

慢性溃疡创面愈合的微环境变化： 一项前瞻性随机对照临床研究

孔伟¹ 姜丽娟¹ 赵越² 关静² 崔梅花² 高惠娟³ 刘彦东¹
蒋晓宇¹ 张洪华¹ 张艳芳¹ 韩会民¹

(1. 大庆市第四医院, 黑龙江 大庆 163712; 2. 大庆油田南区医院, 黑龙江 大庆 163712;
3. 大庆油田总医院, 黑龙江 大庆 163712)

【摘要】 目的 探讨非糖尿病慢性溃疡与糖尿病足溃疡愈合适宜的微环境状态及促创面愈合因子表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达变化,为临床治疗慢性溃疡提供理论依据。**方法** 采用前瞻性随机对照临床试验,选择 2013 年 1 月至 2015 年 1 月大庆市第四医院住院的非糖尿病慢性溃疡组患者 20 例及糖尿病足溃疡组患者 25 例为研究对象。两组患者每日进行清创换药,局部感染控制后,给予封闭负压“开窗”技术治疗。测定两组治疗前和治疗后 3 d 和 10 d 创面温度、相对湿度、pH 值、创面面积,于治疗前及治疗后 10 d 用免疫组化法检测创面组织 EGF、VEGF 的表达情况。**结果** 至研究结束时,糖尿病足溃疡组脱落 2 例,最终非糖尿病慢性溃疡组纳入患者 20 例、糖尿病足溃疡组纳入 23 例进行统计。两组治疗后 3 d 和 10 d 创面温度与治疗前比较变化不大,差异无统计学意义($P>0.05$);随治疗时间延长,两组治疗后创面相对湿度、pH 值均较治疗前降低,创面面积均较治疗前缩小。治疗 10 d 糖尿病足溃疡组创面相对湿度、pH 值变化较非糖尿病慢性溃疡组更显著[相对湿度: $(76.84 \pm 1.93)\%$ 比 $(78.64 \pm 2.17)\%$, pH 值: 7.84 ± 0.86 比 7.93 ± 0.97],创面面积缩小程度以非糖尿病慢性溃疡组较糖尿病足溃疡组更显著(cm^2 : 16.82 ± 2.11 比 16.84 ± 2.02)。两组治疗后 10 d EGF 和 VEGF 均较治疗前不同程度增多;且糖尿病足溃疡组上述指标的表达量均较非糖尿病慢性溃疡组少[EGF($\times 10^3$, A 值): 11.81 ± 0.87 比 12.87 ± 0.54 , VEGF($\times 10^3$, A 值): 13.66 ± 0.89 比 15.33 ± 0.97 , 均 $P<0.01$]。**结论** 慢性溃疡愈合不同时期微环境会发生改变,微环境与创面愈合时间密切相关,尤以创面相对湿度、pH 值对创面的愈合作用更为重要。EGF 与 VEGF 表达增多可能与微环境改善有关。

【关键词】 慢性溃疡; 微环境; 表皮生长因子; 血管内皮生长因子

The change of micro environment of wound healing of chronic ulcer: a prospective randomized controlled trail Kong Wei*, Jiang Liuan, Zhao Yue, Guan Jing, Cui Meihua, Gao Huijuan, Liu Yandong, Jiang Xiaoyu, Zhang Honghua, Zhang Yanfang, Han Huimin. *Department of Orthopaedics, the Fourth Hospital of Daqing City, Daqing 163712, Heilongjiang, China

Corresponding author: Kong Wei, Email: kongwei13000@126.com

【Abstract】 Objective To discuss on suitable micro environment for the healing of non diabetic chronic ulcer and diabetic foot ulcer, and the changes in the expression of promoting wound healing factor, such as epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), to provide a theoretical basis for clinical treatment of chronic ulcer. **Methods** A prospective randomized controlled trail (RCT) was conducted. 20 cases of non diabetic chronic ulcer patients and 25 cases of diabetic foot ulcer admitted to the Fourth Hospital of Daqing City From January 2013 to January 2015 were enrolled. Two groups of patients were treated with debridement and dressing change daily, and the technique of closed negative pressure with "window" was given after local infection control; temperature, relative humidity, pH value, the wound area were measured before and after treatment of 3 days and 10 days, EGF, VEGF were detected before and after treatment of 10 days by immunohistochemical expression. **Results** To the end of the experiment, 2 cases of diabetic foot ulcer group fall off, 20 cases of non diabetic chronic ulcer group and 23 cases of diabetic foot ulcer group were included in the final statistics. Compared with before treatment, the changes of wound temperature in the groups after treatment of 3 days and 10 days were not significant, and there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$); with prolonged treatment, the two groups of relative humidity and pH values were lower than those before treatment, the wound area were reduced after treatment. After treatment of 10 days, the changes of relative humidity and pH value in diabetic foot ulcer group was more significant than that in the non diabetic chronic ulcer group[relative humidity: $(76.84 \pm 1.93)\%$ vs. $(78.64 \pm 2.17)\%$, pH value: 7.84 ± 0.86 vs. 7.93 ± 0.97]. The extent of reduction of wound area in non diabetic chronic ulcer group was more significant than that of diabetic foot ulcer group (cm^2 : 16.82 ± 2.11 vs. 16.84 ± 2.02). After the treatment of 10 days, EGF and VEGF in the two groups were all

increased in varying degrees compared with before treatment; the expression of the above indexes in diabetic foot ulcer group was lower than those in non diabetic chronic ulcer group [EGF ($\times 10^3$, A value): 11.81 ± 0.87 vs. 12.87 ± 0.54 , VEGF ($\times 10^3$, A value): 13.66 ± 0.89 vs. 15.33 ± 0.97 , $P < 0.01$]. **Conclusions** The micro environment will change in different stages of chronic ulcer healing and it is closely related to the healing time of the wound, especially the effect of humidity and pH value on the healing of the wound. The increased expression of EGF and VEGF may be related to the improvement of micro environment.

【Key words】 Chronic ulcer; Microenvironment; Epidermal growth factor; Vascular endothelial growth factor

糖尿病足溃疡因具有病因复杂、病程长、致残率高和反复发作的特点^[1],是临床上的一种常见难治性疾病,寻找有利于溃疡愈合的方法已是临床亟待解决的问题。慢性溃疡的愈合不仅与营养、免疫、血供等整体状态有关,而且与创面局部微环境密切相关。溃疡创面不同状态下微环境(指创面的温度、湿度、pH 值和低氧张力等)^[2-5]的特点如何目前鲜见报道。本研究通过对糖尿病足慢性溃疡患者进行前瞻性分组研究,探讨适宜慢性糖尿病足溃疡愈合的微环境及创面组织表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)变化情况,为临床应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象人选与排除标准

1.1.1 入选标准:2013 年 1 月至 2015 年 1 月本院住院的慢性溃疡及 Wagner 分级 II ~ III 级糖尿病足患者。

1.1.2 排除标准:休克未纠正者,有严重心脏病或心功能不全者,有慢性肾脏病或肾功能不全者,有明确严重急慢性肝病者,局部创面严重感染者,肢体广泛或完全坏死需立即截肢者,放射性溃疡、癌性溃疡者。观察过程中有要求撤出者视为脱落对象终止试验予以剔除。

1.2 研究设计及患者一般资料:采用前瞻性随机对照临床试验(RCT),共入选 45 例患者,其中非糖尿病慢性溃疡组 20 例、糖尿病足溃疡组 25 例;CT 血管造影(CTA)检查显示糖尿病足溃疡组下肢动脉血管病变均重于非糖尿病溃疡组。至研究结束时,糖尿病足溃疡组脱落 2 例,非糖尿病慢性溃疡组没有脱落,最终 43 例纳入统计。男性 33 例,女性 10 例;年龄 21 ~ 79 岁,平均(62.7 ± 9.8)岁。

1.3 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,所有治疗和检测方法取得患者或家属同意并签字。

1.4 治疗方法:两组患者每日进行清创换药,局部感染控制后,予封闭负压“开窗”治疗,以给创面提供一个相对密闭空间,减少外界因素干扰。

1.5 观察指标及方法:记录患者性别、年龄、体质量

指数等一般资料,将糖尿病足溃疡患者血糖控制在 5 ~ 10 mmol/L。

1.5.1 创面温度、相对湿度、pH 值、创面面积大小:分别测量治疗前和治疗后 3 d 和 10 d 创面温度、相对湿度、pH 值、创面面积大小。用透明方格纸画创面形状的方法,采用 Adobe photoshop 7.0 和 Osiris 软件计算创面面积。

1.5.2 创面组织中 EGF、VEGF 表达检测:于封闭负压吸引治疗前及治疗后 10 d 取创面组织 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$,用甲醛固定。由于伦理原则的限制,所有组织来源于手术中切取的弃用组织。采用免疫组化法测定 EGF、VEGF 水平,用 Image-Pro Plus 6.0 软件显示 EGF、VEGF 阳性细胞表达的积分吸光度(A)值。

1.6 统计学处理:使用 SPSS 11.5 软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 创面温度(表 1):与治疗前比较,两组治疗后 3 d 和 10 d 创面温度变化不大($P > 0.05$)。

2.2 创面相对湿度(表 1):与治疗前比较,非糖尿病慢性溃疡组治疗 3 d 和 10 d 创面相对湿度明显下降(均 $P < 0.01$),而糖尿病足溃疡组治疗 10 d 后相对湿度才明显下降,且糖尿病足溃疡组较非糖尿病慢性溃疡组降低更显著(均 $P < 0.05$)。

2.3 pH 值(表 1):两组治疗后 pH 值均较治疗前降低,且糖尿病足溃疡组的降低程度较非糖尿病慢性溃疡组更显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 创面面积(表 1):两组治疗后溃疡面积均较治疗明显缩小(均 $P < 0.01$);非糖尿病慢性溃疡组治疗 3 d 和 10 d 后愈合溃疡面积均较糖尿病足溃疡组大(均 $P < 0.05$)。

2.5 创面组织 EGF 与 VEGF 表达水平比较(表 1):阳性颗粒主要表达于表皮基底层细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞中。两组治疗后 EGF 和 VEGF 均较治疗前有不同程度增多,且糖尿病足溃疡组上述指标的表达量均较非糖尿病慢性溃疡组少(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组治疗前后温度、相对湿度、pH 值、创面面积、EGF、VEGF 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	时间	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	相对湿度 (%)	pH 值	创面面积 (cm^2)	EGF ($\times 10^3, \text{A 值}$)	VEGF ($\times 10^3, \text{A 值}$)
非糖尿病慢性 溃疡组	20	治疗前	35.13 $\pm$ 0.82	85.34 $\pm$ 2.59	8.35 $\pm$ 0.94	23.50 $\pm$ 3.43	8.64 $\pm$ 0.45	12.45 $\pm$ 0.88
	20	治疗 3 d	35.37 $\pm$ 0.75	82.90 $\pm$ 2.74 ^a	8.25 $\pm$ 0.82 ^b	21.47 $\pm$ 2.87 ^b		
	20	治疗 10 d	34.93 $\pm$ 0.93	78.64 $\pm$ 2.17 ^a	7.93 $\pm$ 0.97 ^b	16.82 $\pm$ 2.11 ^a	12.87 $\pm$ 0.54 ^a	15.33 $\pm$ 0.97 ^a
糖尿病足溃疡组	23	治疗前	34.78 $\pm$ 0.51	81.37 $\pm$ 2.15	8.18 $\pm$ 0.94	18.13 $\pm$ 2.68	7.45 $\pm$ 0.58	10.56 $\pm$ 0.67
	23	治疗 3 d	34.12 $\pm$ 0.81	80.28 $\pm$ 2.36 ^c	8.02 $\pm$ 0.85 ^{bd}	17.25 $\pm$ 2.65 ^{bc}		
	23	治疗 10 d	34.15 $\pm$ 0.76	76.84 $\pm$ 1.93 ^{ac}	7.84 $\pm$ 0.86 ^{bd}	16.84 $\pm$ 2.02 ^{ad}	11.81 $\pm$ 0.87 ^{ac}	13.66 $\pm$ 0.89 ^{ac}

注:与治疗前比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与非糖尿病慢性溃疡组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;空白代表未测

3 讨 论

慢性溃疡(或慢性难愈性创面)系指临床治疗 4~6 周以上的难愈合或不愈合创面,其主要原因是创面不能通过正常的愈合进程达到愈合,进入一种病理性炎症反应状态,从而导致创面经久难愈^[6];根据病因可以分为 8 种类型,其中压力性溃疡、静脉性溃疡、糖尿病性溃疡是最常见的 3 种,占慢性创面的 70% 左右^[7]。关于慢性溃疡的发病机制研究国内外学者一直处于探索阶段,目前研究发现,溃疡愈合与创面微环境密切相关,然而,针对何种微环境状态能促进溃疡愈合仍不明确。

微环境中的 pH 值对创面愈合的影响包括氧的释放、血管再生、酶的活性、细菌的毒性等多个方面,其对细胞及亚细胞功能、酶活性及皮肤屏障功能亦有重要影响^[8]。人体正常状态下, pH 值应维持在 7.3~7.4,即略呈碱性;正常皮肤的表面是偏酸性的,成年人表皮的 pH 值大致维持在 4.0~6.5,而慢性创面的 pH 值环境在文献记录范围内是 7.1~8.9^[9]。有研究表明,创面微环境中 pH 值改变可明显抑制细菌的生长,微环境中不同 pH 值的抑菌效果不完全相同^[9],其抑制作用主要通过以下几个的方面来实现^[10]:① 可以使核酸、蛋白质等生物大分子所携带的电荷发生改变,进而影响大分子的生物学活性;② 可以引起细胞膜电荷的变化,从而影响细胞对营养物质的吸收;③ 可以改变细菌生长微环境中营养物质的供给及代谢物的毒性。

本研究发现,创面 pH 值在治疗前以碱性为主, pH 值在 8.1~8.5 左右。随着创面好转,肉芽生长, pH 值逐渐下降至 7.5~7.9,虽仍呈碱性,但愈合速度加快,原因可能是高 pH 值环境下创面愈合速度低于 pH 值接近中性的创面愈合速度。而随着创面愈合,微环境中的 pH 值也逐渐接近正常人皮肤 pH 值。

关于微环境中的湿度,过湿的创面环境将会提高创面感染几率,从而延缓创面实际愈合时间。而

创面过干会损伤伤口床的成纤维细胞,不利于局部上皮化^[11],因此无论微环境过湿还是偏干均不利于创面愈合。本研究发现,治疗前大部分病例创面相对湿度均较高,波动在 80.1%~89.5%,分泌物多;小部分病例因以干性坏死为主,相对湿度较正常值无明显改变,随着治疗好转,创面湿度逐渐接近正常水平(71.4%~79.7%),肉芽生长快,创面愈合速度快。非糖尿病慢性溃疡组患者溃疡愈合速度较糖尿病足溃疡组更快,原因主要有:湿性环境下坏死组织能被渗出液水合而释放出组织细胞自身的纤维蛋白溶酶及其他蛋白溶解酶,这些蛋白溶解酶能水解坏死组织,有利于吸收而达到清创效果^[12],另外,适宜的湿性环境有利于坏死组织的溶解,能维持创面局部微环境的低氧状态,有利于细胞的增殖分化和移行,保留渗出液内的生长因子并促进其释放,降低感染率^[13-14]。而且更重要的是,在慢性小腿和足部溃疡,小血管周围常形成纤维鞘,阻碍血液与组织间的营养成分交换,而纤维蛋白溶酶则可以溶解该纤维鞘,使血液与组织间的营养交换恢复正常。

大量临床实践证明,对慢性难愈伤口普通湿性疗法存在清创期长、不易引流、组织生长缓慢、伤口容易感染等问题^[15]。本研究应用改进的全封闭负压“开窗”技术,不仅为创面表面营造一个适度湿润密闭的微环境,同时有利于杀灭创面中的细菌,增加创面血液循环和淋巴引流,有利于组织细胞的增殖和上皮移行,阻隔外源性微生物的入侵。另外,可实时通过“开窗”处进行换药、观察创面情况、取细菌进行培养等以减少感染的机会,提高创面愈合质量,加速清创过程,缩短创面愈合时间^[16]。

在温度方面,接近人体温度,伤口愈合会更快、更好^[13]。本研究提示非糖尿病慢性溃疡体表温度较糖尿病足溃疡者略高,可能与糖尿病患者常合并严重下肢血管病变甚至干性坏死等有关,另外,糖尿病患者对炎症的反应能力低下,局部红肿热痛不明

显,亦是导致局部温度偏低的原因。

在创面修复不同过程中,各种生长因子(包括 EGF、VEGF)分别起到趋化、合成分泌、增殖分化、诱导凋亡、刺激血管新生等多种生物效应,从而促进创面的愈合^[17-19]。EGF 不仅影响与组织修复有关的细胞,如表皮细胞、成纤维细胞以及内皮细胞等的细胞周期转换以加速细胞的分裂、增殖^[20],而且是有效的促细胞分离原,可以促进组织修复细胞内 DNA、RNA 及蛋白质合成^[20],促进角质形成、细胞迁移及上皮化,从而促进创面愈合^[21-22]。VEGF 被认为是目前最强也是唯一特异性促进血管内皮细胞增殖的生长因子,具有促进血管再生、增加毛细血管密度及通透性,改善微循环,诱导成纤维细胞和血管内皮细胞迁移,促进创面纤维增生和新生血管形,有利于肉芽组织的形成和生长的作用^[23-24]。张曼等^[25]的实验证明,将 VEGF 基因导入缺血心肌后可促进血管增生,增加侧支循环。刘阳等^[26]亦发现,中药解毒生肌膏能提高局部肌肉组织中 VEGF 含量,从而促进糖尿病大鼠创面愈合。在不同微环境下,EGF 与 VEGF 的表达如何变化目前未见报道。本研究发现,随着微环境的改善,非糖尿病慢性溃疡组 EGF、VEGF 表达明显增多,肉芽生长良好,创面愈合速度加快;而糖尿病足溃疡组 EGF、VEGF 表达明显低于非糖尿病慢性溃疡组,可能与糖尿病患者机体内晚期糖基化终末产物(AGEs)沉积,持续作用于内皮细胞导致其合成和分泌生长因子的能力下降或生长因子糖基化有关^[27]。因此,糖尿病足创面难以愈合,除了创面局部某些生长因子缺乏和不足外,生长因子活性的改变可能也是影响糖尿病创面愈合的另一个重要因素。

综上所述,不同的创面微环境对创面愈合产生不同影响;在创面愈合过程中,不同时期及不同阶段微环境亦不相同。适度的湿度、温度及 pH 值能减少创面细菌定植或感染率,降低感染风险,促进肉芽生长及创面愈合,过湿或偏干的创面环境均不利于愈合。另外,随着温湿度、pH 值等微环境的改善,EGF、VEGF 等表达进一步增多,两者形成良性循环,有利于创面愈合。总之,适当对创面微环境进行干预,使其达到适宜肉芽生长的理想状态,将对创面愈合起着重要作用,值得进一步探讨。

参考文献

- [1] 常菲,杨长伟,路卫.难愈创面的发生机制和治疗进展[J].第二军医大学学报,2007,28(11):1259-1261.
- [2] WINTER GD, SCALES JT. Effect of air drying and dressings on the surface of a wound[J]. Nature, 1963, 197: 91-92.

- [3] Witkowski JA, Parish LC. Cutaneous ulcer therapy[J]. Int J Dermatol, 1986, 25(7): 420-426.
- [4] Saymen DG, Nathan P, Holder IA, et al. Control of surface wound infection: skin versus synthetic grafts[J]. Appl Microbiol, 1973, 25(6): 921-934.
- [5] Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, et al. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature[J]. Dermatol Surg, 2008, 34(9): 1159-1169.
- [6] Menke NB, Ward KR, Witten TM, et al. Impaired wound healing[J]. Clin Dermatol, 2007, 25(1): 19-25.
- [7] 刘旭盛.慢性创面的诊断与治疗进展[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2013,8(6):8-12.
- [8] 沈萍.微生物学[M].北京:高等教育出版社,2000:144-145.
- [9] 马复廉,翟晓梅.创面酸碱度对细菌生长及创面愈合作用的研究[D].郑州:郑州大学,2012.
- [10] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:50,54,63-66,108-109.
- [11] Feldman DL, Rogers A, Karpinski RH. A prospective trial comparing Biobrane, Duoderm and xeroform for skin graft donor sites[J]. Surg Gynecol Obstet, 1991, 173(1): 1-5.
- [12] 舒立涛,徐宝顺,王蔚然.伤口湿性愈合的新理念[J].中国实用美容整形外科杂志,2004,15(6):336.
- [13] Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. 1962[J]. J Wound Care, 1995, 4(8): 366-367.
- [14] 梁明娟,林瑞燕,麦梨芳,等.湿性愈合理论在糖尿病足伤口处理中的实践[J].岭南现代临床外科,2010,10(5):383-384.
- [15] 蒋琪霞,申萍,刘云,等.改良式湿性疗法治疗老年压疮的临床研究[J].医学研究生学报,2007,20(11):1182-1185.
- [16] 姜丽娟,陈德华,王婧,等.封闭负压开窗技术治疗糖尿病足的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2015,22(3):322-323.
- [17] Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha[J]. J Clin Invest, 2007, 117(5): 1249-1259.
- [18] Zucchi P, Ferrari P, Spina ML. Diabetic foot: from diagnosis to therapy[J]. G Ital Nefrol, 2005, 22 Suppl 31: S20-22.
- [19] 韩会民,郭琳,姜丽娟,等.利用基因芯片技术阐述中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡作用的分子机制[J].中华危重病急救医学,2011,23(10):621-624.
- [20] 陈伟,付小兵,孙同柱,等.表皮细胞生长因子及其受体在难愈性溃疡组织中的表达特征[J].中华危重病急救医学,2003,15(10):600-602.
- [21] 刘如俊,赵文志,张路,等.表皮生长因子在糖尿病足溃疡创面愈合过程中的作用观察及其机制探讨[J].大连医科大学学报,2014,(4):322-327.
- [22] 吕雅丽,梁龙彦,刘阳,等.中药解毒生肌膏治疗大鼠糖尿病足的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(4):233-235.
- [23] 周友龙,周六合.VEGF在缺血性脑血管病中的运用及面临的问题[J].中国误诊学杂志,2004,4(10):1620-1622.
- [24] 陈伟,付小兵,孙同柱,等.血小板源性生长因子和受体在皮肤溃疡中表达特征及其对溃疡形成影响的研究[J].中华危重病急救医学,2002,14(9):515-517.
- [25] 张曼,张福春,张海荣,等.血管内皮生长因子基因对兔冠状动脉前降支结扎心肌侧支循环建立的影响[J].中华危重病急救医学,1999,11(1):16-18.
- [26] 刘阳,韩会民,徐荣慧,等.中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡肌肉中细胞因子影响的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):49-51.
- [27] 宋振强,王润秀,于德民,等.晚期糖基化终末产物修饰人血清白蛋白对角质形成细胞迁移功能的影响[J].中华医学杂志,2008,88(38):2690-2694.

(收稿日期:2016-01-20)

(本文编辑:邸美仙 李银平)