

· 基础研究 ·

封闭式负压引流技术对兔急性创面愈合的影响

王科科 刘江辉 黄勇 姬忠良 彭佳华 王维平

【摘要】目的 观察封闭式负压引流技术(VAC)治疗兔急性创面的效果,探讨其促进创面愈合的机制。**方法** 将 12 只新西兰大白兔背部 24 个急性创面(每只兔 2 个创面)用随机数字表法分为 VAC 组和对照组,VAC 组给予 VAC 治疗,负压为 120 mmHg,共治疗 7 d;对照组给予常规换药治疗。治疗第 3 和 7 天观察创面愈合情况;于创缘取材,采用 HE 染色观察组织学变化;采用 RT-PCR 方法检测创缘组织 Cx 43 mRNA 的表达水平。**结果** 创面大体观察示,VAC 组创面较对照组红润、清洁,水肿消退快;镜下可见 VAC 组上皮较对照组厚,炎症细胞浸润较多;VAC 组 Cx 43 mRNA 表达在治疗第 3、7 天均明显低于对照组($P < 0.05$)。**结论** VAC 可促进急性创面愈合,其机制可能与其促进急性创面炎症细胞浸润,下调组织 Cx 43 mRNA 的表达有关。

【关键词】 封闭式负压引流; 急性创面; 间隙连接蛋白 43

Effects of drainage with vacuum and closure on acute wounds WANG Ke-ke, LIU Jiang-hui, HUANG Yong, JI Zhong-liang, PENG Jia-hua, WANG Wei-ping. Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: WANG Wei-ping, Email: emailwang6@hotmail.com

【Abstract】Objective To observe the effects of drainage with vacuum and closure (VAC) on acute wounds, and explore the mechanism of drainage with VAC in promoting wound healing. **Methods** Twenty-four acute wounds were inflicted on the backs of 12 New Zealand white rabbits (each rabbit two wounds), and the rabbits were divided into a drainage with VAC group and a control group randomly. The drainage with VAC group was treated with drainage with VAC. The control group was treated with wet saline gauze. The wounds were observed 3 and 7 days after treatment. Patho-morphological changes in tissues from the compressed area were observed by HE staining. The expression level of Cx 43 mRNA was detected using a RT-PCR. **Results** At the 3rd and 7th day after treatment, the wounds of the drainage with VAC group were clean, fresh and had less edema compared with those of the control group. Pathomorphological tissue changes were more obvious in the drainage with VAC group. The expression of Cx 43 mRNA in the drainage with VAC group had declined significantly compared with the control group. **Conclusion** Drainage with VAC can promote inflammatory cell infiltration, down-regulate the expression of Cx 43 mRNA, and promote wound healing.

【Key words】 Drainage with vacuum and closure; Wounds; Connexin 43

封闭式负压引流技术(vacuum assisted closure, VAC)已被广泛应用于治疗各类急、慢性创面,尤其适用于大批伤员的创伤救治^[1]。目前已有研究证实,VAC 是通过改善创面的供血和调节生长因子水平,促进细胞的增殖和分化,从而加速创面愈合^[2]。但是,VAC 对急性创面的影响及其促进创面修复的具体机制尚不完全清楚。有关外源性生长因子对间隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx 43)表达和间隙连接细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)的调节作用已在细胞水平上开展了广泛研究^[3]。本研究以 VAC 对急性创面 Cx 43 表达的影响为切入点,探讨其对急性创面愈合的影响和促进创面修复的机制。

材料与方法

一、主要仪器和试剂

YB-DX23D 负压电动吸引器(上海医疗器械); T-gradient 基因扩增仪(德国 Biometra 公司);紫外分光仪(美国 Beckman 公司);RT-PCR 试剂盒(购自南京凯基);Trizol 试剂(购自美国 Invitrogen 公司)。

二、动物模型制作及分组

选择成年健康新西兰大白兔 12 只,体重(2.4 ± 0.3) kg,由广东省医学实验动物中心提供。实验动物用 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg 体重)静脉麻醉,背部用 100 g/L 硫化钠脱毛,在无菌条件下,于背部中线距离颈部 10 cm 和 20 cm 处为圆心,各做一个直径为 2 cm 的圆形全层皮肤缺损创面^[1]。创面按顺序编号(1~24),用随机数字表法分为对照组和 VAC 组,每组 12 个创面。

三、治疗方法

对照组采用常规换药方法,即用生理盐水棉球清洗创面,0.5% 安尔碘消毒液消毒创面周围组织,用无菌纱布敷料覆盖创面,并用手术贴膜固定敷料。VAC 组采用 VAC 治疗^[4],即生理盐水棉球清洗创面,0.5% 安尔碘消毒液消毒创面周围后,依创面形状剪裁医用海绵,置于创面内,将引流管带侧孔的一端插入海绵,另一端连接到负压装置,创面及周边用手术贴膜完全封闭,调整负压为 120 mmHg;负压吸引 2 h 间隔 0.5 h 为 1 个循环,每日 4 个循环,共治疗 7 d。2 组均每 2 d (即治疗第 3 和第 5 天)更换 1 次敷料。

四、大体观察

治疗第 3、7 天更换敷料时对创面进行观察,数码相机拍照。观察创缘皮肤、筋膜水肿情况、筋膜下血管以及创面颜色、分泌物、血管供血情况等。

五、取材方法

造模当时留取皮肤组织,治疗第 3 天和第 7 天切取创缘 1.5 cm × 1.0 cm 全层皮肤组织,取 1/2 组织放入 4% 多聚甲醛中固定,余 1/2 组织迅速置入液氮中,后转入 -80℃ 超低温冰箱备用。

六、组织学观察

皮肤组织经 4% 多聚甲醛固定 12 h 后,石蜡包埋,切片厚 4 μm,HE 染色后光镜下观察。

七、Cx 43 mRNA 测定

1. 设计与合成:查阅 gene bank,使用 Primer 5.0 版软件设计的 Cx 43 引物,上游序列为 5'-GAAAATGCGAGGGGCTT-3',下游序列为 5'-TCACTCTTTCCTTCACACGAT-3',扩增片段长度为 300 bp;GAPDH 引物,上游序列为 5'-ACCTCAACTACATGGTCTAC-3',

下游序列为 5'-TTGTCATTGAGAGCAGCC-3',扩增片段长度为 209 bp。GAPDH 作为内参,检测样品中总 RNA 的完整性。

2. RT-PCR:冰浴下称取 100 mg 组织放入离心管中,按试剂盒说明进行总 RNA 抽提;逆转录反应按试剂盒说明操作;PCR 按试剂盒说明操作,热循环条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察,最后用 Band-scan 扫描系统测定各产物光密度值。用 Image J 软件分析目标条带片段大小和净光密度值。将目的 Cx 43 条带和内参 GAPDH 条带的净光密度值之比作为 Cx 43 mRNA 的相对光密度值。

八、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计软件包分析。数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,结果进行方差分析, P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

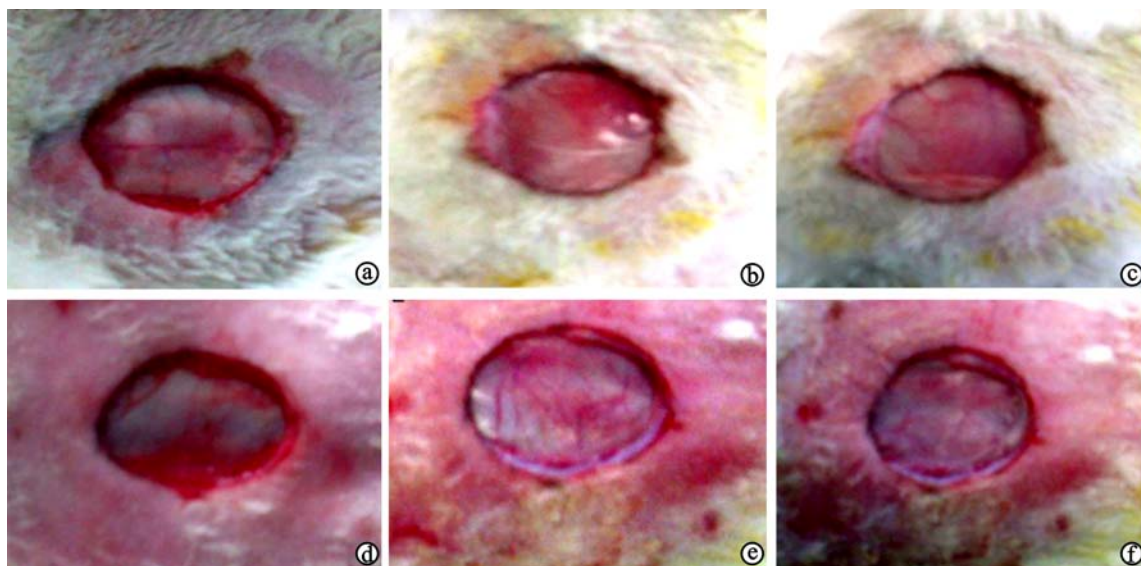
结 果

一、大体观察

治疗第 3 和第 7 天,VAC 组创缘清洁,创面基底部红润、清洁,无明显水肿,无异常分泌物,筋膜菲薄透明,其下血管清晰可见;对照组创缘有少量血痂附着,创面基底部呈暗红色,水肿明显,有淡黄色分泌物附着,筋膜水肿模糊。见图 1。

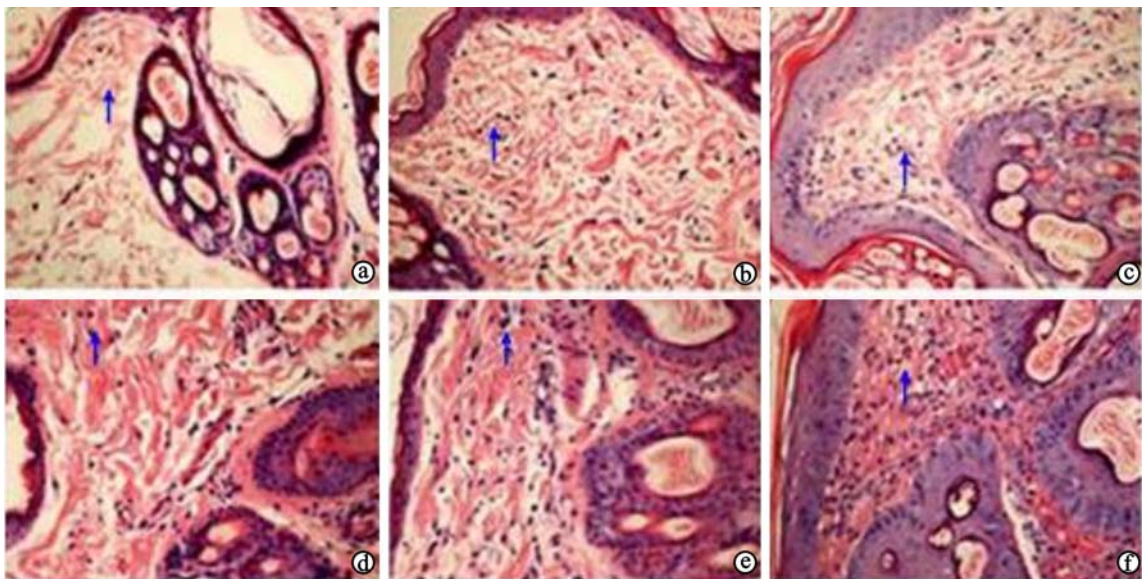
二、组织学观察

治疗第 3 和第 7 天,VAC 组上皮厚度较治疗前有明显增厚,皮下组织内有较多炎症细胞浸润;对照组上皮厚度轻微增厚,皮下组织内较少炎症细胞浸润。见图 2。



注:a. 对照组建模时;b. 对照组治疗第 3 天;c. 对照组治疗第 7 天;d. VAC 组建模时;e. VAC 组治疗第 3 天;f. VAC 组治疗第 7 天

图 1 2 组创面各时间点的大体观察



注:a. 对照组造模时;b. 对照组治疗第 3 天;c. 对照组治疗第 7 天;d. VAC 组造模时;e. VAC 组治疗第 3 天;f. VAC 组治疗第 7 天

图 2 2 组创缘组织各时间点组织学观察(HE 染色, $\times 400$)

三、Cx 43 mRNA 表达

治疗第 3 和第 7 天,2 组 Cx 43 mRNA 的表达均较治疗前有明显的下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 VAC 组治疗后 Cx 43 mRNA 的表达明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3 和表 1。

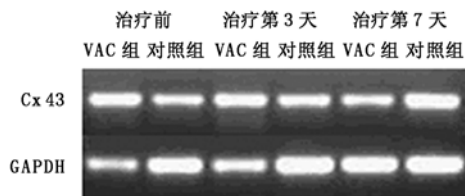


图 3 Cx 43-mRNA RT-PCR 产物电泳条带

表 1 2 组不同时间点 Cx 43 mRNA 相对光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	创面数	治疗前	治疗第 3 天	治疗第 7 天
VAC 组	12	0.88 ± 0.07	0.34 ± 0.04^{ab}	0.35 ± 0.03^{ab}
对照组	12	0.88 ± 0.05	0.60 ± 0.05^a	0.57 ± 0.04^a

注:与组内治疗前比较,^a $P < 0.05$;与对照组相应时间点比较,^b $P < 0.05$

讨 论

创伤修复是一个复杂的病理过程,涉及到细胞与细胞之间及细胞与基质之间的相互作用^[5]。间隙连接(gap junctions)是细胞间连接的一种方式,广泛存在于各类细胞之间,是细胞间信息传递的普遍方式,例如细胞间各类离子、小分子物质和第二信使的传递即是通过 GJIC。GJIC 的作用广泛,包括调节细胞的迁移、增殖、炎症反应和组织细胞的收缩^[6-9]。GJIC 在维持正常组织稳态上发挥着重要的作用,正常细胞间通过 GJIC

反映其功能状态。间隙连接蛋白(gap junction protein / connexin)是构成 GJIC 的客观主体,是跨膜蛋白家族的成员,人类现已发现 21 种间隙连接蛋白,其中与创伤愈合相关的主要为皮肤组织表达的 8 种间隙连接蛋白,而研究最多的则是 Cx 43。Cx 43 主要表达于表皮的基底层和棘层细胞的膜表面,其 C 末端可以和诸如激酶、磷酸化酶、膜受体以及信号转导蛋白等整合在一起,以调控其半衰期及功能活性^[10]。大量研究表明,外源性生长因子如粒细胞集落刺激因子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、表皮生长因子、转化生长因子- β 等,在创伤愈合过程中发挥着主要作用^[3]。外源性生长因子对 Cx 43 的表达和 GJIC 功能的调节与生长因子和膜受体的类型及细胞原始的活化或磷酸化状态有关。Suzuki 等^[11]研究发现,兔角膜上皮创伤发生后,Cx 43 表达下调;而随着伤口的愈合,Cx 43 表达恢复。另有研究发现,在大鼠颈动脉剥脱性损伤后,有多种内皮细胞连接蛋白伴随着动脉内皮的再生而交替表达^[7]。这些研究表明,在创伤愈合的不同时期 GJIC 的功能状态不同。

创伤发生后,组织细胞失去稳态,局部释放的细胞因子和化学因子影响 GJIC 功能及其功能蛋白的表达。有文献报道,前炎症介质脂多糖、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 等均可抑制血管内皮细胞、血管平滑肌细胞等的 GJIC 功能^[12],表明 GJIC 可能是炎症介质主要的作用靶点。炎症介质一向被认为是引起细胞损伤的物质,但是其又可通过刺激细胞凋亡和增殖在组织修复过程中发挥重要的作用。本实验发现,VAC 组治疗后细胞上皮厚度较治疗前有明显增厚,皮下组织内有较多炎症细胞浸润,说明 VAC 可促进急性创面上皮增

生和炎症细胞浸润。

本实验发现,在治疗第 3 和第 7 天,VAC 组和对照组 Cx 43 mRNA 的表达与各自治疗前相比,均呈现明显的下降趋势,且 VAC 组 Cx 43 mRNA 的表达较对照组更低。这与 Suzuki 等^[11]的研究结果是一致的。有研究表明,许多组织不仅只表达一种连接蛋白,而其具体表达哪一种连接蛋白主要受到激素、生长因子和炎症介质的影响^[13-14]。本实验还发现,VAC 组治疗后创面局部浸润较多炎症细胞,我们推测大量炎症细胞所分泌释放的炎症介质和生长因子作用于相应的受体,导致了 Cx 43 在创伤局部的表达下调和 GJIC 的功能障碍,这直接造成细胞和细胞间、细胞和细胞外基质间的信息交换中断,可能通过某一途径使局部具有潜在增殖能力的细胞被激活而进入细胞增殖周期,使其迁移和增殖,最终修复创伤。

综上所述,VAC 可促进急性创面的上皮增生和炎症细胞浸润,下调创伤局部 Cx 43 的表达,可能通过改变 GJIC 的功能状态,进而启动细胞的迁移和增殖,促进创伤的愈合。

参 考 文 献

- [1] Morykwas MJ, Simpson J, Pungler K, et al. Vacuum assisted closure: state of basic research and physiologic foundation. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117: 121-126.
- [2] Argenta LC, Morykwas MJ, Marks MW, et al. Vacuum assisted closure: state of clinic art. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117: 127-142.
- [3] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 2003, 83: 835-870.
- [4] 王维平,邓哲,张宪芬,等.波浪床结合创面封闭负压引流及延期减张缝合治疗Ⅳ期压力性溃疡的临床研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28: 119-122.
- [5] Martin P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997, 276: 75-81.
- [6] Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, et al. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal*, 2009, 7: 4.
- [7] Bannerman P, Nichols W, Puhalla S, et al. Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 605-615.
- [8] Oviedo-Orta E, Hoy T, Evans WH. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin 40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 2000, 99: 578-590.
- [9] Ehrlich HP, Rittenberg T. Differences in the mechanism for high- versus moderate-density fibroblast-populated collagen lattice contraction. *J Cell Physiol*, 2000, 185: 432-439.
- [10] Giepmans BN. Role of connexin 43: interacting proteins at gap junctions. *Adv Cardiol*, 2006, 42: 41-56.
- [11] Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, et al. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 2495-2500.
- [12] Chanson M, Derouette JP, Roth I, et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1711: 197-207.
- [13] Yeh HI, Lai YJ, Chang HM, et al. Multiple connexin expression in regenerating arterial endothelial gap junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 1753-1762.
- [14] Chanson M, Derouette JP, Roth I, et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1711: 197-207.

(修回日期:2011-03-20)

(本文编辑:吴 倩)

· 消息 ·

《中华临床医师杂志(电子版)》2012 年度征稿、征订启事

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管、中华医学会主办,是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊,本刊为半月刊,全年共出刊 24 期,定价 672 元,国内刊号 CN 11-9147/R,邮发代号 80-728,以电子版、纸版导读同时面向全国公开发行人,本刊现已被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

本刊 2012 年上半年刊出重点栏目包括器官移植、腹部内镜、肿瘤介入、生殖医学、白血病防治、风湿病、肾脏疾病、青光眼、白内障、精准手术、外科导航、外科感染、老年医学、围产医学、冠心病介入治疗、癫痫等。欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志!同时也欢迎各位专家教授组织、推荐、撰写重点栏目论文!本刊投稿信箱:100035 北京市 100035-50 信箱;投稿电子邮箱:Lcdoctor@163.com 或 Lcyszz@163.com;联系电话:010-62219211,传真:010-62222508;网址:www.clinicmed.net。