

· 基础研究 ·

湿润暴露疗法/湿润烧伤膏干预 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进体表慢性难愈合创面修复的实验研究

李利青^{1,2} 林也¹ 葛斌² 舒清峰² 陈端凯² 单云龙²
王澍² 黄炳臣³ 王金花² 唐乾利^{2,1}

摘要 **目的** 探讨湿润暴露疗法/湿润烧伤膏 (moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment, MEBT/MEBO) 干预磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路促进体表慢性难愈合创面的修复机制。**方法** 将 160 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组 24 只、对照组 (急性全层皮肤缺损组) 34 只和慢性难愈合创面组 102 只, 慢性难愈合创面组 (全层皮肤缺损 + 注射醋酸氢化可的松) 造模成功后再随机分为模型组 34 只、贝复新组 34 只和 MEBT/MEBO 组 34 只。各组分别干预治疗后观察: (1) 创面愈合情况, 记录统计创面愈合时间; 于第 3、7、14 天固定焦距拍照创面计算愈合率; (2) 并同时于第 3、7、14 天取创面组织, 石蜡切片 HE 常规染色观察第 3、14 天病理改变; (3) 提取第 3、7、14 天创面组织蛋白, Western Blot 法检测 PI3K、p-Akt (S473)、p-mTOR (Ser2448)、p-p70 S6K (Thr389)、p-4E BP1 (Thr37/46) 蛋白表达水平。**结果** (1) 与模型组比较, 贝复新组及 MEBT/MEBO 组显著缩短大鼠创面愈合时间和提高创面愈合率 ($P < 0.05$)。 (2) 造模及干预治疗 14 天后, 贝复新组及 MEBT/MEBO 组大鼠创面组织病理学形态学改善明显优于模型组。 (3) 与模型组比较, 造模及干预治疗 7 天后贝复新组及 MEBT/MEBO 组大鼠创面组织 PI3K 和磷酸化 Akt 蛋白高表达 ($P < 0.05$), MEBT/MEBO 组 mTOR 及其下游效应分子 p70 S6K 和 4E BP1 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** MEBT/MEBO 可促进体表慢性难愈合创面的愈合, 较好改善其组织病理形态学改变, 其作用机制可能与激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路, 促进大量与愈合相关的蛋白质合成有关。

关键词 体表慢性难愈合创面; 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏; 磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路

MEBT/MEBO Promoted Chronic Non-healing Cutaneous Wound by Modulating the PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway LI Li-qing^{1,2}, LIN Ye², GE Bin¹, SHU Qing-feng¹, CHEN Duan-kai¹, SHAN Yun-long¹, WANG Shu¹, HUANG Bing-chen³, WANG Jin-hua¹, and TANG Qian-li^{2,1} 1 School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208); 2 Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi (533000); 3 Department of Pathology, Affiliated Hospital, Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi (533000)

ABSTRACT **Objective** To observe the molecular mechanisms underlying therapeutic benefits of MEBT/MEBO in chronic non-healing cutaneous wound by focusing on the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. **Methods** Totally 160 male SD rats were randomly divided into normal group ($n = 24$), acute wound group ($n = 34$), and chronic wound group ($n = 102$). After successfully establishing chronic non-healing cutaneous wound model, 102 rats were randomly divided into the model group ($n = 34$), rb-FGF group

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81560776; No. 81774327)

作者单位: 1. 湖南中医药大学中西医结合学院 (长沙 410208); 2. 右江民族医学院研究生院 (广西百色 533000); 3. 右江民族医学院附属医院病理科 (广西百色 533000)

通讯作者: 唐乾利, Tel: 0776-2827008, E-mail: htmgx@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190104.097

($n = 34$), and MEBT/MEBO group ($n = 34$). (1) After initiation of treatment with saline, rb-FGF, or MEBO, healing time and rates of healing were recorded and calculated in each group. The healing rate of the wound was calculated after fixing focal length on day 3, 7, and 14. (2) On day 3, 7, and 14, tissues were collected from each group and examined histopathologically by HE staining. (3) Proteins were extracted from tissue samples to detect expression levels of PI3K, p-Akt (S473), p-mTOR (Ser2448), p-p70 S6K (Thr389), and p-4E BP1 (Thr37/46) by Western Blot. Results (1) Compared with the model group, the healing time was significantly shortened and the healing rate improved in the rb-FGF group and MEBT/MEBO group ($P < 0.05$). (2) After 14-day modeling and intervention, histopathological changes were more markedly improved in the rb-FGF group and MEBT/MEBO group than in the model group. (3) Compared with the model group, after 14-day modeling and intervention, expressions of PI3K and phosphor-Akt were higher in the rb-FGF group and MEBT/MEBO group than in the model group ($P < 0.05$). Phosphorylation levels of mTOR and its downstream effector p70 S6K and 4E BP1 were significantly elevated more in the MEBT/MEBO group than in the model group ($P < 0.05$). Conclusions MEBT/MEBO significantly promoted the healing of chronic non-healing cutaneous wound, and improved histopathological changes. Its mechanism might be associated with activating PI3K-Akt-mTOR signaling pathway, promoting proteins syntheses associated with healing.

KEYWORDS chronic non-healing cutaneous wound; moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment; PI3k-Akt-mTOR signaling pathway

体表慢性难愈合创面俗称溃疡,是指病程 3 个月以上无法通过正常有序且及时的修复过程达到解剖和功能上完整状态的创面,以糖尿病足、创伤性溃疡、压疮和下肢静脉性溃疡最常见^[1,2],其具有发病机制复杂、病程长、治疗难度大、并发症多、愈后极易复发且少数尚有癌变可能等特点^[3,4]。在发达国家,约 1% ~ 2% 的人遭遇慢性难愈合创面,约计 12% 足部溃疡患者需要行截肢手术^[5]。我国约 1.7% 住院患者有慢性难愈合创面,尤以糖尿病引起为主^[6]。目前,其西医治疗以手术、物理疗法、干细胞及各种细胞生长因子治疗为主^[7],但存在疗效不确切、技术不成熟以及经济代价高等问题。因而,寻求行之有效的治疗新策略迫在眉睫。

中医药治疗皮肤溃疡历史悠久,疗效良好。湿润暴露疗法/湿润烧伤膏(moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment, MEBT/MEBO),即皮肤再生医疗技术是一种中医外治法,经过近 30 年的研究和临床应用,其理论体系已由原来单纯的 MEBT 发展成为皮肤再生医疗技术,广泛应用于临床慢性难愈合创面的治疗^[8-11]。

本课题组在前期研究发现,MEBT/MEBO 能促进大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞以及血管内皮细胞的增殖分化,从而加速创面的愈合^[12-14]。但 MEBT/MEBO 影响体表慢性难愈合创面修复的具体机制仍未明确。已有研究证实,PI3K-Akt-mTOR 信号通路作为细胞内重要的信号转导途径,调控核酸转录、蛋白

质翻译,广泛参与调节细胞的生长与存活、增殖与凋亡、血管生成等^[15-17]。但 MEBT/MEBO 对体表慢性难愈合创面促愈合的作用靶点是否在该信号通路尚不明确。据此,本实验拟通过构建体表慢性难愈合创面大鼠模型,围绕该信号通路及其下游效应分子,探讨 MEBT/MEBO 促进体表慢性难愈合创面修复的部分机制,为临床推广应用 MEBT/MEBO 防治该病提供可靠的实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 160 只,12 周龄,体质量 220 ~ 250 g,购自广西医科大学,合格证号:45000300000745。严格按照动物伦理学标准处理。

2 药物 MEBO(40 g/支,北京光明中医烧伤疮疡研究所汕头经济特区美宝制药厂生产,批号:Z20000004);贝复新(外用重组牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶,rb-FGF,每支 5 g,含 21 000 IU,珠海亿胜生物制药有限公司生产);盐酸氯胺酮注射液(2 mL:0.1 g,江苏恒瑞医药股份有限公司生产);盐酸甲苯噻嗪粉剂(纯度 98%,每支 5 g,上海源叶生物科技有限公司生产);醋酸氢化可的松注射液(5 mL:25 mg,上海通用药业股份有限公司生产)。

3 试剂 BCA 蛋白定量试剂盒、4 × Loading Buffer、RIPA 裂解液、PMSF、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、SDS-PAGE 电泳液、Western 半干法转膜液

(北京索莱宝科技公司); 预染彩虹蛋白 Marker(美国 Thermo Scientific); Western 封闭液(北京康为世纪生物科技有限公司); 超强 ECL 化学发光试剂盒(Bridgen 桥生物); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); PI3K、磷酸化 Akt (S473)、磷酸化 mTOR (Ser2448) 兔单克隆抗体一抗(Abcam); 磷酸化 p70 S6K (Thr389)、磷酸化 4E-BP1 (Thr37/46) 兔单克隆抗体一抗(美国 Cell Signaling Technology); β -actin 鼠单克隆内参一抗体(北京中杉金桥生物科技有限公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物科技有限公司)。

4 仪器 酶标仪(型号 MS352, 芬兰 Lab-systems Multiskan); 圆周型数显振荡摇床(型号 sk-R1807-E, 北京大龙兴创实验仪器有限公司); 样本匀浆高速分散机(型号 T10, 德国 IKA 集团); 台式高速冷冻离心机(型号 5810R, 德国 Eppendorf 公司); 蛋白电泳系统(型号 Mini-PROTEAN Tetra, 美国 Bio-Rad 公司); 生物显微镜(型号 Ni-U, 日本 Nikon 公司)。

5 方法

5.1 动物造模 参照付小兵等^[18] 全层皮肤缺损法和沈道修等^[19] 改良塑料环肉芽肿定量法, 经改进制备大鼠体表慢性难愈合创面模型。大鼠经腹腔注射氯胺酮(90 mg/kg) + 甲苯噻嗪(9 mg/kg) 麻醉后置于无菌环境中, 背部备皮, 直径 1.5 cm 的圆形图章标记, 沿脊椎方向用外科方法作两条深达筋膜、直径为 1.5 cm 的全层皮肤缺损开放性创面, 加盖两层消毒干纱布, 用胶布“丰”字形固定。手术后再按 8 mg/100 g 剂量即刻注射醋酸氢化可的松, 制备慢性难愈合创面模型。

5.2 动物分组与干预治疗 将 12 周龄、体重 220 ~ 250 g SPF 级 SD 雄性大鼠 160 只, 适应性喂养 1 周后, 按照随机数表法分为空白组 24 只、对照组(急性全层皮肤缺损组) 34 只、慢性难愈合创面组 102 只。空白组大鼠不作任何有损伤性处理; 对照组大鼠按上述模型建立方法仅在造模部位行全层皮肤缺损开放性创面, 不注射醋酸氢化可的松; 慢性难愈合创面组大鼠按上述方法制备慢性难愈合创面模型, 随后分为模型组、贝复新组和 MEBT/MEBO 组, 每组动物各 34 只。除空白组不作任何处理外, 其余各组造模制备完成后即给药, 对照组和模型组敷盖两层生理盐水纱布; 贝复新组敷盖两层贝复新浸透纱布(60 IU/cm²), MEBT/MEBO 组创面敷盖两层 MEBO 纱条(含药量 0.2 g/cm²), 各组均加盖两层灭菌干纱布, 胶带固定。

各组换药前均以 1/5 000 呋喃西林液清洁创面, 每天早、晚各换药 1 次。

5.3 观察指标及检测方法

5.3.1 观察创面愈合情况 各组分别于干预治疗后第 3、7、14 天共 3 个时点各随机选取 10 只动物在固定焦距的情况下对创面拍照, 同时以透明薄膜描印创面。采用 NIH Image J 图像分析软件测量创面面积, 计算创面愈合率。公式: 创面愈合率(%) = (初始创面面积 - 观察日创面面积) / 初始创面面积 × 100%。

5.3.2 标本采集与处理 各组分别于干预治疗后第 3、7、14 天共 3 个时点每组各随机取 8 只大鼠, 切取距离创缘 0.5 cm 的整个创面及周围组织深达筋膜层, 将切取的第 3、14 天中的一部分组织予滤纸包裹置于包埋盒, 浸泡于 10% 中性缓冲液福尔马林里, 经 24 h 移置于 70% 无水乙醇中, 放于 4 °C 冰箱保存, 以作组织学观察; 剩余部分暂时存放于液氮中, 并及时转移至 -80 °C 冰箱, 统一进行 Western blot 实验, 检测分析 PI3K、p-Akt (S473)、p-mTOR (Ser2448)、p-p70 S6K (Thr389)、p-4E BP1 (Thr37/46) 蛋白表达水平。

5.4 组织形态观察 取创面组织后, PBS 液冲洗, 用 4% 多聚甲醛固定, PBS 液冲洗, 逐级脱水, 制作石蜡组织切片(厚度: 4 ~ 6 μ m), 常规 HE 染色, 生物显微镜下观察各组创面肉芽组织生长和上皮化程度的差异。

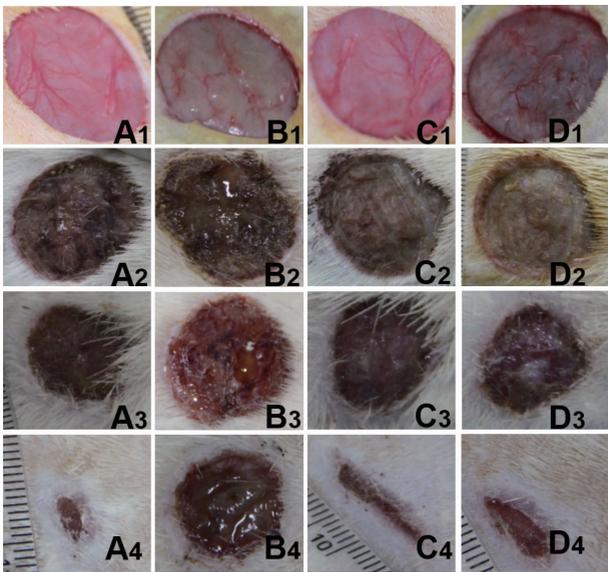
5.5 PI3K-Akt-mTOR 信号通路分子蛋白表达检测 组织匀浆机破碎创面组织, 提取总蛋白, 蛋白定量, 之后将蛋白变性保存备用。制备 10% SDS-PAGE 胶, 相同蛋白量上样, 80 V 恒压下电泳。蛋白电泳后电转至 PVDF 膜上, 恒流 0.3 A 转膜约 40 ~ 60 min。蛋白转膜后随即室温摇床封闭 2 h, 封闭完成后 4 °C 摇床孵育一抗过夜, 洗膜, 加二抗室温孵育 1.5 h, 再次洗膜后暗室发光曝光, 将结果扫描到电脑上用 Image J 软件进行灰度分析, 以目的条带与 β -actin 的积分吸光度比值表示样本蛋白含量。电泳条带密度值 = 灰度 × 面积 / 参照物值。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本间的比较采用单因素方差分析, 根据方差齐性检验, 方差齐及不齐时分别使用 LSD 法和 Games-Howell 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠体表创面愈合情况比较(图 1) 慢

性难愈合创面造模后第 2 天,模型组大鼠死亡 3 只。肉眼观察造模当天及干预治疗后第 3、7、14 天各组大鼠局部创面,对照组创面愈合情况最好,其次为贝复新组和 MEBT/MEBO 组,模型组愈合最差。干预治疗后第 14 天,对照组创面基本愈合或完全愈合,覆盖以大量新生毛发;模型组创面愈合较前有所好转,部分仍有脓性分泌物,部分创面干枯,较多坏死组织,揭开痂皮见基底苍白、少量散在肉芽组织;贝复新组创面面积愈合大半以上或几近愈合,创周较多新生毛发;MEBT/MEBO 组创面愈合情况良好,部分接近愈合,表皮生长迅速,创面呈淡红或粉红色,大量新生毛发覆盖创周。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为贝复新组;D 为 MEBT/MEBO 组;1、2、3、4 分别为第 0、3、7、14 天

图 1 各组大鼠第 0、3、7、14 天创面愈合大体情况

2 各组大鼠创面愈合时间比较(表 1) 与对照组比较,模型组大鼠创面愈合时间增长,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,贝复新组、MEBT/MEBO 组创面愈合时间均有缩短($P < 0.01$),贝复新组与 MEBT/MEBO 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠创面愈合时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	愈合时间(d)
对照	10	13.3 ± 0.7
模型	10	18.5 ± 1.3*
贝复新	10	15.1 ± 1.0 [△]
MEBT/MEBO	10	15.3 ± 1.7 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

预处理后第 3 天,各组创面愈合率基本相当。干预治疗后第 7 天,对照组创面愈合率(57.9 ± 4.2)%,模型组创面愈合率低于对照组,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);贝复新组和 MEBT/MEBO 组创面愈合情况优于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。干预治疗后第 14 天,对照组创面基本愈合,贝复新组和 MEBT/MEBO 组创面愈合率显著优于模型组创面愈合率,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组各时点创面愈合率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

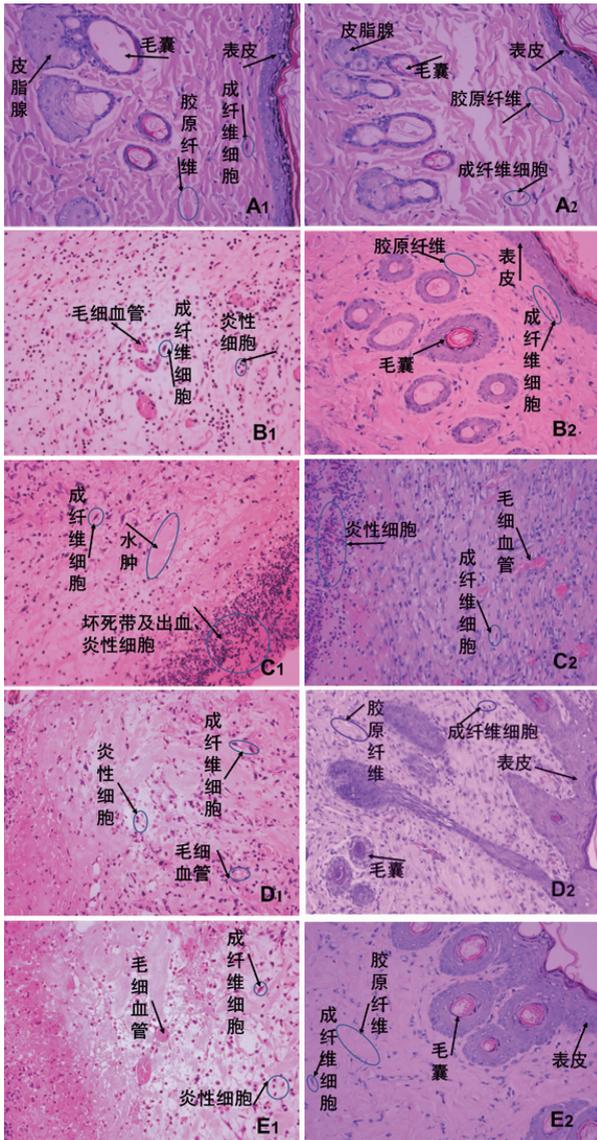
组别	创面愈合率		
	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照	10.7 ± 1.6(8)	57.9 ± 4.2(8)	97.8 ± 2.1(8)
模型	9.4 ± 1.9(7)	37.5 ± 1.8(7)*	67.9 ± 3.5(7)*
贝复新	9.6 ± 1.3(8)	48.1 ± 2.2(8) [△]	89.6 ± 3.9(8) [△]
MEBT/MEBO	9.8 ± 1.3(8)	49.5 ± 1.9(8) [△]	88.9 ± 4.3(8) [△]

注:与对照组同期比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较,[△] $P < 0.01$;()内数据为样本数

4 不同时相点各组大鼠创面组织病理形态学比较(图 2) 造模后第 3 天,空白组有完整的皮肤结构,见成熟的表皮组织、单个的毛囊及与肥大皮脂腺相连的毛囊,也可见成熟致密的胶原纤维束,少量梭形纤维细胞分布;与空白组比较,模型组创面组织表层出现明显坏死带及出血,大量炎性细胞浸润,组织高度水肿,成纤维细胞稀疏散在分布,未见新生毛细血管;对照组、贝复新组及 MEBT/MEBO 组均发现出血、水肿,有炎性细胞浸润,肉芽组织中见多走行紊乱、较丰富的成纤维细胞增殖,大量新生小、圆或橄榄球、狭长窄形的毛细血管紊乱分布。造模及干预治疗后第 14 天,空白组未见明显形态改变,有完整的表皮及皮肤附件,可见单个存在或与皮脂腺相连的毛囊,胶原纤维中少量成纤维细胞;与空白组比较,模型组部分创面组织坏死,可见不少炎症细胞,但较前减少,肉芽组织稀疏,仍见不少毛细血管,成纤维细胞分布散在且紊乱,部分区域可见表皮再生,但未见毛囊等其他皮肤附件形成;对照组、贝复新组及 MEBT/MEBO 组创面部分可见新生表皮爬覆,毛细血管萎缩,胶原纤维致密且排列整齐,走向较一致的成熟梭形纤维细胞分布,可见新生毛囊及其他较完整或正趋于成熟的皮肤附属器。

5 各组大鼠创面组织 PI3K 及磷酸化 Akt 蛋白表达水平比较(图 3,表 3) 造模及干预治疗后,对照组、模型组、贝复新组和 MEBT/MEBO 组大鼠创面组织 PI3K 蛋白表达量从第 3 天开始升高,第 7 天达到最高,随后逐渐降低。造模干预治疗后第 3 天和第 7 天,

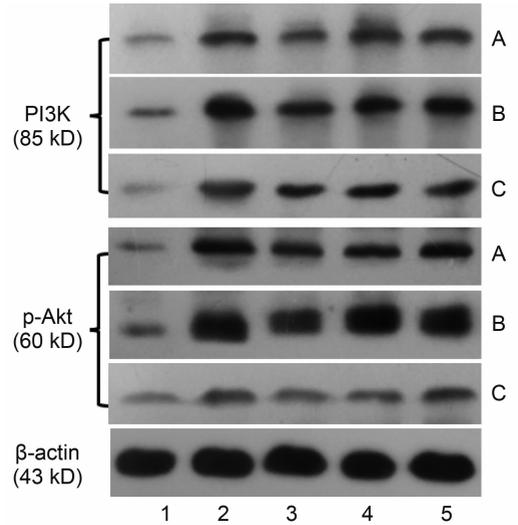
3 各组大鼠各时点创面愈合率比较(表 2) 干



注:A 为空白组;B 为对照组;C 为模型组;D 为贝复新组;E 为 MEBT/MEBO 组;其中 1,2 为第 3,14 天

图 2 不同时点各组大鼠创面组织病理形态学比较 (HE, ×200)

对照组、贝复新组和 MEBT/MEBO 组 PI3K 蛋白表达量显著高于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 14 天后, 各组间 PI3K 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。PI3K 高表达更多磷酸化激活其下游 Akt, 对照组、模型组、贝复新组和 MEBT/MEBO 组磷酸化 Akt (p-Akt) 表达量都呈现先升高后降低的趋势; 模型组的 p-Akt 表达量在第 3 天和第 7 天均低于对照组、贝复新组和 MEBT/MEBO 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 第 14 天后各组间 p-Akt 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。空白组大鼠由于未做损伤处理, 其组织乃正常皮肤, 故 PI3K 和 p-Akt 蛋白表达量未有明显变化。



注:A、B、C 依次为第 3、7、14 天;1 为空白组;2 为对照组;3 为模型组;4 为贝复新组;5 为 MEBT/MEBO 组

图 3 各组大鼠不同时点创面组织 PI3K 及 p-Akt 蛋白表达电泳图

表 3 各组大鼠不同时点创面组织 PI3K 及 p-Akt 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	PI3K	p-Akt
空白	8	第 3 天	0.15 ± 0.07 **	0.18 ± 0.07 **
		第 7 天	0.21 ± 0.10 **	0.23 ± 0.09 **
		第 14 天	0.15 ± 0.05	0.16 ± 0.05
对照	8	第 3 天	0.59 ± 0.12 ^{△△}	0.84 ± 0.13 ^{△△}
		第 7 天	0.75 ± 0.15 ^{△△}	1.08 ± 0.10 ^{△△}
		第 14 天	0.33 ± 0.09	0.26 ± 0.08
模型	7	第 3 天	0.22 ± 0.08	0.53 ± 0.10
		第 7 天	0.47 ± 0.02	0.79 ± 0.08
		第 14 天	0.29 ± 0.07	0.28 ± 0.05
贝复新	8	第 3 天	0.54 ± 0.17 [△]	0.76 ± 0.09 [△]
		第 7 天	0.66 ± 0.11 [△]	1.09 ± 0.09 ^{△△}
		第 14 天	0.38 ± 0.19	0.24 ± 0.04
MEBT/MEBO	8	第 3 天	0.48 ± 0.19 [△]	0.74 ± 0.11 [△]
		第 7 天	0.68 ± 0.05 [△]	0.97 ± 0.02 [△]
		第 14 天	0.35 ± 0.12	0.22 ± 0.08

注:与对照组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同期比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

6 各组大鼠不同时点创面组织 mTOR 信号通路分子蛋白表达比较(图 4, 表 4) 造模及干预治疗后, 各组创面组织 mTOR 信号通路被激活, mTOR 及其下游效应分子 p70 S6K 和 4E BP1 磷酸化水平显著升高, p-mTOR、p-p70 S6K 和 p-4E BP1 蛋白表达量都呈现先升高后降低的趋势。造模干预治疗后第 3 天和第 7 天, 与模型组比较, 除第 3 天对照组 p-mTOR 及 p-p70 S6K 外, 其余差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 第 14 天后, 各组间 p-

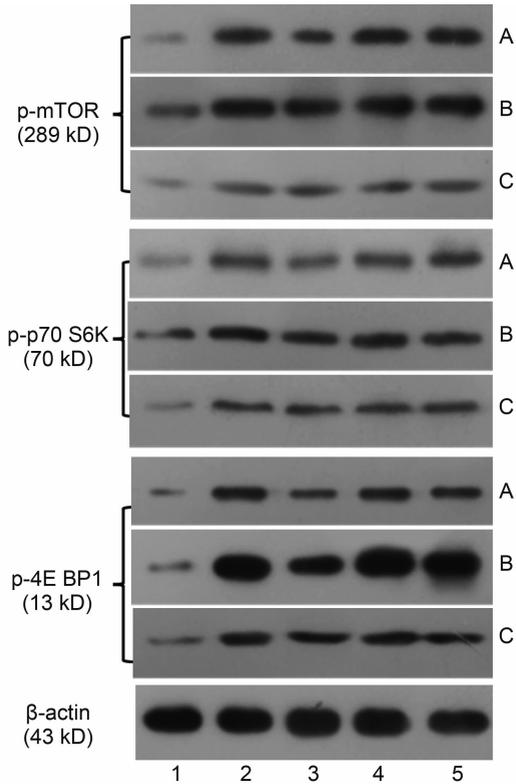
mTOR、p-p70 S6K 和 p-4E BP1 蛋白表达量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。空白组大鼠由于未做损伤处理,其组织乃正常皮肤,故 mTOR 及其下游效应分子蛋白表达量未有明显变化。

讨 论

中医学认为创伤的修复是创伤形成之后,邪正相争,正胜邪退,邪毒渐除,瘀滞尽化,经络复通,脏腑调和,津血正气恢复,气血流通的渐进过程^[20, 21]。中医药治疗皮肤溃疡以祛腐和生肌为基本原则,在长期运用的过程中积累了“煨脓长肉、祛腐生肌、活血化瘀”等丰富的经验^[20, 21]。研究证实,中医药可以缩短溃疡创面愈合时间,提高溃疡愈合率,并且不良反应少,治疗慢性难愈合创面具有“简、便、廉、验”的特点^[22-24]。

皮肤再生医疗技术是以 MEBO 为治疗药物,以 MEBT 为治则,简称 MEBT/MEBO,是当代中医药外治烧伤创疡的重要方法之一。MEBO 主要由黄连、黄柏、黄芩、地龙、罂粟壳等中药精制而成,具有活血化瘀、清热解毒、去腐生肌之功效。MEBO 中包含活血祛瘀的药物和补益之品的营养物,活血祛瘀药物可直达病所,加上其中含有祛腐生肌的成分,能祛除局部的腐肉和邪毒,达到腐去新生之效;而 MEBT 药物中的补益之品、营养成分则扶正补虚,为创面组织的再生修复提供营养原料。课题组前期研究已证实,MEBT/MEBO 可以创造一种既利于修复,同时又不破坏正常组织修复进程的生理环境,可促进难愈合创面修复,有效地预防或减少瘢痕形成,提高愈合质量^[25-27]。

创面修复过程中,创面组织需要加速合成大量与愈合相关的蛋白质以促进创面愈合,而蛋白质翻译被激活认为是创面愈合进程中的必然事件^[28]。调控蛋白质翻译、血管生成与调节细胞增殖、分化的信号转导通路中某一环节的异常,均可导致创面经久不愈、创面加深^[3, 4]。而作为细胞内非常重要的信号转导途径之一的 PI3K-Akt-mTOR 信号通路,发挥着调控核酸转录、蛋白质翻译,广泛参与调节细胞的生长与存活、增殖与凋亡、血管生成等重要生理病理作用^[15-17]。其中,PI3K 是细胞内重要的信号传导分子,参与调节细胞的增殖、凋亡与分化等生理过程^[29, 30]。营养物、生长因子(如 IGF-1)和氨基酸等作用于细胞表面受体或支架蛋白如 IRS 激活 PI3K,活化的 PI3K 磷酸化激活 Akt。活化的 Akt 通过结节性硬化 TSC1/2 复合物进一步激活其下游分子 mTOR 复合物 1(mTORC1)。有研究报道,活化的 mTOR 信号通路显著促进大鼠创面愈合^[28],而给予成年 C57 小鼠 mTOR 复合物 1(mTORC1)特异性抑制剂雷帕霉素(rapamycin)后创面发生延迟愈合^[31]。另一方面,mTOR 也是维持细胞生长、新陈代谢以及血管发生的重要调控元件。活化的 mTOR 进一步磷酸化激活其下游效应分子



注:A、B、C 依次为第 3、7、14 天;1 为空白组;2 为对照组;3 为模型组;4 为复新组;5 为 MEBT/MEBO 组

图 4 各组大鼠不同时点创面组织 mTOR 信号通路分子蛋白表达电泳图

表 4 各组大鼠各时点创面组织 p-mTOR、p-p70 S6K 及 p-4E BP1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	p-mTOR	p-p70S6K	p-4EBP1
空白	8	第 3 天	0.14 ± 0.06**	0.15 ± 0.04**	0.11 ± 0.05**
		第 7 天	0.21 ± 0.08**	0.18 ± 0.07**	0.12 ± 0.06**
		第 14 天	0.12 ± 0.01*	0.15 ± 0.05	0.12 ± 0.04**
对照	8	第 3 天	0.44 ± 0.06	0.38 ± 0.08	0.53 ± 0.18 $\Delta\Delta$
		第 7 天	0.76 ± 0.11 Δ	0.62 ± 0.05 Δ	1.12 ± 0.15 $\Delta\Delta$
		第 14 天	0.37 ± 0.04	0.27 ± 0.06	0.49 ± 0.13
模型	7	第 3 天	0.29 ± 0.13	0.31 ± 0.05	0.26 ± 0.07
		第 7 天	0.42 ± 0.09	0.36 ± 0.15	0.70 ± 0.07
		第 14 天	0.28 ± 0.06	0.23 ± 0.10	0.37 ± 0.04
复新	8	第 3 天	0.52 ± 0.11 Δ	0.39 ± 0.08	0.49 ± 0.08 Δ
		第 7 天	0.69 ± 0.16 Δ	0.61 ± 0.13 Δ	1.07 ± 0.17 $\Delta\Delta$
		第 14 天	0.32 ± 0.15	0.26 ± 0.09	0.32 ± 0.13
MEBT/MEBO	8	第 3 天	0.50 ± 0.14 Δ	0.35 ± 0.09	0.47 ± 0.06 Δ
		第 7 天	0.71 ± 0.20 Δ	0.56 ± 0.08 Δ	0.96 ± 0.14 Δ
		第 14 天	0.35 ± 0.11	0.30 ± 0.14	0.38 ± 0.19

注:与对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

p70 S6K 和真核翻译起始因子 4E-BP1。p70 S6K 磷酸化后激活 S6K1, 促进 mRNA 的转录和蛋白质的翻译、合成。4E-BP1 磷酸化后失活, 与真核细胞翻译起始因子 4E 即 eIF4E 分离, 随后 eIF4E 释放并募集 eIF4G 和 eIF4A 形成三聚体的真核细胞翻译起始因子复合物 eIF4F, 启动蛋白质的翻译。

本实验研究结果证实, 作为具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞内磷脂酰肌醇激酶 PI3K, 只有当激发其活性时才能磷酸化激活其相关下游效应分子, 进而充分发挥该信号通路在创面修复中调控肉芽组织的核酸转录、蛋白质翻译、细胞增殖与凋亡、血管生成等序列生物反应作用。同时也证实, 随着创面愈合时间的推移, 各组大鼠肉芽组织中 PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 和 p-4E BP1 表达水平均呈现出先升高-降低、第 3 天水平最高、最终逐渐恢复或接近其生理水平的趋势。实验结果表明, 模型组创面愈合时间、愈合率、相关蛋白表达水平均无 MEBT/MEBO 组理想, 这表明, 当大鼠局部慢性创面形成后, 其局部创面组织中相关蛋白生物进程减缓, 由于慢性创面信号的持续刺激, 导致 PI3K-Akt-mTOR 信号通路激活受抑制, 影响创面组织修复的相关生物进程; 而 MEBO 是一种能创造出近似于人体内环境的仿生制剂, 其药物及营养成分的组方机制和药物作用形成了一个由“药”-“方”-“法”-“理”构成的“个体辨证系统”, 从而可使创面组织立体式地暴露在一个完全符合生命规律的生理性湿润环境内进行代谢修复、实现再生, 其以液化的方式无损伤地排除坏死组织、以原位细胞组织培植的方式再生修复创面, 可减少慢性创面中不利于修复的刺激信号、增强或调动慢性创面中促愈合的刺激信号, 活化 PI3K、Akt、mTOR、p70 S6K、4E BP1 蛋白水平并最终使之趋于平稳水平, 促进大量与愈合相关的蛋白质合成, 使之发挥促成纤维细胞与血管内皮细胞增殖分化作用, 进而促进肉芽组织生长、较少瘢痕组织增生, 最终达到修复目的。因此, 随着创面愈合时间的推移, MEBT/MEBO 组组织病理形态学随之发生改变, 表现出初期成纤维细胞及毛细血管增生较模型组明显且成纤维细胞体积及毛细血管官腔均较模型组大、炎性细胞较模型组少, 后期 MEBT/MEBO 组成纤维细胞及胶原纤维排列致密, 而模型组肉芽组织中成纤维细胞仍在大量增殖且仍见不少毛细血管及炎性细胞甚至坏死、胶原纤维大量沉积且排列不整齐; 同时, MEBT/MEBO 组创面肉芽组织中相关蛋白量逐渐增高, 并在接近愈合终末期时下调或接近生理水平; 而模型组因未施予外来干预, 同期相关蛋白量较 MEBT/MEBO 组

水平低, 其局部组织处于慢性创面信号的持续刺激, 进而发生修复缓慢或修复障碍, 因而其愈合进程较 MEBT/MEBO 组缓慢。

本研究显示, MEBT/MEBO 能较显著促进慢性难愈合性创面修复, 较好改善其组织病理学改变, 疗效较显著, 其作用机制可能是: MEBT/MEBO 激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路, 促进大量与愈合相关的蛋白质合成, 促进肉芽组织增生、较少瘢痕组织增生, 从而加快大鼠体表慢性难愈合创面的修复。至于 MEBT/MEBO 中作用 PI3K-Akt-mTOR 信号通路的活性成分尚有待下一步深入研究。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 姜玉峰, 付小兵. 体表慢性难愈合创面的研究进展[J]. 感染·炎症·修复, 2011, 12(1): 59-61.
- [2] 曾鸿孟, 唐乾利. 体表慢性难愈合创面的研究进展[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2016, 28(5): 340-344.
- [3] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration[J]. Nature, 2008, 453(7193): 314-321.
- [4] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(265): 265sr6.
- [5] Sen CK, Gordillo GM, Roy S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy [J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(6): 763-771.
- [6] Jiang Y, Huang S, Fu X, et al. Epidemiology of chronic cutaneous wounds in China [J]. Wound Repair Regen, 2011, 19(2): 181-188.
- [7] Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: A review of current management and treatments [J]. Adv Ther, 2017, 34(3): 599-610.
- [8] 卢栋, 郭璐, 唐乾利, 等. MEBT/MEBO 治疗慢性难愈合创面 60 例临床疗效观察 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2010, 22(5): 346-350.
- [9] 陈方凯, 李晓辉, 龚海粟, 等. MEBT/MEBO 治疗慢性难愈合性创面的临床疗效分析 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2014, 26(2): 119-124.
- [10] 李杰辉, 黄欣, 唐乾利, 等. MEBT/MEBO 治疗糖尿病足溃疡的临床疗效观察 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2016, 28(1): 22-25.
- [11] 吴标良, 唐乾利, 冯烈, 等. 烧伤皮肤再生医疗技术治疗糖尿病足部溃疡疗效的系统评价 [J]. 中国全科医学, 2014, 17(32): 3851-3854.

- [12] 唐乾利, 黄欣, 王宇, 等. 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏治疗慢性难愈合创面的超微病理及丝裂原活化蛋白激酶激酶和 c-myc mRNA 表达的机制研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(3): 294-299.
- [13] 唐乾利, 付军, 韩珊珊, 等. MEBT/MEBO 对大鼠慢性难愈性皮肤溃疡创面肉芽组织 EGF、EGFR 表达的影响[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2012, 24(6): 470-480.
- [14] 唐乾利, 韩珊珊, 付军, 等. MEBT/MEBO 对皮肤创面愈合过程中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达影响的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(5): 597-601.
- [15] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease [J]. Cell, 2012, 149(2): 274-293.
- [16] Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(6): 555-564.
- [17] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. Cell, 2017, 168(6): 960-976.
- [18] 赵京禹, 付小兵, 雷永红, 等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备[J]. 感染·炎症·修复, 2008, 9(1): 64-64.
- [19] 沈道修, 顾月芳, 任晓英. 一种研究中草药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J]. 中西医结合杂志, 1983, 3(1): 49-50, 67, 5.
- [20] 张云杰. 中医药治疗慢性皮肤溃疡研究概况[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(12): 1040-1042.
- [21] Huang YY, Jiang M, Zhang C, et al. Benefits of Chinese medicine among patients with diabetic foot: An expert review from clinical studies [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(4): 520-525.
- [22] Tang QL, Han SS, Feng J, et al. Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1277-1282.
- [23] 唐乾利, 李利青, 李辉, 等. MEBT/MEBO 对大鼠糖尿病足创面组织 TGF- β 1、Smad3、P-smad3 表达及形态学结构的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2017, (3): 283-288.
- [24] 唐乾利, 曾鸿孟, 王澍, 等. 皮肤再生医疗技术对大鼠慢性难愈合创面不同时段 PTEN 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, (9): 2218-2221.
- [25] 唐乾利, 王权胜, 尚新志. MEBT/MEBO 对慢性难愈合皮肤创面基础研究现状与展望[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2009, 21(2): 95-99.
- [26] 徐荣祥, 萧摩. 烧伤皮肤再生疗法与创面愈合的机制[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2003, 15(4): 253-261.
- [27] 李利青, 何晓微, 黄欣, 等. 烧伤皮肤再生医疗技术治疗糖尿病皮肤溃疡机理的总结探析[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2014, 26(1): 38-44, 46.
- [28] 崔文慧. mTOR 信号通路与创伤愈合的相关性研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012: 8-12.
- [29] Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase in human disease [J]. Harvey Lect, 2004, 100: 103-122.
- [30] Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(9): 545-555.
- [31] Mills RE, Taylor KR, Podshivalova K, et al. Defects in skin gamma delta T cell function contribute to delayed wound repair in rapamycin-treated mice [J]. J Immunol, 2008, 181(6): 3974-3983.

(收稿: 2018-08-22 在线: 2019-04-03)

责任编辑: 段碧芳

责任编辑: 张晶晶