

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

葛 斌 李利青 唐乾利 曾鸿孟 王 澍 单云龙 陈端凯

【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 VEGFR-2 表达水平的影响, 探讨 MEBT/MEBO 促进创面愈合的分子学机制。**方法** 按照随机数表法将 90 只健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为空白组 (18 只)、对照组 (18 只)、模型组 (18 只)、MEBO 组 (18 只) 和贝复济组 (18 只), 其中空白组仅做备皮处理, 对照组做全层皮肤缺损创面模型, 模型组、MEBO 组和贝复济组做慢性难愈合创面模型; 模型建立后, 空白组大鼠备皮后皮肤予以生理盐水纱布湿敷, 对照组及模型组大鼠创面予以生理盐水纱布覆盖治疗, MEBO 组大鼠创面予以湿润烧伤膏 (moist exposed burn ointment, MEBO) 药纱覆盖治疗, 贝复济组大鼠创面予以贝复济药纱覆盖治疗, 并分别于治疗后第 3、7、14 天检测、对比各组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 的表达水平。**结果** 创面处理后第 3、7、14 天, 空白组大鼠皮肤组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平均无明显变化, P 均 >0.05 , 差异无统计学意义; 而对照组、模型组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平变化均较明显, P 均 <0.05 , 差异具有统计学意义, 其中对照组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平均呈先升高后降低的趋势, 而模型组则呈递增趋势; 治疗第 7 天, MEBO 组大鼠创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平均高于其他各组, P 均 <0.05 , 差异具有统计学意义。**结论** MEBT/MEBO 可通过上调创面组织中 VEGFR-2 的表达水平, 促进创面愈合。

体表慢性难愈合创面是指由多种原因引起的治疗 1 个月以上仍未愈合且无明显愈合倾向的创面, 此类创面不仅会降低患者的生存质量、增加患者的经济负担, 而且若长期不愈还存在癌变风险^[1-2]。目前, 西医治疗慢性难愈合创面主要以手术、物理疗法 (氧疗、紫外线疗法等)、干细胞及各种细胞生长因子疗法为主, 但却存在技术不成熟、疗效不确切以及价格高昂等弊端, 难以广泛推广应用, 而中医在治疗慢性难愈合创面方面经验丰富, 且取得了一定的临床疗效。近年来, 皮肤再生医疗技术 (moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment, MEBT/MEBO) 作为一种中医外治疗法, 不仅在慢性难愈合创面的基础研究中

取得了较大进展^[3-6]，在其治疗中也取得了显著疗效，获得了广大医务工作者的认可，被广泛应用于临床^[7-8]，但 MEBT/MEBO 治疗慢性难愈合创面的具体机制却尚不完全清楚，仍需进一步深入研究探讨，遂笔者于本研究中观察了 MEBT/MEBO 对大鼠慢性难愈合创面组织中 VEGFR-2 的动态调控作用，以期进一步研究 VEGFR-2 在慢性难愈合创面修复中的作用机理，揭示 MEBT/MEBO 促进慢性难愈合创面修复的部分分子学机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠 90 只（右江民族医学院动物实验中心提供），年龄 12~14 周，体重 200~245 g，均在温度为 20~25℃，湿度为 55%~75%，通风良好的室内饲养。本研究经实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 湿润烧伤膏（moist exposed burn ointment, MEBO）：汕头市美宝制药有限公司生产，国药准字 Z20000004；贝复济（外用重组牛碱性成纤维细胞生长因子，rb-bFGF）：珠海亿胜生物制药有限公司生产，国药准字 S19991021；水合氯醛：泰兴市豪申化工贸易有限公司生产，CAS 登记号 302-17-0；醋酸氢化可的松注射液：上海通用药业股份有限公司生产，国药准字 H31021290；VEGFR-2 抗体、山羊抗兔二抗及山羊抗小鼠二抗：美国 Cell Signaling Technology 公司生产；TaKaRa MiniBEST UniversalRNA Extraction Kit、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser：日本 TaKaRa 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型建立 按照随机数表法将 90 只大鼠随机分为空白组（18 只）、对照组（18 只）、模型组（18 只）、MEBO 组（18 只）和贝复济组（18 只），其中，空白组大鼠仅做背部备皮处理；对照组大鼠予以 7%水合氯醛腹腔注射麻醉（0.3 mL/100 g）及背部备皮后，用直径为 1.5 cm 的图章标记，并在无菌条件下沿标记做深达筋膜层的全层皮肤缺损创面；模型组、MEBO 组和贝复济组大鼠按对照组的处理方法建立全层皮肤缺损创面后，立即注射醋酸氢化可的松注射液（8 mg/100 g），使其形成慢性难愈合创面^[9-10]。

1.2.2 创面处理 模型建立后，空白组大鼠备皮区皮肤及对照组、模型组大鼠创面予以 1/5000 呋喃西林液消毒后，依次覆盖 2 层生理盐水纱布及 2 层无菌干纱布，包扎固定，每天换药 2 次；MEBO 组大鼠创面予以 1/5000 呋喃西林液消毒后，依次覆盖 2 层 MEBO 药纱（200 mg/cm²）及 2 层无菌干纱布，包扎固定，每天换药 2 次；贝复济组大鼠创面予以 1/5000 呋喃西林液消毒后，依次覆盖 2 层贝复济药纱（60 U/cm²）及 2 层无菌干纱布，包扎固定，每天换药 2 次。

1.2.3 标本采集 分别于创面处理后第 3、7、14 天，从每组随机选取 6 只大鼠，取相同部位组织暂时存放于液氮中，并置于-80℃的冰箱内储存备用。

1.3 标本检测

1.3.1 Western blotting 技术检测 VEGFR-2 蛋白表达水平 待所有标本收集完毕后，用匀浆机将标本搅碎，提取组织蛋白，检测蛋白含量，并将蛋白变性后保存备用；将提取的蛋白上样置于 80 V 恒压下进行电泳，待条带均匀后，在 300 mA 恒流下进行半干转 40~60 min，随即室温摇床封闭，并于 4℃摇床内孵育一抗过夜；一抗孵育后，洗膜，并加二抗室温孵育 1.5 h；二抗孵育后，洗膜，并于暗室内曝光；最后用 Image J 图像分析软件对检测结果进行灰度分析。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。

1.3.2 Real-time PCR 技术检测 VEGFR-2 mRNA 表达水平 待所有标本收集完毕后，按照 TaKaRa 试剂盒使用说明提取 RNA、制备 cDNA，并以 cDNA 为模板进行扩增及检测，将检测所得的 CT 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其扩增表达率。其中，VEGFR-2 引物序列为：上游 5'-GGACAGCA TCACCAGCAGTCA-3'，下游 5'-TGAGATGCTCCAAGGTCAGGAA-3'；GAPDH 为内参，其引物序列为：上游 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3R，下游 5'-ATGGTGGTGAAGACG CCAGTA-3'。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件对所得数据进行统计学处理，其中计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，多样本间比较采用单因素方差分析，组间比较采用 SNK-q 检验，均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGFR-2 蛋白表达水平

创面处理后第 3、7、14 天，空白组大鼠皮肤组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平无明显变化， $P > 0.05$ ，差异无统计学意义；对照组、模型组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平变化均较明显， P 均 < 0.05 ，差异具有统计学意义，其中对照组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平均呈先升高后降低的趋势，而模型组则呈递增趋势（表 1、图 1-2）。

创面处理后第 3 天，各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平对比，空白组 $>$ 贝复济组 = MEBO 组 = 对照组 $>$ 模型组，各组组间两两对比，除对照组、MEBO 组及贝复济组组间两两对比， $P > 0.05$ ，差异无统计学意义外，其余各组组间两两对比， P 均 < 0.05 ，差异具有统计学意义；创面处理后第 7 天，各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平对比，

贝复济组=MEBO 组>对照组>空白组>模型组，各组组间两两对比，除对照组、MEBO 组及贝复济组组间两两对比， $P>0.05$ ，差异无统计学意义外，其余各组组间两两对比， P 均 <0.05 ，差异具有统计学意义；创面处理后第 14 天，各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平对比，贝复济组=MEBO 组=对照组=空白组>模型组，各组组间两两对比，除模型组与空白组、模型组与 MEBO 组对比， P 均 <0.05 ，差异具有统计学意义外，其余各组组间两两对比， P 均 >0.05 ，差异无统计学意义（表 1、图 1-2）。

表 1 各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平对比（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	例数	时间点			F 值	P 值
		第 3 天	第 7 天	第 14 天		
MEBO 组	6	1.55±0.03 ^{bcdh}	2.57±0.17 ^{acfh}	1.85±0.08 ^{abf}	139.63	0.000
贝复济组	6	1.54±0.11 ^{bcdh}	2.59±0.12 ^{acfh}	1.88±0.13 ^{ab}	119.05	0.000
模型组	6	0.65±0.15 ^{bcddeg}	1.50±0.04 ^{acdeg}	1.71±0.13 ^{abdh}	138.31	0.000
对照组	6	1.41±0.08 ^{bcdh}	2.50±0.35 ^{acfh}	1.86±0.08 ^{abdf}	39.72	0.000
空白组	6	1.91±0.05 ^{defg}	1.87±0.08 ^{defg}	1.90±0.04 ^f	0.04	0.9637
F 值	-	26.45	42.07	3.52	-	-
P 值	-	0.000	0.000	0.0208	-	-

注：各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平组内对比，其中与第 3 天对比，^a $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与第 7 天对比，^b $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与第 14 天对比，^c $P<0.05$ ，差异具有统计学意义。各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白表达水平组间对比，其中与 MEBO 组对比，^d $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与贝复济组对比，^e $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与模型组对比，^f $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与对照组对比，^g $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与空白组对比，^h $P<0.05$ ，差异具有统计学意义

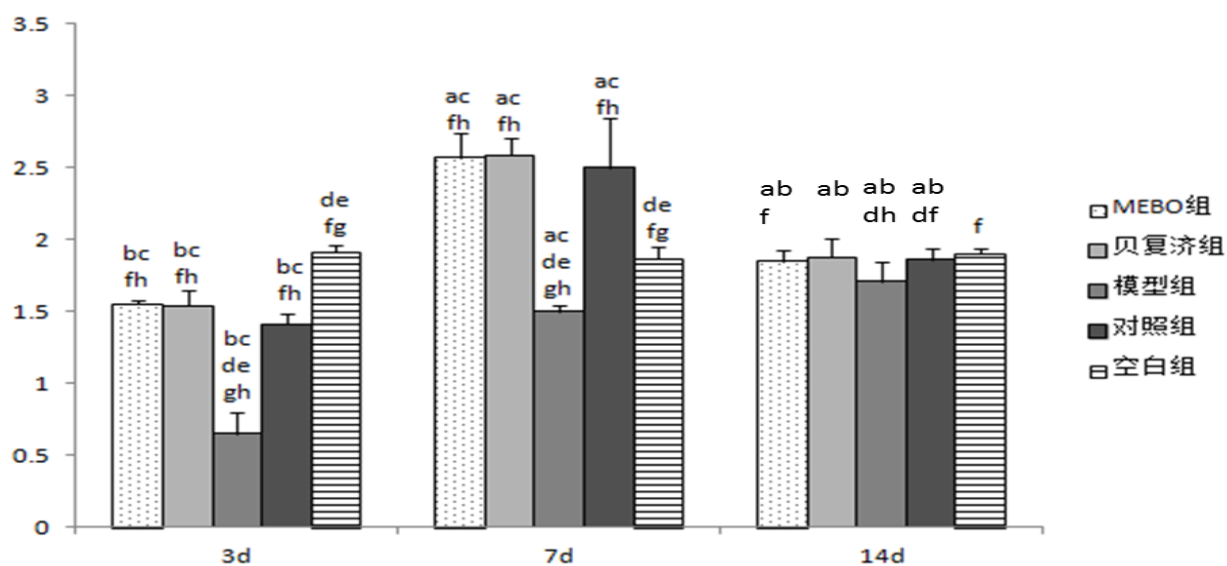


图1 各组大鼠皮肤或创面组织中VEGFR-2蛋白条带灰度值示意图

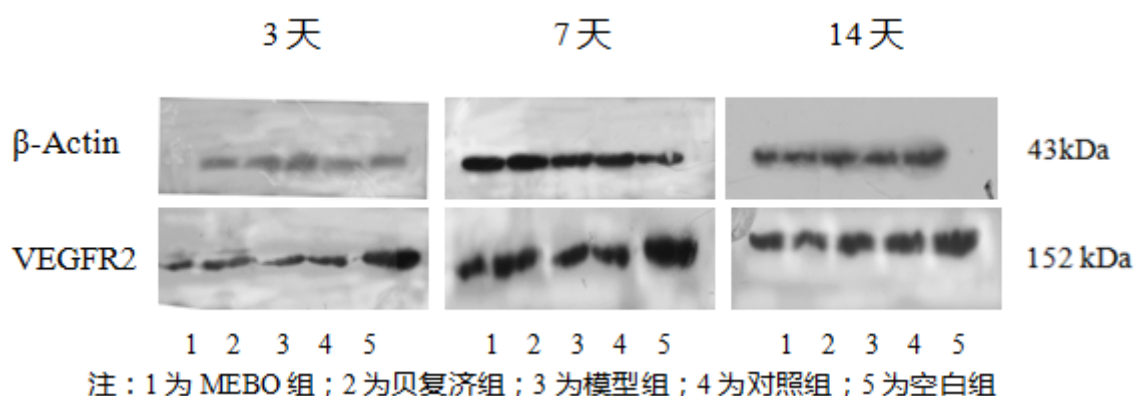


图2 各组大鼠皮肤或创面组织中VEGFR-2蛋白条带图

2.2 VEGFR-2 mRNA 表达水平

创面处理后第 3、7、14 天，空白组大鼠皮肤组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平无明显变化， $P>0.05$ ，差异无统计学意义；对照组、模型组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平变化均较明显， P 均 <0.05 ，差异具有统计学意义，其中对照组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平均呈先升高后降低的趋势，而模型组则呈递增趋势（表 2）。

创面处理后第 3 天，各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平对比，对照组 $>$ 贝复济组=MEBO 组 $>$ 空白组 $>$ 模型组，各组组间两两对比，除 MEBO 组与贝复济组、模型组与空白组组间对比， $P>0.05$ ，差异无统计学意义外，其余各组组间两两对比， P 均 <0.05 ，差

异具有统计学意义；创面处理后第 7 天，各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平对比，对照组>贝复济组>MEBO 组>模型组>空白组，各组组间两两对比，除模型组与空白组对比， $P>0.05$ ，差异无统计学意义外，其余各组组间两两对比， P 均 <0.05 ，差异具有统计学意义；创面处理后第 14 天，各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平对比，贝复济组=MEBO 组>模型组>对照组>空白组，除 MEBO 组与贝复济组对比， $P>0.05$ ，差异无统计学意义外，其余各组组间两两对比， P 均 <0.05 ，差异具有统计学意义（表 2、图 3）。

表 2 各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平对比（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	例数	时间点			F 值	P 值
		第 3 天	第 7 天	第 14 天		
MEBO 组	6	2.16±0.03 ^{bcfgh}	7.43±0.30 ^{acefgh}	3.05±0.18 ^{abfgh}	1161.79	0.000
贝复济组	6	2.05±0.35 ^{bcfgh}	7.97±0.19 ^{acdfgh}	3.12±0.39 ^{abfgh}	576.57	0.000
模型组	6	0.87±0.04 ^{bcdeg}	1.29±0.22 ^{acdeg}	2.57±0.28 ^{abdeg}	109.93	0.000
对照组	6	2.84±0.22 ^{bcdefh}	8.60±0.30 ^{acdefh}	1.46±0.08 ^{abdefh}	1783.04	0.000
空白组	6	1 ^{deg}	1 ^{deg}	1 ^{defg}	-	-
F 值	-	120.13	1619.57	102.64	-	-
P 值	-	0.000	0.000	0.000	-	-

注：各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平组内对比，其中与第 3 天对比，^a $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与第 7 天对比，^b $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与第 14 天对比，^c $P<0.05$ ，差异具有统计学意义。各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平组间对比，其中与 MEBO 组对比，^d $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与贝复济组对比，^e $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与模型组对比，^f $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与对照组对比，^g $P<0.05$ ，差异具有统计学意义；与空白组对比，^h $P<0.05$ ，差异具有统计学意义

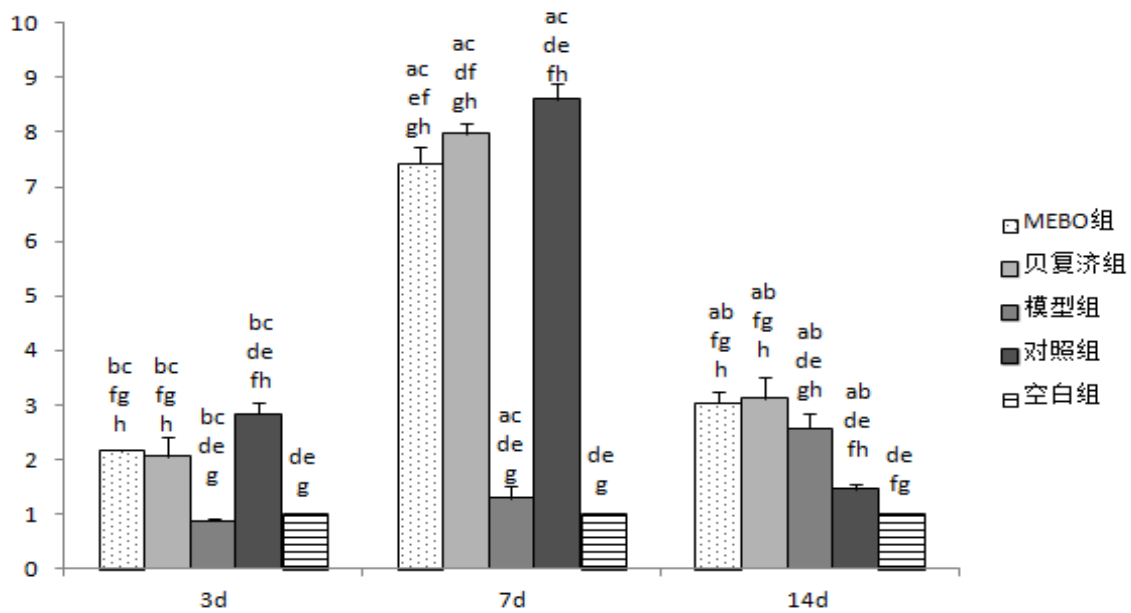


图3 各组大鼠创面组织内 VEGFR-2 mRNA 表达水平示意图

3 讨论

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 又称血管渗透因子(vascular permeability factor, VPF), 是目前发现能够刺激血管内皮细胞增生的最强且最专一的细胞因子, 具有趋化血管内皮细胞、特异性促血管生成、增强血管通透性等功能^[11-12]。VEGF 能够与血管内皮细胞受体进行特异性结合, 继而促进血管内皮细胞进行分裂、增殖, 最终形成新的完整血管^[13]。目前, 已发现的血管内皮细胞受体包括 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3, 其中 VEGFR-2 是 VEGF 的主要功能受体, 主要分布于血管内皮细胞, 具有介导血管内皮细胞再生、增强血管通透性、趋化血管内皮细胞等作用^[13]。遂笔者于本研究中对比观察了不同时间点各组大鼠皮肤或创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平的变化, 以期进一步研究 VEGFR-2 在慢性难愈合创面修复中的作用机理, 揭示 MEBO 促进慢性难愈合创面修复的部分分子学机制。

研究结果显示, 创面处理后第 3、7、14 天, 空白组大鼠皮肤组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平均无明显变化, P 均 >0.05 , 差异无统计学意义; 而对照组、模型组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平变化均较明显, P 均 <0.05 , 差异具有统计学意义, 其中对照组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 表达水平均呈先升高后降低的趋势, 而模型组则呈递增趋势。其原因可能为, 空白组大鼠由于未做损伤处理, 其皮肤组织仍为正常皮肤组织, 因此, 受检组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 的表达水平无明显变化。由于 VEGF 调控内皮细胞的增

殖主要是通过激活 VEGFR-2 实现的^[14]，调节血管通透性主要是通过 VEGFR-2 的 Tyr801 残基磷酸化，继而激活内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)产生 NO 实现的^[15]。因此，大鼠皮肤受损后，机体即会生理性激活 VEGFR-2，以促进新生血管的生成，故对照组、模型组、MEBO 组和贝复济组大鼠创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 的表达水平均呈现出上升状态。且治疗第 7 天，MEBO 组大鼠创面组织中 VEGFR-2 mRNA 表达水平均高于其他各组， P 均 <0.05 ，差异具有统计学意义，即 MEBO 可有效激活 VEGFR-2，提高 VEGFR-2 mRNA 的表达水平。随着治疗时间的延长，对照组、MEBO 组及贝复济组大鼠创面逐渐愈合，故其创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 的表达水平开始下降，而模型组大鼠创面为慢性难愈合创面，仅予以生理盐水纱布外敷治疗，创面并无愈合倾向，故其创面组织中 VEGFR-2 蛋白及 VEGFR-2 mRNA 的表达水平始终处于上升状态。

综上所述，VEGFR-2 在创面愈合过程中发挥着不容小觑的作用，其高表达状态可促进血管内皮细胞增生，诱导创面血管生成，加速创面愈合；而 MEBO 可显著上调创面组织中 VEGFR-2 的表达水平，从而促进血管内皮细胞增生，诱导创面血管生成，加速创面愈合。值得注意的是，MEBO 上调创面组织中 VEGFR-2 的表达水平可能只是 MEBO 促进慢性难愈合创面愈合的机制之一，是否还有其他愈合机制，以及其与 VEGF 相关因子的交互作用机制仍需进一步深入研究探讨。

参考文献

- [1] 曾鸿孟，唐乾利．体表慢性难愈合创面的研究进展[J]．中国烧伤创疡杂志，2016，28(5)：340-344.
- [2] 严豪杰，王军，矫浩然，等．中药外用 促进慢性难愈性创面愈合机理研究[J]．吉林中医药，2012，32(2)：156-157，165.
- [3] 唐乾利，黄欣，王宇，等．湿润暴露疗法/湿润烧伤膏治疗慢性难愈合创面的超微病理及丝裂原活化蛋白激酶激酶和 c-myc mRNA 表达的机制研究[J]．中国全科医学，2015，18(3)：294-299.
- [4] Tang QL, Han SS, Feng J, et al. Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4)：1277-1282.
- [5] 唐乾利，李辉，李杰辉，等．MEBT/MEBO 对慢性难愈合创面 ERK1、c-myc 表达的调控[J]．中国烧伤创疡杂志，2016，28(6)：387-394.

- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 吴标良, 唐乾利, 冯烈, 等. 糖尿病足部免疫表达和烧伤皮肤再生医疗技术干预治疗的影响[J]. 上海医学, 2014, 37(7): 610-613.
- [9] 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): 64-74.
- [10] 沈道修, 顾月芳, 任晓英. 一种研究中西药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J]. 中国中西医结合杂志, 1983, 3(1): 49-50.
- [11] Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing[J]. Am J Pathol, 2000, 156(5): 1499-1504.
- [12] Gille H, Kowalski J, Li B, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1(VEGFR-1) and KDR(VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3222-3230.
- [13] 李京佳, 林相国, 许涛, 等. VEGF 家族及其在肿瘤生长中作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(4): 777-779.
- [14] Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5638-5646.
- [15] 王东彬, 黎玮, 杨书文, 等. 肾上腺髓质素对肾肿瘤细胞 PI3K/Akt/eNOS/VEGF 信号通路的作用[J]. 河北医药, 2014, 36(23): 3525-3527.