

生肌玉红膏对深Ⅱ度烧伤大鼠创面修复的影响

董小鹏¹, 王丽娟^{1*}, 赵春霖², 于博²(1.甘肃中医学院, 兰州 730000; 2.甘肃中医学院附属医院, 兰州 730000)

摘要:目的 从组织病理学方面动态观察生肌玉红膏对深Ⅱ度烧伤大鼠创面修复的影响, 初步探讨生肌玉红膏促进皮肤烧伤创面愈合的作用及可能机理。方法 将深Ⅱ度烧伤大鼠模型按体质量随机分为模型组、生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组, 每组 24 只。烧伤创面涂以相应药物, 每天 1 次, 连续给药直至创面愈合。观察各组动物创面愈合时间、创面愈合率, 并于烧伤后第 7, 14, 21 天对各组动物创面组织进行取材, 分别进行 HE 常规染色、Masson 皮肤胶原染色。光镜下观察各组创面组织形态学变化, 成纤维细胞形态及数量变化, 并对创面中成纤维细胞进行计数, 用图像分析软件分析各组创面胶原纤维面积。结果 与模型组相比, 生肌玉红膏组创面愈合时间缩短, 创面愈合率提高($P<0.05$); 烧伤后第 7, 14 天, 生肌玉红膏组创面成纤维细胞数量多于模型组($P<0.05$); 烧伤后第 14, 21 天, 生肌玉红膏组创面中心胶原纤维面积大于模型组($P<0.05$)。结论 生肌玉红膏可促进深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合, 可能与其促进创面成纤维细胞增生和胶原纤维分泌有关。

关键词: 生肌玉红膏; 烧伤; 大鼠; 创面愈合; 成纤维细胞; 胶原纤维

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)04-0387-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.001

Effect of Shengji Yuhong Ointment on Deep Partial-thickness Burn Wound Healing in Rats

DONG Xiaopeng¹, WANG Lijuan^{1*}, ZHAO Chunlin², YU Bo²(1. Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China; 2. The Hospital Affiliated to Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe dynamically the effect of Shengji Yuhong ointment on deep partial-thickness burn wound healing in rats from the histopathological aspect. **METHODS** The model of deep partial-thickness burn rats were randomly divided into model group, Shengji Yuhong ointment group and MEBO group, 24 rats for each group. Each group were treated with corresponding drug once daily until wound healing. The time of wound healing and the wound healing rate were observed; skin collagen in the wound tissue were observed by HE staining and Masson staining on the 7th, 14th and 21st day after burn. Under the light microscope, the morphological changes of wound tissue, fibroblast morphology and quantitative changes, and the wound fibroblasts were detected. **RESULTS** Compared with the model group, the wound healing time shortened and wound healing rate increased in Shengji Yuhong ointment group($P<0.05$). The wound fibroblast numbers in Shengji Yuhong ointment group were more than model group on the 7th, 14th day after burn($P<0.05$). The wound center collagen fiber area was larger than the model group on the 14th, 21st day after burn($P<0.05$). **CONCLUSION** Shengji Yuhong ointment has promoting effect on wound healing of deep partial-thickness burn in rat, and this may be related to the promotion of wound fibroblasts proliferation and secretion of collagen fibers.

KEY WORDS: Shengji Yuhong ointment; burn; rat; wound healing; fibroblast; collagen fibers

生肌玉红膏是中医学活血生肌的外用药, 具有化腐生肌、消肿止痛、和血止血的作用, 主治一切痈疽疮毒、溃疡久不收口、烫伤、烧伤等。生肌玉红膏临床用于治疗 I、II 度烧伤患者可显著促进创面愈合, 缩短病程。本研究拟建立深Ⅱ度烧伤大鼠模型, 通过创面愈合时间、创面愈合率及创面病理形态学观察, 探讨生肌玉红膏对烧

伤创面愈合的影响, 并从成纤维细胞和胶原含量变化来探讨生肌玉红膏促进创面愈合机理, 为其临床治疗烧伤提供理论依据和应用指导。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠, ♂, 体质量(200±20)g。由甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心提供, 实验

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260543)

作者简介: 董小鹏, 男, 硕士, 讲师, 主治医师 Tel: (0931)8765395
E-mail: piaoxueyu2000@sina.com

*通信作者: 王丽娟, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0931)8765395 E-mail: 13519665487@139.com

动物合格证号: SCXK(甘)2004-0006。

1.2 药物

生肌玉红膏(甘肃中医学院附属医院药剂科提供, 甘药制字 Z04010879, 批号: 20120508, 规格: 30 g·盒⁻¹), 主要药物有当归、甘草、白芷、紫草、血竭、白蜡、轻粉。制备方法: 先将当归、白芷、紫草、甘草 4 味入油内浸 3 日, 然后文火熬枯去渣, 再入血竭化尽, 次入白蜡微火化开, 待油温后, 再入研细轻粉搅匀, 冷却后即凝成膏; 美宝湿润烧伤膏(汕头市美宝制药有限公司生产, 国药准字 220000004, 批号: 20110708, 规格: 40 g·支⁻¹)。

1.3 试剂

戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: 20121216); 多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20100529); 二甲苯(北京化工厂, 批号: 20111010)。

2 方法

2.1 分组

大鼠按体质量随机分成 3 组, 即生肌玉红膏组、湿润烧伤膏组、模型组, 每组 24 只。

2.2 造模与给药

采用水蒸气烫伤方法制备烧伤模型。用 80 mg·mL⁻¹ 硫化钠溶液脱去大鼠背部毛。用 250 mL 玻璃瓶装适量蒸馏水, 置于铁架台上, 下置酒精灯, 将水煮沸, 玻璃瓶盖的上开一 1.5 cm×1.5 cm 口。将麻醉好的大鼠已脱毛的背部皮肤置于蒸馏水已沸腾的瓶口, 注意将大鼠皮肤紧贴瓶口以密封, 避免水蒸汽泄漏, 以秒表计时, 各组大鼠烫 8s(病理切片证实为深 II 度)。烧伤后 2 h 后用生理盐水清洗大鼠背部创面, 开始于创面均匀涂药(涂药面积 1.5 cm×1.5 cm)。烧伤模型组每只大鼠给予生理盐水 0.2 mL, 湿润烧伤膏组每只大鼠给予湿润烧伤膏 0.2 g, 生肌玉红膏组每只大鼠给予生肌玉红膏 0.2 g, 用消毒纱布覆盖, 再以无刺激胶布封闭、固定 8 h, 每日定时换药 1 次, 连续给药直至创面痊愈。

2.3 取材及制备组织切片

于造模后第 1, 7, 14, 21, 28, 35 天 5 个时间点观察并记录创面愈合情况。为观察给药早期及中期创面胶原合成情况, 每组于造模后第 7, 14, 21 天 3 个时间点每个观测点对 6 只动物取材, 每组剩余 6 只动物继续给药观察。具体方法: 用戊

巴比妥钠按 30 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉大鼠, 用剪刀剪取动物创面全皮, 经多聚甲醛固定, 0.01 mol·L⁻¹ 的 PBS 洗脱 3 次后依次进行梯度酒精脱水, 二甲苯浸透和石蜡包埋, 切片, 分别进行 HE 常规组织学染色和 Masson 三色胶原染色。

2.4 检测指标

2.4.1 大体观察 观察每只大鼠的精神状态、活动、进食、饮水及其它异常情况。

2.4.2 创面愈合时间 即定义为创面完全上皮化所需的时间, 而上皮化依靠肉眼观察。以创面愈合面积>95%烫伤面积为完全愈合, 分别记录每只大鼠创面愈合时间。

2.4.3 创面愈合率 各组均于烧伤后第 1, 7, 14, 21, 28, 35 天分别采用先将创面边缘描绘在透明薄膜上, 再以此为模板, 将质地均匀的硬纸板剪成同样大小, 然后用分析天平称重, 以硬纸板的重量间接地表各示创面面积大小, 并按下列公式计算创面愈合率: 创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积×100%。

2.4.4 HE 染色切片观察 在低倍和高倍镜下, 分别观察 HE 染色后创伤组织结构, 成纤维细胞形态变化。每例切片随机法取 5 个视野, 于 400 倍镜下观察, 计数成纤维细胞, 并取其平均数。

2.4.5 Masson 三色胶原染色切片观察 在低倍和高倍镜下, 观察创面中胶原的形态和数量变化。胶原纤维呈绿色, 肌纤维呈红色, 红细胞呈橘红色。用 Olympus 光学显微镜观察创面中胶原的形态和数量变化, 并在创面中心随机法取 5 个视野, 于 400 倍镜下用 Image-pro-plus 图像分析系统分析软件, 测定胶原纤维的阳性面积, 取其平均值。

2.5 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 各组间比较用方差分析。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 大体观察

所有大鼠均活至创面愈合, 各组大鼠在精神状态、活动、进食、饮水等方面均无明显差异, 无明显感染现象。

3.2 创面愈合情况

3.2.1 创面愈合时间 以创面愈合面积>95%烫伤面积为完全愈合。与模型组相比, 生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组动物创面愈合时间缩短, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。生肌玉红膏组和湿润烧伤

膏组动物创面愈合时间相比, 差异无统计学意义, 结果见表 1。

3.2.2 创面愈合率 因为造模后第 1 天肉眼观察不到创面愈合, 故除去第 1 天的数据。在此后各时间点生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组的创面愈合率均高于模型组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组无明显差异, 结果见表 2。

表 2 生肌玉红膏对大鼠深 II 度烧伤创面愈合率的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of Shengji Yuhong Ointment on the wound healing rate in deep partial-thickness burned rats($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	原始创面面积/cm ²	给药后不同时间创面愈合率/%				
		7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
模型组	2.25	14.17±4.29	27.83±6.05	47.67±7.34	73.27±8.90	89.34±7.89
湿润烧伤膏组	2.25	21.51±3.83 ¹⁾	39.16±5.12 ¹⁾	62.76±7.87 ¹⁾	87.83±7.94 ¹⁾	100 ¹⁾
生肌玉红膏组	2.25	22.67±5.68 ¹⁾	37.33±6.02 ¹⁾	65.14±11.81 ¹⁾	89.84±6.18 ¹⁾	100 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$

3.3 皮肤病理组织学观察

3.3.1 HE 染色切片观察 烧伤后第 7 天, 真皮层内中性粒细胞数量开始减少, 肉芽组织增生明显, 与烧伤模型组比较, 生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组成纤维细胞数量增加较明显, 且创面中心肉芽组织中毛细血管较烧伤模型组多。模型组创面炎性细胞仍然较多, 以中性粒细胞为主。两组创面均未见表皮细胞覆盖。见图 1。

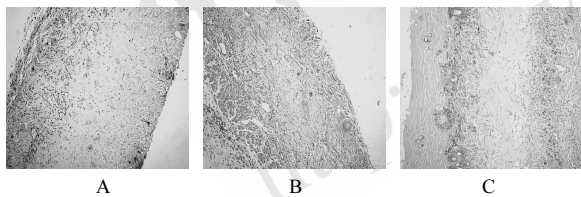


图 1 烧伤后第 7 天创面组织 HE 染色图

A-模型组; B-生肌玉红膏组; C-湿润烧伤膏组

Fig 1 HE staining of burn wound tissue on 7th day

A-model group; B-Shengji Yuhong ointment group; C-MEBO group

烧伤后第 14 天, 生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组成纤维细胞、纤维细胞、毛细血管的数量明显增多, 并有大量的红色胶原纤维, 湿润烧伤膏组散在分布有中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞, 炎症反应较轻; 烧伤模型组成纤维细胞、纤维细胞、毛细血管的数量也有增加, 与实验组比较则较少, 红色胶原纤维数量也少于实验组, 排列也较实验组紊乱。创面仅有部分表皮覆盖。见图 2。

表 1 生肌玉红膏对大鼠深 II 度烧伤创面愈合时间的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of Shengji Yuhong ointment on the wound healing time in deep partial-thickness burned rats($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	创面愈合时间/d
模型组	39±6.1
湿润烧伤膏组	30±4.7 ¹⁾
生肌玉红膏组	32±5.8 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$

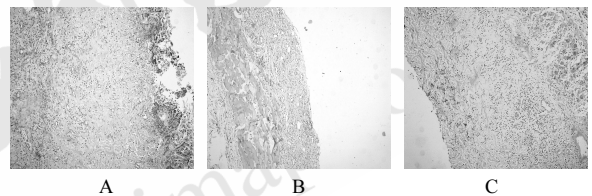


图 2 烧伤后第 14 天创面组织 HE 染色图

A-模型组; B-生肌玉红膏组; C-湿润烧伤膏组

Fig 2 HE staining of burn wound tissue on the 14th day

A-model group; B-Shengji Yuhong ointment group; C-MEBO group

烧伤后第 21 天, 生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组创面肉芽组织中少量毛细血管渐闭合, 退化。模型组新生表皮层进一步增厚, 继续向中心生长, 创面中心仍有少量炎性细胞。见图 3。

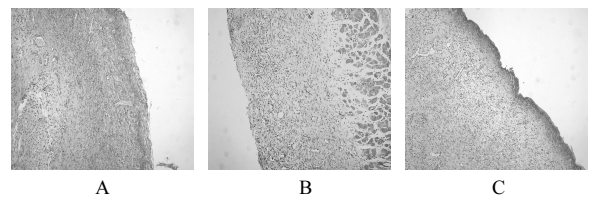


图 3 烧伤后第 21 天创面组织 HE 染色图

A-模型组; B-生肌玉红膏组; C-湿润烧伤膏组

Fig 3 HE staining of burn wound tissue on the 21st day

A-model group; B-Shengji Yuhong ointment group; C-MEBO group

不同时间点各组动物创面中心成纤维细胞数量比较详见表 3。

3.3.2 Masson 胶原染色观察结果 第 7 天, 各组增生的肉芽组织中有少量胶原纤维, 生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组与模型组比较, 创面中心胶原

纤维量差异无统计学意义。见图 4。

表 3 生肌玉红膏对大鼠深 II 度烧伤创面成纤维细胞数量的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of Shengji Yuhong Ointment on the wound fibroblast numbers in deep partial-thickness burned rats($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	成纤维细胞数/个		
	7 d	14 d	21 d
模型组	53.55±8.50	71.46±8.71	84.16±8.92
湿润烧伤膏组	72.49±10.41 ¹⁾	90.17±10.11 ¹⁾	92.91±11.40
生肌玉红膏组	69.61±10.24 ¹⁾	86.66±8.39 ¹⁾	90.22±9.96

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$

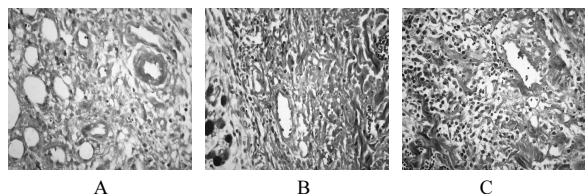


图 4 烧伤后第 7 天创面组织 Masson 染色图

A-模型组; B-生肌玉红膏组; C-湿润烧伤膏组

Fig 4 Masson staining of burn wound tissue on the 7th day

A-model group; B-Shengji Yuhong ointment group; C-MEBO group

烧伤后 14 天, 各组创面中新生胶原纤维逐渐增多, 统计结果显示, 与模型组比较, 生肌玉红膏组和湿润烧伤膏组创面中心胶原纤维量明显增

表 4 生肌玉红膏对大鼠深 II 度烧伤创面中心胶原面积的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of Shengji Yuhong Ointment on the wound center collagen fiber area in deep partial-thickness burned rats($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	中心胶原面积/cm ²		
	7 d	14 d	21 d
模型组	7 375.42±704.07	10 118.51±995.92	13 454.36±1 031.07
湿润烧伤膏组	8 150.76±627.59	12 636.65±1 192.73 ¹⁾	15 858.32±1 310.31 ¹⁾
生肌玉红膏组	8 359.07±755.82	12 011.29±1 357.07 ¹⁾	15 595.66±1 236.68 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$

4 讨论

烧伤后促进创面愈合是治疗烧伤的关键也是最终目的。源自《外科正宗》的生肌玉红膏, 为活血生肌的代表方药, 由当归、白芷、紫草、血竭、甘草、轻粉、白腊、麻油等组成, 具有化腐生肌、消肿止痛、和血止血的作用。生肌玉红膏临床主要用于各种难愈性创面, 如糖尿病足创面、烧伤创面、手术后切口不愈合形成的创面等, 疗效显著^[1-4]。实验研究表明, 生肌玉红膏外用可以显著促进创面微循环, 减少微血栓, 因此增加创面营养和血供, 促进创面愈合^[5]。进一步的实验研

究证实^[6], 生肌玉红膏促进创面微循环, 可能是通过调节创面肉芽组织中成纤维细胞生长因子(b-FGF)引起的。本实验通过动态组织病理学观察, 探讨生肌玉红膏促进皮肤烧伤创面愈合的作用及其机理, 为今后该药膏的临床使用提供理论依据。

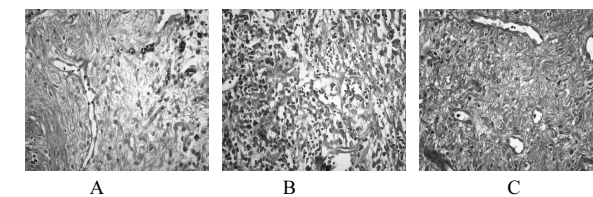


图 5 烧伤后第 14 天创面组织 Masson 染色图

A-模型组; B-生肌玉红膏组; C-湿润烧伤膏组

Fig.5 Masson staining of burn wound tissue on the 14th day

A-model group; B-Shengji Yuhong ointment group; C-MEBO group

从新生胶原形态上比较, 生肌玉红膏组与湿润烧伤膏组在烧伤后 21 天, 胶原逐渐由较紊乱变向有序化发展, 而模型组显得较零乱, 不及前两者有序。见图 6。胶原面积比较见表 4。

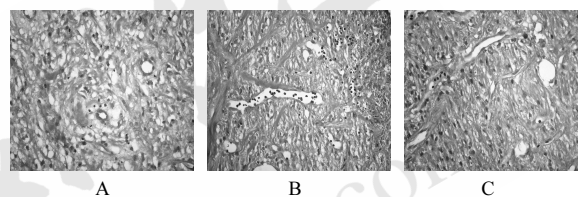


图 6 烧伤后第 21 天创面组织 Masson 染色图

A-模型组; B-生肌玉红膏组; C-湿润烧伤膏组

Fig.6 Masson staining of burn wound tissue on the 21st day

A-model group; B-Shengji Yuhong ointment group; C-MEBO group

究证实^[6], 生肌玉红膏促进创面微循环, 可能是通过调节创面肉芽组织中成纤维细胞生长因子(b-FGF)引起的。本实验通过动态组织病理学观察, 探讨生肌玉红膏促进皮肤烧伤创面愈合的作用及其机理, 为今后该药膏的临床使用提供理论依据。

创面的愈合情况是评价药效的客观指标。本实验结果显示, 生肌玉红膏可缩短创面愈合时间并提高创面愈合率。成纤维细胞是创面修复的主要细胞。创伤愈合中伤处大量的成纤维细胞, 一方面是由细胞分裂而来, 另一方面, 更多的是从邻近细胞演变或游走到达伤处的, 它通过迁徙、

增殖、分化、分泌胶原和各类细胞因子对创伤修复起作用，并与细胞外基质的形成、肉芽组织和瘢痕组织的形成有密切的关系^[7]。胶原在创伤修复中是构成修复组织的主要细胞外基质成分，对于修复过程的完成有着极其重要的作用。而创面愈合过程中胶原合成、分泌与沉积的量的增加并不是借助于成纤维细胞内胶原 mRNA 表达的增强，而是借助于成纤维细胞的增殖，使其细胞数量显著增加，从而实现胶原合成、分泌与沉积的增加，填充创伤或深度烧/烫伤所致的皮肤缺损，这也是创面愈合过程中成纤维细胞增殖的真正目的^[8]。愈合初期成纤维细胞被激活，合成和分泌胶原，胶原的产生既是创面修复的重要过程，也是瘢痕形成过程的决定性因素，故调控胶原的合成对于促进创面愈合，减少瘢痕形成有着重要的意义^[9]。

本实验 HE 形态学观察结果显示，烧伤后第 7、14 天，生肌玉红膏组成纤维细胞数量增加明显，而到烧伤后第 21 天，生肌玉红膏组创面肉芽组织中成纤维细胞数量略为减少，且胶原纤维生长较模型组有序。实验结果显示生肌玉红膏组早期、中期成纤维细胞多于模型组，即生肌玉红膏组修复早于模型组；生肌玉红膏组胶原纤维的产生也较模型组多，排列更有序。本实验结果提示生肌玉红膏组创面成纤维细胞水平及胶原分泌情况高于模型组，因而可推测生肌玉红膏可能通过促进创面成纤维细胞的增生和胶原纤维的合成而促进创面愈合，但对于具体作用机制尚需进一步实验研究。

REFERENCES

- [1] WANG D P. A report of 48 cases of Shengji Yuhong ointment in the treatment of diabetic foot ulcer [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med(中国中西医结合外科杂志), 2012, 18(3): 299-300.
- [2] WANG Z X, FANG X H, JIANG J G. Application of modified Shengji Yuhong ointment in the treatment of moderate and small burn wounds in 350 cases [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2010, 37(S1): 137-138.
- [3] ZHANG J, YAO C, YIN H, et al. 257 cases randomized controlled multi-center clinical study on Shengji Yuhong ointment for promoting legs chronic wound healing [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2013, 54(1): 35-38.
- [4] XIA L, WANG L X. Systematic review on Shengji Yuhong ointment for promoting wound healing in patients undergoing anorectal surgery [J]. Eva Anal Drug-use Hosp China(中国医院用药评价与分析), 2011, 11(11): 1024-1027.
- [5] YAO C, SHI Y X, ZHU Y K, et al. Experimental study on effect of Shengji Yuhong ointment on microcirculation of mechanical wound in mice [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药), 2005, 26(11): 68-68.
- [6] YAO C, PAN L Q. Experimental study of Shengji Yuhong ointment on the content of wound basic fibroblast growth factor [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药), 1999, 20(8): 42-43.
- [7] LU S L. The Mechanism and New Technology of Burn Wound Healing(伤创面愈合机制与新技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 56-59
- [8] CHEN J K, CHEN C. The mechanism of deep partial-thickness burn wound healing [J]. Guangdong Med J(广东医学), 2009, 3(11): 1752-1754.
- [9] WANG Z Y, XIAO X L, TANG H J. Effects of Fuhuang Shengji Yuchuang ointment on expressions of type I and III collagens mRNA in granulation wound tissue in rats with diabetes [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med(中国中西医结合外科杂志), 2011, 17(1): 63-66.

收稿日期: 2013-06-07

不同品种威灵仙水煎液外用对大鼠痔疮、佐剂性关节炎模型的影响

于舒雁, 魏荣锐, 苗明三* (河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 目的 通过对威灵仙的外用实验研究, 探索其对痔疮和佐剂性关节炎的治疗作用。方法 观察 3 种威灵仙水煎液外用对大鼠痔疮模型和大鼠佐剂性关节炎模型的影响。结果 威灵仙、棉团铁线莲、东北铁线莲不同剂量水煎液均能改善大鼠痔疮模型肛周溃疡症状, 加速痔疮创面修复, 促进愈合, 减轻肛周肿胀; 减轻大鼠关节炎模型足跖肿胀, 改善关节肿胀及屈伸不利症状, 降低血清炎症因子 IL-1 β , TNF- α 水平。结论 威灵仙可促进病理组织修复, 加快溃疡面的愈合, 具有抗炎功能。

关键词: 威灵仙; 外用; 痔疮; 佐剂性关节炎

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)04-0391-07

基金项目: 国家“十一五”支撑计划(2008BA153B09); 高校科技创新团队(2012IRTSTHN011)

作者简介: 于舒雁, 女, 硕士 Tel: (0371)65962546 E-mail: shuyanyu88@126.com *通信作者: 苗明三, 男, 博士, 教授 Tel: (0371)65962546 E-mail: miaomingsan@163.com