

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.07.015

石香膏对糖尿病慢性难愈合创面模型大鼠创面组织血管内皮细胞黏附分子 1、核因子 κ B p65 表达的影响

凌一鸣¹, 费冀^{2*}, 张开伟², 周一夫³, 沈冯君²

1. 浙江省绍兴市中医院, 浙江省绍兴市越城区人民中路 641 号, 312000; 2. 贵州中医药大学第一附属医院; 3. 湖南中医药大学第二附属医院

摘要 目的 探讨石香膏治疗糖尿病慢性难愈合创面的可能作用机制。方法 将 50 只 SD 大鼠按 7、14 天两个时间点分为正常组、创面对照组、难愈合组、贝复济组、石香膏组, 每个时间点每组 5 只。除正常组和创面对照组外, 其余各组采用腹腔注射链脲佐菌素溶液制备糖尿病大鼠模型, 造模后用手术器械剪去标记圆形区域全层皮肤直至显露肌筋膜, 形成大鼠全层皮肤缺损创面模型; 创面对照组亦建立皮肤缺损创面模型。造模成功后石香膏组创面外敷石香膏厚度约 2 mm, 贝复济组创面外用贝复济约 0.2 ml, 均保证药物完全覆盖创面, 创面对照组和难愈合组均不使用药物覆盖创面, 正常组不作处理。创面造模后第 7、14 天, 观察大鼠创面组织生长情况, Western Blot 法检测创面组织血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65)、磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65) 表达情况, 荧光定量 PCR 法检测 VCAM-1 mRNA 表达水平。结果 造模后第 14 天难愈合组可见创面未见明显修复, 成纤维细胞数量较少; 石香膏组创面已基本修复。造模后第 7 天, 与难愈合组比较, 石香膏组中 VCAM-1 蛋白表达, 贝复济组和石香膏组 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白及 VCAM-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与贝复济组比较, 石香膏组中 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$)。造模后第 14 天, 与难愈合组比较, 贝复济组和石香膏组中 VCAM-1、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白及 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与贝复济组比较, 石香膏组中 VCAM-1、NF- κ B p65 蛋白及 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 石香膏可以促进糖尿病慢性难愈合创面修复, 抑制创面中 VCAM-1、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 及 VCAM-1 mRNA 表达可能是其作用机制之一。

关键词 糖尿病; 慢性难愈合创面; 石香膏; 血管内皮细胞黏附分子 1; 核因子 κ B p65

慢性难愈合创面是指伤口愈合不能正常进行, 创面皮肤的解剖结构和功能不能在一个月内恢复的疾病^[1]。主要病因包括创伤、感染、外部压迫和常见的急性或慢性内科疾病, 包括糖尿病、血管疾病等, 甚至某些社会心理因素, 如隔离和抑郁也可引起慢性难愈合创面^[2]。我国慢性难愈合创面患病率约为 0.17%^[3], 平均住院花费超过万元^[4]。但是许多患者的治疗效果仍不理想, 最终进展为截肢甚至危及生命。研究^[5]表明, 因慢性难愈合创面而导致患者死亡的发生率为 2.5%。目前常用的

治疗方法包括清创换药、抗感染、皮瓣移植等传统疗法, 新型治疗方法包括负压创面疗法、干细胞疗法、细胞生长因子疗法等^[6-8], 但这些方法存在治疗效果不佳、费用昂贵等不足。石香膏是我们治疗创面的经典外用膏药, 在促进创面愈合、缩短愈合时间、缓解疼痛方面效果显著^[9-11]。研究^[11-12]表明, 血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 受到多种信号刺激, 传导到下游信号进一步激发炎症反应, 在细胞内炎症反应过程中起到重要的作用。本研究通过建立慢性难愈合创面大鼠模型, 观察石香膏对大鼠 VCAM-1、NF- κ B p65 的影响, 探讨石香膏治疗慢性难愈合创面的可能作用机制。

基金项目: 贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (黔教合 KY 字 [2016] 188 号); 贵州省科技计划项目 (黔科合 LH 字 [2016] 7509 号); 沈冯君名老中医药专家传承工作室

* 通讯作者: drhosi@sina.com, 17785000475

1 材料与方法

1.1 动物

50 只清洁级健康雄性 SD 大鼠, 体重 (325 ± 50) g, 由贵州医科大学实验动物中心 (贵州省实验动物工程技术中心) 提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (黔) 2012-0001, 实验动物使用许可证号: SYXK (黔) 2018-0001。饲养环境: 温度 (25 ± 3) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 分笼饲养, 自由进食饮水, 适应性饲养 3 周后用于本研究。

1.2 主要药品与试剂

石香膏由贵州中医药大学第一附属医院制备, 制备过程: 将乳香 150 g、赤石脂 150 g、冰片 150 g、栀子 150 g、煅龙骨 150 g、没药 150 g 均匀混合后研磨成粉末状, 将 2 L 麻油倒入锅中充分加热至冒烟时, 加入炉甘石 500 g 充分搅拌均匀, 再倒入磨好的粉末, 持续搅拌约 1 h, 待锅中液体呈面糊状后, 加入 200 g 蜂蜡, 再次搅拌均匀, 冷却后即成为石香膏成品。

苏木素染液 (批号: D005-4-3)、免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (SP) 试剂盒 (批号: I003-2)、伊红染液 (批号: D019-1-3), 均为南京建成生物工程研究所产品; 中性树脂 (批号: ZLI-9555), 北京中杉金桥生物技术公司; NF-κB p65 一抗 (批号: A00284-3)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS, 批号: A01604), 均为武汉博士德公司产品; 磷酸化核因子 κB pP65 (p-NF-κB P65) 一抗 (批号: AB86299), 美国 Abcam 公司; 荧光定量 PCR 试剂 (批号: A25742), 美国 Thermo 公司; 链脲佐菌素 (批号: 18883-66-4), 东光县克锐斯化学有限公司; 诺和灵 R (批号: J20160026), 诺和诺德 (中国) 制药有限公司; 柠檬酸钠缓冲液 (批号: SJH1190), 上海如吉生物科技发展有限公司; 盐酸氯胺酮 (批号: 20163609), 浙江九旭药业有限公司; 硫化钡 (批号: B106631), 湖北鑫润德化工有限公司; 重组牛碱性成纤维细胞生长因子外用溶液 (贝复济, 批号: S10980077), 珠海亿胜生物制药有限公司; 青霉素注射液 (批号: H11020456), 北京悦康凯悦制药有限公司; 10% 甲醛溶液 (批号: H43020198), 湖南尔康制药有限公司; Trizol 试剂盒 (批号: R0016), 中国上海碧云天生物技术有限公司; Sybr green I (批号: SY1020), 北京索莱宝科技有限公司; 聚乙二醇辛基苯基醚

(TritonX-100, 批号: A600198-0500), 上海生工生物工程股份有限公司; 3% 过氧化氢溶液 (H₂O₂, 批号: H44023919), 广东恒健制药有限公司; DAB 显色试剂盒 (批号: ZLI-9049), 北京诺博莱德科技有限公司; 二甲苯 (批号: QM-TR-031), 舟山顺迎石油化工有限公司。

1.3 主要仪器

实时荧光定量 PCR 仪 (型号: STEP ONE PLUS), 美国 ABI 公司; 电泳仪 (型号: Power pac basic), 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪 (型号: TANON 4200), 中国天能公司; 纯水仪 (型号: Milli-Q Direct), 美国 MILLIPORE 公司; 切片机 (型号: RM2235)、展片机 (型号: HI1210)、烤片机 (型号: HX2867), 德国 Leica 公司; 血糖仪 (型号: 580), 江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; 离心机 (型号: GS-15R), 美国 Beckman 公司; 倒置显微镜 (型号: CK-40), 日本 Olympus 公司。

1.4 动物分组及造模

50 只大鼠按 7、14 天两个时间点分为正常组、创面对照组、难愈合组、贝复济组、石香膏组, 每个时间点每组 5 只。正常组仅用于观察实验是否处于正常状态, 并排除其他因素对实验结果的干扰。

1.4.1 建立糖尿病大鼠模型 实验前禁食 18 h, 测量并记录大鼠体重。用血糖仪测量大鼠血糖并记录。难愈合组、贝复济组、石香膏组大鼠参照文献 [3] 制备糖尿病模型, 腹腔注射配置好的链脲佐菌素溶液 150 mg/kg。72 h 后再次测量大鼠血糖, 若大鼠造模前血糖值 < 8.9 mmol/L, 造模后血糖值 > 16.7 mmol/L 则表示糖尿病大鼠造模成功。若造模后测得血糖 > 33.3 mmol/L, 则可根据血糖升高程度肌肉注射胰岛素 (诺和灵 R) 降低血糖至 33.3 mmol/L 以下, 以减少实验误差。正常组大鼠腹腔注射 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液以作对照 [4]。全部大鼠均造模成功。

1.4.2 建立糖尿病慢性难愈合创面大鼠模型 糖尿病模型造模成功 1 周后, 创面对照组、难愈合组、贝复济组、石香膏组大鼠采用盐酸氯胺酮 120 mg/kg 腹腔注射麻醉 [5]。麻醉显效后, 剃去大鼠背部毛发, 再用硫化钡脱毛。用黑色记号笔在大鼠脊柱正中偏上处标记一直径约 3 cm 的圆形区域。碘伏消毒, 按照无菌操作原则用手术器械剪去标记圆形区域全层皮肤直至显露肌筋膜, 充分止血, 形成大鼠全层皮肤缺损创面模型 [6]。创面愈合主要可分为以下几个阶段: 炎症、增殖、上皮化血管生

成、重塑和瘢痕形成^[7]，本次造模的大鼠属于炎症期。

1.5 干预方法

建立大鼠糖尿病慢性难愈合创面模型后，石香膏组创面外敷石香膏厚度约 2 mm，贝复济组创面外用贝复济约 0.2 ml，均保证药物完全覆盖创面，创面对照组和难愈合组均不使用药物覆盖创面，4 组大鼠创面均用 3 层无菌纱布覆盖，胶布固定牢靠，防止敷料脱落。正常组不作处理。从开始造模前一天起，连续 5 天对难愈合组、贝复济组、石香膏组大鼠肌肉注射青霉素 4000 U/只，预防感染。大鼠饲养方法同造模前。

1.6 观察指标及方法

创面造模后第 7、14 天创面对照组、难愈合组、贝复济组、石香膏组大鼠腹腔注射盐酸氯胺酮 120 mg/kg 麻醉，无菌备皮脱毛碘伏消毒后，分别取大鼠背部创面肉芽组织标本，一半用 10% 甲醛溶液固定，制成石蜡块保存；另一半置于 -70℃ 冰箱中保存，用于 Western Blot 与荧光定量 PCR 检测。

1.6.1 免疫组化法观察大鼠背部创面组织生长情况 取大鼠背部创面肉芽组织标本，经过组织脱水、透明、脱蜡、包埋、切片、烤片后，形成组织石蜡切片，选取相应的石蜡切片脱蜡复水，抗热源修复，随后进行免疫组化染色。在切片组织上滴加 0.5% Triton X-100，室温打孔 20 min，用磷酸盐缓冲液（PBS 缓冲液）浸洗切片 3 次，每次 3 min。在 25℃ 下用 3% H₂O₂ 处理切片 15 min，用 PBS 缓冲液浸洗切片 3 次，每次 3 min。山羊血清 25℃ 封闭 60 min，完毕后取出，甩干封闭液；一抗孵育，4℃ 过夜。PBS 缓冲液清洗标本 3 次，每次各 5 min。二抗孵育 37℃ 30 min。PBS 缓冲液清洗标本 3 次，每次各 5 min。DAB 显色试剂盒显色 1~10 min，蒸馏水清洗，苏木素复染 5 min，自来水洗返蓝，用梯度酒精脱水，75%、85%、95%、100% 各 3 min。使用二甲苯透明 2 次 3 min。中性树胶封片。倒置显微镜下观察各组标本细胞形态学改变。

1.6.2 Western Blot 法检测创面组织 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达水平 创面组织剪切成细小的碎片。每 100 mg 组织加入 1 ml RIPA 裂解液。用玻璃匀浆器匀浆 20 次。将匀浆物转移到 1.5 ml 离心管，12000 r/min，4℃ 离心 5 min，离心半径 10 cm，吸取上清，进行电泳及免疫沉淀操作。

1.6.3 荧光定量 PCR 法检测创面组织 VCAM-1 mRNA 表达情况 取各组大鼠创面组织，使用 Trizol 法提取组织中的 RNA，用随机引物进行 RNA 逆转录反应，总反应体系 20 μl：2 × RT buffer 10 μl、6 N 随机引物 1 μl，RT-mix 1 μl，模板 RNA 5 μl，DEPC 水 3 μl，逆转录反应条件：25℃ 10 min，42℃ 50 min，85℃ 5 min 合成 cDNA，然后设计特异性的引物和 Sybr green I 荧光染料进行荧光定量 PCR 检测，总反应体积 50 μl，条件设置 94℃ 4 min，94℃ 20 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s 循环 35 次，72℃ 时检测信号。引物由重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司合成。引物序列：VCAM-1：上游：5'-GAACCCAAACAAAGGCAGAG-3'，下游：5'-GAAAACCATCACTTGAGCAGG-3'，目的片段长度：136 bp；β-actin：上游：5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'，下游：5'-TTTAATGTCAGCACCATTTC-3'，目的片段长度：150 bp。β-actin 作为内参，2^{-ΔΔCT} 法计算相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计。数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，若满足正态分布和方差齐性，采用方差分析；若不满足正态分布或方差齐性，则采用秩和检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠创面组织免疫组化结果

图 1 示，相较于造模后 7 天，造模后 14 天创面对照组创面已有部分修复，可见一定程度成纤维细胞及血管内皮细胞；难愈合组可见创面未见明显修复，成纤维细胞数量较少；贝复济组可见创面部分修复，相较于同期创面对照组可见较多成纤维细胞及血管内皮细胞；石香膏组创面已基本修复。

2.2 各组大鼠创面组织 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达比较

表 1、图 2 示，造模后第 7 天，与创面对照组比较，难愈合组中 NF-κB p65 蛋白表达升高，石香膏组中 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与难愈合组比较，贝复济组和石香膏组 NF-κB p65、p-NF-κB p65，石香膏组中 VCAM-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。造模后第 14 天，与创面对照组比较，难愈合组 VCAM-1 蛋白表达升高，贝复济组 p-NF-κB p65，石香膏组 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65

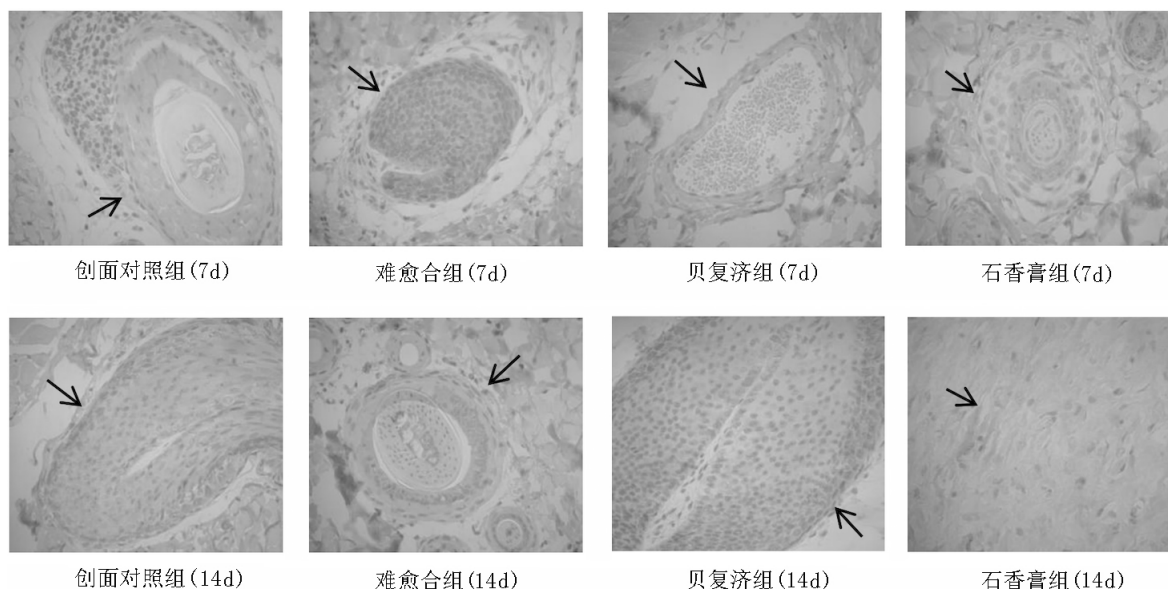
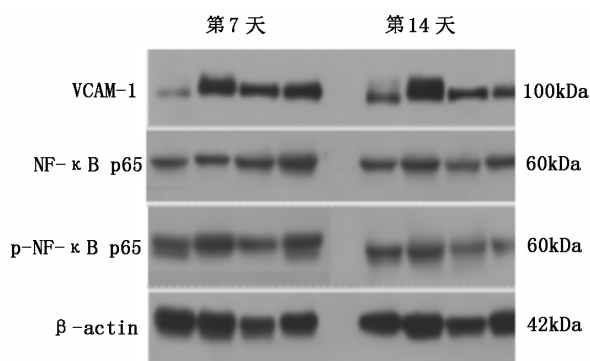


图 1 各组大鼠造模后第 7、14 天创面组织免疫组化结果 (×400)

表 1 各组大鼠不同时间创面组织 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达比较 (μg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	VCAM-1	NF-κB p65	p-NF-κB p65
创面对照组	第 7 天	5	0.5469 ± 0.1653	0.5413 ± 0.0855	0.6470 ± 0.1065
	第 14 天	5	1.1321 ± 0.0914 ^{##}	0.5451 ± 0.0817	0.6092 ± 0.1566
难愈合组	第 7 天	5	0.6462 ± 0.1734	0.6773 ± 0.1220 ^{**}	0.7394 ± 0.0774
	第 14 天	5	1.3652 ± 0.0723 ^{***}	0.6161 ± 0.0788	0.6494 ± 0.2299
贝复济组	第 7 天	5	0.4884 ± 0.1786	0.4570 ± 0.0798 ^{△△}	0.5401 ± 0.1516 [△]
	第 14 天	5	0.9888 ± 0.1159 ^{△△##}	0.4930 ± 0.1225 [△]	0.3408 ± 0.0784 ^{**△△}
石香膏组	第 7 天	5	0.3168 ± 0.0817 ^{*△△}	0.3654 ± 0.0596 ^{**△△}	0.4310 ± 0.1304 ^{*△△}
	第 14 天	5	0.4748 ± 0.1606 ^{**△△▲▲}	0.3651 ± 0.0667 ^{**△△▲}	0.3650 ± 0.0702 ^{**△△}

注: VCAM-1, 血管内皮细胞黏附分子 1; NF-κB p65, 核因子 κB p65; 磷酸化核因子 κB p65, p-NF-κB p65; 与创面对照组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与难愈合组同时间比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与贝复济组同时间比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与本组第 7 天比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$



注: VCAM-1, 血管内皮细胞黏附分子 1; NF-κB p65, 核因子 κB p65; p-NF-κB p65, 磷酸化核因子 κB p65

图 2 各组大鼠造模后第 7、14 天创面组织 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达电泳图
蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与难愈合组比较, 贝复济组和石香膏组中 VCAM-1、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与贝复济组比较, 石香膏组中 VCAM-1、

NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组第 7 天比较, 第 14 天创面对照组、难愈合组、贝复济组 VCAM-1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠不同时间创面组织 VCAM-1 mRNA 表达比较

表 2 示, 造模后第 7 天, 与创面对照组比较, 难愈合组 VCAM-1 mRNA 相对表达量升高, 石香膏组 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$); 与难愈合组比较, 贝复济组和石香膏组 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$); 与贝复济组比较, 石香膏组 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$)。造模后第 14 天, 与创面对照组比较, 难愈合组 VCAM-1 mRNA 相对表达量升高, 贝复济组和石香膏组 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与难愈合组比较, 贝复济组和

石香膏组 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$); 与贝复济组比较, 石香膏组 VCAM-1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$)。与本组造模后第 7 天相比, 造模后第 14 天各组 VCAM-1 mRNA 相对表达量均明显升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间创面组织 VCAM-1 mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天
创面对照组	5	0.0298 $\pm$ 0.0019	0.0502 $\pm$ 0.0029 [#]
难愈合组	5	0.0494 $\pm$ 0.0027 ^{**}	0.0854 $\pm$ 0.0044 ^{***}
贝复济组	5	0.0270 $\pm$ 0.0025 [△]	0.0442 $\pm$ 0.0041 ^{*△#}
石香膏组	5	0.0136 $\pm$ 0.0011 ^{**△▲}	0.0214 $\pm$ 0.0021 ^{**△▲#}

注: VCAM-1, 血管内皮细胞黏附分子 1; 与创面对照组同时时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与难愈合组同时时间比较, $\Delta P < 0.01$; 与贝复济组同时时间比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组第 7 天比较, $\#P < 0.01$

3 讨论

慢性难愈合创面在中医学中归于“痈疽”范畴。痈疽的中医病机为各种内因或外因导致局部组织气滞血瘀、经脉瘀阻, 不能濡养组织, 导致血败肉腐。中医学在长期研究与应用中提出了“提脓祛腐, 煨脓长肉”的治疗理念。提脓祛腐是指根据腐不去则新肉不生原则, 以升丹为主药物促进局部坏死组织液化, 促进创面组织分泌脓液, 使内蓄脓毒排出^[8]。煨脓长肉则是指在疮疡愈合阶段, 外用中药于创面, 促进创面活血化瘀、疏通经络, 同时保持疮面湿润, 促进新生组织生长^[9-20]。

石香膏中乳香活血行气止痛, 消肿生肌; 没药散瘀定痛, 提脓祛腐; 赤石脂生肌敛疮; 梔子消肿止痛; 煅龙骨收敛固涩; 冰片清热散毒; 炉甘石收涩敛创。同时用较为温和的麻油和蜂蜡作为溶剂, 一方面减少药物直接作用于创面的刺激, 还可以长时间保持创面的湿润状态。

核因子 κB (NF- κB) 是具有转录激活调节功能的一种转录因子, 在许多关键的生理过程如免疫系统的发育、动态平衡和激活中起着重要的作用。在细胞水平上, NF- κB 在调节细胞周期、增殖和细胞死亡中起着重要的作用, 并在炎症性疾病中起到重要的病理作用^[21]。炎症细胞因子的释放主要受 NF- κB 信号通路的调控, 当上游信号作用在 NF- κB 上时, 会促进下游基因表达, NF- κB 驱动的基因产物包括 VCAM-1 等^[22], 通过释放这些物质来调节炎症反应及创面组织修复进程。NF- κB 包含 p50 和 p65 等亚基, p65 是 NF- κB 中分布最广、作用最强

的亚基^[23], 其磷酸化形成的 p-NF- κB p65 可增强或下调靶基因的转录, 或调节转录反应。随着 p65 的磷酸化刺激下游基因表达, 一方面减少抗炎因子释放, 另一方面增加炎症因子的活性, 影响细胞组织修复功能^[24]。VCAM-1 是诱导型黏附分子, 主要在血管内皮细胞中表达, 促进与单核细胞相关的紧密附着, 在机体免疫炎症反应中具有重要作用^[25]。在炎症条件下, VCAM-1 主要在血管内皮细胞的内侧和外侧表达, 介导白细胞不同亚群的活动和黏附, 进一步促进炎症反应的进行^[26]。创面修复是一个复杂的过程, 包括多个步骤, 例如炎症、血管生成、肉芽组织形成、再上皮化和组织重建等。在皮肤损伤时, 细胞如成纤维细胞、角质细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞迅速增殖并向伤口迁移并启动复杂的愈合过程。因此, 细胞向伤口的迁移是伤口愈合过程的关键阶段^[27-28]。

本研究结果显示, 与创面对照组比较, 难愈合组大鼠创面组织中的 VCAM-1、NF- κB p65 升高, 贝复济组与石香膏组明显降低, 说明 VCAM-1、NF- κB p65 对于创面生长愈合具有抑制作用。与难愈合组比较, 贝复济组与石香膏组大鼠创面组织中 VCAM-1、NF- κB p65、p-NF- κB p65 均明显下降, 有效证实了贝复济、石香膏在慢性难愈合创面上均能有效抑制炎症反应。石香膏组在降低 VCAM-1、NF- κB p65 方面要优于贝复济组, 说明了在治疗慢性难愈合创面上, 石香膏具有更好的疗效。此外, 造模后第 14 天 VCAM-1 较造模后第 7 天在各组中仍有升高, 而 NF- κB p65 则未见明显变化, 说明在创面愈合过程中, VCAM-1 影响时间更长。

创面组织免疫组化结果显示, 与创面对照组比较, 石香膏组与贝复济组对慢性难愈合创面修复作用较强, 说明二者均可能通过抑制 VCAM-1/NF- κB 起到修复创面的作用。同时也表明, 石香膏对于难愈合性创面的修复效果优于贝复济。本项研究一方面证明石香膏对于慢性难愈合创面具有较好的修复作用, 另一方面表明其作用机制之一为抑制 VCAM-1/NF- κB , 减少炎症反应, 有利于创面修复与组织新生。但本研究也存在一定的局限性, 如未随机分组, 每组大鼠数量较少, 研究的时间较短, 石香膏的最佳使用剂量不确定等。

参考文献

- CLINTON A, CARTER T. Chronic wound biofilms: pathogenesis and potential therapies [J]. Lab Med, 2015, 46 (4): 277-284.

- [2] ZHANG L, WENG C, ZHAO Z, et al. Extracorporeal shock wave therapy for chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Wound Repair Regen, 2017, 25(4): 697-706.
- [3] 姜玉峰. 中国体表慢性难愈合创面流行病学研究 [D]. 北京: 军医进修学院, 2011.
- [4] JIANG Y, HUANG S, FU X, et al. Epidemiology of chronic cutaneous wounds in China [J]. Wound Repair Regen, 2011, 19(2): 181-188.
- [5] SINGER AJ, TASSIOPOULOS A, KIRSNER RS. Evaluation and management of lower-extremity ulcers [J]. N Engl J Med, 2017, 377(16): 1559-1567.
- [6] YANG SL, ZHU LY, HAN R, et al. Effect of negative pressure wound therapy on cellular fibronectin and transforming growth factor-beta1 expression in diabetic foot wounds [J]. Foot Ankle Int, 2017, 38(8): 893-900.
- [7] DWIVEDI MK, SRIVASTAVA RN, BHAGAT AK, et al. Pressure ulcer management in paraplegic patients with a novel negative pressure device: a randomised controlled trial [J]. J Wound Care, 2016, 25(4): 199-207.
- [8] GAROUFALIS M, NAGESH D, SANCHEZ PJ, et al. Use of dehydrated human amnion/chorion membrane allografts in more than 100 patients with six major types of refractory nonhealing wounds [J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2018, 108(2): 84-89.
- [9] 费冀, 陈久毅, 张开伟, 等. 中药石香膏治疗慢性难愈合创面的多中心临床研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 179-181.
- [10] 费冀, 陈久毅. 中药“石香膏”促进糖尿病溃疡创面修复临床初探 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(3): 107-108.
- [11] SCHLESINGER M, BENDAS G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1): an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis [J]. Int J Cancer, 2015, 136(11): 2504-2514.
- [12] ZHANG J, YAN J. Protective effect of ginkgolic acid in attenuating LDL induced inflammation human peripheral blood mononuclear cells via altering the NF- κ B signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2019, 8(10): 1241-1252.
- [13] 陆少君, 曾伟斌, 藏林泉. 2 型糖尿病大鼠模型制备实验研究 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 624-628.
- [14] 农慧, 盛庆寿, 梁健, 等. STZ 诱导糖尿病大鼠模型的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(1): 69-72.
- [15] 胡玉红, 恽时锋, 周森妹, 等. 氯胺酮用于大鼠麻醉的效果观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(6): 348-350.
- [16] 赵京禹, 付小兵, 雷永红, 等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备 [J]. 感染、炎症、修复, 2008, 9(1): 64.
- [17] SORG H, TILKORN DJ, HAGER S, et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts [J]. Eur Surg Res, 2017, 58(1/2): 81-94.
- [18] 吴允波, 胡铁山, 程仕萍, 等. 解毒祛腐煨脓生肌法治疗蛇伤后溃疡的临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1382-1384.
- [19] 马运涛, 吴深涛. 吴深涛治疗糖尿病下肢溃疡经验管窥 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12): 5087-5089.
- [20] 郭冬婕, 陈瑜, 李斌, 等. “煨脓长肉”理论的临床运用与理性思考 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 4812-4814.
- [21] CHRISTIAN F, SMITH EL, CARMODY RJ. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation [J]. Cells, 2016, 5(1). pii: E12. doi: 10.3390/cells5010012.
- [22] SOKOLOVA O, NAUMANN M. NF- κ B signaling in gastric cancer [J]. Toxins (Basel), 2017, 9(4). pii: E119. doi: 10.3390/toxins9040119.
- [23] KANG R, CHEN R, XIE M, et al. The receptor for advanced glycation end products activates the AIM2 inflammasome in acute pancreatitis [J]. Immunol, 2016, 196(10): 4331-4337.
- [24] MILANOVIC M, KRACHT M, SCHMITZ ML. The cytokine-induced conformational switch of nuclear factor kappa b p65 is mediated by p65 phosphorylation [J]. Biochem J, 2014, 457(3): 401-413.
- [25] LIU YS, LIN HY, LAI SW, et al. MiR-181b modulates EGFR-dependent VCAM-1 expression and monocyte adhesion in glioblastoma [J]. Oncogene, 2017, 36(35): 5006-5022.
- [26] KONG DH, KIM YK, KIM MR, et al. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1057-1073.
- [27] KOENEN P, SPANHOLTZ TA, MAEGELE M, et al. Acute and chronic wound fluids inversely influence adipose-derived stem cell function: molecular insights into impaired wound healing [J]. Int Wound J, 2015, 12(1): 10-16.
- [28] BOLLA SR, MOHAMMED AL-SUBAIE A, YOUSUF AL-JINDAN R. In vitro wound healing potency of methanolic leaf extract of Aristolochia saccata is possibly mediated by its stimulatory effect on collagen-1 expression [J]. Heliyon, 2019, 5(5): e01648.

Effects of *Shixiang Paste* (石香膏) on Expressions of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Nuclear Factor- κ B p65 in Wound Tissue of Diabetic with Chronic Refractory Wounds Model Rats

LING Yiming¹, FEI Ji², ZHANG Kaiwei², ZHOU Yifu³, SHEN Fengjun²

1. Shaoxing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoxing, 312000; 2. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine; 3. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To study possible mechanism of *Shixiang Paste* (石香膏) in treating diabetic chronic refractory wounds. **Methods** Fifty SD rats were divided into normal group, wound control group, refractory group, rb-bFGF group and *Shixiang Paste* group, with 5 rats in each group and each time point (7 d and 14 d). Except for the normal group and the wound control group, rats were given intraperitoneal injection of streptozotocin solution to prepare diabetic rat models. After modeling, full-thickness skin marked with a circular area was cut with surgical instruments until the muscular fascia was exposed, forming a rat model of full-thickness skin defect wound; skin defect wound models were also established in the wound control group. After successful modeling, the wounds in the *Shixiang Paste* group were applied *Shixiang Paste* with a height of 2 mm. The wounds in the rb-bFGF group were treated with 0.2 ml rb-bFGF externally. It is ensured that the drugs completely covered the wounds. The wound control group and the refractory group were not given drugs to cover the wounds, and the normal group was not treated. On the 7th and 14th day after modeling, wound tissue growth was observed, expressions of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), nuclear factor κ B p65 (NF- κ B p65) and p-nuclear factor κ B p65 (p-NF- κ B p65) in the wounds were detected by Western Blot, and expression levels of VCAM-1 mRNA were detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** On the 14th day after modeling, no obvious repair was seen in the refractory group, and the number of fibroblasts was small. The wounds in the *Shixiang Paste* group had been repaired. On the 7th day after modeling, the expression of VCAM-1 in the *Shixiang Paste* group was lower than that in the refractory group, and the expressions of NF- κ B p65, p-NF- κ B p65 and VCAM-1 mRNA in the rb-bFGF group and the *Shixiang Paste* group were lower than those in the refractory group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the rb-bFGF group, the relative expression of VCAM-1 mRNA in the *Shixiang Paste* group was decreased ($P < 0.01$). On the 14th day after modeling, compared with the refractory group, the relative expressions of VCAM-1, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65 and VCAM-1 mRNA in the rb-bFGF group and the *Shixiang Paste* group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the rb-bFGF group, the relative expressions of VCAM-1, NF- κ B p65 and VCAM-1 mRNA in the *Shixiang Paste* group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Shixiang Paste* could promote repair of diabetic refractory wound, inhibiting expressions of VCAM-1, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65 and VCAM-1 mRNA in wounds might be one of the mechanisms.

Keywords diabetes; chronic refractory wounds; *Shixiang Paste* (石香膏); vascular cell adhesion molecule-1; nuclear factor- κ B p65

(收稿日期: 2019-07-17; 修回日期: 2019-12-08)

[编辑: 王利芬]