

创面生物活性玻璃修复材料促进家猪创面愈合的实验研究

王增辉¹ 黄海¹ 革军¹ 常江² 王臻^{1△}

(¹ 第四军医大学附属骨科医院骨五科,全军骨科重点实验室 陕西 西安 710015 ;

² 中科院硅酸盐上海研究所,生物材料与组织工程研究中心 上海 200050)

摘要 目的 观察创面生物活性玻璃修复材料对家猪皮肤创面的促愈合作用。方法 选择 14 头家猪,随机分成 7 组,每组 2 头,在每头猪的脊柱两旁制造 3 个 4×4cm 的全层皮肤缺损的创面模型,每头猪 6 个创面又分成实验组和空白对照组,于试验后每天观察创面愈合情况,第 1、3、7、14、21、28、35 天图像分析计算创面愈合率,并同时取创面组织行组织学染色,观察各组材料对家猪皮肤全层缺损创面愈合的影响。结果:在涂材料的实验组和空白对照组创面愈合时间分别是 $23.19 \pm 1.27d$ 、 $29.52 \pm 1.54d$ 两组组间比较,具有统计学意义($P < 0.05$);实验组的创面愈合率在各时间段均高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);组织学观察实验组的上皮化程度、表皮生长、成纤维细胞、毛细血管数量均好于空白对照组。结论 创面生物活性玻璃修复材料对家猪皮肤创面愈合具有促进作用,可作为一种新型的促愈合覆盖材料进一步研究。

关键词 生物活性玻璃;创面愈合;家猪

中图分类号:Q95-3 R641 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1617-04

Promotion of Wound Healing by Bioactive Glass Material in Susscrota Domestica

WANG Zeng-hui¹, HUANG Hai¹, GE Jun¹, CHANG Jiang², WANG Zhen^{1△}

(¹ Department of Orthopedics Surgery, Xijing Hospital, Key Laboratory of PLA, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

² Biomaterials and Tissue Engineering Research Center, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200050, China)

ABSTRACT Objective: To observe the facilitative function of wound healing through bioactive glass material in Susscrota domestica. **Method:** Fourteen pig models of skin wounds with loss of their full-thickness layers (each pig with 6 wounds of 3cm×3cm) were established for the observation of the effects on the wound healing. The biological active glass materials were fully sprinkled into the impingements. **Results:** The healing time of experimental and blank group were $23.19 \pm 1.27d$ and $29.52 \pm 1.54d$, respectively ($P < 0.05$). The healing rate was significantly higher and the healing time was significantly shorter in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). The histological examination demonstrated that the epithelialization condition was also much better in the experimental group. **Conclusion:** The bioactive glass material may be considered as a prospective method in promoting the healing of wound with a loss of full-thickness skin.

Key words: Bioactive glass material; Wound healing; Susscrota domestica

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R641 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)09-1617-04

前言

生物活性玻璃从 20 世纪 70 年代由美国佛罗里达大学教授 Larry L.Hench^[1]提出以来,因其具有较高的生物活性,生物相容性和化学稳定性^[2],立即引起了各国医用生物材料研究者的重视。大面积暴露于外部环境的皮肤组织,易由于烧伤、机械创伤以及慢性溃疡而形成皮肤缺损或功能丧失,仅我国每年有近 400 万各类皮肤缺损患者需要治疗^[3-4]。因此把创面生物活性玻璃修复材料用于创面的促愈合也是当今的一个热点研究方

向。本实验就是以一种新型的创面生物活性玻璃修复材料为研究对象,研究生物活性玻璃材料对创面的促愈合作用,为以后的进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

健康家猪 14 头,雌雄不限,15kg 左右。由西安迪乐普实验动物公司提供。创面生物活性玻璃修复材料,由中科院硅酸盐上海研究所提供。

1.2 实验分组

14 头家猪,耳标标识,完全随机化分成 7 组,每组 2 头,在每头猪的背部造 6 个全层皮肤缺损创面,随机分成实验组和空白对照组,共 84 个创面。

1.3 实验方法

作者简介 王增辉(1984-)男,硕士,医师。主要研究方向:骨关节和大段骨移植及修复研究。

电话:15319768191;E-mail: yidawangzenghui@163.com

△通讯作者:王臻,硕士生导师,E-mail: wangzhen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-02-06 接受日期:2011-02-28)

14 头家猪实验前 1 周购入单栏喂养,自由饮水和喂食。实验前 24h 禁食,术前以 3%戊巴比妥钠 30mg/kg 和陆眠宁 肌注混合麻醉。10min 麻醉生效后,在每头猪脊柱两旁 3cm 左右各制作 6 个 4×4cm 全层皮肤缺损创面,创面间距 4cm,保留筋膜。按实验分组在实验组喷撒创面生物活性玻璃修复材料,空白组不予处理。术后各创面均覆盖无菌纱布,在创面边缘做出标记。

1.4 观察指标

1.4.1 创面一般情况和创面愈合时间 术后每天观察创面愈合的一般情况,在创面完全上皮化时计算创面愈合时间。

1.4.2 创面愈合率 在术后 1、3、7、14、21、28、35 天分别对每组的实验组和空白对照组的创面用计算机图像分析软件计算各组的创面愈合面积,测定各组的创面愈合百分率,按公式创面愈合率(%)=[(创面原始面积-创面未愈合面积)/创面原始面积]×100%。

1.4.3 组织学观察 在术后 1、3、7、14、21、28、35 天分别对每组的实验组和空白对照组的创面在无菌条件下活检对每组的实验组和空白对照组的创面在无菌条件下活检取材,10%福尔马林液固定标本,石蜡包埋切片后常规 HE 色,光镜下观察上皮化程度、表皮生长、成纤维细胞、毛细血管数量等。

1.5 统计分析

采用 spss16.0 统计软件包进行统计学处理,数据均以均数±标准差表示,对各组的实验组和空白对照组的创面愈合时间和创面愈合率做方差分析和 t 检验, P<0.05 为有统计学意

义。

2 结果

2.1 创面一般情况和创面愈合情况

术后第 1 天实验组和对照组创面都有所扩大,肿胀,实验组材料在创面形成一层严密的保护层,较为干燥,渗出较少,对照组创面渗出较多。术后 3 天实验组和对照组创面肿胀消失,坏死组织形成干痂,实验组创面较为湿润,整洁。术后 7 天实验组创面周边及基底部可见鲜红的肉芽组织,创面表层已覆盖较薄表皮细胞层;对照组基底部充血,肉芽组织较少;术后 14 天实验组新生上皮层可见增厚的角化层,创面周边明显愈合,已有毛发生长,对照组新生的上皮层较薄,处之柔软,易出血,创面周边毛发生长较少;术后 21 天实验组创面表层几乎完全覆盖修复上皮,新生的上皮生长迅速,创面可见大量的毛发生长,对照组修复上皮覆盖面积较少,上皮生长较慢;术后 28 天实验组创面基本愈合到术后 35 天完全愈合,创面表面毛发生长茂密,皮肤处之光滑,韧性好;对照组创面愈合则较之愈合晚,毛发较少。

创面愈合时间:实验组为 23.19±1.27d,对照组为 29.52±1.54d,两组组间比较具有统计学差异(P<0.05)。

2.2 创面愈合率

实验组和对照组在术后第 1、3 天创面愈合率无明显差别,实验组第 7、14、21、28、35 天较对照组的创面愈合率有明显差异,具有统计学差异(P<0.05)。结果见表 1。

表 1 各组创面愈合率比较(n=12, % $\bar{x} \pm s$)
Table 1 Rate of wound healing in different groups (n=12, %, $\bar{x} \pm s$)

Groups	7d	14d	21d	28d	35d
Experimental	51.18±0.88*	72.20±0.68*	84.42±0.68*	96.58±0.49*	99.16±0.52*
Blank	48.11±0.97	68.34±0.83	79.19±0.50	90.72±0.59	97.06±0.31

* 与相同时间点实验组与对照组比较 P 值 <0.05
* Comparison between experimental and blank groups in each time point (P<0.05)

2.3 组织学观察

术后第 1、3 天镜下观察,实验组和对照组均有炎症细胞浸润,成纤维细胞、表皮细胞、毛细血管数量大量增加,实验组较对照组明显。术后 7 天,实验组可见大量成纤维细胞向表皮层聚集,表皮细胞增生活跃,毛细血管大量增生,直至术后 14 天成纤维细胞,毛细血管增生数量才有所下降,表皮细胞继续增加。对照组同期也可见大量成纤维细胞,表皮细胞,毛细血管增生,但明显没有实验组增生明显。术后 21 天实验组表皮细胞层增生活跃,胶原生成,基底细胞排列整齐,毛细血管大量生成,乳突层和网状层已能分清,至 28 天表皮层已有明显的分层结构,细胞分化良好,真皮可见大量的胶原生成,排列整齐,可见毛细血管分布。对照组分层不明显,还可见大量的成纤维细胞生成,表皮层和真皮层结构不明显。术后 35 天实验组表皮细胞分化好,与 28 天比较真皮层胶原粗大紧密,排列整齐,毛细血管分布均匀。对照组表皮层出现分层结构较晚,上皮层较菲薄,

与实验组比较,胶原排列不整齐。如图 1

3 讨论

现在实验动物选择种类越来越多,包括猪、羊、兔、猴等等,本实验选择家猪作为实验对象,是因为家猪皮肤全层创面缺损模型制作简便、快速,创面创伤程度容易一致,是研究皮肤创面修复的理想实验对象,同时家猪体表毛发的疏密、表皮厚薄、表皮的脂肪层、表皮形态和增生动物力学,创面皮肤的体液和代谢变化机制,以及解剖、生理学上包括皮肤、心血管、免疫系统等方面都和人有极大的相似^[6],故猪是进行试验性创面损伤的理想动物。可为以后的修复材料应用于人类增加更大的可信度。

生物活性材料生物玻璃是一种硅酸盐性质的异质移植材料。是一种可以与活体骨组织和软组织直接连接的特殊玻璃^[7],它的主要成分包括 SiO₂、Na₂O、CaO、P₂O₅,能够在植入部位迅

速发生一系列表面反应 ,最终导致羟基磷灰石层的形成 ,对促进创面愈合有一定的作用 ,国内外对此都有报道 ,如美国的 D. C.格林斯潘^[8-9]等介绍过促进创伤和烧伤愈合的生物活性玻璃。生物活性玻璃促进创伤愈合的机理^[10]可能为 :当材料植入人体内 ,在体液的作用下 ,Na⁺、Ca²⁺ 等活性大的离子首先溶出 ,同时体液中的 H⁺ 进入玻璃表面形成 Si -OH- ,然后由于 Si-O-Si 键破坏 ,无规网络被溶解 ,可溶性硅以硅醇形式被放出 ,迅速在材料粉体表面形成一个羟基磷灰石胶结层。可溶性硅有分子水平结缔组织的代谢作用结构作用 ,生物玻璃溶解后 ,局部 Si 浓度的升高可促进细胞陈代谢的细胞内部响应 ,激发促创伤愈合因子的自分泌反应 ,参与创伤修复的所有细胞在促创伤愈合因子的

刺激下加速生长和分子 ,并聚集于材料表面形成的羟基磷灰石胶结层 ,使新生组织能整个创面顺利爬移和覆盖。本实验所用的创面生物活性玻璃修复材料是一种无机合成材料 ,是新型生物活性玻璃分剂系列产品 ,它的主要成分 SiO₂、Na₂O、CaO、P₂O₅ ,具有独特的表面活性 ,当与软组织创面接触时 ,材料与组织瞬间发生离子交换 ,提高局部氧压和 PH 值 ,在其表面形成较强的负电势吸附周围成纤维细胞和上表皮细胞 ,生长因子 ,结缔组织蛋白等 ,同时通过羟基磷灰石胶结层快速形成 ,在软组织损伤处稳定这些修复细胞和蛋白 ,从而促进细胞分泌新组织细胞生成 ,推动创面伤口主动修复 ,缩短创面愈合时间和愈合率。

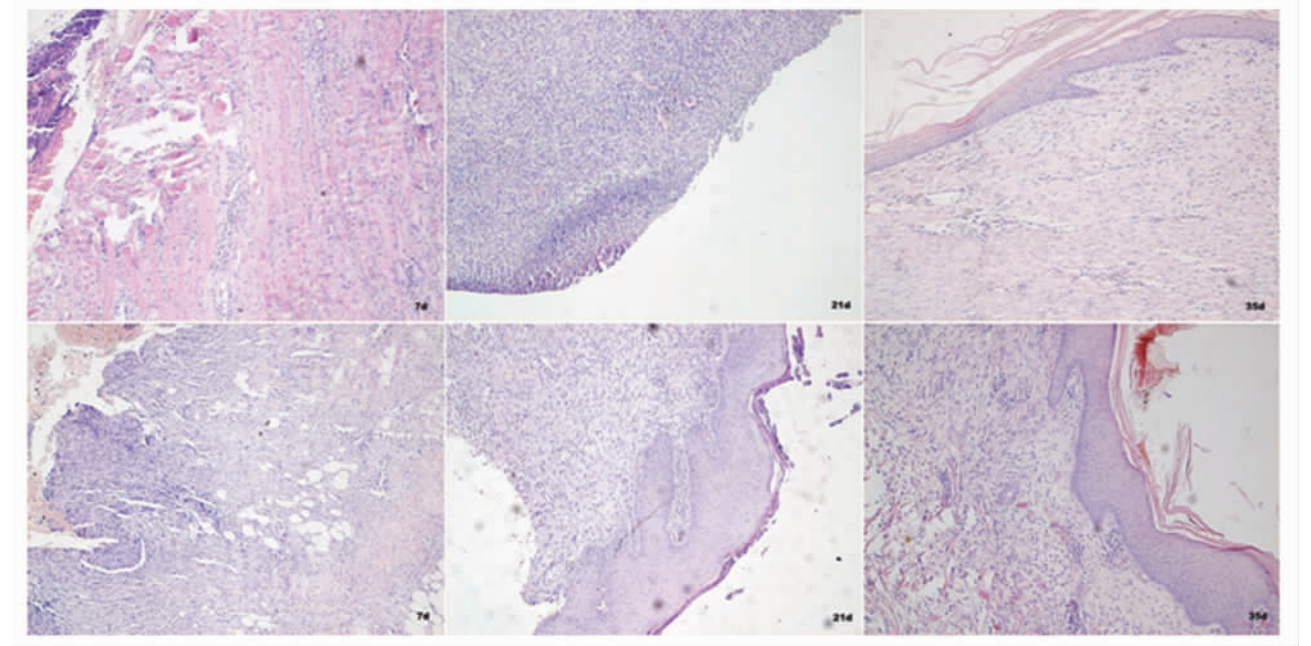


图 1 术后组织学观察(HE100×) 空白对照组(上排) :7d 成纤维细胞少 ,分层不明显 ,21d 大量成纤维细胞聚集 ,表皮细胞增生活跃 ,35d 上皮层形成 ,但较薄 ;实验组(下排) :7d 大量成纤维细胞向增生活跃的表皮层聚集 ,21d 乳头层形成良好 ,角化不全 ,35d 上皮分化良好 ,胶原排列整齐。
Fig. 1 The histological observation of skin wounds after surgery (HE100×) Blank control(upper panel): 7d-unintegrated structure with few fibroblasts, 21d-a large amount of fibroblasts and active proliferation of epidermic cells were found, 35d-the thin epithelial lamina almost formed; experimental group (lower panel): 7d-lots of fibroblasts were gathering towards proliferative epithelium, 21d-the papillar layer was well shaped and paraceratosis existed, 35d-the epithelial cells were well differentiated and collagens were assembled in order.

本实验动物实验方法中 ,通过参照付小兵 ,陆树良等^[5,11-12]的动物实验方法 ,同时加以改进。本次实验共用 14 头家猪 ,分 7 组 ,每组 2 头 ,每头猪 6 个创面 ,共 84 个 ,在实验取材时 7 组家猪分别在 7 个时间点取材 ,即第 1、3、7、14、21、28、35 天取材 ,84 个创面可保证每个创面只取材 1 次 ,避免了反复取材对实验结果造成的影响 ,因为在以往关于创面愈合研究的文献中可以看到 ,由于实验创面的反复取材 ,从而对实验创面愈合时间 ,愈合率产生较大影响 ,对以后的实验研究缺乏可信度和科学性。而本实验用多创面 ,少取材的方法可以成功避免此类问题 ,使实验结果更可信 ,为以后的进一步研究打下基础。

总之 ,创面生物活性玻璃修复材料是一种新型的修复材料 ,它可以明显缩短创面的伤口愈合时间 ,提高创面愈合率 ,同

时它又具备止血^[13] ,抗感染^[14]等效果 ,因此创面生物活性玻璃修复材料必将是以后在创面修复 ,创面愈合选择时的第一选择 ,本实验就是对这一材料在这一方面的探索 ,为以后的研究提供依据。

参 考 文 献(References)

[1] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials [J]. J Biomed Mater Res, 1971 5(6): 117-141

[2] 唐倩.溶胶 - 凝胶法制备的生物活性玻璃的研究进展[J].国际口腔医学杂志 ,2006 ,33(4) :275

Tang Qian. Sol-gel process of bioactive glass research progress [J]. International oral medical journal, 2006, 33(4):275

- [3] 曹谊林. 组织工程学的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2005, 14 (2): 134-135
Cao Yilin. The research progress of tissue engineering. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2005, 14 (2): 134-135
- [4] 付小兵, 程飏. 创伤修复和组织再生几个重要领域研究的进展与展望. 中华创伤杂志, 2005, 21 (1): 40-44
Fu Xiaobing, Cheng Biao. Wound healing and tissue regeneration several important research progress and prospect. Chinese Journal of Traumatology, 2005, 21(1): 40-44
- [5] 孙同柱, 付小兵, 陈伟, 杨银辉, 孙晓庆, 赵志力. 一种小型猪全层皮肤缺损创面模型的制备与应用 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19 (9): 466-467
SunTongzhu, Fu Xiaobing, Chen Wei, et al. Establishment and application of wound model of full-thickness skin defect in minipigs [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2002, 19(9):466-467
- [6] 施新猷. 医用实验动物学. 第1版[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 64-67
Shi Xinyou. Medical experiments of zoology, NO.1 [M]. Shaanxi science and technology press, 1989: 64-67
- [7] Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle [J]. J Biomed Mater Res, 1973; 7 (3): 25-42
- [8] 格林斯潘 D C, 维斯特 J K. 加速创伤和烧伤愈合的组合物和方法 [P]. CN Pat No, 1208338A: 1997-09-19
David C Greenspan, Jon K West. Composition and method for acceleration of wound and burn healing [P]. US Pat, No. 1208338A. 1997-09-19
- [9] David C Greenspan, Jon K West. Composition and method for acceleration of wound and burn healing [P]. US Pat, No. 2001/0041186 A12001-11-15
- [10] 陈良, 徐玲玲, 张志宾. 生物活性玻璃的制备、应用及活性机制[J]. 材料导报, 2008, 22: 348-350
Chen Liang, Xu Lingling, Zhang Zhibin. Study on Preparation, Application and Activating Mechanism of Bioactive Glass [J]. Materials Review, 2008, 22: 348-350
- [11] 陆树良. 烧伤创面愈合机制与新技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 100-120
Lu Shuiliang. Mechanism and new technology of burn wound healing [M]. People's military medical press, 2003: 100-120
- [12] 何丽娟, 刘大庆, 白慈贤等. 自体 BMSCs 复合胶原膜修复猪全层皮肤缺损[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 3: 348-352
He Lijuan, Liu Daqing, Bai Cixian et al. Repair of swine full-thickness cutaneous deficiency by autogenic BMSCs compounded with collagen membrane [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2009, 3: 348-352
- [13] Oonish H, Kushitani S, Yasukawa E, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as bone graft substitute [J]. Clinorthop, 1997, 334: 316-320
- [14] 谢宗平, 张长青. 生物玻璃及其抗感染应用[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 11: 369-370
Xie Zongping, Zhang Changqing. Bioglass and its anti-infection application [J]. Int J Ortho, 2007, 11: 369-370

(上接第 1633 页)

- [10] Seah S, Sivasithamparam S, Karakouis A, et al. Cloning and characterization of a family of disease gene analogs from wheat and barley [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 937-945
- [11] Speelman E, Bouche Z D, Holub E B, et al. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of Arabidopsis thaliana [J]. The plant J, 1998, 14(4): 467-474
- [12] Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, et al. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene Pm3b from hexaploid wheat [J]. Plant J, 2004, 37(4): 528-538
- [13] 张荣, 陈欧, 王振英. RGA 法标记植物抗病基因的研究进展[J]. 天津农业科学, 2009, 15(1): 10-12
Zhang Rong, Chen Ou, Wang Zhen-ying. Research Advance on Disease-resistant Gene of Plant by RGA Labeling [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2009, 15(1): 10-12