

四方木皮提取物对皮肤急性创伤模型大鼠的治疗作用研究

陈柳燕^{1,3}, 梁 潘¹, 覃武金¹, 吴传梅¹, 韦金凤¹, 李永华^{1,2*}, 汝 梅^{1,2*}

1. 广西中医药大学 药学院, 广西 南宁 530200

2. 广西高校中药民族药资源保护与利用重点实验室, 广西 南宁 530200

3. 梧州市人民医院, 广西 梧州 543000

摘要: **目的** 研究四方木皮水提物、醇提物对皮肤急性创伤模型大鼠的治疗作用及其潜在作用机制。**方法** 制备四方木皮水提物、醇提物的冻干粉末, 并与凡士林混合形成软膏; 将 144 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组, 模型组, 凡士林 (每只 0.1 g) 组, 京万红软膏 (阳性对照, 每只 0.1 g) 组, 四方木皮水提物低、高剂量 (每只 0.1 g 软膏, 含生药 0.05、0.10 g) 组, 四方木皮醇提物低、高剂量 (每只 0.1 g 软膏, 含生药 0.05、0.10 g) 组, 每组各 18 只。除对照组外, 用打孔器制成直径为 1.5 cm 的 2 个去皮破损伤口, 用 0.9% 氯化钠溶液清洗伤口形成机械损伤动物模型。造模后给药, 对照组和模型组不涂任何药物。观察治疗后第 3、7、14 天大鼠的伤口愈合率; 利用 HE 和 Masson 染色观察其创伤组织病理变化; 试剂盒法检测创伤组织中羟脯氨酸含量; 采用 ELISA 法检测血清中白细胞介素 (IL)-4、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、血管内皮生长因子 (VEGF)、表皮生长因子 (EGF) 水平; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测创伤组织中磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (AKT1)、内皮型 NO 合成酶 (eNOS)、EGF、VEGF 的基因表达水平。**结果** 与模型组比较, 四方木皮水提物、醇提物低剂量组可显著提高大鼠创面愈合率 ($P < 0.05$ 、 0.01), 明显降低创面愈合初期炎症细胞浸润程度, 促进创面处羟脯氨酸的分泌 ($P < 0.05$ 、 0.01), 促进胶原纤维在肉芽组织中的形成; 水提物和醇取物的低剂量组均能显著提高血清中 IL-4、IL-10、VEGF、EGF 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并降低 IL-6 和 TNF- α 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 同时在创伤部位提高 PI3K、AKT1、VEGF 和 EGF 的基因水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低 eNOS 基因水平 ($P < 0.01$)。**结论** 四方木皮提取物对急性创伤有一定的治疗作用, 其作用机制可能与激活 EGFR-PI3K/Akt 通路相关。

关键词: 四方木皮; 皮肤急性创伤; 表皮生长因子 (EGF); 磷脂酰肌醇激酶 (PI3K); 蛋白激酶 B (AKT1)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)04-0844-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.006

Therapeutic effect of *Saracae Cortex* extract on acute skin trauma model rats

CHEN Liuyan^{1,3}, LIANG Pan¹, QIN Wujin¹, WU Chuanmei¹, WEI Jinfeng¹, LI Yonghua^{1,2}, RU Mei^{1,2}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China.

2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Resources, Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530200, China

3. The People's Hospital of Wuzhou, Wuzhou 543000, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of *Saracae Cortex* extract on acute skin trauma model rats and its potential mechanism. **Methods** The freeze-dried powder of aqueous and alcohol extracts of *Saracae Cortex* was prepared and mixed with petrolatum to form ointments. A total of 144 SPF-grade SD rats were randomly divided into the control group, model group, petrolatum group (0.1 g per rat), Jingwanhong ointment group (positive control, 0.1 g per rat), low and high-dose aqueous extract of *Saracae Cortex* groups (0.1 g per rat, containing 0.05 and 0.10 mg of crude medicine, respectively), and low and high-dose alcohol extract of *Saracae Cortex* groups (0.1 g per rat, containing 0.05 and 0.10 mg of crude medicine, respectively), with 18 rats in each group. Except

收稿日期: 2024-08-23

基金项目: 广西壮族自治区大学生创新创业训练计划项目 (S202210600057, S202310600104); 广西壮族自治区中医药管理局中医药民族医药自筹科研项目 (gzzcl127)

作者简介: 陈柳燕, 硕士研究生, 研究方向为中药资源。E-mail: 1712871963@qq.com

***通信作者:** 汝 梅, 副教授, 从事中药资源开发与应用研究。E-mail: rumei2015@163.com

李永华, 研究员, 硕士生导师, 从事中药质量控制与中药资源开发研究。E-mail: liyonghua185@126.com

for the control group, two 1.5 cm diameter full-thickness skin wounds were created using a puncher, and the wounds were washed with 0.9% sodium chloride solution to establish a mechanical injury animal model. After modeling, the drugs were administered. The control group and the model group were not treated with any drugs. The wound healing rates of rats on the 3rd, 7th, and 14th days after treatment were observed. HE and Masson staining were used to observe the pathological changes of the wound tissues. The content of hydroxyproline in the wound tissues was detected by a kit. The levels of cytokines such as interleukin (IL)-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , vascular endothelial growth factor (VEGF), and epidermal growth factor (EGF) in the serum were detected by ELISA. The gene expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), EGF, and VEGF in the wound tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with the model group, the low-dose groups of aqueous and alcohol extracts of *Saracae Cortex* significantly increased the wound healing rate of rats ($P < 0.05, 0.01$), significantly reduced the degree of inflammatory cell infiltration in the early stage of wound healing, and promoted the secretion of hydroxyproline at the wound site ($P < 0.05, 0.01$), and promoted the formation of collagen fibers in granulation tissue. The low-dose groups of both aqueous and alcohol extracts significantly increased the levels of IL-4, IL-10, VEGF, and EGF in the serum ($P < 0.05, 0.01$), and decreased the levels of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05, 0.01$). At the same time, they increased the gene levels of PI3K, AKT1, VEGF, and EGF at the wound site ($P < 0.05, 0.01$), and decreased the gene level of eNOS ($P < 0.01$). **Conclusion** *Saracae Cortex* extract has a certain therapeutic effect on acute trauma, and its mechanism may be through the activation of EGFR-PI3K/Akt pathway.

Key words: *Saracae Cortex*; acute skin trauma; epidermal growth factor (EGF); phosphatidyl inositol kinase (PI3K); protein kinase B (AKT1)

四方木皮 *Saracae Cortex* 是豆科无忧花属植物中国无忧花 *Saraca dives* Pierre 的干燥树皮, 是 1 种重要的壮药材^[1], 据民间记载, 其具有消除炎症、收缩溃口的功效, 能快速消除静脉曲张和静脉炎引起的酸麻胀痛, 恢复肢体健康状态^[2]。皮肤创伤是指在各种损伤因素作用下造成的皮肤完整性的损害, 甚至正常功能的破坏。创伤愈合由凝血期、炎症期和修复期这 3 个时期组成, 且任何 1 个时期的障碍都可能导致愈合延迟甚至不能使真皮伤口愈合^[3-4]。本课题组前期实验发现四方木皮具有一定的抗炎镇痛作用^[5-6], 对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均具有较强的抑菌作用, 因此可能具有促进伤口愈合的潜能。但是, 目前还未见关于四方木皮对急性皮肤创伤的保护作用及作用机制的文献报道。因此, 本实验研究四方木皮 2 种提取物对皮肤急性创伤模型大鼠的治疗作用, 并从调控表皮生长因子受体 (EGFR)-磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路角度探索其机制, 为其进一步开发提供参考。

1 材料

1.1 药材及水提物、醇提物的制备

四方木皮购于广西玉林药市的偏冷奇中草药材店, 经广西中医药大学药学院郭敏副教授鉴定为豆科中国无忧花 *S. dives* Pierre 的树皮。将四方木皮粉碎成粗粉, 过 24 目筛。分别以纯水、70%乙醇进

行回流提取, 分别先浸泡 1 h, 回流提取 3 次, 先后加入 10、8、6 倍量, 每次提取 1 h, 合并滤液, 浓缩成浸膏, 冷冻干燥后, 粉碎成粉末, 过 100 目筛 (6 号筛), 为四方木皮水提物及醇提物冻干粉, 保存于 -20°C 冰箱, 备用。四方木皮水提物和醇提物的提取率分别为 7.4%、11.8%, 含总酚酸约 2.23%、3.48%。

1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (200 ± 20) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004, 饲养于广西中医药大学科学实验中心解剖楼 6 楼 (符合医学实验动物环境设施要求), 温度 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%~75%、昼夜交替 12 h/12 h, 采用动物专用饲料饲养, 适应性喂养 5 d, 不限制饮食。动物实验经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准 (批准号 DW20240103-005)。

1.3 主要试剂与仪器

白凡士林 (批号 211201, 南昌华鑫医药化工有限公司); 京万红软膏 (批号 Z12020440, 天津达仁堂京万红药业有限公司); 羟脯氨酸 (批号 20220831, 南京建成生物工程研究所); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 EK382-96T)、血管内皮生长因子 (VEGF) ELISA 试剂盒 (批号 A38320444)、白细胞介素 (IL)-4 ELISA 试剂盒 (批

号 A30420231)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 A30620743)、IL-10 ELISA 试剂盒(批号 A31020435)、表皮生长因子(EGF) ELISA 试剂盒(批号 A39320455)均购于杭州联科生物技术股份有限公司。

JXFSTPRP-CL 冷冻匀浆仪(上海净信实业发展有限公司); MH-2 漩涡振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); TC10KB 电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); Q53169Q 移液枪(德国 Eppendorf 公司); ELGA 纯水仪(南宁市荣元生物科技有限公司); CPX96 BIO-RAD 伯乐实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 仪(上海艾研生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 受试样品的制备

将四方木皮水提物的冻干粉末与凡士林混合, 形成质量分数为 7.4% 的软膏作为高剂量组, 质量分数为 3.7% 的软膏作为低剂量组; 将四方木皮醇提物的冻干粉末与凡士林混合, 形成质量分数为 11.8% 的软膏作为高剂量组, 质量分数为 5.9% 的软膏作为低剂量组。

2.2 模型构建和给药

将 144 只 SPF 级 SD 大鼠按体质量随机分为对照组, 模型组, 凡士林(每只 0.1 g) 组, 京万红软膏(阳性对照, 每只 0.1 g) 组, 四方木皮水提物低、高剂量(每只 0.1 g, 含生药 0.05、0.10 g) 组, 四方木皮醇提物低、高剂量(每只 0.1 g, 含生药 0.05、0.10 g) 组, 每组各 18 只。造模前 24 h 去除大鼠背部的毛发, 酒精消毒, 观察确认无红肿、破皮等损伤情况。除对照组外, 其余 7 组用 3% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹) ip 麻醉后, 用碘酒、75% 乙醇局部消毒手术区, 于耳连线中间向下 4 cm 处以脊柱中部两侧相同距离的位置进行定位。用打孔器制成直径为 1.5 cm 的 2 个去皮破损伤口, 用 0.9% 氯化钠溶液清洗伤口形成机械损伤模型^[7]。给药时, 先用 0.9% 氯化钠溶液清洗创面, 其中模型组不涂任何药物, 其他各给药组分别外涂所对应的组别药物, 每只 0.1 g; 涂药后, 用 2 层纱布敷贴在伤口处, 用无刺激、透气胶布固定。分批次于造模后第 3、7、14 天进行创面拍摄和取样, 每组每个批次 6 只。

2.3 观察创面愈合情况

创伤后第 3、7、14 天, 采用简易拍照设备, 在固定的拍照位置拍摄创口照片, 用刻度尺贴附于创口旁边, 将照片上传至计算机, 通过图像处理软件

Image J 测量大鼠的愈合面积, 其中造模成功后的面积即为原创面面积。

愈合率 = (原始面积 - 现在面积) / 原始面积

2.4 创面新生肉芽组织羟脯氨酸测定和常规病理学分析

拍照结束后, 立即用无菌组织剪剪下创面中心至创面边缘正常皮肤 5.0 mm 间的全层皮肤组织。将一部分组织分装标记置于冻存管中, 存放在 -80 °C, 并按照试剂盒的说明检测羟脯氨酸含量。另一部分组织用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后, 经过脱水、包埋和切片处理, 制成石蜡切片。进行 HE 和 Masson 染色, 使用生物显微镜观察大鼠皮肤创面的病理变化, 以及纤维新生、血管生成、毛囊和汗腺等皮肤附属器的生成情况。

2.5 血液中炎症因子和生长因子的 ELISA 分析

取大鼠腹主动脉血液, 室温放置 30 min, 然后移到 4 °C 冰箱静置 2 h。将其在 3 000 r·min⁻¹ 的低温条件下离心 15 min, 吸取上清液, 分装血清并保存于 -80 °C 冰箱备用。取出各组大鼠血清, 在冰水浴中解冻, 按照 ELISA 试剂盒的说明书测定血清中炎症因子 IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α、VEGF、EGF 的表达量。

2.6 组织中 EGFR-PI3K/Akt 通路相关因子基因的 qRT-PCR 分析

取“2.4”项下各组大鼠皮肤组织 30 mg 进行均质研磨, 提取其 RNA, 按照反转录试剂盒的说明书方法合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行扩增, 选择 GAPDH 作为内参, 通过 qRT-PCR 检测大鼠皮肤组织中 PI3K、AKT1、内皮型 NO 合成酶(eNOS)、EGF、VEGF 基因的表达水平, 引物序列见表 1。qRT-PCR 反应条件为: 95 °C、2 min, 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 95 °C、15 s, 共 40 个循环, 结果采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

2.7 数据分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行处理, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 若不满足正态分布则采用非参数秩和检验。所有柱状图和线型图用 GraphPad Prism 8.0.1 作图。

3 结果

3.1 大鼠创面愈合情况

大鼠创伤后, 每天观察其愈合情况, 并于第 3、7、14 天测量创口面积。如图 1 所示, 在造模第 1

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向序列 (5'→3')	反向序列 (5'→3')
PI3K	GTTCTTGCGAAGTGAGATAG	CTGCGTGAAGTCCTGTAGC
AKT1	ACTCATTCCAGACCCACGAC	ATCTCCGCACCGTAGAAGC
eNOS	CTGTATGGCTCTGAGACTGGC	GCTCTAGGGATACCACATCGT
EGF	GGCGTGTGCATGTATGTTGAATCC	GTCTCGGTGCTGACATCGTTCTC
VEGF	ACTGGACCCTGGCTTTACTG	ATAGCTGCGCTGGTAGACG
GADPH	CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC	GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT

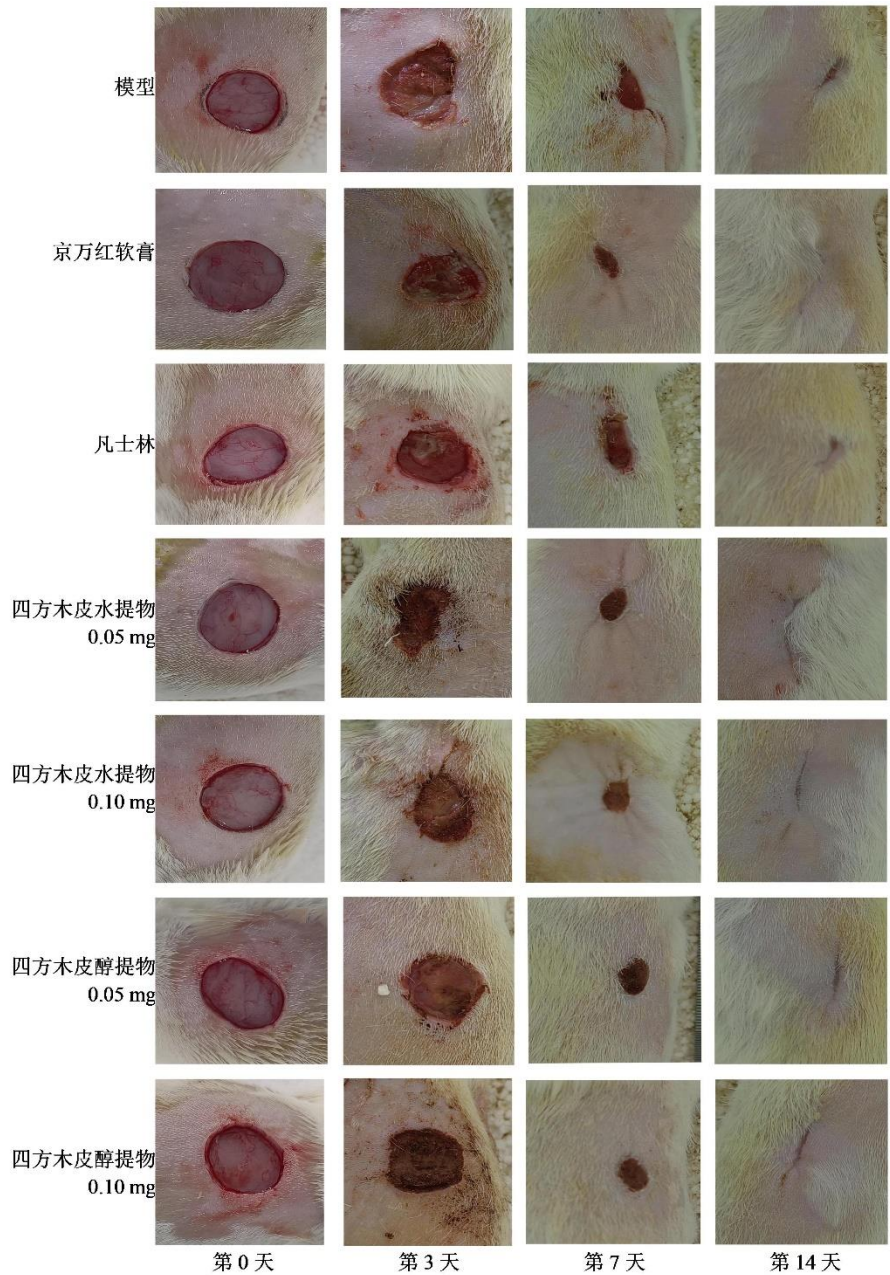


图 1 各组大鼠第 3、7、14 天的创面愈合情况

Fig. 1 Wound healing status of rats in each group on days 3, 7, and 14

天, 各组大鼠均可以自主摄食饮水和行动自如, 没有明显渗血和化脓现象。随着造模时间的延长, 各组大鼠的皮肤创面逐渐愈合。造模第 3 天, 京万红软膏组及四方木皮水提物和醇提物高、低剂量组的大鼠创面均已结痂, 同时可见创面较模型组小; 造模第 7 天, 各组大鼠创面收缩, 且痂壳均已脱落, 肉眼可见模型组和凡士林组的面积较大; 造模第 14 天, 创面继续收缩, 四方木皮水提物低剂量组和京万红软膏组的创面长出了粉嫩的新生组织, 创口表面平整光滑, 且创面处已被毛覆盖。

如表 2 所示, 在第 3 天, 与模型组相比, 京万红

软膏(阳性)组、四方木皮水提物低剂量组和醇提物低剂量组的创面愈合率显著上升($P<0.05$ 、 0.01)。到了第 7 天, 京万红软膏组和四方木皮水提物低剂量组的愈合率高于模型组($P<0.05$ 、 0.01), 其中四方木皮水提物低剂量组的创面愈合率高达 65.25%。而在第 14 天, 四方木皮水提物低、高剂量组、醇提物低剂量组以及京万红软膏组的愈合率均显著高于模型组($P<0.05$ 、 0.01), 结合图 1 的结果, 可以看出这 4 组大鼠的创面基本完全愈合了。结果表明, 四方木皮有促进大鼠创面愈合的作用, 且其促进效果类似于阳性药京万红软膏^[8]。此外, 对比了四方木皮 2 种

表 2 各组大鼠第 3、7、14 天创面愈合率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Wound healing rate of rats in each group on days 3, 7, and 14 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g	愈合率/%		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照	—	—	—	—
模型	—	19.73±8.02	53.88±12.96	92.29±1.29
京万红软膏	0.1	32.37±11.16**	68.73±7.27**	94.25±1.45*
凡士林	0.1	21.28±7.59	56.85±10.23	91.90±1.77
四方木皮水提物	0.05	29.42±5.64*	65.25±4.94*	95.05±1.77**
	0.10	29.22±7.91	59.15±7.41	95.96±0.93**
四方木皮醇提物	0.05	30.49±7.11*	63.49±6.23	94.92±1.64**
	0.10	26.78±5.78	46.81±8.33	93.05±0.96

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

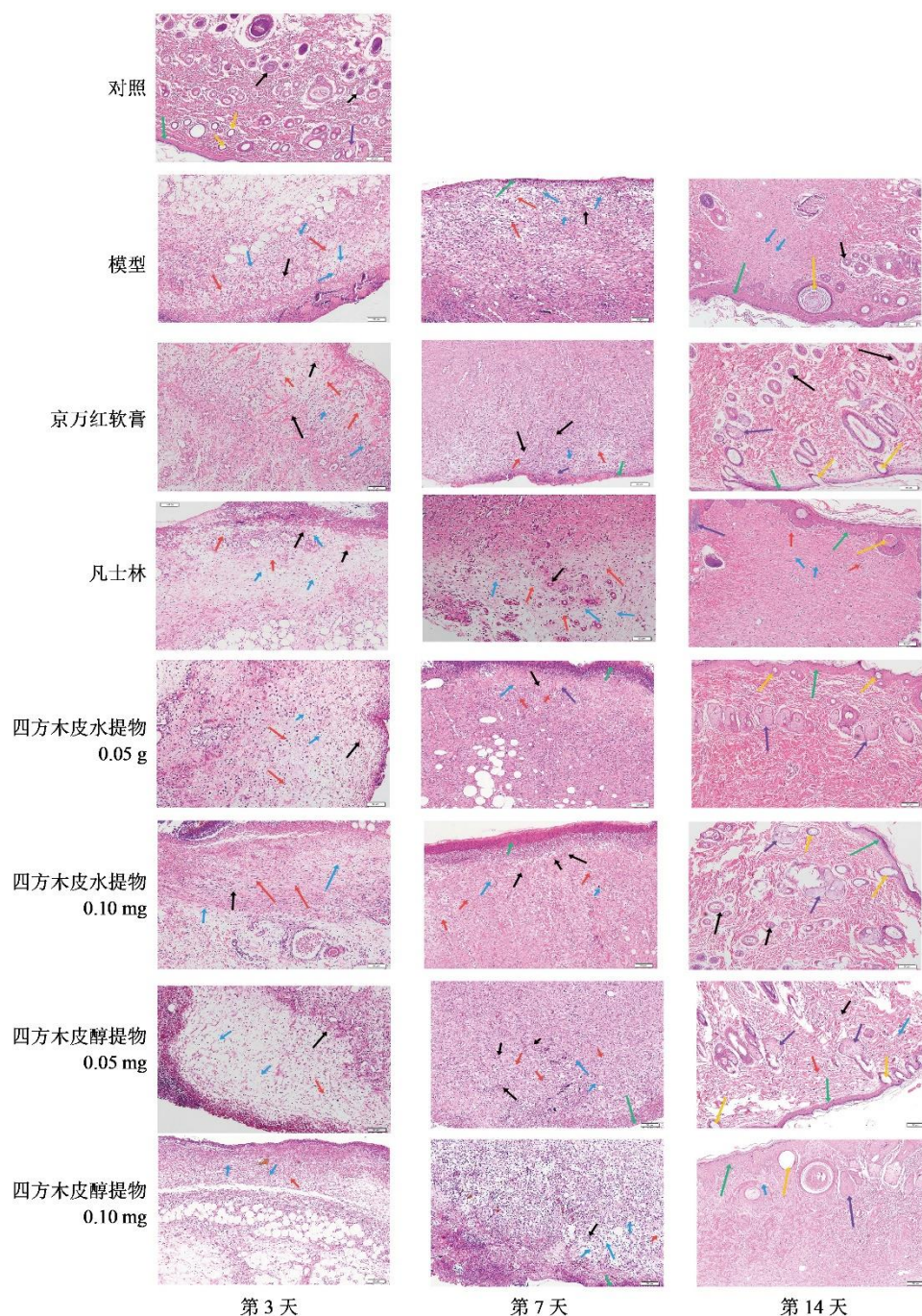
提取物的低、高 2 个剂量组的伤口愈合情况, 发现四方木皮水提物低剂量组效果表现最佳, 其次是四方木皮醇提物低剂量组。

3.2 大鼠组织病理切片分析

3.2.1 HE 染色 正常皮肤因未遭受外力的损害, 组织内炎症细胞和成纤维细胞少见且会聚集大量排列整齐的皮肤附属器和毛囊组, 表皮层光滑平整、厚度适中。在第 3 天, 造模各组大鼠创伤组织中均显现出一定程度的炎症细胞增殖现象, 其中以模型组和凡士林组的创面表现明显, 有大量的炎症细胞浸润, 四方木皮水提物高剂量组和醇提物高剂量组的炎症细胞数量次之, 京万红软膏组、四方木皮水提物低剂量组和醇提物低剂量组的炎症细胞明显减少, 有少许成纤维细胞增殖和新生血管生成。在第 7 天, 造模各组组织中均出现新生毛细血管、炎症细胞和成纤维细胞, 同时, 创口处已被新生表皮覆盖, 其中模型组仍存在较多的炎症细胞, 表皮层薄, 新生毛细血管稀疏。

在第 14 天, 各组均完整上皮化, 与模型组比较, 四方木皮水提物低、高剂量组, 醇提物低剂量组和京万红软膏组有大量排列整齐的皮肤附属器形成, 且发现毛囊的存在。此外, 四方木皮水提物低剂量组的新生表皮最薄, 平整光滑, 皮下附属器及胶原纤维排列紧密有序, 结果见图 2。

3.2.2 Masson 染色 随着创面的愈合, 组织中的胶原纤维会有不同程度的扩增状况, 胶原纤维的扩增又称为胶原沉积, 在 Masson 染色下呈现蓝紫色。创面处胶原纤维的表达水平越高, 胶原沉积现象越明显, 表明创面恢复就越快^[9]。在第 3 天, 与模型组比较, 四方木皮水提物低、高剂量组, 醇提物低剂量组和京万红软膏组中被染成蓝紫色的部位更多, 说明这 4 组大鼠的创面处有较多的新生胶原纤维生长。在第 7 天, 各给药组中大鼠创面组织均出现大量的胶原纤维新生, 而且水提物低、高剂量组的胶原纤维含量大大增多, 肉眼可见蓝紫色均已在表皮附近出现。在第 14 天, 各给药组大鼠的胶原纤



蓝色箭头-炎症细胞浸润; 黑色箭头-新生血管; 红色箭头-成纤维细胞; 绿色箭头-表皮; 紫色箭头-皮肤附属器; 黄色箭头-毛囊。
Blue arrow-inflammatory cell infiltration; black arrow-neovascularization; red arrow-fibroblasts; green arrow-skin; purple arrow-skin appendages; yellow arrow-hair follicle.

图 2 各组大鼠第 3、7、14 天 HE 染色的显微图 (×100)

Fig. 2 Micrographs of HE staining of rats in each group on days 3, 7, and 14 (×100)

维已填充了整个伤口, 与模型组比较, 四方木皮水提取物低、高剂量组、醇提取物低剂量组和京万红软膏组的胶原纤维的深度明显增厚, 结果见图 3。此外, Masson 染色结果与 HE 染色结果一致, 水提取物低剂量组呈现有序的胶原纤维排列。

3.3 大鼠创面羟脯氨酸含量变化分析

胶原纤维的主要化学成分是胶原蛋白, 胶原生成水平可通过羟脯氨酸含量变化来反映^[10]。如表 3 所示, 造模后第 3 天, 创面组织中胶原蛋白刚开始合成, 模型组和各给药组的大鼠创面组织中羟脯氨酸

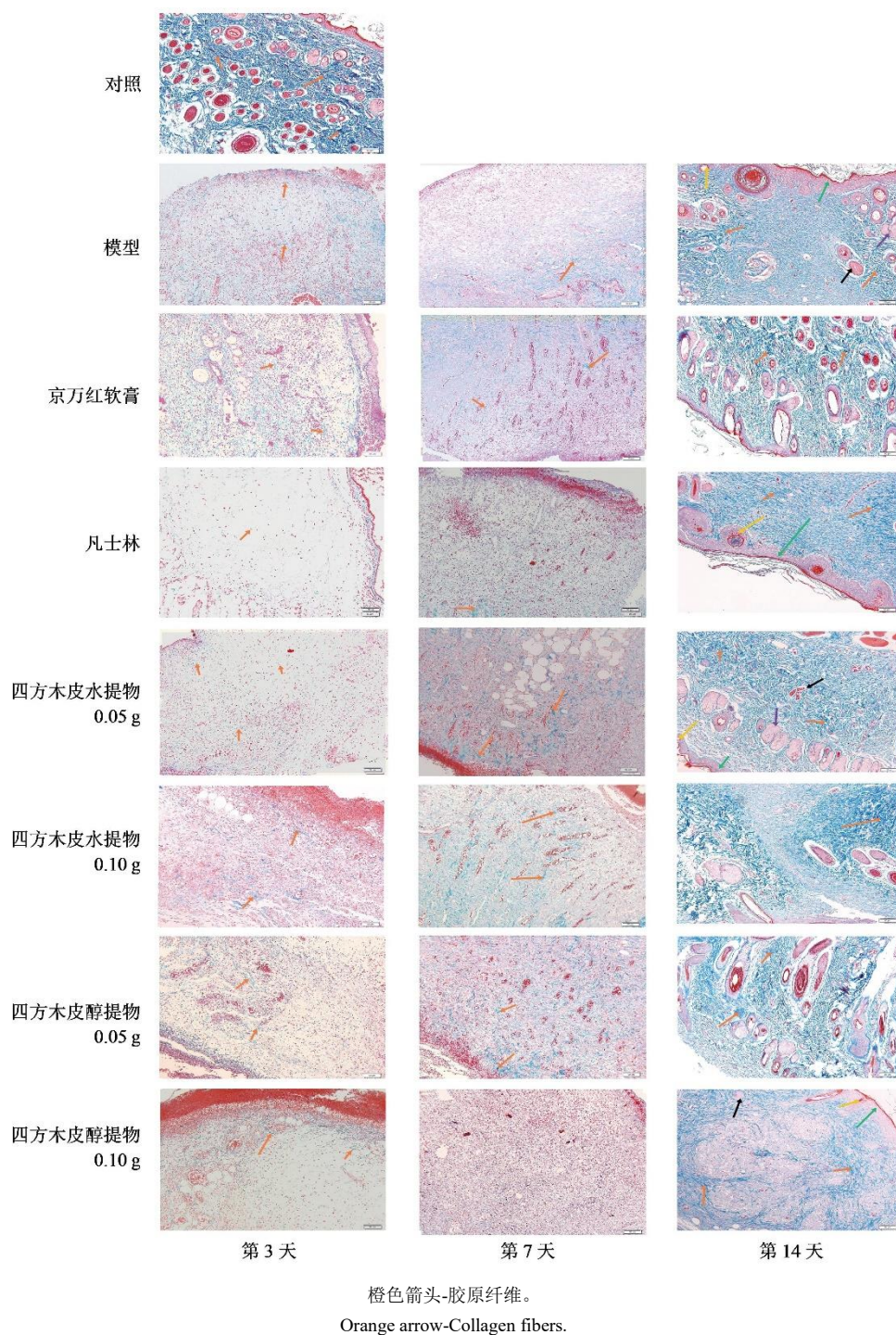


图 3 各组大鼠第 3、7、14 天 Masson 染色的显微图 ($\times 100$)
Fig. 3 Micrographs of Masson staining of rats in each group on days 3, 7, and 14 ($\times 100$)

酸含量显著低于对照组 ($P < 0.01$), 而各给药组创面组织中羟脯氨酸含量显著高于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01); 而造模后的第 14 天, 与第 3 天有类似的结果趋势, 凡士林组除外, 各给药组创面组织中羟脯氨酸含量显著高于模型组 ($P < 0.01$), 与 Masson 染色中胶原纤维含量增多的结果一致, 表明四方木皮

的 2 种提取物通过刺激创面处羟脯氨酸的分泌, 促进肉芽组织中胶原纤维形成, 从而加快伤口收缩和愈合。

3.4 大鼠血清炎症指标分析

如图 4 所示, 对照组大鼠体内的炎症因子分泌较稳定。与对照组比较, 模型组的抗炎因子 IL-4、

表 3 四方木皮提取物对大鼠创面羟脯氨酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of *Saracae Cortex* extract on hydroxyproline content in rat wounds ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/g	羟脯氨酸含量/%		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照	—	2.54±0.38	2.86±0.84	2.54±0.34
模型	—	0.31±0.19 ^{##}	1.77±0.6 ^{##}	1.57±0.28 ^{##}
京万红软膏	0.1	0.65±0.04 ^{####}	2.68±0.52 [*]	2.14±0.33 ^{**}
凡士林	0.1	0.59±0.03 ^{####}	1.52±0.77	1.67±0.44 [#]
四方木皮水提物	0.05	0.58±0.10 ^{##}	1.55±0.76 ^{##}	2.35±0.42 ^{**}
	0.10	0.56±0.13 ^{##}	1.87±0.30 [#]	2.33±0.38 ^{**}
四方木皮醇提物	0.05	0.83±0.24 ^{####}	1.58±0.43 ^{##}	2.30±0.35 ^{**}
	0.10	0.61±0.16 ^{##}	1.56±0.23 ^{##}	2.28±0.24 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。
[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

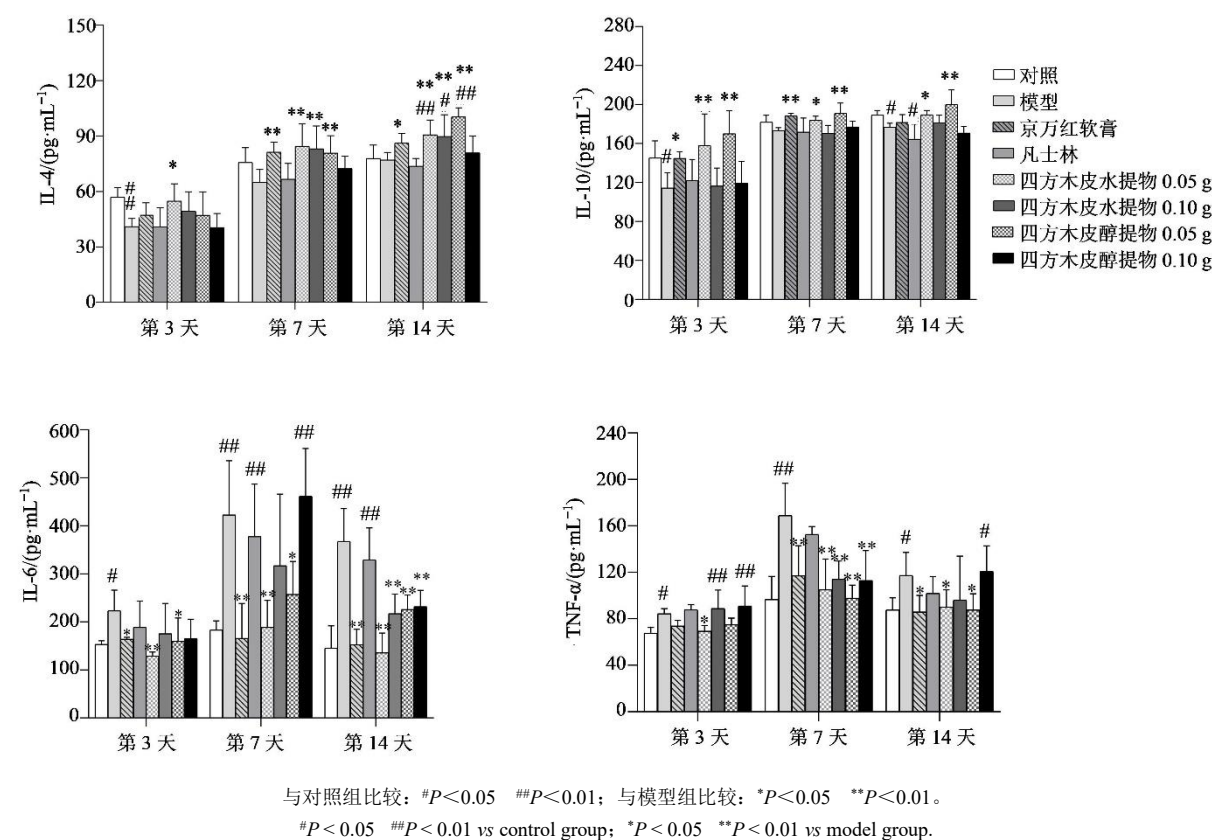


图 4 四方木皮提取物对大鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Effect of *Saracae Cortex* extract on serum inflammatory factors in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

IL-10 均处于低水平表达, 而 IL-6 和 TNF- α 处于高水平表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明创伤后的大鼠体内出现了强烈的炎症反应。与模型组比较, 各给药组均呈 IL-4、IL-10 的表达水平上调, IL-6 和 TNF- α 的表达水平下调趋势, 第 7、14 天水提物和醇提物低剂量组的 4 个炎症指标分泌水平均差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明, 四方木皮提取物通

过提高创面处的炎症因子 IL-4、IL-10 表达量, 以及降低 IL-6 和 TNF- α 的表达量, 来调节机体异常的炎症反应, 从而加快创面愈合速度。

3.5 大鼠血清中生长因子含量变化分析

对照组大鼠生长因子分泌水平较低。造模后第 3 天, 模型组的 VEGF、EGF 水平显著低于对照组 ($P<0.01$), 四方木皮 2 种提取物低剂量组的

VEGF、EGF 表达量显著高于模型组 ($P<0.05$ 、 0.01)。随着天数延长, 各组大鼠体内的生长因子表达逐渐增加, 造模后第 7 天, 2 种提取物低剂量组的 VEGF、EGF 表达量均显著高于模型组 ($P<0.05$ 、 0.01)。造模后第 14 天, 2 种提取物高、低剂量组的

VEGF、EGF 表达量均显著高于模型组 ($P<0.01$), 与水提取物高剂量相比, 两者低剂量组的表达量升高更为明显。见图 5。四方木皮水提取物和醇提取物在伤口愈合过程中促进生长因子 EGF、VEGF 的分泌, 促进上皮细胞的增殖和血管生成, 从而加快创面的愈合。

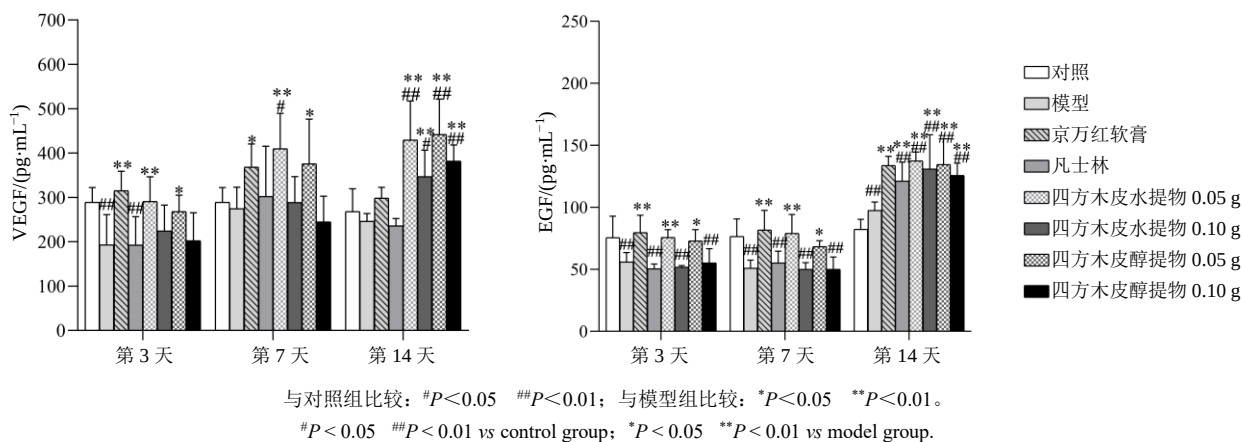


图 5 四方木皮提取物对大鼠创面中生长因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 5 Effect of *Saracae Cortex* extract on content of growth factor in rat wounds ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.6 对 EGFR-PI3K/Akt 信号通路相关因子基因的 qRT-PCR 分析

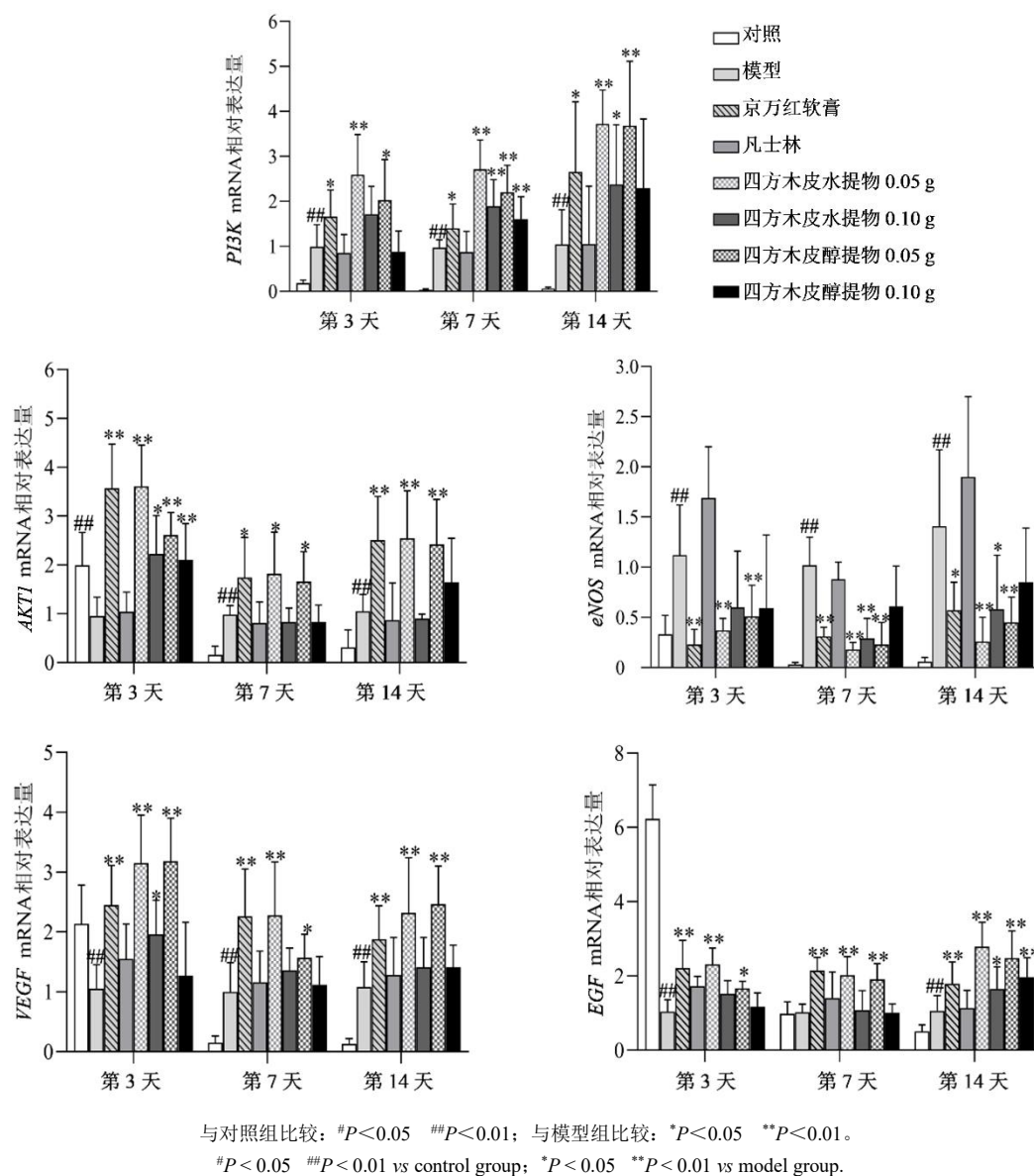
随着大鼠创面的缓慢愈合, 相对于对照组, 模型组的相关因子基因表达水平逐渐增加。与模型组相比, 四方木皮水提取物低剂量组、醇提取物低剂量组和阳性药组在第 3、7、14 天表现出类似趋势, 显著增加了 EGFR-PI3K/Akt 信号通路中 *PI3K*、*AKT1*、*VEGF* 和 *EGF* 基因的表达水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 同时降低了 *eNOS* 的基因表达水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。此外, 水提取物高剂量组的 *AKT1* 和 *VEGF* 表达量仅在第 3 天显著高于模型组, 第 7、14 天的 *PI3K* 表达量高于模型组, *eNOS* 表达量低于模型组, 差异均具有显著性 ($P<0.05$), 见图 6。结果表明, 四方木皮水提取物和醇提取物能够促进大鼠创面处 *PI3K* 和 *AKT1* 基因的表达, 为 EGFR-PI3K/Akt 信号通路的磷酸化提供源源不断的底物, 同时抑制 *eNOS* 的表达, 降低内源性 *eNOS* 的含量, 从而抑制 NO 的生成, 改善创面处的炎症反应。这些作用促使通路下游的激活, 提高 *VEGF* 和 *EGF* 基因的转录水平, 促进新生血管的生成, 从而实现创面的修复。

4 讨论

皮肤创面愈合是一个复杂而有序的动态修复过程, 一般要经过凝血期、炎症期和修复期 3 个阶段。炎症反应是机体自身对外的防御措施, 在整个创面愈合过程中起着关键作用。皮肤损伤后, 炎症

会出现, 并持续到创面完全愈合。IL-4 和 IL-10 作为体内重要的炎症反应抑制因子, 可以对机体内促炎因子的多条分泌途径发挥反作用, 从而减缓炎症程度, 促进创伤组织修复^[11-12]。相反, IL-6 和 TNF- α 是促进炎症反应活跃的关键细胞因子, 能够将更多的免疫细胞和生长因子聚集到炎症部位, 在机体修复和生存过程中发挥着重要作用^[13-14]。成纤维细胞是主要参与创面愈合的细胞, 胶原是新生组织的主要细胞外基质成分, 在修复过程中起着重要作用。成纤维细胞通过增殖来促进胶原的合成、分泌和沉积, 填补皮肤缺损, 胶原的沉积程度越高, 创面恢复的速度越快^[15]。此外, 创面愈合需要各种生长因子以及多条信号网络传导途径在血管新生、胶原合成、表皮重塑等生理过程中进行调节。VEGF 作为一种促进血管生成的因子, 在急性创伤期中表达明显增加, 能够诱导血管内皮细胞的分裂、迁移、增殖和分化, 从而促进血管新生, 为创面提供氧气和营养传递通道, 促进愈合^[16]。在愈合后期, EGF 是主要负责表皮重塑的因子, 促进上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞的增殖和分化^[17]。

本研究采用大鼠急性皮肤创面模型发现, 四方木皮水提取物和醇提取物均能缩短创面愈合时间并提高愈合率。HE 和 Masson 染色结果显示, 在创伤后第 3 和第 7 天, 四方木皮各给药组的成纤维细胞显著增加, 炎症细胞数量略有下降。到第 14 天, 与模

图 6 EGFR-PI3K/Akt 信号通路相关因子基因表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Fig. 6 Gene expression levels of factors related to EGFR-PI3K/Akt signaling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

型组相比, 四方木皮各给药组的胶原纤维排列有序, 形成大量整齐排列的皮肤附属器, 并观察到毛囊的存在。切片分析显示创面羟脯氨酸含量与 Masson 染色结果一致, 表明四方木皮提取物通过刺激羟脯氨酸的分泌促进肉芽组织中胶原纤维的形成, 加速伤口愈合。通过 ELISA 检测发现, 四方木皮可以通过提高创面处抗炎因子 IL-4、IL-10 以及生长因子 VEGF、EGF 的表达量, 降低创面处促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的表达量, 从而调节机体异常的炎症反应, 促进创面的血管新生和肉芽组织成熟, 加快创面愈合速度。Alsarayreh 等^[18]发现西西里漆树果实甲醇提取物通过提高 IL-10 表达量,

同时降低 IL-6 表达量促进糖尿病伤口愈合。Zhang 等^[19]研究了新型肽 NeoPep S 3×10^{-6} 对大鼠模型皮肤伤口修复的影响, 发现其伤口愈合速率显著提高, 跟新型肽 NeoPep S 3×10^{-6} 下调 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的作用有关, 与本实验结果一致。

PI3K/Akt 信号通路主要参与调控细胞增殖、分化、迁移等生物活动, 对细胞有促凋亡与抑凋亡的双重效应^[20]。EGFR-PI3K/Akt 信号通路调控途径之一是通过激活 eNOS, 从而调控血管内皮细胞的迁移; 可通过先后激活其下游底物 eNOS、VEGF, 来调控血管生成^[21]。本研究结果显示, 四方木皮提取物给药组在创面愈合期间 PI3K 和 AKT 基因表达量

较模型组显著增加, *eNOS* 基因表达水平降低, 说明四方木皮提取物给药组能够促进大鼠创面处 *PI3K* 和 *AKT* 基因的转录, 为 EGFR-PI3K/Akt 信号通路磷酸化提供底物, 同时抑制 *eNOS* 的表达, 降低内源性 *eNOS* 的含量, 从而在转录和翻译后修饰等方面发挥抑制 NO 生成的作用, 最终实现改善创面处的炎症作用。通过激活创面组织中 EGFR-PI3K/Akt 信号通路, 使通路下游的 *VEGF* 和 *EGF* 基因转录水平提高, 促进新生血管的生成, 实现创面的修复。

本研究结果表明, 四方木皮水提物和醇提物均具有促进伤口愈合的作用, 作用机制可能与激活 EGFR-PI3K/Akt 通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局编, 兰小云, 滕明新, 韦露译. 广西壮族自治区壮药质量标准-第一卷: 2008 年版 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2017: 460.
Compiled by Guangxi Zhuang Autonomous Region Food and Drug Administration, translated by Lan X Y, Teng M X, Wei L. *Guangxi Zhuang Autonomous Region Zhuang Medicine Quality Standards - Volume 1: 2008 Edition* [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2017: 460.
- [2] 陆小鸿. 堪称良药无忧花 [J]. 广西林业, 2018(3): 38-39.
Lu X H. It's a good medicine [J]. *For Guangxi*, 2018(3): 38-39.
- [3] 王一兵. 创面修复长路漫漫 [J]. 中华烧伤杂志, 2014, 30(2): 100-101.
Wang Y B. It's a long way to go to apprehend wound repair [J]. *Chin J Burns*, 2014, 30(2): 100-101.
- [4] 林雁鸿, 周清清, 李春霖, 等. 创伤修复机制和治疗进展 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(23): 230-232.
Lin Y H, Zhou Q Q, Li C L, et al. Mechanism of wound repair and progress in treatment [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2019, 13(23): 230-232.
- [5] 陈柳燕, 何翠萍, 李斌, 等. 壮药四方木皮化学成分及抗炎镇痛作用研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(3): 26-33.
Chen L Y, He C P, Li B, et al. Study on the chemical constituents and anti-inflammatory and analgesic effects of *Saracae Cortex* from Zhuang medicine [J]. *Res Pract Chin Med*, 2023, 37(3): 26-33.
- [6] 陈柳燕, 吴传梅, 梁潘, 等. 基于斑马鱼模型和网络药理学研究四方木皮的抗炎作用及其机制 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(11): 3070-3080.
Chen L Y, Wu C M, Liang P, et al. Anti-inflammatory effect and its mechanism of *Saracae Cortex* based on zebrafish model and network pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(11): 3070-3080.
- [7] 王爽, 赵宇明, 高新, 等. 美洲大蠊提取物外用乳胶对大鼠烫伤模型的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(9): 2496-2499.
Wang S, Zhao Y M, Gao X, et al. Effect of *Periplaneta americana* extract external emulsion on scald model in rats [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(9): 2496-2499.
- [8] 张密霞, 王景文, 张德生, 等. 京万红软膏对烫伤及创伤大鼠创面愈合、瘢痕形成的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 3007-3010.
Zhang M X, Wang J W, Zhang D S, et al. Effects of Jingwanhong Ointment on wound healing and cicatrization in incision and burn wound rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(8): 3007-3010.
- [9] Mohammed A, Sirajudeen K, Che Hamzah N, et al. *Keladi candik (Alocasia longiloba* Miq.) petiole extracts promote wound healing in a full thickness excision wound model in rats [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2019, 9(4): 140.
- [10] 郭家棋, 郭敏慧, 孔松芝, 等. 积雪草苷-海藻酸钠修复贴的制备及其创伤修复作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4934-4942.
Guo J Q, Guo M H, Kong S Z, et al. Preparation of asiaticoside sodium alginate repair patch and its wound healing effect [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(19): 4934-4942.
- [11] 张慧, 宋旭东, 朱少华, 等. 小鼠皮肤切创 IL-10 和 IL-4 的表达及其与损伤时间关系 [J]. 中国法医学杂志, 2004, 19(5): 280-283.
Zhang H, Song X D, Zhu S H, et al. An immunohistochemical study on the time-dependent expression of IL-10 and IL-4 during skin incised wound healing in mice [J]. *Chin J Forensic Med*, 2004, 19(5): 280-283.
- [12] 吴俊铮, 宋雅娟, 余州, 等. IL-10 在增生性瘢痕中的作用研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2022, 38(4): 368-373.
Wu J Z, Song Y J, Yu Z, et al. Research progress of IL-10 in hypertrophic scar [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2022, 38(4): 368-373.
- [13] 陈勤, 马文龙, 陈柯, 等. 骨炎膏对大鼠感染性创面 TNF- α 和 IL-6 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(13): 1792-1796.
Chen Q, Ma W L, Chen K, et al. Effects of Guyan ointment

- on the expression of TNF- α and IL-6 in rat infected wounds [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(13): 1792-1796.
- [14] 莫小强, 金萌, 唐乾利, 等. 皮肤再生医疗技术对大鼠慢性难愈合创面组织匀浆中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 [J]. 山东医药, 2016, 56(42): 24-27.
- Mo X Q, Jin M, Tang Q L, et al. Effect of MEBT/MEBO on expression of TNF- α and IL-6 in tissue homogenate of chronic non-healing skin wound in rats [J]. Shandong Med J, 2016, 56(42): 24-27.
- [15] 董小鹏, 王丽娟, 赵春霖, 等. 生肌玉红膏对深 II 度烧伤大鼠创面修复的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4): 387-391.
- Dong X P, Wang L J, Zhao C L, et al. Effect of Shengji Yuhong ointment on deep partial-thickness burn wound healing in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2014, 31(4): 387-391.
- [16] 谭倩, 赵鑫, 陈贝, 等. 生长因子在创面愈合中的作用研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(4): 106-110.
- Tan Q, Zhao X, Chen B, et al. Research progress on the role of growth factor in wound healing [J]. Shandong Med J, 2019, 59(4): 106-110.
- [17] Rousselle P, Braye F, Dayan G L. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 146: 344-365.
- [18] Alsarayreh A Z, Oran S A, Shakhanbeh J M. Effect of *Rhus coriaria* L. methanolic fruit extract on wound healing in diabetic and non-diabetic rats [J]. J Cosmet Dermatol, 2022, 21(8): 3567-3577.
- [19] Zhang X R, Pham N C, Ho N T T, et al. NeoPep S: A new generation of AIMP1-derived peptide (AdP) effects on wound healing *in vivo* [J]. In Vivo, 2022, 36(3): 1222-1235.
- [20] 刘东波, 李卫, 何藻鹏, 等. 黄芪甲苷调节 PI3K/AKT/eNOS 信号通路对糖尿病大鼠皮肤缺损的影响 [J]. 中医药导报, 2022, 28(7): 20-26.
- Liu D B, Li W, He Z P, et al. Effects of astragaloside IV regulating PI3K/AKT/e NOS signaling pathway on skin defects in diabetic rats [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 28(7): 20-26.
- [21] 万海山, 代伟宏, 黄泽晓, 等. 杜仲皮水提物对急性骨髓炎大鼠的影响及对 PI3K/AKT-eNOS 通路的干预研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(12): 1978-1982.
- Wan H S, Dai W H, Huang Z X, et al. Effect of water extract of *Eucommiae Cortex* on rats with acute osteomyelitis via PI3K/AKT-ENOS signaling pathway [J]. Cent South Pharm, 2020, 18(12): 1978-1982.

[责任编辑 兰新新]