

本文引文格式:兰海生,李明尚,黄许森,等.皮肤再生医疗技术对大鼠慢性难愈合创面组织中 BMP-4 表达的影响[J].右江民族医学院学报,2020,42(5):543-546.

【论著与临床报道】

皮肤再生医疗技术对大鼠慢性难愈合创面组织中 BMP-4 表达的影响

兰海生¹,李明尚²,黄许森¹,黄海舸¹,岑小宁¹,吕建生¹,钟丽华²

(1. 右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 动态观察皮肤再生医疗技术(moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment, MEBT/MEBO)对大鼠慢性难愈合创面组织中 BMP-4 表达的影响。方法 通过随机数字表将 90 只 SPF 雄性大鼠随机分为 MEBO 组、阳性药组(贝复济组)、模型组、急创组和空白组,构建大鼠慢性难愈合创面模型后,MEBO 组创面局部涂用湿润烧伤膏,贝复济组创面局部涂用贝复济,模型组和急创组局部涂用生理盐水,于治疗后第 3 d、7 d、14 d 应用 Western blotting 检测大鼠创面组织中 BMP-4 表达情况,于治疗后第 14 d,应用 Masson 染色,观察创面局部病理学形态。结果 ①除空白组外,其余各组 BMP-4 的表达水平均呈先升高后降低的趋势($P < 0.01$),同一时间,MEBO 组及阳性药组创面组织中 BMP-4 的表达水平均高于模型组($P < 0.05$);②MEBO 组及阳性药组创面组织病理学形态优于模型组。结论 MEBT/MEBO 能有效影响大鼠创面组织中 BMP-4 表达水平,从而影响慢性难愈合创面修复的质量。

关键词:皮肤再生医疗技术;BMP-4;大鼠;慢性难愈合创面;修复

中图分类号:R632 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2020)05-0543-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.05.002

Effects of MEBT/MEBO on the expression of BMP-4 in chronic refractory wound tissues of rats

Lan Haisheng¹, Li Mingshang², Huang Xusen¹, Huang Haige¹,
Cen Xiaoning¹, Lyu Jiansheng¹, Zhong Lihua²

(1. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities,
Baise 533000, Guangxi, China; 2. Youjiang Medical University for
Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To dynamically observe the effect of moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment (MEBT/MEBO) on the expression of BMP-4 in chronic refractory wound tissues of rats.

Methods A total of 90 SPF male rats were randomly divided into the MEBO group, the positive drug group (rb-bFGF) group, the model group, the acute wound group and the blank group by random number table. After the establishment of chronic refractory wound models in rats, wounds in MEBO group were locally coated with MEBO, rb-bFGF Group with rb-bFGF, and the model group and acute wound group with normal saline. On the 3rd, 7th and 14th day after treatment, Western blotting was used to detect the expression of BMP-4 in wound tissues of rats. On the 14th day after treatment, Masson staining was applied and the local pathological morphology of the wound was observed. **Results** ① Except for that of the blank group, the expressions of BMP-4 in other groups showed a trend of increasing at first and then decreasing ($P < 0.01$). At the same time, the expressions of BMP-4 in wound tissue of the MEBO group and the positive drug group were higher than that of the model group ($P < 0.05$). ② The histopathological morphology of wounds of the MEBO group and the pos-

基金项目:国家自然科学基金(81860852);广西自然科学基金(2017GXNSFAA198321)

第一作者简介:兰海生(1993-),男,硕士,住院医师,研究方向:胃肠外科疾病基础与临床研究, E-mail: yyfylys@qq.com

通讯作者简介:黄许森(1971-),男,学士,教授,硕士研究生导师,研究方向:胃肠肿瘤、创面修复, E-mail: hxsfy@163.com

itive drug group was superior to that of the model group. **Conclusion** MEBT/MEBO can effectively affect the expression of BMP-4 in wound tissues of rats, thus improving the repair quality of chronic refractory wound.

Key words: moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment; BMP-4; rat; chronic refractory wound; repair

皮肤再生医疗技术(moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment,MEBT/MEBO)广泛应用于临床治疗慢性难愈合创面中取得满意疗效,同时与其他的治疗方法比较还有操作简单,价格低廉等特点,在临床上得到了广大医务工作者的认可^[1]。近年来,随着对MEBT/MEBO作用机制研究的不断深入,发现MEBT/MEBO是通过多种通路、因子共同调控的创面修复与再生,但具体机制仍未能完全揭示^[2]。骨形成蛋白4(BMP-4)作为骨形成蛋白家族一员,对细胞增殖、黏附和分化、血管形成、器官纤维化、骨骼发育和骨形成至关重要,而细胞的增殖和分化、血管的形成、纤维的沉积均能有效影响创面修复^[2-4]。因此,本研究通过动态监测大鼠慢性难愈合创面组织中BMP-4的动态的变化,明确其对创面修复的影响,为进一步揭示MEBT/MEBO在创面修复中的作用机制奠定一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠90只,购于长沙市天勤生物技术有限公司,年龄12~14周,体重240~270g,在SPF级动物实验室内进行饲养、造模、取标本。本研究经右江民族医学院实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 湿润烧伤膏:国药准字Z20000004,汕头市美宝制药有限公司生产;贝复济:国药准字19991021,珠海亿胜生物制药有限公司生产;醋酸氢化可的松注射液:国药准字H31021290,上海通用药业股份有限公司生产;水合氯醛:CAS登记号302-17-0,泰兴市豪申化工贸易有限公司生产;BMP-4一抗:Anti-BMP4 Antibody,美国博士德,稀释比例:1:1000;二抗:山羊抗兔的二抗,北京中杉,货号ZB2301,稀释比例:1:3000。

1.1.3 主要器材 精确电子天平(北京赛多利斯)、Bio-rad蛋白质电泳系统(美国伯乐公司)、迷你转印电泳槽型(美国伯乐公司)、THZ-C恒温振荡摇床(培英)、酶标仪(美国赛默飞)、JS-680B全自动凝胶成像系统(培清)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 进行适应性喂养后,将90只大鼠随机分为5组:慢性难愈合创面组(模型组)、MEBO

润烧伤膏组(MEBO组)、阳性药组(贝复济组)、急创组和空白组,每组18只大鼠。

1.2.2 动物模型的建立 空白组仅剃除皮肤毛发不作缺损创面模型,其余4组参照付小兵院士^[5]方法制作创面模型,腹腔注射水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉,麻醉成功后进行背部备皮,用直径为1.5 cm的图章在脊柱两侧进行标记,予碘伏进行皮肤消毒,空白组仅行备皮不做皮肤缺损创面,其余4组分别于脊柱两侧用外科组织剪刀做深达筋膜层的全层皮肤缺损创面(一只大鼠做两个创面模型),创面缺损模型建立后,在模型组、阳性药组、MEBO组大鼠后肢进行肌肉注射醋酸氢化可的松(8 mg/100 g),而急创组未注射氢化可的松,创面再次与碘伏进行消毒,空白组及急创组局部涂用生理盐水,模型组创面局部涂生理盐水,MEBO组局部涂美宝湿润烧伤膏,阳性药组局部涂贝复济,予无菌干纱布包扎固定,每天换药2次^[6]。

1.2.3 标本采集 在干预后的第3 d、7 d、14 d,每组随机选取6只大鼠(共12个模型),用眼科剪刀取创面组织,10%福尔马林固定部分组织,余暂时存于液氮罐,标本采集结束后,转移至-80℃的冰箱冷藏备用。

1.2.4 Western blotting技术检测BMP-4蛋白表达水平 精确电子天平称取100 mg大鼠创面组织,剪碎放入到EP管中,每100 mg组织加入1 ml组织裂解液,将EP管至于冰面上,予匀浆机将标本搅碎,予4℃离心机在15000 r/min下进行离心20 min,取上清分装,按照碧云天试剂盒说明书检测蛋白含量,检测完后进行配平,最后加入Loading Buffer并将蛋白变性后保存备用;备SDS-PAGE凝胶后将提取的蛋白上样,置于90V恒压下进行电泳30 min,继续于120 V电压下电泳,直至条带均匀跑开,在300 mA恒流下进行半干转60 min,室温摇床封闭1 h, TBST洗膜3次,每次5 min,并于4℃摇床内孵育一抗过夜;一抗孵育后,洗膜3次(同前),二抗室温孵育1.5 h;洗膜3次(同前),将配置发光液均匀滴至PVDF膜后进行曝光,并保持条带图;最后用Image J软件进行灰度分析,样本蛋白含量=目的条带积分吸光度值/内参条带积分吸光度值^[7]。

1.2.5 Masson染色检测创面纤维化情况 创面组织固定后,将组织置入乙醇中脱水,脱水后进行石蜡包埋,使用Masson染色试剂盒进行染色,Weigert苏木

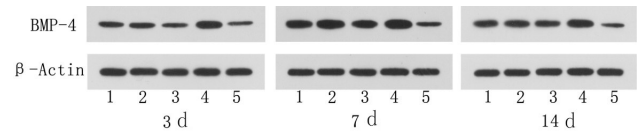
精液染核 6 min,分化液分化 10 s,Masson 蓝液染色 4 min,水洗,丽春红品红染液染色 7 min,1%磷钼酸溶液洗 2 min,苯胺蓝染色液复染 1 min,乙醇脱水,透明剂透明,中性树脂封片,然后镜下观察创面组织纤维化情况。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内不同时项对比采用重复测量方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMP-4 蛋白表达情况 对不同时间的蛋白表达量进行重复测量方差分析,组间干预因素及观察时间之间差异均有统计学意义,以时间为主效应($F = 272.683, P = 0.001$),以干预方法为主效应($F = 447.153, P = 0.001$),两者交互作用($F = 35.436, P = 0.001$),除了空白组外,其余 4 组 BMP-4 表达水平均成先升高后降低趋势($P < 0.01$)。在造模后第

3 d,BMP-4 表达水平升高,其中急创组达到峰值最高,其次为阳性药组、MEBO 组、模型组、空白组。在造模后第 7 d,BMP-4 表达量达到观察时项的最高峰,其中急创组达到峰值最高,其次为阳性药组和 MEBO 组、模型组、空白组,阳性药组和 MEBO 组表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。在造模后第 14 d,BMP-4 表达水平低于第 7 d($P < 0.05$),其中表达量急创组最高,其次为阳性药组和 MEBO 组、模型组、空白组,阳性药组和 MEBO 组表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1、表 1。



注:1 为 MEBO 组,2 为阳性药组,3 为模型组,4 为急创组,5 为空白组

图 1 5 组大鼠 BMP-4 蛋白表达条带图

表 1 5 组大鼠创面组织中 BMP-4 表达水平

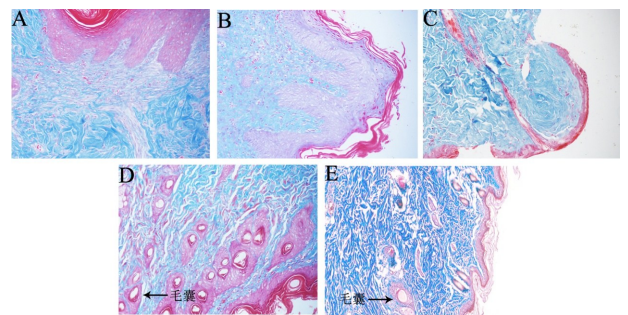
组别	动物数	3 d	7 d	14 d	F	P
MEBO 组	12	0.486 ± 0.071 ^{ab}	0.874 ± 0.089 ^{ac}	0.606 ± 0.036 ^{ad}	101.615	<0.001
阳性药组	12	0.559 ± 0.055 ^a	0.934 ± 0.061 ^{ac}	0.627 ± 0.037 ^{ad}	175.066	<0.001
模型组	12	0.407 ± 0.028 ^b	0.703 ± 0.075 ^{bc}	0.598 ± 0.032 ^d	110.055	<0.001
急创组	12	0.816 ± 0.049 ^{ab}	1.081 ± 0.106 ^{abc}	0.763 ± 0.035 ^{ad}	69.882	<0.001
空白组	12	0.322 ± 0.026 ^{ab}	0.351 ± 0.027 ^{ab}	0.316 ± 0.032 ^a	5.302	0.010
F		179.445	160.005	283.300		
P		<0.001	<0.001	<0.001		

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与模型组对比,a: $P < 0.05$;与阳性药组对比,b: $P < 0.05$;与第 3 d 对比,c: $P < 0.05$;与第 7 d 对比,d: $P < 0.05$ 。

2.2 创面组织 Masson 染色结果 在创面形成的第 14 d,MEBO 组及阳性药组可见完整再生皮爬覆,局部创面胶原纤维排列相对整齐;模型组胶原纤维排列紊乱,局部形成瘢痕组织;急创组局部创面胶原纤维排列疏松、整齐,可见毛囊,血管的再生;空白组见完整上皮组织,创面胶原纤维排列疏松、整齐,创面可见毛囊存在。

3 讨论

慢性难愈合创面是外科常见疾病之一,因其治疗周期长、难度大以及费用高,往往造成患者巨大负担^[2]。创伤后的修复是一个复杂的愈合环境,成纤维细胞具有强大的修复和再生潜力,在细胞因子环境中相互作用,影响这些细胞的功能和分化,导致一系列的愈合反应,适当的纤维化对修复创伤组织有积极意义,而过度的细胞外基质沉积往往造成瘢痕愈合^[8]。骨形成蛋白(BMP)属于转化生长因子- β (TGF- β)超家族的一类多功能的分泌型信号分子,其中以 BMP-2、



注:A 为 MEBO 组,B 为阳性药组,C 为模型组,D 为急创组,E 为空白组

图 2 5 组大鼠第 14 d 创面组织 Masson 染色图($\times 200$)

BMP-4、BMP-6、BMP-7 的功能最具有代表性,BMP 相关信号通路在维持血管内稳态、调控组织纤维沉积中发挥重要作用^[3,9-11]。在本研究中,在创面形成后的第 3 d,BMP-4 的表达量逐渐升高,其中以急创组表达量最高,其次为阳性药组、MEBO 组、模型组,其原因可

能是在创面形成后,机体需要成纤维沉积促进纤维化,促进创面修复,故 BMP-4 表达较空白组升高;BMP-4 表达量在急创组最高,可能与急创组大鼠未注射氢化可的松,局部呈急性创面,机体修复能力较强有关,在创面形成的第 7 d,BMP-4 表达水平持续升高,在创面形成的第 14 d,BMP-4 表达水平较第 7 d 下降,但仍高于正常,可能与创面形成后期,局部创面修复趋于完善,故 BMP-4 表达逐渐下降。在同一时间对比中,阳性药组和 MEBO 组表达均高于模型组,结合 MEBO/MEBT 目前已有的机制研究,其原因可能是,慢性创面组局部修复能力低下,甚至出现修复停滞状态,而 MEBO 及贝复济能有效促进创面修复^[12]。

在慢性难愈合创面愈合过程中,TGF- β /Smad 信号通路与创面修复及病理性瘢痕的形成密切相关,TGF- β 与 BMP 家族密切相关,有研究表明,TGF- β 1 能够促进细胞的增殖而 BMP-4 抑制细胞的增殖,两者间存在拮抗关系,同时 BMP-4 也能诱导 AKT 活化,增加细胞表面的 TGF- β 受体水平,导致 Smads 的自分泌活化和基因表达增强^[3,9-10]。唐乾利等^[13]研究表明,MEBO/MEBT 在创面愈合早期可通过激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路,促进创面损伤修复,而在愈合晚期则抑制该信号通路的活化,控制创面组织过度增生,有效改善慢性创面肉芽组织中成纤维细胞形态、毛细血管新生情况,促进创面愈合。本研究 Masson 染色结果显示,贝复济组及 MEBO 组创面组织愈合病理学形态优于模型组,提示 BMP-4 有可能影响创面纤维沉积和组织重塑。结合目前已有 MEBO/MEBT 相关机制研究;MEBO /MEBT 早期能有效上调 BMP-4、BMP-7、P-AKT 表达水平,下调 TGF- β 1、P-Smad3 表达水平,有效改善慢性创面肉芽组织中成纤维细胞形态、毛细血管新生情况,促进创面脂肪细胞的生长,从而有效促进创面的修复和再生^[3,13-16]。因此,MEBO 可能是通过 TGF/Smad 信号通路及 BMP/Smad 信号通路共同调控创面修复和再生。

综上所述,本研究结果显示,MEBO/MEBT 能有效影响 BMP-4 在大鼠慢性难愈合创面组织中的表达水平,BMP-4 的动态表达也在影响创面修复的结局,但其具体机制仍需下一步研究证实。

参考文献:

- [1] 唐乾利,李杰辉,贺全勇,等. 皮肤再生医疗技术在创面修复中的基础与临床应用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2015,37(1):1-4.
- [2] 黄汉基,唐乾利. 皮肤再生医疗技术治疗压疮的研究进展[J]. 中国烧伤创疡杂志,2019,31(6):387-390.

- [3] 任周新,余海滨,梅晓峰,等. TGF- β 1/BMP-4 诱导肺动脉血管平滑肌细胞增殖及橙皮素、芍药苷的干预[J]. 中华中医药学刊,2018,36(6):1339-1342.
- [4] 张心月,张丹,李慧,等. 丹参、人参、连翘、麦冬对肺纤维化模型大鼠肺组织中 BMP-4 表达的影响[J]. 山东中医杂志,2019,38(11):1062-1066,1074.
- [5] 赵京禹,付小兵,雷永红,等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备[J]. 感染、炎症、修复,2008,9(1):64.
- [6] 沈道修,顾月芳,任晓英. 一种研究中草药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J]. 中西医结合杂志,1983,3(1):49-50.
- [7] 兰海生,黄许森,单云龙,等. 湿润烧伤膏对大鼠慢性难愈合创面组织中骨形成蛋白 7 表达的影响[J]. 右江医学,2019,47(9):653-657.
- [8] Limandjaja GC, Van Den Broek LJ, Waaijman T, et al. Reconstructed human keloid models show heterogeneity within keloid scars [J]. Arch Dermatol Res, 2018, 310(10):815-826.
- [9] Chen MZ, Wan B, Zhu SH, et al. Geranylgeranyl diphosphate synthase deficiency aggravates lung fibrosis in mice by modulating TGF- β 1/BMP-4 signaling [J]. Biol. Chem, 2019, 400(12):1617-1627.
- [10] Cervantes-Garcia D, Cuellar-Juarez A, Borrego-Soto G, et al. Adenoviral-bone morphogenetic protein-7 and/or doxazosin therapies promote the reversion of fibrosis/cirrhosis in a cirrhotic hamster model[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(6):9431-9440.
- [11] Muñoz-Félix JM, González-Núñez M, Martínez-Salgado C, et al. TGF- β /BMP proteins as therapeutic targets in renal fibrosis. Where have we arrived after 25 years of trials and tribulations? [J]. Pharmacol Ther, 2015, 156:44-58.
- [12] 舒清峰,陈端凯,唐乾利,等. MEBT/MEBO 对慢性难愈合创面组织中 CK10 表达水平的影响[J]. 中国烧伤创疡杂志,2019,31(2):77-86.
- [13] 唐乾利,李利青,李辉,等. MEBT/MEBO 对大鼠糖尿病足创面组织 TGF- β 1、Smad3、P-smad3 表达及形态学结构的影响[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(3):283-288.
- [14] 李利青,林也,葛斌,等. 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏干预 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进体表慢性难愈合创面修复的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2019,39(5):583-590.
- [15] 葛斌,李利青,唐乾利,等. 皮肤再生医疗技术对大鼠慢性难愈合创面组织中 VEGFR-2 表达的动态调控作用[J]. 中国烧伤创疡杂志,2017,29(6):399-405.
- [16] 冯波,王聪,冯志. 皮肤原位再生医疗技术治疗大鼠糖尿病足溃疡创面的效果及作用机制[J]. 中国老年学杂志,2019,39(1):181-184.

收稿日期:2020-05-30;修回日期:2020-07-28