

◆ 针灸经络研究 ◆

艾灸联合子午流注对大鼠背部创面修复作用的实验研究

张文恺¹, 许超², 涂冬鹏², 姜献²

1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学附属第二医院创伤科, 浙江 杭州 310005

[摘要] 目的: 观察艾灸联合子午流注对大鼠背部创面愈合的促进作用并探讨其作用机制。方法: 将90只SD大鼠随机分成模型组、普通艾灸组、子午流注组, 雌雄各半, 麻醉及消毒后按照造模标准将大鼠背部制成直径1.8 cm的创面, 深达皮肤筋膜层, 伤后第1天开始进行各项干预治疗, 观察创面愈合的时间, 计算创面愈合率, 以HE染色光镜下观察巨噬细胞, 中性粒细胞及微血管含量等; 并通过免疫组化, 运用图像分析等技术观察血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)阳性表达细胞数。结果: 与模型组比较, 普通艾灸组和子午流注组创面愈合率、VEGF阳性表达均明显增加($P < 0.05$); 与普通艾灸组比较, 子午流注组创面愈合率、VEGF阳性表达均明显增加($P < 0.05$)。结论: 艾灸联合子午流注能明显促进大鼠背部创面愈合, 其机制可能跟其促进组织修复细胞以及炎症细胞的增殖, 影响肉芽组织中VEGF的表达有关。

[关键词] 创面修复; 艾灸; 子午流注; 血管内皮生长因子(VEGF); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R245.81 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 06-0246-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.06.075

Experimental Study on the Effect of Moxibustion Combined with Midnight-midday Ebb flow on the Wound Healing of the Backs of Rats

ZHANG Wenkai, XU Chao, TU Dongpeng, JIANG Xian

Abstract: **Objective:** To observe the promotion effect of moxibustion combined with midnight-midday ebb flow on the wound healing of the backs of rats, and discuss its mechanism. **Methods:** A total of 90 SD rats were randomly divided into the model group, the common moxibustion group and the midnight-midday ebb flow group, with average male and female. After anesthesia and disinfection, wounds with a diameter of 1.8 cm were made on the backs of the rats according to the standards of modeling, reaching deep into the fascia layer of skin. On the first day after the injury, different intervention treatments were conducted. The healing time of wounds was observed; the wound healing rates were calculated; the contents of macrophages, neutrophils and microvessels were observed under light microscope after HE staining. The number of positive cells of vascular endothelial growth factor(VEGF) was observed by immunohistochemistry, image analysis and other techniques. **Results:** The wound healing rates and the positive expression of VEGF in the common moxibustion group and the midnight-midday ebb flow group were significantly increased when compared with those in the model group($P < 0.05$). The wound healing rate and the positive expression of VEGF in the midnight-noon ebb-flow group were significantly increased($P < 0.05$) when compared with those in the common moxibustion group. **Conclusion:** The therapy of moxibustion combined with midnight-midday ebb flow can significantly promote the wound healing on the backs of rats, whose mechanism may be related to the promotion of the proliferation of cells for repairing tissues and inflammatory cells, and the effect on the expression of VEGF in granulation tissue.

Keywords: Wound healing; Moxibustion; Midnight-midday ebb flow; Vascular endothelial growth factor(VEGF); Animal experiments; Rats

[收稿时间] 2018-11-12

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(2018ZA048)

[作者简介] 张文恺(1991-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗创伤疾病。

[通信作者] 许超, E-mail: docxuchao@126.com。

创面愈合分为凝血期、炎症期、肉芽组织形成期及组织重构期4个彼此相互连贯的阶段^[1]。任何一个环节的障碍均可导致创面难愈合或不愈合、创面感染、血管神经受损以及自身免疫功能受损等。创面愈合时间的延长,既增加了病人经济负担,也增加医师工作量。然而近年来对艾灸促进创面愈合机制的研究也层出不穷,研究表明艾灸能促进创面愈合,可能跟调节不同时间内创面组织中血管内皮细胞及血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的含量有关^[2]。有临床研究表明艾灸能加快创面愈合,改善创面修复组织的微循环^[3],也有利用子午流注联合灸法治疗不同证型风湿性关节炎患者的,其联合治疗均能不同程度的降低炎症反应指标、改善局部关节中细胞因子的紊乱,说明艾灸有抗炎免疫等疗效,且对阳虚寒凝型疗效最佳^[4]。子午流注为依照不同的时辰,气血流注不同经穴的原则,讲究定时、择时取穴等治病原则^[5]。《黄帝内经》所说:“虚者补之,损者益之。”艾灸有温经散寒,消瘀散结等功效。故本实验假设使用扶正之艾灸疗法联合子午流注使大鼠气血充足,助新肉生长,创面愈合,并探讨艾灸联合子午流注治疗促进创面愈合的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 选取90只8周龄健康SD大鼠,体质量(225~250)g,雌雄各半,购于上海BK公司,实验动物生产许可证号:ACXK(沪)2018-0198,动物饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心。实验过程中对动物的处置符合浙江中医药大学实验动物处置伦理学标准,并通过动物实验伦理申请,批准编号20180409-04。饲养环境安静,室温20~26℃,分15笼饲养,每笼6只。

1.2 试剂及仪器 戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司);4%多聚甲醛、苏木素伊红(HE)染色试剂盒、免疫组化试剂抗体ARC10513anti-VEGF antibody、抗体ab64238、DAB显色剂、免疫组化笔、封闭山羊血清等(上海昂龙生物科技有限公司);纯艾灸条(南阳市汉艾艾制品有限公司)。

RM-2015石蜡切片机、LEICADM500三目生物显微镜及图像信号采集与分析系统(德国Leica公司);光学显微镜(日本Olympus公司);Tissue-Tek VIP5Jr.组织脱水机(日本Sakura公司)。

1.3 模型制备及分组 大鼠常规饲养2周后,造模前12h禁食禁水,分别在大鼠腹腔内注射3%戊巴比妥(1.5 mL/kg)麻醉,参考赵京禹等^[6]全层皮肤缺损法制成大鼠背部直径约1.8 cm的圆形全层皮肤切除开放创面,深达筋膜。术后碘伏消毒,创面自然止血,待醒后给与清洁饮水,自由进食。之后随机分为模型组、普通艾灸组、子午流注组,每组30只。

1.4 给药方法 造模成功后的第1天进行干预治疗,将子午流注联合艾灸组30只大鼠于背部伤口向上常规固定,在午时(11:00~13:00)行艾灸治疗,具体操作为将艾灸点燃后放入艾灸盒,部位对准伤口,调准高度使艾条离伤口3~4 cm,普通

艾灸组操作如上,治疗时间为申时(15:00~17:00),每次30 min,每天1次,治疗过程中时刻调整艾条与创面的距离,以确保伤口温度一致,模型组除不艾灸外,其余治疗措施与另外2组相同。

1.5 样本采集 每天以醋酸纸覆盖创面,用油墨笔沿创面边缘画标记,保存标记备用。计算创面愈合率。3组治疗第3、5、7、11天取处死大鼠的正常皮肤边缘切下皮肤全层,放入多聚甲醛中固定24 h后进行脱水石蜡包埋处理。

1.6 观察指标及检测方法 用求积仪绘测醋酸纸标记后图像的面积,然后计算不同治疗天数后创面愈合百分率,分析创面愈合的情况,创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积×100%。

组织病理学检查。将取好的组织块置于4%的多聚甲醛中固定完成后,将组织进行脱水,包埋制片等处理,切取4 μm的组织片进行HE染色,每张在光镜下观察,HE染色均在×400倍光镜下采集的视野作为示例,以便更鲜明的突出各个细胞数量及分布趋势。

免疫组化法检测创面修复组织 VEGF 的表达。取已切好的4 μm石蜡切片,60℃烘片2 h,取出冷却至室温,按照染色试剂盒说明书的步骤进行处理,进行常规免疫组化处理后,有棕黄色颗粒的细胞即视为阳性染色,随后做好的切片在×400倍显微镜观察评分^[7]。表达细胞胞浆内颗粒较细且显色高于背景即评分为1分,表达细胞胞浆内颗粒细而多且着色明显为2分,表达细胞胞浆内阳性颗粒粗而大且着色明显即评分为3分,收集数据后运用统计学方法比较阳性细胞积分的均值,并且免疫组化染色图示例×400倍光镜下采集的视野作为示例。以便更鲜明的表示阳性细胞及分布区域。

1.7 统计学方法 数据采用SPSS19.0统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本均数比较采用*t*检验,多个样本之间的两两比较采用单因素方差分析,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠伤口愈合的基本变化 见图1、表1。各组大鼠造模当天均可见创面局部水肿,并且渗血明显。造模后第3天可见各组大鼠创面基本无渗血;创缘周围出现红晕及少许皱褶,且均有不同程度的肉芽组织生长,但子午流注组创面较其它2组大鼠鲜活,渗出液也较少。造模后第5天,可见子午流注组大鼠创面肿胀完全消退,部分创面结痂,创面愈合率高于其余2组(*P*<0.05),第7天各组大鼠创面均干燥结痂,但子午流注组干燥组织红润程度明显,较其余2组呈现明显更好的愈合态势。子午流注组各个时间段愈合率均明显高于模型组(*P*<0.05)。造模后第15天,子午流注组创面基本愈合,其余2组并未完全愈合,尚有结痂疤痕。

2.2 各组大鼠肉芽组织石蜡切片 HE 染色结果 见图2。模型组造模后第3天可见大量成纤维细胞,胞浆较多,造模后第7

天可见少许毛细血管。普通艾灸组第3天可见少量炎性细胞，成纤维细胞较多，核仁染色明显，第7天普通艾灸组可见肉芽组织颜色变为暗红色，炎性细胞减少。子午流注组造模3天后伤口处可见炎性细胞浸润，以巨噬细胞，中性粒细胞为主，创缘肉芽组织形成，并且向伤口方向生长。造模7天后子午流注组大鼠伤口修复组织可见大量新生肉芽组织出现且生长旺盛，

毛细血管丰富可见，并有淋巴细胞浸润。

2.3 各组大鼠创面修复组织 VEGF 表达结果 见图3、表2。与模型组比较，子午流注组及普通艾灸组 VEGF 阳性表达均明显升高($P < 0.05$)；与普通艾灸组比较，子午流注组 VEGF 阳性表达均明显升高($P < 0.05$)。

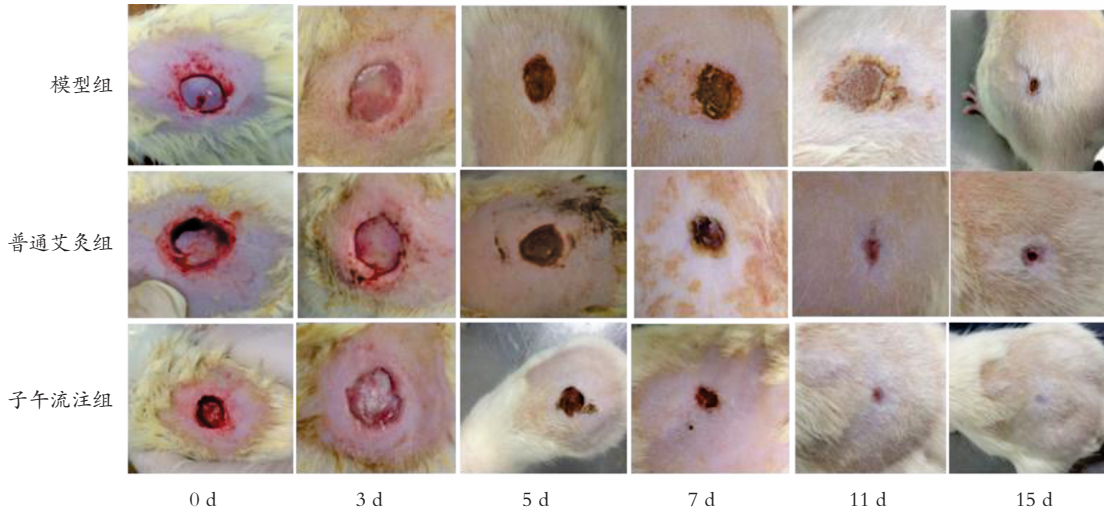


图1 各组大鼠伤口愈合的基本变化

表1 各组大鼠创面愈合率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	7 d	11 d	15 d
模型组	6	11.21 ± 0.14	21.23 ± 0.18	35.76 ± 0.35	67.54 ± 0.41	86.52 ± 0.38
普通艾灸组	6	11.63 ± 0.72 ^①	23.19 ± 0.32 ^①	36.51 ± 0.28 ^①	68.91 ± 0.52 ^①	89.38 ± 0.46 ^①
子午流注组	6	13.19 ± 0.76 ^{①②}	24.67 ± 0.42 ^{①②}	37.66 ± 0.37 ^{①②}	71.25 ± 0.45 ^{①②}	95.37 ± 0.47 ^{①②}

与模型组比较，① $P < 0.05$ ；与普通艾灸组比较，② $P < 0.05$

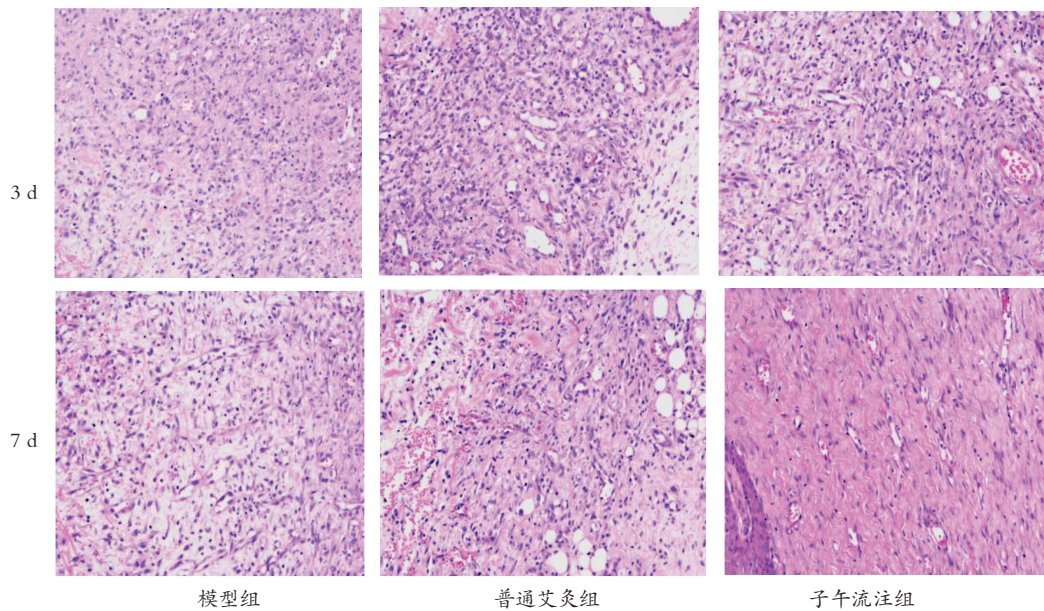


图2 各组大鼠肉芽组织石蜡切片 HE 染色结果 (HE 染色, × 400)

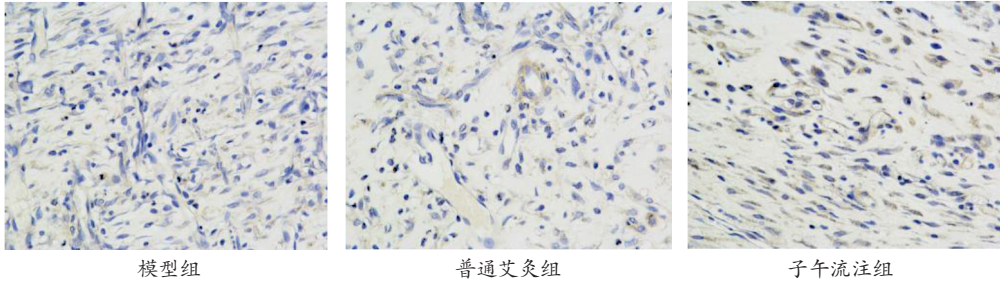


图3 各组大鼠创面修复组织 VEGF 表达结果(免疫组化染色, ×400)

表2 各组大鼠创面修复组织 VEGF 表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	7 d
模型组	6	15.50 ± 0.54	22.66 ± 1.50	21.66 ± 0.81
普通艾灸组	6	16.56 ± 0.69 ^①	24.83 ± 0.75 ^①	23.19 ± 0.77 ^①
子午流注组	6	18.00 ± 0.63 ^{①②}	28.00 ± 0.63 ^{①②}	25.50 ± 0.83 ^{①②}

与模型组比较, ① $P < 0.05$; 与普通艾灸组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

中医基础理论指出脾主统血, 在体合肌肉而主四肢, 若局部创面瘀血严重且影响气血运行, 必然造成脾虚, 脾虚则无力化生气血, 营养全身, 如此周而复始则一定会造成伤口难愈合或不愈合。实验证明艾灸治疗能促进大鼠创面愈合, 促进创面修复组织中血管内皮细胞的增殖及 VEGF 的表达^[9]。子午流注是指人体的气血从子时到午时不断循环, 阴阳各经气血的盛衰开阖都有固定的时间。广义上子午流注即中医时间医学, 正如气血于巳时由脾经流注, 此时脾经气血最为旺盛, 反之于午时气血从脾经流入心经, 此时脾经气血最弱, 结合艾灸有“虚则补之”的功效, 在此时进行艾灸联合子午流注治疗, 激活该经气血, 使得脾经气血旺盛, 从而达到很好的促进创面愈合的效果。

创面的修复是一个非常复杂的生物学过程, 修复过程中的增殖包括基质产物, 血管内皮和上皮生成, 最终白细胞被巨噬细胞等取代^[9]。巨噬细胞是创面愈合中的重要组成部分, 其含量的多少关乎创面愈合的速度。VEGF 作为目前最重要的调控血管生成因子, 其来源和表达也受多种因素调控^[9]。故本实验使用光镜下观察巨噬细胞含量及 VEGF 的阳性表达及作为创面愈合指标, 探讨大鼠创面愈合肉芽组织中 VEGF 的表达, 为探讨子午流注联合艾灸治疗大鼠创面愈合的机制及疗效提供实验依据。

本研究结果表明艾灸能不同程度的促进巨噬细胞的分泌以及 VEGF 的阳性表达, 均促进创面愈合, 缩短创面愈合时间, 但艾灸联合子午流注的效果更明显, 且愈合时间更短。利用该实验从分子生物学方面证明了“补虚祛瘀”这一中医理论指导思想在创面愈合中的重要性, 艾灸联合子午流注促进创面的愈

合, 其机制可能跟促进组织巨噬细胞增殖, 影响肉芽组织中 VEGF 有关。

[参考文献]

- [1] BIELEFELD K A, AMINI-NIK S, ALMAN B A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013, 70(12): 2059-2081.
- [2] 孙琦, 孙忠人, 张秦宏, 等. 艾灸对大鼠创伤皮肤组织血管内皮细胞和血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国针灸, 2014, 34(7): 679-684.
- [3] 孙立虹, 梁玉磊, 孙彦辉, 等. 温和灸对大鼠慢性难愈性创面组织巨噬细胞及胶原表达的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(4): 259-265.
- [4] 洪昆达, 万甜, 张丽瑛. 子午流注灸法治疗不同证型类风湿性关节炎的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 5233-5236.
- [5] 王磊, 陈进法, 王硕硕, 等. 子午流注与生物节律的相关性[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11): 2485-2487.
- [6] 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.
- [7] 潘秀花, 杨占山, 杨淑琴, 等. 在创伤愈合中 VEGF 和 Ang-1 表达的生物动力学变化研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2006, 26(2): 178-181.
- [8] 张静, 张仲, 胡永清, 等. 伤口愈合的研究进展[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(1): 225.
- [9] CASTELLANI M L, GALZIO R J, FELACO P, et al. VEGF, substance P and stress, new aspects: a revisited study[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(3): 229-237.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)