

· 技术与方法 ·

负压封闭引流对兔皮肤创面炎症细胞趋化和炎症因子分泌的影响

杨帆, 胡嵩[△], 白祥军, 李仁杰, 张锐, 薛晨晨, 曹圆

(华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科, 湖北武汉 430030)

摘要:目的 观察负压封闭引流(VSD)对兔创面炎症细胞趋化和炎症因子分泌的影响。方法 建立兔皮肤创面模型, 将建模后的 12 只实验兔随机分为常规组($n=6$, 创面消毒后不作特殊处理, 仅每日常规换药、包扎)及 VSD 组($n=6$, 创面常规消毒, 贴膜后给予持续 -125 mmHg(-16.6 kPa)负压吸引)。分别于不同时间点在创缘处取材, 经苏木素-伊红染色后光学显微镜观察并行巨噬细胞、中性多形核白细胞(PMN)和淋巴细胞计数, 以酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测创面组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量。结果 建模前 VSD 组与常规组比较, 创面组织巨噬细胞、PMN 及淋巴细胞计数无显著性差异($P>0.05$)。建模后两组创面巨噬细胞和 PMN 计数均升高, 与常规组比较, VSD 组创面巨噬细胞计数显著增加($P<0.05$), 而其 PMN 及淋巴细胞计数则明显降低($P<0.01$)。建模后两组创面 TNF- α 、IL-6 含量均升高, 二者均于 24 h 时间点达到峰值后下降, VSD 组创面 TNF- α 及 IL-6 含量显著低于常规组($P<0.05$)。结论 VSD 可通过调节巨噬细胞、PMN、淋巴细胞趋化以及细胞 TNF- α 、IL-6 分泌而降低炎症反应并使其局限化。

关键词:炎症趋化因子类; 巨噬细胞; 中性白细胞; 淋巴细胞; 负压封闭引流

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)07-0686-03

Effects of vacuum sealing drainage on chemotaxis of inflammatory cells and secretion of inflammatory cytokines in skin wound of rabbits

Yang Fan, Hu Duan[△], Bai Xiangjun, Li Renjie, Zhang Kun, Xue Chenchen, Cao Yuan

(Department of Trauma Surgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To observe the effects of vacuum sealing drainage(VSD) on inflammatory cells chemotaxis and inflammatory cytokines secretion in wound tissue of rabbits. **Methods** 12 rabbit skin wound models were established and randomly divided into conventional group ($n=6$, disinfecting without special treatment, only routine dressing and bandage daily) and VSD group($n=6$, disinfecting routinely and continuous suction of -125 mmHg (-16.6 kPa) after membrane affixed to the wound]. Wound tissue were collected at different time points and subjected to observation under optical microscopy after hematoxylin-eosin staining. Counting of macrophages, polymorphonuclear neutrophils (PMN) and lymphocyte were performed. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was adopted to detect the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in wound tissue. **Results** Compared with VSD group and conventional group before modeling, there were no significant differences in macrophages, PMN and lymphocyte counting in wound tissue($P>0.05$). Amounts of macrophages and PMN in wound tissue in two groups were both increased after modeling. Compared to conventional group, the amount of macrophages in wound tissue in VSD group was markedly increased($P<0.05$), while those of PMN and lymphocytes were obviously decreased($P<0.01$). Contents of TNF- α and IL-6 in wound tissue in two groups were both increased after modeling and declined after achieving the peak value at the time point of 12 h. Contents of TNF- α and IL-6 in wound tissue in VSD group were notably lower than those of conventional group($P<0.05$). **Conclusion** VSD reduces and localizes the inflammatory response through regulation chemotaxis of macrophages, PMN and lymphocytes as well as secretion of cellular TNF- α and IL-6.

Key words: chemokines; macrophages; neutrophils; lymphocytes; vacuum sealing drainage

临床上, 挤压综合征、坏死性筋膜炎等急性创伤可造成失控性炎症反应, 从而继发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、脓毒症和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[1], 而负压封闭引流(vacuum sealing drainage, VSD)可有效清除创面坏死组织和渗液, 已广泛应用于各种急性创面的治疗, 临床效果显著^[2-4]。但 VSD 减轻组织细胞炎症反应的作用机制目前尚不明确。本实验通过建立兔创面模型, 研究 VSD 对创面局部组织巨噬细胞、中性多形核白细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)、淋巴细胞、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的影响,

探讨 VSD 减轻创面炎症反应的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器 VSD 一次性护创材料为武汉维斯第公司产品、安舒妥伤口愈合快示格胶贴为英国施乐辉公司产品。TNF- α 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、IL-6 检测 ELISA 试剂盒均购自北京博奥森公司。主要仪器包括: 便携式负压吸引仪(武汉维斯第公司)、Denley dragon wellscan MK3 酶标仪、微量电动组织匀浆器(美国 Kimble 公司)及 JT-12J 全自动生物组织脱水机(武汉俊杰公司)等。

1.2 实验动物 12 只普通级健康日本大耳白兔, 体质量

[△] 通讯作者, Tel:027-83663669; E-mail:hd613@sina.com.

2.5~3.5 kg,雌雄不限,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物质量合格证号:SCXK(鄂)-2008-0005-0007101。动物饲料由华中科技大学同济医学院附属同济医院动物实验中心提供。

1.3 动物建模与分组 用 8%硫化钠(天津恒兴公司)于兔背部脱毛,3 min 后温水洗净并涂润肤油保护皮肤,适应性喂养 1 周。建模前将规格为 15 cm×5 cm 的 VSD 辅料修剪为 4 块备用,每块大小为 5 cm×5 cm。实验兔称体质量后,采用 30 mg/kg 盐酸氯胺酮经兔耳缘静脉注射行兔全身麻醉,兔背部脱毛区予 0.05%活力碘(武汉扬子公司)消毒,用手术刀全层切开皮肤直至肌肉层,形成一个 2 cm×2 cm 的创面,压迫止血。将建模后的 12 只实验兔随机分为 2 组:(1)常规组($n=6$),创面消毒后不作特殊处理,仅每日常规换药、包扎;(2)VSD 组($n=6$),创面消毒后,乙醇脱碘,清除创缘污渍,采用胶贴贴膜后给予持续-125 mmHg(-16.6 kPa)负压吸引,若存在引流管道漏气或堵塞,则及时更换贴膜或 VSD 辅料。上述实验兔均在特制饲养单笼中按标准条件进行饲养,防止创面污染及贴膜破损漏气。

1.4 巨噬细胞、PMN 及淋巴细胞检测 建模后,VSD 组和常规组实验兔分别于 1、2、3、4、5、6、7 d 在创缘处切取大小为 3 mm×5 mm 的组织,用 4%多聚甲醛固定过夜,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。光学显微镜(日本 Olympus 公司)观察并于 600 倍下随机取 5 个视野,计算每个视野中巨噬细胞、PMN 及淋巴细胞数量,结果以 5 个视野的平均值表示。将建模时切取的正常组织作为正常对照。

1.5 TNF- α 和 IL-6 检测 建模后,VSD 组和常规组实验兔分别于 0.5、1.0、6.0、12.0 h 及 1、3、5、7 d 在创缘处切取大小为 2 mm×2 mm 的组织,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤组织,称质量,-80 °C 保存待测。采用二辛

可宁酸(bicinchoninic acid method, BCA)法进行蛋白定量,ELISA 法检测创面组织中 TNF- α 及 IL-6 含量。将建模时切取的正常组织作为正常对照。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VSD 组和常规组创面组织巨噬细胞、PMN 及淋巴细胞的计数 建模前 VSD 组和常规组比较,创面组织巨噬细胞、PMN 及淋巴细胞计数的差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。自 1 d 时间点起两组创面巨噬细胞及 PMN 计数均开始升高。VSD 组创面巨噬细胞计数显著高于常规组($P<0.05$),自 6 d 时间点起两组创面的巨噬细胞计数均开始下降,VSD 组的创面巨噬细胞计数仍高于常规组($P<0.01$)。VSD 组和常规组创面 PMN 计数分别在 3 d 和 4 d 时间点起开始下降,VSD 组创面 PMN 计数持续低于常规组($P<0.01$)。自 1 d 时间点起常规组创面淋巴细胞计数开始升高,自 2 d 起开始下降,而 VSD 组的创面淋巴细胞计数于 1 d 时间点时达峰值,然后持续下降且显著低于常规组($P<0.05$)。见图 1、表 1。

2.2 VSD 组和常规组创面组织 TNF- α 及 IL-6 含量的变化 建模前 VSD 组和常规组比较,创面组织 TNF- α 及 IL-6 含量的差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。自 0.5 h 时间点起两组创面 TNF- α 及 IL-6 含量均开始升高。自 1 h 时间点起 VSD 组创面 TNF- α 含量显著低于常规组($P<0.05$),该组创面 TNF- α 含量在 12 h 时间点时稍下降。两组创面 IL-6 含量在 12 h 时间点时稍有下降后上升,自 12 h 时间点起 VSD 组创面 IL-6 含量显著低于常规组($P<0.05$)。两组创面 TNF- α 、IL-6 含量均于 24 h 时间点达到峰值后开始下降。见表 2。

表 1 创面组织巨噬细胞、PMN 及淋巴细胞的计数 ($\bar{x}\pm s$, 个)

组别	n	细胞计数时间点							
		0 Δ	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
VSD 组									
巨噬细胞	6	1.60±0.28	1.63±0.59*	1.90±0.34*	2.93±0.88#	3.17±0.44#	3.60±1.08*	4.33±0.70#	3.63±0.36#
PMN	6	1.13±0.49	1.33±0.42*	2.03±0.51*	3.03±0.64*	2.93±0.42#	2.47±0.49#	2.53±1.25#	2.43±0.54#
淋巴细胞	6	9.67±0.86	24.63±3.33	17.03±2.03#	14.93±4.15#	9.77±1.56#	8.14±0.94#	7.37±2.25*	3.73±1.47#
常规组									
巨噬细胞	6	1.53±0.32	1.40±0.46	1.80±0.59	2.57±1.05	2.70±0.36	3.47±0.69	3.93±0.54	3.13±0.43
PMN	6	1.10±0.19	1.43±0.34	2.17±0.51	3.30±0.27	3.97±0.67	3.67±1.33	3.13±0.81	2.93±0.55
淋巴细胞	6	8.57±0.60	23.30±2.53	27.47±9.88	22.43±5.15	19.23±6.65	12.27±3.57	11.57±4.85	6.43±0.60

Δ : 为建模时; *: $P<0.05$, #: $P<0.01$,与常规组的相同细胞比较。

表 2 创面组织 TNF- α 及 IL-6 含量的变化 ($\bar{x}\pm s$, pg·L⁻¹)

组别	n	检测时间点								
		0 Δ	0.5 h	1 h	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
VSD 组										
TNF- α	6	18.74±4.94	51.72±19.52	140.78±63.77	202.22±93.05*	176.27±91.03*	198.56±86.09*	70.50±25.71#	70.06±37.63#	71.42±35.89#
IL-6	6	22.25±10.19	56.88±27.92	162.98±86.38*	242.11±136.48	200.45±89.37*	204.73±91.61*	74.28±39.94#	81.79±42.20#	78.60±47.39#
常规组										
TNF- α	6	18.78±4.46	49.78±8.70	126.56±25.37	231.11±34.29	244.95±64.06	250.18±48.15	243.21±60.84	228.60±42.18	155.01±31.46
IL-6	6	18.53±4.06	45.96±9.83	133.93±24.52	250.19±53.36	237.12±37.25	269.44±65.60	258.06±58.39	236.73±44.24	185.98±39.14

Δ : 为建模时; *: $P<0.05$, #: $P<0.01$,与常规组的相同检测指标比较。

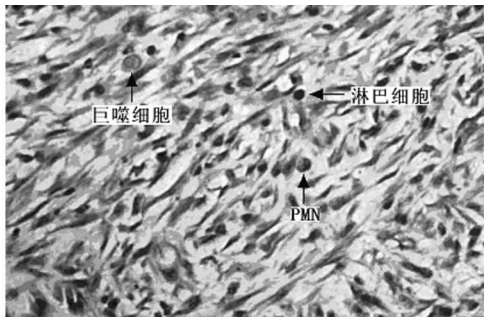


图1 创面组织巨噬细胞、PMN及淋巴细胞形态 (HE ×600)

3 讨论

炎症作为机体创伤后的基本防御性反应,通常包括早期的无菌性炎症和后期的感染性炎症。炎症细胞和炎症因子对炎症结局具有决定作用。合并感染时,这些因子能与细菌脂多糖协同,刺激更多炎症介质的表达,从而放大和加重炎症反应。临床实践表明 VSD 可显著下调创面组织的炎症反应,减少感染的发生,促进创面愈合。

本实验发现 VSD 组创面的巨噬细胞计数显著高于常规组,而 VSD 组创面 PMN、淋巴细胞计数以及 TNF- α 、IL-6 含量则持续低于常规组。其可能机制包括:(1)负压刺激机体巨噬细胞和 PMN 向创面趋化。巨噬细胞和 PMN 均属于吞噬细胞,在炎症早期受趋化因子作用,可透过血管壁移行至组织损伤处,其主要功能是吞噬和杀灭病原体。巨噬细胞吞噬病原体或坏死组织后形成吞噬体,可存活数十天,而 PMN 杀死吞噬的病原体后,自身死亡成为脓细胞。当存在物理负压刺激时,巨噬细胞和 PMN 加快向创面迁移和趋化,使治疗初期 VSD 组创面的巨噬细胞和 PMN 较常规组多。由于 PMN 参与局部炎症反应后其功能迅速降低,发生细胞凋亡或坏死,被巨噬细胞识别、吞噬,而巨噬细胞生存周期较长,使实验表现为 VSD 组创面的巨噬细胞计数显著高于常规组。同时,由于脓细胞增多,刺激巨噬细胞清除机体衰老及受损的炎症细胞,进一步上调巨噬细胞功能,使其分泌多种细胞因子参与创面修复,调节免疫应答。若创伤发生时巨噬细胞表面的防御性受体受到下调,而效应性受体上调,将导致失控性炎症反应的发生。(2)抑制细菌繁殖。创面贴膜使其与外界隔绝,可防止细菌侵入,减少病原微生物的定植和继发感染的发生,从而降低免疫细胞增生、迁移和活化。同时,VSD 形成的创面密闭、潮湿环境为巨噬细胞发挥吞噬功能提供有利条件,较传统干燥创面更利于免疫细胞的游走和渗入,联合持续引流可直接清除病原体^[5-7]。(3)下调炎症反应。VSD 可减少创面 TNF- α 及 IL-6 分泌,促进浸润的淋巴细胞消退。巨噬细胞和 PMN 是非特异性免疫应答反应中的主要效应细胞,其作用不仅限于吞噬与杀菌,而且能合成、分泌多种细胞因子参与炎症反应。PMN 坏死而被吞噬可避免胞内炎症物质释放,从而局限炎症范围,下调巨噬细胞和 PMN 的上、下游炎症反应。当炎症反应控制后,创面 TNF- α 、IL-6 含量和淋巴细胞计数下降。TNF- α 是促炎症反应的主要效应分子^[8],能通过激活核转录因子抑制 PMN 的凋亡,加重炎症反应^[9-10];IL-6 可由多种细胞合成和释放,通过刺激血小板活化因子而协同 TNF- α 放大炎症反应或抑制 PMN 的凋亡^[11-12]。当各种原因造成细胞凋亡延迟或障碍时,细胞存活时间延长,细胞数量和刺激性产物增多,一旦坏死,将导致持续、剧烈的炎症反应和组织损伤^[13-14]。

目前大部分研究认为,VSD 通过改善创面血流、消除水肿

及上调生长因子表达等途径促进创面的修复^[2-4,15]。本研究观察到物理负压可活化巨噬细胞,减少炎症介质 TNF- α 及 IL-6 的分泌,预防过度炎症反应的发生,对完善 VSD 理论具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 杨帆,白祥军,易成腊,等. 急诊负压封闭引流术治疗挤压综合征[J]. 中华创伤杂志,2009,25(2):103-106.
- [2] Ubbink DT, Westerbos SJ, Nelson EA, et al. A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds[J]. Br J Surg, 2008, 95(6):685-692.
- [3] Koehler C, Niederbichler AD, Jung FJ, et al. Wound therapy using the vacuum-assisted closure device: clinical experience with novel indications [J]. J Trauma, 2008, 65(3):722-731.
- [4] Witkowski W, Jawien A, Witkiewicz W, et al. Initial multicentre observations upon the effect of a new Topical Negative Pressure device upon patient and clinician experience and the treatment of wounds[J]. Int Wound J, 2009, 6(2):167-174.
- [5] Phillips PG, Birnby LM, Narendran A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells[J]. Am J Physiol, 1995, 268(5 Pt 1):L789-800.
- [6] Chen SZ, Li J, Li XY, et al. Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study [J]. Asian J Surg, 2005, 28(3):211-217.
- [7] 晏继军,张东江,阿秀梅,等. 利用真空促进伤口愈合的观察[J]. 中华外科杂志,2003,41(2):115.
- [8] Kato Y, Morikawa A, Sugiyama T, et al. Role of tumor necrosis factor- α and glucocorticoid on lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis of thymocytes [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995, 12(3/4):195-204.
- [9] Nolan B, Collette H, Baker S, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NF κ B dependent[J]. J Trauma, 2000, 48(4):599-604.
- [10] Choi M, Rolle S, Wellner M, et al. Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis[J]. Blood, 2003, 102(6):2259-2267.
- [11] Kobayashi E, Yamauchi H. Interleukin-6 and a delay of neutrophil apoptosis after major surgery[J]. Arch Surg, 1997, 132(2):209-210.
- [12] Biffl WL, Moore EE, Moore FA, et al. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor[J]. J Trauma, 1996, 40(4):575-578.
- [13] 柳垂亮,李玉娟,招伟贤. 中性粒细胞凋亡与炎症反应[J]. 广东医学,2002,23(11):1218-1220.
- [14] El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, et al. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin[J]. Immunol Lett, 2007, 111(1):36-44.
- [15] 刘飞,罗晴瑜,梁智. 封闭式负压引流技术的原理与创面修复[J]. 中华损伤与修复杂志,2008,3(4):487-492.