

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.06.013

# 皮粘散及其拆方外用对慢性皮肤溃疡模型大鼠创面愈合及创面组织 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响

宋玮<sup>1</sup>, 陈倩倩<sup>1</sup>, 唐宋琪<sup>2</sup>, 王楷<sup>1</sup>, 陈明岭<sup>1</sup>, 江英培<sup>1</sup>, 肖敏<sup>✉</sup>

1. 成都中医药大学, 四川省成都市金牛区十二桥路37号, 610075; 2. 海南医学院

**[摘要]** **目的** 探讨皮粘散治疗慢性皮肤溃疡的可能作用机制及配伍意义。**方法** 将24只SD大鼠随机分为模型组、皮粘散组、水牛皮组、硼砂组, 每组6只。各组大鼠通过冰醋酸涂抹缺损创面制作慢性皮肤溃疡大鼠模型。造模后皮粘散组、水牛皮组、硼砂组分别予以0.2 g药粉均匀地涂抹在溃疡部位, 每天换药1次, 连续干预21天; 模型组不做处理。分别在给药前以及给药的第7、14、21天记录大鼠皮肤溃疡创面面积, 计算创面愈合率, 并进行溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织评分; 末将给药次日采用HE染色观察皮肤组织全层的病理变化; 免疫荧光检测大鼠局部溃疡组织中血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、Ⅲ型胶原蛋白(Collagen Ⅲ)的表达; RT-qPCR法检测大鼠皮肤溃疡创面组织Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关基因[Wnt家族蛋白4(Wnt4)、连环蛋白 $\beta$ 1(Ctnnb1)、G1/S-特异性周期蛋白-D1(Ccnd1)、神经钙黏素(Cdh2)] mRNA表达水平。**结果** 与本组前一时间点比较, 皮粘散组、水牛皮组和硼砂组给药第7、14、21天创面面积、皮肤溃疡主要症状积分均降低, 给药第14、21天创面愈合率升高( $P<0.05$ )。与模型组同时间点比较, 皮粘散组给药第7、14、21天的创面面积及皮肤溃疡主要症状积分均明显降低、创面愈合率明显升高( $P<0.05$ )。给药第21天, 皮粘散组CD31、Collagen Ⅲ免疫荧光可见荧光信号强, 且排列一致性较好; HE染色可见胶原纤维排列更加紧密, 炎性细胞浸润显著减少, 多量新生毛细血管形成; Wnt4、Ctnnb1、Ccnd1、Cdh2 mRNA表达显著增加( $P<0.05$ )。与皮粘散组同时间点比较, 水牛皮组及硼砂组给药第7、14、21天创面面积均增大、创面愈合率降低( $P<0.05$ ); 硼砂组给药第7、14、21天溃疡色泽积分、溃疡肉芽组织积分均显著升高, 给药第14、21天溃疡分泌物积分升高( $P<0.05$ )。HE染色可见水牛皮组及硼砂组较皮粘散组炎性细胞浸润显著增加, 且硼砂组较水牛皮组炎性细胞浸润更加严重。硼砂组CD31、Collagen Ⅲ荧光信号弱于水牛皮组; 硼砂组Wnt4、Ctnnb1、Ccnd1、Cdh2 mRNA表达较皮粘散组降低( $P<0.05$ )。**结论** 皮粘散对大鼠慢性皮肤溃疡创面有较好的治疗作用, 且水牛皮与硼砂配伍具有协同作用, 其作用机制可能与调节Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 从而上调创面组织中CD31、Collagen Ⅲ的表达有关。

**[关键词]** 慢性皮肤溃疡; 皮粘散; 创面愈合; Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路

慢性皮肤溃疡(chronic skin ulcer, CSU)是皮肤组织缺损、液化、感染坏死的一种体表常见病、多发病<sup>[1]</sup>。临床上创伤、周围血管病、微生物感染、糖尿病、放疗、恶性肿瘤等多种疾病均可并发慢性皮肤溃疡<sup>[2]</sup>。目前现代医学多采用清创换药、高压氧、真空辅助封闭、生物制剂、激光、干细胞

移植等治疗方法<sup>[2]</sup>, 但效果并不十分理想。四川文氏皮外科流派为全国首批中医学术流派传承工作室建设单位。皮粘散是该流派第三代传人文琢之先生治疗皮肤慢性溃疡的经典外用处方, 其在缩小溃疡面积、缩减皮损深度、减少分泌物、缓解疼痛、缩短疗程等方面具有明显优势<sup>[3-5]</sup>。实验研究<sup>[6-8]</sup>发现, 皮粘散能够促进皮肤溃疡组织胶原纤维及肉芽组织生长, 抑制促炎因子分泌, 进而促进慢性皮肤溃疡愈合。创面的愈合可分为炎症期、增生期、重塑期, 血管的生成位于增生期。血小板-内皮细胞

**基金项目:**国家自然科学基金(82004380);四川省科技厅应用基础研究项目(2019YJ0613);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(QJRC2021007)

✉ 通讯作者:luckyamy2005@163.com

黏附分子 (CD31) 是新生血管内皮细胞的表面标志物, 而胶原蛋白Ⅲ (Collagen Ⅲ) 的合成则处在创面修复的重塑期<sup>[9-10]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在组织重构、组织损伤修复、组织纤维化和伤口愈合中有重要作用, 与创面愈合有紧密联系<sup>[11]</sup>。在前期研究的基础上, 本研究从 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路及 CD31、Collagen Ⅲ 角度观察皮粘散及其拆方对慢性皮肤溃疡大鼠模型皮肤溃疡创面愈合的影响, 进一步探讨皮粘散的配伍意义, 为中医临床皮肤病选方用药提供实验依据。本实验通过成都中医药大学动物实验伦理委员会审查 (编号: 2017-02)。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量为 (200±20)g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物合格证号: SYXK (川) 2020-225。动物饲养于成都中医药大学动物中心清洁级动物房, 温度 22~25℃, 湿度 50%~70%, 12 h 明暗循环, 自由饮水进食。

### 1.2 药物

皮粘散组成: 水牛皮 10 g、硼砂 10 g; 拆方分为水牛皮组, 用水牛皮 10 g; 硼砂组, 用硼砂 10 g。以上药材由成都中医药大学附属医院制剂室提供, 使用中药粉碎机制成细粉, 过 120 目筛, 密封备用。

### 1.3 主要试剂及仪器

青霉素钾 (批号: 20201016), 哈药集团有限公司; 硫化钠 (批号: 20191210)、冰醋酸 (批号: 20190325), 国药集团化学试剂有限公司; 戊巴比妥钠 (批号: 20180716), 天津市大茂化学试剂厂; 呋喃西林 (批号: 20190513), 苏州第五制药厂; 抗 Collagen Ⅲ 抗体 (货号: ab7778)、抗 CD31 抗体 (货号: ab182981)、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 货号: ab182981)、羊抗兔 IgG H&L (货号: ab150077), 英国 Abcam 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号: RE-03011), 成都福际生物技术有限公司; iScript™ cDNA 合成试剂盒 (货号: 1708891)、Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix (货号: 1725274), 美国 BIO-RAD 公司。

高速冷冻离心机 (H1850R 型), 长沙湘仪检测设备有限公司; 漩涡混匀器 (XW-80A 型), 海门其林贝尔仪器制造有限公司; 组织破碎仪 (Bioprep-6 型), 北京奥盛科技发展有限公司; 摊片机 (HI1210 型)、切片机 (RM2245 型)、冰冻切片机 (CM1860 型)、包埋机 (EG1150 型), 德国 Leica 公司; 全自

动封闭式组织脱水机 (JSD-QD 型)、病理组织漂烘仪 (PHY-Ⅲ 型), 常州中威电子仪器有限公司; 全自动染色机 (ST5010 型)、正置显微镜 (DM500 型)、正置荧光显微镜 (DM3000 型)、微量核酸蛋白分析仪 (N50t 型), 德国 Implen 公司; 荧光定量 PCR 仪 (CFX Connect 型)、PCR 分析软件 (CFX Manager™ Software 3.1), 美国 Bio-Rad 公司; 梯度 PCR 仪 (A300 型), 杭州朗基科学仪器有限公司; 统计作图软件 (GraphPad Prism 9.0.0), 美国 Graph-Pad Software。

### 1.4 分组及干预方法

24 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为模型组、皮粘散组、水牛皮组、硼砂组, 每组 6 只。造模前肌注青霉素钾溶液 (4000 U/只), 连续 4 天, 预防感染。将大鼠背部剃毛, 以 8% 硫化钠脱毛, 面积约 3 cm×3 cm, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉 (0.3 ml/100 g), 在相应皮肤制备一处 1.5 cm×2 cm 的长方形创面; 接着按印记范围剪去全层皮肤及皮下结缔组织, 避开较大血管, 深至浅筋膜, 造成缺损性创面; 以 50% 冰醋酸溶液 (0.2 ml/cm<sup>2</sup>) 涂抹创面每天 1 次, 连续 7 天, 形成慢性皮肤溃疡模型<sup>[12]</sup>。大鼠表现出喜静、体寒, 且创面发白、分泌物清稀量多, 可以判定为慢性皮肤溃疡模型成功<sup>[13]</sup>。各组大鼠于造模成功后即开始给药, 给药前用生理盐水棉球将溃疡创面清洗干净, 轻拭去分泌物, 以 1:5000 呋喃西林溶液清洁创面。按照《药理学实验方法学》中“人与大鼠体表面积折算的等效剂量比率表”<sup>[14]</sup>换算, 皮粘散组、水牛皮组、硼砂组分别将各药物 0.2 g 均匀涂抹在溃疡部位, 模型组不做处理。均以 2 层无菌纱布覆盖, 医用胶布粘贴。按上述方法每天换药 1 次, 连续干预 21 天。

### 1.5 观察指标与方法

1.5.1 大鼠溃疡面积及创面愈合率 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析大鼠给药前以及给药第 7、14、21 天的大鼠溃疡情况, 计算溃疡创面面积及创面愈合率。创面愈合率= (给药前创面面积-未愈合创面面积)/给药前创面面积×100%。

1.5.2 大鼠溃疡主要症状积分 参考《中药新药临床研究指导原则 (试行)》<sup>[15]</sup> 中相关标准拟定: 1) 溃疡色泽: 红润计 0 分, 暗红计 2 分, 灰白计 4 分, 紫黑计 6 分; 2) 溃疡分泌物: 无计 0 分, 少量计 2 分, 中等量计 4 分, 量多计 6 分; 3) 溃疡肉芽组织: 生长迅速计 0 分, 生长较快计 2 分, 生长缓

慢计 4 分, 无生长计 6 分。分别于大鼠给药前及给药第 7、14、21 天评分 1 次, 分数越高症状越重。

1.5.3 大鼠皮肤组织病理学检测 末次给药的第二天, 各组大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉 (0.3 ml/100 g), 脱颈处死, 然后取溃疡局部组织或新鲜肉芽组织, 按照组织病理学方法制备石蜡切片, 常规 HE 染色, 光学显微镜下观察皮肤组织全层的病理变化。

1.5.4 大鼠局部溃疡组织 CD31、Collagen III 表达检测 冰冻切片固定、漂洗后, 10% 山羊血清封闭, 将一抗 (CD31、Collagen III) 均按照比例 (1:500) 进行稀释并 4℃ 孵育过夜, 滴加二抗 (1:500), 再滴加 DAPI (1:1000)。采用荧光显微摄影系统对切片进行图像采集, 应用图像分析系统分析 CD31、Collagen III 阳性表达面积。

1.5.5 大鼠皮肤溃疡创面组织 Wnt 家族蛋白 4 (Wnt4)、连环蛋白  $\beta$ 1 (Ctnnb1)、G1/S-特异性周期蛋白-D1 (Cend1)、神经钙黏素 (Cdh2) mRNA 表达 采用总 RNA 提取试剂盒提取组织中总 RNA, 采用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度, A260/A280 值, A260/A230 值。采用 iScript™ cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为模板 cDNA。采用 Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒进行 qPCR 反应。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成, Wnt4 上游 GCGTAGCCT-TCTCACAGTCCTTTG, 下游 CTTCCTGCCAGCCTC-GTTGTTG, 产物长度 104 bp; Ctnnb1 上游 ACAAG-CCACAGGACTACAAGAAACG, 下游 TCAGCAGTC-TCATTCCAAGCCATTG, 产物长度 91 bp; Cend1 上游 GAGGCGGATGAGAACAAGCAGATC, 下游 GG-AGGGTGGGTTGGAAATGAACTTC, 产物长度 96 bp; Cdh2 上游 TGAAGAAGGTGGAGGAGAGGAAGAC, 下游 TACTGTGGCTCAGCGTGGATAGG, 产物长度 138 bp;  $\beta$ -actin 上游 TGTCACCAACTGGGACGATA, 下游 GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA, 产物长度 165 bp。PCR 单个样本各设置 3 个重复孔上机检测, 统计学分析取平均 Ct 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 以  $\beta$ -actin 为内参, 分析目的基因相对表达量。

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 计量资料均符合正态分布, 用均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 Tukey 法, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠不同时间皮肤溃疡创面面积及创面愈合率比较

表 1 示, 给药前各组大鼠溃疡创面面积差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与本组前一时间点比较, 各组不同时间点创面面积比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。各组给药第 14 天时均较本组给药第 7 天时创面愈合率升高, 给药第 21 天均较本组给药 14 天时创面愈合率升高 ( $P<0.05$ )。给药第 7、14、21 天时, 与模型组同时时间点比较, 皮粘散组、水牛皮组、硼砂组创面面积均明显减小, 创面愈合率升高 ( $P<0.05$ ); 与皮粘散组同时时间点比较, 水牛皮组、硼砂组创面面积均较大, 创面愈合率低 ( $P<0.05$ ); 且硼砂组在给药第 7、14、21 天创面面积均大于水牛皮组, 创面愈合率均低于水牛皮组 ( $P<0.05$ )。

### 2.2 各组大鼠不同时间皮肤溃疡主要症状积分比较

表 2 示, 给药前各组大鼠溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织积分差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与本组前一时间点比较, 模型组给药第 7 天溃疡分泌物积分降低, 给药第 14、21 天溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织积分均降低 ( $P<0.05$ ); 皮粘散组、水牛皮组、硼砂组给药第 7、14、21 天溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织积分均明显降低 ( $P<0.05$ )。与模型组同时时间点比较, 皮粘散组各时间点溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织积分均降低 ( $P<0.05$ ); 水牛皮组仅给药第 7、14、21 天溃疡色泽积分降低, 给药第 14、21 天溃疡分泌物积分降低, 给药第 21 天溃疡肉芽组织积分降低 ( $P<0.05$ ); 硼砂组各时间点溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织积分差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与皮粘散组同时时间点比较, 水牛皮组各时间点溃疡色泽、溃疡分泌物、溃疡肉芽组织积分差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 硼砂组给药第 7、14、21 天时溃疡色泽积分和溃疡肉芽组织积分较高, 给药第 14、21 天时溃疡分泌物积分较高 ( $P<0.05$ )。与水牛皮组同时时间点比较, 硼砂组给药第 21 天时溃疡色泽、溃疡分泌物和溃疡肉芽组织积分均较高 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 各组大鼠皮肤溃疡 HE 染色结果

图 1 示, 给药第 21 天模型组可见大量纤维组织增生, 伴有大量炎性细胞浸润, 少量新生毛细血管形成。与模型组比较, 皮粘散组胶原纤维排列更加紧密, 炎性细胞浸润显著减少, 大量新生毛细血管

表 1 各组大鼠不同时间皮肤溃疡组织创面面积及愈合率比较

Table 1 Comparison of wound area and healing rate of skin ulcer tissue in each group at different timepoints (x̄±s)

| 组别   | 时间       | 鼠数 | 创面面积/mm <sup>2</sup>               | 愈合率/%                             |
|------|----------|----|------------------------------------|-----------------------------------|
| 模型组  | 给药前      | 6  | 297.17±5.78                        | —                                 |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 280.17±3.66 <sup>a)</sup>          | 5.68±2.77                         |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 188.33±5.64 <sup>a)</sup>          | 36.61±2.01 <sup>a)</sup>          |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 123.83±6.04 <sup>a)</sup>          | 58.34±1.59 <sup>a)</sup>          |
| 皮粘散组 | 给药前      | 6  | 296.83±6.94                        | —                                 |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 221.83±4.41 <sup>a) b)</sup>       | 25.21±3.06 <sup>b)</sup>          |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 59.01±6.32 <sup>a) b)</sup>        | 80.13±1.99 <sup>a) b)</sup>       |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 16.02±8.61 <sup>a) b)</sup>        | 94.61±2.89 <sup>a) b)</sup>       |
| 水牛皮组 | 给药前      | 6  | 299.33±2.94                        | —                                 |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 232.67±5.75 <sup>a) b) c)</sup>    | 22.27±1.93 <sup>b) c)</sup>       |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 125.01±4.62 <sup>a) b) c)</sup>    | 58.24±1.52 <sup>a) b) c)</sup>    |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 62.67±6.71 <sup>a) b) c)</sup>     | 79.07±2.23 <sup>a) b) c)</sup>    |
| 硼砂组  | 给药前      | 6  | 297.33±5.85                        | —                                 |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 261.83±4.26 <sup>a) b) c) d)</sup> | 11.91±1.98 <sup>b) c) d)</sup>    |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 133.54±9.94 <sup>a) b) c) d)</sup> | 45.56±2.67 <sup>a) b) c) d)</sup> |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 73.71±1.08 <sup>a) b) c) d)</sup>  | 68.94±1.95 <sup>a) b) c) d)</sup> |

注：a) 与本组前一时间点比较，P<0.05；b) 与模型组同时时间点比较，P<0.05；c) 与皮粘散组同时时间点比较，P<0.05；d) 与水牛皮组同时时间点比较，P<0.05。

表 2 各组大鼠不同时间皮肤溃疡主要症状积分比较

Table 2 Comparison of main symptom scores of skin ulcers in each group at different timepoints (分, x̄±s)

| 组别   | 时间       | 鼠数 | 溃疡色泽                          | 溃疡分泌物                         | 溃疡肉芽组织                        |
|------|----------|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 模型组  | 给药前      | 6  | 5.33±1.21                     | 5.67±0.52                     | 5.00±0.63                     |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 4.83±0.75                     | 4.66±0.52 <sup>a)</sup>       | 4.17±0.75                     |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 3.33±0.82 <sup>a)</sup>       | 3.50±0.55 <sup>a)</sup>       | 3.17±0.98 <sup>a)</sup>       |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 2.83±0.75 <sup>a)</sup>       | 2.50±1.05 <sup>a)</sup>       | 1.83±0.40 <sup>a)</sup>       |
| 皮粘散组 | 给药前      | 6  | 5.33±0.82                     | 5.50±0.55                     | 4.83±0.75                     |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 3.33±0.81 <sup>a) b)</sup>    | 3.67±0.82 <sup>a) b)</sup>    | 2.83±0.75 <sup>a) b)</sup>    |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 1.67±0.52 <sup>a) b)</sup>    | 2.00±0.63 <sup>a) b)</sup>    | 1.50±1.22 <sup>a) b)</sup>    |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 1.01±0.89 <sup>a) b)</sup>    | 0.50±0.55 <sup>a) b)</sup>    | 0.50±0.55 <sup>a) b)</sup>    |
| 水牛皮组 | 给药前      | 6  | 5.17±0.75                     | 5.67±0.52                     | 5.00±0.63                     |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 3.67±0.72 <sup>a) b)</sup>    | 4.00±0.63 <sup>a)</sup>       | 3.33±0.82 <sup>a)</sup>       |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 1.83±0.75 <sup>a) b)</sup>    | 2.50±0.55 <sup>a) b)</sup>    | 2.33±0.52 <sup>a)</sup>       |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 1.17±0.98 <sup>a) b)</sup>    | 1.00±0.89 <sup>a) b)</sup>    | 0.83±0.75 <sup>a) b)</sup>    |
| 硼砂组  | 给药前      | 6  | 5.33±0.52                     | 5.51±0.84                     | 5.17±0.75                     |
|      | 给药第 7 天  | 6  | 4.33±0.82 <sup>a) c)</sup>    | 4.33±0.82 <sup>a)</sup>       | 3.83±0.75 <sup>a) c)</sup>    |
|      | 给药第 14 天 | 6  | 2.67±0.81 <sup>a) c)</sup>    | 3.17±0.98 <sup>a) c)</sup>    | 3.00±0.89 <sup>a) c)</sup>    |
|      | 给药第 21 天 | 6  | 2.17±0.41 <sup>a) c) d)</sup> | 2.00±0.63 <sup>a) c) d)</sup> | 1.67±0.82 <sup>a) c) d)</sup> |

注：a) 与本组前一时间点比较，P<0.05；b) 与模型组同时时间点比较，P<0.05；c) 与皮粘散组同时时间点比较，P<0.05；d) 与水牛皮组同时时间点比较，P<0.05。

形成。水牛皮组、硼砂组较皮粘散组炎性细胞浸润明显，且硼砂组较水牛皮组炎性细胞浸润更加严重。

2.4 各组大鼠皮肤溃疡组织中 CD31、Collagen Ⅲ 蛋白表达比较

图 2 示，模型组未见 CD31 阳性荧光信号（绿色）；皮粘散组可见多个 CD31 阳性荧光信号，并形成管腔类结构；水牛皮组有少量 CD31 阳性荧光信号，硼砂组 CD31 荧光信号弱于水牛皮组。图 3 示，模型组 Collagen Ⅲ 阳性荧光信号（绿色）较弱，排列紊乱；皮粘散组 Collagen Ⅲ 阳性荧光信号强，排列一致性较好；水牛皮组 Collagen Ⅲ 阳性荧光信号较强，排列较好；与水牛皮组比较，硼砂组

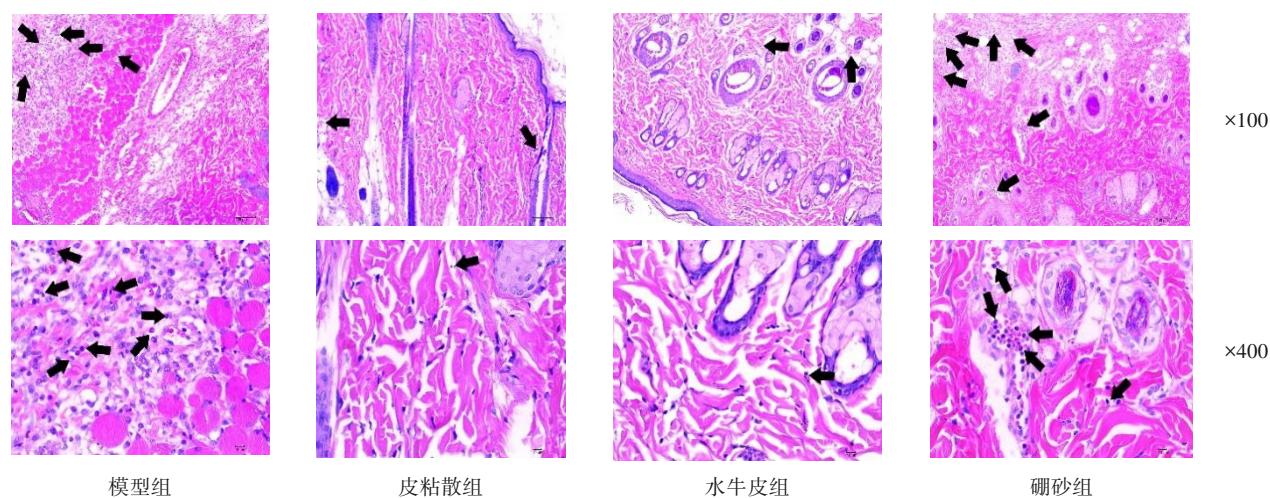
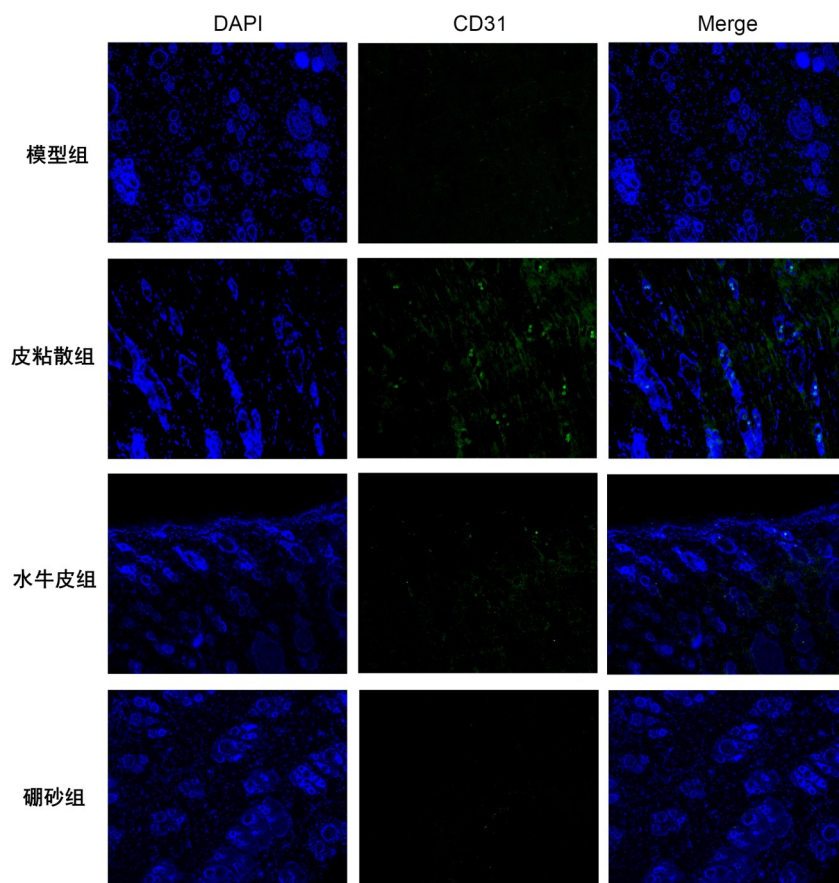


图 1 各组大鼠皮肤溃疡组织 HE 染色结果

Figure 1 HE staining of the skin ulcer tissues in each group



注: DAPI, 4',6-二脒基-2-苯基吡啶; CD31, 血小板-内皮细胞黏附分子; Merge 为蓝色荧光与红色荧光的融合荧光。

图 2 各组大鼠皮肤溃疡组织 CD31 表达免疫荧光染色结果

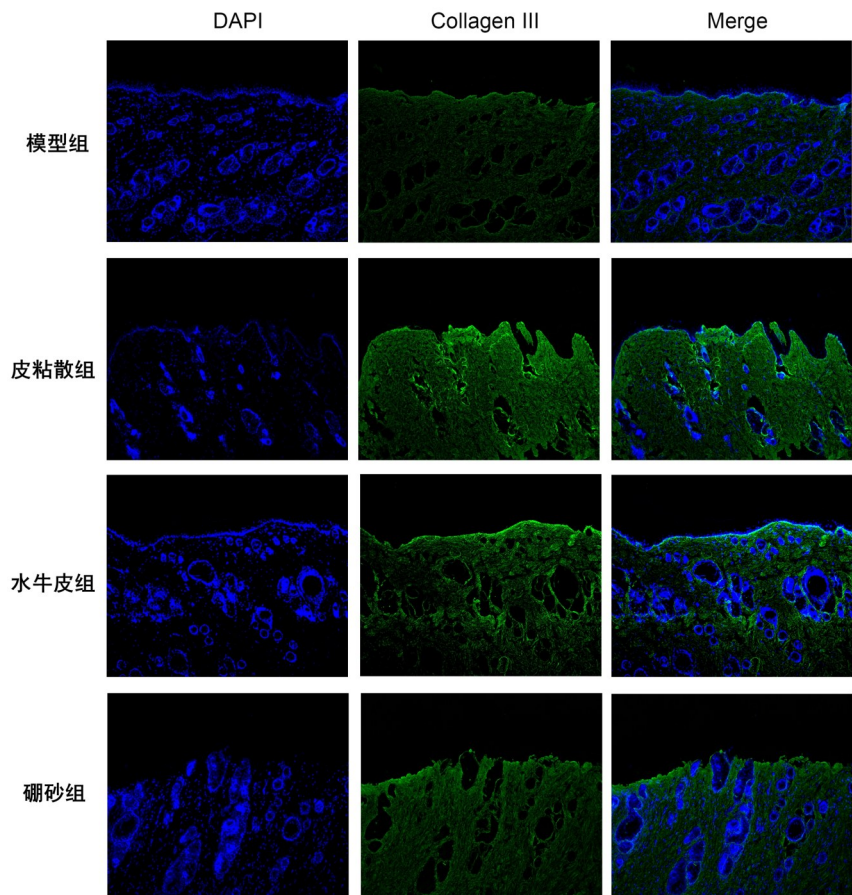
Figure 2 Immunofluorescence staining of CD31 expression in skin ulcer tissues in each group

Collagen III 阳性荧光信号较弱, 排列紊乱。

## 2.5 各组大鼠皮肤溃疡创面组织 Wnt4、Ctnnb1、Cend1、Cdh2 mRNA 表达比较

表 3 示, 与模型组比较, 皮粘散组、水牛皮组、硼砂组 Wnt4、Ctnnb1 mRNA 表达显著升高,

皮粘散组和水牛皮组 Cend1、Cdh2 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与皮粘散组比较, 水牛皮组及硼砂组 Wnt4、Ctnnb1、Cend1、Cdh2 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与水牛皮组比较, 硼砂组 Wnt4、Ctnnb1、Cdh2 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。



注：DAPI,4',6-二脒基-2-苯基吲哚；Collagen Ⅲ,胶原蛋白Ⅲ；Merge 为蓝色荧光与红色荧光的融合荧光。

图3 各组大鼠皮肤溃疡创面组织Collagen Ⅲ表达免疫荧光染色结果

Figure 3 Immunofluorescent staining of Collagen Ⅲ expression in skin ulcer wound tissue in each group

表3 各组大鼠皮肤溃疡组织创面组织Wnt4、Ctnnb1、Cend1、Cdh2 mRNA表达比较

| 组别   | Wnt4                            | Ctnnb1                          | Cend1                        | Cdh2                         |
|------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 模型组  | 1. 10±0. 11                     | 1. 02±0. 93                     | 0. 79±0. 12                  | 1. 04±0. 12                  |
| 皮粘散组 | 2. 55±0. 13 <sup>a)</sup>       | 1. 96±0. 58 <sup>a)</sup>       | 2. 02±0. 11 <sup>a)</sup>    | 2. 24±0. 06 <sup>a)</sup>    |
| 水牛皮组 | 2. 15±0. 10 <sup>a) b)</sup>    | 1. 29±0. 32 <sup>a) b)</sup>    | 1. 06±0. 14 <sup>a) b)</sup> | 1. 66±0. 79 <sup>a) b)</sup> |
| 硼砂组  | 1. 65±0. 97 <sup>a) b) c)</sup> | 1. 12±0. 69 <sup>a) b) c)</sup> | 0. 93±0. 08 <sup>b)</sup>    | 1. 09±0. 05 <sup>b) c)</sup> |

注：Wnt4，Wnt家族蛋白4；Ctnnb1，连环蛋白β1；Cend1，G1/S-特异性周期蛋白-D1；Cdh2，神经钙黏素。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与皮粘散组比较， $P<0.05$ ；c) 与水牛皮组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

皮肤溃疡属于中医学“疮疡”“痈疮”“顽疮”“席疮”的范畴。《外科启玄》载：“夫疮疡者，乃疮之总名也。疮者伤者，肌肉腐坏，痛痒苦楚，腐烂而成，故名曰疮也。”<sup>[16]</sup>《外科枢要》亦载：“痈疮生于两腠，初起赤肿，久而腐溃或津淫搔痒，破而脓水淋漓。”<sup>[17]</sup>慢性皮肤溃疡病程迁延难愈，往往病情更为复杂，多见于糖尿病坏疽、压疮、坏疽性脓皮病等慢性疾病并发症。四川文氏皮外科流派医家根据慢性皮肤溃疡局部皮损肉芽暗淡、腐肉难

脱等特征，认为其核心病机为正虚不复，湿腐凝聚，血脉阻滞，余毒留恋，病程中往往因虚感邪，邪毒致瘀，瘀阻伤正，化腐致损，临证要善于辨清“邪实”（湿热、瘀血、毒邪）与“正虚”（气血亏虚）的主次关系<sup>[18]</sup>。徐大椿《医学源流记》中云：“外科之法最重外治”，故通过外治法驱邪外出乃治疗慢性皮肤溃疡的重要手段，其中“以皮治皮”通过选取皮部药材治疗皮肤疾患<sup>[19]</sup>。皮粘散即是“以皮治皮”的代表性方剂，其由干象皮粉、硼砂组成。然而，现今临床已禁止使用象皮作为药物，

因此寻找其替代药品十分有必要。《证类本草》载：“水牛皮胶，细研为散，涂敷疮上”<sup>[20]</sup>。前期本团队研究发现，用水牛皮替代象皮组成的皮粘散方对大鼠慢性创面有较好的治疗作用，可减少分泌物，促进创面愈合<sup>[21]</sup>。硼砂甘咸而凉，能解毒防腐，外用可收化皮损余腐。《本草汇言》载：“用本品研细末，放真菜油内浸之，每次服油一小盏，可解毒食，并治恶疮疔毒”<sup>[22]</sup>。现代药理研究发现，硼砂具有一定的防腐作用，同时外用治疗溃疡、脓肿时还能起到较强的抑菌作用<sup>[23]</sup>。水牛皮血肉有情之品与甘咸化腐的硼砂合用，既祛湿利水又防腐护肤，共同发挥“以皮治皮”的效果。

本研究结果显示，与本组前一时间点比较，皮粘散组、水牛皮组和硼砂组大鼠给药第 7、14、21 天时大鼠创面面积及皮肤溃疡主要症状积分均有不同程度减小，且以皮粘散组最优，水牛皮组优于硼砂组；另外，各时间点皮粘散组创面愈合率高于水牛皮组、硼砂组，水牛皮组高于硼砂组，说明水牛皮与硼砂配伍后能有效愈合创面，全方优于拆方给药，且水牛皮优于硼砂单独给药。HE 染色结果也佐证了此结论，皮粘散可显著促进大鼠慢性皮肤溃疡组织的胶原纤维形成、毛细血管新生，抑制炎症细胞浸润，其作用优于拆方给药，且水牛皮组较硼砂组炎症细胞浸润减轻。由此可见，水牛皮和硼砂协同增效，二者属于相须配伍。各组不同时间点比较结果显示，各给药组创面面积及各主要症状积分随着给药时间的延长，各指标改善越明显，提示具有一定的长效作用。

血管再生是慢性皮肤溃疡愈合中不可或缺的一环，为皮肤溃疡增生期中的重要组成部分<sup>[24]</sup>。CD31 是新生血管内皮细胞的表面标志，通过对 CD31 荧光染色可评价溃疡创面组织中新生血管的形成情况<sup>[25]</sup>。本研究结果显示，皮粘散可促进溃疡创面组织中 CD31 表达，促进创面组织血管新生，改善创面局部血供，其作用优于拆方给药。正常皮肤真皮的间质成分主要是 Collagen I 和 Collagen III，在皮肤损伤早期主要是 Collagen III 增生，以后逐渐被 Collagen I 所替代<sup>[26]</sup>。因此，在皮肤溃疡创面愈合过程中，创面组织 Collagen III 的表达量与皮肤愈合的结局密切相关。本研究结果可知，模型组大鼠 Collagen III 荧光信号表达较弱，且排列紊乱，相对的水牛皮组、硼砂组则 Collagen III 荧光信号较强，胶原蛋白排列较好，而皮粘散组既荧光信号强，又排列一致性较好，说明单用水牛皮或单用硼

砂均达不到皮粘散的效果，两者合用时，不仅能使 Collagen III 表达上升，同时使其排列整齐一致，利于大鼠慢性皮肤溃疡的愈合，两者相辅相成。

经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路被认为具有促进创面血管新生及上皮重塑等多方面的功能，在创面修复早期的肉芽组织增生阶段可能起到关键作用<sup>[27]</sup>。当皮肤损伤时，Wnt 蛋白通过自分泌或旁分泌作用与位于细胞膜的相关受体结合，抑制  $\beta$ -catenin 的磷酸化，使  $\beta$ -catenin 在胞内集聚，最后游离  $\beta$ -catenin 进入细胞核内与 T 细胞因子/淋巴细胞因子结合，激活信号通路，启动靶基因 Ccnd1、Cdh2 等的表达<sup>[28]</sup>。 $\beta$ -catenin 是 Wnt 经典信号通路中的核心关键，其在胞质中的含量高低直接影响着核内靶基因的表达，对表皮干细胞增殖分化起一定作用<sup>[29]</sup>。本实验结果显示，皮粘散组大鼠创面组织 Wnt4、Ctnnb1 mRNA 水平较模型组明显上升，下游靶基因 Ccnd1、Cdh2 mRNA 表达较模型组上升，由此说明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化， $\beta$ -catenin 入核激活下游靶基因转录，促进了表皮干细胞的增殖分化，这也是皮粘散组大鼠创面愈合率提高、创面愈合时间缩短的内在机制，可为皮肤溃疡创面愈合的治疗提供思路。

综上所述，皮粘散两药成方配伍后，不仅能保留单味药物本身对促进大鼠慢性皮肤溃疡愈合的作用，而且能相辅相成，增强疗效，促进溃疡组织新生血管、胶原纤维生长，其作用机制可能与激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中 Wnt4、Ctnnb1、Ccnd1、Cdh2 mRNA 表达有关。皮粘散成分复杂，本次实验仅将 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路作为研究靶点，但在 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路传导路径中，Hippo 信号通路、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 通路等都与其有密切联系<sup>[30]</sup>。因此，对于皮肤溃疡修复过程中其他相关信号通路及机制仍需深入研究。

## 参考文献

- [1] KAMAL KS, GITESH US, SHAMENDRA AS, et al. Pentazocine-induced skin ulcers[J]. Am J Med Sci, 2020, 359(3):182-183.
- [2] RAYMAN G, VAS P, DHATARIYA K, et al. Guidelines on use of interventions to enhance healing of chronic foot ulcers in diabetes (IWGDF 2019 update) [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2020, 36 (Suppl 1):e3283. doi: 10.1002/dmrr.3283.
- [3] 陈明岭, 谢德娟, 周继福. 皮粘散治疗慢性皮肤溃疡 73 例临床观察[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3):728-729.

- [4]肖敏,贾方方,艾儒棣.改良皮粘散对慢性皮肤溃疡愈合的影响[J].四川中医,2020,38(2):50-52.
- [5]罗祥.皮粘散治疗老年人慢性皮肤溃疡的临床疗效观察[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [6]陈儒康.皮粘散对慢性皮肤溃疡大鼠组织中CD34、胶原蛋白I、IV及TGF- $\beta$ 1表达的影响及溃疡面积的观察研究[D].成都:成都中医药大学,2020.
- [7]肖敏,贾方方,艾儒棣.改良皮粘散对慢性皮肤溃疡大鼠ERK/MAPK通路表达的影响[J].四川中医,2019,37(12):47-49.
- [8]李宇轩,陈明岭,王宇.皮粘散对慢性皮肤溃疡大鼠模型EGF、bFGF影响的研究[J].时珍国医国药,2014,25(1):49-50.
- [9]CHOI YH, KIM MG, DONG-HYUN A, et al. Immunohistochemical expression of stem cell markers during the wound healing process of cutaneous burn[J]. J Korean Surg Soc, 2010, 79(1):1-7.
- [10]KUIVANIEMI H, TROMP G. Type III collagen (COL3A1): gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases[J]. Gene, 2019, 70(7):151-171.
- [11]赵亚男,刘明,张玥,等.愈疡灵软膏对糖尿病溃疡大鼠Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的影响[J].中医杂志,2016,57(10):879-883.
- [12]SISSCO M, MUSTOE TA. Animal models of ischemic wound healing. Toward an approximation of human chronic cutaneous ulcers in rabbit and rat[J]. Methods Mol Med, 2003, 78(4):55-65.
- [13]徐凝,吴闽枫,段彦娟.慢性皮肤溃疡动物模型的研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(5):704-707.
- [14]魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1698.
- [15]郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行)[M].北京:中国中医药科技出版社,2002:58.
- [16]申拱宸.外科启玄[M].贺菊乔,校注.北京:人民卫生出版社,1955:12.
- [17]薛己.外科枢要[M].吴玄有,校注.北京:人民卫生出版社,1983:143.
- [18]谭强,方明,艾儒棣,等.四川文氏皮科流派从脾胃论治中医外科疾病经验[J].时珍国医国药,2018,29(5):1227-1228.
- [19]肖敏,罗祥,杨婷,等.以皮治皮法治疗老年人慢性皮肤溃疡临床疗效观察[J].四川中医,2021,39(5):144-146.
- [20]唐慎微.证类本草[M].尚志钧,校注.北京:华夏出版社,1993:326.
- [21]陈儒康,陈倩倩,秦悦思,等.皮粘散对慢性皮肤溃疡大鼠创面组织中胶原蛋白I、IV表达及促进创面愈合的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2022,36(1):37-41.
- [22]倪朱谟.本草汇言[M].戴慎,陈仁寿,虞舜,校注.上海:上海科学技术出版社,2005:830.
- [23]翟卫红,马富春,晁宏梅.中药硼砂研究进展[J].动物医学进展,2007,28(8):87-91.
- [24]刘衍哲,徐佳,文根,等.皮肤创面愈合过程中神经与血管的相互作用[J].国际骨科学杂志,2021,42(1):30-34.
- [25]汪涟,郭菲,闵定宏,等.炎症与修复相关细胞因子基因在临床慢性难愈性创面中差异表达的分析[J].中华烧伤杂志,2019,35(1):18-24.
- [26]宋若男,马红伟,栾小艺,等.重组人源III型胶原蛋白乳膏剂的制备及其促创伤愈合药效学评价[J].药物生物技术,2022,29(2):121-126.
- [27]赵亚男,刘明,张玥,等.Wnt信号通路 with 皮肤创面愈合的关系[J].现代生物医学进展,2015,15(11):2173-2176,2184.
- [28]杨蕾蕾,杨晓.调节表皮干细胞增殖和分化的信号通路[J].生命科学,2008,20(2):237-240.
- [29]BIENZ M.  $\beta$ -Catenin: a pivot between cell adhesion and wnt signalling[J]. Curr Biol, 2005, 15(2):R64-R67.
- [30]SZETO SG, NARIMATSU M, LU M, et al. YAP/TAZ are mechanoregulators of TGF- $\beta$ -Smad signaling and renal fibrogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(10):3117-3128.

## Effects of External Administration of *Pizhan Powder* (皮粘散) and Its Disassembled Formula on Wound Healing and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway in Wound Tissue of Chronic Skin Ulcer Model Rats

SONG Wei<sup>1</sup>, CHEN Qianqian<sup>1</sup>, TANG Songqi<sup>2</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, CHEN Mingling<sup>1</sup>, JIANG Yingpei<sup>1</sup>, XIAO Min<sup>1</sup>

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075; 2. Hainan Medical University

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Pizhan Powder* (皮粘散) in the treatment of chronic skin ulcer and the formula composition significance. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into model group, *Pizhan Powder* group, buffalo skin group, and borax group, with six rats in each group. The rat model of chronic skin ulcer was made by smear of glacial acetic acid on defective wounds. After modeling, 0.2 g of corresponding medicinal powder was given to the wounds in the *Pizhan Powder* group, the buffalo skin group and the borax group, re-

spectively, while the model group was not treated, and the dressing was changed once a day for 21 consecutive days. Before treatment and on the 7th, 14th, and 21st day of medication, the skin ulcer wound area, ulcer color, ulcer secretion and granulation tissue of rats were recorded, and the healing rate was calculated. On the next day of last treatment, hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the full-thickness pathological changes of skin tissue, and immunofluorescence was used to detect the expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31) and type III collagen (Collagen III) in local ulcer tissue of rats; the mRNA expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway related genes in skin ulcer wound tissue of rats, including Wnt family protein 4 (Wnt4), catenin  $\beta$ 1 (Ctnnb1), G1/S-specific cyclin-D1 (cyclin-D1), and neural cadherin (Cdh2) were detected by real-time fluorescence quantitative (RT-qPCR). **Results** Compared to those measured at the previous timepoint in the same group, the ulcer wound area and the main symptom scores of skin ulcers in the *Pizhan Powder* group, buffalo skin group and borax group significantly decreased on the 7th, 14th and 21st day, and the healing rate significantly increased on the 14th and 21st day ( $P < 0.05$ ). Compared to those in the model group measured at the same timepoint, the ulcer wound area and the main symptom scores of skin ulcers on the 7th, 14th and 21st day in the *Pizhan Powder* group significantly decreased, while the healing rate increases ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence showed strong fluorescence signals of CD31 and Collagen III with good alignment on the 21st day in the *Pizhan Powder* group; HE staining showed that collagen fibers were more closely arranged, and inflammatory cell infiltration was significantly reduced, with formulation of a large amount of new capillaries; the mRNA expressions of Wnt4, Ctnnb1, Ccnd1 and Cdh2 significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared to those in the *Pizhan Powder* group measured at the same timepoint, the ulcer area of buffalo skin group and borax group on the 7th, 14th, and 21st day significantly increased, and the healing rate significantly decreased ( $P < 0.05$ ); the color score and granulation tissue score of ulcers in the borax group significantly increased on the 7th, 14th, and 21st day, and the ulcer secretion score on the 14th and 21st day increased ( $P < 0.05$ ). HE staining showed that the infiltration of inflammatory cells in the buffalo skin group and the borax group significantly increased compared to that in the *Pizhan Powder* group, and more increases were seen in the borax group. Immunofluorescence showed weak fluorescence signals of CD31 and Collagen III in the borax group than the buffalo skin group; and mRNA expressions of Wnt4, Ctnnb1, Ccnd1 and Cdh2 significantly decreased in the borax group than the *Pizhan Powder* group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Pizhan Powder* has a good therapeutic effect on chronic skin ulcer wound of rats, and the combination of buffalo skin and borax has a coordination effect. The mechanism of action may be related to the up-regulation of the expression of CD31 and Collagen III in wound tissues by regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Keywords** chronic skin ulcer; *Pizhan Powder* (皮粘散); wound healing; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

(收稿日期: 2022-07-29; 修回日期: 2022-10-31)

[编辑: 邓媛]