

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170809.031

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170809.1126.062.html>

局部臭氧治疗对肛瘘创面中炎症细胞因子、生长细胞因子及凋亡分子表达的影响

卢 勇, 吕雪丽, 黄成龙, 徐跃军

(湖北省武汉市第八医院肛肠科, 湖北 武汉 430010)

[摘要] **目的:** 研究局部臭氧治疗对肛瘘创面中炎症细胞因子、生长细胞因子及凋亡分子表达的影响。**方法:** 选择在院接受肛瘘切除术的低位单纯性肛瘘患者, 随机分为臭氧组和对照组, 分别接受臭氧治疗联合常规换药以及常规换药。换药后第5天、10天、15天时, 钳夹创面肉芽组织适量并测定炎症细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12 以及生长细胞因子 VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 以及凋亡分子 Bax、P53、caspase-3 的表达量。**结果:** 换药后第5天、10天、15天时, 臭氧组患者肛瘘创面中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12、VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 的蛋白表达量均显著高于对照组, Bax、P53、caspase-3 的蛋白表达量均显著低于对照组。**结论:** 局部臭氧治疗能够增加肛瘘创面中炎症细胞因子、生长细胞因子的表达, 抑制凋亡分子的表达, 有利于创面的愈合。

[关键词] 肛瘘; 创面; 臭氧; 细胞因子; 凋亡

[中图分类号] R657.1+6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)14-2021-04

Effect of local ozone treatment on inflammatory cytokine, growth cytokine and apoptosis molecule expression in anal fistula wound

LU Yong, LV Xue-li, HUANG Cheng-long, XU Yue-jun

(Anorectal Department, The Eighth Hospital of Wuhan City, Wuhan 430010, China)

[Foundation Project]: This study was supported by 2013 Hubei Provincial Health and Family Planning Commission (Grant No. JX6B105)

[Author]: LU Yong (1976-), Male, Wuhan Hubei, M. B., Attending Physician, Tel: 13638686533, E-mail: kitty390371@163.com.

[Correspondence to]: XU Yue-jun, Male, Associate Chief Physician, Tel: 13871361153, E-mail: XYJ1113@163.com.

Received: 2017-06-19 Revised: 2017-06-25

JHMC, 2017; 23(14): 2021-2024

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of local ozone treatment on inflammatory cytokine, growth cytokine and apoptosis molecule expression in anal fistula wound. **Methods:** Patients with low simple anal fistula who received anal fistulectomy in the Eighth Hospital of Wuhan between June 2014 and December 2016 were selected and randomly divided into ozone group and control group who received ozone combined with routine treatment and routine treatment respectively. Five days, ten days and fifteen days after treatment, the proper amount of wound granulation tissue was clamped to determine the expression of inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-8 and IL-12, growth cytokines VEGF, FGF-1, FGF-2 and EGF as well as apop-

[基金项目] 2013 湖北省卫计委面上项目(JX6B105)

[作者简介] 卢勇(1976-), 男, 湖北武汉人, 本科, 主治医师, 电话: 13638686533, E-mail: kitty390371@163.com.

[通讯作者] 徐跃军, 男, 副主任医师, 电话: 13871361153, E-mail: XYJ1113@163.com.

[收稿日期] 2017-06-19 **[修回日期]** 2017-06-25 **网络出版时间:** 2017-08-09 11:26:11

tosis molecules Bax, P53 and caspase-3. **Results:** Five days, ten days and fifteen days after treatment, IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12, VEGF, FGF-1, FGF-2 and EGF protein expression in anal fistula wound of ozone group were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$) while Bax, P53 and caspase-3 protein expression were significantly lower than those of control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Local ozone treatment can increase the expression of inflammatory cytokines and growth cytokines, inhibit the expression of apoptosis molecules in anal fistula wound, and promote wound healing.

[KEY WORDS] Anal fistula; Wound; Ozone; Cytokines; Apoptosis

肛瘘是临床常见的直肠肛管疾病,直肠内细菌侵入肛窦并引起感染是主要的病因,需要接受手术治疗。肛瘘手术后的创面较为特殊,由于肛门每日排便的特殊生理功能、局部创面污染较为严重,愈合过程同时存在修复和污染,容易出现创面修复和愈合延迟^[1,2]。臭氧是近年来被用于复杂创面治疗的手段,具有较强的氧化性,不仅能够杀灭病原菌、诱导成纤维细胞增殖,还能调节内皮细胞、巨噬细胞功能,对创面的修复具有显著促进作用^[3,4]。创面愈合的过程涉及炎症反应、细胞生长以及组织重建,多种细胞因子及凋亡分子参与该过程的调控。在下列研究中,为了明确臭氧用于肛瘘创面的治疗价值,我们具体分析了局部臭氧治疗对肛瘘创面中炎症细胞因子、生长细胞因子及凋亡分子表达的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2014 年 6 月~2016 年 12 月期间在武汉市第八医院接受肛瘘切除术的低位单纯性肛瘘患者作为研究对象,所有患者均符合肛瘘诊断标准,接受肛瘘切除术并开放创面。排除结核性肛瘘患者、肛瘘合并肛周湿疹患者。共入组 68 例,采用随机数表法分为两组,每组各 34 例。臭氧组中男性 22 例,女性 12 例,年龄 32~55 岁;对照组中男性 20 例,女性

14 例,年龄 33~53 岁。两组一般资料的比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

1.2 创面治疗方法

对照组进行常规换药,碘伏消毒后放置凡士林纱条,每日换药 1 次;臭氧组在常规换药的基础上给予局部臭氧治疗,方法如下:采用来自武汉鑫乐泰医疗技术有限公司的臭氧治疗仪进行臭氧治疗,臭氧浓度设置为 10 mg/L,以臭氧水冲洗模式和臭氧雾熏蒸模式进行治疗,每次 3 分钟,治疗后进行常规换药。

1.3 创面中分子表达的检测方法

换药后第 5 天、10 天、15 天时,钳夹少许创面肉芽组织,加入蛋白裂解液后充分匀浆,分离组织中的总蛋白后采用酶联免疫吸附试剂盒测定 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12、VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF、Bax、P53、caspase-3 的蛋白表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件录入和分析数据,两组间蛋白表达量的数据进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肛瘘创面中炎症细胞因子的表达量

臭氧组患者肛瘘创面中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12 的蛋白表达量均显著高于对照组。两组换药后第 5 天、10 天、15 天时肛瘘创面中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12 表达量的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 换药后肛瘘创面中炎症细胞因子的表达量 (ng/L, $n = 34, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	IFN- γ	TNF- α	IL-1	IL-8	IL-12
臭氧组	5 d	3.14 \pm 0.52*	1.27 \pm 0.14*	4.29 \pm 0.68*	0.57 \pm 0.08*	0.38 \pm 0.06*
	10 d	4.54 \pm 0.63*	2.21 \pm 0.34*	6.48 \pm 0.73*	0.83 \pm 0.11*	0.64 \pm 0.09*
	15 d	5.72 \pm 0.78*	2.89 \pm 0.38*	7.69 \pm 0.93*	1.15 \pm 0.16*	0.92 \pm 0.12*
对照组	5 d	1.92 \pm 0.25	0.75 \pm 0.09	2.77 \pm 0.42	0.32 \pm 0.06	0.22 \pm 0.03
	10 d	2.89 \pm 0.42	1.32 \pm 0.17	3.89 \pm 0.52	0.49 \pm 0.08	0.39 \pm 0.06
	15 d	3.88 \pm 0.52	1.89 \pm 0.25	4.62 \pm 0.79	0.78 \pm 0.10	0.62 \pm 0.09

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 肛瘘创面中生长细胞因子的表达量

臭氧组肛瘘创面中 VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 的蛋白表达量均显著高于对照组。两组换药后第 5 天、10 天、15 天时肛瘘创面中 VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 表达量的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 换药后肛瘘创面中生长细胞因子的表达量 ($n = 34, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	VEGF (ng/L)	FGF-1 (pg/L)	FGF-2 (ng/L)	EGF (ng/L)
臭氧组	5 d	6.49 \pm 0.93*	76.83 \pm 9.35*	53.58 \pm 8.37*	3.58 \pm 0.52*
	10 d	8.58 \pm 1.08*	94.51 \pm 11.25*	82.38 \pm 10.35*	5.51 \pm 0.78*
	15 d	11.37 \pm 1.67*	126.53 \pm 16.58*	107.62 \pm 13.28*	8.32 \pm 1.04*
对照组	5 d	3.58 \pm 0.52	44.21 \pm 6.67	30.38 \pm 5.82	1.75 \pm 0.26
	10 d	5.27 \pm 0.71	62.31 \pm 7.93	47.49 \pm 6.41	3.31 \pm 0.46
	15 d	7.62 \pm 0.93	78.65 \pm 9.32	58.59 \pm 8.92	5.28 \pm 0.78

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 肛瘘创面中凋亡分子的表达量

臭氧组肛瘘创面中 Bax、P53、caspase-3 的蛋白表达量均显著低于对照组。两组患者换药后第 5 天、10 天、15 天时肛瘘创面中 Bax、P53、caspase-3 表达量的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 换药后肛瘘创面中凋亡分子的表达量 ($n = 34, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	Bax	P53	Caspase-3
		(ng/L)	(pg/L)	(ng/L)
臭氧组	5 d	1.87±0.24*	86.53±10.24*	4.29±0.62*
	10 d	1.32±0.17*	67.51±8.24*	3.04±0.52*
	15 d	1.05±0.15*	48.64±7.25*	2.41±0.36*
对照组	5 d	2.94±0.42	131.25±16.74	7.58±0.94
	10 d	2.13±0.26	112.42±14.52	5.61±0.66
	15 d	1.88±0.25	104.46±12.83	4.24±0.55

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

肛瘘术后创面较为特殊,同时存在污染和修复,组织的修复过程涉及炎症反应、细胞生长以及组织重建,而粪便排泄所造成的污染会影响修复过程^[5,6]。因此,有效的局部换药和治疗对肛瘘创面的愈合具有积极价值。慢性炎症反应是创面修复过程中重要的病理变化,适度的炎症反应程度有助于创面的修复和愈合^[7]。巨噬细胞是在炎症反应过程中介导吞噬和抗原提呈的细胞类型。在创面愈合的微环境中,巨噬细胞能活化为 M1 型巨噬细胞并在 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子的诱导下合成 IL-1、IL-8、IL-12 等促炎因子,进而参与病原微生物的杀伤。IL-1 和 IL-12 具有较强的促炎活性,能够增强中性粒细胞、巨噬细胞的吞噬功能,也能介导炎症反应的级联激活^[8];IL-8 是具有趋化功能的细胞因子,能够促进淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞向局部创面聚集和浸润,进而通过炎症反应来杀伤局部病原菌^[9]。为了明确局部臭氧治疗对肛瘘创面愈合过程中炎症反应的影响,我们对上述炎症细胞因子的表达量进行了分析,结果显示:臭氧组患者肛瘘创面中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-12 的蛋白表达量均显著高于对照组。这就说明臭氧局部治疗能够在一定程度上激活肛瘘创面中的炎症反应、有利于创面的愈合。

创面在修复和愈合过程中,成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞等类型细胞的增殖是重要的生物学过程。VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 等生长细胞因子是介导细胞增殖及生长的重要内源性活性物质,在创面修复过程中发挥重要作用。VEGF 是包括 VEGF-A、-B、-C、-D、-E 等多个成员的家族,能够在创面修复过程中促进新生毛细血管生成、充实肉芽组织,同时也能改善创面局部的微循环、提供修复所

需的营养物质^[10]。FGF-1 和 FGF-2 是 FGF 家族中参与创面修复的成员,对成纤维细胞、内皮细胞、角质细胞的增殖均具有促进作用,能够加速创面局部的组织修复以及血管新生^[11]。EGF 是能够特异性促进表皮细胞增殖的细胞因子,能够加速创面的上皮化过程,还能促进创面内结缔组织形成及收缩^[12]。为了明确局部臭氧治疗对肛瘘创面愈合过程中生长细胞因子分泌的影响,我们对上述生长细胞因子的表达量进行了分析,结果显示:臭氧组患者肛瘘创面中 VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 的蛋白表达量均显著高于对照组。这就说明臭氧局部治疗能够在一定程度上促进创面中多种生长细胞因子的分泌,进而促进创面的愈合。

臭氧作为一类强氧化剂,通过自身的强氧化性能够有效杀伤创面内的病原菌,同时,在杀伤病原菌后臭氧自动分解为氧气和水,既不残留污染,又能调节创面内细胞因子分泌、细胞增殖和凋亡等生物学过程^[13-15]。创面内成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞等的增殖活性不仅与 VEGF、FGF-1、FGF-2、EGF 等生长细胞因子有关,还与 Bax、P53、caspase-3 凋亡分子所调节的细胞凋亡过程密切相关。Bax 是通过线粒体途径发挥促凋亡作用的分子,定位表达于线粒体膜并能形成二聚体,Bax-Bax 同源二聚体是细胞色素 C 通过线粒体膜进入细胞浆的通道;Bax 通过促进细胞色素 C 进入胞浆来促进细胞发生线粒体途径凋亡^[16]。P53 是体内多条凋亡途径的调控分子,能够通过阻碍细胞周期来抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡^[17]。Caspase-3 是细胞凋亡过程的执行分子,不同的凋亡通路均能活化 caspase-3 并引起细胞凋亡。我们通过分析创面愈合过程中上述凋亡分子表达量的影响可知:臭氧组患者肛瘘创面中 Bax、P53、caspase-3 的蛋白表达量均显著低于对照组。这就说明臭氧局部治疗能够在一定程度上抑制肛瘘创面中的细胞凋亡、有利于创面内细胞的增殖,进而促进创面的愈合。

局部臭氧治疗对肛瘘创面的愈合具有促进作用,增加炎症细胞因子、生长细胞因子的表达以及抑制凋亡分子的表达是局部臭氧治疗发挥促进创面愈合作用的分子机制。

参考文献

- Chen HJ, Sun GD, Zhu P, et al. Effective and long-term outcome following ligation of the intersphincteric fistula tract (LIFT) for transsphincteric fistula[J]. Int J Colorectal Dis, 2017, 32(4):583-585.
- Meena RK, Dudhamal T, Gupta SK, et al. Wound healing potential of Pa cavalkala formulations in a postfistulectomy wound [J]. Anc Sci Life, 2015, 35(2): 118-121.

- 3 Borges GÁ, Elias ST, da Silva SM, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2017, 45(3):364-370.
- 4 Degli Agosti I, Ginelli E, Mazzacane B, et al. Effectiveness of a Short-Term Treatment of Oxygen-Ozone Therapy into Healing in a Posttraumatic Wound[J]. *Case Rep Med*, 2016, 2016: 9528572.
- 5 Lambertz A, Lüken B, Ulmer TF, et al. Influence of diversion stoma on surgical outcome and recurrence rates in patients with rectovaginal fistula - A retrospective cohort study [J]. *Int J Surg*, 2016, 25:114-117.
- 6 Han JG, Wang ZJ, Zheng Y, et al. Ligation of Intersphincteric Fistula Tract vs Ligation of the Intersphincteric Fistula Tract Plus a Bioprosthetic Anal Fistula Plug Procedure in Patients With Transsphincteric Anal Fistula; Early Results of a Multi-center Prospective Randomized Trial[J]. *Ann Surg*, 2016, 264(6): 917-922.
- 7 Berksoy Hayta S, Durmuş K, Altuntaş EE, et al. The reduction in inflammation and impairment in wound healing by using strontium chloride hexahydrate[J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2017, 22:1-5.
- 8 Banerjee A, McNish S, Shanmugam VK. Interferon-gamma (IFN- γ) is Elevated in Wound Exudate from Hidradenitis Suppurativa[J]. *Immunol Invest*, 2017, 46(2): 149-158.
- 9 Wu RF, Yang HM, Zhou WD, et al. Effect of interleukin- β and lipoxin A 4 in human endometriotic stromal cells: Proteomic analysis[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2017, 43(2):308-319.
- 10 Lord MS, Ellis AL, Farrugia BL, et al. Perlecan and vascular endothelial growth factor-encoding DNA-loaded chitosan scaffolds promote angiogenesis and wound healing[J]. *J Control Release*, 2017, 28(250): 48-61.
- 11 Cha JK, Sun YK, Lee JS, et al. Root coverage using porcine collagen matrix with fibroblast growth factor-2: a pilot study in dogs[J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(1):96-103.
- 12 Li X, Ye X, Qi J, et al. EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 17(11): 3993-4009.
- 13 Valacchi G, Sticozzi C, Zanardi I, et al. Ozone mediators effect on "in vitro" scratch wound closure[J]. *Free Radic Res*, 2016, 50(9): 1022-1031.
- 14 Rosul MV, Patskan BM. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus[J]. *Wiad Lek*, 2016, 69(1):7-9.
- 15 Zhou YT, Zhao XD, Jiang JW, et al. Ozone Gas Bath Combined with Endovenous Laser Therapy for Lower Limb Venous Ulcers: A Randomized Clinical Trial[J]. *J Invest Surg*, 2016, 29(5):254-259.
- 16 Mac Nair CE, Schlamp CL, Montgomery AD, et al. Retinal glial responses to optic nerve crush are attenuated in Bax-deficient mice and modulated by purinergic signaling pathways[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):93.
- 17 Wang J, Zhang Y, Zhu Q, et al. Emodin protects mice against radiation-induced mortality and intestinal injury via inhibition of apoptosis and modulation of p53[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 46:311-318.

.....

(上接第 2016 页)

- 4 Yang Z, Wang L, Zhang W, et al. Plasma homocysteine involved in methylation and expression of thrombomodulin in cerebral infarction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1218-1222.
- 5 周丽萍, 乔羲, 刘毓刚, 等. 血清同型半胱氨酸及其代谢相关基因 MTHFR 多态性与缺血性脑卒中发生及预后的关系[J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(3):241-246.
- 6 于春晶. 血浆高同型半胱氨酸与脑卒中的相关性及其干预研究进展[J]. *大家健康旬刊*, 2016, 10(8):127-128.
- 7 孙斌, 梁海燕, 余慧立, 等. 急性脑梗死患者血清铁蛋白和神经元烯醇化酶水平变化和临床意义[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2016, 26(1):69-71.
- 8 Shen Y, Gao HM. Serum somatostatin and neuron-specific enolase might be biochemical markers of vascular dementia in the early stage[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10):19471-19475.
- 9 胡重灵, 杨新玲, 毛德强, 等. 急性脑梗死患者血清泛素羧基末端水解酶-1 和胶原纤维酸性蛋白的表达及其临床意义[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(4):284-290.
- 10 Nguyen DN, Huyghens L, Wellens F, et al. Serum S100B protein could help to detect cerebral complications associated with extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)[J]. *Neurocrit Care*, 2014, 20(3): 367-374.
- 11 云永利, 陈萍. S100B 的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(1): 46-49.
- 12 胡珣, 包玉倩. 成纤维细胞生长因子 23 与心血管疾病的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(34):2814-2816.
- 13 Ra M, Krzystolik A, Ra M, et al. Is plasma-soluble CD36 associated with density of atheromatous plaque and ankle-brachial index in early-onset coronary artery disease patients? [J]. *Kardiol Pol*, 2016, 74(6):570-575.
- 14 Tavridou A, Georgoulidou A, Roumeliotis A, et al. Association of Plasma Adiponectin and Oxidized Low-Density Lipoprotein with Carotid Intima-Media Thickness in Diabetic Nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015:507265.
- 15 Chen KC, Liao YC, Wang JY, et al. Oxidized low-density lipoprotein is a common risk factor for cardiovascular diseases and gastroenterological cancers via epigenomical regulation of microRNA-210[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27):24105-24118.
- 16 李涯南. 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 对人颈内动脉粥样硬化斑块稳定性影响的研究[D]. 河北: 河北医科大学, 2016:1-10.
- 17 Ye S. Putative targeting of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147:111-122.