

本文引用:陈 丽,邢 琴,周忠志,刘沐琳,陈港军,李利玲,李 旺.复方 ANBP 对小鼠创面组织学变化的实验研究[J].湖南中医药大学学报, 2019,39(6):699-703.

复方 ANBP 对小鼠创面组织学变化的实验研究

陈 丽¹,邢 琴¹,周忠志^{2*},刘沐琳¹,陈港军¹,李利玲¹,李 旺¹

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 观察中药复方 ANBP[由仙鹤草(*Agrimonia eupatoria*, A)、藕节(*Nelumbo nucifera Gaertn.*, N)、乳香(*Boswellia carteri*, B)和蒲黄(*Pollen typhae angustifoliae*, P)组成]对全层皮肤缺损小鼠创面愈合的影响,初步探讨复方 ANBP 对小鼠皮肤创面愈合的治疗机制。**方法** 将 48 只 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分为空白对照组、ANBP 组,每组 24 只。采用全层打孔器制备小鼠背部全层皮肤缺损模型,每组再随机分为 6 h、3 d、7 d、14 d 4 个时间点。造模后空白对照组不做任何处理,ANBP 组创面被覆复方 ANBP 粉末。通过肉眼和 HE 染色观察创面愈合情况并计算创面愈合率,对数据进行统计学分析。**结果** (1)造模后 3 d、7 d 和 14 d,与空白对照组相比,ANBP 组创面愈合率明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);(2)HE 染色结果显示 ANBP 组表皮舌长度增加、均匀平整,肉芽组织丰富。**结论** 复方 ANBP 可以明显改善小鼠创面情况,加快小鼠背部皮肤创面愈合速度,提高愈合质量。

[关键词] 中药复方;皮肤缺损;创面愈合;组织形态

[中图分类号] R264

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.005

Experimental Study on Histological Changes of Wound in Mice by Compound ANBP

CHEN Li¹, XING Qin¹, ZHOU Zhongzhi^{2*}, LIU Mulin¹, CHEN Gangjun¹, LI Liling¹, LI Wang¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of compound ANBP [(*Agrimonia eupatoria*, A), (*Nelumbo nucifera Gaertn.*, N), (*Boswellia carteri*, B) and (*Pollen typhae angustifoliae*, P)] on wound healing in mice with full-thickness skin defect, and preliminarily explore its related mechanism. **Methods** A total of 48 C57BL/6 mice were randomly divided into a blank control group and an ANBP group, with 24 mice in each group. And each group was also randomly divided into 4 time points of 6 h, 3 d, 7 d and 14 d to prepare the full-thickness skin defect model of mouse back by full-layer puncher. No treatment was given to the blank control group after modeling, and the wound was covered with compound ANBP powder in the ANBP group. The wound healing was observed by naked eye and HE staining and the wound healing rate was calculated. Also, the data were statistically analyzed. **Results** (1) Compared with the blank control group, the wound healing rate in the ANBP group was significantly increased after 3 d, 7 d and 14 d of the modeling, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); (2) HE staining showed that the length of epidermal tongue was increased, even and flat, with abundant granulation tissue. **Conclusion** Compound ANBP can significantly improve the wound condition in mice, accelerate the healing speed of the skin wound on the mouse back, and improve the healing quality.

[Keywords] Chinese compound formula; full-thickness skin defect; wound healing; histomorphology

[收稿日期] 2018-11-12

[基金项目] 国家自然科学基金(81501669);湖南省重点研发计划-国际与区域科技创新合作专题项目(2016WK2011);湖南省普通高等学校教学改革研究项目(2016-336);2017年国家级大学生创新创业训练计划项目(201710541003);2017年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(312);2017年湖南中医药大学大学生研究性学习和创新性实验计划课题(2017-14)。

[作者简介] 陈 丽,女,博士,副教授,研究方向:中西医结合创面修复与再生。

[通讯作者] *周忠志,男,主任医师, E-mail: 3z_cl@163.com。

创伤和意外伤害是导致死亡、降低生活与工作质量的重要原因。伤后创面经常出现修复不足的慢性溃疡现象,严重影响患者的生活和工作^[1-3]。如何促进创面愈合成为皮肤损伤组织修复与再生的关键问题。目前,应用多种细胞因子、干细胞作为种子细胞,修复受损皮肤,促进创面愈合,但难以有效用于临床或临床效果不佳^[4-8]。

本课题组采用中药复方 ANBP 微粉在临床上治疗皮肤组织创伤有一定的疗效。ANBP 由仙鹤草(*Agrimonia Eupatoria*, A)、藕节(*Nelumbo Nucifera Gaertn*, N)、乳香(*Boswellia Carteri*, B)和蒲黄(*Pollen Typhae Angustifoliae*, P)4 味经典的治疗创伤的中药,按君臣佐使原则配伍构成,具有止血止痛、消炎凉血、活血生肌的功效^[9-10],但具体机制尚不明确。本实验是从形态学角度观察复方 ANBP 对 C57BL/6 小鼠创面愈合的作用,探讨其疗效和作用机制,现将结果报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠 48 只,鼠龄 7 周,雌性,SPF 级,体质量(20±2)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司;实验操作过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical Issues in Animal Experimentation》中关于动物伦理学标准的条例。

1.2 实验药物

复方 ANBP,由仙鹤草、藕节、乳香和蒲黄 4 味中药组成,由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供,药物制备方法参考本课题组已发表论文^[9]。

2 方法

2.1 动物造模及分组

小鼠适应环境 3 d 后,随机分为 2 组:空白对照组 24 只、ANBP 组 24 只。两组小鼠再随机分为 4 个时间点,每组 6 只。将实验器械均消毒完毕后开始脱毛、备皮(选定创伤造模范围及大小,在其背部使用弯剪进行基础脱毛后,使用少量无刺激性脱毛膏脱毛 2~3 min,最后用无菌棉签将脱毛膏和残存毛发处理干净)、消毒(将脱毛后的皮肤区域依此使用碘酒及酒精),消毒完毕后用直径 1 cm 的全层打孔器在小鼠背部制成全层皮肤缺损模型^[11]。造模后,

空白对照组不做处理,ANBP 组的小鼠创面上立即均匀被覆上一层中药复方 ANBP 粉末。

2.2 标本采集

造模后 6 h、3 d、7 d、14 d,取空白对照组和 ANBP 组 4 个时间点造模的小鼠,用 10%水合氯醛麻醉,对创面进行拍照记录。取相同部位以创面为中心、深至骨组织的大小为 2 cm×2 cm 标本(能确保修剪标本时保留创伤后新生组织),于 4%多聚甲醛的瓶中固定,常温保存。

2.3 小鼠创面肉眼观察

观察并记录两组小鼠不同时间点的愈合情况,测量各时间点的小鼠创面直径,并利用 Image Pro Plus 计算出各时间点小鼠背部创面愈合面积。

创面愈合率=(原始创面面积-检查时创面面积)/原始创面面积×100%。

2.4 小鼠创面组织病理观察

将固定在 4%多聚甲醛中的标本送至湖南中医药大学显微形态实验室,经脱钙液脱钙(5%硝酸处理 5~7 d),经 75%、85%、90%、95%乙醇及无水乙醇脱水,放入二甲苯透明,浸蜡包埋,切片机(厂家:LEICA;型号:RM2235)进行切片,37℃摊片,捞片,按顺序装篮,60℃的恒温箱内烤片,烤片 2 h。脱蜡前放在 70℃烤箱里加热 30 min,行 HE 染色。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两个样本间比较方差齐性采用独立样本 *t* 检验,方差不齐则采用 Mann-Whitney *U* 秩和检验。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠创面愈合不同时间点的肉眼观察

空白对照组:造模后 6 h 创缘内翻、肿胀,创面湿润、色泽偏亮、颜色偏淡,创缘交界处存在出血点;造模后 3 d 创缘凸起明显,创面干燥、质硬,痂皮较薄;造模后 7 d 可见大片较厚痂皮,质硬,边缘不规则;造模后 14 d 创缘出现新生毛发,创面仍未愈合,存在痂皮。ANBP 组与空白对照组相比,造模后 6 h 创缘无明显水肿、出血,创面干燥;造模后 3 d 可见创缘规则平整,创面色泽红润,质软,创面面积缩小;造模后 7 d 创缘可见新生表皮,创面与创缘平齐,创面面积进一步缩小;造模后 14 d 原创面完全愈合,皮肤平整,质软,周边毛发生长良好(见图1)。与空白

对照组比较,ANBP组在造模后14 d的创面平均直径的差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

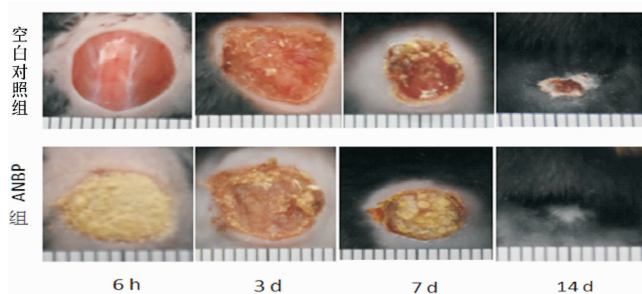


图1 复方ANBP对创面愈合影响的肉眼观察

表1 复方ANBP对小鼠创面直径的影响($\bar{x}\pm s$, cm)

时间	n	空白对照组	ANBP组	P值
6 h	6	0.917 $\pm$ 0.076	0.933 $\pm$ 0.153	0.874
3 d	6	0.817 $\pm$ 0.153	0.900 $\pm$ 0.100	0.473
7 d	6	0.683 $\pm$ 0.076	0.750 $\pm$ 0.050	0.275
14 d	6	0.300 $\pm$ 0.100	0.033 $\pm$ 0.058*	0.016

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$

3.2 复方ANBP对小鼠创面愈合率的影响

造模后3 d、7 d、14 d,与空白对照组相比,ANBP组小鼠创面面积缩小显著,差异具有统计学意义($P<0.05$)。具体见表2。

表2 复方ANBP对小鼠创面愈合率的影响($\bar{x}\pm s$, %)

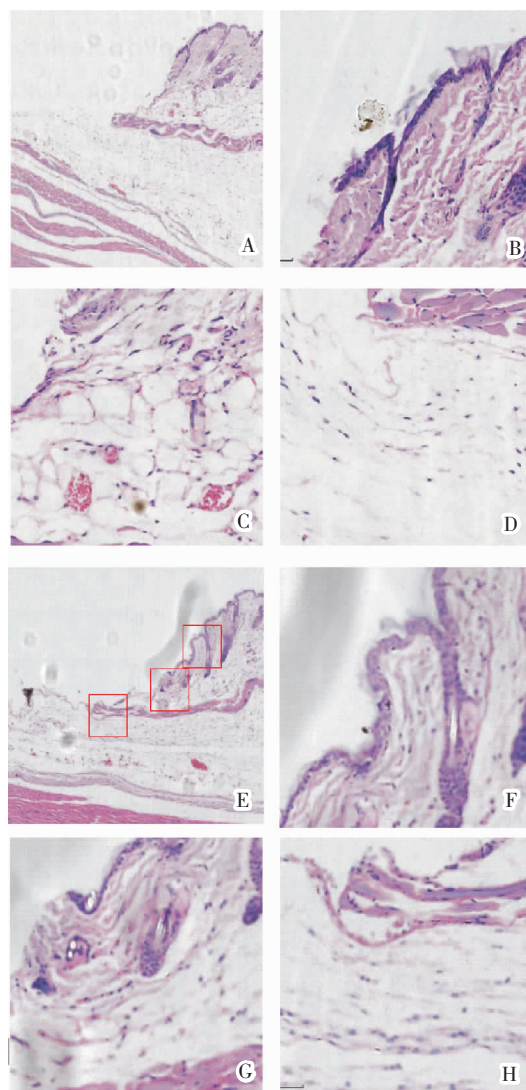
时间	n	空白对照组	ANBP组	P值
3 d	6	8.3 $\pm$ 1.1	17.4 $\pm$ 3.4*	0.012
7 d	6	35.5 $\pm$ 6.2	55.5 $\pm$ 7.9*	0.027
14 d	6	91.8 $\pm$ 2.8	100.0*	0.007

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$

3.3 小鼠背部创面不同时间点的组织病理学观察

造模后6 h:空白对照组创缘皮肤各层水肿变性坏死明显,深筋膜层结缔组织水肿疏松,厚薄不一,少量炎细胞浸润;创面深筋膜层层次紊乱不连续,未解离膨胀较薄,肌层肌细胞水肿变性坏死,肌纤维松解,肌膜内有明显充血;创缘表皮与深筋膜之间角度较大,见图2A-2D。与空白对照组相比,ANBP组创缘皮肤各层水肿变性坏死程度轻微,深筋膜层无明显水肿,厚薄均匀,炎细胞浸润明显;创面深筋膜层结构完整连续,解离膨胀较厚,层次增多,血管扩张明显;创缘的表皮与深筋膜之间角度明显变小,见图2E-2H。

造模后3 d:空白对照组创缘表皮层细胞数量增多,层次增厚,往创面增殖迁移,表皮舌厚薄不均,



注:A-D:空白对照组(A为 $\times 40$,B-D为 $\times 200$);E-H:ANBP组(E为 $\times 40$,F-H为 $\times 200$)

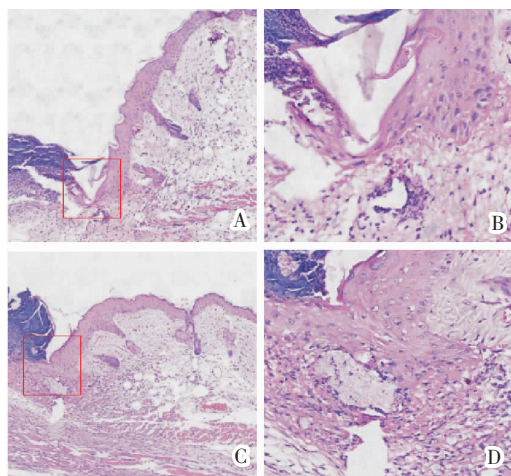
图2 造模后6 h小鼠背部创面组织病理观察光镜图

与创面垂直,创缘成纤维细胞和毛细血管少量增生,肉芽组织少,创缘痂块松散易碎;创面大量炎性细胞浸润,见图3A、3B。与空白对照组相比,ANBP组创缘表皮舌厚度均一,与创面相平,长度更长,创缘成纤维细胞和毛细血管增生明显,肉芽组织丰富,创缘痂块紧密;创面胶原纤维增生明显,见图3C、3D。

造模后7 d:空白对照组创缘表皮层细胞大量增殖,尚未成熟,层次不清,厚薄不均,表皮下有大量新生毛细血管,肉芽组织丰富,见图4A、4B;与空白对照组相比,ANBP组创缘表皮层细胞成熟,层次清晰,厚薄较均一,出现新生毛囊,表皮下出现成纤维细胞和胶原纤维,毛细血管较少,真皮层结构趋向成熟,见图4C、4D。

造模后14 d:空白对照组创面已经完全表皮化,部分新生的表皮层较厚,无毛囊、皮脂腺等附属

器,其下真皮成纤维细胞和胶原纤维致密,部分新生的表皮层较薄,其下真皮成纤维细胞和胶原纤维较致密,有大量未成熟的毛囊、皮脂腺等附属器,未见皮肤肌层结构,见图 5A-5D;与空白对照组相比,ANBP 组创面新生的表皮层较成熟,厚度均一,其下真皮成纤维细胞和胶原纤维减少,组织疏松,有毛囊、皮脂腺、竖毛肌等附属器,真皮层较成熟,可见皮下组织结构,浅筋膜层血管丰富,可见皮肤肌层结构,见图 5E-5G。

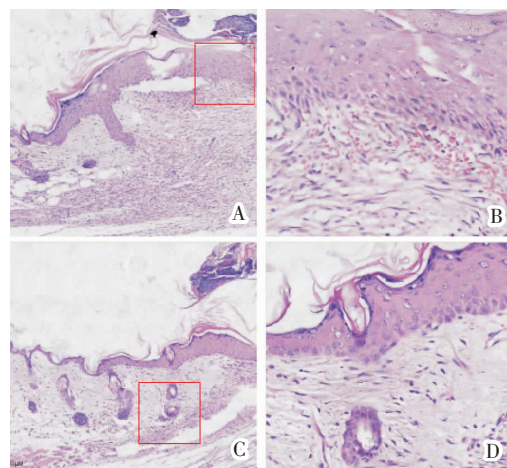


注:A-B:空白对照组(A为×40,B为×200);C-D:ANBP组(C为×40,D为×200)

图3 造模后3 d小鼠背部创面组织病理观察光镜图

4 讨论

创面修复的过程可以分为四个时期,即止血期、炎症反应期、增殖期、塑形期^[12-16]。复方 ANBP 是本课题组临床上治疗创伤愈合的经验药方。本实验肉

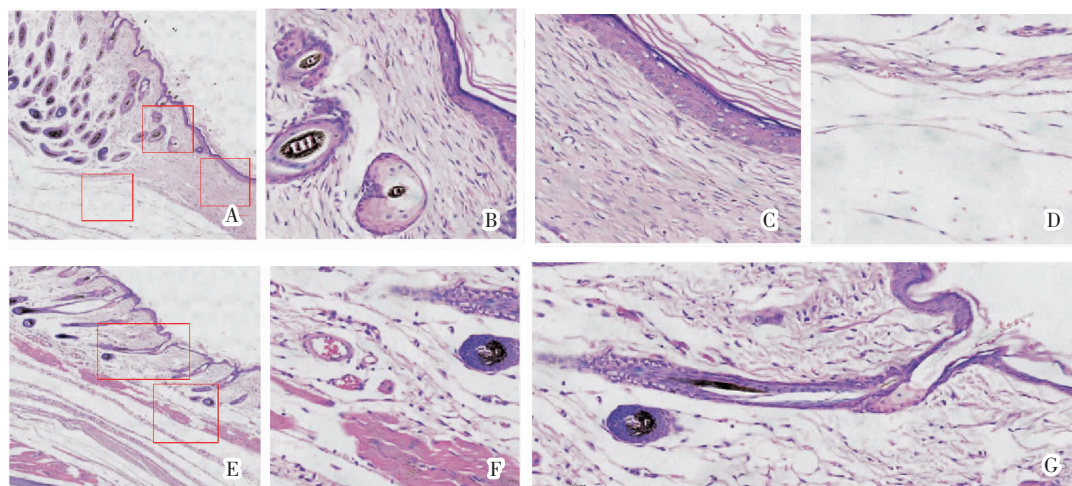


注:A-B:空白对照组(A为×40,B为×200);C-D:ANBP组(C为×40,D为×200)

图4 造模后7 d小鼠背部创面组织病理观察光镜图

眼观察显示,ANBP 组与空白对照组相比,造模后 6 h 减轻创缘水肿、出血,造模后 3 d 可见创缘规则平整,创面色泽红润,创面面积缩小,造模后 7 d 创缘可见新生表皮,创面与创缘平齐,创面面积进一步缩小,造模后 14 d 原创面完全愈合,皮肤平整,质软,周边毛发生长良好。ANBP 可以显著提高在造模后 3 d 至 14 d 的愈合率,以上结果提示:复方 ANBP 可以加快小鼠创面愈合速度。

在创伤早期及时处理,迅速止血止痛,可以减少组织损伤,从而避免机体产生过强的防御反应,在一定程度上减少炎症反应,有利于创伤快速愈合,及早完成一期愈合。本实验组织病理学结果显示,造模后 6 h,空白对照组创缘组织明显变性水肿坏死,而 ANBP 组创面干燥无明显出血水肿变性坏死,说明



注:A-D:空白对照组(A为×40,B、C、D为×200);E-G:ANBP组(E为×40,F、G为×200)

图5 造模后14 d小鼠背部创面组织病理观察光镜图

复方 ANBP 在创伤早期可以迅速止血,减轻组织损伤;造模后 3 d,空白对照组炎细胞浸润明显,而 ANBP 组出现丰富肉芽组织,表皮舌长度明显增加,说明造模后 3 d 空白对照组仍处于炎症反应期,ANBP 组已进入增殖期;造模后 7 d,空白对照组表皮下有大量新生毛细血管,肉芽组织丰富,而 ANBP 组创缘表皮层及真皮层结构比较成熟,层次清晰,出现新生毛囊,说明造模后 7 d 空白对照组仍处于增殖期,而 ANBP 组已进入塑形期;造模后 14 d,空白对照组新生的表皮层厚薄不均,无毛囊、皮脂腺等附属器,真皮成纤维细胞和胶原纤维致密,不成熟,而 ANBP 组创面新生的表皮层和真皮层较成熟,层次清晰,厚度均一,有毛囊、皮脂腺、竖毛肌等附属器。以上结果说明,复方 ANBP 可以提高创面愈合质量。

本实验通过建立小鼠背部全层皮肤缺损模型,观察创面愈合情况,运用复方 ANBP 达到减轻创伤早期损伤和炎症反应,加快肉芽组织增生和再表皮化速度,加速创伤愈合的进程,提高创伤愈合质量。复方 ANBP 对小鼠皮肤创面愈合的治疗机制有待进一步验证。

参考文献

- [1] Havelaar A H, Kirk M D, Torgerson P R, et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010 [J]. *PLoS Medicine*, 2015, 12(12):e1001923.
- [2] 詹小舒,罗冬章,王丙云,等.犬脐带间充质干细胞来源外泌体修复皮肤创伤[J].*中国组织工程研究*,2018,22(25):4021-4027.
- [3] 徐 森.小儿皮肤创伤粘合剂的临床应用和护理研究[J].*皮肤病与性病*,2018,40(4):588-589.
- [4] 王婕然,姜晓文,于文会,等.中药外用治疗皮肤创伤修复研究进展[J].*动物医学进展*,2018,39(8):97-101.
- [5] 蒋 桃,卫朝辉,蒲 辉,等.干细胞分泌因子对皮肤创伤犬的治疗作用[J].*动物医学进展*,2018,39(6):132-136.
- [6] 黄 建,黄功华,刘新光.免疫炎症在皮肤创伤中的作用及研究进展[J].*现代免疫学*,2018,38(2):158-161.
- [7] 周思政,李青峰.皮肤创伤愈合和增生性瘢痕动物模型的研究进展[J].*组织工程与重建外科杂志*,2018,14(1):48-52.
- [8] 赵贵芳.脐带间充质干细胞及其来源外泌体修复皮肤损伤的机制研究[D].吉林大学,2016.
- [9] HOU Q, HE W J, HAO H J, et al. The four-herb chinese medicine anbp enhances wound healing and inhibits scar formation via bidirectional regulation of transformation growth factor pathway[J]. *PLoS ONE*, 2014,9(12): e112274.
- [10] HOU Q, HE W J, CHEN L, et al. Effects of the Four Herb Compounds ANBP on Wound Healing Promotion in Diabetic Mice[J]. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2015,14(4):335-342.
- [11] 曹大勇,牛希华,夏成德,等.小鼠糖尿病全层皮肤缺损模型的建立[J].*中华损伤与修复杂志(电子版)*,2015,10(6):490-494.
- [12] 裴 卓,周 聪,张一鸣,等.毛囊干细胞在皮肤创伤修复中的促进作用[J].*中华细胞与干细胞杂志(电子版)*,2017,7(6):364-368.
- [13] 詹小舒,罗冬章,王丙云,等.犬脐带间充质干细胞来源外泌体修复皮肤创伤[J].*中国组织工程研究*,2018,22(25):4021-4027.
- [14] 刘梦栋,杨薛康,韩 夫,等.膝部严重烧伤患者皮肤软组织缺损创面修复及功能重建系统康复治疗策略[J].*中华烧伤杂志*,2018,34(5):266-270.
- [15] 刘 娜.精细化护理对皮肤创伤修复术后感染的预防作用分析[J].*养生保健指南*,2018(3):126.
- [16] 沈传新,王光华,侯自明.股前外侧穿支皮瓣移植在四肢严重创伤后皮肤缺损修复中的应用[J].*中国医疗美容*,2018,8(3):25-27.

(本文编辑 苏 维)