

疡愈涂剂对免疫抑制小鼠伤口愈合和 IL-1 β 、TNF- α 的影响

何秀娟 张金超 林 燕 李 萍

摘 要 **目的** 研究疡愈涂剂对免疫抑制小鼠皮肤伤口愈合作用和对创面局部炎性反应的影响。**方法** 以氢化可的松处理小鼠造成免疫抑制状态,采取全厚皮切除术,复制愈合迟缓伤口模型。随机分为对照组、模型组和疡愈涂剂高、中、低浓度组。治疗组伤口外用疡愈涂剂,一次性无菌敷料贴包扎,隔日换药。观察小鼠创伤后 3、7 和 10 天伤口面积;HE 染色观察创面的组织学变化;放免法检测创面白介素 1 (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。**结果** 用药后 7 天和 10 天与模型组比较,疡愈涂剂能够明显缩小免疫抑制小鼠创面面积 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),组织学结果显示疡愈涂剂促进创面成纤维细胞增殖和血管生成。用药后 3 天时疡愈涂剂各浓度组 IL-1 β 水平明显高于模型组 ($P < 0.01$),7 天时无明显差异,10 天时高、中浓度组明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组比较,疡愈涂剂各浓度组 3 天时 TNF- α 水平差异无统计学意义,7 天时明显升高,10 天时疡愈涂剂中、低浓度组明显下降 ($P < 0.01$)。**结论** 疡愈涂剂能促进免疫抑制小鼠皮肤伤口愈合,其机制可能是早期促进创面炎性反应来启动创面的修复,中晚期抑制炎性反应,促进肉芽组织生成。

关键词 伤口愈合 疡愈涂剂 慢性皮肤溃疡

中图分类号 R261

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.008

Effects of YYTJ on Wound Healing and IL-1 β , TNF- α Level of Immuno-suppressive Mice. He Xiujuan, Zhang Jinchao, Lin Yan, et al. Beijing Institute of TCM, Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China

Abstract **Objective** To study the healing effect of YangYuTuJi (YYTJ) on skin wounds of immune-suppressive mice and its effect on the local inflammatory response of wounds. **Methods** Mice were treated with hydrocortisone to induce immune-suppression. Full-thickness skin resection was performed to replicate the delayed-healing wound model. 150 animals were randomly divided into control, model groups and YYTJ groups with high/medium/low dose. The YYTJ groups were externally treated with YYTJ. The model and control groups were both treated with N. S. Transparent semipermeable dressings were applied over the wound. The wound area was observed on the 3rd, 7th and 10th day after trauma. The histological changes of the wound were observed by HE staining. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by radioimmunoassay. **Results** Compared with the model group, YYTJ significantly reduced the wound area of immune-suppressive mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$) on 7 days and 10 days after treatment. The histological results showed that YYTJ promoted the proliferation of wound fibroblasts and angiogenesis. The level of IL-1 β in YYTJ group was significantly higher than that in model group on 3 days ($P < 0.01$), and there was no significant difference on 7 days, YYTJ with high/medium dose group decreased significantly on 10 days ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, there was no significant difference in the level of TNF- α for YYTJ groups for 3 days and the level of TNF- α significantly increased at 7 days, while the level of TNF- α in the YYTJ group decreased significantly on 10 days ($P < 0.01$). **Conclusion** YYTJ can promote skin wound healing in immune-suppressive mice. The mechanism may be to repair the wounds by promoting the wound inflammatory response in the early stage, suppressing the inflammatory reaction and promoting the formation of granulation tissue in the late stage.

Key words Wound healing; YangYuTuJi; Chronic skin ulcer

慢性难愈性皮肤溃疡是糖尿病、周围血管病、微

生物感染、放疗等常见的并发症,迁延难愈,给患者和社会带来沉重的经济负担^[1]。此类疮面多属于中医的阴疮范畴,治疗当以回阳生肌为法,其治则核心是益气温阳活血通络,疡愈涂剂(YangYuTuJi, YYTJ)以此原则组方而成^[2-4]。研究发现疡愈涂剂能明显缩短糖尿病大鼠创面愈合时间、提高创面愈合率和创面 I、III 型胶原比值、调节创面金属蛋白酶和金属蛋白

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81774312,81403270,81774328,81403409)

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院、北京市中医研究所

通讯作者:李萍,研究员,博士生导师,电子邮箱:liping411@126.com.cn

酶抑制剂的平衡,促进创面成纤维细胞增殖,从而加速创面的愈合^[5,6]。体外研究发现,YYTJ通过降低肿瘤坏死因子诱导的人脐静脉内皮细胞表面黏附分子的表达,抑制白细胞与血管内皮细胞的黏附,从而抑制过度的炎症反应^[7]。本研究使用免疫抑制小鼠皮肤伤口模型,观察YYTJ对慢性创面炎症反应的调节机制,探讨“回阳生肌”的物质基础^[8]。

材料与方法

1. 动物: BALB/c 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 体重 18~20g, SPF 级, 由维通利华提供。在 SPF 级动物室无菌饲料喂养, 湿度 20%~40%, 温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

2. 药物、试剂与仪器: 川芎嗪、桂皮醛和麝香酮购自中国药品生物制品检定所, 黄芪多糖粉剂(美国泛华医药公司惠赠), 疡愈涂剂(YYTJ): 黄芪多糖(25g/L)、川芎嗪(2g/L)、桂皮醛(100g/L)和麝香酮(100g/L)分别用 PBS 配成水溶液, 微孔滤膜过滤除菌, 按终浓度比例 10:3:3:0.1 混合为疡愈涂剂原液 8.34g/L, 4°C 保存备用。实验时高浓度为 1.05g/L, 中浓度为 0.53g/L, 低浓度为 265mg/L。一次性无菌敷料贴(山东东华医疗科技有限公司)。氢化可的松注射液(天津金耀氨基酸有限公司)。包埋机(Leica, EG1140C); 石蜡切片机(德国 Leica 公司, RM2135); 正置显微镜(德国 Zeiss 公司, Axio Imager A2), 数码相机(日本佳能公司, EOSM3)。

3. 动物分组、模型制备及给药: 150 只 BALB/c 小鼠随机分为 5 组: ①对照组; ②模型组; ③疡愈涂剂高剂量组(YYTJH 组); ④疡愈涂剂中剂量组(YYTJM 组); ⑤疡愈涂剂低剂量组(YYTJL 组), 每组 30 只。除空白组外各组采用免疫抑制复合皮肤伤口的方法制备慢性皮肤溃疡小鼠模型, 于实验前连续 7 天肌内注射氢化可的松 0.5mg/d; 空白组小鼠肌内注射 0.2ml 生理盐水。实验时给予戊巴比妥钠 60mg/kg 腹腔麻醉, 背部去毛, 消毒, 用特制打孔器在鼠背打一圆孔, 切取直径 11mm、面积为 94.99mm^2 的皮肤, 深至皮下。造模后单笼饲养, 在 SPF 级动物室无菌饲料喂养。疡愈涂剂高、中、低剂量组伤口分别滴加 50 μl 高、中、低浓度的疡愈涂剂, 一次性无菌敷料贴包扎, 隔天换药 1 次并拍照。皮肤损伤后, 对照组小鼠隔天肌内注射 0.25mg/d 生理盐水, 其余组小鼠隔天肌内注射相同剂量氢化可的松 0.25mg/d。于小鼠皮肤创面形成后第 3、7、10 天处死后取伤口组织。

4. 检测指标与方法: (1) 伤口面积: 小鼠造模后

第 3、7、10 天照相, 使用图像分析软件 IPP5.1 计算伤口面积。(2) 组织学观察: 于造模后第 3、7、10 天取小鼠伤口组织, 10% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE 染色进行组织学观察。(3) IL-1 β 和 TNF- α (放免法): 取伤口的肉芽组织, 称重, 放入 1ml 生理盐水中匀浆, 离心 3000r/min, 20min, 取上清, 按放免说明书操作, γ -计数器测定放射性计数。

5. 统计学方法: 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 Turkey 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 疡愈涂剂对免疫抑制小鼠皮肤创面面积的影响: 创伤后 3 天时, 各组创面面积差异无统计学意义。7 天和 10 天时, 对照组与模型组创面面积差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 疡愈涂剂高、中、低浓度组创面面积均明显缩小 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见图 1。

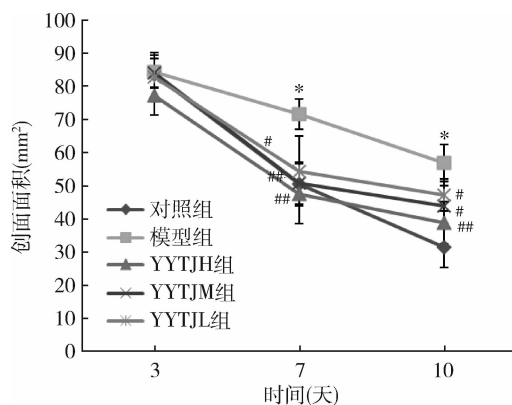


图1 疡愈涂剂对免疫抑制小鼠皮肤创面面积的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2. 疡愈涂剂对免疫抑制小鼠皮肤创面组织学影响见图 2。创伤后 3 天对照组可见伤口边缘的表皮增厚, 向伤口区延伸, 创面痂下有较多巨噬细胞和中性细胞浸润。模型组可见伤口区稀疏的巨噬细胞和中性细胞浸润。疡愈涂剂高剂量组伤口区巨噬细胞和中性细胞浸润较多, 有少量胶原纤维; 中剂量组伤口区有稀疏的巨噬细胞和中性细胞浸润; 低剂量组伤口区少量的炎细胞浸润。创伤后 7 天对照组可见伤口区有肉芽组织形成, 大量增生的成纤维细胞和新生的毛细血管和较多的单个核细胞。模型组伤口区可见稀疏的成纤维细胞和单个核细胞。疡愈涂剂高剂

量组伤口肉芽组织致密,单个核细胞较多;中剂量组伤口区有较多的炎细胞浸润,胶原纤维较多;低剂量组伤口有较多的炎细胞浸润,胶原纤维较多。创伤后 10 天对照组可见伤口区新生肉芽组织中胶原纤维增多。模型组伤口区肉芽组织中胶原纤维较少。愈合

涂剂高剂量组伤口区大量新生的成纤维细胞和新生的毛细血管,管腔闭塞;中剂量组伤口区较多的新生胶原纤维;低剂量组伤口区新生的成纤维细胞和新生的毛细血管。

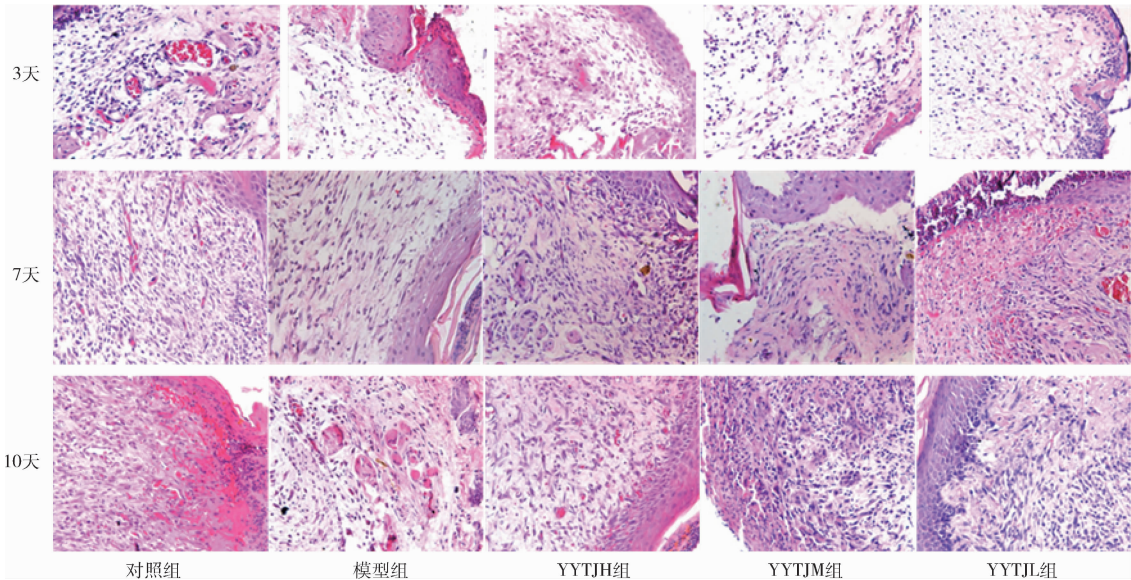


图 2 愈合涂剂对免疫抑制小鼠皮肤伤口组织学影响 (HE, ×200)

3. 愈合涂剂对免疫抑制小鼠皮肤伤口 IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响:创伤后 3 天模型组 IL-1 β 水平明显低于对照组 ($P < 0.01$)。与模型组比较,愈合涂剂各浓度组 IL-1 β 水平明显升高 ($P < 0.01$)。创伤后 7 天模型组 IL-1 β 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$),愈合涂剂各浓度组 IL-1 β 水平与模型组比较差异无统计学意义。创伤后 10 天模型组 IL-1 β 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$),愈合涂剂高、中浓度组 IL-1 β 水平与模型组比较明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),见图 3。创伤后 3 天模型组 TNF- α 水平明显低于对照组 ($P < 0.01$);愈合涂剂各浓度组与模型组 TNF- α 水平比较,差异无统计学意义。创伤后 7 天模型组 TNF- α 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$);愈合涂剂各浓度组 TNF- α 水平与模型组比较明显升高 ($P < 0.01$)。创伤后 10 天模型组 TNF- α 水平高于对照组,愈合涂剂各浓度组 TNF- α 水平与模型组比较明显降低 ($P < 0.01$),见图 4。

讨 论

创面局部的炎性反应是创面愈合的基础,没有创面局部的炎性反应就不可能有创伤愈合过程的启动和完成。但是炎性反应过度或低下都可导致伤口迁

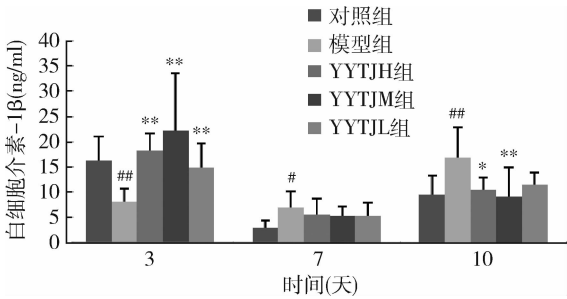


图 3 愈合涂剂对免疫抑制小鼠皮肤伤口 IL-1 β 水平影响
与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较,
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

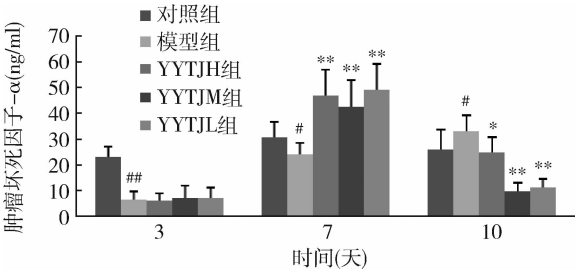


图 4 愈合涂剂对免疫抑制小鼠皮肤伤口 TNF- α 水平影响
与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较,
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

延不愈。糖皮质激素在伤口愈合过程中抑制炎症反应而抑制伤口愈合,其机制为抑制伤口局部编码参与伤口愈合的多种重要蛋白质的基因表达。使用地塞米松作用于全厚皮切除伤口的小鼠,发现 IL-1 β 、IL-1 α 、TNF- α 、TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 和它们的受体、PDGF 和其受体、参与产生 NO 的酶等都是糖皮质激素作用的目标^[9]。糖皮质激素可抑制肉芽组织多种生化过程,包括使成纤维细胞数量减少,胶原合成和分泌减少。其抑制胶原生物合成的机制为降低前胶原基因表达,降低前胶原 mRNA 的稳定性。

慢性皮肤溃疡属于中医“疮疡”的范畴,疮疡阴证表现为疮面颜色晦暗,疮型平塌散漫,渗液清稀,皮色不变或紫暗或沉黑,不热或微热,是慢性难愈合性皮肤溃疡的常见证型^[2, 3]。使用氢化可的松 7 天后,模型组小鼠一般情况较差,出现萎靡不振、毛色无光泽、弓背少动、反应迟钝、体重下降等现象,复合皮肤损伤后,以上症状加重,出现畏寒蜷卧等症状,中医辨证为阳虚型创面,提示此模型可用于中医病证结合的实验研究。

疡愈涂剂以黄芪多糖为君药,益气通络,桂皮醛和川芎嗪为臣药,温阳活血,麝香通络为佐使药,共奏益气温阳活血通络之功,体现了回阳生肌的治则,用于治疗阴疮。黄芪益气托毒生肌,被誉为“疮家圣药”,黄芪多糖是其主要活性成分之一,黄芪多糖外用可促进免疫抑制复合皮肤伤口小鼠和表柔比星引起小鼠表皮损伤创面的愈合。肉桂辛、甘、热,补火助阳、散寒止痛、温通经脉。桂皮醛是肉桂的主要成分,桂皮醛对皮肤血管有很强的扩张作用,而且能升高皮温,有“温阳通络”的作用,能抑制巨噬细胞的迁移和 M1 细胞极化^[10, 11]。川芎活血行气,祛风止痛,川芎嗪是其主要成分。麝香活血通络,消肿止痛,单味药对慢性皮肤溃疡也有较好的疗效。麝香酮是麝香最重要的具有生理活性的组分,是麝香香味的主要来源。研究发现黄芪多糖、桂皮醛对糖尿病大鼠伤口来源的成纤维细胞、人正常成纤维细胞和慢性溃疡疮周的成纤维细胞都表现出促增殖作用^[12];黄芪多糖、桂皮醛和麝香酮都能抑制中性粒细胞和 TNF 活化的血管内皮细胞的黏附,从而发挥抑制炎症的作用^[13-15]。

创伤后第 3 天,实验各组创面面积比较差异无统计学意义,但对照组与疡愈涂剂各组创面边缘均有不同程度皱缩的现象,组织学观察模型组中性粒细胞和

巨噬细胞浸润较少,而对照组炎性细胞较多,提示模型组创面局部处于免疫抑制状态,而疡愈涂剂各组炎性细胞浸润均比模型组明显。提示疡愈涂剂通过加强炎症反应而启动创面愈合。创伤后第 7 天,模型组创面面积明显大于对照组,组织学观察对照组肉芽组织形成,提示对照组已进入增殖阶段,而模型组可见少量成纤维细胞和炎性细胞,提示模型组创面局部炎性细胞过少,不能释放足够的炎症因子和生长因子激发炎症反应,从而不能顺利进入增殖阶段,延缓了伤口愈合。而同期疡愈涂剂各组与模型组相比创面面积明显缩小,尤其是疡愈涂剂高剂量组可见新生致密的肉芽组织,中、低剂量组创面组织有炎细胞浸润和新生的胶原纤维,提示高剂量组增殖明显,而中、低剂量组处于炎症反应状态,增殖不显著。创伤后第 10 天,对照组创面面积已明显缩小,组织学观察可见大量成熟的胶原纤维,而模型组肉芽组织中胶原纤维仍然较少,疡愈涂剂治疗后创面面积明显缩小,肉芽组织中有较多新生的成纤维细胞和毛细血管,提示疡愈涂剂可能促进成纤维细胞增殖和血管生成来加速创面愈合。

IL-1 β 研究结果显示,造模后 3 天 IL-1 β 水平最高,随后下降,7 天时最低,以后开始升高,这与以往的文献报道相一致^[16]。这是由于新生的成纤维细胞和内皮细胞也分泌 IL-1 β 所致。TNF- α 结果显示,对照组与中药组造模后 7 天 TNF- α 最高,随后下降,模型组则缓慢而持续升高。造模后 3 天模型组 IL-1 β 和 TNF- α 明显低于对照组($P < 0.01$),说明氢化可的松抑制了小鼠的免疫功能,巨噬细胞分泌减少,伤口处于免疫抑制状态。造模后 7 天模型组 TNF- α 水平明显低于对照组;组间 IL-1 β 水平比较差异无统计学意义,但都下降至最低点,但模型组与前期比较下降的幅度很小,说明对照组创面的炎症反应已得到控制,模型组创面还处于免疫低下状态。造模后 10 天模型组 IL-1 β 和 TNF- α 水平明显高于对照组,说明模型组创面处于持续的炎症反应。

造模后 3 天疡愈涂剂组 IL-1 β 水平明显高于模型组, TNF- α 水平差异无统计学意义。造模后 7 天,疡愈涂剂组 TNF- α 水平与模型组比较明显升高, IL-1 β 水平差异无统计学意义,提示疡愈涂剂能促进炎症细胞分泌炎症因子,加强创面的炎症反应。造模后 10 天疡愈涂剂高、中浓度组 TNF- α 和 IL-1 β 水平与模型组比较明显降低。提示疡愈涂剂能改善免疫抑制小鼠的免疫低下状态,促进炎症因子的分

泌,加强炎症反应,随后抑制其持续存在的炎症反应,使其顺利进入增生阶段。

回阳生肌法拆方研究发现活血通络方与益气温阳方均可促进免疫抑制小鼠疮面愈合,其机制可能是通过促进巨噬细胞表型转化,促使疮面修复由炎症期过渡到增殖期,这与笔者的实验结果相一致,提示疡愈涂剂可能促进巨噬细胞表型转化,今后还需深入研究^[4]。

综上所述,疡愈涂剂能促进免疫抑制小鼠皮肤伤口愈合,其机制可能是早期促进创面局部炎症因子分泌,加剧炎症反应来启动创面的修复,随后下调炎症因子,促进成纤维细胞增殖和血管生成从而促进肉芽组织形成。

参考文献

- 1 Powers JG, Higham C, Broussard K, *et al.* Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management[J]. J Am Acad Dermatol, 2016,74(4):607-626
- 2 贾连城,吕培文. 吕培文应用回阳生肌法治疗慢性难愈性皮肤溃疡经验总结[J]. 中国医药导报, 2015,12(28):85-88
- 3 朱艳萍. 吕培文治疗下肢慢性溃疡经验总结[J]. 北京中医药, 2014,33(9):660-662
- 4 蒙玉娇,何秀娟,林燕,等. 回阳生肌膏拆方对慢性皮肤溃疡模型小鼠疮面愈合及疮面巨噬细胞表型转化的影响[J]. 中医杂志, 2017,58(3):244-249
- 5 盛巡,李光善,李萍,等. 疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面 I、Ⅲ胶原合成及 MMPs、TIMP-1 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005,21(8):1508-1513
- 6 李萍,李光善,韩秋萍,等. 疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面 PCNA 表达及成纤维细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006,12(3):44-47
- 7 何秀娟,吕喆,龙军,等. 疡愈涂剂对人白细胞与血管内皮细胞

- 黏附影响的分子机制[J]. 首都医科大学学报, 2010,31(6):752-755
- 8 Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, *et al.* One systemic administration of transforming growth factor- β 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing[J]. J Clin Invest, 1993,92(6):2841-2849
- 9 Beer H D, Fassler R, Werner S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair[J]. Vitam Horm, 2000,59:217-239
- 10 李萍,刘欣,梁代英,等. 肉桂提取物及桂皮醛对人体表微循环及局部温度相关变化的影响[J]. 中国中药杂志, 2006,31(3):262-264
- 11 姜涛,王剑. 桂皮醛对 LPS 诱导的 Raw264.7 巨噬细胞迁移和 M1 极化的抑制作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016,27(3):361-365
- 12 李光善,李萍,盛巡,等. 黄芪多糖、桂皮醛、川芎嗪对实验性糖尿病大鼠创面成纤维细胞增殖作用的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004,10(4):20-22
- 13 何秀娟,李萍,邱全瑛,等. 麝香酮抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其表面 ICAM-1、VCAM-1 和 CD44 表达[J]. 中国免疫学杂志, 2006,22(2):148-150
- 14 何秀娟,林燕,蒙玉娇,等. 桂皮醛抑制血管内皮细胞与中性粒细胞黏附及其分子机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017,22(1):43-47
- 15 李萍,何秀娟,张颖,等. 黄芪多糖对细胞增殖及血管内皮细胞与白细胞粘附作用的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2004,20(9):141-144
- 16 Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination[J]. Int J Legal Med, 1996,108(5):231-236

(收稿日期:2017-11-10)

(修回日期:2017-11-29)

(接第 57 页)

- 16 刘宁,谭文成,夏吉生,等. miR-34a 靶向 MMP-13 调控大鼠软骨细胞凋亡的机制[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版, 2016, 37(2):139-145
- 17 Sandy JD, Verscharen C. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo [J]. Biochem J, 2001, 358(Pt 3):615
- 18 Bau B, Gebhard PM, Haag J, *et al.* Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro [J]. Arth Rheum, 2010, 46(10):2648-2657

- 19 Tew S R, Li Y, Pothacharoen P, *et al.* Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. Osteoarthr Cartil, 2005, 13(1):80-89
- 20 黄林剑,李辉,谢千阳,等. 静压力下兔髌突软骨细胞 COL2A1、SOX9、COL1A1 和 ALP 的表达变化[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2014,12(4):295-300
- 21 马玉环,郑文伟,林平冬,等. 骨关节炎软骨退变与炎症的关系[J]. 风湿病与关节炎, 2015,4(8):50-53
- 22 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2017,21(20):3255-3262

(收稿日期:2017-11-23)

(修回日期:2017-12-22)