

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0222-04

蜂蜜对创伤大鼠皮肤修复中 FGF₂ 和 TGF β 1 表达的作用及其意义

敖 薪¹, 黄 涛^{2*}¹ 长江大学医学部, 荆州 434023; ² 暨南大学附属第一医院, 广州 510630

摘要:本文通过测定蜂蜜在创伤大鼠皮肤修复中碱性成纤维细胞生长因子 2 (Fibroblast growth factor 2 FGF₂) 和转化生长因子 β 1 (Transforming growth factor β 1 TGF β 1) 含量的变化, 揭示蜂蜜对 FGF₂ 和 TGF β 1 表达的作用, 探讨蜂蜜促进皮肤组织修复的机制。采用了人工造模法建立皮肤创面, 伤后用蜂蜜涂抹创面, 并在伤后第 1、3、5、7 天采集血清, 用酶联免疫吸附方法 (ELISA) 检测 FGF₂ 和 TGF β 1 含量。同时设有空白对照组, 进行对比观察。研究的主要结果如下: 伤后第一天蜂蜜组 FGF₂ 和 TGF β 1 含量迅速升高, 至第三天达高峰。而空白组则缓慢上升, 两组有显著差异 ($P < 0.05$)。伤后第五天蜂蜜组 FGF₂ 和 TGF β 1 的含量开始下降, 至第七天还在下降。而空白组含量则继续升高, 至第七天仍然在升高, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验结果表明, 蜂蜜在创伤皮肤修复早期可以加速上调 FGF₂ 和 TGF β 1 的表达, 预防创面继发感染, 加速创面早期愈合; 在创伤皮肤修复后期通过减弱上调 FGF₂ 和 TGF β 1 表达的作用, 达到抑制肉芽组织形成, 防止基质过剩沉积, 降低病理性瘢痕形成的风险。

关键词:蜂蜜; 皮肤创伤; 碱性成纤维细胞生长因子 2; 转化生长因子 β 1; 修复机制

中图分类号:R93

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018. S. 035

The Effect and Influence of Honey on FGF 2 and TGF β Expression in Rats Skin Wound Repaire

AO Xin¹, HUANG Tao^{2*}¹ Yangtze University, Jingzhou 434023, China; ² Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 51000, China

Abstract: To explore the effect of honey in basic fibroblast growth factor 2 (FGF 2) and transforming growth factor β 1 (TGF β 1) contents in rats skin wound repair, reveal the effect of honey on expression of FGF 2 and TGF β 1, discuss repair mechanism. The skin wound was made by manual molding method, after built; honey was coated on the wound. Serum was taken on first, third, fifth, seventh day after injury, respectively. Enzyme linked immunosorbent (ELISA) was used to detect the contents of FGF 2 and TGF β 1. The control group was built to make comparative observation. The main results were as follows: on the first day, FGF 2 and TGF β 1 in honey group were higher than that of control group ($P < 0.05$). On the third day, both FGF 2 and TGF β 1 in honey group reached the peak, and the control group also increased compared to that of the first day ($P < 0.05$). On fifth day, both FGF 2 and TGF β 1 decreased in honey group, while the control group continued to increase, especially FGF 2 was higher than honey group ($P < 0.05$). On the seventh day, both FGF2 and TGF β 1 in honey group continued to decrease, while FGF 2 and TGF β 1 continued to increase in control group ($P < 0.05$). Conclusions could be made, honey accelerated FGF 2 and TGF β 1 expression, strengthened their role in promoting inflammatory reaction, promoting capillaries, promoting epithelial cell growth, and promoting the synthesis of extracellular matrix, prevented the secondary infection of the wound, accelerated wound healing in early stage. In the middle and later stage, honey suppressed granulation tissue formation, reduced the extracellular matrix synthesis, prevented excess matrix deposition, also reduced the risk of pathological scar formation by weakening FGF 2 and TGF β 1 expression.

Key words: honey; skin trauma; basic fibroblast growth factor 2; transforming growth factor β 1; repair mechanism

自 1892 年,荷兰科学家 van Ketel 首次认可蜂蜜的抑菌活性以来,人们就开始利用蜂蜜具有的抗菌功效,辅助治疗浅度烧伤、撕裂伤、动静脉溃疡、手术感染伤、糖尿病溃疡、压疮等急慢性创伤,并取得较好的效果^[1,2]。尽管蜂蜜在临床使用的历史悠久,但蜂蜜敷料仍然还没有能作为临幊上治疗皮肤创伤的常规敷料推广使用。这与蜂蜜在皮肤修复中的作用机制至今不明确有很大关系,致使蜂蜜在当前的临幊应用中不受青睐。随着创伤后组织修复机制的深入研究,学者们一致认为^[3-5],与创伤修复密切相关的是 FGF₂ 和 TGF_{β1} 两种因子,它们不仅参与整个创伤修复过程,而且在创伤修复中起着极为重要的作用。基于这一点,本研究拟用大鼠作为研究对象,在其背部皮肤建立伤口模型,用蜂蜜涂抹,并通过测定不同时间点大鼠血清中 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的含量,观察其变化规律,揭示蜂蜜对 FGF₂ 和 TGF_{β1} 两种因子表达的作用,从而探讨蜂蜜在皮肤组织修复中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

蜂蜜(陕西老蜂农蜂业有限公司);皮肤钻环(海德创业北京生物科技有限公司);Multiskan Mk 型号全自动酶标仪(Thermo Labsystems);离心机(北京医用离心机厂);负 20 ℃冰箱(海尔公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 建模方法

用乙醚气体麻醉大鼠,剃去大鼠背部皮肤毛发 $2 \times 2 \text{ cm}^2$,两指绷紧背部皮肤,使用规格为 6 mm 的皮肤取样器,在无毛区剃去皮肤,形成一个 6 mm 的圆形皮肤创面,深度达筋膜,所有大鼠均在背部的相同位置建模。建模后大鼠自由饮食。

1.2.2 分组方法

将 32 只大鼠随机分为蜂蜜组和空白对照组。蜂蜜组,共 16 只,每次涂抹蜂蜜 0.5 mL,每天涂抹 3 次,并用无菌纱布遮蔽;空白对照组,共 16 只,不涂药,仅用无菌纱布遮蔽,每次在给蜂蜜组涂药更换敷料的同时也为其更换纱布,使其自然愈合。

1.2.3 标本收集和处理

建模之后(不包括当天)的第 1、第 3、第 5、第 7 天等四天中,每天每组随机取 4 只大鼠乙醚吸入麻醉后,用剪刀纵向剪开大鼠上腹部至胸腔皮肤,暴露心脏,用 1 mL 注射器刺入心脏抽吸 0.3 mL 血液,注

入不加抗凝剂的 1.5 mL 干燥 EP 管中,所有血标本均在采集后室温放置 30 min,之后以 1 000 rpm 离心 15 min,然后编号密封放置于 -20 ℃ 冰箱中保存待测。

1.2.4 含量测量方法

首先将血样本及试剂盒恢复到室温,用包被缓冲液稀释抗体至蛋白质含量为 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在每个反应孔中加入 0.1 mL,4 ℃ 过夜。次日,将板内液体吸取,加洗涤液 400 $\mu\text{L}/\text{孔}$,洗涤 3 次,每次 3 min,用吸水纸吸干残余液体。按试剂盒说明书加入标准品和实验样本,37 ℃ 孵育 2 h,再次洗涤,并记录标准品和实验样本的微孔位置。然后加酶标抗体,37 ℃ 孵育 0.5~1 h,洗涤。接着加入显色底物 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,避光,37 ℃ 孵育 30 min。最后加入终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,30 min 内用酶标仪测量在 450 nm 波长下的吸光度。计算结果:读取各孔的光密度(optical density OD)值,并绘制线性标准曲线图。曲线横坐标为样本中细胞因子的浓度值,纵坐标为标准曲线点的 OD 值。

1.2.5 统计分析

本实验数据用 SPSS17.0 统计软件进行处理,含量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验比较两组数据的差异性,当 $P < 0.05$,则差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF₂ 检测结果

伤后第一天,蜂蜜组 FGF₂ 的含量高于空白对照组,两组有显著差异($P < 0.05$)。伤后第 3 天,蜂蜜组 FGF₂ 的含量快速增加达到高峰,空白对照组较第一天比较也有明显增加,但两组比较差异明显($P < 0.05$)。伤后第 5 天,蜂蜜组 FGF₂ 的含量迅速下降,空白对照组 FGF₂ 的含量则继续增加,反超蜂蜜组,两组差异性显著($P < 0.05$)。伤后第七天,蜂蜜组 FGF₂ 的含量继续下降,空白对照组 FGF₂ 的含量继续升高,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 TGF_{β1} 检测结果

伤后第一天,蜂蜜组 TGF_{β1} 含量与空白对照组比较差异显著($P < 0.05$)。伤后第 3 天,两组 TGF_{β1} 的含量均在增加,蜂蜜组增加的程度高于对照组,且达到高峰,两组比较有明显差异($P < 0.05$)。伤后第 5 天,蜂蜜组 TGF_{β1} 的含量快速下降,空白对照组含量则继续增加,两组有显著差异性。

表 1 两组不同时间点血清 FGF₂ 水平的比较 (pg/mL) ($\bar{x} \pm S$)Table 1 Serum FGF₂ in groups (pg/mL) ($\bar{x} \pm S$)

| 时间点 Time point | 蜂蜜组 Honey | 空白对照组 Control | t | P |
|-------------------|---------------|------------------|--------|-------|
| 第 1 天 day 1 | 92.57 ± 6.28 | 43.75 ± 3.07 | 229.55 | 0.000 |
| 第 3 天 day 3 | 107.60 ± 9.70 | 55.45 ± 2.83 | 117.69 | 0.000 |
| 第 5 天 day 5 | 55.30 ± 4.07 | 56.80 ± 3.29 | 2.23 | 0.047 |
| 第 7 天 day 7 | 29.83 ± 5.93 | 59.50 ± 6.48 | 60.70 | 0.000 |

($P < 0.05$)。伤后第七天, 蜂蜜组 TGF β 1 的含量进一步下降, 空白对照组 TGF β 1 的含量仍然继续升

高, 两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组不同时间点血清 TGF β 1 水平的比较 (pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Serum TGF β 1 in groups (pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)

| 时间点 Time point | 蜂蜜组 Honey | 空白对照组 Control | t | P |
|-------------------|---------------|------------------|--------|-------|
| 第 1 天 day 1 | 129.61 ± 5.39 | 50.56 ± 4.81 | 400.82 | 0.000 |
| 第 3 天 day 3 | 154.05 ± 6.67 | 57.22 ± 5.44 | 537.48 | 0.000 |
| 第 5 天 day 5 | 104.58 ± 3.80 | 61.88 ± 4.82 | 183.08 | 0.000 |
| 第 7 天 day 7 | 37.25 ± 3.88 | 63.78 ± 4.65 | 86.62 | 0.000 |

3 讨论

根据国内外学者的研究认为, 皮肤创伤后的组织修复是一个复杂的过程, 从组织学角度看, 需要经历止血期、炎性浸润期、肉芽组织形成期、瘢痕形成期等不同时期的变化^[6]。从细胞学角度看, 皮肤组织修复的过程则是由多种细胞、细胞外基质和细胞因子参与并相互作用的过程^[6], 是一个复杂有序的生物学现象。其中, FGF₂ 是具有多种生物学效应的多功能细胞因子, 可以通过促进细胞有丝分裂, 起到调节细胞的生长、存活、分化和迁移的作用^[7]。当皮肤组织受伤时, 炎症细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞和角质细胞均可以分泌大量的 FGF₂, 参与皮肤组织创面修复^[8]。它可以趋化血管内膜各类细胞生长和血管内皮生长因子的产生^[8], 促进毛细血管再生。也正是由于新生毛细血管的出现, 使局部的血液循环得到改善, 从而有利于上皮细胞的快速增生, 促进上皮修复。如此同时, FGF₂ 还可以诱导细胞分泌组织重建所必需的多种酶, 例如胶原酶、蛋白水解酶和血浆酶原激活剂等, 催化细胞外基质的合成^[9]。总之, FGF₂ 在上皮修复、血管新生和肉芽组织形成中发挥着重要作用。而 TGF β 1 则是创伤愈合过程中重要的调控因子, 影响创面愈合的所有阶段^[10], 对皮肤组织和细胞具有不同的调控作用。TGF β 1 是在皮肤组织受伤后, 由血小板脱颗粒释放

到伤口周围, 并通过与细胞外基质结合而被激活^[11], 活化后的 TGF β 1 便获得了趋化单核细胞、中性粒细胞、成纤维细胞的能力, 以促进创面的炎性细胞大量浸润。反过来大量的炎性细胞又会产生和分泌更多的 TGF β 1, 它们之间相互作用和调节。TGF β 1 不仅对炎性细胞有趋化作用, 对上皮细胞也有趋化作用, 可以启动上皮细胞的分裂和增殖, 增加角质细胞表达特异角蛋白的活性^[12], 使创面能够被上皮组织覆盖而愈合。不仅如此, TGF β 1 还可以诱导成纤维细胞增殖并迁移至创面, 同时介导成纤维细胞合成胶原蛋白、弹性蛋白、整合素、蛋白多糖等多种细胞外基质成份, 并抑制基质降解酶的合成, 增强细胞外基质与细胞的结合能力^[13], 让肉芽组织纤维化, 使创伤愈合。由此可见, 倘若 TGF β 1 分泌过剩、表达过度则可引起细胞外基质的过度沉积, 导致病理性瘢痕的形成^[14]。

本研究设计的空白对照组未经任何处理, 是皮肤组织自然愈合过程, 其 FGF₂ 和 TGF β 1 含量的变化, 完全可以反映皮肤组织自然修复的规律。根据研究结果我们可以看到, 在创面自然愈合的 1~7 天中, FGF₂ 和 TGF β 1 的含量水平呈现出逐渐升高的状态。提示在皮肤组织自然愈合中 FGF₂ 和 TGF β 1 的调控作用呈逐渐加强的趋势。与对照组比较, 蜂蜜组 FGF₂ 和 TGF β 1 的含量则表现出快速增长至峰值, 之后快速下降的动态变化。充分说明蜂蜜在创

伤大鼠皮肤修复早期可以加速上调血清中 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的表达, 中后期可以抑制血清中 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的表达。出现这一结果的意义在于, 让我们从中看到了蜂蜜之所以能够促进创面愈合的重要原因。根据上述结果, 结合皮肤组织修复中 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的调控原理, 我们探讨蜂蜜促进皮肤修复的机制认为: 在创伤大鼠皮肤修复的早期, 由于蜂蜜能加速 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的大量分泌, 皮肤局部的含量增高, 在 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的强大作用下, 一是会加快炎性细胞的分泌和浸润, 以加强局部异物的清理, 提高创面抵抗细菌的能力, 从而预防创面继发感染, 为创面的愈合营造必备的环境; 二是会趋化血管内皮细胞和成纤维细胞的快速生长。正是因为血管内皮细胞的大量生长, 毛细血管再生的速度将加快, 而这些新生毛细血管可以与成纤维细胞一起共同形成肉芽组织, 向创面移行填塞伤口。同时这些新生毛细血管也为创面的供血提供良好的途径, 因此蜂蜜中的营养物质, 如葡萄糖、转化糖、转化酶及多种维生素、微量元素、氨基酸等^[15] 就能够被组织细胞充分利用, 为加速创面愈合奠定基础。不仅如此, 大量的 FGF₂ 和 TGF_{β1} 还能诱导成纤维细胞合成大量的细胞外基质, 加速肉芽组织的纤维化, 致使创面能提前愈合。三是会加速上皮细胞的分裂和增殖, 加快上皮组织覆盖创面的过程, 促进创面早期愈合。在创伤大鼠皮肤修复的中后期, 由于蜂蜜能抑制 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的分泌, 从而减弱了 FGF₂ 和 TGF_{β1} 的调控作用, 一方面可以减慢血管内皮细胞和成纤维细胞的生长, 继而减少肉芽组织的形成; 另一方面可以减弱对成纤维细胞合成细胞外基质的介导作用, 不会引起细胞外基质异常增多, 而导致细胞外基质过度沉积形成病理性瘢痕。因此蜂蜜具有很好的预防病理性瘢痕的功效。

鉴于本次研究的结果和上述分析可见, 蜂蜜在创伤大鼠皮肤修复中对 FGF₂ 和 TGF_{β1} 表达具有强大的调节作用, 早期可以促进其表达, 中后期可以抑制其表达。并通过发挥 FGF₂ 和 TGF_{β1} 对炎性细胞浸润、肉芽组织形成、上皮组织覆盖、细胞外基质合成的调节作用, 达到预防创面继发感染, 促进创面早期愈合, 阻止病理性瘢痕形成的目的。

参考文献

- Jull AB, Cullum N, Dumville JC. Honey as a topical treatment for wounds [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, 36: 231-245.
- Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi AA. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice [J]. *SCI World J*, 2011, 11: 766-787.
- Boo S, Daqnino L. Integrins as modulators of transforming growth factor beta signaling in dermal fibroblasts during skin regeneration after injury [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013, 2: 238-246.
- Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, et al. Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013, 2: 215-224.
- Wei XY(卫秀洋), Wang WM(王万明), Chen QJ(陈庆券). Progress of basic fibroblast growth factor in tissue repair [J]. *Orthopedic J China*(中国矫形外科杂志), 2011, 19: 1108-1110.
- Fu XB(付小兵), Wang DW(王德文). Modern Wound Repair Science(现代创伤修学) [M]. Beijing : People's Military Medical Publishing House, 1999: 14-22.
- Li XK(李晓康), Wang S(王舒), Yu Y(于杨), et al. Research progress of skin trauma repair [J]. *Chin J Dermato Venerol Integ Trad W Med*(中国中西医结合皮肤性病学杂志), 2016, 15(1): 62-65.
- Li B, Wang JHC. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement [J]. *J Tissue Viability*, 2011, 20: 108-120.
- Shi PN(史佩娜), Gao MN(高梦娜), Tao JM(陶键敏), et al. Progress in research on mechanism and treatment of skin trauma [J]. *J Zhejiang Med*(浙江医学), 2014, 36: 1349-1353.
- Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review [J]. *Int J Burns Trauma*, 2012, 2(1): 18-28.
- Choi J, Minn KW, Chang H. The efficacy and safety of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells: an update [J]. *Arch Plast Surg*, 2012, 39: 589-592.
- Sun GF(孙桂芳), Zhang XF(张晓芬), Chen YF(陈亚峰), et al. Research progress of treatment of skin wound repair [J]. *Med Recapitulate*(医学综述), 2015, 21: 3330-3331.
- Shi HX, Lin C, Lin BB, et al. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e59966.
- Li MY(李梦芸), Liu DW(刘德伍). The research of abnormal scar and the present situation in its prevention and treatment [J]. *J Prac Dermatology*(实用皮肤病学杂志), 2017, 10: 162-165.
- Wang CH(王春华). The effect of honey health care [J]. *Apicultural China*(中国蜂业), 2012, 63(2): 29-30.