

· 基础研究 ·

康肤霜对糖尿病大鼠烫伤创面愈合的作用*

龚震宇¹, 童亚林^{1△}, 万友华², 杨润生³, 苏晓玲³

(中国人民解放军第 181 医院:1. 烧伤整形科;2. 病理科;3. 动物实验中心, 广西桂林 541002)

摘要:目的 观察康肤霜对糖尿病大鼠深 II 度烫伤创面愈合的影响。方法 Wistar 大鼠 24 只, 采用尾静脉注射四氧嘧啶法制成糖尿病大鼠模型。自动控时调压烫伤仪在大鼠背部制备 4 个深 II 度烫伤创面, 将创面随机分为康肤霜组、rhEGF 组、聚维酮碘组及生理盐水组, 分别采用康肤霜、rhEGF、聚维酮碘及生理盐水外敷, 直至创面取材或创面愈合。观察创面愈合率及愈合时间。各组大鼠于创面治疗后第 7、14、21 天取创面组织, 苏木素-伊红(HE)染色光学显微镜下观察创面组织病理学变化, 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)免疫组织化学法检测创面组织增殖细胞核抗原(PCNA)的表达, 以标记指数法测定 PCNA 阳性细胞, 评估组织创面的修复情况。**结果** 康肤霜组大鼠创面愈合时间、愈合率均优于其他 3 组($P < 0.05$)。病理检查显示康肤霜能明显减轻创面早期的炎症反应, 促进创面的再上皮化和表皮各层的分化。康肤霜组大鼠创面组织中 PCNA 的表达水平明显高于其他 3 组($P < 0.05$)。**结论** 康肤霜能促进糖尿病大鼠烫伤创面细胞增殖, 加速创面的愈合。

关键词:糖尿病, 实验性; 伤口愈合; 增殖细胞核抗原; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)07-0679-04

Effect of Kangfu cream on the scald wound healing of rats with diabetes mellitus*

Gong Zhenyu¹, Tong Yalin^{1△}, Wan Youhua², Yang Runsheng³, Su Xiaoling³

(1. Department of Burn and Plastic Surgery; 2. Department of Pathology; 3. Laboratory Animal Center, the 181st Hospital of Chinese People's Liberation Army, Guilin, Guangxi 541002, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Kangfu cream on deep II degree burn wound healing of rats with diabetes mellitus. **Methods** Tail-vein injection of alloxan in 24 Wister rats were performed to establish diabetic rat models. Automatic time control and pressure regulation scald apparatus was employed to make 4 surfaces of deep II degree burn wound on the back of rats. The wound surfaces were randomly divided into Kangfu cream group, rhEGF group, povidone-iodine group and physiological saline group in which rats were treated with Kangfu cream, rhEGF, povidone-iodine and physiological saline, respectively, until the wound tissue samples taken or the wound healing. The wound healing rates and the healing periods were observed. The samples of wound surface tissue of rats in each group were taken on the 7th, 14th and 21th day after treatment. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of wound tissue by optical microscope. Streptavidin biotin-peroxidase complex(SABC) immunohistochemistry was adopted to detect the expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA), and the PCNA positive cells were measured by labeling index method to evaluate the tissue repair in wound surface. **Results** Both wound healing period and healing rates of rat in Kangfu cream group were superior to those in the other 3 groups($P < 0.05$). Pathological examination demonstrated that Kangfu cream could significantly reduce the early inflammatory response in wound surfaces, promote the wound re-epithelialization and the differentiation of each epidermal layer. The expression level of PCNA in wound surface tissue was markedly higher than those in the other 3 groups($P < 0.05$). **Conclusion** Kangfu cream can promote the cell proliferation in wound surface of rats with diabetes mellitus and facilitate the wound healing.

Key words: diabetes mellitus, experimental; wound healing; proliferating cell nuclear antigen; rats

烧伤患者合并糖尿病在临床中较常见, 这类患者的创面愈合较困难, 常发展成经久不愈的溃疡, 极大地影响了临床治疗效果^[1]。康肤霜为烧伤创面外用药物, 动物实验证实其对急、慢性创面的愈合具有明显促进作用^[2-4]。本实验在已建立的新型糖尿病大鼠深 II 度烫伤创面模型的基础上, 观察康肤霜对该模型创面愈合的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 健康的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Wistar 雄性大鼠 24 只, 体质量(220±25)g, 由桂林医学院动物中心提供(合格证号: SCXK 桂 2007-0001)。本实验

经解放军第 181 医院动物实验伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂及药物 重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)凝胶购自桂林华诺威基因药业有限公司(批号: 20060601); 聚维酮碘为长沙雨花消毒药有限公司产品(批号: 20070727/59); 四氧嘧啶为美国 Sigma 公司产品(批号: GA-14908); 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin biotin-peroxidase complex, SABC)免疫组织化学染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(克隆编号 PC10)。康肤霜为锌、冰片、洗必泰、水溶性基质、少量维生素 A 及维生素 E 按一定比例配制的水包油型白色霜剂, 由解放

军第 181 医院自行研制。

1.1.3 仪器 主要仪器包括:One Touch 血糖仪(美国强生公司)、Olympus BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)、DP-70 图像分析系统(日本 Olympus 公司)、自动控时调压烫伤仪(解放军第 181 医院研制,发明专利号 200610114104.4)。

1.2 实验方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的建立 实验前大鼠禁食 12 h,测血糖,选取空腹血糖低于 7.0 mmol/L 的大鼠,尾静脉注射四氧嘧啶溶液(40 mg/kg),注射后自由饮食,1 周后测随机血糖,若血糖超过 11.1 mmol/L,持续 4 周,并伴有体质量减轻,多饮、多食、多尿,即可认为建模成功^[5]。

1.2.2 糖尿病大鼠烫伤模型的建立^[6] 取成功建模的糖尿病大鼠 24 只,采用 10% 硫化钠水溶液于大鼠背部脱毛,24 h 后确认脱毛区无损伤。采用 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)大鼠腹腔注射,麻醉成功后,在大鼠背部脊柱两侧标出 4 个直径为 1.5 cm 的圆形区域(左、右侧各 2 个,前后创面相距 4 cm)。采用自动控时调压烫伤仪致伤,设定高压锅内压力为 300 mmHg(0.04 kPa),温度为 106 °C,烫伤时间为 2 s,致伤后创面皮肤颜色呈灰白,质地均匀一致,病理组织学检查证实为深 II 度。

1.2.3 实验分组 致伤后,将大鼠的 4 个创面随机分为康肤霜组、rhEGF 组、聚维酮碘组及生理盐水组,致伤后分别采用康肤霜、rhEGF、聚维酮碘及生理盐水外敷,药物完全覆盖创面,用无菌纱布覆盖、包扎,胶布固定,每日换药 1 次至创面愈合。实验期间单笼、正常喂养。

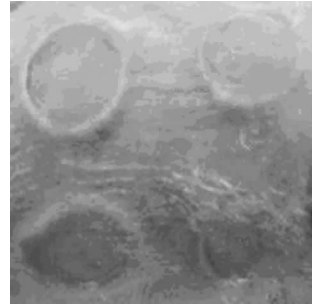
1.2.4 实验观察 (1)创面大体观察。每日换药时肉眼观察创面情况,包括:创面水肿渗出程度、是否干燥、有无分泌物及创周红肿变化等,如发现创面有异常分泌物,需进行分泌物细菌培养。(2)创面愈合时间。观察创面上皮完全愈合所需时间,由 2 位实验人员分别判定并记录。(3)创面愈合率。烫伤后第 7、14、21 天用数码相机对伤口进行照相,采用 Image Pro Plus(IPP) V6.0 图像分析软件计算创面愈合面积。按照公式计算创面愈合率^[7]:创面愈合率=(原始创面面积-当前创面面积)/原始创面面积×100%。(4)病理学及组织学观察。烫伤后第 7、14、21 天各处死 6 只大鼠,取创面组织行 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡切片,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光镜下观察创面组织炎症细胞浸润、新生血管形成以及肉芽组织与再上皮化变化的情况。(5)PCNA 检测。采用 SABC 试剂盒,染色步骤按试剂盒说明书进行,以磷酸盐缓冲溶液代替第一抗体作为阴性对照,二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色,细胞核呈棕色者为阳性。采用计数 PCNA 标记指数(labeling index, LI)方法^[8],在 400 倍光镜下观察染色结果,每组选取 6 个视野,每个视野均观察 100 个细胞,计算阳性细胞数,即为标记指数。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,创面愈合时间差异用单向方差分析;创面愈合率差异用重复测量方差分析;PCNA 标记指数数据用析因分析,采用最小显著差数法(the least significant difference, LSD)进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

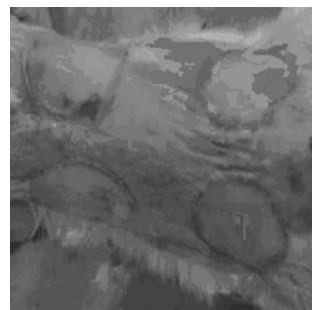
2.1 创面大体观察 烫伤后见创面呈灰白色,创面中心与周边色泽均匀、质地一致,与周围正常组织界限明显。换药后 1~4 d, rhEGF 组及生理盐水组创面肿胀、渗出最为明显,聚维酮

碘组次之,康肤霜组最轻。随着换药时间延长,创面逐渐好转至完全愈合,4 组创面均未出现明显脓性分泌物,细菌培养均为阴性,见图 1~3。



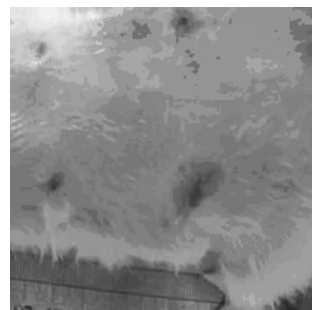
左上:康肤霜组;左下:rhEGF 组;右上:聚维酮碘组;右下:生理盐水组。

图 1 烫伤时各组创面大体观察



左上:康肤霜组;左下:rhEGF 组;右上:聚维酮碘组;右下:生理盐水组。

图 2 烫伤后第 3 天各组创面大体观察



左上:康肤霜组;左下:rhEGF 组;右上:聚维酮碘组;右下:生理盐水组。

图 3 烫伤后第 21 天各组创面大体观察

2.2 创面愈合时间 4 组大鼠创面愈合时间由长到短分别为:生理盐水组[(26.37 ± 1.0)d]、聚维酮碘组[(23.83 ± 0.75)d]、rhEGF 组[(22.33 ± 1.03)d]及康肤霜组[(20.67 ± 1.03)d]。4 组大鼠创面愈合时间两两比较,差异有统计学意义($F = 36.86, P < 0.05$)。

2.3 创面愈合率 烫伤后第 7、14、21 天创面愈合率统计结果显示:康肤霜组大鼠创面的愈合率高于其余 3 组,4 组大鼠创面愈合率两两比较,差异有统计学意义($F = 1239.09, P < 0.05$)。各组创面愈合率随时间推移明显升高($P < 0.05$),3 个时间点的大鼠创面愈合率两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 病理学及组织学观察 烫伤后第 7 天康肤霜组光镜下可见真皮乳头层充血、水肿不明显,炎症细胞浸润及坏死组织较

其他 3 组少。烫伤后第 14 天康肤霜组创面的毛细血管数、毛细血管内皮细胞数及成纤维细胞数较其他 3 组多,肉芽组织生长也更旺盛。烫伤后第 21 天康肤霜组创面上皮化较完全,新生上皮细胞分化较好,新生上皮组织较厚,有较多的表皮钉脚深入真皮层,而其他 3 组新生上皮组织较薄,未见有表皮钉脚形成。见图 4。

表 1 烫伤后不同时间各组创面愈合率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%, n=6$)

组别	烫伤后时间(d)		
	7	14	21
生理盐水组	10.83±1.12	43.76±0.70	75.43±0.89
聚维酮碘组	16.12±0.40	48.81±0.76	78.65±0.45
rhEGF 组	19.80±1.09	61.73±0.79	89.25±0.98
康肤霜组	20.83±0.78	64.63±1.54	96.37±1.34

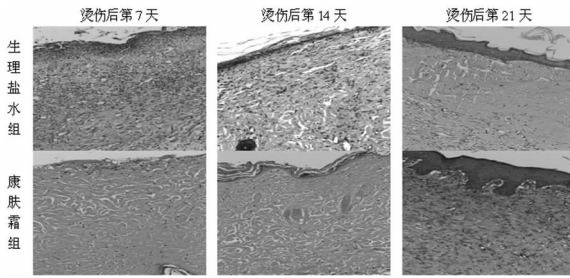


图 4 烫伤后第 7、14、21 天生理盐水组与康肤霜组创面组织的光镜观察 (HE ×100)

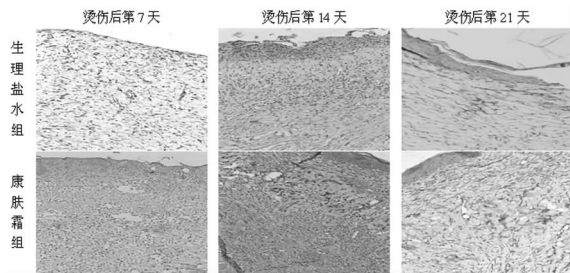


图 5 烫伤后第 7、14、21 天生理盐水组与康肤霜组创面组织的 PCNA 阳性表达 (SABC ×100)

表 2 烫伤后不同时间各组 PCNA 标记指数比较 ($\bar{x} \pm s, \%, n=6$)

组别	烫伤后时间(d)		
	7	14	21
生理盐水组	14.67±1.86	36.83±2.48	42.17±2.14
聚维酮碘组	17.33±1.37	40.83±1.17	46.50±1.87
rhEGF 组	28.50±1.05	73.33±2.16	63.33±2.34
康肤霜组	32.83±1.47	76.33±2.00	67.67±2.94

2.5 PCNA 在创面组织中的表达 烫伤后第 7、14 天 4 组大鼠创面组织的 PCNA 主要表达于腺体、毛囊上皮细胞及血管内皮细胞;烫伤后第 21 天 4 组大鼠创面组织的 PCNA 主要表达于新生上皮的基底细胞、基底层以上的部分表皮细胞、腺体和毛囊的上皮细胞及血管内皮细胞。4 组大鼠烫伤后第 14、21

天创面组织均可见少量成纤维细胞 PCNA 的阳性表达,见图 5。康肤霜组 PCNA 标记指数高于其他 3 组,4 组大鼠创面组织的 PCNA 标记指数两两比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。标记指数随时间推移明显升高 ($F = 2174.78, P < 0.05$);第 14、21 天与第 7 天比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),第 14 天与第 21 天比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

实验先采用尾静脉注射四氧嘧啶法建立糖尿病大鼠模型,烫伤后 4 周大鼠一直维持较高的血糖水平,不同的时间点血糖无明显波动。在此糖尿病大鼠模型上,采用自行研制的自动控时调压烫伤仪建立深 II 度烫伤创面大鼠模型,大体及病理结果证实该模型创面烫伤深度均匀、界限清楚,是一种较理想的糖尿病烫伤创面动物模型。

实验结果显示,与其他 3 组比较,康肤霜组糖尿病大鼠深 II 度烫伤创面的愈合速度最快,创面愈合时间最短,创面愈合率最高,表明康肤霜能促进烫伤创面愈合。病理组织学显示康肤霜能明显减轻烫伤创面早期的炎症反应。rhEGF 是促进上皮细胞生长的重要因子之一,动物实验及临床试验显示其具有加速糖尿病创面愈合的作用^[9-10]。本实验表明康肤霜促进创面愈合的作用优于 rhEGF。PCNA 是增殖细胞核内 DNA 聚合酶 δ (DNA polymerase $\delta, pol\delta$) 的一种辅助因子,与真核细胞 S 期的 DNA 的复制有关^[11],是反映细胞增殖状态的一个重要指标^[12-14]。皮肤组织中的 PCNA 主要定位于表皮基底细胞、毛囊上皮细胞、内皮细胞和部分成纤维细胞的细胞核内,在皮肤组织的发生与修复过程中表达增强。实验结果显示康肤霜组 PCNA 标记指数高于其他 3 组,说明康肤霜对创面组织细胞的增殖有明显的促进作用,能加快创面再上皮化,促进创面愈合。

糖尿病创面愈合困难主要与 2 个环节有关:(1)合成分泌胶原的组织细胞功能异常;(2)调控细胞外基质的生长因子及其他调控因子的功能异常。在创面愈合过程中,这些涉及不同环节的功能异常相互作用,构成了创面愈合困难的基础^[15]。康肤霜是由锌、冰片、洗必泰、水溶性基质、少量维生素 A 及维生素 E 按一定比例配制成的水包油型白色霜剂。维生素 A 可促胶原蛋白交联及组织内沉积;加速创面上皮化;增强巨噬细胞吞噬创面坏死组织,释放细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子及纤维连接蛋白的作用^[16]。锌不仅能够提高生长激素水平,使后者对胰岛素样生长因子-1 诱导作用增强,而且对表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体的表达有促进作用,从而加速表皮细胞增殖和胶原的沉积,促进创面愈合^[17]。维生素 E 可降低毛细血管通透性,与维生素 A 都有抗氧化作用^[18]。康肤霜外敷创面可使局部潮湿、缺氧。潮湿环境有利于间生态组织恢复活力。低氧环境可刺激毛细血管增生,改善局部血液循环;加速坏死组织的溶解;促进多种生长因子的释放;利于表皮细胞的迁移及间生态组织恢复活力^[19]。但潮湿环境也利于细菌繁殖,康肤霜成分中的洗必泰、冰片具有抗菌、消炎作用^[20-21],结合及时清创与换药,可避免创面感染,为加速创面修复提供良好的局部环境。本实验证实康肤霜具有明显加快糖尿病烫伤创面愈合的作用,这与康肤霜中多种配方成分的综合促愈合作用有关,对于其促进糖尿病创面愈合的机制尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds; the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(1): 59-69.
- [2] 童亚林, 缪洪城, 朱金红. 康肤霜促进兔深 II 度烫伤创面愈合的实验研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2003, 19 增刊: S26.
- [3] 缪洪城, 童亚林. 康肤霜修复小型猪深 II 度烫伤创面疗效观察[J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(7): 535-536.
- [4] 龚震宇, 童亚林, 万友华, 等. 康肤霜对大鼠放射性皮肤损伤创面愈合的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(28): 5224-5227.
- [5] 高畅, 楚勤英, 唐志雄, 等. 蜂胶对糖尿病大鼠创面愈合的影响[J]. *感染、炎症、修复*, 2008, 9(1): 25-27.
- [6] 童亚林, 杨润生, 万友华, 等. 调压调温全自动气烫仪的研制与应用[J]. *中华烧伤杂志*, 2010, 26(2): 162-163.
- [7] Tsang MW, Wong WK, Hung CS, et al. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(6): 1856-1861.
- [8] Elias JM. Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors[J]. *Biotech Histochem*, 1997, 72(2): 78-85.
- [9] 宗守凯, 梁自乾, 欧邦军. 局部应用重组人 EGF 对糖尿病大鼠烫伤创面 EGF 受体及其 mRNA 表达的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(2): 150-155.
- [10] Hong JP, Jung HD, Kim YW. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers[J]. *Ann Plast Surg*, 2006, 56(4): 394-398.
- [11] Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions [J]. *Oncogene*, 1997, 14(6): 629-640.
- [12] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 15): 3051-3060.
- [13] Essers J, Theil AF, Baldeyron C, et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21): 9350-9359.
- [14] Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(2): 145-151.
- [15] Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, et al. Treatment for diabetic foot ulcers [J]. *Lancet*, 2005, 366(9498): 1725-1735.
- [16] 邹京宁, 陈玉林, 葛绳德. 外用维生素 A 促进小鼠烧伤创面愈合[J]. *第二军医大学学报*, 1994, 15(2): 158-160.
- [17] 宋一丁, 薛晓东, 刘宏, 等. 锌对烫伤大鼠表皮生长因子及其受体表达的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(5): 439-442.
- [18] 冯安吉, 海春旭, 蒋宁, 等. 维生素 A 和维生素 E 对梭曼染毒大鼠自由基损伤的预防作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2002, 16(1): 53-55.
- [19] 付小兵, 王德文. 创面修复学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 245-248.
- [20] 黄华军, 余斌, 林庆荣, 等. 臭氧水对感染性创面抗炎修复的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(3): 515-518.
- [21] 孙晓萍, 欧立娟, 宓穗卿, 等. 冰片抗炎镇痛作用的实验研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(5): 353-355.
- (收稿日期: 2011-09-20 修回日期: 2011-10-22)
-
- (上接第 678 页)
- in nonsmall cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2008, 59(2): 240-245.
- [10] 马武开, 姚宇红, 黄礼明, 等. 白血病多药耐药与 NF- κ B 调控机制[J]. *广东医学*, 2009, 30(12): 1930-1931.
- [11] Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, et al. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB[J]. *Oncogene*, 2003, 22(25): 3842-3852.
- [12] Shetty S, Gladden JB, Henson ES, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5 (DR5) mediated by NFkappaB activation in epithelial derived cell lines[J]. *Apoptosis*, 2002, 7(5): 413-420.
- [13] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(2): 92-95.
- [14] Notarbartolo M, Cervello M, Poma P, et al. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells[J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(1): 133-136.
- [15] Takada Y, Murakami A, Aggarwal BB. Zerumbone abolishes NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion[J]. *Oncogene*, 2005, 24(46): 6957-6969.
- (收稿日期: 2011-10-14 修回日期: 2011-11-29)