

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.03.017

回阳生肌膏拆方对慢性皮肤溃疡模型小鼠
疮面愈合及疮面巨噬细胞表型转化的影响

蒙玉娇, 何秀娟, 林燕, 薛妍, 李萍*

(首都医科大学附属北京中医医院/北京市中医研究所, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010)

摘要 目的 探讨回阳生肌膏对慢性皮肤溃疡的影响及可能作用机制。方法 150 只 BALB/c 小鼠分为空白组、模型组、西药组、益气温阳组、活血通络组, 每组 30 只。采用免疫抑制联合皮肤伤口的方法制备小鼠慢性皮肤溃疡模型。益气温阳组和活血通络组分别给予益气温阳方和活血通络方各 0.018 g, 西药组给予重组人碱性成纤维细胞生长因子 0.3 g, 均制成含药明胶海绵、无菌贴贴敷, 隔天换药, 进行疮面拍照。测定疮面面积并计算愈合率; 创伤第 3、7、14 天取疮面组织, HE、Masson 和天狼星红染色观察疮面新生肉芽组织及胶原分布等; 免疫组织化学法检测疮面组织巨噬细胞数量; 使用实时定量 PCR 检测疮面局部 M1、M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子基因表达。结果 损伤第 7、14 天, 与模型组比较, 西药组、益气温阳组、活血通络组疮面面积减小, 愈合率升高 ($P < 0.05$), 且活血通络组愈合率高于益气温阳组 ($P < 0.05$)。损伤第 3 天, 空白组、西药组、益气温阳组白细胞介素 6 (IL-6) 水平低于模型组, 血管内皮生长因子 (VEGF)、白细胞介素 10 (IL-10) 水平高于模型组, 活血通络组 VEGF、IL-10 水平高于模型组, 且活血通络组 VEGF 水平高于益气温阳组 ($P < 0.05$)。损伤第 7 天, 空白组、西药组、益气温阳组、活血通络组皮肤 M1 型巨噬细胞数量、TNF- α 水平明显低于模型组, M2 型巨噬细胞数量、VEGF、IL-10 水平高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且活血通络组 VEGF、IL-10 水平高于益气温阳组 ($P < 0.05$)。结论 活血通络方与益气温阳方均可促进小鼠皮肤慢性疮面愈合, 其机制可能是通过促进巨噬细胞表型转化, 促使疮面修复由炎症期过渡到增殖期, 并且活血通络方对巨噬细胞表型转化作用优于益气温阳方。

关键词 皮肤溃疡; 疮面愈合; 回阳生肌膏; 益气温阳; 活血通络; 巨噬细胞

慢性皮肤溃疡是创伤、放射损伤、痈疽破溃、下肢动脉供血不足、下肢静脉曲张等疾病常见的并发症, 因长期不愈, 易形成顽固性、难愈性溃疡, 严重影响着患者的生活质量, 是临床治疗的一大难题^[1]。研究表明, 在参与慢性疮面修复的众多细胞中, 巨噬细胞起到了总指挥的作用^[2]。巨噬细胞在疮面修复的不同阶段呈现不同的表型和功能, 其中巨噬细胞由炎性 (M1 型) 到修复性 (M2 型) 表型的过渡被认为是疮面愈合程序从炎症转为修复所必须的^[3], 表型转化异常可导致疮面炎症反应的持续存在, 使疮面愈合迟缓^[4]。回阳生肌膏是北京中医医院赵炳南、王玉章等名老中医创立的院

内制剂, 用于治疗慢性皮肤溃疡, 可有效缓解患者整体症状、促进疮面愈合, 临床疗效显著^[5], 但其作用机制尚不明确。本实验利用免疫抑制联合皮肤伤口的方法制备慢性皮肤溃疡小鼠模型^[6], 观察回阳生肌膏拆方对巨噬细胞由炎性 (M1 型) 转化为促修复表型 (M2 型) 的干预作用, 探究回阳生肌膏的可能作用机制和药物靶点, 为其临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 150 只, 雄性, 鼠龄 6~8 周, 体重 18~22 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-001。

基金项目: 国家自然科学基金 (81273768、81403409、81403270); 银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室 (BZ0375)

* 通讯作者: liping411@126.com, (010) 52176679

1.2 药物、试剂与仪器

回阳生肌膏拆方为益气温阳方(人参、鹿茸、肉桂、白芥子、艾叶、黄芪、炮姜按原方 4:2:2:1:1:1:1 配比)、活血通络方(松香、血竭、川芎、当归按原方 1:1:1:1 配比)^[4], 饮片由首都医科大学附属北京市中医医院中药房提供, 中医研究所中药室通过乙醇、水进行闪提, 提取液经低温减压浓缩后冷冻干燥, 得到提取物粉末。将提取物粉末用生理盐水溶解(可适当加入 DMSO 溶解, 浓度 <1%), 过滤为无菌液体, 制备含药物明胶海绵(生药量为 0.018 g/cm²); 明胶海绵(南京金陵制药厂, 批号: 20130049); 一次性无菌敷料贴(山东东华医疗科技有限公司, 批号: 20130187)。氢化可的松注射液(天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 20150043); 重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, PeproTech 公司, 批号: PT6358), 无菌条件下, 溶于生理盐水, 终浓度 3.6 μg/ml, 制成含药明胶海绵 100 μl/只; HE 染色液(批号: ZLI-9610)、天狼猩红染液(批号: EMS26357-02), 北京中杉金桥公司; Masson 染色试剂盒(南京建成公司, 批号: D026); 兔多克隆抗 iNOS 抗体(批号: ab15323)、兔单克隆抗 CD206 一抗(批号: ab64693), 美国 Abcam 公司; 山羊抗兔 IgG 二抗(北京冠星宇科技有限公司, 批号: S8502); 正常山羊血清(美国 Jackson 公司, 批号: 119838); 超纯 RNA 提取试剂盒(批号: Cat#CW0581)、高效逆转录酶 VcDNA 第一链合成试剂盒(批号: Cat # CW0744), CWbio. Co. Ltd. ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司); Forma-86C ULT 超低温冰箱(美国 Thermo 公司); EG1140C 包埋机、RM2135 石蜡切片机(德国 Leica 公司); LSM700 激光共聚焦显微镜、Axio Imager A2 正置显微镜(德国 Zeiss 公司); EOSM3 数码相机(日本佳能公司)。

1.3 动物分组、模型制备及给药

150 只 BALB/c 小鼠按照每组体重相近、健康状况相似原则分为空白组、模型组、西药组、益气温阳组、活血通络组, 每组 30 只。除空白组外其余各组采用免疫抑制联合皮肤伤口的方法制备慢性皮肤溃疡小鼠模型^[5], 于造模前连续 7 天肌肉注射氢化可的松 0.2 ml; 空白组小鼠肌肉注射等体积生理盐水。实验时给予戊巴比妥钠 60 mg/kg 腹腔麻醉, 背部去毛, 消毒, 用特制打孔器在鼠背打一圆孔, 切取直径 11mm、面积为 94.99 mm² 的皮肤,

深至皮下。造模后单笼饲养, 在 SPF 级动物室无菌饲料喂养, 西药组给予 bFGF, 各给药组将含药的明胶海绵外敷于伤口, 以一次性无菌敷料贴包扎, 隔天换药 1 次并拍照。皮肤损伤后, 空白组小鼠隔天肌肉注射 0.25mg 生理盐水, 其余组小鼠隔天肌肉注射相同剂量氢化可的松。

1.4 检测指标与方法

于小鼠皮肤疮面形成后第 3、7、14 天, 每组采用随机数字法选择 10 只小鼠, 处死后取伤口组织, 一部分 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片; 一部分立即放入液氮, 待检。

1.4.1 皮肤疮面面积及愈合率 数码相机拍照后采用图像软件 IPP6.0 分析疮面面积, 计算愈合率。愈合率 = (原始疮面面积 - 取材时伤口面积) / 原始伤口面积 × 100%。

1.4.2 皮肤疮面组织学观察 10% 福尔马林固定 48h, 常规脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋、切片。经 HE 染色、Masson 染色和天狼猩红染色, 观察疮面皮肤表皮细胞、肉芽组织、胶原和血管新生情况。

1.4.3 伤口组织中 M1 型、M2 型巨噬细胞数量检测 组织石蜡切片, 使用大鼠单克隆抗 iNOS 一抗(1:80 稀释), 兔单克隆抗 CD206 一抗(1:1000 稀释), 山羊抗兔 IgG 二抗(1:500 稀释), 山羊抗大鼠 IgG 二抗(1:500 稀释)。采用免疫荧光法检测小鼠 7 天伤口组织中 M2 型巨噬细胞表达情况。用含 DAPI 的封片剂封片, 使用激光共聚焦显微镜在 400 倍视野下拍照, 并采用 IPP 6.0 分析图像, 用 IOD 值代表巨噬细胞表达情况。

1.4.4 伤口组织中 M1 型 白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 12 (IL-12)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、M2 型 血管内皮生长因子 (VEGF)、白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子 β (TGF-β) 巨噬细胞分泌的细胞因子检测 取小鼠疮面组织, 用超纯 RNA 提取试剂盒提取组织样本中总 RNA, 采用 HiFi-MML VcDNA 第一链合成试剂盒进行反转录成 cDNA, 取 5 μl cDNA 进行 PCR 扩增, 以 ACTIN 为内参照。扩增程序为: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 45 个循环。扩增产物取 5 μl 行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 选取样本 cDNA 进行 5 倍梯度稀释, 稀释后样品各取 2 μl 作模板, 分别用目的基因引物和内参照基因引物进行扩增, 同时在 60~95℃ 进行融解曲线分析, 结果显示各标准曲线的 R² 均达到 0.99, 说明线性相关度很高, 且扩增效率均在 90% 以上。IL-6: 上游引物: 5'-TCCTAC-

CCCAATTTCCAATGCTCT-3', 下游引物: 5'-ACCA-CAGTGAGGAATGTCCACAA-3', 产物大小 189bp; IL-12: 上游引物: 5'-TCAACGCAGCACTTCAGAAT-CACAA-3', 下游引物: 5'-GAAGGCGTGAAGCAG-GATGCAGAGC-3', 产物大小 185bp; TNF- α : 上游引物: 5'-CTCTGTGAAGGGAATGGGTG-3', 下游引物: 5'-GGGCTCTGAGGAGTAGACGATAAAAG-3', 产物大小 94bp; VEGF: 上游引物: 5'-TGTGCAG-GCTGCTGTAACGATGA-3', 下游引物: 5'-GTGCT-GGCTTTGGTGAGGTTTGAT-3', 产物大小 212bp; IL-10: 上游引物: 5'-CTGGACAACATACTGCTAAC-CGACTC-3', 下游引物: 5'-AACTGGATCATTTTC-CGATAAGGC-3', 产物大小 86bp; TGF- β : 上游引物: 5'-GCCCTGGATACCAACTATTGCTTCA-3', 下游引物: 5'-CAGAAGTTGGCATGGT-3', 产物大小 131bp; ACTIN: 上游引物: 5'-GCCTTCCTTCTT-GGGTA-3' T, 下游引物: 5'-GGCATAGAGGTCTT-TACGG-3', 产物大小 97bp。PCR 采用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 实验数据用均数 $\pm$ 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), 两两比较采用 Turkey 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠疮面面积及愈合率比较

表 1 示, 皮肤损伤第 3 天时, 各组疮面面积比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。损伤第 7、14 天时, 模型组疮面面积较空白组明显增大 ($P < 0.05$), 符合慢性皮肤溃疡疮面愈合迟缓的表现。损伤第 7、14 天时, 与模型组比较, 西药组、益气温阳组、活血通络组疮面面积均明显减小, 愈合率升高 ($P < 0.05$), 且损伤第 7 天活血通络组愈合率高于益气温阳组、疮面面积小于益气温阳组 ($P < 0.05$)。损伤第 7 天, 各组疮面面积均明显小于本组第 3 天, 损伤第 14 天各组疮面面积均明显小于本组第 7 天 ($P < 0.05$)。损伤第 14 天时益气温阳组、活血通络组愈合率均明显小于西药组。

2.2 各组小鼠皮肤疮面组织学情况

HE 染色显示: 损伤后第 3 天, 模型组疮面炎性细胞稀疏, 无新生表皮, 空白组、西药组、益气温阳组和活血通络组疮面边缘表皮细胞增生, 表皮增厚, 炎性细胞浸润明显; 第 7 天, 模型组成纤维

表 1 各组小鼠疮面面积及愈合率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	疮面面积 (mm ²)	愈合率 (%)
空白组	损伤第 3 天	10	83.65 $\pm$ 4.32	13.17 $\pm$ 1.85
	损伤第 7 天	10	49.98 $\pm$ 3.86 [*] #	47.73 $\pm$ 5.55 [*]
	损伤第 14 天	10	32.66 $\pm$ 9.20 [*] #	64.02 $\pm$ 5.47 [*]
模型组	损伤第 3 天	10	87.86 $\pm$ 6.7	11.84 $\pm$ 0.37
	损伤第 7 天	10	76.37 $\pm$ 5.74 [#]	25.93 $\pm$ 3.28
	损伤第 14 天	10	60.87 $\pm$ 8.74 [#]	41.05 $\pm$ 6.91
西药组	损伤第 3 天	10	85.43 $\pm$ 9.53	14.53 $\pm$ 8.87
	损伤第 7 天	10	52.44 $\pm$ 3.96 [*] #	48.45 $\pm$ 4.02 [*]
	损伤第 14 天	10	38.22 $\pm$ 7.63 [*] #	64.69 $\pm$ 9.88 [*]
益气温阳组	损伤第 3 天	10	86.76 $\pm$ 7.66	11.41 $\pm$ 4.48
	损伤第 7 天	10	69.96 $\pm$ 8.52 [*] #	40.68 $\pm$ 8.53 [*]
	损伤第 14 天	10	50.53 $\pm$ 8.36 [*] #	55.34 $\pm$ 9.65 [*] Δ
活血通络组	损伤第 3 天	10	86.99 $\pm$ 9.58	11.96 $\pm$ 4.13
	损伤第 7 天	10	60.55 $\pm$ 7.99 [*] Δ #	43.98 $\pm$ 11.56 [*] Δ
	损伤第 14 天	10	46.32 $\pm$ 8.27 [*] #	59.99 $\pm$ 9.74 [*] Δ

注: 与模型组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与西药组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$; 与益气温阳组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组前一时间点比较, # $P < 0.05$

细胞稀疏, 空白组、西药组、益气温阳组和活血通络组新生致密肉芽组织, 有大量成纤维细胞和新生毛细血管; 第 14 天, 模型组肉芽组织稀疏, 空白组、西药组成纤维细胞变为长梭形, 血管丰富, 益气温阳组和活血通络组出现新生毛细血管。

Masson 染色显示: 损伤后第 7 天, 空白组新生肉芽组织中胶原纤维密布且排列规则, 模型组胶原纤维少而细, 零星分布, 西药组、益气温阳组和活血通络组有大量新生胶原, 明显多于模型组, 其中西药组胶原粗长, 活血通络组较粗, 益气温阳组相比前两组较稀疏。天狼星红染色显示: 损伤后第 7 天, 模型组 I 型胶原纤维稀少且排列无规则, 无 III 型胶原纤维; 空白组、西药组、益气温阳组和活血通络组有大量排列紧密的 I 型胶原, III 型胶原纤维明显, 呈疏松网状; 益气温阳组与活血通络组比较, 活血通络组胶原密集, 排列规则。

2.3 各组小鼠损伤后第 7 天疮面组织中巨噬细胞数量比较

表 2 各组小鼠损伤后第 7 天疮面组织中巨噬细胞荧光强度比较 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	M1 型巨噬细胞	M2 型巨噬细胞
空白组	10	41435.27 $\pm$ 4517.26 [*]	73788.0900 $\pm$ 4867.88 [*]
模型组	10	76799.35 $\pm$ 7852.37	33199.2200 $\pm$ 5699.38
西药组	10	49746.49 $\pm$ 5235.11 [*]	70757.6100 $\pm$ 8697.99 [*]
益气温阳组	10	58267.93 $\pm$ 6230.89 [*]	55965.4100 $\pm$ 8020.94 [*] Δ
活血通络组	10	52973.59 $\pm$ 5871.07 [*]	62708.0000 $\pm$ 5737.59 [*]

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与西药组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 示, 损伤后第 7 天, 空白组、益气温阳

组、活血通络组、西药组小鼠皮肤 M1 型巨噬细胞表面标志 iNOS 荧光强度低于模型组, M2 型巨噬细胞表面标志 CD206 荧光强度高于模型组 ($P < 0.05$), 且益气温阳组 M2 型巨噬细胞表面 CD206 荧光强度明显低于西药组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠疮面组织中 M1 型和 M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子含量比较

表 3 示, 损伤第 3 天, 空白组、西药组、益气温阳组 IL-6 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$); 损伤第 7 天, 空白组 IL-12 水平明显低于模型组, 空白组、西药组、益气温阳组、活血通络组 TNF- α 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。表 4 示, 损伤第 3、7 天空白组、西药组、益气温阳组、活血通络组 VEGF、IL-10 水平, 损伤第 3 天空白组、西药组 TGF- β 水平均明显高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 损伤第 3、7 天, 活血通络组 VEGF 水平高于同时间点益气温阳组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 损伤第 7 天活血通络组 IL-10 水平高于益气温阳组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

慢性皮肤溃疡是外科领域的顽疾, 目前临床上针对疮面主要采用清创、换药、植皮、激光、高压氧等方法, 但是临床疗效并不理想。原发疾病是引起慢性皮肤溃疡的重要原因, 但是创面局部微环境的异常也是影响创面难以修复的关键因素^[8]。研究表明, 疮面巨噬细胞表型转化障碍是导致慢性皮肤溃疡炎症持续存在的重要原因^[9]。巨噬细胞在疮面修复的不同阶段通常分为 M1 型与 M2 型^[10]: M1 型为炎性巨噬细胞, 主要分泌促炎因子 (如 IL-6、IL-12、TNF- α 及活性氧等), 参与 Th1 型免疫应答, 出现在创伤愈合的炎症期。M2 型为修复性巨噬细胞, 分泌抑炎因子 (IL-10 等) 和生长因子 (IGF-1、VEGF、TGF 等), 多出现在创伤愈合的修复期。巨噬细胞由炎性 (M1 型) 表型到修复性 (M2 型) 表型的过渡被认为是疮面愈合程序从炎症转为修复所必须的^[11-12]。慢性难愈合疮面中巨噬细胞表型转化功能障碍, 其抗炎及促修复功能难以发挥, 导致疮面修复困难^[13], 因此, 我们认

表 3 各组小鼠不同时间疮面组织中 M1 型巨噬细胞分泌的细胞因子相对含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	IL-6	IL-12	TNF- α
空白组	损伤第 3 天	5	0.0726 $\pm$ 0.68 [*]	0.1926 $\pm$ 0.09	0.1147 $\pm$ 1.03
	损伤第 7 天	5	1.0399 $\pm$ 0.33	0.8315 $\pm$ 0.47 [*]	0.4517 $\pm$ 0.67 [*]
模型组	损伤第 3 天	5	1.1004 $\pm$ 0.21	0.4197 $\pm$ 0.14	0.2304 $\pm$ 0.07
	损伤第 7 天	5	2.6282 $\pm$ 2.25	2.6116 $\pm$ 0.12	1.0565 $\pm$ 1.44
西药组	损伤第 3 天	5	0.7996 $\pm$ 0.18 [*]	0.3550 $\pm$ 0.43	0.1577 $\pm$ 0.10
	损伤第 7 天	5	1.1121 $\pm$ 0.97	1.6070 $\pm$ 0.075	0.1183 $\pm$ 0.60 [*]
益气温阳组	损伤第 3 天	5	0.0401 $\pm$ 0.01 [*]	0.2460 $\pm$ 0.24	0.1661 $\pm$ 0.02
	损伤第 7 天	5	2.1559 $\pm$ 0.41	1.8042 $\pm$ 0.21	0.7171 $\pm$ 0.83 [*]
活血通络组	损伤第 3 天	5	0.7530 $\pm$ 0.06	0.3651 $\pm$ 0.05	0.2027 $\pm$ 0.07
	损伤第 7 天	5	1.6975 $\pm$ 0.99	1.7502 $\pm$ 0.24	0.5243 $\pm$ 1.47 [*]

注: IL-6, 白细胞介素 6; IL-12, 白细胞介素 12; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; 与模型组同时间点相比, ^{*} $P < 0.05$

表 4 各组小鼠不同时间疮面组织中 M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子相对含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	VEGF	TGF- β	IL-10
空白组	损伤第 3 天	5	2.0356 $\pm$ 0.14 [*]	1.6567 $\pm$ 0.47 [*]	0.6381 $\pm$ 0.11 [*]
	损伤第 7 天	5	36.7632 $\pm$ 7.96 ^{**}	0.6922 $\pm$ 0.08	4.6229 $\pm$ 1.20 [*]
模型组	损伤第 3 天	5	1.2161 $\pm$ 0.18	0.5378 $\pm$ 0.11	0.0962 $\pm$ 0.02
	损伤第 7 天	5	0.8037 $\pm$ 0.15	0.6898 $\pm$ 0.17	0.7931 $\pm$ 0.22
西药组	损伤第 3 天	5	1.8719 $\pm$ 0.15 [*]	1.0970 $\pm$ 0.20 [*]	0.5571 $\pm$ 0.26 [*]
	损伤第 7 天	5	34.3286 $\pm$ 5.03 ^{**}	0.8286 $\pm$ 0.046	3.9043 $\pm$ 2.34 [*]
益气温阳组	损伤第 3 天	5	1.6974 $\pm$ 1.64 [*]	0.5951 $\pm$ 0.04	0.2951 $\pm$ 0.26 [*]
	损伤第 7 天	5	13.3552 $\pm$ 17.59 ^{**}	0.8251 $\pm$ 0.04	2.3596 $\pm$ 1.17 [*]
活血通络组	损伤第 3 天	5	2.8945 $\pm$ 0.31 ^{* #}	0.8745 $\pm$ 0.31	0.3049 $\pm$ 0.14 [*]
	损伤第 7 天	5	34.6420 $\pm$ 6.64 ^{** #}	0.8472 $\pm$ 0.11	4.8208 $\pm$ 1.62 ^{* #}

注: VEGF, 血管内皮生长因子; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-10, 白细胞介素 10; 与模型组同时间点比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与益气温阳组同时间点比较, [#] $P < 0.05$

为, 巨噬细胞表型转化异常导致了疮面炎症反应的持续存在, 使疮面愈合迟缓。

慢性皮肤溃疡属于中医学“疮疡”的范畴, 疮疡辨证, 首辨阴阳, 阴疮是慢性难愈合性皮肤溃疡的常见证型, 其病理表现为炎症的迁延时相过程, 导致创面愈合障碍。回阳生肌膏用于治疗慢性皮肤溃疡, 证属“阴疮”者, 疗效显著^[4]。研究表明, 回阳生肌膏可促进疮面的愈合^[5]。我们将其拆方为活血通络方和益气温阳方, 活血通络方中川芎性味辛、温, 行气开郁、活血祛瘀; 当归甘、辛、温, 补血活血、止痛; 松香生肌止痛; 血竭散瘀定痛、生肌敛疮; 四药配伍可以改善疮面微环境, 减轻炎症反应, 缩短疮面修复进程。益气温阳方中人参大补元气、补肺益脾; 肉桂补火助阳、温通经脉; 艾叶温经、散寒止痛; 黄芪益气托疮生肌; 炮姜温经止血; 诸药配合, 益气温阳, 提高疮面愈合能力, 促进疮面愈合。

本研究组织学观察显示, 西药组、益气温阳组、活血通络组同模型组比较炎性细胞浸润明显, 表皮细胞增殖较多, 提示西药组、益气温阳组、活血通络组通过促进疮面炎症反应启动愈合程序; 同时伤口处有致密肉芽组织形成, 并见增生的成纤维细胞, 表明西药组、益气温阳组、活血通络组可有促进慢性皮肤溃疡疮面愈合的作用。另外, 各给药组小鼠疮面愈合率得以提高, 愈合时间缩短; 并且疮面组织较早出现炎症反应启动愈合程序, 并迅速由炎症期过渡到增殖期。新生大量胶原形成致密肉芽组织, 伴随新生血管, 表明益气温阳方、活血通络方均可促进免疫抑制小鼠慢性疮面的愈合。

PCR 结果显示, 皮肤损伤后 3 天, 模型组 M1 型巨噬细胞各因子高表达, M2 型巨噬细胞各因子低表达, 表型转化困难, 导致创面炎症持续存在, 阻碍了创面的正常愈合; 同时愈合初期, 用药后可促进巨噬细胞表型转化, 使 M2 型巨噬细胞聚集, 减轻疮面炎症反应, 缩短疮面的愈合进程。免疫荧光结果显示, 疮面愈合中期 (皮肤损伤后 7 天), 模型组 M1 型巨噬细胞浸润明显多于西药组、益气温阳组、活血通络组, 而 M2 型巨噬细胞较少, 进一步表明西药组、益气温阳组、活血通络组可促进巨噬细胞由 M1 型向 M2 型转化, 疮面愈合由炎症期过渡到增殖期, 疮面修复进程缩短, 疮面愈合率提高。实验结果说明活血通络方与益气温阳方均可促进疮面愈合, 而活血通络方又可与促进巨噬细胞表型转化, 与提高 M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子

含量有关, 通过促进抑炎因子 IL-10, 生长因子 VEGF 的分泌, 缓解疮面炎症反应, 促进疮面血管再生, 达到促进疮面愈合的目的。实验中活血通络组对于促进 M2 型巨噬细胞因子 (VEGF、IL-10) 分泌, 提高巨噬细胞表型转化 (由 M1 型向 M2 型) 效果优于益气温阳组, 效果与西药组相同, 提示促进巨噬细胞表型转化, 提高 M2 型细胞因子的分泌从而促进疮面修复可能是活血通络方对于疮面愈合起到主要作用的机制。本研究为临床使用回阳生肌膏治疗慢性皮肤溃疡提供理论依据, 为临床有效方剂的复方优化及拆方提供证据与方向。

参考文献

- [1] POWERS JG, HIGHAM C, BROUSSARD K, et al. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management [J]. J Am Acad Dermatol, 2016, 74 (4): 607-625.
- [2] MOTWANI MP, GILROY DW. Macrophage development and polarization in chronic inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27 (4): 257-266.
- [3] MIRZA RE, FANG MM, ENNIS WJ, et al. Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2013, 62 (7): 2579-2587.
- [4] NOVAK ML, WEINHEIMER-HAUS EM, KOH TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury [J]. J Pathol, 2014, 232 (3): 344-355.
- [5] 董雨, 黄凤, 王雨, 等. 应用王玉章回阳生肌法治疗糖尿病阴证疮疡典型病例报告 [J]. 世界中医药杂志, 2015, 10 (12): 1912-1913.
- [6] BECK LS, DEGUZMAN L, LEE WP, et al. One systemic administration of transforming growth factor- β 1 reverses glucocorticoid-impaired wound healing [J]. Clin Invest, 1993, 92 (6): 2841-2849.
- [7] 李媛. 糖尿病慢性皮肤溃疡阴证模型建立与回阳生肌膏对糖尿病阴证溃疡创面不同时相的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [8] 贾连城, 盛巡, 孙明杰, 等. 回阳生肌膏治疗慢性难愈性皮肤溃疡疗效观察及作用机制探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16 (10): 9-12.
- [9] MAHDAVIAN DELAVARY B, VAN DER VEER WM, VAN EGMOND M, et al. Macrophages in skin injury and repair [J]. Immunobiology, 2011, 216 (7): 753-762.
- [10] MARTINEZ FO, SICA A, MANTOVANI A, et al. Macrophage activation and polarization [J]. Front Biosci, 2008, 13: 453-461.
- [11] GORDON S, MARTINEZ FO. Alternative activation of

- macrophages: mechanism and functions [J]. Immunity, 2010, 32(5): 593-604.
- [2] MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(12): 958-969.
- [3] HAIBIN TIAN, YAN LU, SHRADDHA P, et al. Autocoid 14S, 21R-dihydroxy-docosahexaenoic acid counteracts diabetic impairment of macrophage prohealing functions [J]. Am J Pathol, 2011, 179(4): 1780-1791.
- [4] 贾连成, 吕培文. 吕培文应用回阳生肌法治疗慢性难愈性皮肤溃疡经验总结 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(28): 85-88.
- [5] 李萍, 李光善, 盛巡, 等. 疮愈涂剂对糖尿病大鼠疮面 PCNA 表达及成纤维细胞增殖的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 56-60.
- [6] BECK LS, DEGUZMAN L, LEE WP, et al. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses glucocorticoid-impaired wound healing [J]. J Clin Invest, 1993, 92(6): 2841-2849.

Effect of *Huiyang Shengji Ointment* (回阳生肌膏) Components on Skin Wound Healing and Macrophage Phenotype Transformation in Chronic Skin Ulcer Model Mice

MENG Yujiao, HE Xiujuan, LIN Yan, XUE Yan, LI Ping

(Beijing Chinese Medical Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010)

ABSTRACT Objective To observe the effect and possible functional mechanism of *Huiyang Shengji Ointment* on chronic skin ulcer. **Methods** Divided 150 BALB/c mice into blank group, model group, western medicine group, Tonifying Qi and Warming Yang group (TQWY), Activating Blood and Dredging Collaterals group (ABDC), with 30 mice in each group. Adopted immunosuppression combined with skin wound method to build mice of chronic skin ulcer model. The TQWY group and the ABDC group were respectively given *Yiqi Wenyang Formula* and *Huoxue Tongluo Formula* 0.018 g each, while the western medicine group was given recombinant human basic fibroblast growth factor 0.3 g, which were all made into medicated gelatin sponge applied with sterile patch. Changed medicine every other day and took photos of skin wound. Measured square of skin wound and calculated healing rate; took skin wound tissue at the 3rd, 7th and 14th of wound and observed new granulation tissue, collagen distribution and so on in skin wound using HE, Masson and sirius red staining; examined number of macrophagocyte in skin wound tissue using immunohistochemical method; examined the expression of genes of cytokines secreted by M1 and M2 type macrophagocyte in local skin wound using real time PCR. **Results** Compared with the model group, skin wound areas in the TQWY group and the ABDC group decreased and healing rate increased on the 7th and the 14th day of injury ($P < 0.05$). And healing rate in the ABDC group was higher than that in the TQWY group ($P < 0.05$). On the 3rd day of wound, interleukin 6 (IL-6) levels in the blank group, western medicine group and TQWY group was lower than that in the model group, while vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin 10 (IL-10) level were higher than that in the model group. VEGF and IL-10 level in the ABDC group was higher than that in the model group. VEGF level in the ABDC group was higher than that in the TQWY group ($P < 0.05$). On the 7th day of wound, M1 type macrophage number of skin and TNF- α levels in the blank group, western medicine group, the TQWY group and the ABDC group were remarkably lower than that in the model group. M2 type macrophage number, VEGF and IL-10 level was higher than the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). VEGF and IL-10 level in the ABDC group was higher than that in the TQWY group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Huoxue Tongluo Formula* and *Yiqi Wenyang Formula* could both promote chronic skin wound healing in mice. Its mechanism may be promoting wound healing transferring from inflammation phase to proliferating phase by promoting macrophage phenotypic transformation. *Huoxue Tongluo Formula* had better effect in macrophage phenotypic transformation than *Yiqi Wenyang Formula*.

Keywords skin ulcer; skin wound healing; *Huiyang Shengji Ointment*; tonifying Qi and warming Yang (*Yiqi Wenyang*); activating blood and dredging collaterals (*Huoxue Tongluo*); macrophage

(收稿日期: 2016-05-05; 修回日期: 2016-07-11)

编辑: 王利芬