



第十二次全国中西医结合疡科学术交流会

论文汇编

中国中西医结合学会疡科分会

天津市中医药研究院

2005年9月 昆明

20050206

第十二次全国中西医结合疡科学术交流会

论文汇编

中国中西医结合学会疡科分会

天津市中医药研究院

2005年9月 昆明

目 录

载药组织工程皮肤修复皮肤缺损的实验研究·····	李秀兰 张 杨 师宜健 (1)
载药组织工程皮肤体外生物学性能的研究·····	张 杨 李秀兰 师宜健 (3)
清营 I 号药物血清对血管内皮细胞生长因子 VEGF1 表达的影响 ·····	王 健 曹焯民 奚九一等(7)
120 例糖尿病足患者局部经皮氧分压与分期辨证对比分析 ·····	丁 毅 杨焕杰 吕培文 (9)
中药内外治疗对糖尿病足早期病变的影响·····	樊建开 徐兆东 仇 菲 蔡惠群 (13)
毒蛇咬伤的护理·····	余培南(17)
III-IV 度难愈褥疮临床观察·····	程艳华 胡 军 (20)
糖尿病足 163 例中西医结合治疗分析·····	王国华 王自辉 李佩琴 李红霞 (23)
“以色治色”法治疗色素障碍性皮肤病的初步研究·····	杨志波 (24)
疮疡治法方药的现代认识·····	王建平 李兰青 (27)
疮周辨证与疮周用药·····	刘 明 陈会苓 (31)
姜兆俊治疗外科急性感染经验·····	孙贻安 (32)
王旭老师谈躯体疾病辨证论治经验·····	王超凡 (35)
中药壳聚糖复合药膜治疗难治性皮肤溃疡 83 例 ·····	李令根 高 杰 赵 钢 陈文阁 (39)
中西医结合治疗糖尿病合并下肢坏死性筋膜炎 72 例分析·····	郑光儒 (41)
中西医结合治疗糖尿病坏疽 (DF) 56 例体会·····	马立人 指导崔公让 (43)
中西医结合治疗下肢静脉血栓形成 56 例·····	林丽梅 岑小兵 (44)
糖尿病坏疽临床治验·····	陈培红 袁 春 (45)
中西医结合治疗周围血管病体会点滴·····	范 可 (47)
中医疮疡热毒证患者血栓素的改变·····	王耀萍 (48)
论疮疡的辨病与辨证论治·····	杨 毅 (51)
中西医结合治疗巨大褥疮·····	张福军 肖 羽 (66)
中医辨证治疗疮疡 128 例疗效观察·····	贾鸿魁 (57)

内消外敷治疗急性阳证疮疡 36 例观察·····	方 晴 吴兰芬 (58)
神农解毒丹治疗眼镜蛇科蛇伤 264 例体会·····	余永志 余培南 (60)
修甲在甲沟炎的临床应用价值·····	汪明清 杜明国 李 胃 吴宏妍 马胜利 (62)
错位肛管皮肌松解术治疗肛裂临床疗效观察	
····· 李建中 吴胜利 施 捷 郭 震 沈 平 陈建明 朱 诚 龚 飞 (63)	
中医疮疡理论在肛周脓肿术后换药的应用体会·····	黄立功 秦素娥 (65)
生肌玉红膏在混合痔术后的应用体会·····	黄立功 秦素娥 (67)
紫草膏在妊产妇患肛门的疾病中的应用·····	赖仰雄 王天秀 (70)
亚急性甲状腺炎(瘰癧)的治验·····	许佩玲 蔡文墨 (71)
療疔膏内服治疗颈淋巴结核 87 例临床观察·····	冯 骏 汪志仿 (73)
乳增消痛贴治疗乳腺增生病气滞血瘀型临床疗效观察·····	宋阿凤 (73)
肉芽肿性乳腺炎诊疗现状·····	梁 栋 宋爱莉 (76)
中西医结合治疗乳晕部瘻管二例临床分析·····	何湘迎 何 波 (78)
女性痤疮患者中医证型与性激素水平关系研究·····	王海鹰 (79)
中药外洗治疗小儿过敏性紫癜 100 例临床观察·····	史 学 王 静 (81)
消疣煎治疗尖锐湿疣及电灼后抗复发的疗效观察·····	陈建明 李建中 (83)
针灸治疗带状疱疹实践探讨·····	程志英 丁秀云 (84)
中医治疗睾丸鞘膜积液 30 例·····	许百轩 (86)
中西医结合治疗阴茎硬结症·····	杨远贵 (87)
中西医结合治疗开放性骨折合并感染 27 例·····	谢 辉 赵 允 (88)
2 型糖尿病足溃疡中微血管和神经功能的相关作用·····	蔡惠群 (89)
下肢动脉硬化闭塞症的治疗·····	张秀梅 (93)
中医中药治疗前列腺炎症侯群的研究进展·····	孙治林 (94)
中西医结合治疗消化性溃疡的临床体会·····	古远明 (98)

载药组织工程皮肤修复皮肤缺损的实验研究

天津市天津医院骨科研究所 李秀兰 张杨 师宜健 (300211)

皮肤具有复杂的生理结构和多种重要生理功能,当皮肤遭受严重烧伤、创伤、感染及糖尿病顽固性皮肤溃疡等损害时,大面积皮肤缺损的修复与重建成为棘手的难题。尤其是在皮肤这种半开放创面上如何有效解决移植感染问题将是组织修复领域的研究焦点。本研究旨在将生肌液这一高效免疫激活因素与载体支架复合后构建细胞—载药载体复合物,使生肌液发挥对 KC 及 FB 的促增殖作用,加强局部抗感染能力,激活多种免疫活性细胞和活性物质,促进新血管和肉芽组织再生的能力,从而有效缩短皮肤缺损的愈合过程,为皮肤损伤的治疗探索一条新途径。

一.材料方法

1. 自制高 0.3cm、直径 1.5cm 的胶圈,蒸馏水冲洗去除杂质,灭菌后备用。
2. 人工猪皮(猪皮基质材料)、非载药支架—基质材料(明胶:壳聚糖二 1:1)中不含牛肌液、1:5 载药支架—基质材料中含牛肌液浓度为 100mg/ml、1:8.5 载药支架—基质材料中含生肌液浓度为 60mg/ml,分别修剪成 1.3cm 直径的圆片,Co⁶⁰照射消毒。
3. 自体分离的第 3 代 KC、FB 分别消化为单细胞,加兔血清终止消化,加入少许培养液吹打均匀,1000rpm/min 离心 5 分钟,弃去上清液,两种细胞混合后加入同窝兔血清 3ml,配制成 1×10^6 个/ml 的细胞悬液待用。
4. 纯种同窝大耳白兔 7 只,兔龄 100 天左右,体重 1.7 ± 0.2 公斤,0.1mg/kg 复方氯胺酮麻醉后,背部去毛备皮,常规消毒,延脊柱两侧制作直径 1.5cm 的圆形缺损创面,每侧 2 个,清除皮下组织直至肌层,将胶圈卡于缺损位置防止周围皮肤向创面内收缩。
5. 28 个创面随机分为 6 组:阴性对照组—非载药支架贴附于创面后滴加 60 μ l 生理盐水;细胞+生肌膏组—创面接种 60 μ l 细胞悬液后以生肌膏油膏覆盖;人工真皮组—脱细胞真皮基质材料贴附于创面后接种 60 μ l 细胞悬液;细胞+非载药支架组—非载药支架贴附于创面后接种 60 μ l 细胞悬液;细胞+1:5 载药支架组—1:5 载药支架贴附于创面后接种 60 μ l 细胞悬液;细胞+1:8.5 载药支架组—1:8.5 载药支架贴附于创面后接种 60 μ l 细胞悬液,伤口加压包扎。术后 3 天再进行一次细胞接种,隔日换药。
6. 观察各组创面愈合情况,并分别于术后 7 天、10 天取材,从细胞水平上考察皮肤缺损的修复。
7. 术后 10 天去掉所有胶圈,3 天后观察创面直径,比较各组创面收缩情况。

二.结果

1. 人体观察:术后 3 天,材料维持原形,人工真皮组基质收缩;细胞+生肌膏组有少量脓液,可见少量肉芽组织;其余各组均有轻微炎症反应,但材料与创面贴附较好,基本无排斥现象。7 天时材料较硬,除阴性对照外各组均有肉芽组织出现,材料与创面结合紧密;载药组仍有炎症反应,细胞+生肌膏组创面脓液增多。10 天时载药组出现大面积肉芽组织,阴

性对照组结缔组织增生明显。

2. 创面收缩情况比较: 去除胶圈后 3 天, 各组创面直径均值如下(因例数过少不适于进行统计学处理):

组别	均值(cm)	标准差(cm)
阴性对照组	0. 93	0. 21
细胞+生肌膏组	0. 63	0. 21
人工真皮组	0. 93	0. 15
细胞+非载药支架组	0. 83	0. 16
细胞+1:5 载药支架组	0. 60	0. 29
细胞+1:8.5 载药支架组	0. 63	0. 10

大体观察, 各组创面均有不同程度的收缩

3. 组织学观察:

(1)7 天时材料大部分未降解, 无论是支架材料还是脱细胞真皮都有炎细胞浸润。

(2)10 天时观察创面局部修复情况, 阴性对照组、人工真皮组、非载药支架组均有炎性肉芽组织增生, 无表皮组织形成; 细胞+生肌膏组有部分上皮形成; 载药支架组形成接近成熟的上皮组织及幼稚的真皮组织。

三. 讨论

针对大面积皮肤缺损, 人们应用了许多技术和方法来提高自体皮的扩展倍数, 但由于缺乏真皮结构, 造成创面愈合时间长、愈合质量差、瘢痕形成严重、远期创面反复溃破、起水疱等, 影响机体的外观和功能。研究表明, 真皮结构不仅仅提供牢固的机械保护、改善创面愈合的外观和质地, 而且对上皮细胞生长分化以及胶原纤维再生起着相当重要的作用。真皮的基底膜成分可促进表皮真皮交界区正常结构的形成, 促进上皮细胞的生长和分化: 可促进 FB 合成分布合理的新生胶原组织, 防止瘢痕的过度增生。因此, 为获得良好的创面愈合质量真皮结构的构建即显得极为必要。在所构建的组织工程化皮肤中, 真皮 FB 的纳入, 对移植成功起到了不可忽视的作用。首先, FB 能分泌一些生长因子如成纤维细胞生长因子(FGF), 为 KC 增殖、分化和成熟提供了有利条件, 故表皮增厚明显, 基底膜形成早。FGF 还可以作为血管生长因子, 能够诱发新生毛细血管的生长, 促进愈合和组织修复。其次, FB 不断的合成胶原、纤粘连蛋白、蛋白多糖、氨基葡聚糖等生物活性物质, 促进创面的愈合; 通过调节 ECM 合成和降解, 加速胶原纤维的重塑。由 FB 合成分泌的网状和乳头状胶原蛋白与基质网架成分, 其主要作用是承受机械强度、弹性和韧性。这是组织工程皮肤不可缺少的重要组成部分。Hansbrough 等报道的方法是先移植 FB, 再移植 KC。为克服上皮细胞与 FB 不同步移植的缺点, 我们在体外培养皮肤 KC 与 FB, 并传代扩增, 使之达到接种生物材料的细胞量, 然后同时种植到自体创面。这种同步移植 KC 和 FB 的方法, 可减少因多次操作而造成移植物感染的机率。

Lan grant 等报道, 有效控制感染是决定移植物创面接收率的关键因素。生肌液的原剂型

一生肌象皮膏在临床上治愈了大量难以愈合的感染性创面，表现为伤口愈合快、抗感染力强、创面脓液多、愈合后瘢痕组织松软，其作用机制包括：提高微血管的通透性、改善局部微循环；构成体内网络调节体系：诱导创面局部活性物质的自分泌和旁分泌；维持创面微环境平衡构成体内网络调节体系。本研究采用明胶—壳聚糖支架材料复合不同浓度的生肌液成功构建载药组织工程支架，不但为种子细胞的生长提供有效的三维空间，并在生肌液的作用下，KC 与 FB 获得最大量的增殖。而且生肌液作为一种免疫激活剂，还可促进创面附近淋巴细胞和巨噬细胞迅速活化，释放大量的免疫活性物质和细胞因子如：TNF- α 、FGF、TGF、FN、PDGF 等，共同参与并加强了局部和整体的体液免疫和细胞免疫功能，构成含有人量免疫活性物质具有高活性的微环境；在高活区内纤维结合蛋白(FN)及其它活性因子相互调节，激活 FB 并促进其增殖和 I、III 型胶原在 mRNA 水平上的表达，进而加速肉芽组织形成；各种细胞因子联合作用，对种子细胞的增殖及创面的上皮化进程有明显的促进作用。这种刺激因素具有细胞因子的调节作用，且较细胞因子更为安全，更适合作为在体诱导因素使用。

正常表皮由基底层、棘细胞层、颗粒层、透明层、角质层构成，基底层细胞不断分裂，部分细胞向上推进，形成其余各层。创面修复实验结果显示新生组织中各层细胞排列规则，符合与正常表皮的结构特征，证明应用本研究的方法构建细胞—载药载体复合物应用到皮肤缺损疮面能够达到快速、完全的修复目的。

在组织工程皮肤的研制中，制造一个模拟人体内微环境的由多种生长因子构成的网络调控体系尚存在相当大的难度。本研究采用自体皮肤细胞分离获得种子细胞，无免疫原性，不会被机体免疫系统所排斥；种子细胞中既包括 KC，又包括 FB，为双层皮肤结构的构建提供可能。将生肌液这一高效免疫激活因素与载体支架复合后构建细胞—载药载体复合物，使种子细胞在生肌液与明胶—壳聚糖支架材料构建的复合支架中增殖，与创面组织中存在的粘附因子相互作用，载体修复皮肤损伤；生肌液不但对 KC 及 FB 的增殖具有明显促进作用，还可加强局部抗感染能力，激活多种免疫活性细胞和活性物质，构成具有高活性的微环境体系能够在最短时间内有效扩展皮肤缺损处的覆盖面积，从而缩短皮肤缺损的愈合时间，为皮肤损伤的治疗探索一条新途径。

载药组织工程皮肤体外生物学性能的研究

天津市天津医院骨科研究所 张杨 李秀兰 师宜健 (300211)

皮肤作为人体最大的器官，具有复杂的生理结构和多种重要生理功能。当皮肤遭受严重烧伤、创伤、感染及糖尿病顽固性皮肤溃疡等损害时，大面积皮肤缺损的修复与重建成为棘手的难题。本研究旨在利用自体皮肤细胞分离获得的种子细胞，短时间扩增，将生肌液这一高效免疫激活因素与载体支架复合后构建细胞—载药载体复合物，使种子细胞在生肌液与明胶—壳聚糖支架材料构建的复合支架中增殖，构建载药组织工程皮肤，为皮肤损伤的治疗探索一条新途径。

1 材料方法

1.1 生肌液对皮肤种子细胞增殖的影响

1.1.1 配置条件培养液: 培养液原液(MEM 含 10%FBS)、1:40 生肌液(培养液中生肌液浓度为 10mg/ml)、1:60 生肌液(培养液中生肌液浓度为 8mg/ml)、1:100 生肌液(培养液中生肌液浓度为 5mg/ml)、1:60 当归提取液(培养液中当归浓度为 8mg/ml)、1:60 生地提取液(培养液中生地浓度为 8mg/ml)、EGF(培养液含 EGF10ng/ml)

1.1.2 第 3 代角质形成细胞(KC)、成纤维细胞(FB)分别消化成为单细胞, 调细胞浓度为 4×10^4 个/ml, 接种于 96 孔板, 每组平行 5 孔。培养 1 天待细胞完全贴壁后更换条件培养液。

1.1.3 条件培养液培养 1、3、5、7 天分别进行 MTT 检测: 吸去孔中液体, 每孔加入 5mg/ml 的 MTT50 μ l, 37℃ 孵育 4 小时。弃去孔中所有 MTT, 每孔加入 100 μ l 二甲基亚砜, 振荡混合, 以未接种细胞的孔作为空白对照测定 570nm 的吸光度值。

1.1.4 所得数据以 SPSS 软件进行统计学处理。

1.2 载药支架对细胞粘附的影响

1.2.1 5 种材料(非载药支架—基质材料中不含生肌液、1:5 载药支架—基质材料中含生肌液浓度为 100mg/ml、1:6 载药支架—基质材料中含生肌液浓度为 80mg/ml、1:8.5 载药支架—基质材料中含生肌液浓度为 60mg/ml、1:12 载药支架—基质材料中含生肌液浓度为 40mg/ml)分别修剪成 1.3cm 直径的圆片, Co^{60} 照射消毒, 放置于 24 孔板中。

1.2.2 第 3 代 KC、FB 分别消化成为单细胞, 调节细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 接种于带载体的 24 孔板。

1.2.3 每隔 3 天更换新培养液, 分别于培养 7 天、14 天取材, 石蜡包埋后作普通病理切片, HE 染色后计数每个高倍视野(400 倍)中细胞数, 每个标本观察 6 个视野, 计数平均值, 作半定量检测。

1.3 细胞与载药载体支架的生物相容性—组织学与扫描镜观察

1.3.1 非载药支架、1:5 载药支架、1:8.5 载药支架 Co^{60} 照射消毒, 在 6 孔板中分组放置。

1.3.2 第 3 代 KC 以常规方法消化成为单细胞, 调细胞浓度为 2×10^5 个/ml, 接种于 6 孔板, 每隔 3 天更换新培养液。

1.3.3 分别于 4 天、7 天、14 天取材, 电镜固定液固定过夜, 50%、75%、95% 无水乙醇逐级脱水、真空干燥, 分别进行扫描电镜观察和皿染色。

2. 结果

2.1 生肌液对皮肤种子细胞增殖的影响

2.1.1 KC: 除 EGF 组外其余各组增殖曲线形状一致, EGF 组第 1 天时显著升高, 与对照组有显著性差异($P < 0.01$); 中低浓度生肌液组 3、5、7 天升高, 与对照组均有显著性差异($P < 0.05$) 生地提取液组 5、7 天均高于对照组, 有显著性差异($P < 0.01$); 当归提取液组 1、3 天明显下降, 与对照组有显著性差异($P < 0.05$); 两种单味药与生肌液组方升高的时间点不同步。

2.1.2 FB: 当归、生地提取液组第 1、3 天时升高, EGF 组第 1 天时升高, 均与对照组有显著性差异($P<0.05$): 中低浓度的 3 个生肌液组 4 个时间点均升高, 其中 1:80 组 1、3、7 天均与对照组有显著性差异($P<0.05$); 高浓度组在第 1 天时稍有下降, 但无统计学差异(表1)。

表 1: 刺激因素对 FB 增殖的影响($n=5$)

		原液	1:40	1:60	1:80	1:100	当归	生地	EGF
1 天	平均值	0.271	0.251	0.318.	0.310.	0.313.	0.329*	0.306*	0.326*
	标准差	0.019	0.008	0.015	0.019	0.012	0.010	0.021	0.013
3 天	平均值	0.374	0.430	0.385	0.384	0.388	0.430	0.411	0.372
	标准差	0.012	0.020	0.034	0.024	0.027	0.028	0.024	0.018
5 天	平均值	0.554	0.590	0.624	0.652*	0.649*	0.574	0.599	0.595
	标准差	0.026	0.026	0.076	0.025	0.011	0.019	0.041	0.023
7 天	平均值	0.943	0.960	1.056	1.121.	1.106	0.840	0.841	0.966
	标准差	0.041	0.055	0.113	0.117	0.078	0.016	0.022	0.041

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$

2.2 载药支架对细胞粘附的影响

载药材料组, 特别是中等浓度组细胞获得较多增殖(表 6)。

表 6: 细胞在载体上增殖半定量检测试验

	KC		FB	
	7 天	14 天	7 天	14 天
椎载药支架	+	+	+	++
1:5 载药支架	+	+	++	+++
1:6 载药支架	++	+++	+++	+++
1:8.5 载药支架	+++	+++	+++	++
1:12 载药支架	++	++	++	++

+ 每个高倍视野(400 倍)中细胞数 0-5 个

++ 每个高倍视野(400 倍)中细胞数 5-10 个

+++ 每个高倍视野(400 倍)中细胞数 10 以上

2.3 细胞与载药载体支架的生物相容性—组织学与扫描镜观察

2.3.1 HE 染色结果: 无论材料是否载药, KC 大部分在材料表面生长, 形态良好, 药物对细胞无明显毒性作用细胞

2.3.2 扫描电镜观察: 细胞在载体表面及孔隙中生长, 与材料紧密贴附, 细胞形态良好。

3.讨论

皮肤损伤修复是细胞、基质、细胞因子共同参与的一个极其复杂的生理过程, 细胞、基质、细胞因子构成了创面修复的三大网络系统, 它们的互相协同、拮抗和反馈作用维持机体内环境的稳定, 推动创面修复的生理进程。应用组织工程方法修复创面的关键在于种子细胞

能够在损伤区域大量增殖，如何使种子细胞在短时间内大量扩增至所需数目是组织工程的一大难点。人们试图以补加刺激因素如细胞因子的方法来加速其增殖。有研究证明，相同的细胞因子在不同条件下作用不同，同一细胞因子可作用于多种细胞，两种或两种以上细胞因子联合使用优于单一细胞因子作用，粗提品比纯化细胞因子作用更佳，还发现高浓度的细胞因子可引起局部组织过度增生和致癌现象。可以肯定创面修复的细胞因子网络中任何一种细胞因子的缺失和过度均会造成机体内环境失衡而对皮肤损伤的修复产生负面影响。

本实验采用生肌液作为刺激因素，是中医传统外用中药生肌象皮膏的原料药制备而成。研究证明，生肌膏作用于创面后大大提高创面愈合速度、防止瘢痕组织过度增生。究其作用机制，它首先是一种良好的免疫激活剂，激活中性粒细胞进入伤区，并释放一氧化氮和溶菌酶为主的杀菌物质，形成酸性微环境；其次，促进淋巴细胞和巨噬细胞迅速活化，释放大免疫活性物质和细胞因子如：TNF α 、FGF、TGF、FN、PDGF 等，共同参与并加强了局部和整体的体液免疫和细胞免疫功能，构成含有大量免疫活性物质具有高活性的微环境；第三，在高活区内纤维结合蛋白(FN)及其它活性因子相互调节，激活 FN 并促进其增殖和 I、III 型胶原在 mRNA 水平上的表达，进而加速肉芽组织形成；第四，各种细胞因子联合作用，对 KC 的增殖及创面的上皮化进程有明显的促进作用。

对于生肌液原料药中的君药—当归和生地，分别提取了其中的有效成分，与不同浓度的生肌液、表皮生长因子分别进行促细胞增殖作用的比较，结果表明：对于 KC，EGF 的作用在增殖前期占据优势，后期则处于明显劣势；生地提取液则相反，在后期发挥了强大的作用；当归提取液对于该细胞的增殖促进作用不明显；所选择浓度范围的生肌液在整个细胞增殖周期中均持续稳定地发挥作用。对于 FB，EGF 不仅作为 KC 分化增殖的刺激因子，对 FB 增殖同样有效；生地提取液、当归提取液的作用可持续到中期；高浓度的生肌液对于整个生长周期多有轻微的抑制作用，而合适浓度范围的生肌液在整个细生长中均持续稳定地发挥促进作用。综合分析生肌液对于两种细胞的促增殖作用，目前还不能明确到底是其中哪一种因素起决定性作用，这与细胞因子作用与相对应的组织细胞相类似，应考虑是各种组分相互协同、拮抗、调节而形成的一个相对稳定的调控体系。生肌液及各原料药成分分析也表明，组方药并不是各原料药成分单纯堆砌而成，包括有机物含量、溶液中离子浓度、及各种微量元素含量都不是机械的加成关系。在组方药的提取制备过程中，各原料药有机结合，相互作用，构成了生肌液这种可发挥细胞因子作用的天然非生物源性材料。

相对于单纯应用细胞因子，生肌液作为种子细胞的刺激因素具有明显优势：原材料来源相对容易，价格低廉；作用持久而广泛，在细胞增殖的各个时期均发挥作用；可刺激细胞的自分泌和旁分泌功能，聚集大量细胞因子，为组织的修复提供良好的微环境；较细胞因子更安全，将具有极为广阔的临床应用前景。

随着组织工程技术的发展，构建皮肤组织已成为皮肤损伤治疗的新途径。理想的皮肤替代物应具有表皮和真皮两层结构，两者之间连接紧密。组织工程的皮肤替代物应在 1-2 周内获得，手术中便于操作，移植到创面后很快即与创面良好贴附，其中表皮和真皮成分能尽快

完成自身增殖、分化和功能成熟,形成更接近于生理的永久性的皮肤替代物。目前,皮肤组织工程的困难在于:以何种形式移植 KC;在何种状态时移植;真皮成分中 KCM 的选择,它既要有效地促进 KC 和 FB 的增殖功能,又要能诱导创面基底的纤维血管组织长入,而且要在新生皮肤成熟后自动降解,整个过程中无炎症反应。

本研究所采用的基本真皮结构物为明胶—壳聚糖复合支架材料,在此基础上复合了不同浓度的生肌液成功构建载药组织工程皮肤支架。发现这种支架不但为种子细胞的生长提供有效的生长空间,而且在生肌液的作用下, KC 与 FB 获得增殖。考察发现,载药支架与非载药支架相比,无论在细胞增殖程度还是在生物相容性方面均占明显优势。种子细胞—载药支架复合物的 MTT 检测结果表明:生肌液对细胞增殖的作用具有一定的量效关系和时效关系, KC 与 FB 结果一致。最适量的生肌液作为一种高效的免疫活性促进剂,还可刺激 KC、FB 的自分泌和旁分泌功能。组织学与扫描电镜结果显示,与材料复合的 KC 在体外培养过程中保持了良好的生长特性与增殖潜能,细胞均无形态改变且与支架材料均有良好的附着。

载有生肌液的明胶—壳聚糖复合支架满足了对基质材料的要求,具有一定三维结构、有效地促进 KC 和 FB 的粘附、增殖和功能表达,能够在一定时间内自动降解,和一定的抗炎作用,其中所含刺激因素与 EGF 等细胞因子相比价格低廉,安全性更高。KC、FB 与载药支架复合构建的细胞—载药支架复合物的研究与开发将有希望满足临床修复大面积皮肤损伤的要求。

清营 I 号药物血清对血管内皮细胞生长因子 VEGF1 表达的影响

王健¹曹焯民¹奚九一¹鲁培基¹王海杰²

1.上海市中西医结合医院脉管病研究所(200082)

2.复旦大学医学院组织胚胎学系

血管内皮生长因子(VEGF)是一个高度特异作用于血管内皮的细胞因子,它可能与深静脉血栓形成后内皮细胞修复过程有关。本实验采用免疫组织化学法研究清营 I 号药物血清对血管内皮 VEGF 表达的影响,探讨清营 I 号方对 VEGF 在深静脉血栓形成后修复过程中可能发挥的作用。

1.材料与方法

1.1 主要材料

健康新西兰兔 30 只,雌雄各半,体重 2.5—3.0Kg,购自中国科学院上海实验动物中心。合格证编号:中科动管 003 号。清营 I 号方(牛角片、益母草、大黄等,总重计 45 克)饮片,丹参饮片(总重计 15 克)由本院中药房提供。均按水提法制备成注射液(含生药 1g/ml)。人脐静脉内皮细胞株由复旦大学医学院解剖与组织胚胎学系细胞中心提供。MTT 购自美国 sigma 公司。DMSO 购自上海实业生化试剂公司。MTT 溶液的配制:将 MTT 用 0.01ml/LPBS(PH7.2)配成 5g/L,过滤除菌,放 4℃冰箱内避光保存。

1.2 含药血清的制备

新西兰兔 30 只, 分笼喂养 1 周后, 随机分为清营 I 号组, 丹参对照组和空白对照组。清营 I 号组、丹参对照组均按体型系数折算兔用药量, 经耳缘静脉缓慢注射。清营 I 号组于 2h 后, 丹参对照组 1 h 后分别将兔用 3% 戊巴比妥钠麻醉后, 腹主动脉插管取血, 4℃ 冰箱过夜后, 2500rpm 离心 25min, 抽取血清, 经 56℃ 水浴 30min 灭活补体。0.22μm 滤器过滤除菌后分装, -20℃ 保存备用。

1.3 人脐静脉内皮细胞株(ECV)培养及分组 ECV 细胞采用含 10% 胎牛血清培养液, 5% CO₂ 饱和湿度、37℃ 培养箱内培养。当细胞长至 80% 满时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 和 0.02% EDTA 混合消化液消化静脉内皮细胞, 收集细胞, 离心 1000r/min, 10min。加入含有 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, PBS)的 MEM(minimum essential medium), 混悬细胞。将细胞接种于 96 孔培养板, 培养 24h。当细胞生长接近形成单层时, 加入中药血清, 继续培养 24h。实验分 FBS 组、正常兔血清(rabbit serum, RS)组、丹参血清(rabbit danshen serum, RDS)组和清营 I 号血清(rabbit QingyingNO.1 serum, RQS)组。每组再分 5%、10% 和 15% 三种浓度(其中丹参血清组和清营 I 号血清组 5% 和 10% 浓度均用正常兔血清补齐)。每组 16 孔。重复 4 次实验。细胞鉴定。用荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白吞噬实验, 抗第Ⅷ凝血因子相关抗原抗体免疫荧光染色。UEAI 植物凝血素免疫荧光染色和硝酸银染色法鉴定。

1.4 方法 免疫组织化学检测清营 I 号药物血清对 HUVEC 细胞 VEGF 表达的影响 将内皮细胞接种于 6 孔培养板, 每孔内置一大小为 1.5cm² 的盖玻片, 每组 3 张玻片, 培养 48h 细胞长至融合, 密闭无菌条件下, 培养板内灌注 99.99% N₂, 流量 6-8L/min, 持续 10min 后, 按不同分组给药, 再孵育 24h 后取出盖玻片, PBS 洗 3 次, 丙酮室温固定 8min, -20℃ 保存备用。按博士德公司推荐的免疫细胞化学 SABC 法检测 VEGF 表达, 一抗为 VEGF 兔抗血清, 二抗为山羊抗兔 IgG, DAB 室温显色, 镜下控制反映时间, 蒸馏水洗涤。以 PBS 代替一抗作阴性对照。显微镜下, 细胞胞浆中具有棕褐黄色颗粒者为阳性细胞。应用美国 Met Morph 图象分析软件对 EC 阳性染色玻片进行半定量分析, 在相同放大倍率(×200)下, 通过摄像机摄取图象显示于荧光屏上, 选择颜色喷枪确定阳性表达细胞, 经主机读取阳性染色区域所占的像素点, 平均计值后换算为面积(μm²)。

1.5 统计学处理 采用 stata 统计软件中的 t 检验进行分析。

2.结果

清营 I 号药物血清作用后, 15% RQS 浓度组对 HUVEC 的 VEGF 表达较 10%、15%、5% RS 组明显增加。15% RDS 组也较 5%、10%、15% RS 组明显增加。而 RQS 组与 RDS 组比较无差别。同种浓度 RQS、RDS 组亦较 RS 组显著增加。

表 1 RQS 对 HUVEC 细胞 VEGF 水平的影响(x±s)

组别	n	VEGF 阳性面积		
		15%	10%	5%
RS	6	284.13±171.14	251.11±158.71	224.71±112.67
RDS	6	1567.04±782.80 ^{##}	1381.82±614.43 ^{##}	1073.62±698.65 [#]
RQS	6	1718.66±654.51 ^{##}	1641.50±572.97 ^{##}	1204.78±609.40 ^{##}

注: [#]与 RS 组比较 P<0.05, ^{##}与 RS 组比较 P<0.01

3.讨论

血管内皮细胞增殖与凋亡受多种因素的影响,其中 VEGF 能促进血管内皮细胞增殖,抑制血管内皮细胞凋亡,是决定血管内皮细胞存亡的重要因素之一。有研究采用益气活血中药黄芪及其组方可促进人脐静脉内皮细胞 VEGF 表达。本研究采用清营凉血泻瘀中药观察其对内皮细胞 VEGF 的影响。目前尚无类似报道。研究显示清营 I 号药物血清对 HUVEC 细胞 VEGF 表达水平有促进作用。提示清营 I 号方对 HUVEC 细胞增殖的促进作用,可能是通过上调 VEGF 表达而实现的。同时表明,益气活血中药有促进内皮细胞 VEGF 表达作用,不难理解;而采用清营凉血泻瘀中药同样具有促进 VEGF 的表达,提示血管内皮细胞活性成分受多因素的影响。

VEGF 的主要生物学活性有:①VEGF 能促进内皮细胞的增殖;②VEGF 能增加血管的通透性;在成年组织中,维持毛细血管相邻内皮的通透性是 VEGF 主要功能之一。③VEGF 还能改变细胞外基质,使其更易于血管的生长。本组相关实验已证实,清营 I 号药物血清能够促进内皮细胞活性,促进内皮细胞的增殖;结合临床研究证实清营 I 号方能够短期内缓解深静脉血栓形成患者肢体高度肿胀,推测清营 I 号方可能是通过上调 VEGF 表达水平,进而增加血管的通透性而发挥作用。是其机理之一。

120 例糖尿病足患者局部经皮氧分压与分期辨证对比分析

首都医科大学附属北京中医医院外科 丁毅 杨焕杰 吕培文(100010)

我院吕培文教授自 2001 年到 2004 年在北京地区进行了多中心大样本的糖尿病足辨证分析,以局部辨证为主,辅以整体辨证,衷中参西,将糖尿病足分为三期五型:未溃期①肝肾阴虚,筋脉失养②气虚血瘀,脉络阻滞;已溃期①阴虚湿热,肉腐成脓②脾肾阳虚,髓枯骨损;溃后期气血阴阳俱虚。取得一定成果。笔者在 2002 年到 2004 年将本院外科观察的 120 例糖尿病足患者进行了经皮氧分压的检测,将检测结果与辨证分型进行分析对比,报告如下。

1.临床资料:

1.1. 一般资料:120 例(144 条肢体)糖尿病足患者中,男性 68 例,女性 52 例;双侧病变者 24 例;年龄最大 85 岁,最小 40 岁,其中 40-60 岁 19 例,60-80 岁 89 例,80 岁以上 12 例,平均年龄 68.4 ± 9.5 岁;按职业划分比重由高到低依次为:工人 62 例,干部 27 例,技术人员 14 例,无业人员 10 例,农民 7 例。

糖尿病病史:糖尿病病程最长 40 年,最短为入院后确诊,平均病程 11.5 ± 7.5 年,1 年内者 9 例,1-5 年者 18 例,5-10 年者 36 例,10-20 年者 46 例,大于 20 年者 11 例。

病变部位:左下肢 10 例,左足 41 例,右下肢 6 例,右足 37 例,双下肢 8 例,双足 16 例;其中足趾病变 51 例,足底 27 例,足背 24 例,足跟 15 例,踝部 3 例。

并发症:伴动脉硬化 103 例,高血压 87 例,眼病 71 例,脑梗 18 例,冠心病 56 例,肾病 21 例,高脂血症 34 例。

破溃诱因：足癣 30 例，足畸形 17 例，胼胝 16 例，糜烂 12 例，磨擦伤 21 例，修剪不慎致伤 7 例，自发性溃疡 8 例，烫伤 9 例，其它 9 例。

1.2.病例选择：病人均符合 1995 年 10 月中华医学会糖尿病学会第一届全国糖尿病足学术会议讨论和意见之诊断 [李仕明整理，糖尿病足(肢端坏疽)检查方法及诊断标准(草案)，Chinese Journal of Diabetes, May 1996, Vol. 4, No 2]。患者 0 级(高危足)37，I 级 18 例，II 级 26 例，III 级 20 例，IV 级 12 例，V 级 7 例。局部分期标准：根据中医外科传统疮疡分期法及糖尿病足自身局部表现的特点分为未溃期足、已溃期足及溃后期足；将所有 120 例患者按三期分为三组，其中未溃期足 32 例，已溃期足 67 例，溃后期足 21 例。此 120 例患者均为吕培文主任糖尿病足辨证分析课题患者，其辨证分型归为：

表 1

分期	未溃期组		已溃期组		溃后期组
分型	肝肾阴虚， 筋脉失养	气虚血瘀， 脉络阻滞	阴虚湿热， 肉腐成脓	脾肾阳虚， 腱枯骨损	气血阴阳俱 虚
患者数	18 例	14 例	51 例	16 例	21 例

2.检查分析方法：

2.1. 经皮氧分压的测定：选择距创面最近的完整皮肤并避开角质层，矫正数值后将探头置于所选区域测量经皮氧分压。

2.2.分析方法：将三组患者测定经皮氧分压后以 5mmHg 为跨度分别做出频数表并描记图形，根据图表与辨证分型对比分析。

2.3. 统计分析应用 SPSS10.0 软件完成。

3.分析结果：

3.1.三组经皮氧分压频数表如下：

表 2 未溃期组(mmHg)(32 例)

氧分压值	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	40-
患者频数	0	1	1	2	9	3	3	9	4

表 3 已溃期组(mmHg)(67 例)

氧分压值	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	40-
患者频数	1	3	6	4	8	18	15	7	5

表 4 溃后期组(mmHg)(21 例)

氧分压值	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	40-
患者频数	0	0	2	3	3	8	3	1	1

3.2.将以上患者频数带入到各组的辨证分型中见下表:

表 5 未溃期组(mmHg)(32 例)

氧分压值	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	40-
肝, 肾阴 虚, 筋脉失 养 18 例患 者频数					2	1	3	9	4
气虚血瘀, 脉络阻滞 14 例患者 频数		1	1	2	7	2	1		

表 6 已溃期组(mmHg)(67 例)

氧分压值	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	40-
阴虚湿热, 肉腐成脓 51 例患者 频数				1	6	17	15	7	5
脾肾阳虚, 髓枯骨损 16 例患者 频数	1	3	6	3	2	1			

表 7 溃后期组(mmHg)(21 例)

氧分压值	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	40-
气血阴阳 俱虚 21 例 患者频数	0	0	2	3	3	8	3	1	1

3.3.从两方面整理表 5—表 7

3.3.1. 整理各证型经皮氧分压均数并作对比检验

表 8

分期	未溃期组		已溃期组		溃后期组
分型	肝肾阴虚, 筋 脉失养 18 例	气虚血瘀, 脉 络阻滞 14 例	阴虚湿热, 肉 腐成脓 51 例	脾肾阳虚, 髓 枯骨损 16 例	气血阴阳俱 虚 21 例
经皮氧分压	35.7±9.5	24.7±7.8	31.1±13.2	12.5±5.9	26.7±8.6

经方差检验各组内分型之间经皮氧分压数值有明显差异($p<0.01$)

3.3.2. 整理各分型中经皮氧分压频数较集中区域患者数与各型患者数对比

表 9

分期	未溃期组		已溃期组		溃后期组
分型	肝肾阴虚, 筋脉失养 18 例	气虚血瘀, 脉络阻滞 14 例	阴虚湿热, 肉腐成脓 51 例	脾肾阳虚, 腱枯骨损 16 例	气血阴阳俱虚 21 例
氧分压集中区域患者数	13	11	40	12	15

根据卡方检验两组无明显差异($P>0.05$)

4. 结论与探讨

4.1. 立题思路

糖尿病足的中医辨证分型多年来一直未得到统一的标准, 笔者认为其中重要的原因之一就是缺乏客观指标的支持和佐证。近年来研究证实, 糖尿病足的发生发展与糖尿病微循环病变有密切关系, 许多微循环的检查应用于糖尿病足的检查研究中。其中经皮氧分压检测日益引起人们的注意。经皮氧分压(Transcutaneous Oxygen Pressure TCP02)测定是将加热的氧敏电极置于拟检测部位来测定局部组织氧分压, 了解组织血液灌注情况。1967 年, Evans 首先报道应用无创伤方法检测皮肤动脉氧。最初, 主要用于新生儿学, 麻醉学, 以后逐渐扩展至产科, 整形外科及其它学科, 1978 年 Tonnesen 首先报道将此技术应用于下肢血管疾病的诊断。现在 TCP02 的检测已成为下肢动脉缺血性疾病检查的重要手段之一。随着 TCP02 应用的扩展, 其也应用于截肢平面选择及溃疡或坏死愈合可能性估计。TCP02 测定可为下肢是否出现缺血性坏死或溃疡, 选择截肢平面提供理论依据。TCP02 近年也应用于微血管病的判定。应用传统的无创伤实验室检查方法如踝血压检测、脉搏记录等难以对皮肤的微血管状态作出准确的评估。但是, 一些疾病的进展仅造成毛细血管阻塞, 却并不影响大血管的通畅性, 这时, 除了对微血管状态进行特殊的评估, 这类疾病难以诊断。对此, TCP02 检测在该领域中的应用显得尤其具有重要作用。研究结果表明: 在皮肤血流的直接测定中, TCP02 值与激光多普勒血流仪测试结果相一致。在皮肤微血管血流受累的疾病, 如糖尿病中, TCP02 测定结果的异常同样具有重要价值。近年在对不同微循环检查的准确性与实用价值的研究中, 发现激光多普勒血流量仪测定由于患肢易动而被干扰, 所以有时可能不够稳定。而经皮氧监测仪和微循环显微镜既能直接测定与观察皮肤氧的含量和毛细血管数目及状态, 方法简单, 仪器稳定误差少。所以实用价值更高。由此可见, 糖尿病足患者的 TCP02 检测对于患者创面的预后和当时的状态有较好的体现。

中医辨证是以患者的症状为主要依据, 运用中医的辨证理论、辩证思想从糖尿病足患者的症状分析当中总结出患者的状态与预后来指导进一步的治疗。辨证论治也是中医治疗的特色和根本。由于糖尿病足的发病机理比较复杂, 与中医辨证相比, 单从 TCP02 的表现是不够全面的, 但两者在体现患者当时创面状态与预后这方面是相同的。这也是选择这一检查指标来观察的原因之一。吕培文教授进行的多中心大样本的糖尿病足辨证分析, 在方法上也是运

用中医的辨证理论、辨证思想从糖尿病足患者的临床表现入手, 尽量收集患者临床资料并逐一分析总结, 总结出有普遍性的症状群进行辨证分析。而从症状群的分析当中笔者也看到, 大量症状和体征的描述与下肢循环特别是微循环有关, 如: 发凉、发热, 疼痛, 创面颜色, 皮温, 跗阳脉(足背动脉)、太溪脉(胫后动脉)有无等等。微循环的变化所表现出的症状在症状群中占很重要的比例。这样从直观上可建立起微循环与在糖尿病足的中医辨证之间有密切关系的想法。由此产生利用微循环检查来佐证糖尿病足中医辨证的思路。

4.2. 结果分析

从以上检查的结果分析可以看出: 在糖尿病足创面的不同发展阶段中, 其辨证分型不同, 经皮氧分压也有不同; 而经皮氧分压在各分期中不同的数据集中区域患者的辨证分型基本相同。由此可以看出, 糖尿病足患者下肢微循环的变化与其中医辨证分型有较密切的关系, 但与创面分期的关系并不大。经皮氧分压检测可以作为辨证分型的一个辅助客观指标。

4.3. 展望

中医辨证论治是中医治疗的根本, 它不仅应用在内治方面, 外治法、外用药的应用也要辨证施用。辨证是施治的前提, 就一个病来说, 统一的辨证对于治疗有较好的指导作用。目前对于糖尿病足的辨证的统一是一个亟待解决问题。笔者认为对于辨证的统一不仅仅是各医家在这个病认识上的统一, 还要有大量的客观指标作为佐证, 这样才有说服力。为中医辨证寻找更多、更有说服力的客观指标作为佐证是寻求辨证统一的一个可行的办法。就本病而言, 血管病变、神经病变、感染的综合客观监测指标的数据分析, 一定会为其中医辨证提供更全面的证据, 为更有效的中医施治打下良好的基础。

中药内外治疗对糖尿病足早期病变的影响

上海市曙光医院 樊建开 徐兆东 仇菲 (200021)

上海市中医医院 蔡惠群

糖尿病足 (DF) 是糖尿病四大并发症之一, 严重坏疽是造成患者致残、致死的重要原因。本研究旨在通过中药内服、外治的干预, 观察 DF 早期 (0-I 级) 病变的临床症状及血液流变性、血流动力学、血管活性物质及神经传导速度等指标的变化。

1 临床资料

2001 年 5 月至 2003 年 5 月, 共观察 54 例, 均符合第一届全国糖尿病足学术会议制定的“糖尿病足检查方法及诊断标准”^[1], 为 2 型糖尿病合并 DF 0~I 级。治疗组 30 例, 男 17 例, 女 13 例。年龄 47~75 岁, 平均 63.30 ± 8.18 岁。对照组 24 例, 男 11 例, 女 13 例。年龄 48~78 岁, 平均 64.00 ± 9.61 岁。糖尿病 2~30 年, 治疗组平均 9.66 ± 7.90 年, 对照组平均 8.45 ± 7.15 年。肢端病变 0.5~20 年, 治疗组平均 5.01 ± 3.94 年, 对照组平均 5.11 ± 4.68 年。合并症, 治疗组合并眼病 12 例, 心脏病 8 例, 高血压 20 例, 肾病 3 例; 对照组合并眼病 7 例, 心脏病 3 例, 高血压 9 例, 肾病 6 例。