

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.027

rhGM-CSF 和纳米银联合外用对深 II° 烫伤创面炎症反应的影响*

杨景哲, 耿琪瑛[#], 冯欣姝[△], 陈凤平, 王芳

(承德医学院附属医院烧伤整形科, 河北承德 067000)

摘要:目的 研究外用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和纳米银敷料联合外用对深 II° 烫伤创面愈合过程炎症反应的影响。方法 用 Wistar 大鼠建立深 II° 烫伤模型,分为 A、B、C、D 4 组, A 组 30 例:凡士林纱布覆盖; B 组 30 例:纳米银敷料覆盖; C 组 30 例:rhGM-CSF 涂抹创面; D 组 30 例:rhGM-CSF 联合纳米银敷料覆盖, 伤后第 1、4、7、10、14、21 天, 观察创面炎症反应, 细菌培养并计数, 按照 ELISA 测定血清 IL-2、IL-8 水平。结果 炎症反应由重至轻依次为 A 组、B 组、C 组、D 组; A 组、B 组/C 组、D 组分别于伤后第 4、10、14 天出现细菌生长, D 组与 A、B、C 组比较, B、C 组与 A 组比较, 细菌生长数量少, 且第 10、14、21 天差异有统计学意义($P < 0.05$); 各组间 IL-2、IL-8 水平各时相点不同, D 组最低, A 组最高; IL-2 水平, 除伤后第 1 天各组间差异无统计学意义, 第 4 天, B 组与 C 组间差异无统计学($P > 0.05$)外, 其余各时相点各组间差异有统计学意义($P < 0.05$); IL-8 水平, 除第 1 天, A 组与 B 组、B 组与 C 组、D 组与 C 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)外, 在各时相点各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 rhGM-CSF 和纳米银联合外用, 减轻深 II° 烫伤创面炎症反应, 并且优于 rhGM-CSF、纳米银单独应用。

关键词: DNA; 重组; 巨噬细胞集落刺激因子; 银; 烧伤

中图分类号: R644

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)29-3926-03

Effect of recombinant human granulocyte/macrophage colonystimulating factor combined with nano-silver on deep burn degreen II about inflammation*

Yang Jingzhe, Geng Qiying[#], Feng Xinshu[△], Chen Fengping, Wang Fang

(Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of recombinant human granulocyte/macrophage colonystimulating factor (rhGM-CSF) combined with nano-silver as a treatment on deep burn degreen II about inflammation. **Methods** The burn model was built with Wistar rats. They were randomly divided into four groups, petrolatum treatment (group A, $n = 30$), nano-silver treatment (group B, $n = 30$), rhGM-CSF treatment (group C, $n = 30$), and rhGM-CSF combined with nano-silver treatment (group D, $n = 30$). observation the inflammatory reaction, and culture bacteria on wound of the four groups at 1st, 4th, 7th, 10th, 14th, 21th day after treatment were made. The level of IL-2 and IL-8 were measured in serums with ELISA. **Results** The inflammatory reaction: group A > group B > group C > group D; Bacteria were observed in group A, group B/C and group D at 4th, 10th, 14th day respectively after treatment. The number of bacterial grewed in group D was less than in group A, group B and group C. The numbers of bacterial grewed in group B and group C were less than in group A. And after 10, 14, 21 days treatment, there was significantly statistical difference ($P < 0.05$). There was difference among groups in the levele of IL-2 and IL-8, which were the lowest in group D and the highest in group A. The level of IL-2 has no significantly statistical difference between every group at 1st day and between B and C group at 4th day ($P > 0.05$). After other days treatment, there was significantly statistical difference ($P < 0.05$). There was significantly statistical difference in every group at each day of the IL-8 levele except A and B group, B and C group, C and D group at 1st day ($P < 0.05$). **Conclusion** rhGM-CSF combined with nano-silver treatment could alleviate inflammatory reaction, and be better than rhGM-CSF or nano-silver alone.

Key words: DNA; recombinance; macrophage colony-stimulating factor; silver; burn

烧(烫)伤是常见的机体损伤,而深 II° 创面的转归,在烧伤的整体治疗中起着至关重要的作用,因其愈合过程极易感染,致创面加深,成为 III° 创面,残余创面经久不愈。因此合理的创面外用药物,直接影响深 II° 烧伤创面的愈合周期及整体治疗的病程和转归。而重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和纳米银联合外用治疗深 II° 烧伤创面,可以改变创面局部微环境及全身免疫状态,达到控制感染、减轻创面炎症反应的作用,加速创面愈合,缩短治疗周期,降低治疗费用,对

烧伤整体治疗有积极意义,对抢救生命至关重要。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组 Wistar 大鼠 120 只, 200~220 g, 雌雄各半, 由天津山川红实验动物科技有限公司购买。水合氯醛 1 mL/kg 腹腔注射麻醉, 背部去毛后用 99 °C 纱布覆盖 10 s, 造成约 4 cm×4 cm 大小深 II° 烫伤创面(病理切片证实), 伤后创面分别用 A、B、C、D 4 种方法处理, 分 A、B、C、D 组每组 30 只。A 组: 凡士林纱布覆盖; B 组: 生理盐水湿润纳米银医用抗菌敷

* 基金项目: 承德市科学技术研究与发展计划资助项目(20122164); 河北省 2013 年医学科学研究重点课题计划指令性课题(20130024)。

作者简介: 杨景哲(1980—), 主治医师, 硕士, 主要从事烧伤创面愈合机制研究。 # 共同第一作者: 耿琪瑛(1954—), 教授, 本科, 主要从事难愈性创面治疗研究。 △ 通讯作者, E-mail: sanyue_1@sina.com。

料(购买自深圳市爱杰特医药科技有限公司)覆盖;C组:rh-GM-CSF(购买自长春金赛药业有限公司)涂抹创面;D组:rh-GM-CSF联合纳米银敷料覆盖,创面无菌敷料包扎,每天换药,分别于伤后第1、4、7、10、14、21天留取组织标本1cm×1cm大小及血标本1份约3mL,组织标本-80℃保存;血标本离心,取血清-80℃保存,至第21天,终止实验。

1.2 创面炎性反应及病理观察 创面换药时观察创面炎性反应情况,创面组织标本在HE染色情况下观察细胞浸润、血管通透性及炎症细胞趋化。

1.3 创面细菌培养、计数 创面分泌物用咽拭子涂抹整个创面,注射用水10mL浸泡,分别取其中的10μL在9cm血平板及麦康凯平皿上均匀划线,在37℃电热恒温培养箱(DNP-9272,上海精宏实验设备有限公司)孵育24h,菌落计数,运用细菌鉴定仪(VITEK2™-compact,法国梅里埃公司)根据革兰染色镜检及进行生化鉴定。

1.4 IL-2、IL-8检测 血清标本解冻,按照ELISA测定各标本血清中IL-2、IL-8水平,试剂盒购买自武汉华美生物工程有限公司,按照说明书操作。

1.5 统计学处理 采用SPSS16.0软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,F检验比较创面愈合率在各组间不同时间相点的差异及创面细菌数量在各组间不同时间相点的差异,Q检验比较各组两两比较的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 创面炎性反应及病理学表现 rhGM-CSF可在创面治疗过程中通过趋化及吞噬作用对抗创面炎性反应。A、B、C、D4组均在第10天出现明显的血管化和上皮化。A组创面伤后红

肿明显,并且在第14天出现痂下积脓,向皮下潜行,切片可见大量炎症细胞浸润、聚集、迁移,血管壁通透性增加,血管化和上皮化进程较慢;B、C组创面伤后红肿,在伤后第4天炎症反应最重,切片可见炎症细胞浸润、聚集、迁移,血管壁通透性增加,至第14天因为创面溶痂,炎症反应较前略有加重;D组创面伤后红肿,较A、B、C组明显减轻,至伤后第4天出现炎症反应,切片可见适量炎症细胞浸润、聚集、迁移,血管壁通透性增加。

2.2 创面细菌培养及计数 在伤后第1天创面细菌培养中,各组创面均无细菌生长,A组在第4天有细菌生长,B、C组在第10天有细菌生长,D组在第14天培养有细菌生长。第10天,B组、C组与A组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);第14、21天,D组与A组、B组、C组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),且B组、C组与A组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),但是,B组与C组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

2.3 血清IL-2、IL-8水平 IL-2、IL-8水平在伤后第1、4、7天是逐渐上升的,第10天下降可能与10天左右创面大部分成痂干燥有关,第14天再次升高,可能与大部分创面溶痂有关。IL-2水平在第1天各组间差异无统计学意义($P > 0.05$),第4天B组与C组差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各时间点各组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。IL-8水平,第1天,A组与B组、B组与C组、D组与C组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),C组、D组与A组、B组与D组差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各时间点各组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表1 深Ⅱ°烫伤大鼠细菌计数比较($\bar{x} \pm s, \times 10^4 / \text{cm}^2$)

组别	第4天	第7天	第10天	第14天	第21天
A组	3.22±1.04	4.57±1.15	8.13±1.25	16.36±3.22	14.52±3.10
B组	—	—	5.67±0.77 ^a	8.14±1.21 ^a	6.86±0.96 ^a
C组	—	—	4.38±1.44 ^a	6.80±0.85 ^a	4.94±0.40 ^a
D组	—	—	—	4.10±0.47 ^{abc}	2.46±0.76 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与A组比较;^b: $P < 0.05$,与B组相比较;^c: $P < 0.05$,与C组比较;—:此项无数据。

表2 深Ⅱ°烫伤大鼠血清IL-2水平($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	第1天	第4天	第7天	第10天	第14天	第21天
A组	471.01±26.90	721.11±33.47	762.60±18.49	679.57±16.92	709.88±9.07	628.76±9.64
B组	463.90±11.10	627.61±20.10 ^a	586.45±16.13 ^a	545.05±12.90 ^a	524.67±6.36 ^a	430.02±9.60 ^a
C组	474.63±11.66	615.43±27.41 ^a	520.32±11.04 ^{ab}	473.47±9.01 ^{ab}	460.89±13.20 ^{ab}	352.77±9.29 ^{ab}
D组	465.89±10.58	527.65±18.60 ^{abc}	485.57±14.63 ^{abc}	422.57±10.30 ^{abc}	387.23±8.50 ^{abc}	294.63±13.75 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与A组比较;^b: $P < 0.05$,与B组相比较;^c: $P < 0.05$,与C组比较。

表3 深Ⅱ°烫伤大鼠血清IL-8水平($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	第1天	第4天	第7天	第10天	第14天	第21天
A组	553.73±27.47	768.25±10.83	841.64±9.07	772.41±12.28	796.34±14.92	727.86±10.91
B组	537.87±32.26	717.54±12.65 ^a	670.12±12.56 ^a	601.07±8.76 ^a	591.41±7.91 ^a	496.88±11.29 ^a
C组	518.62±14.84 ^a	699.36±10.98 ^{ab}	623.58±10.65 ^{ab}	553.22±7.38 ^{ab}	523.98±12.44 ^{ab}	429.02±10.29 ^{ab}
D组	489.51±10.42 ^{ab}	638.12±13.56 ^{abc}	596.90±9.63 ^{abc}	496.90±11.45 ^{abc}	459.01±8.62 ^{abc}	356.52±7.72 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与A组比较;^b: $P < 0.05$,与B组相比较;^c: $P < 0.05$,与C组比较。

3 讨 论

烧伤后创面感染目前仍是烧伤治疗面临的首要问题,浅Ⅱ°创面早期通过换药可达到治愈的目的,Ⅲ°创面可尽早选择手术治疗,而深Ⅱ°创面愈合过程中因溶痂期出现感染易导致创面加深,残余创面不愈。随着诊疗技术的进步,困扰烧伤治疗的休克期复苏,因量化公式、容量监测仪器的应用,使休克期的渡过趋于平稳、可控,而烧伤创面外用敷料种类繁多,但是如何合理有效利用以控制创面感染,至今在烧伤治疗方面仍是一个盲区。rhGM-CSF 和纳米银联合外用通过调节机体免疫系统,激活细胞因子,感染可控的前提下促进创面愈合。

rhGM-CSF 作为基因工程产物,通过调节机体免疫系统,启动炎性细胞因子,增强机体的免疫力,改善创面局部炎症趋化反应^[1]。rhGM-CSF 局部外用可吸引炎症细胞及修复细胞至创面,活化中性粒细胞、单核/巨噬细胞,增强其吞噬和分泌功能,提高创面自身的抗感染能力,从而在适度炎症反应下介导创面愈合^[2-3]。rhGM-CSF 不仅可以促进深Ⅱ°烧伤创面的愈合^[4],缩短治疗周期,而且在烧伤残余创面治疗方面有独特的优势^[5]。纳米银敷料是采用纳米技术,将单质银制成粒径约为 25 nm 的银微粒,银与菌体蛋白中的巯基(-SH)结合,引起其变性,使巯基酶失活发挥其广谱抗菌作用,同时创面存在大量基质金属蛋白酶,可使多种生长因子降解,不利于创面的愈合,而纳米银具有抑制基质金属蛋白酶的作用,大大促进了创面的愈合^[6]。

纳米银具有缓释作用和持续杀菌、减轻创面感染、促进创面愈合的特点,但其缺点是吸水性差,对创面的黏附性强给换药工作带来一定的困难^[7],对促进皮肤再生方面的作用有所欠缺。而 rhGM-CSF 以羧甲基纤维素钠、甘油及保护剂为辅料,易于清除,能减少换药时的疼痛^[8],且 rhGM-CSF 可保持创面湿润,有利于上皮细胞再生。rhGM-CSF 和纳米银敷料相结合,不仅能在控制烧伤后创面炎症反应方面相得益彰,而且有效利用了凝胶保湿和纳米银敷料的敷料架构作用。

IL-2 是目前研究最为活跃的促炎细胞因子,它由炎症细胞激活所释放,IL-2 与其受体结合诱导一系列的信号级联反应,引起强烈的炎症反应,甚至能引起暴发性炎症反应^[9]。IL-8 是细胞趋化因子家族中的主要组成成分,是许多炎症疾病的重要介质,与炎症过程中中性粒细胞和淋巴细胞的聚集和活化有关,参与炎症反应和免疫调节^[10]。IL-8 是体内最主要的内源性趋化因子,通过趋化、激活中性粒细胞而实现,提高中性粒细胞在炎症部位的结合能力,从而增强白细胞黏附与移行^[11]。随着烧伤创面治疗时间的推移,创面逐渐溶痂,炎症反应逐渐加重,但是 D 组创面炎症反应明显小于 A、B、C 组,尤其是伤后第 14 天,创面细菌数量和 IL-2、IL-8 均达到峰值,而且 D 组创面有较少细菌生长,IL-2、IL-8 水平明显低于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$),证明 rhGM-CSF 和纳米银敷料相结合,既能减轻创面炎症反应,又能使机体在适度炎症反应下启

动免疫调节、促进创面愈合;另外,较纳米银敷料(B组)、rhGM-CSF(C组)单独应用,亦具有优势,二者联合应用在控制创面炎症反应方面起到了叠加效应,对临床工作有一定指导意义。

烧伤创面外用敷料的研究逐渐趋向复合生物材料,并且在临床上效果已经得到了广泛认可和支持,但是对于生物材料应用的有效、合理性研究有待深入,不同生物材料促进创面愈合的机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 裴瑾,赵大欣,姜晶,等.外用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子凝胶对烧烫伤动物的疗效[J].中国生物制品学杂志,2008,21(5):414.
- [2] Fang Y, Gong SJ, Xu YH, et al. Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice[J]. Br J Dermatol, 2007, 157(3):458-465.
- [3] 王志勇,张勤,廖镇江,等.重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子对深Ⅱ度烧伤创面的治疗作用[J].中华烧伤杂志,2008,24(2):107-109.
- [4] Zhang L, Chen J, Han C. A multicenter clinical trial of recombinant human GM-CSF hydrogel for the treatment of deep second-degree burns [J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(5):688-689.
- [5] Yan H, Chen J, Peng X. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hydrogel promotes healing of deep partial thickness burn wounds[J]. Burns, 2012, 38(6):877-881.
- [6] 刘焕亮,王慧杰,裘著革.纳米银的抗菌原理及生物安全性研究进展[J].环境与健康杂志,2009,26(8):736-739.
- [7] 陈炯,韩春茂,林小玮,等.纳米银敷料在修复Ⅱ度烧伤创面的应用研究[J].中华外科杂志[J],2006,44(1):50-52.
- [8] Meier K, Nanney LB. Emerging new drugs for wound repair[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2006, 11(1):23-37.
- [9] 李江,李丽莎.吸入性麻醉药对促炎性细胞因子表达的影响[J].重庆医学,2013,42(7):778-780.
- [10] Yoshikawa T, Dent G, Ward J, et al. Impaired neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respiratory Critical Care Med, 2007, 175(5):473-479.
- [11] 李俊兰. COPD 患者不同时期血清 IL-8 变化及其临床意义[J].重庆医学,2008,37(20):2329-2330.

(收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-07-15)