

臭氧水对感染性创面内源性细胞因子含量的影响

余斌 黄华军 林庆荣 王博炜 陈辉强

摘要 目的:研究臭氧水治疗感染性创面后,对内源性生长因子含量的影响,探讨臭氧水抗炎修复作用的机制。方法:将 50 只 vista 大鼠随机分成 5 组,洗必泰治疗组、低、中、高浓度臭氧水治疗组、对照组(不做特殊处理)各 10 只。首先在大鼠背部造成实验性感染性伤口,感染成功后 48 h 进行治疗,每天 1 次,9 d 为 1 个疗程。并在治疗前,治疗后 3、6、9 d 后分别对感染伤口的变化进行观察;同时切取皮肤、肌肉组织标本,用 ELISA 法分别检测其肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、表皮生长因子(EGF)的含量,并探讨这两种细胞因子含量变化与臭氧水对创面修复作用的关系。结果:EGF 含量在臭氧水治疗组明显高于对照组以及洗必泰治疗组,而 TNF- α 含量则是相反。结论:臭氧水对内源性的 EGF 以及 TNF- α 的影响有利于促进创面的抗炎以及修复。

关键词 创伤和损伤; 臭氧水; 表皮生长因子; 肿瘤坏死因子 α

Effects of ozone water on endogenous growth factors content in infected wound YU Bin, HUANG Hua-jun, LIN Qing-rong, WANG Bo-wei, CHEN Hui-qiang. Department of Orthopedic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of ozone water treatment on the expression of endogenous growth factors in infected wound and reveal the mechanism of anti-inflammatory and wound healing of ozone water. **Methods** 50 vista rats were randomly divided into five groups: 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L ozone water treatment group, chlorhexidine treatment group, and sham operation group. Infected wounds were artificially created in the back and leg of rats. 48 hours after the establishment of infection, the rats from different treatment groups were treated with chlorhexidine or ozone water once a day for 9 days respectively. The alteration of infected wound was observed at the 3rd, 6th and 9th day after corresponding treatment. And the expression level of endogenous epidermal growth factor (EGF) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in infected wound were analyzed by ELISA assay. **Result** The results revealed that the expression of EGF in ozone water treated groups were much higher than those in chlorhexidine treated group and sham operation group. But the expression of TNF- α in ozone water treated groups is reduced compared to sham operation group and chlorhexidine treated group. **Conclusion** The effects of ozone water treatment on EGF and TNF- α are helpful to the repairment of infected wound.

[Key words] Wounds and injuries; Ozone water; Epidermal growth factor; Tumor necrosis factor alpha

创伤愈合是外科医学最常见的基本问题,也是一个极其复杂的病理过程,涉及了机体许多病理变化。生长因子对组织修复和创面愈合的作用已经日益受到人们的重视,而且也得到较多的研究证实^[1-2]。研究发现,在某些创面(如慢性溃疡),组织内源性生长因子的含量变化对创面修复质量及其预后有重要的影响^[3]。近年来,臭氧水在创伤愈合及抗感染中的应用越来越广泛,也取得了良好的

临床疗效^[4-5],但其对创面抗炎修复的作用机制尚未完全明确。本实验通过观察在不同时间点对感染性创面的表皮生长因子(EGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量的变化,探讨这两种细胞因子含量变化与臭氧水对创面修复作用的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 Vista 大鼠 50 只。体重 280 ~ 340 g。雌雄各半,由南方医科大学动物实验中心提供。随机分为 5 组:洗必泰治疗组,低(5 mg/L)、中(10 mg/L)、高浓度(20 mg/L)臭氧水治疗组,对照组各 10 只。按组编号,分笼按常规饲养。

1.2 臭氧水的制备 将双蒸水倒入臭氧消毒剂生成机(德国哈斯乐臭氧发生器 OZONOSAN Alpha

doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2010.10.019

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(编号:8151051501000079)

作者单位:510515 广州市,南方医科大学创伤骨科

Plus 1107) 的储水槽中 (容量约 2 000 mL), 室温 20℃, 分别制取浓度为 5、10、20 mg/L 的臭氧水。所获的臭氧水立即用于创面的清洗消毒。

1.3 模型制作 实验前 24 h, 用脱毛剂在各组大鼠的脊背部和左侧大腿处脱毛备皮, 戊巴比妥麻醉, 背部完全暴露皮肤 3~5 cm, 将皮肤暴露消毒, 铺洞巾, 分别沿脊柱左侧做浅层切口直达深筋膜, 沿左侧大腿做深层切口直达肌肉, 切口均长约 5 cm, 开放创口, 常规止血后, 伤口均匀涂上金黄色葡萄球菌 (菌液浓度 > 20 亿/mL, 南方医院细菌室提供) 进行人工致炎, 制成不同层次组织的感染模型。

1.4 观察指标及方法 (1) 感染伤口炎症表现以及各个时间段创面愈合情况比较。(2) 生长因子含量测定: 将所有标本称重后用生理盐水作为介质进

行匀浆, 然后在 4℃, 1 000 × g 条件下离心 10 min。取上清液按固相夹心法酶联免疫吸附实验 (ELISA), 测定组织匀浆中 EGF、TNF-α 的 OD 值, 最后以标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度, 结果以 pg/mL 表示。

2 结果

2.1 人工感染伤口所见 感染后 48 h, 各组均可见创面周围红肿, 较多量脓性分泌物及坏死组织, 各组感染情况无明显差异。治疗后创面愈合情况比较, 臭氧水治疗组疗效远优于对照组以及洗必泰组, 其中 10 mg/L 与 20 mg/L 臭氧水组疗效又优于 5 mg/L 组。见表 1。

表 1 各组治疗后创面愈合情况比较

组别	干燥、结痂			红肿			分泌物、坏死组织			瘢痕、伤口缩小		
	3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d
对照组	-	-	++	++++	+++	++	++++	+++	++	-	-	+
洗必泰组	+	+	+++	++++	++	++	+++	++	+	-	+	++
5 mg/L 臭氧水组	++	+++	++++	++	+	+	++	+	-	+	+	++
10 mg/L 臭氧水组	+++	++++	++++	+	-	-	+	-	-	++	+++	+++
20 mg/L 臭氧水组	++	++++	++++	+	-	-	+	-	-	++	+++	+++

注: 无(-); 不明显(+); 较明显(++); 明显(+++); 非常明显(++++)

2.2 EGF 含量变化 各组的 EGF 含量在感染前、后以及治疗后各阶段的多重比较经统计学分析, 差异有显著性 ($F = 22.827, P = 0.004$)。治疗后各组间在相同时间 (3、6、9 d) 两两比较差异性见表 2、图 1。治疗组与对照组比较以及洗必泰组与臭氧水治疗组比较 $P < 0.05$, 不同浓度臭氧水治疗组间两两

比较, 10 mg/L 与 20 mg/L 组无明显差异 ($P > 0.05$), 而前两者与 5 mg/L 组在治疗后 3、6 d 后有显著意义 ($P < 0.05$), EGF 含量高于 5 mg/L 组。而在治疗后 9 d, 三种浓度的臭氧水治疗组 EGF 含量差异没有显著意义。

2.3 TNF-α 含量变化 各组的 TNF-α 含量在感染

表 2 人工致炎前后及不同时间大鼠 EGF 含量的变化

时间(d)	感染前	感染后 2 d	治疗后 3 d	治疗后 6 d	治疗后 9 d
对照组	47.11 ± 0.11	54.15 ± 3.71	50.58 ± 0.90	47.36 ± 1.02	38.82 ± 3.25
洗必泰组	44.48 ± 5.96	51.54 ± 1.01	62.42 ± 7.60	67.33 ± 3.93	64.31 ± 4.05
20 mg/L 臭氧水组	48.95 ± 0.21	64.11 ± 11.83	116.47 ± 6.23	160.89 ± 6.52	314.43 ± 11.00
10 mg/L 臭氧水组	55.29 ± 3.37	64.60 ± 11.06	129.12 ± 0.86	171.39 ± 0.67	349.97 ± 122.99
5 mg/L 臭氧水组	41.67 ± 5.11	54.63 ± 8.97	82.11 ± 3.24	122.29 ± 5.38	119.86 ± 1.48

前、后以及治疗后各阶段的多重比较经统计学分析, 差异有显著性 ($F = 20.585, P = 0.003$)。治疗后各组间在相同时间 (3、6、9 d) TNF-α 含量的两两比较差异性见表 3、图 2。治疗组与对照组比较以及洗必泰组与臭氧水治疗组比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 不同浓度臭氧水治疗组间两两比较, 10 mg/L 与 20 mg/L 组无统计学意义 ($P > 0.05$), 而前两者与 5 mg/L 组在治疗后 3、6 d 后差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在治疗后第 9 天差异统计学意义

($P > 0.05$), 5 mg/L 组 TNF-α 含量高于前两者。

3 讨论

创面愈合是机体的一个精确的调控过程, 在这一过程中有众多免疫细胞和细胞因子参与, 启动机体局部和全身的免疫防御、细胞再生和组织重建过程^[6]。近年来随着臭氧的应用逐步发展, 臭氧水作为一种新型的抗炎、杀菌消毒剂在临床应用上取得了良好的疗效, 但其作用机制却未完全清楚。本实验结果提示, 10 mg/L 与 20 mg/L 臭氧水对感染性

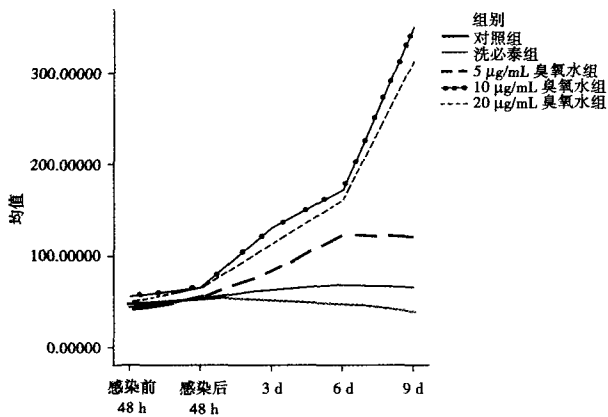


图 1 人工致炎前后及不同时间大鼠 EGF 含量的变化曲线

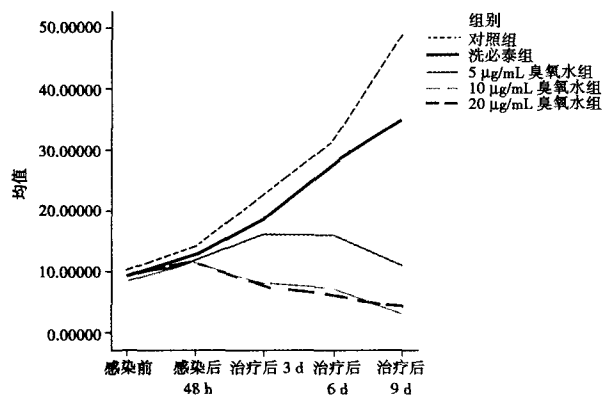


图 2 人工致炎前后及不同时间大鼠 TNF-α 含量的变化曲线

表 3 人工致炎前后及不同时间大鼠 TNF-α 含量的变化

时间(d)	对照组	洗必泰组	20 mg/L 臭氧水组	10 mg/L 臭氧水组	5 mg/L 臭氧水组
感染前	10.17 ± 0.86	9.31 ± 0.47	9.40 ± 0.66	8.44 ± 0.86	7.97 ± 1.53
感染后 2	14.01 ± 1.40	12.73 ± 0.45	11.76 ± 1.70	11.44 ± 0.20	11.51 ± 0.88
治疗后 3	22.51 ± 0.63	18.80 ± 0.20	7.46 ± 0.00	7.91 ± 0.55	16.34 ± 0.63
治疗后 6	31.36 ± 4.74	27.71 ± 1.64	6.13 ± 2.08	7.05 ± 0.69	15.94 ± 0.75
治疗后 9	48.94 ± 9.91	34.64 ± 5.28	4.38 ± 0.37	3.28 ± 1.31	10.95 ± 0.70

因此推测,臭氧水在治疗感染性创面的过程中降低了 TNF-α 含量,从而抑制了 NF-κB 系统的活性,达到抗炎修复组织的目的。

创面愈合是机体的一个精确的调控过程,在这一过程中有众多免疫细胞和细胞因子参与,启动机体局部和全身的免疫防御、细胞再生和组织重建过程^[12]。内源性的 EGF 以及 TNF-α 在创面愈合过程中起了很重要的作用,实验证明臭氧水对这两种内源性生长因子的影响有利于促进创面的抗炎以及修复。但是,创面内环境十分复杂,又有多种细胞因子的参与,臭氧水对内源性 EGF 以及 TNF-α 的影响的机制尚未清楚,可能为多种细胞因子的协同作用,需要进一步的研究。

创面的治疗效果最好,5 mg/L 臭氧水次之。

EGF 是 20 世纪 60 年代发现的一种多肽因子,广泛存在于人和动物体内,可促进或抑制多类细胞生长,具有刺激上皮细胞增生,加快创伤愈合的作用^[7]。Richard 等和 Rebecca 等研究结果显示 EGF 可增加上皮细胞和成纤维细胞 DNA 合成和细胞增殖^[8-9]。本研究发现,EGF 与大鼠创面的抗炎修复结局成正相关性,臭氧水在治疗过程中能促进创面组织中的 EGF 含量逐步升高,而且与其浓度有关,其中以 10 mg/L 与 20 mg/L 组最佳。另一方面,在机体炎症、免疫应答过程以及细胞凋亡过程中,转录因子 NF-κB 起了主要的作用^[10],可以抑制蛋白质的合成,NF-κB 系统可以被多种因子激活,TNF 是其中之一。TNF-α 主要由激活单核/巨噬细胞和激活 T 淋巴细胞产生,不仅有杀伤肿瘤细胞和在炎症、休克以及自身免疫等病理过程中起重要作用,而且对成纤维细胞胶原合成与分解代谢也发挥着重要影响。Huth 等^[11]在臭氧化介质治疗牙周炎试验中证实臭氧化介质能抑制牙周膜组织 NF-κB 系统的活性,具有抗炎作用。而作为 NF-κB 系统的激活因子之一的 TNF-α 在这过程中又有什么变化呢?本实验结果提示,臭氧水治疗对创面中 TNF-α 含量影响异于 EGF,臭氧水治疗组中 TNF-α 含量普遍低于洗必泰组以及对照组,其中 10 mg/L 与 20 mg/L 浓度臭氧水治疗组中的 TNF-α 含量最低。

4 参考文献

- [1] 付小兵,程飙,盛志勇,等. 生长因子应用于临床创伤修复 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2004,18(6):508.
- [2] Frechette J P, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas; Growth factor content and roles in wound healing [J]. J Dent Res. 2005, 84(5):434-439.
- [3] 付小兵,常国友,王亚平,等. 不同修复阶段创面肉芽组织中肿瘤坏死因子含量的变化 [J]. 中华实验外科杂志, 1996, 13(1):35-36.
- [4] Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against Candida albicans adhering to acrylic denture plates [J]. Oral Microbiol Immunol, 2005,20(4):206-210.
- [5] Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules [J].

J Endod, 2004, 30(11):778-781.

[6] Pollard J D, Quan S, Kang T, et al. Effects of copper tripeptide on the growth and expression of growth factors by normal and irradiated fibroblasts [J]. Arch Facial Plast Surg, 2005, 7(1): 27-31.

[7] 唐艳红, 王泉祥, 唐在明, 等. 人表皮生长因子对皮肤的保护作用 [J]. 中华医学美容杂志, 2004, 10(1):53.

[8] Kurten R C, Chowdhury P, Sanders R C Jr, et al. Coordinating epidermal growth factor-induced motility promotes efficient wound closure [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(1):109-121.

[9] Dize R S, Frey M R, Whitehead R H, et al. Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and

phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1):G276-285.

[10] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity [J]. Trends Immunol, 2004, 25(6):280-288.

[11] Huth K C, Saugel B, Jakob F M, et al. Effect of Aqueous Ozone on the NF-kB System [J]. J Dent Res, 2007, 86(5):451-456.

[12] 彭程, 贺全勇, 彭浩. 烧伤创面脓毒症大鼠肺组织细胞凋亡的研究 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(14):2223-2225.

(收稿:2009-12-23 编辑:张倩)

盐酸曲马多致依赖 1 例

白云洋

患者男, 24 岁, 大学文化, 摄影师。因“盐酸曲马多口服 4 年”于 2009 年 11 月 10 日入院。患者自述 2005 年 11 月开始因工作压力大, 经常心情不好, 睡眠差, 肌肉疼痛自行口服少量盐酸曲马多片剂, 最初每天服用 3 片, 即 150 mg/d, 服用后自感情绪好转, 睡眠差及肌肉疼痛均有改善和缓解。于是, 患者在心情不好, 睡眠差和肌肉疼痛的时候就会服用盐酸曲马多。患者不知不觉每天都要服用曲马多, 如不服用就会出现疲劳, 易激惹, 心情烦躁, 焦虑, 情绪低, 流泪, 流鼻涕等症状。患者盐酸曲马多口服用量由最初的 150 mg/d, 发展到最大剂量 1 250 mg/d, 平均日剂量为 1 000 mg/d。服用过程中曾经 4 次出现肌肉抽搐, 全身无力, 短暂晕厥。患者曾经 4 次强制自己不再服用盐酸曲马多, 但是因出现上述各种身体不适而不得不服用。患者既往史健康, 无食物和药物过敏史, 无输血史, 无冶游史。无癫痫病家族史。病前性格内向, 自尊心强, 喜欢安静。

入院时体格检查未见异常。实验室检查: 血钾 4.10 mmol/L, 脑电图检查提示: 轻度异常脑电图, 未见棘波等典型癫痫样波形。精神检查: 意识清晰, 定向力完整, 未引出幻觉及感知综合障碍,

问之能答, 切题, 未引出妄想。情感反应协调, 存在明显焦虑情绪及抑郁情绪, 汉米尔顿焦虑量表测评为 23 分, 汉米尔顿抑郁量表测评为 28 分。患者对能否戒掉曲马多非常担心, 意志活动减少, 不愿意上班及活动, 智能良好, 自知力存在, 社会功能受影响。

治疗采用药物治疗及心理治疗。药物治疗主要采取抗焦虑抗抑郁治疗, 口服盐酸舍曲林片 100 mg/d (早晨、中午各 1 次, 50 mg 口服), 丁螺环酮片 15 mg/d (每天 3 次口服, 每次 5 mg), 氯硝西洋片 2 mg/d (2 mg 晚睡前口服)。心理治疗主要采取认知行为治疗, 让患者了解盐酸曲马多的一些相关的知识, 给予患者分析目前的病情, 树立患者战胜疾病的信心。确定患者一些消极的想法并且针对患者一些对于本身的错误观念和认知歪曲的内容加以纠正并重建认知, 比如不是只有服用盐酸曲马多才能解除睡眠差、肌肉疼痛以及情绪上的问题, 与人沟通是有意义的, 自己控制不住服用盐酸曲马多不是无能的表现等等。治疗 22 d 后, 患者症状消失, 临床痊愈出院。

讨论 盐酸曲马多为非阿片类中枢性镇痛药, 为非选择性的 μ , δ 和 κ 阿片受体激动剂, 通过抑制神经元突触对去甲肾上腺素和 5-羟色胺再摄取, 影响痛觉传递而产生镇痛作用。它对急慢性疼痛有效, 由于其镇痛效果好而成瘾性低故而在临床上得到广泛使用。临床研究发现连续 3 个月使用

曲马多 (口服, < 400 mg/d) 的严重疼痛患者, 未出现显著的身体依赖症状; 使用 > 3 个月, 部分患者出现轻度身体依赖^[1]。Spiller 等^[2]对曲马多滥用导致的不良反应的多中心前瞻性研究观察到给予曲马多 500 mg 足以引起痛样发作、心动过速、高血压和烦躁, 而剂量大于 800 mg 则可以引起昏迷和呼吸抑制。所以长期服用可产生对曲马多的依赖, 因此要慎用。目前有些青少年对情绪障碍认识不清 (比如抑郁、焦虑障碍) 而错误地服用曲马多, 也有些青少年在朋友的诱导下服用, 有些同学为了学习提神而服用, 有的女孩子为了减肥而服用, 对本药存在着许多错误的认识。目前我国青少年因为各种情绪障碍服用曲马多的报道曾上升趋势, 但没有具体的统计数字。本药不在医生指导下服用易成瘾, 可给身体带来很多不良反应, 而且青少年对压力及挫折的心理适应和合理解决问题能力的提高在向“生物-心理-社会医学”新医学治疗模式转变的今天更应该引起临床医生的广泛注意。

参考文献

[1] 刘志民, 张开镛. 曲马多的药理学特点及其依赖性调研 [J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9(2):118.

[2] Spiller H A, Gorman S E, Villalobos, et al. Prospective multicenter evaluation of tramadol exposure [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1997, 35(4):361.

(收稿:2009-12-10 编辑:陈兵)