

## rhGM-CSF、纳米银外用对深Ⅱ°烫伤创面愈合的影响研究

杨景哲,陈凤平,冯欣姝\*,温海玲,耿琪璘

(承德医学院附属医院烧伤整形科,河北 承德 067000)

**[摘要]** 目的:研究外用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和纳米银,对深Ⅱ°烫伤创面愈合的影响。方法:用Wistar大鼠建立深Ⅱ°烫伤模型,分为A、B、C3组,A组(30例):凡士林纱布覆盖;B组(30例):纳米银覆盖;C组(30例):rhGM-CSF涂抹创面;伤后第1、4、7、10、14、21天,观察创面愈合情况,计算愈合率,按照酶联免疫吸附法测定血清中血管内皮生长因子(VEGF)及表皮生长因子(EGF)水平。结果:A、B、C3组均在伤后第10天出现血管化和上皮化;创面愈合率C组>B组>A组,第10天各组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),第14、21天各组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );VEGF水平,A组、B组、C组分别在第21、14天达峰值,伤后第1天各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),第4、7、10、14天各组间及第21天A组和C组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );EGF水平,各组均在第21天达峰值,第1、4天各组间及第7天A组与B组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),第7天C组与A组、B组之间及第10、14、21天各组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:rhGM-CSF、纳米银外用,均加速深Ⅱ°烫伤创面愈合,并且rhGM-CSF效果优于纳米银。

**[关键词]** 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;纳米银;烧伤;血管内皮生长因子;表皮生长因子

**[中图分类号]** R644

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)02-192-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150211

## Effects of recombinant human Granulocyte/macrophage colonystimulating factor and nano-silver for deep burn degree II wound healing

Yang Jingzhe, Chen Fengping, Feng Xinshu\*, Wen Hailing, Geng Qiyang

(Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of recombinant human Granulocyte/macrophage colonystimulating factor (rhGM-CSF) and nano-silver as treatment for deep burn degree II wound healing. **Methods:** The burn models were done with Wistar rats, which were randomly divided into three groups, petrolatum treatment (group A.  $n = 30$ ), nano-silver treatment (group B.  $n = 30$ ), and rhGM-CSF treatment (group C.  $n = 30$ ). The healing rate of the three groups was recorded on postburn day 1, 4, 7, 10, 14, 21. Meanwhile the levels of VEGF and EGF in serums were measured with ELISA. **Results:** Group A, group B, and group C were all neovascularization and epithelization on postburn day 10. The healing rate: group C > group B > group A. On postburn day 10, there were no significantly difference between groups ( $P > 0.05$ ), but on postburn day 14, 21, there were significantly statistical differences between groups (all  $P < 0.05$ ). For VEGF levels, group A, group B, and group C were peaked on postburn day 21, 14, 14, respectively. On postburn day 1, there were no significantly statistical difference between groups ( $P > 0.05$ ). On postburn day 4, 7, 10, 14 and 21, there were significantly statistical difference between groups ( $P < 0.05$ ). For EGF levels, All groups were peaked on postburn day 21. On postburn day 1 and 4, there were no significantly statistical differences between groups ( $P > 0.05$ ). On postburn day 7 there were differences between C and group A and group B, and on day 10, 14, 21 differences were observed between groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** rhGM-CSF and nano-silver treatment could promote wound healing, but rhGM-CSF is better than nano-silver.

**[Key words]** recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF); nano-silver; burn; VEGF; EGF

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 192-195]

**[基金项目]** 承德市科学技术研究与发展计划项目(20122164);河北省医学科学研究重点课题计划指令性课题(20130024)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: sanyue\_1@aliyun.com

烧(烫)伤是常见的机体损伤,浅Ⅱ°创面能完全自愈,Ⅲ°创面需手术治疗,而深Ⅱ°创面在愈合过程中因溶痂极易感染,致创面经久不愈,因此深Ⅱ°创面的愈合直接决定烧伤患者整体治疗的病程和预后。重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte/macrophage colonystimulating factor, rhGM-CSF)是基因工程产物,既具有抑制炎症反应的作用,又促进上皮再生、创面愈合,而纳米银其主要作用是抗感染,在此基础上促进愈合,二者在临床治疗中均已广泛应用,但是关于二者的对照研究目前仍是空白。本文就 rhGM-CSF 和纳米银对深Ⅱ°烧伤创面愈合进程的影响进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠 90 只(天津山川红实验动物科技有限公司),200~220 g,雌雄各半;纳米银医用抗菌敷料(批号:120401,深圳市爱杰特医药科技有限公司),rhGM-CSF(批号:20120603,长春金赛药业有限公司),Photoshop7.0 软件(Adobe 公司,美国)和 KS400 图像分析系统(Kaiser),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)酶联免疫试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模型制作和分组

水合氯醛 1 ml/kg 腹腔注射麻醉 Wistar 大鼠,背部去毛后用 99℃ 纱布覆盖 10 s,造成约 4 cm×4 cm 大小深Ⅱ°烫伤创面(病理切片证实),伤后创面分别用 A、B、C、3 种方法处理,每组 30 只,A 组:凡士林纱布覆盖;B 组:生理盐水湿润纳米银医用抗菌敷料单层完整覆盖创面;C 组:rhGM-CSF 涂抹创面,每次涂抹约 2 g(参照药物使用说明书),创面无菌敷料包扎,每天换药,分别于伤后第 1、4、7、10、14、21 天留取血标本 1 份约 3 ml,至第 21 天,终止实验。

#### 1.2.2 创面病理学观察

创面换药时观察创面愈合情况,创面组织标本在 HE 染色情况下观察炎细胞趋化及血管化、上皮化程度。

#### 1.2.3 创面愈合率计算

于烫伤即刻及伤后第 1、4、7、10、14、21 天创面照相,采用 Photoshop7.0 软件(Adobe),测量创面愈合面积,计算创面愈合率,创面愈合率=(创面总面积-残余创面面积)/创面总面积×100%。

#### 1.2.4 VEGF 和 EGF 检测

血清标本解冻,按照酶联免疫吸附法测定各标本血清中 VEGF 和 EGF 水平,按照说明书操作。在酶标板上分别加标准品和待测样本 100 μl,晃动摇匀,37℃ 温育 2 h,甩干,加生物素标记抗体工作液 100 μl,37℃ 温育 1 h,甩干,洗板 3 次,加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 μl,37℃ 温育 1 h,甩干,洗板 5 次,加底物 90 μl,37℃ 避光显色 30 min,加终止溶液 50 μl,终止反应。在 450 nm 波长测量各孔的光密度值。

### 1.3 统计学方法

运用 SPSS16.0 进行统计学分析。方差分析比较 VEGF、EGF 在各组间不同时相点的差异,SNK-*q* 检验比较组内不同时相点两两比较的差异。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 创面病理学表现

A、B、C 3 组均在第 10 天出现明显的血管化和上皮化,A 组创面伤后红肿明显,并且在第 14 天出现痂下积液,向皮下潜行,切片可见大量炎性细胞浸润、聚集、迁移,血管壁通透性增加,血管化和上皮化进程较慢;B、C 组创面伤后红肿,在伤后第 4 天炎症反应最重,切片可见炎性细胞浸润、聚集、迁移,血管壁通透性增加,血管化和上皮化进程较 A 组明显加快,至第 14 天因为创面溶痂,炎症反应较前略有加重;C 组血管化和上皮化进程最快。伤后第 14 天,A 组创面仍处于溶痂阶段,炎症反应明显,B 组创面已出现部分上皮化,C 组创面大部已上皮化(图 1)。

### 2.2 创面愈合率

在伤后第 1、4、7 天各组创面均未出现愈合,第 10、14、21 天创面愈合率 C 组>B 组>A 组。第 10 天,A 组、B 组、C 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );第 14、21 天,A 组、B 组、C 组之间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,表 1)。

### 2.3 血清 VEGF 水平

A 组 VEGF 水平在伤后逐渐上升,第 10、14 天下降,B 组、C 组逐渐上升,第 14 天达到峰值,第 21 天水平下降,可能与 B 组、C 组第 21 天大部分创面已愈合有关,血管化程度降低,尤其是 C 组下降幅度最大。VEGF 水平在第 1 天各组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),第 4、7、10、14 天各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),第 21 天 A 组与 C 组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,表 2)。

### 2.4 血清 EGF 水平

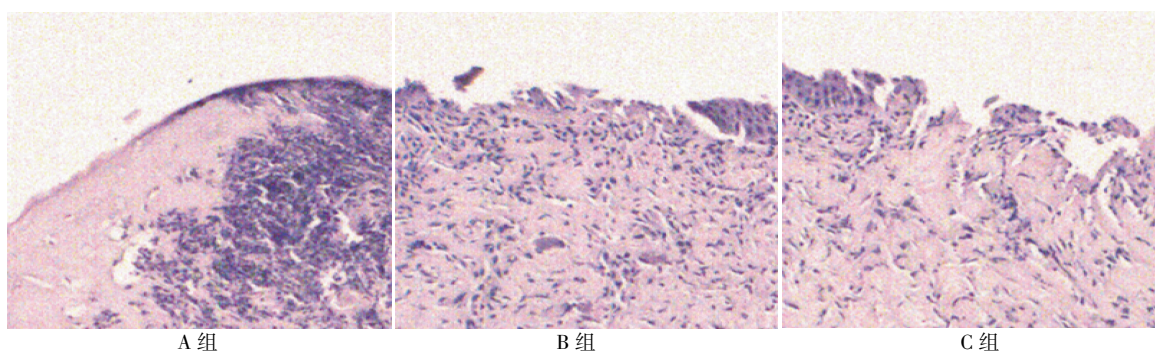


图1 各组大鼠烧伤后第14天创面上皮化情况(HE, ×200)

Figure 1 Pathological changes of burn wounds in rats on the 14 day(HE, ×200)

表1 各组不同时间点愈合率比较

Table 1 Comparison about healing rate in all groups(%)

组别	第10天	第14天	第21天
A组	11.48 ± 0.81	20.16 ± 1.33	51.48 ± 1.78
B组	12.90 ± 1.50	34.55 ± 0.33*	73.62 ± 1.61*
C组	12.85 ± 0.87	39.48 ± 0.91**	81.48 ± 1.44**

与A组比较, \*P < 0.05, 与B组比较, #P < 0.05。

表2 各组深Ⅱ°烫伤大鼠血液VEGF水平

Table 2 The levels of VEGF of deep burn degree II in all groups (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第1天	第4天	第7天	第10天	第14天	第21天
A组	23.01 ± 1.73	23.18 ± 1.64	23.55 ± 1.48	20.81 ± 1.43	19.54 ± 1.07	25.76 ± 1.46
B组	23.09 ± 1.10	24.61 ± 1.25*	26.38 ± 1.13*	27.05 ± 1.37*	29.73 ± 1.58*	26.27 ± 2.10
C组	23.23 ± 1.66	25.43 ± 1.41**	30.81 ± 1.44**	33.47 ± 1.26**	38.91 ± 2.38**	27.11 ± 1.91*

与A组比较, \*P < 0.05; 与B组比较, #P < 0.05。

表3 各组深Ⅱ°烫伤大鼠血液EGF水平

Table 3 The levels of EGF of deep burn degree II in all groups (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第1天	第4天	第7天	第10天	第14天	第21天
A组	0.48 ± 0.17	0.48 ± 0.13	0.52 ± 0.09	0.59 ± 0.10	0.63 ± 0.12	0.72 ± 0.14
B组	0.50 ± 0.10	0.51 ± 0.11	0.58 ± 0.11	0.67 ± 0.14*	0.81 ± 0.11*	0.93 ± 0.13*
C组	0.52 ± 0.08	0.54 ± 0.12	0.65 ± 0.13**	0.78 ± 0.12**	0.96 ± 0.10**	1.18 ± 0.16**

与A组比较, \*P < 0.05; 与B组比较, #P < 0.05。

### 3 讨论

rhGM-CSF能趋化单核/巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞、上皮细胞的活化,诱导角质细胞增殖和迁移<sup>[1]</sup>,也有研究表明rhGM-CSF是通过介导磷酸化雷帕霉素蛋白同时激活其信号通路,促进创面的愈合<sup>[2]</sup>,另外,rhGM-CSF在烧伤残余创面治疗上有独特的优势<sup>[3-4]</sup>,还能调节机体免疫系统,增强机体的免疫力,促进烧伤感染创面的愈合<sup>[5]</sup>。纳米银主要是通过银离子的缓慢释放,发挥抑菌、杀菌作用,减轻炎症反应,同时降解烧伤创面金属蛋白酶来实现创面愈合作用。创面治愈率C组最高,A组最低,在第10天,各组之间差异无统计学意义,考虑为深Ⅱ°烧伤创面修复刚开始启动,各组自身优势相比不明显,第14、21天,各组之间差异有统计

学意义,证明B组、C组在促进创面愈合方面较A组有明显优势,并且rhGM-CSF比纳米银在加速创面愈合方面作用更加突出。

A组、B组、C组EGF水平在伤后均是持续逐渐上升的,A组上升速度最慢,C组上升速度最快,第1、4天各组间差异无统计学意义(P > 0.05),第7天A组与B组差异无统计学意义(P > 0.05),第7天C组与A组、B组之间及第10、14、21天各组间差异均有统计学意义(P < 0.05,表3)。

学意义,证明B组、C组在促进创面愈合方面较A组有明显优势,并且rhGM-CSF比纳米银在加速创面愈合方面作用更加突出。

VEGF是促血管生成因子<sup>[6]</sup>,调节局部组织血管结构变化以及血管源性水肿等生理、病理过程<sup>[7]</sup>。深Ⅱ°烧伤发生后,创面局部早期表现主要是组织的缺血缺氧,缺血缺氧是诱导血管新生因子释放的最主要因素<sup>[8]</sup>,缺血缺氧首先启动低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1α),HIF-1α通过诱导VEGF基因转录<sup>[9]</sup>,使缺氧细胞存活,改善微循环,完善供氧系统<sup>[10]</sup>。创面局部新生血管生成后使氧平衡得到改善,因此HIF-1α及其调控因子VEGF的表达相应下调<sup>[11-12]</sup>。VEGF介导血管内皮细胞迁移修复和血管新生,改善深Ⅱ°烧伤创面局部微循环状态。A组VEGF水平持续升高,与3周

内创面一直处于生长修复期有关,第 10、14 天下降可能与创面溶痂,局部血管化受影响有关,B 组、C 组 VEGF 水平在第 14 天达峰值,第 21 天降低,可能与 B 组、C 组大部分创面已愈合、血管化程度较前降低有关。在第 1 天各组间差异无统计学意义,说明烧伤早期创面发生应激性反应,机体修复机能未完全启动;第 4、7、10、14、21 天各组间的差异证明,在促进创面血管化方面,C 组作用最强,A 组作用最弱,并且 rhGM-CSF 在促进深Ⅱ°烧伤创面血管新生方面优势明显强于纳米银。

EGF 是一种强有力的细胞分裂因子,最显著的生物学效应是促进上皮细胞增殖和分化,在创伤后上皮细胞生长方面发挥主要作用<sup>[13]</sup>。EGF 具有促进上皮增殖、组织修复和细胞保护作用,随着创伤修复细胞的增殖和分裂,诱导干细胞分化,促进创面愈合<sup>[14-15]</sup>。随着上皮细胞再生,反馈机制通过下调转化生长因子- $\beta_1$  的表达,调节 smad 蛋白家族作用,抑制 I 型胶原合成,从而在创面愈合的前提下抑制瘢痕的形成<sup>[16]</sup>。EGF 水平在深Ⅱ°烧伤创面治疗过程中,是持续上升的,与创面上皮化是密切相关的,A 组 EGF 水平上升最慢,上皮化速度最慢,C 组上升最快,上皮化速度最快。陈晓东等<sup>[17]</sup>研究猪脱细胞异体真皮应用于深Ⅱ°烧伤创面,EGF 水平在第 5 天达到峰值,之后逐渐下降。第 1、4 天各组间及第 7 天 A 组与 B 组间差异无统计学意义,烧伤早期创面上皮化修复未启动,伤后第 7 天 rhGM-CSF 和纳米银外用深Ⅱ°烧伤创面治疗均启动上皮化进程,并且第 10、14、21 天 rhGM-CSF 和纳米银均能加速创面愈合,但是 rhGM-CSF 在促进深Ⅱ°烧伤创面上皮化方面优势强于纳米银。

rhGM-CSF、纳米银外用深Ⅱ°创面治疗过程中促进血管新生和上皮再生,加速创面愈合,rhGM-CSF 比纳米银更有优势。rhGM-CSF 和纳米银能否联合外用治疗深Ⅱ°烧伤,充分利用二者的凝胶保湿和敷料架构作用值得进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Zhang L, Chen J, Han C. A multicenter clinical trial of recombinant human GM-CSF hydrogel for the treatment of deep second-degree burns[J]. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(5): 688-689

[2] 崔文慧, 黄宏, 徐祥, 等. 粒细胞巨噬细胞刺激因子对大鼠创面哺乳动物西罗莫司靶蛋白信号通路的作用[J]. *中华烧伤杂志*, 2012, 28(1): 36-41

[3] Yan H, Chen J, Peng X. Recombinant human granulocyte-

macrophage colonystimulating factor hydrogel promotes healing of deep partial thickness burn wounds[J]. *Burns*, 2012, 38(6): 880

[4] 邱学文, 王甲汗, 杨磊, 等. 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子治疗烧伤后残余创面[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(7): 1196-1197

[5] 裴瑾, 赵立欣, 姜晶, 等. 外用重组人粒细胞-巨噬细胞刺激因子凝胶对烫伤动物的疗效[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(5): 414-416

[6] Zhao JL, Chen L, Shu B, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor influences angiogenesis by regulating the coordinated expression of VEGF and the Ang/Tie System[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e92691

[7] 强辉, 张晨, 时志斌, 等. 表达 VEGF 的重组腺相关病毒对大鼠创伤性脊髓损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(6): 729

[8] Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 240

[9] Dai Y, Xu M, Wang Y, et al. HIF-1 alpha induced VEGF over-expression in bone marrow stem cells protects cardio-myocytes against ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6): 1042

[10] Zhou Y, Liu XH, Qu SD, et al. Hyperbaric oxygen intervention on expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in spinal cord injury models in rats[J]. *Chin Med J*, 2013, 126(20): 3901-3902

[11] 吴冬鸣, 唐燕, 韩艺, 等. 大鼠心肌缺血再灌注后不同时间点心脏及肝脏中 HIF-1、VEGF 的表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(8): 1050-1051

[12] Li H, Liu F, Lou YT, et al. The expression level of HIF after renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Exp Lab Med*, 2011, 29(1): 6-8

[13] Han Y, Shao Y, Lin ZH, et al. Netrin-1 simultaneously suppresses corneal inflammation and neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(3): 1294

[14] 宗守凯, 梁自乾, 欧邦军. 局部应用重组人 EGF 对糖尿病大鼠烫伤创面 EGF 受体及其 mRNA 表达的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(2): 153

[15] Nanba D, Toki F, Matsushita N, et al. Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(4): 646-649

[16] Zhang Z, Finnerty CC, He J, Smad ubiquitination regulatory factor 2 expression is enhanced in hypertrophic scar fibroblasts from burned children[J]. *Burns*, 2012, 38(2): 243-244

[17] Chen XD, Shi Y, Shu B, et al. The effect of porcine ADM to improve the burn wound healing[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(11): 2288