

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.006

透明质酸联合盐酸米诺环素对大鼠金黄色葡萄球菌感染创口的治疗效果 *

孟 云¹ 于建勃² 庄德舒³ 毕良佳³ 张喆焱^{1Δ}

(1 佳木斯大学附属口腔医院 黑龙江 佳木斯 154002; 2 牡丹江医学院基础医学院 黑龙江 牡丹江 157000;

3 哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨透明质酸联合盐酸米诺环素对大鼠金黄色葡萄球菌感染创口的治疗效果。**方法:**选择 32 只 Wistar 大鼠,在背部脊柱两侧各制备 1 个全层皮肤缺损模型。创面接种细菌形成感染创口并将大鼠随机地分为 4 个组,每个组共有 16 个创口。实验组(1.5 %透明质酸联合 0.1 %盐酸米诺环素凝胶治疗组)、对照组 1(0.9 %生理盐水治疗组)、对照组 2(1.5 %透明质酸凝胶治疗组)、对照组 3(0.1 %盐酸米诺环素凝胶治疗组)。观察分析创口愈合情况及创口愈合率,HE 染色组织形态学分析,免疫组织化学染色法分析创口中肿瘤坏死因子 α 的表达。**结果:**透明质酸联合盐酸米诺环素组创口愈合率为(78.13 $\pm$ 3.04) %,显著高于生理盐水对照组、透明质酸对照组和盐酸米诺环素对照组(均 $P<0.05$);透明质酸联合盐酸米诺环素组创口可见大量成熟的纤维组织,生理盐水组创口可以观察到组织发生坏死,结构不清;透明质酸组可见富含血管的新生肉芽组织;盐酸米诺环素组可见大量纤维组织;透明质酸联合盐酸米诺环素组创口 TNF- α 表达为 10.84 $\pm$ 1.49,显著低于生理盐水对照组、透明质酸对照组和盐酸米诺环素对照组(均 $P<0.05$)。**结论:**1.5 %透明质酸联合 0.1 %盐酸米诺环素凝胶对大鼠金黄色葡萄球菌感染创口有较好的治疗效果。

关键词:口腔颌面部软组织损伤;透明质酸联合盐酸米诺环素凝胶;创口愈合;肿瘤坏死因子 α

中图分类号:R-33;R782 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)11-2024-04

Effects of Hyaluronic Acid combined with Minocycline Hydrochloride on the Wound Infected by *Staphylococcus Aureus* in Rats*

MENG Yun¹, YU Jian-bo², ZHUANG De-shu³, BI Liang-jia³, ZHANG Zhe-yan^{1Δ}

(1 Stomatological Hospital Affiliated to Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154002, China;

2 School of Basic Medical Sciences, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang, 157000, China;

3 Department of Stomatology, The fourth affiliated hospital of Harbin medical university, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: This study explores the therapeutic effects that hyaluronic acid combined with minocycline hydrochloride in rats wound infected with *Staphylococcus aureus*. **Methods:** The full-thickness dermal excision models on two sides of spine were established on 32 wistar rats, wounds were inoculated with *Staphylococcus aureus* to form infected wound. There were 4 groups of rat and 16 infected wounds in each group, divided randomly. The experimental group (1.5 % hyaluronic acid combined with 0.1 % minocycline hydrochloride gel treatment group, n=8), the first control group(0.9 % normal saline treatment group, n=8), the second control group (1.5 % hyaluronic acid gel treatment group, n=8) and the third control group (0.1 % minocycline hydrochloride gel treatment group, n=8). The wound healing condition and the rate of that related to rats were watched and detected, through the method of HE staining to fulfill histological analysis and immunohistochemical staining of TNF- α were accomplished. **Results:** The rate of wound healing in the hyaluronic acid combined with minocycline hydrochloride group was (78.13 $\pm$ 3.04) %, significantly higher related to that of normal saline group($P<0.05$), hyaluronic acid group ($P<0.05$) and minocycline hydrochloride group ($P<0.05$). There existed a great quantity of mature fibrous tissue in the hyaluronic acid combined with minocycline hydrochloride group; the tissue necrosis and unclear structure were observed in the normal saline group; in the hyaluronic acid group, the granulation tissue was rich in blood vessels; there existed a mass of fibrous tissue in the minocycline hydrochloride group. The expression of TNF- α in the hyaluronic acid combined with minocycline hydrochloride group was 10.84 $\pm$ 1.49 significantly lower related to that of normal saline group($P<0.05$), hyaluronic acid group($P<0.05$) and minocycline hydrochloride group($P<0.05$). **Conclusions:** Our study show that 1.5 % hyaluronic acid combined with 0.1 % minocycline hydrochloride gel can have a promising therapeutic effect on the rats wound infected with staphylococcus aureus.

Key words: Oral and maxillofacial soft tissue injury; Hyaluronic acid combined with minocycline hydrochloride gel; Wound healing; TNF- α

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R782 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2024-04

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81670994)

作者简介:孟云(1989-), 硕士, 医师, 主要从事口腔颌面外科临床工作, 电话: 13946397587, E-mail: 1062935130@qq.com

Δ 通信作者:张喆焱(1965-), 教授, 主要从事口腔颌面外科临床工作, E-mail: zhangzheyang6@163.com

(收稿日期:2016-10-20 接受日期:2016-11-16)

前言

口腔颌面部软组织损伤在临床上比较常见,单纯颌面部软组织损伤占颌面部损伤的 65 %左右,可分为切割伤、挫裂伤和火器伤等,感染是影响组织愈合的重要因素。目前,外科清创术与抗生素、新型生物敷料和多种中药制剂等已被用于感染创口的防治^[1,2]。近年来,研究显示盐酸米诺环素与壳聚糖、透明质酸与生长因子等联合治疗感染创口利于组织愈合,其中盐酸米诺环素 (Minocycline hydrochloride, MINO) 又称盐酸二甲胺四环素,具有较强抗菌活性的广谱抗生素,且其细菌耐药性比较少见^[3]。透明质酸(Hyaluronic acid, HA)属于高生物活性的糖胺聚糖类物质,在抗炎、细胞迁移与增殖、血管生成、抑制瘢痕等方面具有重要作用^[4,5]。然而,盐酸米诺环素与透明质酸联合的研究比较少,本研究旨在探讨透明质酸联合盐酸米诺环素凝胶对大鼠金黄色葡萄球菌感染创口的作用效果,旨在为软组织损伤并发感染的局部治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 Wistar 大鼠 32 只 (哈尔滨医科大学动物实验中心提供),体重 200-300 g,适应性喂养 5 d;金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 菌株。

1.2 主要试剂

TNF- α (Tumor necrosis factor- α) 抗体 (BOSTER 公司), PV-6001 二抗、DAB 显色剂 (ZSGB 公司);0.1 %盐酸米诺环素凝胶、1.5 %透明质酸凝胶、1.5 %透明质酸联合 0.1 %盐酸米诺环素凝胶(由惠博士公司提供),0.9 %生理盐水;其它实验用试剂和实验仪器由哈尔滨工业大学实验室提供。

1.3 大鼠感染创口模型的建立及分组

10 %水合氯醛腹腔注射麻醉(3 mL/kg),备毛,脊柱两侧标记并切除 1.3 cm $\times$ 1.3 cm 创口,深达筋膜层,建立大鼠的全层皮肤缺损模型。创口分别止血并涂布菌液(含 1×10^8 cells/mL, 各 1 mL),并用消毒纱布覆盖,1 次/d,共 3 天,每天均注射 hydrocortisone 针剂(20 mg/kg)。3 天后创口出现脓液,大鼠处于萎靡不振状态,完成模型^[6,7]。将大鼠随机地分组,实验组:创口涂布 1.5 %透明质酸联合 0.1 %盐酸米诺环素凝胶进行治疗,对照组 1:创口涂布 0.9 %生理盐水进行治疗,对照组 2:创口涂布 1.5 %透明质酸凝胶进行治疗,对照组 3:创口涂布 0.1 %盐酸米诺环素凝胶进行治疗,每个组共有 16 个创口。创口每次各涂布 1 mL,隔天治疗一次。在实验过程中的第 1 天、第 3 天、第 13 天进行创口的拍照记录,药物治疗 10 天后,处死大鼠并切取创口。

1.4 观察指标及方法

进行大鼠创口愈合情况的观察;运用计算机计算大鼠第 1 天和第 13 天创口面积图像,创口愈合率=(第 1 d 值-第 13 d 值)/第 1 d 值 $\times$ 100 %;组织固定,石蜡 5 μ m 连续切片,HE 染色,显微镜($\times$ 200)组织形态学观察;按说明书完成 IHC 染色,显微镜($\times$ 400)下每样本随机 5 个视野计数阳性细胞,取均值。

1.5 统计学分析

用 SPSS19.0 统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠创口愈合情况的比较

创口愈合状况:生理盐水组创口缩小最少,创口可见坏死物,大量炎性渗出物存在;透明质酸组、盐酸米诺环素组创口缩小明显,出现肉芽创面,创口存在少量渗出;透明质酸联合盐酸米诺环素组创口缩小最明显,创口出现结痂,上皮增生覆盖明显。见图 1。

创口愈合率:单因素方差分析($F=18.18$, $P < 0.05$);联合药物组与生理盐水组、透明质酸组和盐酸米诺环素组比较都有统计学意义(均 $P < 0.05$)。各组创口愈合率平均值,见表 1。

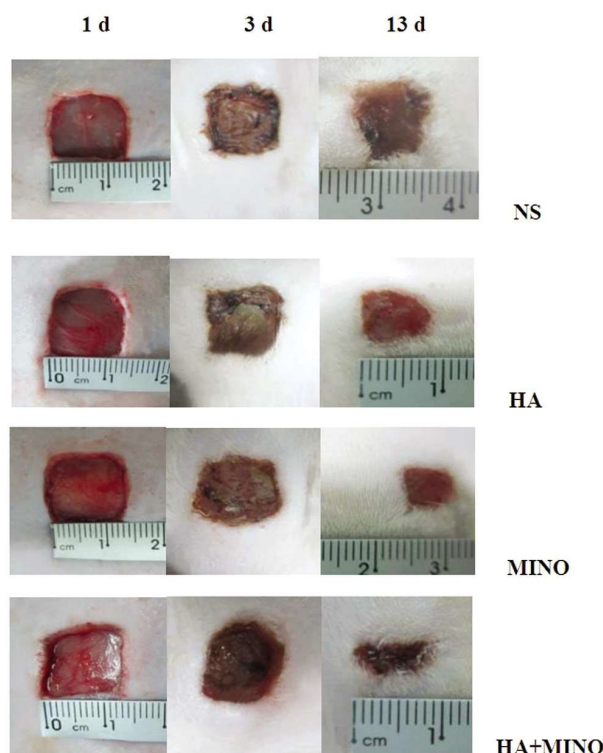


图 1 各组创口的愈合情况

Fig.1 The wound healing of each group

表 1 各组创口的愈合率($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The wound healing rate in each group

Groups	The amount of rats (n)	Wound healing rate
NS	8	66.37 $\pm$ 2.83*
HA	8	72.50 $\pm$ 3.46*
MINO	8	73.25 $\pm$ 3.41*
HA+MINO	8	78.13 $\pm$ 3.04

Note: *compared with the HA+MINO group, $P < 0.05$.

2.2 各组大鼠创口组织形态学的比较

生理盐水组创口可以观察到组织发生坏死,局部红染,大量蓝染的细胞核碎屑,结构不清;透明质酸组创口可见富含血管的新生肉芽组织,大量炎细胞浸润;盐酸米诺环素组创口可见大量纤维组织,少量成纤维细胞,淋巴细胞和浆细胞浸润;透明质酸联合盐酸米诺环素组创口可见大量成熟的纤维组织以及少量的淋巴细胞浸润。见图 2。

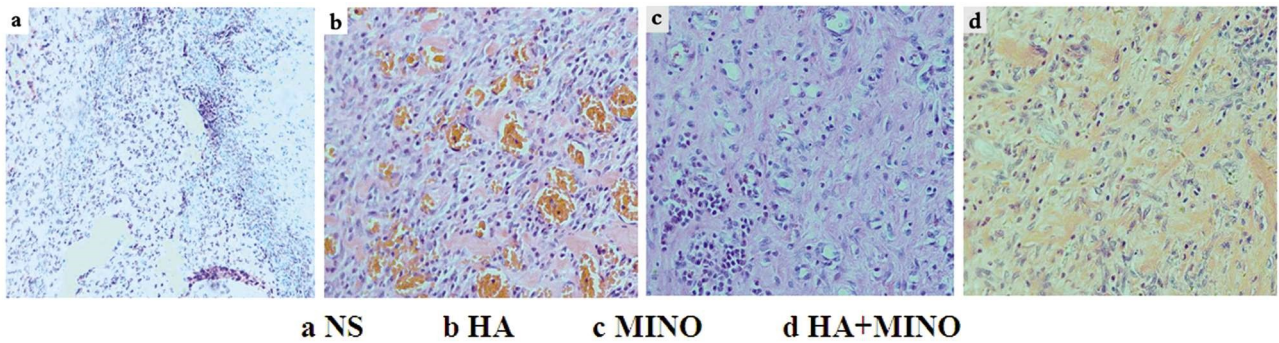


图 2 各组组织形态学观察

Fig.2 Histological examination in each group (HE staining, $\times 200$)

2.3 各组大鼠创口 TNF- α 表达的比较

免疫组织化学染色后创口 TNF- α 阳性反应为在细胞质呈棕黄色或者棕褐色,各组创口 TNF- α 表达,见图 3;单因素方差

分析($F=9.34$, $P<0.05$),联合药物组创口 TNF- α 水平与生理盐水组、透明质酸组和盐酸米诺环素组比较都有统计学意义 (均 $P<0.05$)。各组创口 TNF- α 表达平均值,见表 2。

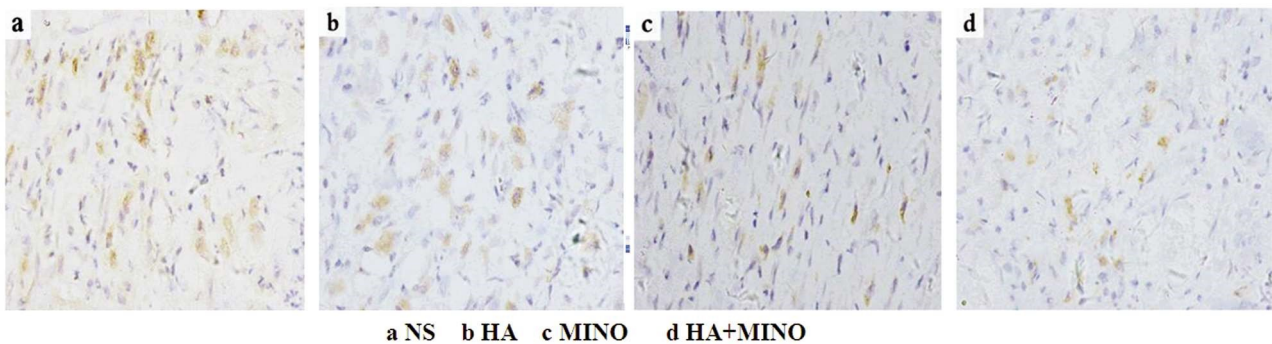


图 3 各组创口 TNF- α 表达比较

Fig.3 Immunohistochemical staining of TNF- α in each group ($\times 400$)

表 2 各组创口 TNF- α 表达比较

Table 2 The expression of TNF- α in each group

Groups	The amount of rats (n)	TNF- α
NS	8	17.83 $\pm$ 3.68*
HA	8	14.75 $\pm$ 3.22*
MINO	8	14.63 $\pm$ 1.39*
HA+MINO	8	10.84 $\pm$ 1.49

Note: *compared with the HA+MINO group, $P<0.05$.

3 讨论

口腔颌面部软组织损伤在颌面部损伤中发病率最高,且呈显著上升趋势,按照损伤产生的原因以及程度可划分为多种类型,其处理方法主要依据损伤类型的特点对症处理如理疗、中药外敷、皮瓣移植等,而当感染发生组织愈合将会延迟,带给患者巨大的身心及经济负担^[6]。据研究,当创口受到细菌污染时(大于 10^5 cfu/g),组织愈合发生困难,其中基质金属蛋白酶以及多种细菌酶类等的大量释放将导致胞外基质中生长因子等多种蛋白成分遭到破坏,同时感染坏死也会造成创口组织发生血液循环障碍,这将严重影响修复进程。盐酸米诺环素具有的抗胶原酶特性能防止组织内胶原成分的溶解破坏,作为广谱抗生素其具有较强抗菌活性能显著降低创口组织中的细菌负荷从而利于组织修复^[9,10]。透明质酸是一种具有良好生物相容性和强大保水特性的高分子活性物质,可以为组织湿性愈合创造有

利条件,作为一种靶向运载工具,可显著提高药物利用率,其复合物受到国内外学者的广泛关注^[11-14]。原位凝胶是能在给药后发生溶液-凝胶相变,且具有较高生物相容性的新型药物运载系统,该剂型可以在组织内较长时间存留,达到控释及缓释的效果,其贮药特性可显著降低各种外界干扰因子的影响,提高治疗效果,而且其生产制备工艺流程简单易操作,在医药领域受到学者的重视^[15]。本实验将透明质酸和盐酸米诺环素以原位凝胶形式作用于感染创口,提高创口组织局部浓度,隔天给药一次,利用其缓释性能以降低耐药性,以探讨感染创口局部治疗方法及该药的治疗效果。

本研究中,盐酸米诺环素作用于感染创口能发挥快速、高效的抗菌作用且能维持较长时间,是通过阻碍其肽链增长,导致蛋白质无法合成来发挥作用的。Tsai 等研究指出局部应用 0.1% 盐酸米诺环素能迅速降低感染创口的细菌负荷,改善创口炎症状态,为组织修复创造有利条件,促进愈合进程。透明质酸能与生长因子结合,对细胞的增殖与分化有积极作用,也能增加组织中 III 型胶原的合成和转化生长因子- $\beta 3$ 的表达;透明质酸作为药物载体,与其受体结合,可以实现定向给药和减少毒副作用的效果^[16]。吴正平等^[17]研究指出局部应用 1.0% 透明质酸复合物可以加速组织修复进程。何祯平等^[18]研究指出应用 1.0%、2.0% 的外源性透明质酸可以通过上调组织中 III 型胶原的合成与透明质酸的含量,减少创口瘢痕组织形成,对组织修复具有正向作用。本实验中联合药物组的创口愈合率均比生理盐水组、透明质酸组、盐酸米诺环素组为高,拍照图片显示创口

出现明显的上皮增生覆盖,此结果与之前研究结果相一致,提示1.5%透明质酸联合0.1%盐酸米诺环素凝胶通过局部途径作用于感染创口,能促进组织愈合进程。

创口愈合涉及大量细胞与非细胞成分之间的相互作用,其中炎细胞的浸润、成纤维细胞的增殖在愈合中扮演重要角色。研究报道称当细菌等致炎因素长期存在,组织中过量中性粒细胞被激活,它们可以通过氧自由基作用加重损伤程度,其中促炎介质TNF- α 等在其趋化作用的发生和调节中发挥重要作用^[19];TNF- α 主要由巨噬细胞产生,可妨碍创口愈合,TNF- α 等大量释放会导致免疫调节功能处于紊乱状态,而且降低生长因子的活性,导致成纤维细胞等趋向凋亡,对组织愈合中胶原沉积产生负面作用,创口愈合将会延迟^[20-22]。Aoyagi等^[23,24]指出盐酸米诺环素对创口愈合有抑菌效果,且已用于皮肤感染的治疗,其研究证实该药对组织修复有积极效果。Frenkel等指出透明质酸能通过下调氧自由基的损害作用和前列腺素E2水平以及通过降低炎细胞趋化作用来调节炎症反应。本实验中联合药物组创口中TNF- α 表达均比生理盐水组、透明质酸组、盐酸米诺环素组为低,组织内大量成熟纤维组织形成,此结果与之前研究结果相一致。这一结果提示1.5%透明质酸联合0.1%盐酸米诺环素凝胶能通过下调TNF- α ,促进组织修复进程。

综上所述,1.5%透明质酸联合0.1%盐酸米诺环素凝胶通过局部给药方式作用于感染创口,下调创口TNF- α ,促进组织愈合。口腔颌面部软组织损伤高发,创口常受到污染,目前已有不少学者致力于新型局部治疗方法的研究,本研究为其局部治疗方法提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] 许艺莲, 刘韦淞, 李琬. 口腔颌面部软组织损伤患者感染的预防[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 15: 3827-3828
Xu Yi-lian, Liu Wei-song, Li Long. Prevention of Infection in Patients with Soft Tissue Injury in Oral and Maxillofacial Region[J]. Chinese journal of hospital infection, 2014, 15: 3827-3828
- [2] Dubhashi S P, Sindwani R D. A Comparative Study of Honey and Phenytoin Dressings for Chronic Wounds [J]. Indian Journal of Surgery, 2015, 77(3): 1209-1213
- [3] Nagarakanti S, Bishburg E. Is Minocycline an Antiviral Agent? A Review of Current Literature[J]. Basic clinical pharmacology toxicology, 2016, 118(1): 4-8
- [4] Frenkel J S. The role of hyaluronan in wound healing[J]. International wound journal, 2014, 11(2): 159-163
- [5] Gaston J, Thibeault S L. Hyaluronic acid hydrogels for vocal fold wound healing[J]. Biomaterials, 2013, 3(1): e23799
- [6] 付小兵, 孙同柱, 盛志勇. 几种用于创伤修复研究的动物模型[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(5): 479-480
Fu Xiao-bing, Sun Tong-zhu, Sheng zhi-yong. Several kinds of animal models for wound healing research [J]. Chinese experimental surg, 1999, 16 (5): 479-480
- [7] Tsai D M, Tracy L E, Lee C C Y, et al. Full thickness porcine burns infected with Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa can be effectively treated with topical antibiotics [J]. Wound Repair and Regeneration, 2016, 24(2): 356-365
- [8] O'Connor R C, Shakib K, Brennan P A. Recent advances in the management of oral and maxillofacial trauma [J]. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2015, 53(10): 913-921
- [9] Geng S, Cao C, Chen Z. The effect of non-surgical periodontal and adjunctive minocycline-HCL treatments on collagenase activity[J]. Chinese journal of stomatology, 2000, 35(5): 336-339
- [10] Ruan H, Yu Y, Liu Y, et al. Preparation and characteristics of thermoresponsive gel of minocycline hydrochloride and evaluation of its effect on experimental periodontitis models [J]. Drug delivery, 2016, 23(2): 525-531
- [11] Knopf Marques H, Pravda M, Wolfova L, et al. Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation[J]. Advanced Healthcare Materials, 2016
- [12] Babo P S, Reis R L, Gomes M E. Production and characterization of hyaluronic acid microparticles for the controlled delivery of growth factors using a spray dehydration method [J]. Journal of Biomaterials Applications, 2016: 0885328216669475
- [13] Lin W J, Lee W C, Shieh M J. Hyaluronic acid conjugated micelles possessing CD44 targeting potential for gene delivery [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 101-108
- [14] Paliwal S R, Paliwal R, Agrawal G P, et al. Hyaluronic acid modified pH-sensitive liposomes for targeted intracellular delivery of doxorubicin[J]. Journal of liposome research, 2015: 1-12
- [15] 魏静. 盐酸米诺环素牙周缓释原位凝胶的研究[D]. 沈阳药科大学, 2007
Wei Jing. Minocycline hydrochloride in situ gel periodontal slow-release research [D]. Shenyang pharmaceutical university, 2007
- [16] Akella R, Bonnacaze R T. Hyaluronic acid hydrogel biomaterials for soft tissue engineering applications[J]. 2003
- [17] Wu Z, Tang Y, Fang H, et al. Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015, 26(1): 1-10
- [18] 何祯平, 程宁新, 王原路, 等. 外源性透明质酸对创面愈合组织的影响[J]. 中国美容医学, 2003, 12(6): 573-575
He Zhen-ping, Cheng Ning -xin, Wang Yuan-lu, et al. Influence of exogenous hyaluronic acid on wound healing organization [J]. China medical cosmetology, 2003, 12 (6): 573-575
- [19] Hoth J J, Wells J D, Hiltbold E M, et al. Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion [J]. Shock (Augusta, Ga.), 2011, 35(6): 604
- [20] Withycombe C, Purdy K J, Maddocks S E. Micro-management: curbing chronic wound infection[J]. Molecular Oral Microbiology, 2016
- [21] Eming S A, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation [J]. Science translational medicine, 2014, 6(265): 265sr6-265sr6
- [22] 范瑛瑛, 叶光华, 林刻智, 等. α 7nAChR的激活通过抑制TNF- α 表达促进糖尿病小鼠伤口愈合 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(6): 1053-1058
Fan Yan-yan, Ye Guang-hua, Lin Ke-zhi, et al. Activation of α 7nAChR promotes wound healing in diabetic mice by inhibiting the expression of TNF- α [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013, 29 (6): 1053-1058
- [23] Aoyagi S, Onishi H, Machida Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds[J]. International journal of pharmaceutics, 2007, 330(1): 138-145
- [24] Sung J H, Hwang M R, Kim J O, et al. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan [J]. International journal of pharmaceutics, 2010, 392(1): 232-240