

生肌化瘀方及其拆方对大鼠创面成纤维细胞

I、III 型胶原合成的影响^{*}

董莉¹ 李斌¹ 章云¹ 韩志芬² 王振宜¹

内容提要 目的 探讨生肌化瘀方及其拆方促进创面修复(呈皮肤修复)的作用机理。方法 采用体外培养创面肉芽组织成纤维细胞,以乳鼠皮肤成纤维细胞作对照,分别加入生肌方、化瘀方及生肌化瘀方大、小剂量药物血清,运用细胞化学 ABC 法检测成纤维细胞 I、III 型胶原的含量。结果 生肌方能够提高创面成纤维细胞 I、III 型胶原含量,且均高于模型组($P < 0.01$);化瘀方能够降低创面成纤维细胞 I、III 型胶原含量,且低于模型组($P < 0.01$);生肌化瘀方大、小剂量组 I、III 型胶原含量与正常组比较差异均无显著性($P > 0.05$)。结论 生肌化瘀方能够促进创面修复,其可能的作用机理是通过调节 I、III 型胶原的比值来调控 I、III 型胶原代谢。

关键词 生肌化瘀方 拆方 药物血清 成纤维细胞 I、III 型胶原

Effect of Shengji Huayu Recipe and Its Disassembled Formulae on Type I and III Collagen Synthesis in Wound Healing Fibroblasts DONG Li, LI Bin, ZHANG Yun, et al Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai (200437)

Objective : To explore the mechanism of Shengji Huayu Recipe (SJHYR) and its 3 disassembled formulae in accelerating wound healing toward skin restoration. **Methods** : Using in vitro cultured fibroblasts from granulation tissue of wound and compared with the normal skin fibroblast of suckling rat, who were treated separately by drug serum containing high and low dose SJHYR and its disassembled prescriptions (Shengji formula and Huayu formula). The type I and III collagen contents in the fibroblasts were determined with immunocytochemical ABC method. **Results** : Shengji formula could increase the levels of type I and III collagens in fibroblasts, which was significantly higher than those in model cells and control ($P < 0.01$). Huayu formula lowered them to the levels below those in model cells ($P < 0.01$), while in comparing the levels in the cells treated by high or low dose SJHYR with those in control, no significant difference was shown ($P > 0.05$). **Conclusion** : SJHYR might accelerate wound healing toward skin restoration through regulating the ratio of collagen type I and III, to adjust their metabolism.

Key words Shengji Huayu Recipe, disassembled formulae, drug containing serum, fibroblast collagen type I and III

在组织修复中,促进组织再生和减少瘢痕形成是一对矛盾,而胶原代谢在其中起着关键的作用,并贯穿于创面修复的始终。在正常条件下,皮肤胶原合成和分解代谢处于相对平衡状态,但在病理条件下,胶原代谢失去平衡,分解大于合成,创面难于修复,修复后期合成大于分解,则易形成增生性瘢痕。因此,寻找能有效调控胶原代谢的方药具有重要意义。本研究将扶正生肌法和化瘀消癥法有机结合,旨在探讨生肌化瘀方对创面愈合过程中的相关胶原代谢的调控机理。

材料与方法

1 实验动物 1 日龄 SD 乳鼠,清洁级雄性 SD 大鼠,体重(220 ± 10)g,由上海中医药大学实验动物中心提供。

2 药物及主要试剂 生肌化瘀方由黄芪、太子参、白术、生地、丹参、水蛭、桃仁、川芎组成,生肌方由黄芪、太子参、白术、生地组成,化瘀方由丹参、水蛭、桃仁、川芎组成,均由上海中医药大学附属岳阳医院制剂室按既定工艺制备,含生药量:生肌方为 6g/ml,化瘀方为 3g/ml,生肌化瘀方为 9g/ml。ABC 染色试剂盒为美国 VICTOR 公司产品。

3 主要仪器 SX-100 计算机图像分析系统,美

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39900195);上海市高等学校青年科学基金课题(No. 98QN71)

1. 上海中医药大学附属岳阳医院(上海 200437) 2. 上海中医药大学

国 IBM 公司产品。

4 方法

4.1 成纤维细胞培养 参照付小兵等改良塑料环肉芽肿定量法^[1]制备创伤模型,5~7 天待肉芽组织形成后取材,培养创面肉芽组织成纤维细胞。取 1 日龄乳鼠背部皮肤,做正常皮肤成纤维细胞培养,第 2~5 代用于实验^(2,3)。

4.2 药物血清制备 将动物随机分成 5 组,每组 10 只。生肌方组、化瘀方组、生肌化瘀方小剂量组分别给予相应药物灌胃 0.2ml/100g,生肌化瘀方大剂量组则灌胃生肌化瘀方 0.8ml/100g(剂量的确定:大鼠按成人单位体重 6 倍给药,生肌化瘀方大剂量组放大至 24 倍),正常组给予等量生理盐水灌胃,每天 2 次,连续 3 天。末次给药前禁食不禁水 12h,末次给药后 1h 采血,常规制备药物血清^(4,5)。

4.3 成纤维细胞 I、III 型胶原检测 采用免疫细胞化学法。成纤维细胞消化后以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度接种于内置盖玻片的 6 孔板内,培养 72h 后用无小牛血清的 1640 培养 24h 后分别加入各组药物血清,浓度为 10%。每组设 4 个复孔,处理 48h,以 ABC 法作免疫细胞化学染色。染色结果应用 SX-100 计算机图像分析系统对各组细胞进行光密度测定,检测细胞胞浆灰度值,各组细胞片随机检测 20 个细胞⁽⁶⁾。

5 统计学方法 计量资料用单因素方差分析。

结 果

各组成纤维细胞 I、III 型胶原表达的比较 见表 1。与模型组比较,正常组、生肌方组、化瘀方组、生肌化瘀方大、小剂量组 I、III 型胶原含量差异均有显著性 ($P < 0.01$),其中 III 型胶原含量生肌方组高于正常组 ($P < 0.05$)。I、III 型胶原含量化瘀方组均低于正常组 ($P < 0.01$)。与正常组比较生肌化瘀方大、小剂量组 I、III 型胶原含量差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 各组成纤维细胞 I、III 型胶原表达的比较

组别	n	I 型胶原	III 型胶原	I/III
		(灰度值 $\bar{x} \pm s$)		(比值)
正常	20	76.3 ± 4.4	75.7 ± 5.1	1.01
模型	20	66.5 ± 5.0**	54.1 ± 4.0**	1.23
生肌方	20	78.3 ± 5.8△	82.4 ± 10.3*△	0.95
化瘀方	20	56.3 ± 3.8**△	50.4 ± 4.5**△	1.17
生肌化瘀方小	20	73.1 ± 4.3△	72.3 ± 4.8△	1.01
生肌化瘀方大	20	74.5 ± 3.8△	74.7 ± 4.2△	1.00

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.01$

讨 论

有研究表明,成纤维细胞是创面愈合过程中的主

体细胞,其生物学效应在创面修复中起着至关重要的作用,成纤维细胞所合成的胶原是细胞外基质的主要组分,胶原代谢的结果直接影响创面的修复质量⁽⁷⁾。在创面愈合过程中起主要作用的是 I、III 型胶原,I 型胶原起支架作用,III 型胶原决定胶原纤维的直径大小和弹性好坏,I、III 型胶原含量的比值关系到最终的修复结果⁽⁸⁾。正常情况下,创面有大量成纤维细胞产生,机体通过其合成胶原,使组织修复得以完成和完善。创面中胶原合成与分解呈动态平衡,一旦失衡则形成瘢痕增生,在增生过度的瘢痕中,胶原交联过程发生障碍,只有少部分胶原纤维聚成纤维束,大量胶原纤维杂乱地沉积在组织内,方向紊乱,呈漩涡状或曲线样结构⁽⁹⁾。

生肌化瘀方是根据“祛瘀与生新并重”、“瘀不去,肌不生,气血旺,肉乃长”的原则,通过长期临床实践研制成的,方中黄芪、太子参、白术、生地 4 药合用,共奏健脾益气、托疮生肌之功;丹参、水蛭、桃仁、川芎 4 药相配,既能改善局部血液循环,又可化瘀消瘢;诸药相合,相得益彰。本研究利用免疫细胞化学的方法,以乳鼠皮肤作对照,观察各药物血清对创面肉芽组织成纤维细胞的 I、III 型胶原的影响。结果表明生肌方可以促进 I、III 型胶原合成,以 III 型胶原合成显著,使 III 型胶原相对正常组过度增生。化瘀方能够抑制 I、III 型胶原合成,实验也证实生肌化瘀方大、小剂量组 I、III 型胶原含量与正常组比较差异无显著性,其 I、III 型胶原比值更接近正常,而且在促进 I、III 型胶原含量增生情况下呈量效关系。以上均反映了生肌化瘀方对成纤维细胞的双向调节作用,既促进其增殖,但又避免其过度增殖造成增生性瘢痕,此结果与复制、转录水平相一致,与形态学相符合(其相关文章正陆续发表),从理论上更能说明生肌化瘀方促进创面愈合呈皮肤修复的机理,充分体现了中药在这一领域的广阔前景。

参 考 文 献

1. 付小兵. 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.
2. 黄金井. 瘢痕组织成纤维细胞培养体会. 中华整形烧伤杂志 1995;11(1):28—29.
3. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 北京: 世界国际出版公司, 1996: 104—108.
4. 刘成海, 刘平. 抗纤维化复方有效中药复方血清药理学方法讨论. 中国实验外科杂志 1998;4(2):16—17.
5. 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理 1999;10(2):95.
6. 陈台硕. 现代实用免疫细胞化学技术. 上海: 上海科学技术出

版社,1997:201—204.

7. Hemdor DN, Barrow RE, Kunkel KP, et al. Regulation of fibroplasia in coetaneous wound repair. *Ann Surg* 1990 ;212(4):424—429.

8. Ching T. Molecular cloning of the complementary DNA encoding for

the hamster TGF- α mature peptide. *Carcinogenesis* 1991 ;12:529.

9. Hirschel BJ, Ryam GB, Kunkel KP, et al. Granulation tissue as contractile organ. *Ann Surg* 1990 ;212(4):424—429.

(收稿 2001 - 02 - 26 修回 2001 - 11 - 05)

· 病例报告 ·

中西医结合治疗急性格林—巴利氏综合征 1 例

陈长江 章平富 魏国兰 杨吉荣

病历简介 患者,女,56岁,住院号:1009718。因进行性四肢麻木,活动障碍伴胸闷,呼吸困难2周,于2000年5月25日入院。1个月前曾因感冒、发热、咽痛,服感冒药片而愈。2周后在无诱因下出现四肢麻木,皮肤过敏,肌肉压痛明显,双下肢活动障碍,并进行性加重,继之出现吞咽困难,声音嘶哑,胸闷、气促、不能站立行走,卧床不能主动翻身。于2000年5月18日就诊于某大医院,经腰穿脑脊液检查有蛋白、细胞分离现象及肌电图异常,诊断为“急性格林—巴利氏综合征”。给予地塞米松等住院治疗1周,家属要求回当地治疗,遂入我院。入院时体格检查:体温36.5℃,脉搏82次/min,呼吸20次/min,血压130/85mmHg,发育正常,营养中等,形体偏胖,神清语利,语音偏低,心肺及胸腹部望、触、叩、听未发现异常,脊柱、四肢无畸形,双下肢无水肿。乳头以下部位皮肤感觉麻木,痛觉增强;四肢肌肉无萎缩,双上肢肌力Ⅱ级,双下肢肌力Ⅱ级,肱二、三头肌、膝腱反射消失,巴彬斯基征(-);舌质偏红、苔薄白,脉细弦。实验室检查血常规:血红蛋白(Hb)150g/L,白细胞(WBC)11.6×10⁹/L,中性84.5%,淋巴12.1%,血小板263×10⁹/L,血沉31mm/h;肾功能:血肌酐(SCr)81.9μmol/L,尿素氮(BUN)5.03mmol/L;血电解质:钾3.49mmol/L,钠136.7mmol/L,氯97.6mmol/L;肝功能:总蛋白69.6g/L,白蛋白41.8g/L,谷丙转氨酶(ALT)71.2 U/L,碱性磷酸酶(AKP)136 U/L,乳酸脱氢酶(LDH)285 U/L,肌酸磷酸激酶(CPK)135 U/L;血糖5.23mmol/L;血脂:胆固醇4.4mmol/L,甘油三酯1.7mmol/L。中医辨证为“痿证”,西医诊断为急性格林—巴利氏综合征。

治疗经过 西药:强的松片20mg,每天3次,连服7天;脑活素30ml及三磷酸腺苷40mg,分别加入5%葡萄糖注射液500ml及10%葡萄糖注射液250ml,静脉滴注,每天1次,连用15天。中药采用健脾益气、活血温经、祛风通络:黄芪20g,白术12g,当归12g,淮山药15g,茯苓10g,赤芍12g,白芍12g,桂枝6g,怀牛膝15g,蜈蚣1条,全蝎3g,桑枝30g,明天麻10g,甘草6g,每天1剂,水煎分2次服。经治疗7天后,精神转佳,进食饮水无呛咳,肌肉压痛不明显,四肢麻木减轻,双上肢肌力Ⅲ级,双下肢肌力Ⅱ级。6月1日出现口渴多饮、多尿,尿

糖定性+++ ,血糖15.92mmol/L,考虑为类固醇性糖尿病。用正规胰岛素4u,早、中、晚餐前30min皮下注射;中药在方基础上减去桂枝,加生地20g,枸杞子10g,知母10g,黄柏10g,并同时撤减强的松为15mg,每天2次,治疗1周后,口渴、多尿消失,复查尿糖定性(-),血糖6.9mmol/L,病情好转,改服强的松片10mg,每天2次,连用7天。后再继续从本施治。

患者于2000年6月14日出院,出院时无明显自觉不适,能自行翻身,双上肢可抬举,两下肢自由屈伸,能下床行走10m,心、肺、肝、脾正常;腹股沟以下皮肤感觉麻木,痛觉正常,腱反射可引出,双上肢肌力Ⅴ级,两下肢肌力Ⅳ级,病理反射阴性;实验室检查:WBC 5.8×10⁹/L, Hb 134g/L,血小板118×10⁹/L, ALT 35 U/L, LDH 82 U/L, AKP 33.8 U/L, CPK 33 U/L;血糖6.2mmol/L,症状明显好转。出院后改服强的松片5mg,每天2次,服用15天后停药,中药继服健脾益气、滋阴养筋、活血通络之品,调治30余天。门诊复诊:患者能自由行走,不受限制,并恢复正常工作,体格检查:皮肤感觉无异常,四肢肌力Ⅴ级,实验室检查各项指标正常,随访1年,病情无复发。

讨论 急性格林—巴利氏综合征是由多种原因所致的疾病,病因尚不清楚,有人认为与病毒感染有关,一般认为属迟发性过敏的自身免疫性疾病。临床表现以四肢对称性弛缓性瘫痪,严重时可累及肋间肌及膈肌,伴有或不伴有感觉障碍。治疗按急则治其标,缓则治其本的原则,早期给予足量类固醇激素治疗,抑制免疫,以缓解吞咽困难、气促、胸闷等危及生命的症状,但应用激素宜短期突击,尽快撤退,以减少类固醇副作用。继之利用脑活素在神经细胞内可促进蛋白质合成,具有抗缺氧的保护能力,改善能量代谢。三磷酸腺苷能营养肌肉神经作用。同时以中药治疗,早期以健脾益气、活血温经、祛风通络;后期采用健脾益气、滋阴养筋、活血通络,促进神经肌肉功能恢复。本例应用中西医结合治疗,抓住时机,取得了满意疗效。

(收稿 2001 - 09 - 20 修回 2001 - 11 - 20)