

生肌化癥方 95%乙醇提取物对糖尿病小鼠创面的治疗作用

张婧婷^{1a}, 马明华², 吴闽枫^{1b}, 汪晓河^{1a}, 李福伦^{1b}, 年华^{1a*} (1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, a.药剂科, b.皮肤科, 上海 200437; 2.上海市同济大学附属杨浦医院药剂科, 上海 200090)

摘要: 目的 探讨生肌化癥方 95%乙醇提取物对糖尿病小鼠创面愈合的影响。方法 采用体内动物试验研究生肌化癥方 95%乙醇提取物(低、中、高浓度)促进糖尿病创面的作用; 通过对糖尿病小鼠大体观察, 对创面面积、愈合时间、HE 染色(肉芽新生、胶原修复、表皮迁移)等数据综合分析了解创面愈合的情况。结果 治疗第 11 天时阳性药组、95%乙醇提取物低剂量组创面面积明显小于模型组($P<0.05$); 95%乙醇提取部位低浓度创面愈合率高于中、高浓度($P<0.05$)。结论 生肌化癥方 95%乙醇提取物有明显促进创面愈合的作用。

关键词: 生肌化癥方; 95%乙醇提取物; 创面愈合; HE 染色

中图分类号: R285.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)10-1369-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.002

引用本文: 张婧婷, 马明华, 吴闽枫, 等. 生肌化癥方 95%乙醇提取物对糖尿病小鼠创面的治疗作用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1369-1372.

Therapeutic Effect of 95% Ethanol Extract of Shengji Huayu Formula on Diabetic Wound

ZHANG Jingting^{1a}, MA Minghua², WU Minfeng^{1b}, WANG Xiaohe^{1a}, LI Fulun^{1b}, NIAN Hua^{1a*} (1.Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, a.Pharmaceutical Center, b.Department of Dermatology, Shanghai 200437, China; 2.Department of Pharmacy, Shanghai Yangpu Hospital, Tongji University, Shanghai 200090, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of 95% ethanol extract of Shengji Huayu formula on wound healing in diabetic mice. **METHODS** *In vivo* animal experiment was used to study the effect of Shengji Huayu formula 95% ethanol extract(low, medium and high concentration) to promote the therapeutic effect of diabetic wound; based on diabetic mice (db/db mice), gross observation of the wound area, wound healing time, HE staining (new collagen repair, granulation, epidermal migration) comprehensive analysis data to understand the situation of wound healing. **RESULTS** On the eleventh day of treatment, the wound area of positive drug group and 95% ethanol group was significantly smaller than the model group ($P<0.05$), the wound healing rate of 95% ethanol extracts of low concentration was significantly higher than that in the middle, high concentration ($P<0.05$). **CONCLUSION** The 95% ethanol extract of Shengji Huayu formula can obviously promote wound healing.

KEY WORDS: Shengji Huayu formula; 95% ethanol extract; wound healing; HE staining

近年来, 全球糖尿病发病率及患病率增长迅速^[1], 糖尿病患者皮肤易受损伤, 迁延不愈, 形成顽固难愈性溃疡。生肌化癥方在生肌化癥法的指导下, 长期应用于临床, 是传统促进皮肤溃疡愈合的外用药物, 具有扎实的临床基础。本研究应用 db/db(diabetes mouse)小鼠创面模型, 从整体动物模型的角度, 对中药复方进一步研究。通过小鼠大体观察、创面面积、愈合时间、HE 染色(创面修复情况、胶原新生, 表皮迁移)等数据综合分析, 观察生肌化癥方 95%乙醇提取部位对 db/db 小鼠创面愈合的疗效, 以期进一步证实其促进糖尿病

创面愈合的作用。为下一步明确活性部位群物质基础提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

YP-6001N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); P4-2 型恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); RE52CS 型旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); XW-80A 型旋涡混合仪(海门市其林贝尔仪器有限公司)。

基金项目: 国家自然科学基金(81373648, 81673866); 上海市卫计委科研课题项目(201440386); 上海市科学技术委员会科研计划项目(16411955000); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(ZY3-RCPY-3-1041); 2016 年度上海中医药大学校级医院管理研究项目(2016YG15)

作者简介: 张婧婷, 女, 硕士生 Tel: (021)65161782-3115 E-mail: zjt08310@163.com *通信作者: 年华, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (021)65161782-3118 E-mail: jackynian@126.com

1.2 试剂与药物

生肌化腐方由黄芪、丹参、白芷、大黄、紫草、血竭、炉甘石和珍珠粉组成(上海万仕诚国药制品有限公司);贝复新[重组牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶,珠海亿胜生物制药有限公司,批号:20160714,规格:每支 $21\ 000\ \text{IU}\cdot(5\ \text{g})^{-1}$];95%乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:20131114);卡波姆(广州康乔汉普药业有限公司,批号:20130001);甘油[丰益油脂化学(上海)有限公司,批号:20110010]。

1.3 动物及饲料

db/db小鼠由C57BL/KsJ近亲交配株常染色体隐性遗传衍化而来,属II型糖尿病模型。

SPF级8周♀db/db小鼠20只,喂给动物普通饲料,许可证号:SCXK(沪)2012-0002,由上海斯莱克动物有限公司提供。

1.4 药物制备

①95%乙醇提取部位:按比例取黄芪30.05 g、丹参15.02 g、大黄15.13 g、血竭10.06 g、紫草30.16 g、白芷30.35 g、珍珠粉30.10 g和炉甘石30.05 g,置圆底烧瓶中,第1次加入8倍量95%乙醇1500 mL,回流提取1 h,第2次加入95%乙醇1000 mL,回流提取1 h,合并提取液、静置,过滤后浓缩至175 mL。按低、中、高(1:5:8)的比例分别将浓缩液分成12.5, 62.5, 100 mL,分别将其浓缩至7 mL,与溶胀好的卡波姆混合,加适量三乙醇胺调节pH值在6~8,制备成12.5 g低、中、高浓度的凝胶剂,贴好标签放入4℃冰箱保存。

②空白基质:称取0.375 g卡波姆、0.5 g甘油,向其中加入11.5 mL水溶胀过夜,作为空白凝胶基质,贴好标签放入4℃冰箱保存。

2 方法

2.1 糖尿病创面模型的建立

采用自身对照法按照随机数字分为生肌化腐方95%乙醇提取物组(低浓度组、中浓度组、高浓度组)、模型组及阳性药组。在无菌条件下,进行创面造模^[2],将小鼠麻醉用脱毛刀脱毛后,于脊柱两侧用直径0.6 cm打孔器制作面积为 $0.28\ \text{cm}^2$ 的皮肤创面,每只小鼠背部6个孔,创面深度达到筋膜下包扎伤口,单笼饲养,分别做好组间标记。

2.2 给药方案

模型建立后,采用自身对照的方法;给药组小鼠(15只)左侧创面外敷卡波姆空白凝胶剂,右侧

创面进行创周消毒后,外敷生肌化腐方95%乙醇提取物凝胶剂低、中、高浓度。阳性药组(5只)每只背部6个创面,均涂阳性药;每日换药1次。

2.3 标本采集

造模后第3, 7, 9, 11天分别对小鼠进行创面面积测算。给药第15天脱颈处死小鼠,快速切取创面基底肌肉组织一块;生肌化腐方醇提组低、中、高浓度分别各10个创面;模型组10个创面,阳性药24个创面。各组半数创面用4%多聚甲醛固定,24 h后换液为75%酒精;剩余创面置于-80℃冰箱保存。由于实验过程中小鼠部分创面受损伤影响其正常愈合,创面面积与其余创面面积差距较大,所以选择剔除;剔除后创面面积数据仍满足统计要求。

2.4 HE染色

①取材、固定、脱水(不同浓度梯度乙醇);②包埋、切片(厚度约 $5\ \mu\text{m}$);③60℃恒温箱中烘烤1 h;④二甲苯脱去石蜡3次,每次10 min;⑤水洗2次,每次5 min;⑥Harris苏木素染色处理5 min;⑦水洗5 min;⑧1%盐酸酒精溶液分化5 s,自来水洗返蓝15 min;⑨0.5%伊红(水溶性)染色1 min;80%乙醇2 min;95%乙醇2次,每次5 min;100%乙醇2次,每次5 min;⑩二甲苯透明处理2次,每次5 min,滴加1~2滴树脂,加盖玻片封固。

2.5 观察指标

2.5.1 大体观察 每天换药时肉眼观察创面有无渗液、是否感染、创面色泽、水肿情况、肉芽组织的生长情况等。

2.5.2 创面面积比 分别于小鼠创面造模后第3, 7, 9, 11天用标尺标记、相机拍摄创面,用图像分析软件Image J予以分析,取得面积数据,计算出创面面积所占百分比($A/\%$)。 $A(\%) = \text{观察时间点创面面积} / \text{原始创面面积} \times 100\%$ 。

2.5.3 创面愈合时间 以肉芽完全覆盖溃疡面为治愈标准,达到创面愈合标准时间为创面愈合时间。

2.5.4 HE染色结果观察 第15天由于创面基本愈合,在 $200\times$ 倍镜下,观察HE染色后创面组织结构、表皮及胶原组织修复情况。

2.5.5 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布组间比较采用One-Way ANOVA分析,两两比较采用LSD检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验标准。

3 结果

3.1 大体观察

糖尿病小鼠创面造模后, 无感染现象, 背部创周有水肿现象。研究结果显示, 模型组创面结成黄褐色痂, 有出血现象, 愈合缓慢, 分泌物较多, 有血痂覆盖, 肉芽新生少; 阳性药组创面有少许渗出液, 创面呈橘红色, 有肉芽组织生成, 创面修复较好; 低浓度组创面泛红, 有黄脓痂覆盖可见稠黄的脓汁, 无坏死组织, 趋向闭合有新生肉芽生长, 创面愈合速度较快; 中浓度组创面有少量新生肉芽血痂覆盖, 部分有愈合趋势, 较少出血现象, 创面泛红; 高浓度组肉芽呈鲜红色, 有渗出液深红色血痂, 创面缩小缓慢。结果见图 1。

3.2 创面面积比

给药第 9, 11 天时, 阳性药组、低浓度组创面面积显著低于模型组和中、高浓度组($P<0.05$), 中、高浓度组与模型组相比无统计学意义, 中浓度组与高浓度组相比无统计学差异; 给药第 3, 7 天时, 各组间相比无统计学差异。结果见表 1。

3.3 HE 染色

第 15 天 HE 染色结果显示, 模型组创面表皮较薄、真皮层胶原纤维疏松、修复较差、细胞层次模糊, 复层排列不规整; 阳性药组创面少见坏死组织、血管生成较多; 低浓度组表皮增厚明显、修复较好、不见坏死组织; 中浓度组表皮修复明显, 有瘢痕形成; 高浓度组胶原组织修复不完整, 表皮较模型组薄, 细胞层次较不明显。结果见图 2。

表 1 各组不同时间点创面面积比($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Wound area proportion of each group at different time($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第3天	第7天	第9天	第11天
模型组	10	94.08±16.22	60.38±18.12	44.17±15.81	33.53±10.06
阳性药组	24	98.12±23.90	56.56±8.99	33.85±7.65 ¹⁾²⁾³⁾	16.83±4.66 ¹⁾²⁾³⁾
低浓度组	10	94.38±12.59	50.11±12.21	17.66±6.17 ¹⁾²⁾³⁾	3.29±1.40 ¹⁾²⁾³⁾
中浓度组	10	83.09±11.51	60.51±8.86	49.54±13.44	39.42±6.85
高浓度组	10	87.63±13.48	59.78±12.55	51.97±11.37	39.72±9.45

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与中浓度组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与高浓度组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with middle concentration group, ²⁾ $P<0.05$; compared with high concentration group, ³⁾ $P<0.05$.

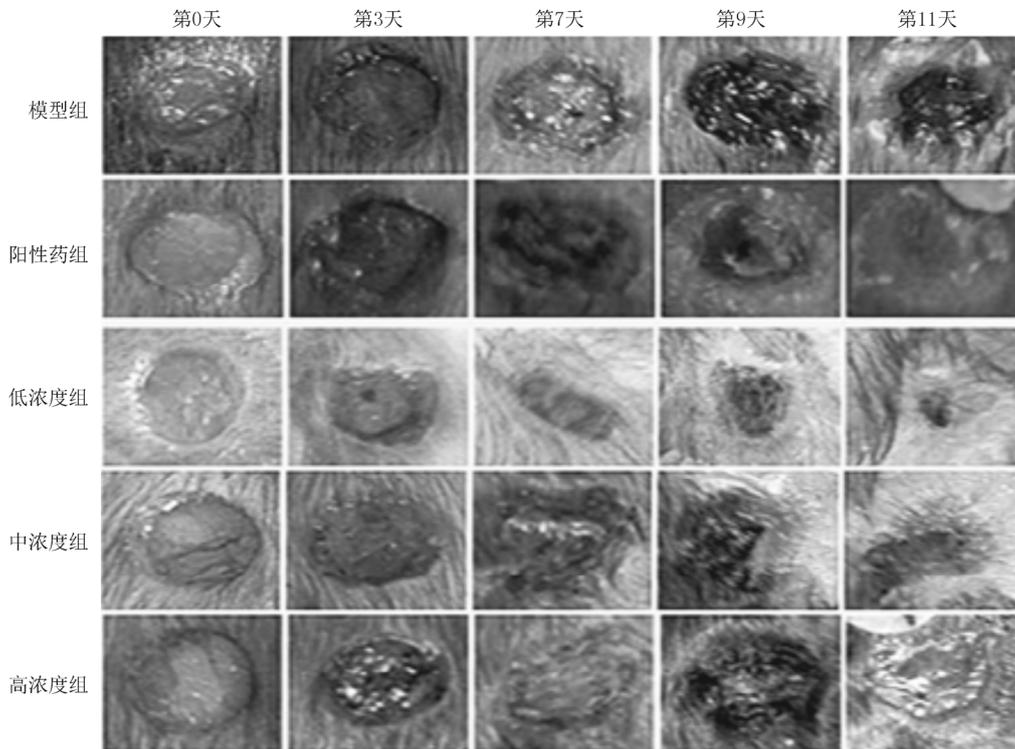


图 1 不同时间点各组小鼠创面形态变化

Fig. 1 The morphological changes of wound at different time points

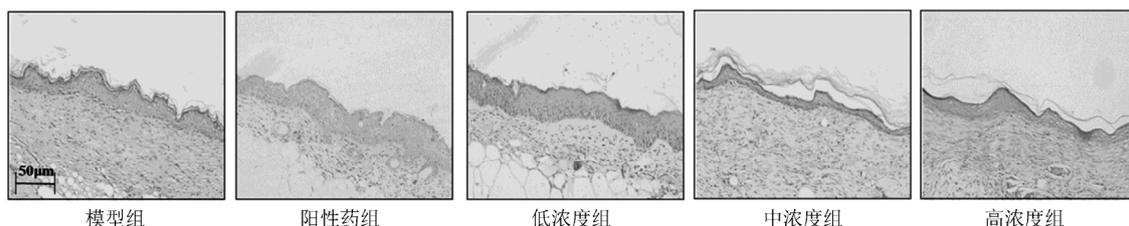


图2 给药15 d后糖尿病小鼠创面肉芽组织 HE 染色结果(200×)

Fig. 2 HE staining of wound granulation tissue after treat 15 d (200×)

4 讨论

在药效物质基础研究过程中, 实验动物模型是最可靠、最常用的验证工具之一^[3]。随着生命科学前沿技术的快速发展, 糖尿病动物模型目前在中医药研究中被广泛应用。本研究选用动物模型为 db/db 小鼠, 是由 C57BL/KsJ 近亲交配株常染色体隐性遗传衍化而来, 属 II 型糖尿病模型^[4]。db/db 小鼠模型主要用于中药有效部位群及单体成分抗糖尿病及糖尿病并发症的研究^[5-6]。db/db 小鼠肥胖、贪食, 故选用 10 周以内的实验模型, 该模型稳定、遗传背景明确、糖尿病及其并发症特征明显。临床研究表明, 中医外科治疗慢性皮肤溃疡的根本目的是“生肌”; 大体上归纳为祛腐生肌、拔毒生肌、补虚生肌、益气化瘀生肌、祛瘀生肌等。生肌化瘀方是中医外科唐汉钧教授和李斌教授根据多年临床实践经验总结出的经验方, 本研究将以往汤剂改良成以卡波姆为基质的凝胶剂, 与聚乙二醇相比, 卡波姆制作过程更方便、涂布性更好、与皮肤更贴合、吸收更完全。制作成凝胶剂的目的在于直接接触患处有利于创面吸收、给药方便、使用舒适、生物相容性好, 还可避免首过效应、减少药物不良反应、促进药物相互作用等方便于临床应用。

糖尿病创面愈合是一个错综复杂的过程, 新血管生成及成纤维细胞增殖是创面修复的关键之一。新血管生成及成纤维细胞的增殖情况均与肉芽组织内血管生成有关, 是创面愈合的首要条件。糖尿病溃疡有出血现象, 分泌炎症因子及过氧化现象, 减少炎症因子分泌、丰富胶原蛋白、促进表皮迁移, 从而有利于促进溃疡修复^[7]。治疗创面愈合不仅要求创面要尽快愈合, 并且要避免瘢痕形成^[8], 创面愈合过程可分为炎症期、肉芽增殖期、重塑期 3 个阶段^[9], 分别在 3, 7, 15 d 左右。创面愈合情况是评价药效的客观指标^[10], 本研究可知, 生肌化瘀方对糖尿病创面愈合有明显治疗作用。在不同时间点

观察创面愈合情况, 并利用图像软件测量创面面积。根据创面形态显示: 模型组创面愈合缓慢、分泌物较多、易出血、肉芽组织生成少; 95%乙醇提取物低浓度组创面肉芽组织出现时间短、溃疡面积缩小速度快、生长状态良好。低剂量组中有效成分提取较完全, 与高剂量组相比杂质成分少, 干扰小。生肌化瘀方促进创面愈合的显著作用展示了其良好的药用前景, 但生肌化瘀方 95%乙醇提取物是复杂的化学混合物, 其促进创面愈合的机制以及其活性成分的筛选尚有待进一步研究探索。

REFERENCES

- [1] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [2] FU X B, WANG Y P, SUN T Z, et al. Preparation of diabetic ulcers in rats [J]. Shanghai Lab Animal Sci(上海实验动物科学), 1997, 17(4): 217-219.
- [3] CALCUTT N A, COOPER M E, KERN T S, et al. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(5): 417-429.
- [4] CHENG L, SHEN Z F, SUN G B, et al. Advances in diabetic animal models and its application in the traditional Chinese medicine research [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2015, 50(8): 951-958.
- [5] ZHANG S Y. Effects of phlorizin on vascular complications in diabetes db/db mice [D]. Jinan: Shandong University, 2013.
- [6] DU H, SHAO J Q, GU P, et al. Effect of rhein treatment on first phase insulin secretory function in db/db mice [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(20): 2764-2767.
- [7] AKIRA K, YOSHIKI T. Attempts to accelerate wound healing [J]. J Dermatol Sci, 2014, 76(3): 169-172.
- [8] LIU C Y, TANG J H, SHAO J S, et al. Promoting healing effects on accreting raw surface in burning and scald of skin with aloe gel [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(7): 931-933.
- [9] KULKARNI M, O'LOUGHLIN A, VAZQUEZ R, et al. Use of a fibrin-based system for enhancing angiogenesis and modulating inflammation in the treatment of hyperglycemic wounds [J]. Biomaterials, 2014, 35(6): 2001-2010.
- [10] DONG X P, WANG L J, ZHAO C L, et al. Effect of Shengji Yuhong ointment on deep partial-thickness burn wound healing in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(4): 387-391.

收稿日期: 2017-06-02

(本文责编: 蔡珊珊)