

# 生肌化瘀方及其拆方对大鼠创面修复早期肉芽组织中 I、III 型胶原的影响

李 斌, 王振宜, 肖秀丽, 李福伦, 范 斌

(上海中医药大学岳阳中西医结合医院中医外科, 上海 200437)

**[摘要]** 目的:探讨生肌化瘀方及其拆方对创面修复早期 I、III 型胶原的影响。方法:将 24 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:生肌化瘀方组、生肌方组、化瘀方组和模型组。以大鼠皮肤全层缺损创面为模型,采用免疫组化和图像分析相结合的方法,观察各组大鼠创面修复早期肉芽组织中 I、III 型胶原的变化。结果:在创面修复的第 3 天,生肌方组和生肌化瘀方组的 I 型胶原水平均高于模型组,化瘀方组则低于模型组 ( $P < 0.05$ );生肌方组、化瘀方组和生肌化瘀方组的 III 型胶原水平均低于模型组 ( $P < 0.05$ ),以化瘀方组更为明显;在创面修复的第 7 天,生肌方组、生肌化瘀方组的 I 型胶原水平均低于模型组 ( $P < 0.05$ );生肌方组和化瘀方组的 III 型胶原水平均高于模型组 ( $P < 0.05$ )。结论:祛瘀生肌法可以促进大鼠创面修复,减少瘢痕形成。

**[关键词]** 生肌化瘀方;创面修复;肉芽组织; I 型胶原; III 型胶原

**[中图分类号]** R283.61 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)03-0216-04

## Effects of Shengji Huayu Recipe and its decomposed formulas on synthesis of collagen types I and III in granulation tissue of rats in early wound healing

LI Bin, WANG Zhen-Yi, XIAO Xiu-Li, LI Fu-Lun, FAN Bin

(Department of Chinese Traditional Surgery, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

**ABSTRACT** Objective: To study the effects of Shengji Huayu Recipe (a traditional Chinese medicine compound recipe for resolving stagnation and promoting granulation) and its decomposed formulas (Huayu Recipe for resolving stagnation and Shengji Recipe for promoting granulation) on the synthesis of collagen types I and III in granulation tissue of rats in early wound healing. Methods: Twenty-four male Sprague-Dawley (SD) rats with full-thickness skin lesion were randomized into 4 groups: Shengji Huayu Recipe-treated group, Shengji Recipe-treated group, Huayu Recipe-treated group and untreated group. Collagen types I and III in granulation tissue of the rats were tested with immunohistochemical methods and image analysis. Results: On the third day of wound healing, collagen I of the rats in both Shengji Huayu Recipe-treated group and Shengji Recipe-treated group was higher than that in the untreated group, and collagen III of the rats in Huayu Recipe-treated group was lower than that in the untreated group ( $P < 0.05$ ). Collagen I and III of the rats in the three treated groups were lower than that in the untreated group ( $P < 0.05$ ). On the seventh day of wound healing, collagen I of the rats in both Shengji Huayu Recipe-treated group and Shengji Recipe-treated group was higher than that in the untreated group ( $P < 0.05$ ), and collagen III of the rats in both Shengji Recipe-treated group and Huayu Recipe-treated group was higher than that in the untreated group ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Resolving stagnation and promoting granulation therapy can promote the wound healing in rats.

**KEY WORDS** Shengji Huayu Recipe; wound healing; granulation tissue; collagen type I; collagen type III

J Chin Integr Med, 2005, 3(3): 216-219

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.39900195);上海中医药大学中医外科重点学科资助项目(No.030518)

**[作者简介]** 李 斌(1966-),男,博士,主任医师.

Correspondence to: LI Bin, MD, Professor. E-mail: drlibin@hotmail.com

创面愈合结局取决于胶原纤维合成与分解的平衡状况。正常情况下,创面内胶原合成与分解呈动态平衡,一旦失衡则创面难以愈合或形成瘢痕增生。创面愈合过程中,胶原的代谢是一个复杂的生物反应过程,利用一些因素来干预胶原代谢的过程,以加速创面愈合或减少瘢痕形成,在临床中有重要意义。本研究采用中药生肌化瘀方及其拆方对创面修复早期进行干预,从创面胶原代谢角度阐明生肌化瘀方促进创面愈合的作用机制。

## 1 材料与方

1.1 实验动物及分组 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重(220 ± 10)g,由上海中国科学院实验动物中心提供(批号:医动字第 02-22-2 号)。将大鼠随机分为创面造模后喂药 3 d 和 7 d 两个观测时段。每个时段又分为模型组(生理盐水)、生肌化瘀方组、生肌方组、化瘀方组。每组各 6 只动物。

1.2 药物组成及制备 生肌化瘀方:黄芪 45 g,太子参 30 g,白术 15 g,生地黄 15 g,丹参 30 g,水蛭 9 g,桃仁 12 g,川芎 12 g。生肌方:黄芪 45 g,太子参 30 g,白术 15 g,生地黄 15 g。化瘀方:丹参 30 g,水蛭 9 g,桃仁 12 g,川芎 12 g。由上海中医药大学岳阳中西医结合医院制剂室制备成合剂,使其含生药分别为生肌化瘀方 1.8 g/ml,生肌方 1.2 g/ml,化瘀方 0.6 g/ml。

1.3 实验试剂和仪器 型胶原单克隆抗体,北京中山生物工程公司产品,工作浓度 1:50; 型胶原多克隆抗体,复旦大学上海医学院病理解剖学实验室提供,工作浓度 1:200;二抗抗体,生物素标记的羊抗兔抗体,美国 Vector 公司产品,工作浓度 1:200;EnVision 试剂盒,日本 Dako 公司产品,工作浓度 1:100;3,3-二氨基联苯胺(DAB),瑞士 Fluke 公司产品;BX51/BX52 系统显微镜,日本 Olympus 公司产品。

## 1.4 实验方法

1.4.1 动物创面造模 参照傅小兵等<sup>[1]</sup>方法改进,SD 大鼠用 1% 盐酸氯胺酮 3 ml/kg 腹腔注射麻醉。局部备皮,常规消毒后,于背部取直径为 3 cm 左右圆形切口,剪去皮肤全层,至皮下筋膜,加盖无菌敷料,换药 1 次/d。

1.4.2 用药 根据成人日服用药量的 6 倍计算大鼠灌胃剂量分别为生肌方 12 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,化瘀方 6 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,生肌化瘀方 18 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,对照组灌服同生肌化瘀组等体积的生理盐水。从造模后第 2 天开始,灌胃 1 次/d,连续 3 d 或 7 d。

1.4.3 动物标本采集 用药后第 3、7 天,分别将动物麻醉(氯胺酮)处死,用眼科手术剪分离新生创面

肉芽组织,并成块取下,为所需实验样品。

1.4.4 免疫组化实验 标本用 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片,每例分别进行 HE 染色(用以对照病理诊断),并同时、同一试剂进行免疫组化 EnVision 二步法测定 I、II 型胶原。方法如下:取存档蜡块制成 5 μm 厚连续切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水。将切片移入电饭煲水浴中(内含 0.01 mol/L, pH 6.0 的柠檬酸三钠缓冲液),温度保持在 95 ~ 100 ℃,煮 20 min,保温 10 min,进行抗原修复,取出后在室温下自然冷却。TBS 洗涤,5 min × 3 次。滴加一抗(分别为上述抗体及相应抗体稀释度),在湿盒中室温下(20 ~ 25 ℃)孵育 60 min 后移入 4 ℃ 冰箱过夜。TBS 洗涤 3 次。滴加 EnVision 反应液(抗鼠,抗兔),50 μl/片,室温下孵育 30 min。TBS 洗涤 3 次。0.05% DAB + 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色 5 ~ 10 min。流水洗,苏木素衬染,盐酸酒精分化,蓝化。递增梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规树脂封片。对照设置:显微镜下观察有棕黄染色者为阳性对照,用 TBS 代替一抗做阴性对照。染色结果应用 Image-Pro Plus 4.1 版本计算机图像分析系统在 40 倍显微镜下计算区域的阳性面积百分比(%),求出 10 个视野平均值( $\bar{x} \pm s$ )。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件包对相关数据进行团体均数的双侧 *t* 检验或方差分析。

## 2 结果

### 2.1 I、II 型胶原图像分析结果

2.1.1 生肌化瘀方及其拆方对实验性创面第 3 天肉芽组织中 I、II 型胶原水平的影响 3 天组大鼠 I 型胶原表达阳性率,生肌方组和生肌化瘀方组均高于模型组( $P < 0.05$ ),且细胞内和周围基质中表达均匀,模型组主要在周围基质中表达;化瘀方组则低于模型组( $P < 0.05$ ),仅见少量表达。见表 1、图 1。3 天组大鼠 II 型胶原表达阳性率,生肌方组、化瘀方组和生肌化瘀方组均低于模型组( $P < 0.05$ ),模型组在细胞内及基质中均有较高表达,而生肌方组、化瘀方组和生肌化瘀方组则集中在细胞内中等或少量表达。见表 1、图 2。

2.1.2 生肌化瘀方及其拆方对实验性创面第 7 天肉芽组织中 I、II 型胶原水平的影响 7 天组大鼠 I 型胶原表达阳性率,4 组均较低,且都以基质内为主。生肌方组、生肌化瘀方组均低于模型组( $P < 0.05$ )。见表 2、图 3。II 型胶原表达阳性率,生肌方组和化瘀方组均高于模型组( $P < 0.05$ ),生肌方组以胞内表达为主,化瘀方组以基质表达为主,而模型组和生肌化瘀方组胞内和基质中表达均匀。见表 2、图 4。

表 1 实验性创面第 3 天各组大鼠肉芽组织中 I、III 型胶原水平

Tab 1 Collagen types I and III in granulation tissue of the rats in 4 groups 3 days after skin lesion

( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	n	Collagen I	Collagen III
Untreated group	6	39.0 ± 4.7	54.1 ± 7.8
Shengji Recipe-treated group	6	63.3 ± 3.8*	34.0 ± 5.5*
Huayu Recipe-treated group	6	25.9 ± 4.2*	16.8 ± 3.5*
Shengji Huayu Recipe-treated group	6	69.0 ± 1.9*	41.8 ± 6.4*

\* P < 0.05, vs untreated group

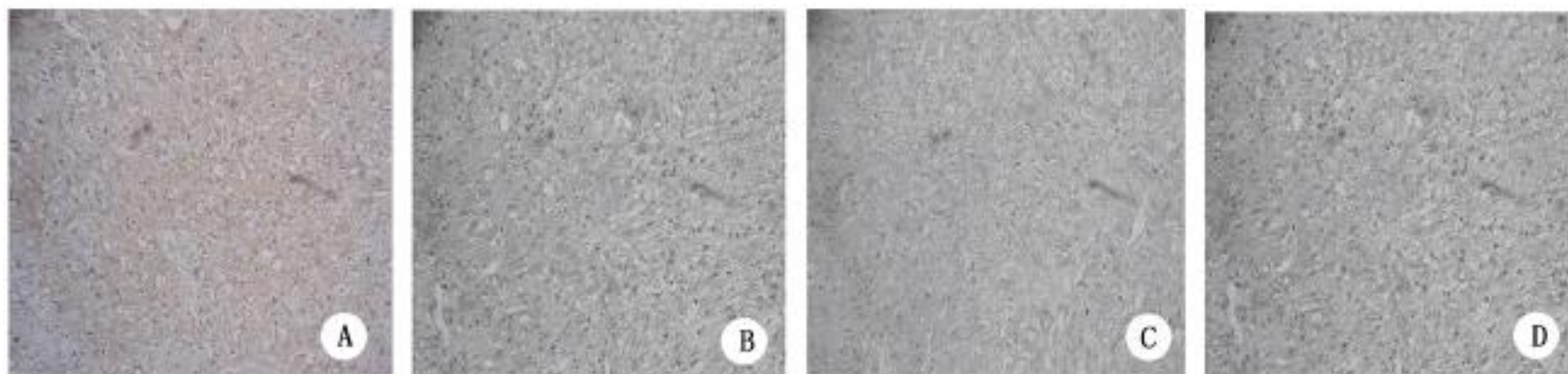


图 1 实验性创面第 3 天各组大鼠肉芽组织中 I 型胶原表达 (SP × 40)

Fig 1 Collagen I in granulation tissue of the rats in 4 groups 3 days after skin lesion (SP × 40)

A: Untreated group; B: Shengji Recipe-treated group; C: Huayu Recipe-treated group; D: Shengji Huayu Recipe-treated group

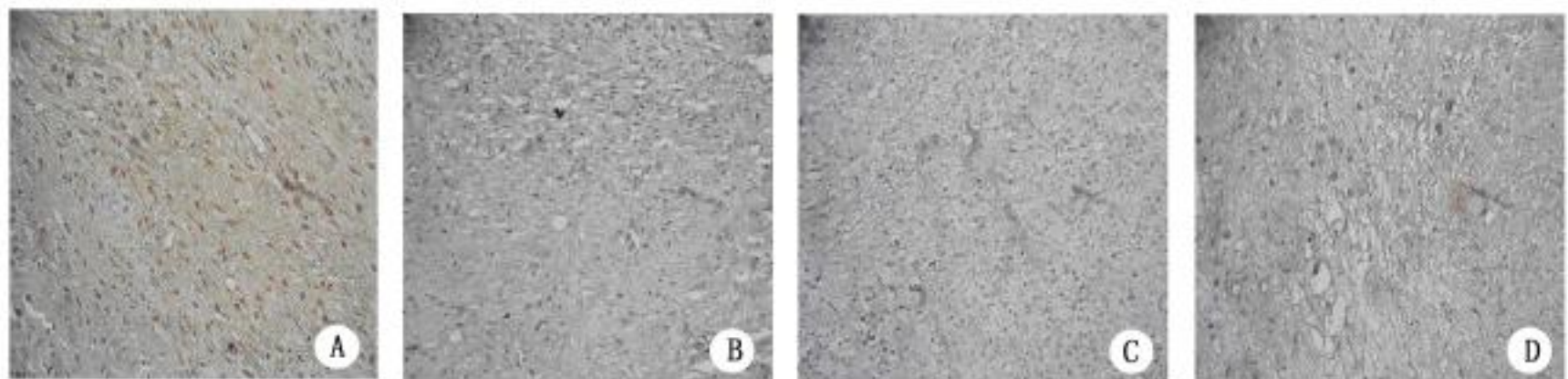


图 2 实验性创面第 3 天各组大鼠肉芽组织中 III 型胶原表达 (SP × 40)

Fig 2 Collagen III in granulation tissue of the rats in 4 groups 3 days after skin lesion (SP × 40)

A: Untreated group; B: Shengji Recipe-treated group; C: Huayu Recipe-treated group; D: Shengji Huayu Recipe-treated group

表 2 实验性创面第 7 天各组大鼠肉芽组织中 I、III 型胶原水平

Tab 2 Collagen types I and III in granulation tissue of the rats in 4 groups 7 days after skin lesion

( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	n	Collagen I	Collagen III
Untreated group	6	14.8 ± 2.5	39.3 ± 9.8
Shengji Recipe-treated group	6	6.0 ± 1.4*	61.4 ± 4.0*
Huayu Recipe-treated group	6	13.2 ± 5.0	56.9 ± 4.1*
Shengji Huayu Recipe-treated group	6	11.0 ± 2.7*	37.9 ± 5.1

\* P < 0.05, vs untreated group

### 3 讨论

细胞外基质包含有一种或两种胶原、氨基聚糖和蛋白聚糖,而胶原是细胞外基质的最基本结构,除了对组织提供支持和张力外,还能对细胞施加多种

影响<sup>[2]</sup>。

胶原分子是细胞外基质的最主要的结构性大分子,由 3 条肽链形成三股螺旋蛋白。每条肽链均有 1 000 个氨基酸,肽链组成的特点为(甘-X-Y) n 排列,X 位常为脯氨酸,Y 位多为羟脯氨酸或羟赖氨

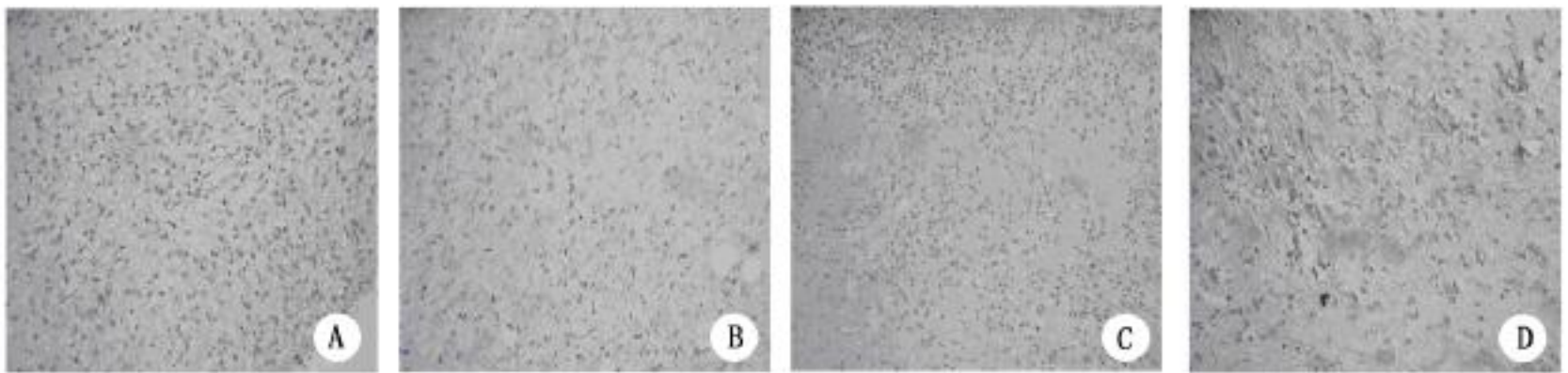


图 3 实验性创面第 7 天各组大鼠肉芽组织中 I 型胶原表达 (SP × 40)

Fig 3 Collagen I in granulation tissue of the rats in 4 groups 7 days after skin lesion (SP × 40)

A: Untreated group; B: Shengji Recipe-treated group; C: Huayu Recipe-treated group; D: Shengji Huayu Recipe-treated group

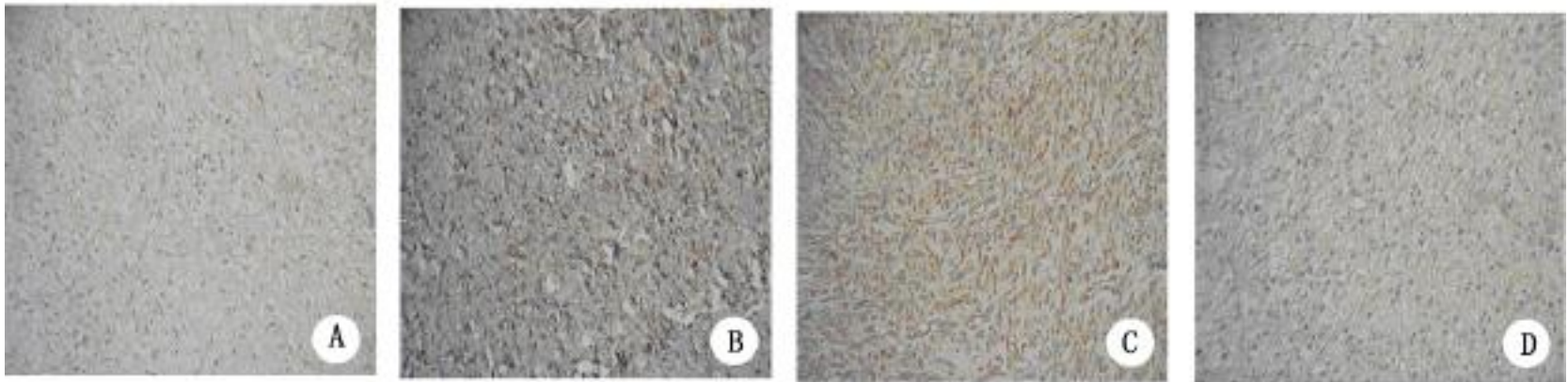


图 4 实验性创面第 7 天各组大鼠肉芽组织中 III 型胶原表达 (SP × 40)

Fig 4 Collagen III in granulation tissue of the rats in 4 groups 7 days after skin lesion (SP × 40)

A: Untreated group; B: Shengji Recipe-treated group; C: Huayu Recipe-treated group; D: Shengji Huayu Recipe-treated group

酸,羟脯氨酸须以氢键与脯氨酸相连,形成的螺旋结构稳定。根据体内分布和功能特点可分为三大类:(1)间质胶原;(2)基膜胶原;(3)细胞外周胶原。其中间质胶原与创面愈合关系最为密切,在体内以多聚分子结构即纤维的形式存在。I 型是皮肤胶原的重要类型,与皮肤张力密切相关。I 型胶原直径 100 ~ 500 nm,由两条结构相同的肽链和另一条结构不同的肽链组成。III 型包绕在外周,直径 40 ~ 60 nm,由三条相同的肽链组成。直径大小取决于切除两端肽链的顺序,先切除 C 端,则形成的胶原纤维较细。有人发现 I 型胶原含量越高,纤维束越细<sup>[3,4]</sup>。

本实验结果表明,在创面修复的第 3 天 I 型胶原生肌方组和生肌化瘀方组均高于模型组,化瘀方组则低于模型组 ( $P < 0.05$ ); III 型胶原生肌方组、化瘀方组和生肌化瘀方组均低于模型组 ( $P < 0.05$ ),以化瘀方组更为明显。由此说明生肌化瘀方和生肌方在创面修复起始阶段(前 3 天)具有减少胶原分解作用,化瘀方则具有促进胶原分解作用。在创面修复的第 7 天 I 型胶原生肌方组、生肌化瘀方组均低于模型组 ( $P < 0.05$ ); III 型胶原生肌方组和化瘀方组均高于模型组 ( $P < 0.05$ )。由此证明在创面修复过程中生肌和化瘀药物在创面修复的早期具有调控创面 I、III 型胶原水平的作用,我们在既往研究中已证明生肌化瘀方在离体实验中,具有促进创面成纤维胶原合成与代谢的作用<sup>[5]</sup>。在创面第 7 天,化瘀方组 I 型胶原高于模型组 ( $P < 0.05$ ),说

明化瘀中药也在一定程度上具有生肌作用,印证了我们提出的“化瘀利于生肌,生肌不致成瘀”的思想。生肌药物和化瘀药物合理配伍,以及在创面不同时期的应用是临床取得疗效的关键所在,也体现中医辨证论治的精华,本实验中所应用的生肌化瘀方,由于是在创面早期应用,是以生肌药物为主,化瘀药物为辅,对于胶原代谢中的分解与合成的平衡作用,特别是通过 I、III 型胶原水平调控,有利于胶原的合成,并提高创面修复质量。

[参考文献]

- 1 傅小兵,王德文主编.创伤修复基础[M].北京:人民军医出版社,1997.117-119.
- 2 蔡景龙,张宗学主编.现代瘢痕治疗学[M].北京:人民卫生出版社,1998.26.
- 3 张剑,向军,王志勇,等.真皮“生物模板”对创面愈合中胶原影响的研究[J].上海第二医科大学学报,2003,23(5):393-395.
- 4 Gallant CL, Olson ME, Hart DA. Molecular, histologic, and gross phenotype of skin wound healing in red Duroc pigs reveals an abnormal healing phenotype of hypercontracted, hyperpigmented scarring[J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(3): 305-319.
- 5 董莉,李斌,章云,等.生肌化瘀方及其拆方对大鼠创面成纤维细胞 I、III 型胶原合成的影响[J].中国中西医结合杂志,2002,22(3):200-201.

[收稿日期] 2005-03-23 [本文编辑] 周庆辉