

· 基础研究 ·

常压低温等离子体对小鼠创伤性皮肤溃疡愈合的影响

谭明 陈宏翔 许丽 俞莺 涂亚庭

【摘要】目的 探讨常压低温等离子体(CAP)对 Balb/c 小鼠创伤性皮肤溃疡愈合的影响。**方法** 在 150 只 Balb/c 小鼠背部两侧各造一直径 6 mm 的溃疡模型,将其分为对照组(溃疡自然愈合)、He-Ne 激光组(溃疡接受 He-Ne 激光治疗)及 CAP 组(溃疡接受 CAP 治疗),每组 50 只。术后第 4,7,10,14 天计算各组创面愈合面积百分比;3 组各处死 10 只小鼠,两侧溃疡均被切取进行病检,按同一评分系统评分。术后第 7 天,以免疫组化技术检测溃疡组织中血管内皮生长因子(VEGF)的表达,图像分析系统定量。**结果** 与对照组比较,CAP 组在术后第 7,10 天,平均创面愈合面积百分比明显增大($P < 0.01$);在术后第 7,10,14 天,平均病理评分也明显提高($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。VEGF 的表达水平,CAP 组较对照组、He-Ne 激光组明显提高($P < 0.01$)。**结论** CAP 具有促进创伤性皮肤溃疡愈合的作用,该作用可能与其提升 VEGF 的水平有关。

【关键词】 常压低温等离子体; 皮肤溃疡; 创伤愈合; 血管内皮生长因子

Effect of cold atmospheric plasma on skin ulcer healing TAN Ming*, CHEN Hong-xiang, XU Li, YU Ying, TU Ya-ting. *Department of Cosmetology, Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Wuhan 430070, China
Corresponding author: TU Ya-ting, Email: wslhss@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of cold atmospheric plasma (CAP) on the healing of skin ulcers using Balb/c mice. **Methods** Wounds with a diameter 6 mm were created on each side of the backs of Balb/c mice ($n = 150$) using a punch biotome. The mice were assigned randomly into a control group (wounds healed naturally), a laser group (wounds treated with a He-Ne laser for 10 min daily) and a CAP group (wounds treated with CAP for 10 min daily). Wound healing was evaluated on postoperative days (PODs) 4, 7, 10 and 14 in terms of percent wound closure. Ten mice per group were sacrificed on each of the evaluation days. Both wounds were removed and a histological examination was conducted. A scoring system was used to evaluate the wounds. The expression of vascular endothelial growth factors (VEGFs) in the wounded tissue was detected by using immunohistochemical methods on POD 7. The results were quantified using an HPIAS-1000 system. **Results** Compared with the control group, the average percentage of wound healing was significantly greater in the CAP group on PODs 7 and 10. The average scores on the histological examination were significantly higher in the CAP group on PODs 7, 10 and 14. Compared with the other two groups, the expression of VEGF was up-regulated significantly in the CAP group. **Conclusions** CAP can positively affect the wound healing process. This might be related to the up-regulation of VEGF in the wounded tissues.

【Key words】 Cold atmospheric plasma; Skin ulcers; Wound healing; Vascular endothelial growth factor

常压低温等离子体(cold atmospheric plasma, CAP)技术是当代物理学发展的一项新技术。等离子体是指高度电离的气体云,是气体在加热或强电磁场作用下电离而产生的。而常压低温等离子体,则是在正常大气压下,通过强电磁场作用产生的常压低温等离子体,其温度通常为 20 ~ 40℃。过去的几年

里,以 CAP 处理活体组织,不论是在等离子物理学界,还是医学界,都是一个热门课题。研究显示,低温等离子体不仅具有杀菌功能,还有助于非炎症组织的修复,因此,被认为是有望应用于伤口愈合、皮肤病及口腔疾病治疗的重要工具^[1]。我们在成功地建立了 Balb/c 小鼠创伤性皮肤溃疡模型的基础上,比较 CAP 处理与 CAP 非处理在溃疡愈合过程中的差异,现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.10.006

作者单位:430070 武汉,湖北省妇幼保健院整形美容科(谭明),华中科技大学同济医学院附属协和医院皮肤科(陈宏翔、许丽、俞莺、涂亚庭)

通信作者:涂亚庭,Email:wslhss@126.com

1. 实验动物:6 周龄 Balb/c 雌性小鼠 150 只,体重(20 ± 2)g,由华中科技大学同济医学院动物中心提供,饲养于同济医学院动物学部二级动物实验室,自由饮食,一周后开始实验。

2. 主要仪器:CAP 喷流装置(华中科技大学电气学院低温等离子体实验室),实验中采用脉冲直流电源,放电电压 8000 V,输出频率 8 kHz,脉宽 500 ns,工作气体 He、N₂ 和 O₂;HGL-MH15 He-Ne 激光治疗机(武汉华工激光工程有限责任公司);CM1850 冰冻切片机(德国 LEICA 公司);RM2135ZEN-1200EX 石蜡切片机(德国 LEICA 公司);BH-2 型 Olympus 显微镜(日本 Olympus 公司);HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统(武汉千屏公司)。

3. 药物及试剂:戊巴比妥钠,兔抗小鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多克隆抗体,羊抗兔 IgG、SABC-FITC 免疫组化试剂盒,均为武汉博士德生物工程有限公司产品。

二、实验方法

1. 小鼠皮肤溃疡模型制作:以 6.7 mg/ml 的戊巴比妥钠(0.01 ml/g 体重)经腹腔注射麻醉小鼠后,俯卧位固定,在其背部左右两侧用打孔器各作一直径 6 mm 的皮肤溃疡面,确保深度一致^[2]。

2. 实验分组和处理:将 150 只小鼠完全分为对照组(皮肤溃疡自然愈合)、He-Ne 激光组(皮肤溃疡接受 He-Ne 激光治疗,10 min/d)、CAP 组(皮肤溃疡接受 CAP 治疗,10 min/d),每组 50 只。双侧溃疡面均接受所在组的相应处理,处理于术后第一天开始。每组 50 只小鼠中,10 只用于愈合过程的观察,40 只用于病检和免疫组化检测。

三、观测指标

1. 皮肤溃疡愈合面积百分比:在术后第 4,7,10,14 天由专人在盲态下以游标卡尺测量小鼠溃疡面的两条垂直直径,继以公式 $An(Area_n) = \pi r_1 r_2$ 计算溃疡面积^[2]。最后,通过公式 $\%WC(\text{percent wound closure}) = [(Area_i - Area_n)/Area_i] \times 100$ 计算溃疡愈合面积百分比^[3],Area_i指溃疡初始面积,Area_n指第 n 天溃疡面积。

2. 皮肤溃疡处组织病理评分:在术后第 4,7,10,14 天,每组各处死 10 只小鼠,切取双侧溃疡组织。脱水,石蜡包埋,HE 染色,光镜观察。由专人在盲态下按下述标准评分^[4]:(1)表皮,无表皮 0 分,少许 1 分,完整但极薄 2 分,较厚 3 分,厚 4 分。(2)细胞成分、数量及状态,无或极少 0 分,炎性细胞多而成纤维细胞少 1 分,成纤维细胞较多 2 分,成纤维细胞占绝大多数 3 分,成熟的成纤维细胞 4 分。(3)肉芽组织,无或边缘极少 0 分,仅在边缘且薄 1 分,覆盖创面但薄 2 分,较

厚但不均匀 3 分,厚而均匀 4 分。(4)胶原状态,无 0 分,少许胶原纤维 1 分,中量的胶原纤维 2 分,大量胶原纤维 3 分,成熟的胶原纤维 4 分。(5)血管状态,无 0 分,少许毛细血管 1 分,中量的新生血管 2 分,大量的新生血管 3 分,成熟的血管系统 4 分。5 项评分相加后,进行比较。

3. 皮肤溃疡组织中 VEGF 表达:在术后第 7 天,各组处死的 10 只小鼠中,每只小鼠的溃疡组织取连续 3 张冰冻切片,切片厚度 6 μm 。先后滴加血清封闭液、1:200 兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体(一抗)、1:100 羊抗兔 IgG(二抗)、1:100 的 SABC-FITC,中性树胶封片。应用 HPIAS-1000 型全自动医学彩色图像分析系统进行定量分析,测定 VEGF 的积分光密度值(integral optical density, IOD)。每张切片测量 5 个视野的参数,取平均值。均在相同光强度、相同面积下以同种方法测量。

四、统计学分析

所有数据用 SPSS 13.0 版统计软件处理。数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性用最小显著差法(LSD)检验,方差不齐用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

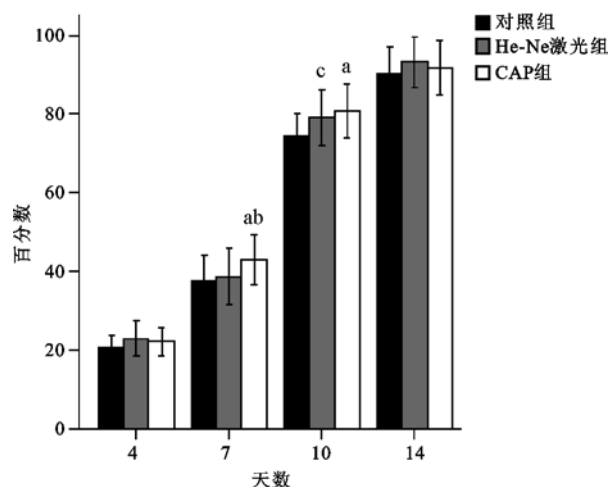
一、CAP 对皮肤溃疡愈合面积的影响

由图 1 可见,术后第 4,14 天,3 组间溃疡愈合面积百分比差异无统计学意义($P > 0.05$);但术后第 7 天,CAP 组的平均溃疡愈合面积百分比为 43.1%,大于对照组的 37.5%及 He-Ne 激光组的 38.6%,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$);术后第 10 天,CAP 组与 He-Ne 激光组的平均愈合百分比分别为 80.8%和 79.1%,均大于对照组的 74.5%,差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),而 CAP 组与 He-Ne 激光组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

二、CAP 对溃疡组织病理评分的影响

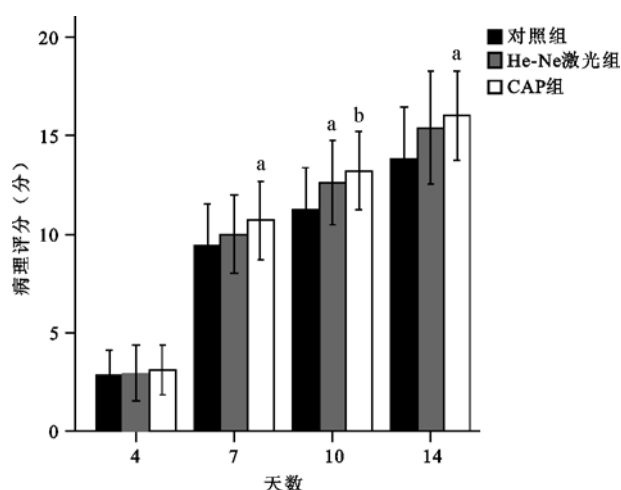
由图 2 可见,术后第 4 天,3 组间溃疡组织评分差异无统计学意义($P > 0.05$);术后第 7 天,CAP 组平均溃疡组织评分为 10.7 分,高于对照组的 9.4 分,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 CAP 组与 He-Ne 激光组之间、He-Ne 激光组与对照组之间,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后第 10 天,CAP 组与 He-Ne 激光组的平均组织评分分别为 13.2 分和 12.6 分,均大于对照组的 11.3 分,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),而 CAP 组与 He-Ne 激光组间差异无统计学意义($P > 0.05$);术后第 14 天,CAP 组的平均评分为 16.0 分,明显高于对照组的 13.8 分,差异有统计学意

义($P < 0.05$), 而 He-Ne 激光组与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:与对照组同期比较,^a $P < 0.01$,^c $P < 0.05$;与 He-Ne 激光组同期比较,^b $P < 0.05$

图 1 溃疡愈合面积百分比(%)

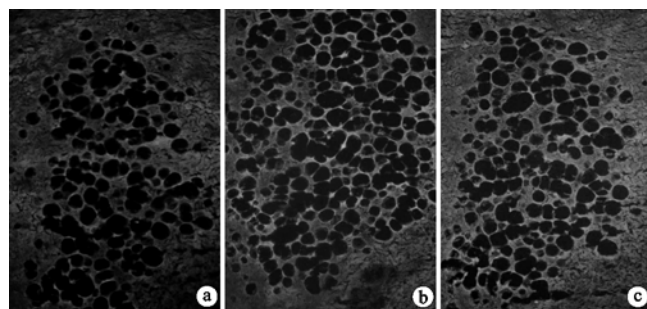


注:与对照组同期比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 2 溃疡组织的病理评分

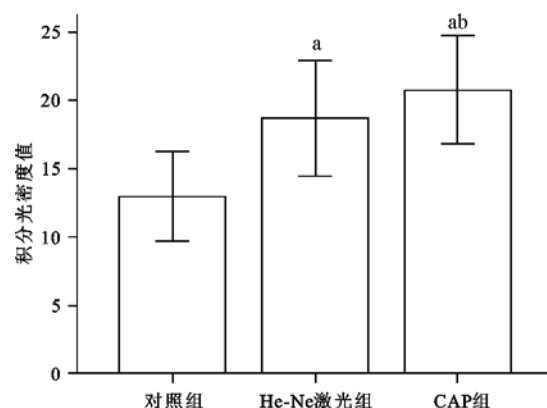
三、CAP 对溃疡组织中 VEGF 表达的影响

免疫组化染色后,在荧光显微镜下,溃疡组织中发出黄绿色荧光的物质即为 VEGF(图 3)。由图 3 可见,在对照组中,溃疡组织中即有 VEGF 的表达,为阳性;而 CAP 组与 He-Ne 激光组中,荧光亮度明显强于对照组,为强阳性。免疫组化半定量分析结果(图 4):CAP 组与 He-Ne 激光组的 IOD 平均值分别为 20.75、18.65,均高于对照组的 12.97,差异有统计学意义($P < 0.01$);且 CAP 组的 IOD 平均值高于 He-Ne 激光组,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。因此,我们可以认为,溃疡组织中 VEGF 的表达,CAP 组 > He-Ne 激光组 > 对照组。



注:a. 对照组;b. He-Ne 激光组;c. CAP 组

图 3 VEGF 在溃疡组织中的表达图像(直接免疫荧光染色, $\times 200$)



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 He-Ne 激光组比较,^b $P < 0.05$

图 4 溃疡组织中 VEGF 的积分光密度值

讨 论

等离子体是高度电离的气体云,在物理学界被看作是继固态、液态、气态后的第四态。等离子体种类很多,分类的方式也很多。根据产生等离子体的气压条件,可分为高压等离子体、低压等离子体和常压等离子体。常压等离子体装置在一定程度上简化了等离子体产生的条件,为其广泛应用奠定了基础。根据等离子体的温度,可分为高温等离子体和低温等离子体。对于高温等离子体,主要是利用其热效应,例如,临床手术科室现已广泛应用的“等离子刀”。而低温等离子体在一定程度上能选择性地作用于活体组织及细胞,且对周围组织无明显损伤,现已被有计划地应用于基因转染^[5]、细胞分离^[6]、促伤口愈合^[7]等。本研究应用的 CAP 喷流装置,是近年来发展的一种新型等离子体设备,有着广阔的应用前景。

创伤愈合是一个复杂、动态的过程,而血管生成是其中重要的一个环节^[8]。除血管生成外,创伤愈合还涉及炎性细胞的聚集、多种细胞的增殖、胶原的形成等^[9]。这些因素又导致了细胞外基质的重建、肉芽组织的形成及创面表皮的形成。研究已证实,在创伤愈合过程中,多种细胞因子、生长因子参与其调节功能,

其中 VEGF 是一种促血管内皮细胞生长的因子,主要作用于内皮细胞,促进血管生成,增加黏附分子及细胞外基质的产生,能有效地促进伤口的愈合^[10]。因此,在本实验中,为研究 CAP 对皮肤溃疡愈合的影响,我们不仅检测了溃疡创面的闭合状态、VEGF 的表达,还采用了 Yu 等^[4]的病理评分标准,对溃疡组织进行了综合评定。结果表明,CAP 明显地提高了溃疡组织中 VEGF 的表达,有效地促进了溃疡创面的闭合,在组织学上,能有力地促进了溃疡组织的修复。总之,创伤性溃疡局部应用低温等离子体处理,有助于皮肤溃疡的愈合。

He-Ne 激光治疗皮肤溃疡,是一种成熟的医疗技术。它利用激光对活组织的光热、光化学等生理作用,具有舒张血管、促进新陈代谢、促进肉芽生长及加速伤口愈合的功效。本研究结果显示,CAP 组与 He-Ne 激光组在病理评分方面,差异并不显著;但在术后第 7 天,CAP 组溃疡愈合面积百分比高于 He-Ne 激光组,故可认为,在溃疡愈合早期,CAP 的促创面表皮化能力很可能优于 He-Ne 激光;另外,溃疡组织中 VEGF 的表达,CAP 组也明显高于 He-Ne 激光组。并且,CAP 还具有 He-Ne 激光所没有的杀菌功能。因此,可以预测,在复杂的自然环境中,CAP 对皮肤溃疡的治疗效果很可能优于 He-Ne 激光。当然,这还需要进一步实验证实。

CAP 作为一种新生事物,其产生原理、功能及作用机制等均尚在研究中。目前,研究认为,它的成分主要包括自由电荷、自由基、光子、激活的原子和分子、稳定的转换产物(NO、O₃等)^[1]。NO 在创伤愈合过程中,作为一种重要的介质调节着细胞的增殖、肉芽组织的形成、胶原的沉积、血管的生成等^[11]。因此,低温等离子体中的 NO,在促皮肤溃疡愈合的过程中,可能扮演着重要的角色。Shekhter 等^[12]研究发现,外源性 NO 能通过伤口或完整的皮肤渗入组织,发挥其相应的调节作用。同时,国外研究还发现,少量的 NO 能通过 HIF-1 和/或 HO-1 调节通路,上调 VEGF 的表达;而大量的 NO 则抑制 VEGF 的表达,具体机制尚未明了^[13]。本研究结果显示,当以含有少量 NO 的 CAP 处理皮肤溃疡时,它通过上调 VEGF 的表达,有效地促进了溃疡的愈合,这与国外学者的研究是相符的。Shekhter 等^[12,14]还认为,外源性 NO 有利于伤口的愈合还与下列机制有关:NO 有直接和间接的杀菌作用;能促进单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、G 蛋白、核因子-κB(nuclear factor-

kappa B, NF-κB) 等活性因子的分泌;能诱导成纤维细胞的增殖;参与调节胶原的合成;影响角质形成细胞的再生,从而促进伤口表皮的形成等。这也部分地解释了常压低温等离子体促进皮肤溃疡愈合的机制。但低温等离子体中其它成分在溃疡愈合过程中,所起的作用和影响,尚不清楚,还有待进一步研究探索。

参 考 文 献

- [1] Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma; charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2008, 36: 1441-1457
- [2] Kawalec JS, Hetherington VJ, Pfennigwerth TC, et al. Effect of a diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Ankle Surg*, 2004, 43: 214-220
- [3] Poonawala T, Levay-young BK, Hebbel RP, et al. Opioids heal ischemic wounds in the rat. *Wound Rep Reg*, 2005, 13: 165-174.
- [4] Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med*, 1997, 20: 56-63.
- [5] Coulombe S, Leveille V, Yonson S, et al. Miniature atmospheric pressure glow discharge torch (APGD-t) for local biomedical applications. *Pure Appl Chem*, 2006, 78: 1147-1156.
- [6] Kieft IE, Kurdi M, Stoffels E. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2006, 34: 1331-1336.
- [7] Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, et al. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process*, 2006, 26: 425-442.
- [8] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, 386: 671-674
- [9] Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations// Clark RAF, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 1996: 3-50.
- [10] Efron PA, Moldawer LL. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. *J Burn Care Rehabil*, 2004, 25: 149-160.
- [11] Howdieshell TR, Webb WL, Sathyanarayana, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase results in reductions in wound vascular endothelial growth factor expression, granulation tissue formation, and local perfusion. *Surgery*, 2003, 133: 528-537.
- [12] Shekhter AB, Serezhnikov VA, Rudenko TG, et al. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric Oxide: Biol Chem*, 2005, 12: 210-219.
- [13] Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50: 49-59.
- [14] Shekhter AB, Kabisov RK, Pekshev AV, et al. Experimental and clinical validation of plasmadynamic therapy of wounds with nitric oxide. *Bull Exp Biol Med*, 1998, 126: 829-834.

(修回日期: 2010-01-22)

(本文编辑: 松 明)