渗液少,周围红肿消退快;7 d 后创面组织即见较多质软、易碎的肉芽组织;14 d 后大鼠创面完全被新生肉芽组织覆盖,大部分有上皮生长,可见有较多毛发长出。术后 17 d 模型组大鼠创面仍有少许渗液,而健脾益气组和活血化瘀组大鼠创面已基本结痂。3 组大鼠创面愈合过程中均未见明显感染症状。

2.3 免疫组织化学染色检查 bFGF 及 EGF 蛋白表达 结果见表 2。在术后 3、7、14 d,健脾益气组和活血化瘀组大鼠创面组织中 bFGF 蛋白和 BGF 蛋白表达阳性染色指数均分别较模型组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 表达阳性染色指数明显提高 ($P<0.05$)。在术后第 3、7 天,健脾益气组大鼠创面组织中 bFGF 蛋白和 EGF 蛋白表达阳性染色指数亦分别较活血化瘀组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 表达阳性染色指数高($P<0.05$);但术后第 14 天,健脾益气组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 表达阳性染色指数分别与活血化瘀组大鼠创面组织中 bFGF 和 EGF 表达阳性染色指数相比较无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 严重创伤可致脾虚 软组织损伤属于传统医学“筋伤”的范畴,局部筋脉损伤,血溢脉外,凝滞于局部,脉络不通,从而导致气滞血瘀。中药治疗提倡三期辨证施治,早期以活血化瘀为主。但若为创伤严重患者,其伤气、伤血,脾气虚脱。笔者早期研究发现 ICU 病房中严重创伤患者出现脾虚症状的比例高达 96%,一般创伤患者出现脾胃虚弱的比例达 29.6%^[2]。本研究结果亦显示所有实验大鼠出现了不同程度的脾虚症状和体征,故对于严重创伤致脾虚者应予以健脾益气法治疗,而不宜单纯采用局部辨证而仅用活血化瘀药物。

3.2 参苓白术散有促进软组织修复的作用 参苓白术散为健脾益气的代表方药之一。其中人参具有抗应激、抗缺血、双向调节血压、降血糖、减轻疲劳、强心、保护心肌等作用^[5-9]。茯苓具有增强免疫功能(包括细胞免疫、体液免疫)、抗菌、抗炎、抗病毒、利水消肿、保护肝脏、减低胃酸分泌、抗衰老等作用^[10]。白术具有调节胃肠、增强免疫功能、抗衰老、降糖、利尿、抗菌等作用^[11]。而扁豆亦具有促进肌体防御机能并有抗菌、抗病毒、升高白血球的作用。诸药合用,具有显著的健脾益气的作用,可通过多种途径起到促进软组织修复的作用。

3.3 健脾益气法可增强创面组织中 bFGF 和 EGF 的表达 bFGF 是体内分布广泛的生长因子之一。bFGF 在创面修复过程中起重要作用,可以促进新生

血管形成,促进血管平滑肌细胞、内皮细胞增生,参与炎症反应和损伤修复,促进创伤愈合、软组织的修复,可增加肉芽组织的沉淀,同时伴随有大量的血管增生现象和细胞基质中暂时性葡萄糖氨基多糖的出现,增加表皮再生。本研究结果表明健脾益气法可促进严重创伤软组织损伤的创面组织中 bFGF 的表达,并使其保持在较高的水平,从而可起到促进创面愈合的作用。另外,活血化瘀法亦可促进严重创伤软组织损伤的创面组织中 bFGF 的表达来促进创面愈合,但不及健脾益气法作用明显。因此健脾益气组与活血化瘀组大鼠创面组织中 bFGF 表达均较模型组明显增强,但术后第 3 天和第 7 天,活血化瘀组创面组织中 bFGF 表达较健脾益气组弱。

EGF 广泛存在于人体多种组织,具有促进角化细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞等的生长作用,在创伤修复中有一定的作用。其可加速创面肉芽组织生成和上皮细胞增殖,加速完成损伤的修复和再生,加快伤口愈合,使表皮细胞完整覆盖,缩短创伤的愈合时间。内源性 EGF 参与了创面修复细胞的增殖与分化并在创面修复中起重要作用,如果我们采取有效措施使创面组织细胞的内源性 EGF 增多,则很有可能促进创面愈合的过程。本研究结果显示:在创伤早、中期,健脾益气法能增强创面组织中的 EGF 表达。这说明健脾益气法可通过增强创面组织中 EGF 的表达来促进创面愈合。在创伤早、中期,活血化瘀法亦能增强创面组织中 EGF 的表达,但增加幅度不及健脾益气组明显。另外,健脾益气法可以使创伤模型大鼠创面组织中 EGF 表达快速达到峰值后(造模后第 7 天即达到峰值)又逐渐下降,从而加速创面的愈合。因此,在术后第 14 天,健脾益气组大鼠创面组织中 EGF 表达较第 7 天明显降低,而模型组和活血化瘀组大鼠创面组织中 EGF 的表达还处于上升趋势。该结果与相关研究发现的健脾益气

法可使创伤模型大鼠创面新生毛细血管和成纤维细胞快速达到峰值后(造模后第 10 天即达到峰值)又逐渐下降的结果相一致^[3]。

4 结论

健脾益气法具有增强严重创伤软组织损伤创面组织中 bFGF 和 EGF 表达的作用,通过调节创面组织中 bFGF 和 EGF 的表达来促进创面愈合的作用。该作用可能是健脾益气法促进严重创伤软组织损伤修复的作用途径之一,但其具体的作用机制尚不明确,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 陈逊文,李伟强,朱永展.陈渭良教授岭南伤科治疗体系及其应用探要[J].中医药学刊,2004,22(8):1387-1397.
- [2] 陈逊文,朱永展,陈志维,等.“脾主四肢、肌肉”的理论治疗开放损伤的临床观察[J].中华中医药杂志,2005,20(增刊):165-166.
- [3] 陈逊文,朱永展,陈志维,等.健脾益气法治疗严重软组织损伤的实验研究[J].中国骨伤,2008,21(9):664-666.
- [4] 韩健,梁华平.严重创伤对小鼠体内单核细胞向树突状细胞分化及迁移过程的影响[J].创伤外科杂志,2007,9(1):36-39.
- [5] 王光明,王志高.参苓白术散配方颗粒与剂剂对脾虚糖尿病小鼠小肠推进运动的影响[J].药物研究,2008,17(16):25-26.
- [6] 赖红,王铁民,赵海花,等.人参皂苷对老龄大鼠海马结构胆碱能纤维的影响[J].解剖学杂志,2006,29(2):249-251.
- [7] 孙艳,冯立,王洪军,等.人参多糖对 HCG 诱导黄体与颗粒细胞功能的影响[J].时珍国医国药,2007,18(8):1925-1926.
- [8] 冯立,褚征,孙艳,等.人参多糖对低温应激大鼠颗粒细胞与卵母细胞的调节[J].中国微生态学杂志,2007,19(3):256-258.
- [9] 尚文斌,杨颖,姜博仁,等.人参皂苷 Rb1 促进 3T3-L1 脂肪细胞分化并抑制脂解[J].中华内分泌代谢杂志,2007,23(3):258-263.
- [10] 张敏,高晓红,孙晓萌,等.茯苓的药理作用及研究进展[J].北华大学学报(自然科学版),2008,9(1):63-68.
- [11] 宿廷敏,王敏娟,阮时宝.白术的化学成分及药理作用研究概述[J].贵阳学院学报(自然科学版),2008,3(2):32-35.

(收稿日期:2010-03-08 本文编辑:连智华)

广告目次

- | | |
|---|---|
| 1. 盘龙七片(陕西盘龙制药集团有限公司)..... (封2) | 6. 施沛特(山东福瑞达医药集团公司)
..... (对中文目次2) |
| 2. 曲安奈德(广东省医药进出口公司珠海公司)
..... (封3) | 7. 颈复康颗粒、腰痛宁胶囊(承德颈复康药业集团有限公
司)..... (对英文目次1) |
| 3. 消痛贴膏(西藏奇正藏药股份有限公司)..... (封底) | 8. 金乌骨通胶囊(贵州盛世龙方制药公司)
..... (对正文首页) |
| 4. 祛风止痛胶囊(咸阳步长制药有限公司)..... (对封2) | |
| 5. 腰痹通胶囊、抗骨增生胶囊(江苏康缘药业)
..... (对中文目次1) | |