

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.24.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210430.1748.002.html\(2021-05-06\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210430.1748.002.html(2021-05-06))

## 促红细胞生成素对大鼠剖宫产后创面愈合的促进作用\*

玄振华<sup>1</sup>,王洪萍<sup>2</sup>,朱坤<sup>3</sup>,贺丽霞<sup>1</sup>,赵芳<sup>1△</sup>

(1.山东省济南市第二妇幼保健院妇产科 271100;2.山东省济南市人民医院妇产科 271100;

3.莱芜职业技术学院康复教研室,济南 271100)

**[摘要]** **目的** 研究促红细胞生成素(EPO)对大鼠剖宫产后创面愈合的促进作用及具体机制。**方法** 将 14 d 成年雌性 Sprague-Dawley 孕鼠分为对照组(9 只),EPO 10 U/kg 组(9 只),EPO 100 U/kg 组(9 只),EPO 1 000 U/kg 组(9 只)。苏木素-伊红(HE)和 PAS 染色研究大鼠剖宫产后伤口愈合及组织形态变化;压力传感器和放大记录器检测 EPO 处理后伤口拉伸强度和子宫破裂压的变化;RT-qPCR 检测伤口组织中转化生长因子-β1(TGF-β1)、成纤维生长因子(bFGF)、血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)mRNA 相对表达水平。**结果** 与对照组比较,EPO 100 U/kg 组和 EPO 1 000 U/kg 组大鼠剖宫产后皮肤伤口拉伸强度和子宫破裂压显著增加( $P<0.01$ )。HE 和 PAS 染色结果显示,与对照组比较,EPO 100 U/kg 组和 EPO 1 000 U/kg 组子宫内膜腺体数量和子宫血管密度显著增加( $P<0.05$ ),伤口组织中羟脯氨酸的水平显著升高( $P<0.05$ )。与对照组比较,EPO 100 U/kg 组和 EPO 1 000 U/kg 组伤口组织中 TGF-β1、bFGF 和 CD31 mRNA 表达明显升高( $P<0.01$ )。**结论** EPO 可通过增加 TGF-β1 和 bFGF 表达,减轻炎症反应并促进剖宫产后伤口愈合。

**[关键词]** 促红细胞生成素;剖宫产;转化生长因子-β1;成纤维生长因子;血小板-内皮细胞黏附分子**[中图分类号]** R363.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)24-4162-05

## Effect of erythropoietin on wound healing after cesarean section in rats\*

XUAN Zhenhua<sup>1</sup>,WANG Hongping<sup>2</sup>,ZHU Kun<sup>3</sup>,HE Lixia<sup>1</sup>,ZHAO Fang<sup>1△</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Maternity and Child Health Hospital of Jinan, Jinan, Shandong 271100, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital of Jinan, Jinan, Shandong 271100, China; 3. Rehabilitation Teaching and Research Section of Laiwu Vocational and Technical College, Jinan, Shandong 271100, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of erythropoietin (EPO) on wound healing after cesarean section in rats and its specific mechanism. **Methods** The adult female Sprague-Dawley pregnant rats at 14 days were randomly divided into the control group (Vehicle, 9 rats), the EPO 10 U/kg group (9 rats), the EPO 100 U/kg group (9 rats), and the EPO 1 000 U/kg group (9 rats). The HE and PAS staining were used to observe the wound healing and tissue morphology changes after cesarean section in rats; the pressure sensor and magnifying recorder were used to detect the changes in wound tensile strength and uterine rupture pressure after EPO treatment; the RT-qPCR was used to detect the hydroxyproline in the wound tissue and the mRNA expression levels of transforming growth factor-β1 (TGF-β1), fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31). **Results** Compared with the control group, the skin wound tensile strength and uterine rupture pressure in the EPO 100 U/kg group and the EPO 1 000 U/kg group increased significantly after the cesarean section in a dose-dependent manner ( $P<0.01$ ). The HE and PAS staining results showed that compared with the control group, the number of endometrial glands and uterine vessel density in the EPO 100 U/kg group and the EPO 1 000 U/kg group increased significantly. Compared with the control group, the TGF-β1, bFGF and CD 31 mRNA expression in the wound tissue of the EPO 100 U/kg group (9 rats) and the EPO 1 000 U/kg group significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** EPO can promote wound healing after cesarean section by increasing the expression of the TGF-β1 and bFGF, and reducing the inflammatory reaction.

**[Key words]** erythropoietin; cesarean section; transforming growth factor-β1; basic fibroblast growth factor; CD31

\* 基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2017SW228)。 作者简介:玄振华(1971—),副主任医师,本科,主要从事妇产科临床研究。 △ 通信作者,E-mail:lwzuanzhenhua@163.com。

剖宫产是目前全球最常见的腹部手术之一。在过去很长一段时间里,剖宫产率一直在上升<sup>[1]</sup>。然而,作为一种分娩替代方法,剖宫产是一种对产妇和新生儿健康都具有风险的侵入性医疗行为<sup>[2]</sup>。许多剖宫产妇女术后伤口出现并发症,包括血肿、伤口感染、伤口分离和伤口裂开<sup>[3]</sup>。此外,剖宫产术后子宫切口的不完全愈合也可导致许多临床并发症,如子宫破裂、继发妊娠、异位妊娠、异常子宫出血<sup>[4]</sup>。现在临床已经有包括皮下引流术和子宫修补术等手段来改善剖宫产后伤口愈合<sup>[5]</sup>,然而效果并不理想。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种造血因子,主要参与红细胞的增殖和分化,增加血液循环中红细胞数量<sup>[6]</sup>。现有研究认为 EPO 可促进血管生成,有利于创面及术后伤口愈合<sup>[7]</sup>。本实验主要研究了 EPO 对大鼠剖宫产后伤口愈合及组织形态变化的影响,检测了 EPO 处理后伤口拉伸强度和子宫破裂压力的变化,同时研究了伤口组织中羟脯氨酸及转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, 又名 CD31)的表达水平,旨在探讨 EPO 对大鼠剖宫产后创面愈合的促进作用,以期为临床治疗和用药提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

妊娠 14 d 成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。大鼠均饲养在无特定病原体(SPF)级动物房内,室温( $23 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,昼夜循环 12 h。

### 1.2 仪器与试剂

重组大鼠 EPO 购自美国 R&D Systems 公司(货号 1306-RE-010);PrimeScript<sup>TM</sup> 反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司(货号 RR037A);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司(货号 C0105);PAS 染色试剂盒购自青岛捷世康生物科技有限公司(货号 GMS80131.3);酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自南京建成科技有限公司。压力传感器和放大记录器购自美国 WPI 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 实验动物分组与剖宫产手术

将实验大鼠分为对照组(9 只)、EPO 10 U/kg 组(9 只)、EPO 100 U/kg 组(9 只)、EPO 1 000 U/kg 组(9 只)。大鼠在饲养环境下适应 5 d 后进行相应实验,所有实验动物可自由进食、饮水。大鼠妊娠第 19 天通过腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉。剖宫产手术流程如下<sup>[7]</sup>:在大鼠下腹部切开 3.0 cm,在子

宫角中部沿肠系膜边界纵行切口 2.0 cm。通过子宫切开术轻轻挤压大鼠幼崽和胎盘并取出,随后对子宫和皮肤切口进行缝合。术后每 2 天腹腔注射相应浓度 EPO 处理 1 次,在第 28 天通过过量二氧化碳麻醉并断颈处死大鼠。

#### 1.3.2 皮肤伤口拉伸强度和子宫破裂压测定

伤口拉伸强度和子宫破裂压通过压力传感器测量和放大记录器记录。 $5 \text{ mm}^2 \times 10 \text{ mm}^2$  皮肤组织在伤口边缘缓慢向反方向拉,破断强度/横截面积可得拉伸强度。将子宫角缝合至子宫瘢痕远端 1.0 cm 处,以防止输卵管灌注液漏出。将导管从距离瘢痕 1 cm 处插入子宫内,缝线固定。导管的近端连接一个 5 mL 注射器,并通过三通阀连接压力传感器,压力传感器与放大记录器相连。随后向子宫内缓慢注入生理盐水直至子宫破裂或渗漏,所获得的最高压力为子宫破裂压。

#### 1.3.3 羟脯氨酸检测

根据 ELISA 试剂盒说明书,对 4 组大鼠伤口组织上清液进行羟脯氨酸测定,试验重复 3 次。

#### 1.3.4 组织学分析

将大鼠用过量乙醚麻醉后取伤口组织和子宫组织(右子宫角)。子宫组织快速固定于 4% 多聚甲醛缓冲液中,24 h 后进行石蜡包埋处理。用切片机制作  $4 \mu\text{m}$  厚度组织切片,HE 或 PAS 染色观察子宫组织形态学变化。

#### 1.3.5 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

通过 TRIzol 试剂盒从伤口组织中提取总 RNA。RNA 通过 PrimeScript<sup>TM</sup> 反转录试剂盒反转录成 cDNA,随后将 cDNA 作为 RT-qPCR 的模板,在 iQ<sup>TM</sup>-SYBRE Green Supermix(Bio-Rad)体系中进行实时 PCR。引物序列设计如下,TGF- $\beta$ 1:上游引物 5'-CCA AGC TTA TGC CGC CCT CCG GGC-3';下游引物 5'-GCG TCG ACC AGC TGC ACT TGC AGG AG-3';bFGF:上游引物 5'-TGC CAG TGG TTA CGA TT-3';下游引物 5'-TAG GAA TAC TGC CAT CAC-3';CD31:上游引物 5'-CCG CTC GTG AAA TGT TTA GG-3';下游引物 5'-CAG AGC AGG GTC CGA GGT A-3'; $\beta$ -actin:上游引物 5'-GGA AAT CGT GCG TGA CAT TA-3';下游引物 5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3'。PCR 条件:94  $^{\circ}\text{C}$  10 min 预变性;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s 变性,60  $^{\circ}\text{C}$  20 s 退火,72  $^{\circ}\text{C}$  34 s 延伸,共 40 次循环。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各基因 mRNA 相对表达水平。

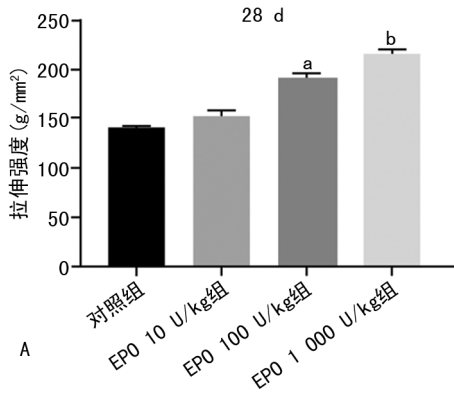
#### 1.4 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析(ANO-

VA), 然后采用 Tukey 事后检验进行多重比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

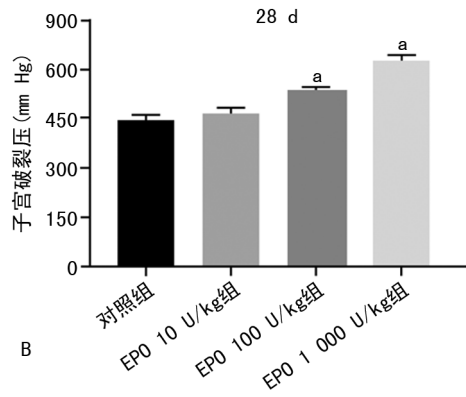
## 2 结果

### 2.1 EPO 对大鼠皮肤伤口拉伸强度和子宫破裂压的影响



影响

术后第 28 天, EPO 100 U/kg 组、EPO 1 000 U/kg 组较对照组皮肤伤口拉伸强度、子宫破裂压显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 1。



A: 伤口拉伸强度; B: 子宫破裂压; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

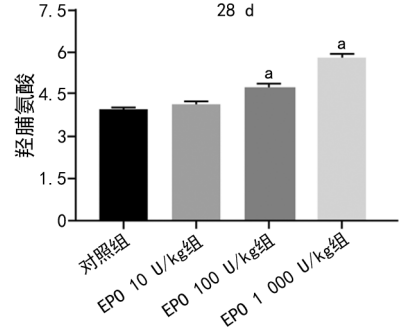
图 1 EPO 对大鼠皮肤伤口拉伸强度和子宫破裂压的影响

### 2.2 EPO 对剖宫产后大鼠伤口组织中羟脯氨酸水平的影响

术后第 28 天, EPO 100 U/kg 组、EPO 1 000 U/kg 组大鼠伤口组织中羟脯氨酸水平较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。

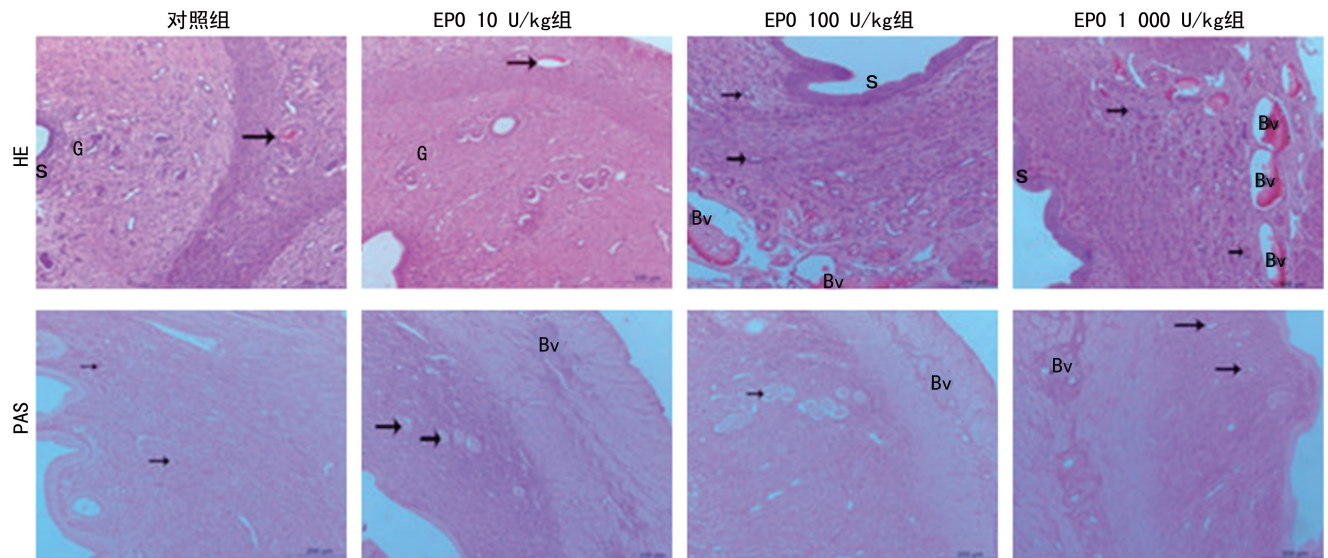
### 2.3 EPO 对大鼠剖宫产后子宫组织形态的影响

HE 染色结果显示, 与对照组大鼠子宫内膜组织比较, EPO 100 U/kg 组、EPO 1 000 U/kg 组大鼠子宫内膜上皮高度、子宫内膜腺体数量及活性(箭头所示)、子宫血管密度显著增加。PAS 染色结果显示, EPO 100 U/kg 组、EPO 1 000 U/kg 组大鼠子宫内膜腺体活性(箭头所示)及子宫血管密度增加, 见图 3。



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 2 EPO 对剖宫产后大鼠伤口组织中羟脯氨酸水平的影响



S: 子宫内膜上皮高度; G: 子宫内膜腺体数量; Bv: 子宫血管密度。

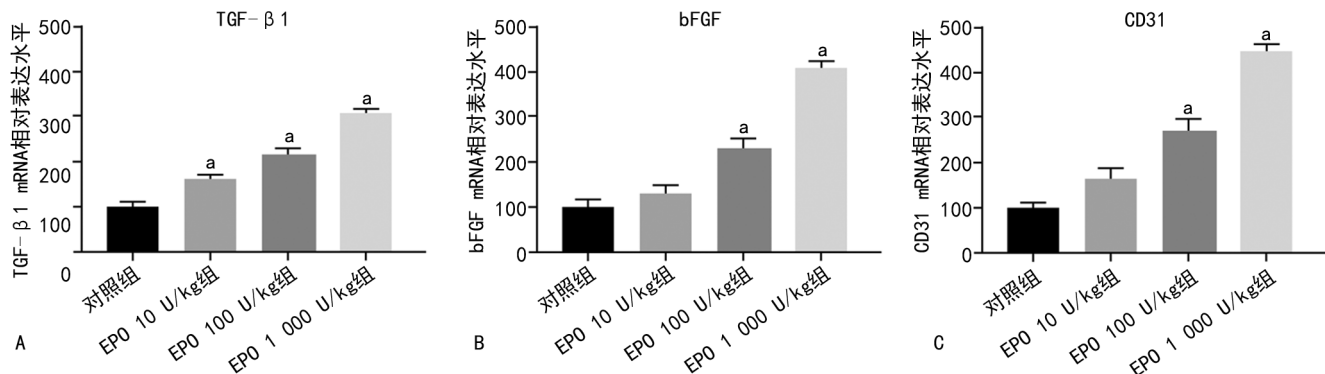
图 3 EPO 对大鼠剖宫产后子宫组织形态的影响(200×)



## 2.4 EPO 对大鼠剖宫产后伤口组织中 TGF-β1、bFGF、CD31 表达的影响

与对照组比较,10 U/kg 组、100 U/kg 组、EPO 1 000 U/kg 组大鼠伤口组织中 TGF-β1 mRNA 相对

表达水平显著增加 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ),而 EPO 100 U/kg 组、EPO 1 000 U/kg 组伤口组织中 bFGF、CD31 mRNA 的相对表达水平也显著增加 ( $P < 0.01$ ),差异均有统计学意义,见图 4。



A: TGF-β1; B: bFGF; C: CD31; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 4 PCR 检测 EPO 对大鼠剖宫产后伤口组织中 TGF-β1、bFGF、CD31 表达的影响

## 3 讨 论

研究<sup>[8]</sup>表明,通过剖宫产手术分娩的女性再次受孕期间子宫破裂风险将会上升。虽然剖宫产后子宫瘢痕破裂的风险相对较低,但皮肤伤口并发症及子宫切口不完全愈合并发症仍然影响孕妇和婴儿的健康<sup>[9]</sup>。本实验通过检测 EPO 处理后剖宫产大鼠皮肤伤口拉伸强度和子宫破裂压,发现 EPO 可显著增加大鼠剖宫产后皮肤伤口拉伸强度和子宫破裂压。为了查明 EPO 促进愈合的机制,本研究检测了 EPO 对剖宫后大鼠伤口组织中羟脯氨酸水平的影响,结果发现,100 U/kg 和 1 000 U/kg 的 EPO 可显著升高子宫内腺体数量和子宫血管密度,显著增加伤口组织中羟脯氨酸的水平;同时,伤口愈合过程需要新的胶原蛋白合成,体内大约 99.8% 的羟脯氨酸储存在胶原中,因此羟脯氨酸的测定可以作为胶原总量的标志物<sup>[10]</sup>。以上证据证明了 EPO 对剖宫产术后伤口愈合具有促进作用。

EPO 是促进哺乳动物红细胞增殖和分化的主要细胞因子,现有研究表明,EPO 可促进创伤愈合并减少炎症反应,保护组织,促进血管再生及伤口的重构<sup>[11-12]</sup>。吕大伦等<sup>[13]</sup>研究发现,EPO 治疗 14 d 后,大鼠急性创面可全部愈合,而 EPO 在剖宫产后的伤口愈合中的研究却未见报道。在皮肤和子宫组织中,拉伸强度是评价伤口愈合最常用的参数。较高的拉伸强度反映了较快的愈合过程,而瘢痕组织的拉伸强度明显弱于正常组织。子宫创伤的愈合不良可以增加子宫破裂的风险,而愈合良好的子宫可以降低破裂的风险。血管生成是伤口愈合过程中必不可少的环节,现有研究也显示 EPO 具有促进血管生成的作

用<sup>[14]</sup>。本研究 HE 和 PAS 染色结果显示,EPO 可显著增加子宫内腺体数量和子宫血管密度。

伤口愈合是一个复杂的信号传导过程,曾娟妮等<sup>[15]</sup>研究报道 TGF-β1/Smad3 信号转导通路参与皮肤创面愈合过程,抑制该通路可促使创面愈合速度加快。血小板和白细胞释放的 TGF-β1 是一种多功能细胞因子,在细胞迁移、增殖、分化、凋亡和细胞外基质中起着重要作用<sup>[16]</sup>。而本研究发现伤口组织中 TGF-β1 mRNA 相对表达水平升高。TGF-β1 在 EPO 促进伤口愈合中的作用还需要进一步研究。bFGF 是成纤维细胞和血管内皮细胞的调节因子,在组织再生和修复中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。本研究结果显示 EPO 可显著升高伤口组织中 bFGF mRNA 相对表达水平。CD31 是细胞黏附分子 Ig 超家族成员,可在血管和造血细胞中表达,CD31 在炎症中起着至关重要的作用,现有研究认为 CD31 是慢性炎症反应的负调节因子<sup>[18-20]</sup>。本研究结果显示 EPO 可能通过上调 CD31 的表达来减轻炎症反应。本研究仍有诸多不足之处,对于子宫内膜厚度和子宫内膜腺体数量的测算基于 HE 染色观察,精密的计算仍有待进一步研究。

综上所述,本研究结果显示 EPO 可通过增加 TGF-β1 和 bFGF 表达,减轻炎症反应,促进剖宫产后伤口愈合,为临床剖宫产术后并发症提供了新的治疗途径。

## 参考文献

[1] 刘喆,杨慧霞,辛虹,等. 全国多中心子宫破裂现状调查及结局分析[J]. 中华妇产科杂志,2019,

- 54(6):363-368.
- [2] HARRISON M S, BETRÁN AP, VOGEL J P, et al. Mode of delivery among nulliparous women with single, cephalic, term pregnancies: The WHO global survey on maternal and perinatal health, 2004-2008[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2019, 147(2):165-172.
- [3] 焦丽敏. 子宫疤痕妊娠 28 例临床诊治分析[J]. *中国校医*, 2017, 31(2):128-129.
- [4] FOESSLEITNER P, JUST U, KISS H, et al. Challenge of diagnosing pyoderma gangrenosum after caesarean section[J]. *BMJ Case Rep*, 2019, 12(7):230315-230328.
- [5] 李健, 白文佩. 剖宫产切口愈合不良的治疗方法[J]. *国际妇产科学杂志*, 2017, 44(5):543-546.
- [6] 龚文娟, 吴方建, 张倩睿. 重组人促红细胞生成素临床应用的调查分析[J]. *医药导报*, 2017, 36(5):564-568.
- [7] SCHOBER M E, REQUENA D F, RODESCH C K. EPO improved neurologic outcome in rat pups late after traumatic brain injury[J]. *Brain Dev*, 2018, 40(5):367-375.
- [8] 高海莹, 吕艳. 68 例剖宫产术后阴道分娩产妇的监测与护理[J]. *天津护理*, 2017, 25(3):247-248.
- [9] 石一复. 剖宫产子宫切口愈合不良的并发症[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2016, 8(3):1-2, 5.
- [10] PEREZ G R, VARGAS S R, ORTIZ H Y. Wound healing properties of *Hylocereus undatus* on diabetic rats[J]. *Phytother Res*, 2005, 19(8):665-668.
- [11] 中华医学会烧伤外科学分会, 《中华烧伤杂志》编辑委员会. 皮肤创面外用生长因子的临床指南[J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(12):721-727.
- [12] CHOI Y B, DUNN-MEYNELL A A, MARCH ESE M, et al. Erythropoietin-derived peptide treatment reduced neurological deficit and neuropathological changes in a mouse model of tauopathy[J]. *Alzheimer Res Ther*, 2021, 13(1):766-784.
- [13] 吕大伦, 徐姝娟, 陈雷, 等. 人促红细胞生成素对大鼠急性创面转化生长因子  $\beta 1$ /Smad3 信号转导通路的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2018, 34(10):719-726.
- [14] 罗琼, 尹军, 李兵, 等. 乳腺癌外周血管内皮生长因子与血红蛋白及红细胞生成素的相关性研究[J]. *世界临床医学*, 2017, 11(2):4-5.
- [15] 曾娟妮, 刘筱, 耿越飞, 等. 美洲大蠊提取液对大鼠难愈合创面 TGF- $\beta 1$ /Smads 通路调控机制的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(3):521-528.
- [16] HINCK A P. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(14):1860-1870.
- [17] 杨杰. bFGF 联合 VSD 技术在术后难愈合伤口患者中的应用[J]. *实用中西医结合临床*, 2019, 19(2):19-21.
- [18] 张泽渊, 张自琴. 活血化瘀类中药对深静脉血栓形成后综合征相关指标影响的动态观察[J]. *安徽医药*, 2017, 21(1):119-122.
- [19] DAGENAIS M, DUPAUL-CHICOINE J, DOUGLAS T, et al. The interleukin (IL)-1R1 pathway is a critical negative regulator of PyMT-mediated mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(3):1287247-1287256.
- [20] CORALLO C, CUTOLO M, SOLDANO S, et al. OP0082 Fibrosis and microangiopathy are the main histopathological hallmarks of scleroderma-related myopathy[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(Suppl 2):86.