紫草油对创面组织修复及 bFGF mRNA 表达的影响

裴宪武[1,2]　王坤正[1]　陈君长[1]　党晓谦[1]　时志斌[1]　高登峰[1]

摘要　目的　通过观察创面组织碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)mRNA 的表达和创面愈合率,探讨紫草油促进创面愈合的分子生物学机制。**方法**　对住院患者的皮肤创面用紫草油治疗为观察组,对照组用凡士林纱布治疗,观察两组的创面愈合率。用 RT-PCR 方法观察两组创面组织的 bFGF mRNA 表达。**结果**　两组创面组织均存在内源性 bFGF mRNA 基因表达,观察组创面组织 bFGF 基因表达在各个时段均明显超过对照组,灰密度值比较,差异有显著性($P<0.05$);创面愈合率与创面组织中 bFGF mRNA 基因表达程度相平行,而观察组的创面愈合率明显高于对照组($P<0.05$)。在创面愈合的不同阶段中,作为内参的磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因都有表达,并且各时段 GAPDH 基因表达量无显著变化($P>0.05$)。**结论**　紫草油对创面组织中 bFGF 有明显的促进作用,这可能是紫草油提高创面愈合率的机理之一。

关键词　紫草油; 碱性成纤维细胞生长因子; 创面

Effect of Arnebia Root Oil in Promoting the Tissue Recovery of Surface of Wound and Basic Fibroblast Growth factor (bFGF) mRNA Expression PEI Xian-wu, WANG Kun-zheng, CHEN Jun-chang, et al *Department of Orthopedics, The Second Hospital Affiliated ro Xi'an Jiaotong University, Xi'an (710004)*

Abstract　Objective　To explore the molecular biological mechanism of Arnebia Root oil (AO) in promoting the recovery of surface of wound by observing basic fibroblast growth factor (bFGF) mRNA expression in the wound tissue and healing rate of the wound. **Methods**　Patients in the observed group with their wound treated by AO and those in the control group treated by petrolatum gauze. The wound surface healing rate was estimated and bFGF mRNA expression was observed by RT-PCR. **Results**　Endogenous bFGF mRNA expression existed in the wound surface of both groups, but its level in the observed group at any time point was obviously higher than that in the control group respectively, with significant difference in comparison of the gray density between the two groups ($P<0.05$). The wound surface healing rate kept abreast with bFGF mRNA expression in wound tissues, so it was significantly higher in the observed group than that in the control group ($P<0.05$). GAPDH gene, which was taken as a parameter for internal reference, expressed with a certain amount unchanged in different periods of healing ($P>0.05$). **Conclusion**　AO shows obviously promotive action on bFGF, an important regulatory factor on wound healing, it might complete the recovery process by stimulating the increase of bFGF.

Key words　Arnebia Root oil; basic fibroblast growth factor; surface of wound

有研究显示紫草油外敷可以促进创面的愈合。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在创伤愈合过程中起着重要的作用[1]。为此,我们对紫草油外敷的创面组织 bFGF mRNA 表达与创面修复速度的关系进行了观察,以期在分子生物学方面找到紫草油促进创面愈合的理论依据。

资料与方法

1　临床资料　选自本院骨科新住院患者 12 例,男 8 例,女 4 例;年龄 15～62 岁,平均(32.5±11.2)岁;均有多处创面,且为全层皮肤缺损,大小为 4～8cm^2,将相距较远的 24 处创面随机分为观察组和对照组,按预先规定,将随机数字为单数者分入观察组,双数分入对照组。

2　方法

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371443)

作者单位:1. 西安交通大学第二医院骨科(西安 710004);2. 浙江省台州市中心医院骨科

通讯作者:裴宪武,Tel: 13119184014; E-mail: peixianwu@126.com

万方数据

2.1 紫草油制备方法 将紫草 100g 白芷 50g 花生油 1000g 置于锅内，加热至 150℃，30min(以白芷变焦黄色为度)，过滤，待油冷却后，将冰片 10g 研细缓缓加入，搅匀即得(由西安交通大学第二医院制剂室制备)。

2.2 用药及取材方法 观察组常规创面部位皮肤消毒，然后用数层剪成孔的紫草油纱布块贴敷于创面上，经常滴加油剂保持其湿润，外用厚层纱布覆盖；对照组采用数层剪成孔的凡士林纱布块贴敷于创面；渗出物较多时换药。伤后 3、7、14、21 天换药时在无菌条件下于创面局部取组织标本，取材范围包括创面及少许周围正常皮肤，置液氮保存。

2.3 检测方法

2.3.1 创面愈合率的检测 伤后 3、7、14、21 天时分别用创面照相结合透明方格纸描记测量，然后计算两组创面愈合率。

创面愈合率 =(原始创面面积 - 未愈合创面面积)/原始创面面积

2.3.2 两组创面组织 bFGF mRNA 基因表达 创面组织总 RNA 的提取和 bFGF mRNA 的分离：按不同时期提取两组创面组织的总 RNA，用紫外分光分析和凝胶电泳检测所提取总 RNA 的质量和浓度。按照 Poly A Tract(r) mRNA Isolation System 系统分离纯化 mRNA，紫外分光其纯度。bFGF 基因表达的变化：采用逆转录 - 多聚酶链反应(RT-PCR)方法。每份样品取等量 mRNA，用 Promega 公司的逆转录试剂盒，按说明书进行 cDNA 的合成。按照引物设计原则设计引物和内参照[磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)][2]，所有样品取等量的模板进行 PCR 扩增，取 PCR 产物 10μl，在 1.5% 琼脂糖中电泳后紫外光下扫描；用凝胶图像分析系统(美国 BioRad 公司，Gel Doc 2000 型凝胶成像分析仪)对目的基因的 PCR 产物进行灰密度测定。

3 统计学方法 采用单因素方差分析。

结 果

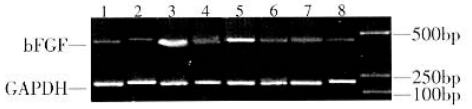
1 两组创面愈合率比较 见表 1。观察组创面愈合率明显高于对照组($P<0.05$)。

表 1 两组不同时期创面愈合率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	创面愈合率			
		3d	7d	14d	21d
观察	12	0.16±0.15*	0.34±0.12*	0.29±0.22*	0.26±0.14*
对照	12	0.13±0.09	0.30±0.13	0.28±0.06	0.20±0.15

注：与对照组同期比较，* $P<0.05$

2 两组伤后不同时期的 bFGF mRNA 基因表达比较 见图 1。伤后第 3 天 bFGF mRNA 在两组的表达水平均明显增强，并于伤后第 7 天达峰值；伤后第 14 天，两组 bFGF mRNA 表达均有所减弱，并持续下降；到伤后第 21 天时，两组 bFGF mRNA 表达水平仍然下降，但观察组创面组织 bFGF 基因表达在各个时段均明显超过对照组，灰密度值差异有显著性($P<0.05$)。作为内参照的 GAPDH 基因都有表达，各时段表达量无明显变化($P>0.05$)。



注：1、3、5、7 分别为观察组 3、7、14 及 21 天的 bFGF mRNA 表达；2、4、6、8 分别为对照组 3、7、14 及 21 天的 bFGF mRNA 表达

图 1 两组伤后不同时期的 bFGF mRNA 表达比较

讨 论

创面修复是一个连续的、复杂的生理过程，主要包括细胞趋化，结缔组织细胞增生，细胞外基质蛋白沉积及重排，上皮细胞迁移，增生最终导致创面再上皮化，恢复组织的完整性和连续性，有研究显示 bFGF 在创伤的修复中起着重要的作用[3]。

本结果表明，两组创面组织均存在内源性 bFGF mRNA 基因表达，其表达水平随创面修复过程的时相变化而有所不同。这提示 bFGF 在创伤的愈合过程中起着重要的调节作用，伤后第 3 天即明显增强，表达持续增强并于伤后第 7 天达峰值，说明早期修复细胞的迁移，增殖也最为活跃，以至于创面的愈合率有显著的提高。此后的表达在较高的水平上略有波动，伤后第 14 天，bFGF mRNA 表达有所减弱，并持续下降，这可能为伤后一定时期创面组织对创伤刺激反应降低，故合成较少。到伤后第 21 天时，bFGF mRNA 表达水平仍然下降，这表明随着创面的修复和改建的逐渐完成，bFGF mRNA 的分泌越来越少或被抑制，可能和组织生长的自限性有关。但观察组创面组织 bFGF mRNA 基因表达在各个时段均明显超过对照组，这表明，紫草油能诱导 bFGF mRNA 基因表达，对高表达起着重要的作用。观察组创面愈合率与 bFGF mRNA 基因表达呈现平行的关系，而观察组的创面愈合率明显高于对照组，表明紫草油和 bFGF 之间存在着必然的内在联系，bFGF 作为正性调节因子参与了创面修复的过程。在创面愈合的不同阶段中，作为内参的 GAPDH 基因都有表达，并且各时段表达量无显著变化，说明标本的变化符合实际。

紫草油的主要成分为：紫草、白芷等，具有去腐生

万方数据

肌、活血、解毒,消毒止痛的作用,并且具有较强的收敛作用,而其中的油性部分又对创面有滋润营养的作用。从现代医学来看,紫草油促进创口愈合和组织修复是一个十分复杂的生物学过程,与生长因子的增长有着密切的内在联系,本结果说明紫草油可能是调动了细胞对生长因子的分泌作用,刺激 bFGF 生成而发生的作用,紫草油起到了诱发和激活这些细胞活动的作用。

bFGF 作为细胞生长的多功能调节因子,对创伤愈合具有促进作用,并有很多因素影响着它的表达[4]。内源和外源的 bFGF 均能促进组织愈合[5]。bFGF 在损伤愈合的不同阶段有着不同的表达,和损伤的时间和程度有着紧密的联系[6]。bFGF 已经应用于临床并取得了较好的效果[7]。bFGF 可刺激成纤维细胞增殖及胶原合成,促进毛细血管增生和肉芽组织形成。在早期,bFGF 可增强创面炎症反应,提高机体白细胞吞噬功能[8],其可能机制是:参与调节细胞 DNA 合成,加速细胞分裂、增殖;参与调节胶原蛋白的合成和胶原基质的形成;刺激内皮细胞增殖及迁移,诱使血管内皮长入胶原基质中,形成毛细管腔等作用,促进创面的愈合。

创伤的愈合是多种因素综合作用的结果[9],创面组织 bFGF mRNA 表达水平的变化与其来源和作用有关。创面组织浸润聚集的细胞数量可影响组织细胞总 RNA 量,从而可影响创面早期 mRNA 表达增强,又决定了愈合过程中、后期的 RNA 水平。因此在修复过程的不同时期,分布于修复组织内的 T 淋巴细胞、激活的巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、角质细胞等不仅应答于 bFGF 的作用,而且也产生 bFGF,后者通过对上述细胞的趋化和迁移以及对其增殖和合成功能的刺激作用,直接促进细胞外基质蛋白合成和表皮细胞的迁移,最终完成创面的再上皮化,并由于存在自分泌和旁分泌机制,得以保持其作用的持续性。

虽然受创的组织愈合,有其自身的生物学过程,但紫草油可以通过启动生长因子的分泌和刺激生长因子的增多而使这一过程增强,使愈合的速度和质量发生明显变化,进而加速修复进程使创面愈合。

参 考 文 献

1 Ku PT, D' Amore PA. Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene and protein expression following its release from sublethally injured endothelial cells. J Cell Biochem 1995; 58(3):328—343.

2 陈 凌, 刘运生, 王陆申, 等. 垂体腺瘤 PTTG、bFGFmRNA 表达与侵袭性的关系. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志 2003; 9(3): 132—135.
Chen L, Liu YS, Wang LS, et al. Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG), bFGF and invasiveness of pituitary adenoma. Chin J Otorhinolaryngology-skull Base Surgery 2003; 9(3): 132—135.

3 邢帮荣,利天增,卞徽宁,等. 表皮生长因子与碱性成纤维细胞生长因子促进创面修复的比较研究. 中华烧伤杂志 2003;19(6): 340—343.
Xing BR, Li TZ, Bian HN, et al. Comparison of the effects of rhEGF with rhbFGF on the acceleration of wound healing. Chin J Burns 2003;19(6): 340—343.

4 Fu X, Gu X, Sun T, et al. Thermal injuries induce gene expression of endogenous c-fos, c-myc and bFGF in burned tissues. Chin Med J (Engl) 2003; 116(2): 235—238.

5 Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. Endogenous and exogenous fibroblast growth factor-2 modulate wound healing in the chick embryo chorioallantoic membrane. Angiogenesis 1999; 3(1): 89—95.

6 Takamiya M, Saigusa K, Nakayashiki N, et al. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination. Int J Legal Med 2003; 117(1):46—50.

7 葛步军, 郭松铭. 碱性成纤维细胞生长因子在肛周创面愈合中的疗效观察. 中国修复重建外科杂志 2002; 16(5): 345—347.
Ge BJ, Guo SM. Curative effects of basic fibroblast growth factor on anus wound healing. Chin J Repairative Reconstr Surg 2002; 16(5):345—347.

8 郑景熙,王素华,郭琳琅,等. 成纤维细胞生长因子促进放烧复合伤创面愈合的实验研究. 中华整形烧伤外科杂志 1994; 10(2):146－149.
Zheng JX, Wang SH, Guo LL, et al. To promote wound healing with fibroblast growth factor in combined burn radiation injury. Chin J Plastic Surg Burns 1994; 10(2):146—149.

9 蒋 伟, 王正国,赖西南,等. P 物质对肉芽组织成纤维细胞 bFGF 表达的调控作用及意义. 中华烧伤杂志 2003;19(3): 159—162.
Jiang W, Wang ZG, Lai XN, et al. Regulative effects and significances of substance P on the expression of basic fibroblast growth factor of granulation tissue fibroblasts in vitro. Chin J Burns 2003;19(3):159—162.

(收稿:2005－01－06 修回:2005－07－15)

万方数据