

清凉膏促进肛肠术后感染切口愈合的机制研究

徐利, 代群, 葛琼翔, 林国强(浙江中医药大学附属第一医院肛肠外科, 杭州 310006)

摘要: 目的 观察清凉膏对肛肠手术后感染切口肉芽组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管紧张素-2(angiotensin-2, ANG-2)、CD34 的表达和羟脯氨酸含量的影响。方法 42 例肛肠手术患者随机分为对照组和清凉膏组, 对照组患者术后创面用凡士林纱条外敷, 清凉膏组用清凉膏纱条外敷, 术后第 3, 7, 14 天取创面肉芽组织检测 VEGF、ANG-2、CD34 的表达和羟脯氨酸含量。结果 术后治疗第 7, 14 天的肉芽组织与治疗第 3 天比较, 对照组和清凉膏组中 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白的表达和羟脯氨酸含量逐渐增多($P<0.05$); 术后治疗第 3, 7 天, 清凉膏组与对照组在创面肉芽组织中 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白表达和羟脯氨酸含量无明显差异; 术后第 14 天, 清凉膏组与对照组比较, 创面肉芽组织中 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白表达和羟脯氨酸含量明显增多($P<0.05$)。结论 清凉膏可能通过促进 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白的表达和促羟脯氨酸含量增加发挥促进创面愈合的作用。

关键词: 清凉膏; 肛肠术后感染切口; 血管内皮生长因子; 血管紧张素-2; CD34; 羟脯氨酸

中图分类号: R969.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)07-0952-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.005

引用本文: 徐利, 代群, 葛琼翔, 等. 清凉膏促进肛肠术后感染切口愈合的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 952-956.

Study on the Mechanism of Qingliang Ointment Promoting Healing of Anorectal Postoperative Infection

XU Li, DAI Qun, GE Qionxiang, LIN Guoqiang(Department of Colon and Rectal Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of Qingliang ointment on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF), angiotensin-2(ANG-2), CD34 and hydroxyproline content in granulation tissue of incisional wound after anorectal operation. **METHODS** Forty-two cases of anorectal surgery patients were randomly divided into control group and Qingliang ointment group, the control group of patients with external application of Vaseline gauze wound, while the Qingliang ointment group with external application of Qingliang ointment. The expression of VEGF, ANG-2, CD34 and hydroxyproline content were detected on the 3rd day, 7th day and 14th day after operation. **RESULTS** Compared with the 3rd day, the expression of VEGF, ANG-2 and CD34 and the content of hydroxyproline in control group and Qingliang ointment group were gradually increased ($P<0.05$) on the 7th day and the 14th day after operation in the granulation tissue. The expression of VEGF, ANG-2, CD34 protein and hydroxyproline in the wound granulation tissue of Qingliang ointment group and control group had no significant difference on the 3rd and 7th day after operation. The expression of VEGF, ANG-2, CD34 and the content of hydroxyproline in granulation tissues of wound group were increased ($P<0.05$) on the 14th day after operation compared with the control group. **CONCLUSION** Qingliang ointment can promote the wound healing by promoting the expression of VEGF, ANG-2, CD34 protein and the increase of hydroxyproline content.

KEY WORDS: Qingliang ointment; anorectal postoperative infection incision; vascular endothelial growth factor(VEGF); angiotensin-2(ANG-2); CD34; hydroxyproline

肛门手术后创口多为感染性创口, 愈合缓慢是临床上的一个难题。肛肠病术后存在血管充血、组织增生、血栓等病理产物形成, 术后创口污染严重的问题, 一般不缝合, 开放创口, 充分引流, 并通过创口换药清除管壁腐败组织的方法促使创面愈合。笔者前期临床研究发现术后使用清凉膏能减轻患者的疼痛, 缩短炎症反应期, 加速肛周脓肿术后感染性创口的愈合^[1]。血管紧张素-2

(angiotensin-2, ANG-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)特异性作用于血管内皮细胞的生长因子, 通过多种途径直接或间接促进血管生成, 血管形成是创面愈合的关键因素^[2]。CD34 是目前血管内皮细胞最可靠的标记, 是目前检验微血管的最好方法^[3]。本研究通过比较清凉膏对术后创面肉芽组织 VEGF、ANG-2、CD34 的表达和羟脯氨酸含量的影响, 探

基金项目: 浙江省中医药管理局资助立项课题(2015ZA093)

作者简介: 徐利, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)87071013

E-mail: 1755889877@qq.com

讨清凉膏促进肛肠病术后组织修复的作用机制,为研究清热化瘀法在控制肛周术后切口感染和促进炎症消退、创口愈合中的作用奠定理论依据。

1 材料及方法

1.1 临床资料

符合 2012 年《中医肛肠科常见病诊疗指南》中肛周脓肿的诊断标准的术后患者^[4],本项目经浙江中医药大学附属第一医院伦理委员会根据卫生部《涉及人的生物医学研究伦理审查办法(试行)》(2007)审批通过。所有患者均签署知情同意后入选(批准号:2015-K-176-01)。肛周局部红肿疼痛,直肠指检可触及压痛性肿块,或有波动感,局部穿刺可抽出脓液,且无明显全身症状,位于肛提肌以下间隙的肛管直肠周围脓肿。

1.2 材料

清凉血软膏(以下简称清凉膏,为笔者所在医院制剂,生产批号:浙药制 Z20060057);灭菌凡士林纱条(绍兴振德医用敷料有限公司,浙食药监生产许 20100048 号);羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20130311); VEGF、CD34 购自谷歌生物; ANG-2 购自武汉三鹰。

1.3 分组给药

符合诊断标准的术后患者按随机数字表法分为对照组和清凉膏组。清凉膏组药物:清凉膏纱条;对照组药物:凡士林纱条。清凉膏由大黄、当归、紫草、麻油、黄腊组成,由笔者所在医院制剂中心生产,为院内制剂,做成清凉膏纱条备用(清凉膏纱条制作方法:将无菌纱布剪成 1.5 cm×4 cm 大小,清凉膏均匀浸上无菌纱条,以纱条上有少许清凉膏溢出为宜,一层纱布一层清凉膏,高压消毒后使用)。清凉膏组创面聚维酮碘消毒后,干棉球擦干消毒液,外敷清凉膏纱条,纱布覆盖创面。对照组外用凡士林纱条,其他处理与清凉膏组完全相同,直至创口愈合为止。

1.4 样本采集检测

取直肠正常黏膜组织、脓肿组织和术后第 3, 7, 14 天切口处创缘的肉芽组织,部分置 4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋切片,免疫组化采用 SP 法,主要免疫组化步骤:二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,3%双氧水灭活内源性过氧化物酶, PBS 缓冲液振洗,抗原微波热修复,10%血清封闭、一抗 4℃过夜, PBS 洗涤后二抗孵育 2 h, DAB 染色,

苏木精复染细胞核后脱水,中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照。取上述肉芽组织于-80℃冰箱保存,按照 ELISA 试剂盒操作说明检测羟脯氨酸含量。

1.5 结果判断

VEGF、ANG-2 阳性表达位于细胞浆,呈棕黄色着色。结果评定标准:根据着色程度及着色细胞阳性范围进行计算,阳性强度:不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色中等为 2 分,着色深者为 3 分。着色细胞阳性范围:不着色为 0 分,着色阳性细胞<1/3 为 1 分,着色阳性细胞 1/3~1/2 为 2 分,着色阳性细胞>1/2 为 3 分;将每张切片着色程度与着色细胞阳性范围得分各自相加为其最后计分^[5]。CD34 阳性表达主要在黏膜血管内皮细胞,显微镜观察阳性细胞的分布情况,计数阳性细胞的数量。Weidner(1995)方法:CD34 阳性染色来计数微血管密度(microvessel density, MVD),先在低倍镜下挑选阳性细胞密集区,然后在 200 倍镜下计算 3 个视野,取其平均值。染成棕色单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数;管腔>8 个红细胞,带较厚肌层的血管均不计数,其中微血管的判断不以红细胞的出现来确定是否是血管,也不以是否出现管腔来计数。最后取均值进行统计学处理。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件包,2 组均数比较用 *t* 检验;相关性采用 Pearson 相关分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 清凉膏对肉芽组织中 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白表达的影响

正常黏膜中见适量 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白的表达,肛周脓肿组织中 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白呈强阳性表达,主要定位于上皮细胞中以及血管周围和血管壁内皮细胞上,脓肿组织中 VEGF、ANG-2、CD34 的表达明显高于正常组织,差异有统计学意义(*P*<0.05),结果见表 1。

对照组和清凉膏组术后治疗第 7 天和第 14 天的肉芽组织与第 3 天比较,VEGF、ANG-2、CD34 蛋白的表达明显增多(*P*<0.05);术后治疗第 3 天和第 7 天,肉芽组织中的毛细血管处于创面愈合早期,清凉膏治疗组与对照组中 VEGF、

ANG-2、CD34 蛋白的表达差异不具有统计学意义；术后第 14 天，创面肉芽组织中 VEGF、ANG-2、CD34 蛋白表达增多，清凉膏组与对照组蛋白表达有明显差异($P<0.05$)。相关分析显示肉芽组织中 VEGF、ANG-2、CD3 表达相互之间呈正相关($r=0.896$ ； $r=0.863$ ； $r=0.856$)。结果见表 2，图 1~4。

表 2 术后肉芽组织中 VEGF、ANG-2 和 CD34 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 In the postoperative granulation tissue VEGF, ANG-2 and CD34 expression($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF			ANG-2			CD34		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	19	1.11±0.46	1.26±0.73 ¹⁾	2.05±0.52 ¹⁾	1.08±0.33	1.37±0.49 ¹⁾	2.32±0.67 ¹⁾	1.03±0.47	1.53±0.62 ¹⁾	2.16±0.38 ¹⁾
清凉膏组	23	0.95±0.49	1.55±0.51 ¹⁾	2.68±0.65 ¹⁾²⁾	1.14±0.56	1.59±0.50 ¹⁾	2.77±0.53 ¹⁾²⁾	1.18±0.51	1.45±0.51 ¹⁾	2.64±0.66 ¹⁾²⁾

注：与术后第 3 天比较，¹⁾ $P<0.05$ ；与对照组比较，²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the third day after treatment, ¹⁾ $P<0.05$; compared with control group, ²⁾ $P<0.05$.

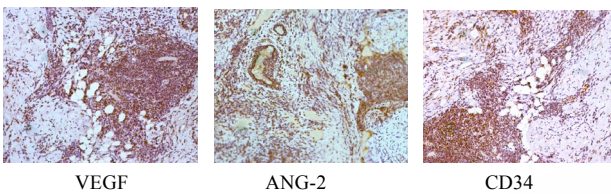


图 1 脓肿壁组织中 VEGF、ANG-2 和 CD34 的表达

Fig. 1 Expression of VEGF, ANG-2 and CD34 in abscess wall tissue

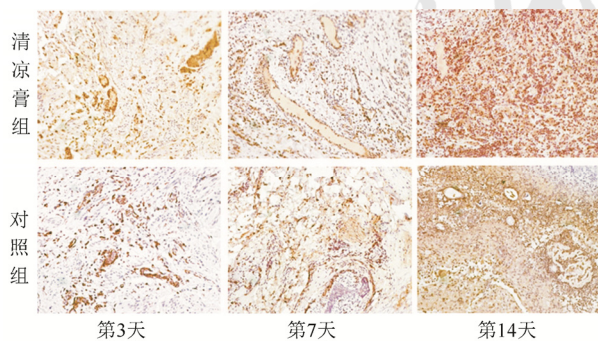


图 2 术后肉芽组织中 ANG-2 的表达

Fig. 2 Expression of ANG-2 in granulation tissue after operation

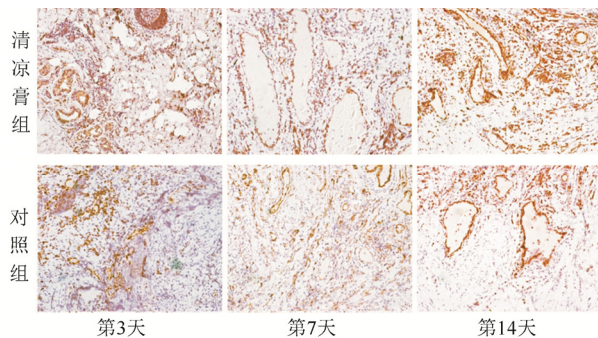


图 3 术后肉芽组织中 VEGF 的表达

Fig. 3 Expression of VEGF in granulation tissue after operation

表 1 脓肿组织与正常组织中 VEGF、ANG-2、CD34 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Abscess tissue and normal tissue in the expression of VEGF, ANG - 2 and CD34($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF	ANG-2	CD34
正常组织	22	1.15±0.37	1.25±0.44	1.35±0.89
脓肿组织	41	4.21±0.83 ¹⁾	4.36±0.69 ¹⁾	4.23±0.77 ¹⁾

注：与正常组织比较，¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal tissue, ¹⁾ $P<0.05$.

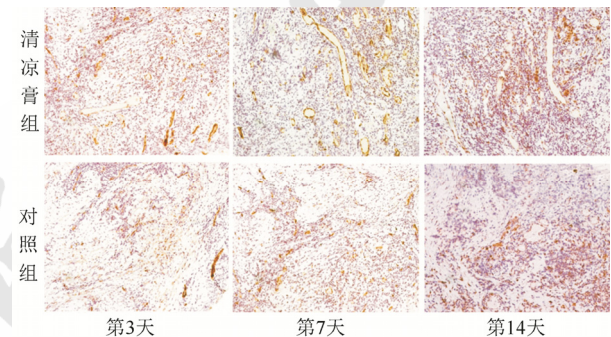


图 4 术后肉芽组织中 CD34 的表达

Fig. 4 Expression of CD34 in granulation tissue after operation

2.2 清凉膏对肉芽组织中羟脯氨酸含量的影响

对照组、清凉膏组术后治疗的第 7，14 天，肉芽组织中羟脯氨酸含量与第 3 天比较显著增加($P<0.05$)；第 3，7 天的清凉膏组肉芽组织的羟脯氨酸含量与对照组比较差异不具有统计学意义；术后第 14 天的清凉膏组中肉芽组织的羟脯氨酸含量与对照组比较显著增加($P<0.05$)。结果见表 3。

表 3 各组肉芽组织中羟脯氨酸含量的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Changes of hydroxyproline content in granulation tissue of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	羟脯氨酸含量/mg·mL ⁻¹		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	19	1.087±0.072	1.346±0.122 ¹⁾	1.897±0.136 ¹⁾
清凉膏组	20	1.035±0.094	1.382±0.099 ¹⁾	2.235±0.147 ¹⁾²⁾

注：与术后第 3 天比较，¹⁾ $P<0.05$ ；与对照组比较，²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the 3rd day after treatment, ¹⁾ $P<0.05$; compared with control group, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

清凉膏是已故名老中医潘午印的祖传秘方,由笔者所在医院药房配制供应外科临床应用已有100年的历史。清凉膏主要的药物组成为大黄、当归、紫草、麻油、黄腊,外用能清火解毒,凉血消肿,主治热毒痈疽疔疮。肛周脓肿术后创面愈合缓慢是肛肠外科常见的问题^[6],创面的愈合包括炎症反应、肉芽形成、血管新生、上皮再生、组织重塑等过程^[7]。VEGF和ANG是血管生成过程中2个最重要的调节因子,ANG-2和VEGF为目前已知的作用于血管内皮细胞重要的血管新生促进因子,在血管生成、发展及在构成血管稳定和血管内皮细胞重塑的调节系统中发挥重要作用^[8-9]。VEGF主要通过促进内皮细胞增殖、迁移、管腔形成,增加创面血液供应,促进创面血管再生和创面愈合^[10]。VEGF与血管内皮细胞膜上的特异性受体酪氨酸激酶结合,进一步激活其下游的相关基因表达,刺激血管内皮细胞分裂增殖及迁移,诱导间质胶原酶的表达,最终形成新生血管。肛周脓肿术后的创面受到粪便污染,血管形成过程受损导致创面延迟愈合。

ANG-2是一种主要的血管活性物质,具有多种生理功能,近年来发现在组织损伤修复中起重要作用^[11-12]。ANG-2是一种分泌性蛋白,主要由血管内皮细胞分泌产生。VEGF可显著上调ANG-2在基质细胞的表达,对血管生成的影响与局部微环境中VEGF的存在与否密切相关,ANG-2促进血管新生的作用是通过与VEGF的协同作用实现的,并且二者的这种作用互为增强^[13]。肉芽组织由大量的毛细血管、微小血管及丰富的成纤维细胞组成。在细胞增殖和修复期,最关键的步骤之一是肉芽组织的形成。本研究显示创面脓肿组织中VEGF、ANG-2、CD34的表达明显高于正常组织,差异有统计学意义,表明脓肿组织中含有大量的VEGF、ANG-2,其促进脓肿中的微小血管形成,加重了疾病的发展。术后治疗第3,7天,肉芽组织中毛细血管在创面愈合早期,清凉膏组与对照组中VEGF、ANG-2、CD34蛋白的表达不多,2组比较无明显差异,第14天肉芽组织中VEGF、ANG-2、CD34蛋白表达增多,清凉膏组和对照组分别与术后第3天比较有显著差异,且清凉膏组与对照组蛋白表达有明显差异。结果表明清凉膏

可以促进新生的肉芽组织内VEGF、ANG-2、CD34的表达,促进新生血管的形成和组织修复。ANG-2与VEGF相关性结果表明2者在新生血管形成过程中发挥协同作用,共同促进新生血管的生成。微血管密度反映微血管的发生发展^[14],在细胞增殖和修复期,最关键的步骤之一是肉芽组织的形成。肉芽组织由大量的毛细血管、微小血管及丰富的成纤维细胞组成。CD34是一种糖基化跨膜糖蛋白,在新生血管内皮细胞中表达稳定^[15],本研究结果表明清凉膏能够促进组织修复,同时CD34与VEGF、ANG-2的相关性提示清凉膏可能通过促进ANG-2与VEGF的表达发挥其促进微血管形成的作用。

胶原是人体重要的结构蛋白之一,它构成了创面的基质^[16]。胶原代谢的不平衡是创面愈合缓慢的原因之一,羟脯氨酸水平可间接反映胶原水平^[17]。本研究通过了解创面愈合过程中胶原代谢状况反映创面愈合情况。羟脯氨酸是胶原蛋白的组成成分,约占其氨基酸总量的13%。创伤形成后,成纤维细胞发生增殖、迁移,并合成、分泌胶原和胞外基质(蛋白质)成分,参与肉芽组织形成、创口收缩及组织重建的过程。本研究结果显示,术后第3,7天清凉膏组羟脯氨酸含量增加不明显,与对照组比较无显著差异;术后第14天清凉膏治疗组肉芽组织中羟脯氨酸的含量明显增加,与对照组比较有显著差异,提示清凉膏能促进羟脯氨酸的合成,促进组织修复。

综上所述,具有清热化痰作用的清凉膏对感染切口的愈合具有促进作用,这种作用可能与促进VEGF、ANG-2、CD34蛋白的表达和增加羟脯氨酸含量发挥有关。本研究为临床新药的进一步开发,以及中医外治法的推广提供了临床研究依据。

REFERENCES

- [1] 徐利. 清热凉血软膏治疗婴儿肛周脓肿 30 例临床观察[J]. 中医儿科杂志, 2015, 11(5): 52-54.
- [2] LI X Q, HU D H, LIU Y, et al. Influence of negative pressure wound therapy on the angiogenesis of wounds in diabetic rats [J]. Chin J Burns(中华烧伤杂志), 2013, 29(5): 442-447.
- [3] SLOMKA M, STASIKOWSKA O, WAGROWSKA-DANILEWICZ M, et al. Diagnostic and prognostic values of repair protein Hmlh1 Hmsh2 and protein CD34 immunexpression in sporadic colorectal cancer [J]. Pol Merkur Lekarski, 2010(29): 351-356.

- [4] 中华中医药学会. 中医肛肠科常见病诊疗指南[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 7.
- [5] 何蓓晖, 陈芝芸, 赵振中, 等. 三七对酒精性肝病大鼠肝脏瘦素及其受体表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(2): 122-124.
- [6] ZHONG C C, CHEN X, XIA X M, et al. Clinical observation of Jinxuan Zhike Xunxi San combined with iontophoresis on circumferential mixed hemorrhoid after surgery [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2016, 35(8): 581-584.
- [7] HOU J J, NIE F F, LI B L, et al. The expressions of periostin and the related factors during healing process of full-thickness cutaneous wound in rat [J]. Chin Critic Care Med(中国危重病急救医学), 2012, 24(6): 334-337.
- [8] LI Y, MA X, ZHANG J, et al. Prognostic value of microvessel density in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis [J]. Int J Biol Markers, 2014, 29(3): 279-287.
- [9] CAI R, LIU B CONG Q H, et al. Icarin improves learning and memory via promoting angiogenesis in bilateral common carotid artery occlusion rats [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2016, 35(4): 287-292.
- [10] HAMILTON D W. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease [J]. J Cell Commun Signal, 2008, 2(1): 9-17.
- [11] YAHATA Y, SHIRAKATA Y, TOKUMARU S, et al. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(19): 13209-13216.
- [12] RAMIREZ-SANCHEZ M, PRIETO I, WANGENSTEEN R, et al. The renin-angiotensin system: new insight into old therapies [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(10): 1313-1322.
- [13] WANG P, RUAN L H, ZHAO X Q, et al. Expression of angiogenin-2 and VEGF in acute leukemia and its significance [J]. J Exp Hematol(中国实验血液学杂志), 2010, 18(1): 11-14.
- [14] ZHAO A B, YANG Y G, XU H Y, et al. Significance of vascular endothelial growth factor and CD34 expression in nasal polyps [J]. Chin Arch Otolaryngol Head Neck Surg(中国耳鼻喉头颈外科), 2013, 20(11): 594-599.
- [15] CHALOOB M K, ALI H H, QASIM B J, et al. Immunohistochemical expression of Ki-67, PCNA and CD34 in astrocytomas; a clinicopathological study [J]. Oman Med J, 2012, 27(5): 368-374.
- [16] YUN J, YANG G G, HUANG C X. Collagen metabolic changes of granulation tissue in rats infectious wounds [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med(中国中西医结合外科杂志), 2009, 15(12): 656-659.
- [17] ZHAO C L, WANG L J, DONG X P, et al. Effects of Shengji Yuhong Ointment on the content of hydroxyproline and collagen ratio in rats with deep partial thickness burn in wound healing process [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(11): 2329-2332.

收稿日期: 2016-10-18

(本文责编: 蔡珊珊)