

生肌玉红膏对下肢慢性溃疡患者组织学指标影响的临床研究

——附 117 例临床资料

江虹¹ 许岩磊¹ 姚昶² 卞卫和²

(1.南京中医药大学,江苏南京 210023; 2.南京中医药大学附属医院,江苏南京 210029)

摘要 目的:观察生肌玉红膏对下肢慢性溃疡愈合的疗效及对组织学指标变化的影响。方法:由第三方数据管理机构将 257 例下肢慢性溃疡患者随机分为试验组 127 例和对照组 130 例。通过标准化临床路径对患者进行下肢创面临床治疗,于治疗前后分别测定创面肉芽组织内微血管计数、羟脯氨酸、血红蛋白及 VEGF 水平。结果:试验组总有效率为 99.15%,明显高于对照组的 71.67%;治疗后,2 组创面肉芽组织内微血管计数、血红蛋白和羟脯氨酸含量均显著升高,且试验组较对照组升高更为显著;试验组创面肉芽组织内 VEGF 水平显著增高。结论:生肌玉红膏对下肢慢性溃疡愈合疗效显著,其作用机制可能与刺激肉芽组织分泌 VEGF,促进胶原合成,进而促进创面肉芽组织微血管新生,改善血流灌注有关。

关键词 下肢慢性溃疡 生肌玉红膏 血管新生 羟脯氨酸 血红蛋白 VEGF

中图分类号 R632.105 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2014)12-0029-03

生肌玉红膏出自《外科正宗》,具有提毒祛腐、敛疮生肌功效,临床多用于疮疡脓水将尽、肉芽生长缓慢者。长期的临床实践显示其对慢性体表溃疡具有良好疗效。我们前期临床研究显示生肌玉红膏具有改善创面微循环、促进肉芽生长及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)表达而促进下肢慢性溃疡患者创面愈合的作用^[1-4]。本研究进一步采用临床多中心、双盲、对照方法,通过检测创面肉芽组织中血管新生、胶原合成等客观指标,验证生肌玉红膏治疗慢性下肢溃疡的疗效,现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 2010 年 5 月至 2012 年 5 月期间,本研究共搜集完成病例 257 例,均来源于江苏省中医院等位于江苏省的 11 个分中心中医外科门诊与病房。所有患者均通过各中心医院伦理委员会批准后,由南京海泰医疗信息系统有限公司进行双盲随机派位确立各中心的病历号。至研究结束统计,257 例患者中,试验组 127 例,脱落 10 例,实际完成 117 例:男 71 例,女 46 例;年龄 20~85 岁,平均年龄(63.28±14.36)岁;病程 2 个月~30 年,平均病程

(2.84±6.12)年;创面初始面积为(10.15±13.14)cm²。对照组 130 例,脱落 10 例,实际完成 120 例:男 81 例,女 39 例;年龄 20~85 岁,平均年龄(61.28±13.67)岁;病程 2 个月~30 年,平均病程(2.72±5.92)年;创面初始面积为(7.96±8.93)cm²。2 组患者一般资料比较无显著性差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 诊断标准 参照《Guidelines for the Best Care of Chronic Wounds》^[5]制定的西医诊断标准与《中华人民共和国中医药行业标准·中医病证诊断疗效标准》^[6]制定的中医诊断标准拟定如下:下肢溃疡 1 个月以上,未出现解剖与功能上愈合倾向者。表现为大小不等,疮面肉色灰白、淡红或紫暗,表面或附有黄色脓苔,疮口凹陷,边缘形如缸口,脓水清稀,呈灰黑或带绿色,带腥味。溃疡周围可伴有湿疮、静脉曲张、色素沉着。

1.3 纳入标准 (1)年龄 18~85 岁,男女不限;(2)膝关节下方下肢溃疡创面面积 $\geq 2\text{cm}^2$ 且 $\leq 50\text{cm}^2$ 者;(3)合并糖尿病,血糖控制平稳者(空腹血糖 $\leq 10\text{mmol/L}$);(4)完成知情同意及相关告知。

1.4 排除标准 孕妇或哺乳期妇女及同时进行影响组织修复治疗的患者。

基金项目:“十一五”国家支撑计划(2008BAI53B014);康缘中医药科技创新基金(HZ1009KY);江苏省中医药领军人才(LJ2009002);江苏高校优势学科建设工程资助项目(012062003010)

2 治疗方法

所有患者均采用统一的治疗路径,简述如下:签订知情同意后,记录临床观察病例各项资料,常规用碘伏棉球消毒创面周围皮肤,创面以生理盐水棉球清除脓腐坏死分泌物,首次创面清创后,上敷药物,无菌纱布(16~24层)覆盖固定,隔日换药。

2.1 试验组 以生肌玉红膏油纱布(江苏省中医院制药厂,苏药制字 Z04000396)1片外敷创面。

2.2 对照组 以凡士林纱布[江苏省中医院制药厂,苏卫药准字(1982)203201]外敷创面。

对于创面肉芽取材方法及原则规范如下:应用生理盐水棉球轻轻擦拭创面后,再使用干棉球蘸除创面渗液,选创面中央区肉芽,用眼科剪剪除约 0.3cm×0.3cm 大小肉芽一块,深至以创面出血为度。因该操作有创且取材有限,每块肉芽组织仅可行 1 项组织学指标检测,故对每组患者依次循环行肉芽组织微血管计数、血红蛋白、羟脯氨酸及血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)水平测定,治疗结束后若创面愈合,则不再取材检测。

2 组患者均于治疗 1 个月后进行疗效评价。

3 疗效观察

3.1 观察指标 (1)微血管计数:照 CD₃₄ 免疫组织化学试剂盒说明书标记各时点组织切片内微血管,400 倍光镜下每张切片取不重叠的 2 个视野,采用 MIAS-200 彩色病理图像分析系统,行单位肉芽组织切片面积内的微血管计数。(2)血红蛋白含量测定:采用光度计法测定,试验组与对照组各时点标本取出后浸入 2mL 蒸馏水内 5min 以去除表面血液,按试剂盒(南京建成生物工程研究所提供,批号 20110106)指示测定 410nm 吸收光度值,其标准曲线由人体血红蛋白标准品(Sigma H 2500)测量获得(μg/mg)。(3)羟脯氨酸含量测定:采用样本碱水解法,将创面肉芽取出称重后,按试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20090106)指示予以匀浆后离心,加入试剂后,以分光光度仪测定其吸收值(μg/mg)。(4)VEGF 含量测定:采用 ELISA 法检测组织中 VEGF 165 的含量。根据试剂盒(厦门慧嘉科技有限公司提供,批号:No.CSB-E13100h)操作流程进行操作,以酶标仪测定 450nm 处峰值,根据标准品做的标准曲线得出相应的 VEGF 含量(ng/mg)。

3.2 疗效评定标准 总体疗效参照《中华人民共和国中医药行业标准·中医病症诊断疗效标准》^[9]制定。临床痊愈:创面完全愈合;显效:创面明显缩小 75% 以上;有效:创面缩小 25% 以上;无效:创面缩小不足 25%。

3.3 统计学方法 病例治疗结束后,由南京海泰医疗信息系统有限公司输出数据,数据统计分析由广州驭时医药有限公司采用 SPSS 统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3.4 治疗结果

3.4.1 总体疗效比较 试验组 117 例中,临床痊愈 32 例,显效 56 例,有效 28 例,无效 1 例,总有效率 99.15%;对照组 120 例中,临床痊愈 13 例,显效 18 例,有效 55 例,无效 34 例,总有效率 71.67%。2 组总有效率比较具有高度显著性差异($P < 0.01$),说明试验组临床疗效优于对照组。

3.4.2 微血管计数比较 2 组患者经治疗后,肉芽组织中单位面积新生血管数量均明显增加($P < 0.01$);组间比较,试验组新生血管数量显著多于对照组($P < 0.01$),数值约为对照组的 2 倍。详见表 1。

表 1 试验组与对照组治疗前后创面肉芽组织内微血管计数比较($\bar{x} \pm s$) 个/视野

组别	视野	微血管计数	
		治疗前(例数)	治疗后(例数)
试验组	视野一	9.81±2.61(26)	21.63±4.15(19) ^{*▲}
	视野二	10.38±1.94(26)	23.00±2.79(19) ^{*▲}
对照组	视野一	9.15±2.45(34)	10.67±1.05(24) [*]
	视野二	10.21±2.59(34)	11.38±1.61(24) [*]

注:与同组治疗前比较,* $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,▲ $P < 0.01$ 。

3.4.3 血红蛋白含量比较 2 组患者经治疗后,肉芽组织中血红蛋白含量均明显升高($P < 0.01$);组间比较,试验组血红蛋白含量显著高于对照组($P < 0.01$),与血管密度增加一致,约为对照组的 2 倍。结果见表 2。

表 2 试验组与对照组治疗前后创面肉芽组织内血红蛋白含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	血红蛋白含量(μg/mg)	
	治疗前(例数)	治疗后(例数)
试验组	0.31±0.05(33)	0.77±0.16(22) ^{*▲}
对照组	0.33±0.08(31)	0.38±0.18(26) [*]

注:与同组治疗前比较,* $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,▲ $P < 0.01$ 。

3.4.4 羟脯氨酸含量比较 2 组患者经治疗后,肉芽组织中羟脯氨酸含量均明显升高($P < 0.01$);组间比较,试验组羟脯氨酸含量显著高于对照组($P < 0.01$),为对照组将近 2 倍。详见表 3。

表 3 试验组与对照组治疗前后创面肉芽组织内羟脯氨酸含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	羟脯氨酸含量(μg/mg)	
	治疗前(例数)	治疗后(例数)
试验组	0.72±0.04(31)	1.32±0.14(23) ^{*▲}
对照组	0.71±0.06(36)	0.78±0.14(33) [*]

注:与同组治疗前比较,* $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,▲ $P < 0.01$ 。

3.4.5 VEGF 水平比较 对照组治疗后肉芽组织中 VEGF 水平较治疗前无明显变化; 试验组治疗后肉芽组织中 VEGF 水平较治疗前显著增高 ($P<0.01$), 且明显高于对照组 ($P<0.01$)。详见表4。

表4 试验组与对照组治疗前后创面肉芽组织内 VEGF 水平比较

组别	VEGF 水平 (ng/mg)	
	治疗前(例数)	治疗后(例数)
试验组	68.27±3.88(35)	101.19±6.10(24)*▲
对照组	69.73±8.88(29)	66.69±12.59(24)

注:与同组治疗前比较,* $P<0.01$;与对照组治疗后比较,▲ $P<0.01$ 。

3.5 安全性分析 整个临床试验阶段,无恶性不良事件发生,仅对照组中 1 例患者出现创缘轻度皮疹,未予特殊处理,后随试验进展,皮疹自行消退。

4 讨论

下肢慢性溃疡是外科临床的常见病和疑难病,以“腐、瘀、虚”为主要病机。生肌玉红膏具有提毒祛腐、敛疮生肌之功效,在临床上已被广泛运用于治疗该类疾病^[1-4,7]。然而,目前仍然缺乏多中心大样本随机对照的临床研究,且关于组织学检测评价下肢慢性溃疡的多中心双盲研究尚未见报道。

本研究通过免疫组化标记血管,采用 MIAS-200 彩色病理图像分析系统计算单位肉芽组织切片面积内的微血管数量,使得结果更为客观,结果显示试验组微血管新生效果明显优于对照组,达到对照组的 2 倍左右。虽然新生血管数量增加,但血管内血流是否增加仍需通过血红蛋白含量来评价。研究表明,血红蛋白可以较为客观地体现血管新生的质量,且通过改善肉芽组织中血红蛋白水平,可以达到促进创面快速愈合的目的^[8]。本研究显示试验组血红蛋白含量增加结果与血管新生数量一致,提示生肌玉红膏可以显著提高肉芽组织新生血管的血流灌注,增加微循环,促进愈合。为此,我们进一步通过 VEGF 测定探讨其机制。

VEGF 是目前发现唯一作用于血管内皮细胞的生长因子,在血管新生中起到关键作用^[9],本研究结果显示生肌玉红膏可以显著刺激下肢慢性溃疡肉芽组织中 VEGF 分泌,促进血管新生,而对照组肉芽组织中 VEGF 含量无明显升高,虽然治疗后血管新生数量增加,但仅增加约 10%,试验组增加了 120%,提示出生肌玉红膏刺激 VEGF 分泌的疗效。

创面肉芽血循环的改善,促进了肉芽生长,胶原合成,羟脯氨酸为胶原蛋白水解而来,故创面肉芽组织中羟脯氨酸的含量能在一定程度上反映创面胶原合成的状况^[10]。本研究显示生肌玉红膏能够促进创面胶原蛋白合成,结果与提高血管新生、血流灌注及

创面愈合相一致。

综上所述,生肌玉红膏治疗下肢慢性创面 1 月,临床未见不良反应,安全有效。本研究首次揭示了生肌玉红膏具有促进创面肉芽组织微血管新生,改善肉芽组织血流灌注功效,其机制之一为刺激肉芽组织分泌 VEGF,由此促进胶原合成,有利于下肢慢性创面的愈合,与前期症状学结果一致^[1-4]。今后可进一步进行量效与时效研究。

5 参考文献

- [1] 施裕新,姚昶,张晓清,等.生肌玉红膏改善下肢慢性创面患者生活质量的双盲随机对照. 中国老年学杂志, 2013,33(9):1992
- [2] 尹恒,应语,姚昶,等.生肌玉红膏治疗下肢慢性溃疡祛腐生肌疗效的临床研究. 南京中医药大学学报,2013,29(2):121
- [3] 张晶,姚昶,尹恒,等.生肌玉红膏促进下肢慢性创面愈合 257 例随机对照多中心临床研究. 中医杂志,2013,54(1):35
- [4] 应语,姚昶,卞卫和,等.生肌玉红膏干预下肢慢性溃疡创面炎症反应的临床研究.西部中医药,2013,26(2):7
- [5] Robson MC, Barbul A. Guidelines for the best care of chronic wounds. Wound Repair Regen, 2006,14(6):647
- [6] 国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准.南京:南京大学出版社,1994:51
- [7] 姚昶,高卫卫,杨理,等.生肌玉红膏促进慢性体表溃疡愈合的临床研究.上海中医药大学学报,2009,11(6):29
- [8] Callaghan MJ, Chang EI, Seiser N, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. Plast Reconstr Surg, 2008, 121(1):130
- [9] Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, et al. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. Nat Cell Biol, 2013, 15(3):249
- [10] 李震,李祝,房秋寒,等.中药抗皮肤衰老剂对小鼠皮肤羟脯氨酸含量的影响. 山东中医药大学学报,1997,21(2):142

第一作者:江虹(1991-),女,硕士研究生,从事中医外科学临床研究。

通讯作者:姚昶,yaochang67@126.com

收稿日期:2014-05-27

编辑:王沁凯 岐 轩

