

本文引用:卫 昊,刘 清,张晓双,刘继平,许 栋.水飞蓟喷雾剂对大鼠深Ⅱ度烫伤创面修复的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1380-1383.

水飞蓟喷雾剂对大鼠深Ⅱ度烫伤创面修复的影响

卫 昊,刘 清,张晓双,刘继平,许 栋
(陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046)

〔摘要〕目的 考察水飞蓟喷雾剂对大鼠深Ⅱ度烫伤创面修复作用及机制。方法 建立深Ⅱ度烫伤模型大鼠,随机分为模型组、美宝湿润烧伤膏组(24 g/kg)、水飞蓟喷雾剂小剂量组(24 g/kg)、水飞蓟喷雾剂中剂量组(48 g/kg)、水飞蓟喷雾剂大剂量组(96 g/kg)和空白组,连续给药21 d。分别在造模后第3、7、14、21天计算烫伤创面愈合率,检测血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;免疫组化法检测烫伤创面碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)的表达。结果 与模型组相比,烫伤后第3天,水飞蓟喷雾剂小剂量组、中剂量组、大剂量组创面愈合率提高,血清SOD活性升高,MDA含量降低,且差异均具有统计学意义($P<0.05$);烫伤后第7、14天,水飞蓟喷雾剂大剂量组血清SOD活性升高,MDA含量降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$);同时水飞蓟喷雾剂各剂量组均可不同程度诱导受损组织内bFGF、EGF、TGF- β 的表达。结论 水飞蓟喷雾剂对大鼠深Ⅱ度烫伤创面有修复作用,可促进烫伤创面的愈合,其机制可能与抗氧化,增加b-FGF、EGF、TGF- β 的表达有关。

〔关键词〕 水飞蓟喷雾剂;深Ⅱ°烫伤;创面;b-FGF;EGF;TGF- β

〔中图分类号〕R283 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.12.006

Efficacy of Silymarin Spray in Treatment of Deep II Degree Scald Wound in Rats

WEI Hao, LIU Qing, ZHANG Xiaoshuang, LIU Jiping, XU Dong
(Shanxi University of Chinese Medicine, Xiayang, Shanxi 712046, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the efficacy of silymarin spray in the treatment of deep II degree scald wound in rats and its mechanism of action. **Methods** A model of deep II degree scald wound was established in rats. The rats were randomly divided into model group, moisture burn ointment (MEBO) group (24 g/kg), low-dose silymarin spray group (24 g/kg), medium-dose silymarin spray group (48 g/kg), high-dose silymarin spray group (96 g/kg), and blank group. They were given respective treatments for 21 consecutive days. At 3, 7, 14, and 21 days after modeling, the healing rate of scald wound was calculated, and the serum levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured; the expression of basic fibroblast growth factor (b-FGF), epidermal growth factor (EGF), and transforming growth factor beta (TGF- β) in the wound was measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, at 3 days after scalding, the three silymarin spray groups had significantly higher wound healing rate and serum level of SOD and a significantly lower serum level of MDA (all $P<0.05$); at 7 and 14 days after scalding, the high-dose silymarin spray group had a significantly higher serum level of SOD and a significantly lower serum level of MDA (all $P<0.05$); the expression of b-FGF, EGF, and TGF- β in the damaged tissue was increased to varying degrees in the three silymarin spray groups (all $P<0.05$). **Conclusion** Silymarin spray has a repairing effect on deep II degree scald wound in rats by promoting the healing of scald wound. The mechanism may be related to antioxidation and increasing the expression of b-FGF, EGF, and TGF- β .

〔Keywords〕 silymarin spray; deep II degree scald; wound; b-FGF; EGF; TGF- β

〔收稿日期〕2018-06-11

〔基金项目〕陕西省科技厅社会发展项目(2016SF-048)。

〔作者简介〕卫 昊,男,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药抗炎免疫药理学,E-mail:weihao217@163.com。

水飞蓟为菊科植物水飞蓟 *Silybummarianum*(L.) Gaertn.的干燥成熟果实,具有清热解毒、疏肝利胆等功效,临床上用于治疗肝胆湿热、胁痛,黄疸^[1]。水飞蓟及其复方的提取物对浅Ⅱ度烫伤具有较好的疗效,可有效缓解疼痛,促进组织修复^[2-3]。本文在前期水飞蓟膏剂对浅Ⅱ度烫伤模型研究基础上,建立深Ⅱ度烫伤动物模型,改变受试药物剂型,研究水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠创面愈合率、血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量、烫伤创面碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor betal, TGF- β)表达的影响,探讨水飞蓟喷雾剂在促进烫伤创面愈合中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

水飞蓟种子,陕西兴盛德药业有限责任公司,批号:20160401;美宝湿润烧伤膏,汕头市美宝制药有限公司,批号:1600604k;超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;批号:20170324,丙二醛(MDA)测定试剂盒,批号:20170414,南京建成生物工程研究所;兔抗 b-FGF 多克隆抗体(NO.10N36)、兔抗 EGF 多克隆抗体(NO.10N213)、兔抗TGF- β 多克隆抗体(NO.10N51)、SABC 试剂盒(07k21cj)、DAB 试剂盒(07125c20),均由武汉博士德生物工程有限公司提供;水合氯醛,上海浦江化工有限公司,批号:20150308;硫化钠,天津市天力化学试剂有限公司,批号:20161210;乳酸钠林格注射液,安徽双鹤药业有限公司,批号:20170305。

1.2 动物

SD 大鼠 72 只,SPF 级,体质量 180~220 g,雌雄各半,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2015-030。

1.3 仪器

CPA225D 型精密分析天平,Sartorius 公司;TDL-80-2B 低速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;UV2100 双光束紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司;ELX808IU 酶标仪,由 BioTEK 公司;超低温保存箱,Haier 公司;RM2235 型手动轮转式切片机,Leica 公司;Axio Imager M2 型正置显微镜,Zeiss 公司。

1.4 方法

1.4.1 水飞蓟喷雾剂的制备 取水飞蓟药材适量,

分别用 95%乙醇在煎药机中提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,回收乙醇,浓缩至 2 g(生药)/mL,灌装入喷壶,封口,即得。

1.4.2 造模、分组和给药 造模前大鼠禁食 12 h,用硫化钠在大鼠背部脱毛,面积约 3 cm \times 3 cm,清水洗净,擦干。除空白组外,其余各组以 10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,铁板在沸水中煮 15 min,然后紧贴于大鼠裸露皮肤 15 s,烫伤后各组均以乳酸钠林格注射液腹腔注射 300 mL/kg 抗休克治疗。取创伤组织制作病理切片,光镜下观察表皮、真皮层及汗腺等附件组织损伤情况,证实造成大鼠深Ⅱ度烫伤模型。造模成功后,将造模成功的大鼠随机分为分模型组,美宝湿润烧伤膏组(24 g/kg),水飞蓟喷雾剂小剂量组(24 g/kg)、水飞蓟喷雾剂中剂量组(48 g/kg)、水飞蓟喷雾剂大剂量组(96 g/kg)和空白组,每组 12 只。美宝湿润烧伤膏组每天涂抹给药 1 次,水飞蓟各组每天喷药 2 次,连续给药 21 d。空白组和模型组每天给予同体积的生理盐水。

1.4.3 指标检测 分别在造模后第 3、7、14、21 天,对大鼠创面进行平面拍照,计算创伤面积及创面愈合率。

创面愈合率=(原始烫伤面积-各时间点未愈合面积)/原始烫伤面积 \times 100%

分别在在造模后第 3、7、14、21 天,每次取 3 只大鼠,10%水合氯醛麻醉后,腹主动脉取血,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,检测血清 SOD 活性和 MDA 含量;切取烫伤区域全层皮肤,面积约 1 cm \times 1 cm,将皮肤组织放在 10%甲醛溶液固定,免疫组化法检测 b-FGF、EGF、TGF- β 的表达,免疫组化阳性结果为在光镜下观察到细胞浆中有棕黄色颗粒。

1.5 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析。所有数据“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据处理采用单因素方差分析,组间比较采用 Q 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠创面愈合率的影响

烫伤后第 3 天,美宝湿润烧伤膏组、水飞蓟喷雾剂小剂量组、中剂量组、大剂量组创面愈合率升高,与模型组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);烫伤后第 14 天,水飞蓟喷雾剂小剂量组与模型组相比创

面愈合率升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);烫伤后第 7、21 天,与模型组相比,其余各组创面愈合率无显著变化,差异均无统计学意义($P>0.05$),但第 21 天各组创面愈合率均达到 92%以上。见表 1。

表 1 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠创面愈合率的影响

($\bar{x}\pm s, n=12, \%$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
模型组	11.39±3.82	49.02±3.27	83.22±3.70	92.84±6.43
美宝湿润烧伤膏组	42.25±2.02*	60.85±6.34	91.67±3.89	97.19±1.90
水飞蓟小剂量组	45.64±4.96*	62.61±7.49	92.10±1.37*	97.64±2.77
水飞蓟中剂量组	54.12±2.86*	69.84±5.08	89.11±3.94	95.15±8.51
水飞蓟大剂量组	50.80±4.85*	60.24±3.06	88.99±4.94	95.89±3.85

注:与模型组比较,* $P<0.05$

2.2 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠血清 SOD 活性的影响

与模型组相比,烫伤后第 3 天,美宝湿润烧伤膏组、水飞蓟喷雾剂小剂量组、中剂量组、大剂量组血清 SOD 活性均上升,差异具有统计学意义($P<0.05$);烫伤后第 7、14 天,美宝湿润烧伤膏组、水飞蓟喷雾剂大剂量组血清 SOD 活性均上升,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠血清 SOD 活性的影响

($\bar{x}\pm s, n=3, U/mL$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
空白组	58.99±3.56	58.91±2.41	58.99±2.55	58.99±2.34
模型组	23.03±3.44 [#]	30.22±5.66 [#]	34.11±3.12 [#]	45.53±5.06 [#]
美宝湿润烧伤膏组	36.34±3.50*	37.26±0.13*	42.71±3.23*	50.01±3.82
水飞蓟小剂量组	34.34±5.57*	32.31±6.33	37.69±2.29	48.62±2.15
水飞蓟中剂量组	35.93±1.29*	34.13±3.26	39.48±6.11	50.16±5.59
水飞蓟大剂量组	39.58±4.08*	42.83±5.29*	44.79±4.82*	53.29±3.55

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

2.3 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠血清 MDA 含量的影响

与模型组相比,烫伤后第 3 天,美宝湿润烧伤膏组、水飞蓟喷雾剂小剂量组、中剂量组、大剂量组血清 MDA 含量均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);烫伤后第 7、14 天,美宝湿润烧伤膏组、水飞蓟喷雾剂大剂量组血清 MDA 含量均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠的皮肤创面 b-FGF、EGF、TGF- β 表达影响

与模型组比较,美宝湿润烧伤膏组和水飞蓟喷雾剂大剂量组 b-FGF、EGF、TGF- β 阳性表达增加。见图 1-3。

表 3 水飞蓟喷雾剂对烫伤大鼠血清 MDA 含量的影响

($\bar{x}\pm s, n=3, nmol/mL$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
空白组	5.33±1.20	5.33±1.20	5.34±1.25	5.31±1.19
模型组	14.21±1.72 [#]	10.91±2.17 [#]	8.01±2.18 [#]	6.98±1.52 [#]
美宝湿润烧伤膏组	9.96±1.65*	7.45±1.19*	5.84±1.45*	5.72±2.08
水飞蓟小剂量组	10.99±1.66*	8.87±0.13	6.95±1.41	6.29±1.03
水飞蓟中剂量组	9.31±1.98*	8.23±2.77	6.77±2.57	6.45±1.41
水飞蓟大剂量组	8.57±1.55*	7.32±1.21*	5.25±2.94*	5.84±1.11

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

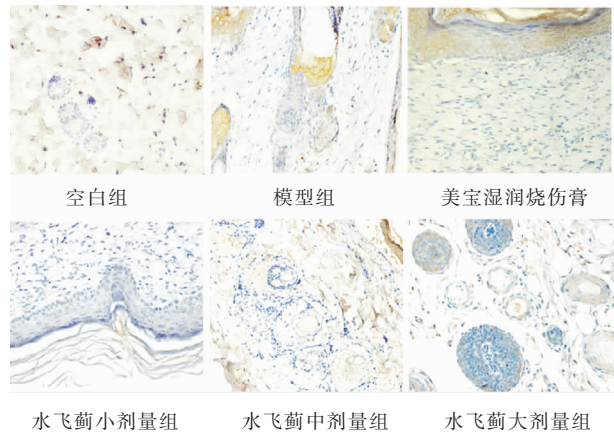


图 1 烫伤大鼠皮肤创面 b-FGF 的表达(免疫组化,×200)

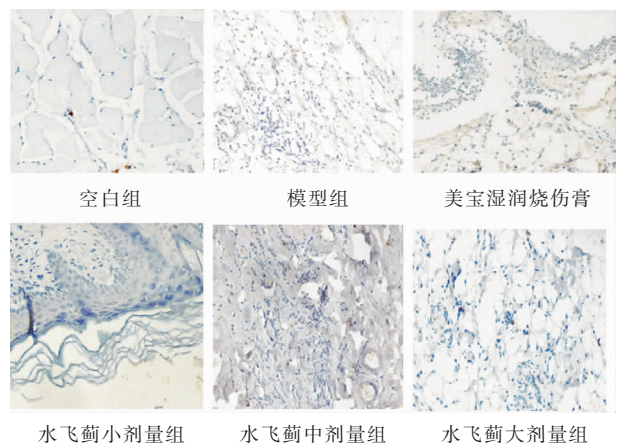


图 2 烫伤大鼠皮肤创面 EGF 的表达(免疫组化,×200)

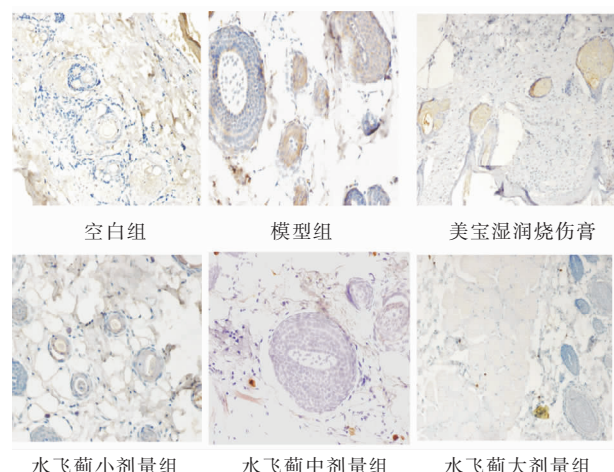


图 3 烫伤大鼠皮肤创面 TGF- β 的表达(免疫组化,×200)

3 讨论

烧烫伤是人体最大最外部器官-皮肤极易遭受的创伤,是目前医学研究的热点。创伤修复是皮肤在损伤发生后多种修复细胞、生长因子和细胞外基质之间相互作用而进行自我修复的复杂动态过程。伤口接受外界刺激后最初经历氧化应激和炎症反应阶段,随后才是组织的修复和瘢痕阶段^[4-5]。烧烫伤会使创面处于一个暂时的缺氧状态,因此机体内氧自由基爆发性产生^[6]。自由基的清除与抗氧化物的活性相关,SOD 是机体内唯一以氧自由基为底物的酶,具有高效的催化作用。SOD 是体内的一种重要的抗氧化保护酶,它的活力高低间接反应了机体清除氧自由基的能力。MDA 是自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性,因而 MDA 的含量高低又间接反应了机体细胞被自由基侵袭的严重程度。

生长因子是一类对细胞生长与分化有显著作用的多肽,对创面愈合作用呈现多功能性,不仅能促进细胞增殖和分化,而且合成和分泌创面愈合所需的多种物质^[7]。b-FGF 作为细胞有丝分裂刺激原,广泛分布于体内多种细胞,可促进细胞自身和周围细胞的分裂、增殖、分化,改变细胞的趋化性,增加细胞迁移,促进上皮组织的生成^[8-9]。EGF 是一种多肽类物质,可刺激表皮角质细胞和纤维细胞增殖,促进新血管的形成和核酸蛋白质的合成^[10-11]。TGF- β 主要来源于血小板,对细胞的生长和分化有重要的作用,其中突出的作用为促进胶原蛋白等细胞外基质的形成,同时还能够抑制蛋白酶和基质酶的活性,进而促进细胞外基质的沉积,是目前已知的与胶原代谢和增生性瘢痕形成关系最为密切的生长因子。组织损伤后,血小板在受损组织脱颗粒释放 TGF- β 。TGF- β 的自身诱导作用又可使激活的巨噬细胞、T 淋巴细胞、增殖的上皮细胞和成纤维细胞表达 TGF- β ,加强并延长 TGF- β 的作用^[12-13]。

实验研究结果显示,与模型组相比,给药 3 d 后,水飞蓟醇提物可明显提高小鼠烫伤模型创面愈合率,起效较快,给药 21 d 各组创面愈合率均达到 92% 以上,效果明显。同时给药 3 d 后水飞蓟三个剂量组均能不同程度升高血清中 SOD 活性,降低血清中 MDA 含量,且差异具有统计学意义;烫伤后第 7、14 天,水飞蓟大剂量组治疗作用最为明显,说明受试药物抗烫伤作用机制与抗氧化和清除自由基高度相关,且呈现出一定的量效关系,这与本课题组前期相关研究结果一致^[14-15]。烧烫伤修复是个复杂有序的生物学过程,中药制剂可以通过促进 b-FGF、EGF、TGF- β 等生长因子的分泌与释放,加速不同深

度烧烫伤创面及供皮区愈合,特别是对深 II 度创面作用更为明显,其中成纤维细胞的增殖是创面愈合中的关键步骤^[16-19]。本实验对皮肤组织进行了免疫组化定性分析,染色后光镜下图形分析结果显示,水飞蓟喷雾剂各剂量组均可不同程度诱导受损组织内 bFGF、EGF、TGF- β 的表达,从而促进创面的愈合。因本课题后续研究还将采用 western 法定量检测组织蛋白,故本实验未对切片进行定量分析。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:48.
- [2] 郭惠玲,卫 昊,武可泗,等.烫伤灵对大鼠抗炎镇痛作用的实验研究[J].陕西中医学院学报,2008,31(6):63-64.
- [3] 卫 昊,万朝阳,张 莹.水飞蓟提取物对烫伤创面愈合作用的实验研究[J].陕西中医,2013,34(10):1428-1429.
- [4] BIAN X, GUO H, LI Z, et al. Role for heat shock protein 90 α in the proliferation and migration of hacat cells and in the deep second-degree burn wound healing in mice [J]. Plos One, 2014,9(8):e103723.
- [5] MOREIRA E, BURGHI G, MANZANARES W. Update on metabolism and nutrition therapy in critically ill burn patients[J]. Med Intensiva, 2018,42(5):306-316.
- [6] 陈 鑫.缺氧微环境下微管相关蛋白 4 对人表皮细胞迁移能力影响及机制研究[D].重庆:重庆第三军医大学,2014.
- [7] 司振兴,安 宇,玉光哲,等.骨髓间充质干细胞促进大鼠背部创面愈合的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2013,47(5):414-417.
- [8] AKITA S, AKINO K, HIRANO A. Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing[J]. Adv Wound Care,2013,2(2):44-49.
- [9] TANG Q L, HAN S S, FENG J, et al. Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF[J]. Mol Med Rep,2014,9(4):1277-1282.
- [10] 谷廷敏,牛星焘,邢玉林,等.FGF 对创面愈合及其组织学影响的研究[J].北京军区医药,2000,12(6):3813-3814.
- [11] 程 飙,付小兵,盛志勇,等.局部应用碱性成纤维细胞生长因子对烫伤创面愈合及周围神经纤维再生的影响[J].中华外科杂志,2006,44(3):198-199.
- [12] 张 星,马朝群.烫伤药水喷雾剂促进深 II 度烫伤创面愈合、减少瘢痕形成的实验研究[J].中医学报,2016,31(4):558-562.
- [13] 尹秀婷,张 泓,张 健,等.不同时辰艾灸对急性胃黏膜损伤模型大鼠 EGF 及 TGF- α 的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):294-297.
- [14] 卫 昊,孟建国.水飞蓟软膏对烫伤模型大鼠自由基损伤的保护作用研究[J].现代中医药,2015,35(1):51-53.
- [15] 刘 清,胡 宇,徐宗军,等.水飞蓟软膏剂对浅 II 度烫伤模型大鼠的疗效评价[J].陕西中医,2016,37(3):379-380.
- [16] 马拴全,刘 鑫.创愈液对大鼠深 II 度烫伤创面 TGF- β 1、EGF 的影响[J].河南中医,2018,38(2):229-232.
- [17] 蔡 蔚,谢海平,龙 鑫,等.马归液对腹性膀胱炎模型大鼠 TGF- β 1、EGF- β 的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):870-874.
- [18] 黄梦玲,王 雄,吴金虎.中药治疗烧烫伤的作用机制研究进展[J].医学综述,2017,23(11):2240-2244.
- [19] 杨胜群,熊 茜,邹俊波,等.中药在烧烫伤治疗中的应用及作用机制研究进展[J].中南药学,2015,13(11):1182-1186.