

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.03.016

补中益气汤对脾气虚证模型大鼠手术切口肌肉组织炎症反应和肉芽组织增生的影响

樊慧杰¹, 柴智¹, 闫润红¹, 李艳彦^{1,2}, 周然^{PK}

(1. 山西中医学院基础医学院, 山西省太原市晋祠路一段 89 号, 030024; 2. 山西中医学院第二中医院)

基金项目: 山西中医学院基础与临床研究计划项目 (2011JC02)

摘要 目的 观察补中益气汤对脾气虚证大鼠手术切口愈合的影响。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、脾气虚模型组、补中益气汤组, 每组 20 只。除正常组外其余各组采用苦寒泻下法制备脾气虚动物模型, 各组造模第 19 d 于背部做长约 4 cm 并平行脊柱的切口, 补中益气汤组手术当天大鼠每日灌服 7 g/kg 的补中益气汤水煎剂; 脾气虚模型组和正常组大鼠每日给予等体积蒸馏水灌胃。各组分别于术后 3 d、7 d 各处死 10 只大鼠, 取距手术切口两侧肌肉组织行 HE 染色, 光镜下观察手术切口处炎症反应和肉芽组织增生情况, 高倍镜下对切口肌肉组织成纤维细胞进行计数。结果 补中益气汤组术后 7 d 切口处可见新生肉芽组织, 其间有大量新生血管, 并有巨噬细胞、淋巴细胞浸润。与正常组术后 3 d、7 d 比较, 脾气虚模型组成纤维细胞数量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组术后 3 d、7 d 比较, 补中益气汤组术后同时时间点的成纤维细胞数量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 补中益气汤通过改善手术切口局部肌肉组织炎症反应和肉芽组织增生情况, 可促进切口愈合。

关键词 补中益气汤; 脾气虚; 创面愈合; 成纤维细胞

术后切口愈合不良是临床上常见的手术并发症之一, 而促进手术切口愈合一直是学术界和患者都共同关注的热点问题。伤口愈合是一个错综复杂和严格控制的过程, 包括炎症、增殖、再塑三个阶段。在这相互交错的三个阶段中, 炎症反应和肉芽组织生长都是体现伤口愈合程度的重要内容^[1]。肉芽组织由新生的血管和增生的成纤维细胞构成, 并伴有炎性细胞的浸润。我们根据中医学“脾主肌肉”理论解读伤口愈合, 选用经典补脾方剂补中益气汤干预伤口愈合, 观察手术切口处肌肉组织炎症反应和肉芽组织增生的变化, 旨在探讨补中益气汤对切口愈合的影响及可能作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 (210 ± 10) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2009-0004。雌雄分笼饲养, 室温 (22 ± 2) °C, 湿度 45%~55%, 自然昼夜节律照明, 自由摄取水食。

1.2 药物

补中益气汤组成: 黄芪 18 g, 炙甘草 9 g, 人参 6 g, 当归 3 g, 陈皮 6 g, 升麻 6 g, 北柴胡 6 g, 白术 9 g, 中药均由山西中医学院第二中医院提供, 常规煎煮, 提取加工成水煎剂, 浓度为 1 g/ml, 4°C 保存备用。大黄煎剂: 由山西中医学院第二中医院制备, 浓度为 1 g/ml。

1.3 试剂与仪器

硫化钠, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 38026796; 戊巴比妥钠, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 69020194。

BS224S 型万分之一电子天平 (德国赛多利斯集团), BMJ-1 生物组织包埋机 (天津天利航空机电有限公司), KQ-300VDE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), W-201B 型数显恒温水浴锅 (上海申胜生物技术有限公司), RM-2015 石蜡切片机 (德国莱卡公司), IX51 光学显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

1.4 模型建立

采用苦寒泻下法制备脾气虚动物模型^[2]: 每日给大鼠灌服大黄煎剂 20 g/kg, 连续灌胃 18 d。

* 通讯作者: zhour58@sohu.com, (0351) 2272390

灌服大黄后大鼠逐渐出现大便质软或稀溏、食量减少、蜷缩、易惊、毛污黄无光泽、行动缓慢、嗜睡、精神萎靡、明显消瘦、久泻不止甚至有脱肛现象，符合脾气虚证，说明造模成功。

1.5 动物分组和处理

大鼠适应性饲养 1 周后，采用随机数字表法分为正常组、脾气虚模型组、补中益气汤组，每组 20 只，各组又分为术后 3 d、7 d 两个时间点。①补中益气汤组建立脾气虚动物模型，第 18 天大鼠背部剪毛后再以 10% 硫化钠脱毛，第 19 天用 45 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射（术前禁食 12 h），待大鼠麻醉后常规消毒，于背部一侧距离脊柱 1 cm 处做长约 4 cm 并平行脊柱的切口，逐层切开皮肤、肌肉，缝合切口，无菌纱布包扎，每日更换 1 次无菌纱布，直到大鼠处死之日。手术当天起，大鼠每日灌服 7 g/kg 的补中益气汤水煎剂（相当于 60 kg 成人体重用量的 7 倍），每天 2 次，连续给药至大鼠处死之日。②脾气虚模型组大鼠复制脾气虚模型后在同时间点相同部位制作相同大小的手术切口。于手术当天起，每日给予大鼠等体积蒸馏水灌胃，灌胃时间相同。③正常组大鼠同时间点制作相同大小手术切口，实验期间给予等体积蒸馏水。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 切口肌肉组织炎症反应和肉芽组织增生的观察 分别于术后 3 d、7 d 末次灌胃 6 h 后用戊巴比妥钠麻醉，各时间点处死 10 只大鼠，在相同部位取距手术切口两侧各 0.3 cm × 1.0 cm 肌肉组织样本，10% 甲醛溶液固定，石蜡包埋后切片，常规 HE 染色，光镜下观察手术切口处炎症反应和肉芽组织增生情况。

1.6.2 切口肌肉组织成纤维细胞的计数 高倍镜下（×400）对肉芽组织的主要成分之一成纤维细胞进行观察并计数，镜下选取 5 个非重叠视野，将 5 个视野的计数取平均值作为各组织样本的观察值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，计量数据用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 各组大鼠切口肌肉组织炎症反应和肉芽组织增生情况

正常组术后 3 d 切口处可见大量炎性细胞浸

润，以中性粒细胞为主，巨噬细胞、淋巴细胞少量散在分布，术后 7 d 切口处可见含有大量新生血管的新生肉芽组织出现，有巨噬细胞、淋巴细胞浸润；脾气虚模型组术后 3 d 切口处可见大量的中性粒细胞浸润，术后 7 d 切口处可见新生肉芽组织，新生血管散在分布，有巨噬细胞、淋巴细胞浸润，并有中性粒细胞散在分布；补中益气汤组术后 3 d 切口处可见大量炎性细胞浸润，以中性粒细胞为主，巨噬细胞、淋巴细胞偶见散在分布，术后 7 d 切口处可见新生肉芽组织，其间有大量新生血管，并有巨噬细胞、淋巴细胞浸润。

2.2 各组大鼠切口肌肉组织成纤维细胞计数比较

表 1 示，与正常组术后 3 d 比较，脾气虚模型组和补中益气汤组术后 3 d 的大鼠切口肌肉组织成纤维细胞数量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常组术后 7 d 比较，脾气虚模型组术后 7 d 的成纤维细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)，而补中益气汤组术后 7 d 的成纤维细胞数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组术后 3 d、7 d 比较，补中益气汤组术后同时时间点的成纤维细胞数量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠切口肌肉组织成纤维细胞计数比较 (个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	成纤维细胞计数
正常组	术后 3 d	10	19.74 ± 3.31
	术后 7 d	10	60.84 ± 9.95
脾气虚模型组	术后 3 d	10	11.46 ± 2.74**
	术后 7 d	10	40.52 ± 16.14**
补中益气汤组	术后 3 d	10	15.62 ± 3.81*▲▲
	术后 7 d	10	56.70 ± 15.38▲

注：与正常组同时时间点比较：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组同时时间点比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$

3 讨论

中医学认为，“脾为后天之本，气血生化之源”。脾气虚是一种较常见的中医临床证型，是由于脾不能正常运化水谷精微，则临床上表现为营养不良、体质虚弱、抵抗疾病能力差等症状。应用基因芯片技术研究人胃黏膜组织发现，与健康者相比慢性胃炎脾气虚证患者具有特征性的基因差异表达图谱，主要表现为与营养物质代谢及免疫调节相关基因呈下调趋势^[9]。补中益气汤是扶正固本的经典方剂，方中重用黄芪，补中益气，升阳固表，为君药；配伍人参、炙甘草、白术补气健脾为臣药，以增补中益气之功效；当归养血合营，协人参、黄

芪以补气养血; 陈皮理气和胃, 使诸药补而不滞, 共为佐药; 并以少量升麻、北柴胡升阳举陷。实验证实补中益气汤能显著改善脾气虚证^[4]。有研究报道, 补中益气汤能够明显提高创伤后大鼠 CD_4^+ T 细胞数量, 提高 CD_4^+ T/ CD_8^+ T 比值, 说明补中益气汤对创伤大鼠的免疫紊乱有纠正作用, 能够加快大鼠免疫功能的恢复^[5]。也有研究认为, 补中益气汤通过提高巨噬细胞吞噬指数、T 细胞增殖能力和自然杀伤细胞活性等指标, 能增强机体免疫功能^[6]。

炎症是机体受到刺激时所表现的一系列防御性应答, 是非特异性免疫的综合作用结果, 所以炎症既是一种病理过程, 又是一种积极的免疫防御反应。正常适中的炎症反应对切口愈合是必要的, 而紊乱的炎症可抑制伤口愈合。切口愈合期间炎性巨噬细胞出现浸润, 通过释放细胞因子, 启动伤口修复。有研究发现急性损伤肌肉中巨噬细胞产生高水平的胰岛素样生长因子-1, 能促进损伤肌肉的修复愈合^[7]。但是如果炎症反应出现紊乱或失调, 则可抑制伤口愈合。有研究报道, 肿瘤细胞坏死因子 α 是影响伤口愈合的重要介质, 其峰值出现滞后可导致伤口愈合延迟^[8]。炎性细胞、新生血管和成纤维细胞共同构成肉芽组织。成纤维细胞在伤口收缩、基质合成、伤口修复、瘢痕形成及无瘢痕愈合方面均起重要作用^[9]。

本研究结果显示, 脾气虚模型组大鼠与正常组大鼠相比较, 手术切口处炎症反应失调, 新生肉芽组织中的血管密度低, 中性粒细胞散在分布, 并且成纤维细胞数量显著降低; 经补中益气汤干预后大鼠手术切口处炎症反应程度和正常组大鼠一致, 新生肉芽组织中的血管密度高, 并且与脾气虚模型组术后 3 d、7 d 比较, 补中益气汤组术后同时时间点的成纤维细胞数量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),

术后 7 d 成纤维细胞数量与正常组大鼠相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明脾气虚可使伤口炎症反应失调、肉芽组织增生缓慢, 对伤口愈合产生负面影响, 其为“脾主肌肉”理论提供了实验依据; 而补中益气汤能对抗此作用进而可促进伤口愈合, 再次说明了“脾主肌肉”, 且为临床上防治手术切口的延迟愈合提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] 范琰琰, 叶光华, 林刻智, 等. $\alpha 7nAChR$ 的激活通过抑制 TNF- α 表达促进糖尿病小鼠伤口愈合 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(6): 1053-1058.
- [2] 樊慧杰, 柴智, 闫润红, 等. 补中益气汤对脾气虚症大鼠伤口肌肉组织 Hyp、VEGF 和 α -SMA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 184-187.
- [3] 陈蔚文, 王颖芳, 劳绍贤, 等. 脾气虚证患者基因差异表达研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(1): 148-152.
- [4] 刘群英. 补中益气汤治疗脾虚证作用机制研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(7): 799-801.
- [5] 荀世宁, 张玉勤, 郭颖强. 补中益气汤对创伤大鼠免疫系统 T 细胞亚群的影响 [J]. 医学理论与实践, 2013, 26(2): 141-144.
- [6] 桂曼曼, 张李峰, 李雪嫣, 等. 比较含黄芪和含红芪的补中益气汤对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中医杂志, 2012, 53(2): 145-147.
- [7] Lu H, Huang D, Saederup N, et al. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury [J]. FASEB J, 2011, 25(1): 358-369.
- [8] Jung Y, Son D, Kwon S, et al. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors [J]. Int Wound J, 2013, 10(3): 295-305.
- [9] 王益民, 韦福康, 刘敏, 等. 成纤维细胞与创伤修复的研究进展 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(2): 126-128.

Effects of Buzhong Yiqi Decoction on Inflammation and Granulation Tissue Proliferation of Incision in Rats With Spleen Qi Deficiency Pattern

FAN Huijie¹, CHAI Zhi¹, YAN Runhong¹, LI Yanyan^{1,2}, ZHOU Ran¹

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Province 030024; 2. The Second TCM Hospital, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Buzhong Yiqi Decoction (Center-Supplementing Qi-Boosting Decoction, 补中益气汤) on incision healing in rats with spleen qi deficiency pattern. **Methods** Sixty SD rats were randomized into the normal group, model group and Buzhong Yiqi Decoction group, with 20 in each. The rat models of spleen qi deficiency pattern were established in the model group and Buzhong Yiqi Decoction group. A 4 cm

incision paralleled to the spine was made on the back of rats in the each of groups on the 19th day of modeling. The Buzhong Yiqi Decoction group was gavaged with 7g/kg of Buzhong Yiqi Decoction daily after operation. The normal group and model group were gavaged with an equal volume of distilled water. Ten rats were sacrificed respectively on the 3rd day and 7th day after operation in each group. The muscle tissue on both sides of surgical incision was sampled and dyed with routine HE staining. The inflammation and granulation tissue formation was observed. The fibroblast cells were counted. **Results** The new granulation tissue with new blood vessels, macrophages and lymphocytes could be seen in the Buzhong Yiqi Decoction group 7 days after operation. Comparing with the normal group, the number of fibroblasts was significantly decreased in the model group 3 days and 7 days after operation ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the number of fibroblasts was significantly increased in the Buzhong Yiqi Decoction group 3 days and 7 days after operation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Buzhong Yiqi Decoction can promote incision healing by relieving inflammation and granulation tissue formation of muscle tissue.

Keywords Buzhong Yiqi Decoction; spleen qi deficiency; incision healing; fibroblasts

(收稿日期: 2013-09-13; 修回日期: 2013-11-15)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购下列图书

《**一选方治验实录**》 在浩瀚的中医典籍中,有方名的古方数以十万计。为了汰芜存菁,借鉴古今医家的经验,为现代临床服务,作者在长期从事中医方药文献研究和临床诊疗工作的基础上,在完成“中医古方筛选方案和利用研究”课题研究的基础上,经过深入发掘,编纂完成《一选方治验实录》(上下册)。本书以有验案资证作为筛选古方的重要条件,结合古方其他价值特征,从近 10 万首方剂中,筛选出 583 首古方及其相关验案 5500 余则。这些优选出的古方,既不乏传世名方,也有相当一部分以往未被方剂学教材或方剂选本收录过的“新面孔”。从 10 万首方中最终优选出 500 余首方,其比例约为 200 选 1;又鉴于治验记录是本书的主要内容,故名为《一选方治验实录》。全书分上、下两册,上册收录汉唐方(张仲景方、晋唐方),下册收录宋元明清方(宋元方、明清方),编次以方为纲,医案为目,每一方剂又分方源记载和治验实录(分为中医病症医案、西医病症医案)两部分。书末附有方名索引、中医病症索引、西医病症索引和引用书目,方便读者检索。本书汇集古今文献,资料丰富,拥有本书,就如同跟随古今名医侍诊,通过品读古方所附的具体病例,领悟出该方的适应证和用法秘诀,可大大提高中医治疗的疗效。本书是中医各科临床医生提高临床疗效必备的案头书,又可为各中药生产厂家研发新药提供借鉴。《一选方治验实录》(上下册),为 16 开精装本,1584 页,已由人民卫生出版社于 2011 年 1 月出版,全套 207 元。

《**李时珍医学全书**》 包括《本草纲目》《濒湖脉学》《奇经八脉考》和《脉诀考证》4 种。现集成一册点校,用简体字横排方式出版。每册 192.00 元。

《**黄元御医学全书**》 清代黄元御撰,包括《素问悬解》《灵枢悬解》《难经悬解》《伤寒悬解》《金匱悬解》《伤寒说意》《四圣悬枢》《素灵微蕴》《长沙药解》《玉楸药解》11 种医著,均系《四库全书总目提要》所著录者。以上 11 种黄氏医籍均予全书点校,简体横排印刷。每册 103.00 元。

《**中医百年百名中医临床家丛书**》 收录了过去 100 年中为中医药事业做出过巨大贡献、在中医临床方面取得卓越成就、在全国享有崇高威望且具有较高学术造诣的中医临床大家。以每位医家独立成册,每册按医家小传、专病论治、诊余漫话、年谱四部分编写。本书不仅具有较高的临床参考价值和学术价值,同时还具有前所未有的文献价值。现出版的医家有:余无言、耿鉴庭、马光亚、赵心波、何炎燊、刘云鹏、单健民、张珍玉、李克绍、胡天雄、夏桂成、施今墨、董建华、于己百、李翰卿、郭士魁、叶心清、胡希恕、丁光迪、潘澄濂、颜德馨、徐志华、孟澍江、宋祚民、李斯炽。每套 340.00 元(免收邮资)。

邮购汇款地址:北京市东直门南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店;邮政编码:100700;联系电话:(010) 64013162, (010) 64014411 转 3053。请在汇款附言中注明所购书名,免邮费。欢迎邮购。