

# 胶原蛋白对大鼠创伤模型愈合影响的实验研究

张红<sup>1</sup>, 孙明江<sup>2</sup>, 代龙<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医药科技开发交流中心, 北京 100027; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

**[摘要]** 目的: 研究胶原蛋白对大鼠创伤皮肤的促愈合作用。方法: 以猪皮为原料酶解分别制备胶原及胶原蛋白, 以大鼠建立皮肤创伤模型, 比较使用胶原、胶原蛋白及胶原与胶原蛋白合用后大鼠创伤模型的愈合率。结果: 大鼠创伤模型的愈合率: 胶原+胶原蛋白组>胶原蛋白组>胶原组, 与对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论: 胶原和胶原蛋白能有效促进大鼠创伤皮肤的愈合。

**[关键词]** 胶原蛋白; 胶原; 猪皮; 皮肤; 愈合

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0078-02

由急、慢性损伤引起的各类皮肤破损性疾病是一种临床常见病多发病, 由于该类疾病多引起皮肤表面缺损, 造成深达真皮层或更深层的皮肤损害, 往往缠绵难愈, 临床治疗比较棘手。“以皮补皮”古人已有认识, 动物皮治疗破损皮肤从古至今一直在临床外科中应用, 如象皮生肌散<sup>[1]</sup>、经紫外线预照射猪皮外敷治疗烧伤<sup>[2]</sup>等, 均取得较好的治疗效果。猪皮的结构及组成与人体皮肤近似, 其主要含有I型和II型胶原, 猪皮胶原能促进皮肤成纤维细胞的生长, 利于皮肤的修复<sup>[3]</sup>。现以猪皮为原料制备胶原蛋白, 并对胶原蛋白对大鼠创伤模型愈合的影响做了实验研究。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠, 雄性, 体重(220±10)g, 由山东中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(鲁)20050015, 使用许可证号 SYXK(鲁)20050043。

**1.2 试剂** 戊巴比妥钠, 中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: F20080417; 75%酒精消毒液, 山东利尔康消毒科技有限公司; 卡波姆940, 山东聊城阿华制药有限公司; 脂肪酶(酶活力 $\geq 3000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 批号: F20080421, 胃蛋白酶(酶活力 $\geq 1200 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 批号: F20070518, 胰蛋白酶(活力 $\geq 500 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), 批号: F20071228, 均为国药集团化学试剂有限公司; 蒸

馏水; 其余均为分析纯。

**1.3 实验器材** 透析袋(截留分子量14000), 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20080327; 卷式微孔滤膜(Prep/Scale™-TFF 1 ft<sup>2</sup> Cartridge, PLAC 3k Regenerated cellulose), Millipore Corporation, Billerica, MA 01821。

## 2 方法

**2.1 胶原供试样品的制备** 取鲜猪皮, 除去毛附属物, 刮去脂肪, 切碎, 取100g, 加10倍量1%脂肪酶水液, 35℃保温酶解2h, 倾去上清液, 余猪皮以水洗涤, 4℃冷藏, 加入10倍量预冷至4℃的含2%胃蛋白酶的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸溶液, 4℃冷藏48h, 离心, 所得上层液加入氯化钠使含量达10%, 4℃冷藏12h, 离心, 弃上清液, 沉淀以 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸复溶, 离心, 透析, 得胶原酸液(100g, 相对分子质量270k~300k)供试样品。

**2.2 胶原蛋白供试样品的制备** 将2.1项下胶原酸液均分2份, 取其中1份加入1%的胃蛋白酶40℃保温酶解2h, 酶解液再以氢氧化钠调节pH至9.0, 加2%胰蛋白酶, 50℃保温酶解6h, 加热至85℃保温30min, 放冷, 滤过, 上清液超滤, 得相对分子质量小于3k的小分子溶液, 减压浓缩至50g, 即为胶原蛋白溶液, 将胶原蛋白溶液加入润涨并熟化完全的卡波姆中制成凝胶, 即为胶原蛋白供试样品。

**2.3 胶原+胶原蛋白供试样品的制备** 将以猪皮计等量的胶原供试样品与胶原蛋白供试样品混合均匀, 即为胶原+胶原蛋白供试样品。

**2.4 创伤皮肤模型的建立** 大鼠以4%戊巴比妥钠

[收稿日期] 2009-03-23

[通讯作者] \* 代龙, Tel: 13156189167; E-mail: dailongdailong@263.net

40 mg·kg<sup>-1</sup> 体重, ip, 浅麻醉。局部备皮, 常规消毒, 于大鼠背部取直径为 2.5 cm 圆形切口, 切开皮肤全层, 至深筋膜, 制作出 2.5 cm 直径的圆形创面, 然后以无菌纱布覆盖, 造模完成。

**2.5 动物分组及给药** 雄性大鼠 40 只, 随机分成 4 组: 对照组、胶原组、胶原蛋白组、胶原+ 胶原蛋白组, 每组各 10 只。造模 1 d 后, 实验组将相应药物均匀外涂创面, 每日 2 次, 每次涂以猪皮计相同量的相应药物(分别为胶原 2 g, 胶原蛋白 1 g, 胶原+ 胶原蛋白 1.5 g), 空白对照组不作处理。以无菌纱布覆盖, 防止感染, 连续给药观察 15 d。

**2.6 创面愈合情况的评价** 每天观察伤口愈合情况, 并将创面描记在半透明纸上, 再以此为模板, 将质地均匀的硬纸片剪成图样大小, 以硬纸片重量间接表示创面面积大小, 并以下式计算: 创面愈合率(%) = (开始创伤面积 - 未愈合创面面积) / 开始创伤面积。

**2.7 统计处理** 计量资料以平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组样本均数间比较用单因素方差分析。数据结果采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理分析。

### 3 结果

各实验组的创面愈合率见表 1。

表 1 大鼠创面愈合率的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10, \%$ )

组别	2 d	5 d	10 d	15 d
模型对照组	10.32 ± 1.85	20.35 ± 2.16	38.25 ± 2.45	60.34 ± 3.03
胶原组	15.16 ± 1.64	32.35 ± 2.32 <sup>1)</sup>	60.25 ± 2.80 <sup>1)</sup>	81.34 ± 3.12 <sup>1)</sup>
胶原蛋白组	25.58 ± 1.96 <sup>1)</sup>	56.66 ± 2.08 <sup>2,3)</sup>	82.38 ± 2.65 <sup>1,3)</sup>	92.80 ± 2.82 <sup>1,3)</sup>
胶原+ 胶原蛋白组	21.32 ± 2.10 <sup>1)</sup>	52.27 ± 1.88 <sup>2,3)</sup>	91.48 ± 2.92 <sup>1,3)</sup>	95.24 ± 3.16 <sup>1,3)</sup>

注: 与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与胶原组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$

以上实验结果表明, 与模型对照组比, 胶原有促愈合作用( $P < 0.05$ ); 胶原蛋白组创伤的愈合率较胶原组好; 胶原与胶原蛋白合用似有协同作用。

### 4 讨论

胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 它具有广泛的活性, 在细胞的分化、组织修复、器官的正常营养等方面起着重要作用, 可以促进成纤维细胞、血管内皮细胞的分化并形成基质, 激活巨噬细胞的吞噬功能, 提高机体的免疫活性, 降低创面被感染的概率。同时胶原蛋白可促进肉芽组织生长, 其降解产物为机体修复细胞所必须的氨基酸——羟基脯氨酸, 为创面的修复提供丰富的营养物质<sup>[4]</sup>, 加速创面的愈合。

在现代医学诸多治疗措施中, 大面积严重皮肤创伤多采用皮肤移植进行整复, 小面积创面多以药物治疗。常用的化学药物主要为具有修复作用的各种生长因子, 如表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经生长因子等<sup>[5-7]</sup>, 生长因子类虽然有较强的促进细胞增殖作用, 能促进伤口愈合, 但由于生长因子活性半衰期只有几个小时或更短, 而且起作用的影响因素复杂, 临床效果仍不能令人满意; 另一类常用的药物为组织工程生物材料——胶原类。胶原在止血剂、人工皮肤中应用较多, 对皮肤表面的蛋白质分子具有较大的亲和力、较弱的抗原性、良好的生

物相容性和生物降解安全性, 可降解吸收, 但胶原为大分子蛋白质, 相对分子质量约 300 k, 不能直接被吸收利用, 而胶原蛋白相对分子质量小于 3 k, 作为“生肌原料”更易被机体吸收利用, 这可能就是在实验组中胶原蛋白的促愈合作用优于胶原的原因。

### [参考文献]

[1] 邓博, 郭彦涛. 象皮生肌膏治疗外伤性皮肤全层缺损的临床观察[J]. 中医药导报, 2008, 14(5): 62.

[2] 赵东轮, 张晋杰, 苗三林. 生物辅料在烧伤创面治疗中的应用[J]. 中国民康医学, 2008, 20(18): 2091.

[3] 张焰, 曾敬英, 陈露, 等. 重建胶原纤维对细胞生长的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(41): 8095.

[4] 王晓芹, 王贵波, 李晓辉. 创面敷料及其对愈合的影响研究进展[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4): 574-575.

[5] Jingjing L. Human muller cells express VEGF183, a novel splice dvariant of VEGF[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(3): 752.

[6] Klein M, Picard E, Vignaud JM, et al. Vascular endotheliagrowth factor gene and protein: strang expression in thyroiditi and thyroid carcinomas[J]. J Endocrinol, 1999, 161(1): 41.

[7] L I QF. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor[J]. J Reconstr Microsurg, 2000, 16(1): 451.