

· 临床研究 ·

# 芪榆油膏对肛瘻术后创面肉芽组织中 EGF mRNA 表达的影响\*

曹波<sup>1</sup>, 李志<sup>1△</sup>, 李绍堂<sup>2</sup>, 邓文玲<sup>1</sup>

(1. 贵阳中医学院第一附属医院/贵州省肛肠病医院肛肠科 550001;

2. 上海交通大学附属新华医院肛肠科 200092)

**摘要:**目的 通过观察芪榆油膏对肛瘻术后创面肉芽组织中表皮生长因子(EGF)mRNA 表达的影响,探讨其分子生物学水平的作用机制。**方法** 选择 2009 年 6 月至 2010 年 3 月贵阳中医学院第一附属医院肛肠科病房低位单纯性肛瘻患者 90 例,随机分为观察组、对照组和凡士林组,每组 30 例。采用 RT-PCR 方法对术后用药第 7 天各组创面肉芽组织中 EGF mRNA 的表达进行检测并比较各组疗效。**结果** 观察组术后用药第 7 天创面肉芽组织中 EGF mRNA 基因表达均明显超过对照组和凡士林组( $P < 0.01$ );创面愈合时间观察组明显少于对照组和凡士林组( $P < 0.05$ )。**结论** 芪榆油膏对瘻术后肛创面的愈合作用可能通过上调 EGF mRNA 的表达介导。

**关键词:** 逆转录聚合酶链反应;基因表达;芪榆油膏;创面愈合

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.27.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)27-2726-03

## Influence of Qi Yu Ointment on the expression of EGF mRNA \* in Anal Fistula Wound Granulation Tissue\*

Cao Bo<sup>1</sup>, Li Zhi<sup>1△</sup>, Li Shaotang<sup>2</sup>, Deng Wenling<sup>1</sup>

(1. Department of Anus &amp; Intestine The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine / Guizhou Provincial Anorectal Hospital, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. Department of Anus &amp; Intestine Shanghai Jiaotong University Affiliated Hospital, Xinhua Hospital, Shanghai 200092, China)

**Abstract: Objective** To observe the influence of Qi Yu ointment on the expression of epidermal growth factor(EGF)mRNA \* in anal fistula wound granulation tissue to explore its mechanism of molecular biology level. **Methods** 90 patients with simple low anal fistula were randomly divided into three groups: observation group, control group and vaseline groups with 30 patients respectively. And then detect the expression of vEGF mRNA in each group which has received treatment for 7 days by RT-PCR method and then compare the efficacy of each group. **Results** The expression of EGF mRNA in the observation group was higher than that of control group and vaseline group( $P < 0.01$ ); and wound healing time of the observation group was shorter than that of the control group and the vaseline group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The function of Qi Yu ointment on the Qi Yu ointment of the wound tissue is conducted by EGF.

**Key words:** reverse transcription polymerase chain reaction; gene expression; Qi Yu ointment; wound healing

芪榆油膏是一种纯中药制剂。有研究发现,该药物能促进肛瘻术后创面的愈合,但其促进创面愈合的机制尚不清楚。本研究观察创面愈合时间与创面肉芽组织中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)mRNA 表达的关系,以期在分子生物学方面找到芪榆油膏促进创面愈合的理论依据,为该油膏在临床上进一步推广应用提供真实可靠的科学依据。现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2009 年 6 月至 2010 年 3 月贵阳中医学院第一附属医院肛肠科病房低位单纯性肛瘻患者 90 例,随机分为观察组、对照组和凡士林组,每组 30 例。3 组患者一般资料见表 1,均符合参考文献[1]的标准。纳入标准:凡符合低位单纯性肛瘻诊断标准的患者,术后创面纵径为 2.5~3.0 cm,并签署知情同意书。排除标准:未按规定方案用药或半途终止用药、出现药物过敏患者。3 组患者性别、年龄、创面平均纵径等差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 试剂及仪器** EGF 抗体试剂盒、RNA 酶抑制剂、逆转录酶(M-MuLV)试剂盒、核苷酸混合物(dNTP Mix)、TaqDNA 聚合酶、随机引物[Oligo(dT)18]、Master Mix 试剂盒均为上海捷瑞生物有限公司产品。PCR 仪为美国 PE 公司产品,凝胶电泳成像系统为美国 Bio-Rad 公司产品。

### 1.3 方法

**1.3.1 芪榆油膏的制作** 按方(生黄芪 120 g、生地榆 60 g、当归尾 60 g、丹参 30 g、紫草 30 g、白芨 30 g、乳香 30 g、没药 30 g、血竭 30 g)将各药均匀混合研成细粉,过筛(100 目),纳入 1 000 g 芝麻油中浸泡 72 h,烧开芝麻油用火将各药炸枯,加热炸至白芷棕褐色,去渣;双层纱布过滤,待油温降至 50~60 °C 时,加入蜂胶搅拌均匀即得。放于高温磨砂瓶中高压灭菌 120 min 备用。

表 1 3 组患者一般资料

组别	n	性别		年龄(岁)	创面平均纵径(cm)
		男	女		
观察组	30	26	4	38.01±5.17	2.81±0.19
对照组	30	27	3	37.68±4.38	2.78±0.27
凡士林组	30	26	4	37.85±5.05	2.74±0.25

**1.3.2 创面处理及术后给药方法** 术前均备皮、清洁灌肠,采用连续硬膜外麻醉。手术方式均行“瘻切除术”,修剪创缘,使切口呈下窄上宽的“V”字型,以便引流通畅,手术切口均不缝合,创面纵径为 2.5~3.0 cm,每次换药前均常规消毒,观察组用芪榆油膏,对照组用龙珠软膏,凡士林组用凡士林纱条,每日换药 1 次至创面愈合。术后均使用同种抗生素 5 d,止血药、止

痛药 3 d。

**1.3.3 标本采集及制备方法** 术后第 7 天换药时,用组织剪取 1.0 mm×1.0 mm 新鲜肉芽组织,放入 10% 甲醛溶液试剂瓶,并做好编号,送医院病理实验室。同样再用组织剪取 1.0 mm×1.0 mm 新鲜肉芽组织,放入装有裂解液的专用 Ep 管中,并做好编号,放于 4℃ 恒温冰箱中保存,立即送往贵州医学院生理病理实验室,−80℃ 低温冰箱中速冻,以防蛋白酶分解,待测分子生物学指标。

**1.3.4 用 RT-PCR 方法检测 EGF mRNA 表达** (1)引物合成:EGF mRNA 的引物设置与扩增参考文献[2]并用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,由上海捷瑞生物有限公司合成纯化:EGF 的上游引物为 5'-TGC CAA CTG GGG GTG CAC AG-3',下游引物为 5'-CTG CCC GTG GCC AGC GTG GC-3',扩增产物片段长度为 342 bp;相应内参(β-actin)上游引物为 5'-GAA ATC GTG CGT GAC ATT AAG-3',下游引物为 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GA-3',扩增产物片段长度为 490 bp。(2)组织总 RNA 的提取:采用 Trizol 提取总 RNA,按 Trizol 试剂说明书操作,提得各标本总 RNA,取 1 个 0.2 mL Ep 管加入 48 μL RNase-free 水,再加入 2 μL 已提取的 RNA 标本,在核酸蛋白分析仪上以 RNase-free 水调零,对所提 RNA 进行定量分析,计算出测 RNA 的浓度和纯度(260 nm/280 nm 比值均为 1.8~2.0),说明 RNA 样品纯度理想;其余放在−80℃ 冰箱中保存备用。(3)逆转录反应:cDNA 的合成严格按照逆转录试剂盒说明书进行操作,逆转录反应体系含 5× reaction buffer 4 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL,10 mmol/L dNTP Mix 2 μL,1 μg/μL Oligo(dT)18 1 μL,无 RNA 酶水 6 μL,M-MuLV 1 μL,组织总 RNA 5 μL(约 2 μg),共 20 μL。反应条件为 70℃ 5 min,37℃ 5 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min。所得逆转录产物 cDNA(−20℃ 保存)。(4)PCR 扩增反应:PCR 反应体系组成:取 cDNA 2 μL,加 10×PCR buffer 2.5 μL,25 mol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL,10 mol/L 核苷酸混合物(dNTP Mix)0.5 μL,5 U/μL MBI DNA 聚合酶 0.2 μL,EGF mRNA 及 β-actin mRNA 上下游引物各 0.5 μL,灭菌水 16.3 μL。共 25 μL。PCR 扩增反应条件:94℃ 预变性 5 min(灭活逆转录酶);94℃ 变性 45 s,58.5℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 40 个循环,72℃ 最后延伸 10 min;EGF PCR 产物为 342 bp,相应内参(β-actin)PCR 产物为 490 bp。4℃ 保存产物。(5)PCR 产物鉴定:在 160 V 电压下,取 5 μL 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳 1 h,然后将凝胶放入凝胶电泳成像系统仪,经计算机扫描成像,成像仪进行图片采集。(6)RT-PCR 结果判定:用 Quantity one 软件分析 DNA 条带的面积及吸光度值,二者乘积为积分吸光度,每条 DNA 带重复测 3 次,取其均值。以 β-actin 扩增条带作为内参照,结果用靶基因(即待测基因 EGF)与相应的 β-actin 的积分吸光度值之比表示 EGF mRNA 表达的相对水平参数,进行半定量分析。

**1.3.5 创面愈合时间测定** 即创面完全上皮化所需时间,上皮化依靠肉眼观察<sup>[3]</sup>。每天换药观察创面愈合程度,如创面被新生肉芽组织填满,覆盖组织完全上皮化,即确定为创面愈合时间。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料用  $\chi^2$  检验,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

观察组术后用药第 7 天创面肉芽组织中 EGF mRNA 基因表达均明显超过对照组和凡士林组( $P < 0.01$ )。(1)EGF mRNA 及 β-actin 经 PCR 扩增后片段分别为 342 bp,490 bp,

见图 1。观察组平均创面愈合时间[(17.03±1.35)d]较对照组[(17.87±1.22)d]和凡士林组[(20.13±1.63)d]短( $P < 0.05$ )。各组术后肉芽组织中 EGF 和相应 β-actin 经 RT-PCR 扩增后产物的积分吸光度值之比数据见表 2。

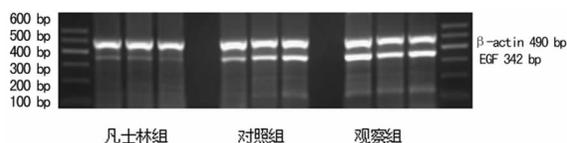


图 1 术后第 7 天肉芽组织中 EGF mRNA 及 β-actin 扩增产物电泳图

表 2 各组不同病历 EGF 和 β-actin 经 RT-PCR 扩增后产物的比值

n	观察组	对照组	凡士林组
1	1.104 095☆	0.652 671	0.579 699
2	1.079 439☆	0.782 447	0.533 919
3	0.832 637☆	0.846 684	0.599 809
$\bar{x} \pm s$	0.986±0.099☆	0.792±0.107	0.555±0.083

☆:  $P < 0.01$ , 与对照组和凡士林组比较。

**3 讨 论**

术后创面的修复是一个连续复杂的生理动态过程,主要涉及炎症细胞的迁徙,细胞因子的合成、释放与利用,成纤维细胞的增殖,新生血管的形成,细胞外基质的合成、沉积和改建等系列环节。改变任一环节都可能影响创伤修复的进程。通过内服或外用中药,能促进创面组织周围的细胞及炎症细胞释放多种内源性生长因子,减少创面氧自由基的量和活性、促进创面细胞基质的合成、提高机体及创面抗感染能力,从而加速创面的愈合。

芪榆油膏是紫草油、生肌玉红膏方剂加减制成的一种纯中药外用油膏。有研究证明,本方中君药黄芪具有较好的促进血管生成作用<sup>[4]</sup>,丹参可通过调节血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)的表达而促进创伤修复<sup>[5]</sup>。另外方中加蜂胶不仅能保护肉芽组织,还有利于伤口愈合<sup>[6]</sup>,抗菌、抗氧化,增强免疫、抗过敏等作用<sup>[7]</sup>。有研究证明,蜂胶外用具有修复器官组织的损伤,消除炎症,促进组织再生,调节内分泌,改善血液循环状态,促进皮下组织血液循环的作用<sup>[8]</sup>。芪榆油膏外敷能使创面形成密闭湿润环境,可促进巨噬细胞、血小板、成纤维细胞和中性粒细胞释放各种生长因子,而且还可调节或刺激巨噬细胞增生<sup>[9-17]</sup>。湿性密闭湿润环境不仅能使各种细胞保持活力,而且有利于创面的重要防御功能恢复和创面愈合。必须的细胞群,如巨噬细胞的积聚,这些细胞将释放大量生长因子并造成一个加快血管生成和纤维蛋白溶解的环境,使创面以更快的速度愈合。同时油膏外敷后,在创面表面形成油状药膜,不易干燥,既有利于延长药效,又能减少创面受摩擦,减少创面由于摩擦引起的刺激、疼痛。再者,创面形成的药膜,防止了敷料和创面形成粘连,避免了换药时撕拉敷料所引起的创面疼痛、出血及破坏新鲜的肉芽组织,对创面有着明显的保护作用。

本研究结果表明,术后创面肉芽组织内均存在内源性 EGF mRNA 表达,提示 EGF 在创面的愈合过程中起着重要的调节作用。但观察组术后用药第 7 天创面肉芽组织中 EGF mRNA 表达均明显超过对照组和凡士林组( $P < 0.01$ ),表明芪榆油膏能诱导内源性 EGF mRNA 表达。其机制可能与方中黄芪和当归配伍促进内皮细胞 EGF mRNA 的表达有关<sup>[18-19]</sup>。创面愈合时间观察组明显短于对照组和凡士林组( $P < 0.05$ )。从另一个方面表明芪榆油膏在促进肛瘘术后创

面愈合方面和 EGF 之间存在着必然的内在联系, EGF 作为内源性正性调节因子参与了创面修复过程。在创面愈合的过程中,  $\beta$ -actin 基因表达, 各组表达量无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 说明标本变化符合实际。芪榆油膏可能调动细胞对生长因子的分泌作用, 刺激内源性 EGF 生成而发挥的作用, 芪榆油膏起到了诱发和激活这些细胞活动的作用, 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, 可见芪榆油膏影响创面修复机制之一是通过 EGF 介导的。

此外, 芪榆油膏是油性制剂, 用在创面上形成一层薄薄的药痂, 其下的微环境也可适宜于血管和上皮的增生。芪榆油膏是否能动员创面内干细胞增殖、分化, 进而促进血管新生尚需进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 中华中医药学会肛肠分会, 中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组, 中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会. 肛瘘临床诊治指南[M]. 北京: 首都师范大学出版社, 2006.

[2] Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decrease release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro[J]. *Microvasc Res*, 1998, 55(1): 29-42.

[3] Sigh KP, Rhsadr, Charl PS, et al. Effect of growth hormone therapy in burn patients on conservative treatment[J]. *Burns*, 1998, 24(6): 733-738.

[4] 王为, 张景云. 创愈散祛腐生肌实验研究[J]. *中国肛肠病杂志*, 2002, 22(11): 3-4.

[5] 王林杨. 复黄生肌愈创油膏对皮肤溃疡修复作用的实验研究[J]. *中医外治杂志*, 1999, 8(4): 6-7.

[6] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 2480.

[7] 怡悦. 水提取蜂胶与碱性蜂胶的抗肿瘤作用[J]. *国外医学: 中医中药分册*, 2002, 24(2): 124.

[8] 刘富海, 许正鼎. 神奇蜂胶疗法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 14.

[9] 周金宝, 肇毅, 朱海青, 等. 丹参药膜对胃壁创伤组织 PDGF 表达的影响[J]. *山东中医杂志*, 2005, 24(2): 42-43.

[10] 付小兵, 王德文. 现代创伤修复学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 245.

[11] 田建广, 夏照帆. 创面敷料的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(5): 470-471.

[12] 戚可名. 女性美容整形外科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 93.

[13] Brogi E, Schatteman G, Wu T, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(2): 469-476.

[14] Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemia myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs[J]. *Circulation*, 1994, 89(5): 2183-2189.

[15] Mukherjee S, Tessema M, Wandinder-Ness A. Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in regulation of signaling and vascular function[J]. *Circ Res*, 2006, 98(6): 743-756.

[16] Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiotensin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 2002, 10(4): 379-392.

[17] Hugo JH, Myriam B, Anita B, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(3): 965-976.

[18] 雷燕, 高倩, 黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(10): 753-756.

[19] 李悦山, 张建龙, 薛磊. 黄芪与当归对人脐静脉内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2005, 28(3): 35-38.

(收稿日期: 2011-05-28 修回日期: 2011-06-29)

(上接第 2725 页)

with partial or whole breast irradiation for low-risk invasive breast carcinoma 5-year results of a randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(3): 694-702.

[11] Vicini F, Winter K, Straube W, et al. A phase I/II trial to evaluate three-dimensional conformal radiation therapy confined to the region of the lumpectomy cavity for Stage I/II breast carcinoma: initial report of feasibility and reproducibility of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) Study 03197[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63(5): 1531-1537.

[12] Veronesi U, Orecchia R, Luini A, et al. A preliminary report of intraoperative radiotherapy (IORT) in limited-stage breast cancers that are conservatively treated[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(17): 2178-2183.

[13] Baglan KL, Sharpe MB, Jaffray D, et al. Accelerated par-

tial breast irradiation using 3D conformal radiation therapy (3D-CRT)[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 55(2): 302-311.

[14] Solin LJ, Chu JCH, Sontag MR, et al. Three dimensional photon treatment planning of the intact breast[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1991, 21(1): 193-203.

[15] Cuttino LW, Todor D, Pacyna L, et al. Threedimensional conformal external beam radiotherapy (3D-CRT) for accelerated partial breast irradiation (APBI): what is the correct prescription dose[J]. *Am J Clin Oncol*, 2006, 29(5): 474-478.

[16] 闫春梅, 刘杰, 王慧琳, 等. 不同术式对 I 期乳腺癌患者生活质量的影响[J]. *护理研究*, 2004, 10(18): 1797-1799.

(收稿日期: 2011-05-28 修回日期: 2011-06-29)