

芪榆油膏对肛瘻术后创面肉芽组织中 VEGF mRNA 表达的影响

曹波¹, 李志^{2*}, 李绍堂³, 邓文玲¹

(1. 贵阳中医学院第一附属医院肛肠科, 贵阳 550001;
2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 3. 福建医科大学, 福州 350004)

[摘要] 目的: 观察芪榆油膏对肛瘻术后创面肉芽组织中血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达的影响, 以初步探讨其作用机制。方法: 90 例术后创面纵径在 2.5~3.0 cm、术后伤口深度达外括约肌浅部的低位单纯性肛瘻患者随机分为观察组、对照组和凡士林组各 30 例。观察组用芪榆油膏, 对照组用龙珠软膏, 凡士林组用凡士林纱条, 每日换药 1 次至创面愈合。采用 RT-PCR 方法对术后用药第 7 天各组创面肉芽组织中 VEGF mRNA 的表达进行检测; 并观察各组术后创面愈合时间。结果: 术后创面肉芽组织内均存在内源性 VEGF mRNA 基因表达。但观察组创面肉芽组织中 VEGF mRNA 基因表达均明显超过对照组和凡士林组($P < 0.01$); 创面愈合时间观察组明显少于对照组和凡士林组($P < 0.05$)。结论: 芪榆油膏可明显提高创面组织中 VEGF mRNA 的表达, 这可能是芪榆油膏促进创面修复的机制之一。

[关键词] 芪榆油膏; 创面愈合; RT-PCR(逆转录聚合酶链式反应); 基因表达

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0236-03

芪榆油膏是一种纯中药制剂, 前期临床研究发现, 该药物能很好的促进肛瘻术后创面的愈合。本实验旨在观察创面愈合时间与 VEGF mRNA 的表达的关系, 以期在分子生物学水平分析芪榆油膏促进创面愈合的依据。

1 资料

1.1 临床资料 所有患者均来源于贵阳中医学院第一附属医院肛肠科病房, 临床症状、体征和肛门镜检查或探针探查及术后回顾诊断均符合低位单纯性肛瘻诊断。90 例患者中: 男性 79 例, 女性 11 例, 年龄 18~60 岁, 病程为 6 d~2 年, 随机分为观察组、对照组和凡士林组各 30 例。3 组患者性别、年龄、创面平均纵径无显著性差异, 具有可比性。

1.2 诊断依据 参照 2006 年版《肛瘻临床诊治指南》中“低位单纯性肛漏”诊断标准^[1]: 内口在肛隐窝, 仅有一个瘻道通过外括约肌皮下部或浅部与皮肤相通。

1.3 纳入标准 凡符合上述诊断标准的低位单纯性肛瘻患者, 术后创面纵径大小 2.5~3.0 cm, 并签署知情同意书。

1.4 排除标准 未按规定方案用药或半途终止用药者, 出现药物过敏者。

2 试剂及仪器

2.1 试剂 VEGF 抗体试剂盒、RNA 酶抑制剂、M-Mulr(逆转录酶)试剂盒、dNTP Mix(核苷酸混合物)、TaqDNA 聚合酶、Oligo(dT)18(随机引物)、Master Mix 试剂盒(上海捷瑞生物有限公司)。

2.2 仪器 PCR 仪(美国 PE 公司), 凝胶电泳成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

3 方法

3.1 芪榆油膏的制作 按组方(生黄芪 120 g, 生地榆 60 g, 当归尾 60 g, 丹参 30 g, 紫草 30 g, 白及 30 g, 乳香 30 g, 没药 30 g, 血竭 30 g)将各药均匀混合研成细粉, 过筛(100 目), 纳入 1 000 g 芝麻油中浸泡 72 h, 烧开芝麻油用文火将各药炸枯, 加热炸至白芷棕褐色, 去渣; 双层纱布过滤, 待油温降至 50~60 ℃ 时, 加入蜂胶搅拌均匀即得。放于高温磨砂瓶中高压灭菌 120 min 备用。

3.2 创面处理及术后给药方法 术前均备皮、清洁灌肠, 采用连续硬膜外麻醉。手术方式均行“瘻切除术”, 修剪创缘, 使切口呈下窄上宽的“V”字型便于

[收稿日期] 2010-12-16

[基金项目] 贵阳中医学院研究生创新计划基金(200962)

[第一作者] 曹波, 副教授, 硕士研究生导师, 从事肛肠疾病的研究与治疗, Tel: 1388509666, E-mail: caobo39666@ yahoo. cn

[通讯作者] * 李志, 硕士, Tel: 15329100716, E-mail: lz79@ yahoo. cn

引流,手术切口不缝合,创面纵径 2.5~3.0 cm,每次换药前均常规消毒,观察组用芪榆油膏,对照组用龙珠软膏,凡士林组用凡士林纱条,每日换药 1 次至创面愈合(术后均使用同种抗生素 5 d、止血药 3 d、止痛药 3 d)。

3.3 标本采集及制备方法 术后第 7 天换药时,剪取 1.0 mm × 1.0 mm 新鲜肉芽组织,放入事先准备好的 10% 福尔马林溶液试剂瓶,送第一附属医院病理实验室。再剪取 1.0 mm × 1.0 mm 新鲜肉芽组织,放入装有裂解液的专用 Epp 管中,无菌操作、保存, -4 °C 条件下立即送贵州医学院生理病理实验室置 -80 °C 低温冰箱中速冻待测 VEGF mRNA。

3.4 肉芽组织 VEGF mRNA 表达的检测 用 RT-PCR 方法。

3.4.1 引物合成 VEGF mRNA 的引物设置与扩增参照文献[2]并用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,由上海捷瑞生物有限公司合成纯化:VEGF 的上游引物为 5'-TCGGCCTCCGAAACCATGA-3',下游引物为 5'-CCTGGAGAGAGATCTGGTTC-3',扩增产物片段长度为 474 bp;相应内参(β -actin)上游引物为 5'-TGGCATTGTGATGGACTC-3',下游引物为 5'-CCGATAGTGATGACCTGAC-3',扩增产物片段长度为 306 bp。

3.4.2 组织总 RNA 的提取 采用 Trizol 提取总 RNA,按 Trizol 试剂说明书操作提得各标本总 RNA,取 0.2 mL Epp 管,加入 48 μ L 无 RNA 酶水,再加入 2 μ L 已提取的 RNA 标本,在核酸蛋白分析仪上以无 RNA 酶水调零,对所提 RNA 进行定量分析,计算出 RNA 的浓度和纯度(260 nm/280 nm 1.8~2.0),说明 RNA 样品纯度理想。其余置 -80 °C 冰箱中保存备用。

3.4.3 RT 逆转录反应 cDNA 的合成严格按照逆转录试剂盒说明书进行操作,逆转录反应体系:5 × 反应缓冲液 4 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L, 10 mmol · L⁻¹ dNTP Mix(核苷酸混合物)2 μ L, 1 g · L⁻¹ 随机引物 1 μ L, 无 RNA 酶水 6 μ L, 逆转录酶 1 μ L, 组织总 RNA 5 μ L(约 2 μ g), 共 20 μ L。反应条件:70 °C 5 min, 37 °C 5 min, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min。所得逆转录产物 cDNA(-20 °C 保存)。

3.4.4 PCR 扩增反应 PCR 反应体系:取 cDNA 2 μ L, 加 10 × 反应缓冲液 2.5 μ L, 25 mol · L⁻¹ MgCl₂ 1.5 μ L, 10 mol · L⁻¹ dNTP Mix(核苷酸混合物)0.5

μ L, 5 U · μ L⁻¹ MBI DNA 聚合酶 0.2 μ L, VEGF mRNA 及 β -actin mRNA 上下游引物各 0.5 μ L, 灭菌水 16.3 μ L, 共 25 μ L。PCR 扩增反应条件:94 °C 预变性 5 min(灭活逆转录酶);94 °C 变性 45 s, 56.3 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环,72 °C 最后延伸 10 min; VEGF PCR 产物为 474 bp, 相应内参(β -actin)PCR 产物为 306 bp。

3.4.5 RT-PCR 结果判定 在 160 V 下,取 5 μ L 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳 1 h, 然后放入凝胶电泳成像系统仪,经计算机扫描成像,成像仪进行图片采集。用 Quantity one 软件分析 DNA 条带的面积及吸光度(A),二者乘积为 IA,每 DNA 条带重复测 3 次。取其均值。以 β -actin 扩增条带作为内参照,结果用待测基因 VEGF 与相应的 β -actin 的 IA 之比表示 VEGF mRNA 表达的相对水平。

3.5 创面愈合时间测定 即创面完全上皮化所需时间,上皮化依靠肉眼观察^[3]。每天换药,观察创面愈合程度,创面愈合时间为创面被新生肉芽组织填满、覆盖组织完全上皮化所需时间。

3.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件包处理分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对样本 t 检验,结果以 P < 0.05 为差异显著的标准。

4 结果

4.1 VEGF mRNA 的表达 观察组较另外两组明显增强(P < 0.05, P < 0.01),见表 1。

表 1 各组 VEGF mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	mRNA 表达
观察	1.371 ± 0.067 ^{1,2)}
对照	1.049 ± 0.062
凡士林	0.597 ± 0.084

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05;与凡士林组比较²⁾P < 0.01。

4.2 创面愈合的时间 观察组较另外两组愈合时间明显缩短(P < 0.05, P < 0.01),见表 2。

表 2 术后各组创面愈合时间比较($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	创面愈合时间/d
观察	17.03 ± 1.35 ^{1,2)}
对照	17.87 ± 1.22
凡士林	20.13 ± 1.63

注:和对照组比较¹⁾P < 0.05;与凡士林组比较²⁾P < 0.01。

5 讨论

芪榆油膏是结合紫草油、生肌玉红膏方剂加减制成的外用油膏。本方重用黄芪大补脾胃之气、令气旺血行、祛瘀通络,为君药;地榆凉血活血、去腐敛

创,当归尾长于活血、且有化瘀而不伤血之妙,二者共为臣药;丹参、乳香、没药、助当归尾活血祛瘀,紫草、白及、血竭有去腐敛疮之功,均为佐药。故本方药能益气活血、去腐生肌,能促进肛肠术后创面愈合。现代医学证明本方中君药黄芪具有较好的促进血管生成作用^[4],丹参可通过调节血小板衍生长因子(PDGF)的表达而促进创伤修复^[5]。方中加蜂胶不仅能保护肉芽组织,还有利于伤口愈合,有抗菌、抗氧化、增强免疫、抗过敏等作用^[6]。蜂胶外用具有修复器官组织的损伤,消除炎症,促进组织再生,调节内分泌,改善血液循环状态,促进皮下组织血液循环的作用^[7]。芪榆油膏外敷能使创面形成密闭湿润环境,密闭湿润环境可促进巨噬细胞、血小板、成纤维细胞和中性粒细胞释放各种生长因子,而且还可调节或刺激巨噬细胞增生^[8-10]。并造成一个加快血管生成和纤维蛋白溶解的环境,使创面以更快的速度愈合。同时油膏外敷后,对创面有着明显的保护的作用。

血管内皮生长因子(VEGF)是一种特异的直接作用于内皮细胞的有丝分裂原,可以刺激体内尤其是缺血部位的血管生成,是迄今为止已知的最强烈的促血管生长因子^[11],它主要是通过启动微血管发生的初始过程-出芽,并最终形成成熟的血管结构,缺血或缺氧是诱导 VEGF 表达的最主要的因素^[12]。研究证实,组织缺血后 VEGF 的表达上调,可刺激内皮细胞增生、迁移,从而形成新的血管^[13-14],这将有利于血管新生、启动微循环系统重建。本实验结果表明,术后创面肉芽组织内均存在内源性 VEGF mRNA 基因表达,这提示 VEGF 在创面的愈合过程中起着重要的调节作用。而观察组创面肉芽组织中 VEGF mRNA 基因表达明显高于对照组和凡士林组($P < 0.01$),表明芪榆油膏能诱导内源性 VEGF mRNA 基因表达。其机制可能与方中黄芪和当归配伍促进内皮细胞 VEGF mRNA 的表达有关^[15-16]。VEGF 作为内源性正性调节因子参与了创面修复过程,可能是芪榆油膏促进创面修复的机制之一。

[参考文献]

[1] 中华中医药学会肛肠分会、中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组、中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会.《肛肠临床诊治指南》[M]. 2006:219.
[2] Lamoreaux W J, Fitzgerald M E, Reiner A, et al. Vascular

endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decrease release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*[J]. *Microvasc Res*, 1998, 55(28): 29242.
[3] Sigh K P, RHSADR, CHARL P S, et al. Effect of growth hormone therapy in bum patients on conservative treatment[J]. *Burns*, 1998, 24(6): 733.
[4] 王为,张景云. 创愈散祛腐生肌实验研究[J]. *中国肛肠病杂志*, 2002, 22(11): 3.
[5] 王林杨. 复黄生肌愈创油膏对皮肤溃疡修复作用的实验研究[J]. *中医外治杂志*, 1999(4): 8.
[6] 愉悦. 水提取蜂胶与碱性蜂胶的抗肿瘤作用[J]. *国外医学: 中药中药分册*, 2002, 24(2): 124.
[7] 刘富海, 许正鼎. 神奇蜂胶疗法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 14.
[8] 周金宝, 肇毅, 朱海青, 等. 丹参药膜对胃壁创伤组织 PDGF 表达的影响[J]. *山东中医杂志*, 2005, 24(2): 105.
[9] 付小兵, 王德文. 现代创伤修复学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 245.
[10] 田建广, 夏照帆. 创面敷料的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(5): 470.
[11] Banai S, Jaklitsch M T, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemia my-o-cardium by vascular endothelial growth factor in gogs[J]. *Circulation*, 1994, 89(5): 2183.
[12] Mukherjee S, Tessema M, Wandinder-Ness A. Vesicular traffickiong of tyrosine kinase receptors and associated proteins in regulation of signaling and vascular function [J]. *Cire Res*, 2006, 98(6): 743.
[13] Zhang Z G, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiotensin expression with disruption of blood-brain barrier and an 2 giogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 2002, 10(4): 379.
[14] Hugo J H, Myriam B, Anita B, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156: 965.
[15] 雷燕, 高倩. 黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(10): 753.
[16] 李悦山, 张建龙, 薛磊. 黄芪与当归对人脐静脉内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2005, 28(3): 224

[责任编辑 何伟]