- bellar granule neurons [J]. *J Neurochem*, 1995, 65: 2425-2431.
- [6] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [7] Mao Y, Yang G Y, Zhou L F, et al. Focal cerebral ischemia in the mouse. Description of a model and effects of permanent and temporary occlusion [J]. *Mol Brain Res*, 1999, 63 (2): 366-370.
- [8] Zeng L H, Zhang W P, Wang R D, et al. Protective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on focal cerebral ischemia in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(2): 148-150.
- [9] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17 (3): 472-476.
- [10] Lundy E F, Solik B S, Frank R S, et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils [J]. *J Pharmacol Methods*, 1986, 16(3): 201-204.
- [11] Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, et al. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30): 18518-18521.
- [12] Du Y, Bales K R, Dodel R C, et al. Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(21): 11657-11662.
- [13] Ovetto S. Chronic administration of a glycine partial agonist alters the expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996, 54(1): 73-77.
- [14] Paul I A. 1-Aminocyclopropane-carboxylates exhibit antidepressant and anxiolytic actions in animal models [J]. *Eur J Pharmacol*, 1991, 203(3): 379-385.
- [15] Huang S J. Pharmacology of a novel neuroprotective agents—GV150926 [J]. *Foreign Med Sci; Pharmacy* (国外医学: 药学分册), 1999, 26(1): 23-26.

烧烫安乳膏对大鼠皮肤深二度烫伤创面愈合的影响

李梅连¹, 吴爱萍¹, 张胜南²

(1. 湖南医药工业研究所, 湖南长沙 410014; 2. 中南大学湘雅医院 烧伤整形科, 湖南长沙 410001)

摘要:目的 探讨烧烫安乳膏对大鼠深二度烫伤的影响。方法 采用大鼠深二度烫伤模型, 创面分别外用高、中、低剂量的烧烫安乳膏, 通过伤后不同时间点创面取材, 检测烫伤创面羟脯氨酸水平、创面愈合面积百分比、愈合时间及观察组织病理学变化, 以基质乳膏作阴性对照, 湿润烧伤膏作阳性对照, 观察烧烫安乳膏对大鼠深二度烫伤创面愈合的影响。结果 创面外用中、高剂量的烧烫安乳膏可以增加创面羟脯氨酸水平, 促进肉芽组织生长, 促进创面局部成纤维细胞生长因子- β_1 (FGF- β_1) 的表达, 缩短愈合时间, 作用与湿润烧伤膏相当。结论 烧烫安乳膏可增强胶原合成, 促进上皮细胞增殖, 加速烫伤创面愈合。

关键词: 烫伤; 创面愈合; 烧烫安乳膏; 羟脯氨酸; 成纤维细胞生长因子

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2005)10-1527-03

Effect of Shaotang' an Cream on deep second degree scald wound healing of rats skin

LI Mei-lian¹, WU Ai-ping¹, ZHANG Sheng-nan²

(1. Hunan Medical Industry Institute, Changsha 410014, China; 2. Department of Burns and Plastics of the First Affiliated Hospital, Central South University, Changsha 410001, China)

Key words: scald; wound healing; Shaotang' an Cream; hydroxyproline; fibroblast growth factor (FGF)

烧烫安乳膏来源于民间秘方, 经科学组方研制而成。其主要组成有紫草、大黄、白芨等, 是一种新开发的创面用药。本实验在大鼠皮肤深二度烫伤创面外用该药, 通过对创面组织羟脯氨酸检测及创面愈合面积百分比、愈合时间、病理形态学的观察, 研究不同剂量的烧烫安乳膏对烫伤创面愈合的促进作用。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器: 烧烫安乳膏(湖南医药工业研究所, 批号 021203), 湿润烧伤膏(北京光明中医烧伤疮疡研究所汕头经济特区美宝制药厂, 批号 020701)。考马斯亮蓝及羟脯氨酸测试盒(南京建成生物工程研究所), 成纤维细胞生长因子- β_1 (FGF-

β_1 单克隆抗体、抗体稀释液、DAB 显色剂及即用型 SABC 试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品。荧光显微镜 (日本), 751 分光光度计 (上海分析仪器总厂), 台式高速冷冻离心机 (太仓市医疗器械厂), 电热恒温水箱 (重庆实验设备厂)。

1.2 动物模型制备及分组: SD 大鼠, 体重 200~250 g (中南大学实验动物部提供), 3% 戊巴比妥钠 ip 麻醉 (30 mg/kg), 脱毛, 次日同方法麻醉, 背部置于 90 C 水中烫 15 s, 面积约 10% 总体表面积 (TBSA), 造成深二度烫伤模型 (经病理证实)^[1]。烫伤后立即 ip 乳酸林格氏液 5 mL。大鼠造模后分笼饲养, 自由进食饮水。烫伤大鼠随机分成 5 组, 每组 50 只。烧烫安乳膏高、中、低剂量 (每日用量分别为 2.0、1.0、0.5 g 生药) 组, 创面外用烧烫安乳膏, 厚度 3.0~5.0 mm, 每日换药 2 次。阴性对照组创面外用基质乳膏, 阳性对照组创面外用湿润烧伤膏, 厚度均为 3.0~5.0 mm, 每日换药 2 次。用药期间各组创面若有感染, 均给予抗生素治疗。分别于烫伤后 4、8、12、16 d 取创面组织标本, 每组每个时间点各处死 10 只大鼠; 每组各取 10 只大鼠观察创面愈合时间和测定创面愈合面积百分比。创面标本于 -80 C 存放, 病理标本固定于 10% 甲醛液中。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 创面愈合时间和创面愈合率: 每组 10 只大鼠, 每天观察创面愈合情况, 以完全上皮覆盖作为创面愈合时间的确定依据。每组于伤后 4、8、12、16 d 采用透明胶片描记加称重法测定局部创面面积, 按下列公式计算:

$$\text{创面愈合面积百分比} = (\text{原始创面面积} - \text{未愈合创面面积}) / \text{原始创面面积} \times 100\%^{[2]}$$

1.3.2 烫伤创面羟脯氨酸测定: 取创面组织标本, 采用化学比色法测定羟脯氨酸水平, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.3.3 免疫组化分析: 应用免疫组化的方法, 检测

伤后 12 d 创面局部 FGF- β_1 的表达, 通过其表达水平的高低来评价创面愈合能力^[3]。

1.3.4 病理组织学检查: 标本常规石蜡包埋切片, 行 HE 染色, 进行光镜组织学观察。

1.4 统计学分析: 实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验比较组间差异。

2 结果

2.1 烫伤创面愈合时间比较: 结果见表 1。提示高、中剂量烧烫安乳膏具有缩短创面愈合时间的作用; 而且高剂量组与湿润烧伤膏组作用相当。

2.2 烫伤创面愈合面积百分比的变化: 中、高剂量烧烫安乳膏组及湿润烧伤膏组创面愈合面积百分比在烫伤后第 4、8、12、16 天均显著高于阴性对照组, 且烧烫安乳膏高剂量组与湿润烧伤膏组作用相当 (见表 1)。

2.3 烫伤创面羟脯氨酸水平的变化: 烧烫安乳膏高、中剂量组创面组织羟脯氨酸水平在伤后第 8、12 天均显著高于阴性对照组 (见表 2)。提示烧烫安乳膏组成纤维细胞增生, 胶原合成增加, 创面愈合加强。

2.4 免疫组化检测结果: 用免疫组织化学的方法检测了伤后 12 d 创面局部的 FGF- β_1 的表达情况, 结果见表 2, 发现烧烫安乳膏中、高剂量组 (特别是高剂量组) 及湿润烧伤膏组 FGF- β_1 的表达明显强于阴性对照组, 提示烧烫安乳膏促进创面愈合。

2.5 创面大体观察及病理形态学观察: 烫伤后, 4 d 内各组创面均红润。烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组创面内有白色分泌物, 3 d 后创面色泽转浅红。随着给药时间的延续, 烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组创面较阴性对照组及烧烫安乳膏低剂量组创面显著缩小。烧烫安乳膏组创面均无感染, 阴性对照组部分创面后期红肿, 创面痂下积脓。约 6~8 d, 烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组创面渐渐与皮面平整, 而阴性组对照组及烧烫安乳膏低剂量组创面凹于皮面。14~16 d, 烧烫安乳膏

表 1 烧烫安乳膏对烫伤大鼠创面愈合时间和创面愈合面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Shaotang'an Cream on wound healing time and area of scalded rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ g	愈合时间/ d	烫伤后不同时间创面愈合面积/%			
			第 4 天	第 8 天	第 12 天	第 16 天
阴性对照	—	26.6±2.8	31.58±2.87	41.23±2.13	50.42±5.38	80.36±4.32
烧烫安乳膏	0.5	25.4±2.5	33.28±1.85	43.13±1.94	52.66±4.76	84.33±4.35
	1.0	23.2±2.9*	36.28±1.47**	45.55±1.67**	59.64±3.32**	93.56±3.08**
	2.0	21.5±1.7**	39.37±3.51**	49.84±3.13**	67.84±4.13**	98.11±2.15**
湿润烧伤膏		21.7±2.0**	38.32±3.21**	47.64±2.13**	68.04±3.15**	98.03±2.74**

与阴性对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs negative control group

表2 烧烫安乳膏对烫伤大鼠创面组织中羟脯氨酸水平和 FGF- β_1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effect of Shaotang'an Cream on hydroxyproline level and FGF- β_1 expression in wound tissue of scalded rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ g	创面组织中羟脯氨酸/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)				FGF- β_1 阳性 表达率/%
		第4天	第8天	第12天	第16天	
阴性对照	—	1.87 $\pm$ 0.22	2.12 $\pm$ 0.29	2.82 $\pm$ 0.35	2.60 $\pm$ 0.38	6.8 $\pm$ 2.8
烧烫安乳膏	0.5	1.95 $\pm$ 0.12	2.01 $\pm$ 0.49	2.52 $\pm$ 0.65	2.66 $\pm$ 0.31	8.2 $\pm$ 2.5
	1.0	1.92 $\pm$ 0.23	2.39 $\pm$ 0.25*	3.21 $\pm$ 0.26*	2.69 $\pm$ 0.47	14.6 $\pm$ 2.9*
	2.0	2.05 $\pm$ 0.46	2.78 $\pm$ 0.34**	3.76 $\pm$ 0.43**	2.81 $\pm$ 0.23	17.4 $\pm$ 1.7**
湿润烧伤膏	—	1.98 $\pm$ 0.33	2.67 $\pm$ 0.54*	3.43 $\pm$ 0.54**	2.71 $\pm$ 0.29	17.3 $\pm$ 2.0**

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group

中、高剂量组及湿润烧伤膏组创面基本愈合,而阴性对照组及烧烫安乳膏低剂量组创面愈合时间明显延迟。组织学观察:伤后第4天,烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组毛细血管数量增多,管腔较大,成纤维细胞较多,有一定数量的巨噬细胞。阴性对照组及烧烫安乳膏低剂量组毛细血管数量较少,而且管腔较小,成纤维细胞较少,巨噬细胞数目也较少。伤后第8天,烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组毛细血管较多,管腔较大,胶原纤维较少,创面部分已有上皮细胞覆盖;而阴性对照组及烧烫安乳膏低剂量组毛细血管数量较少,且管腔较小,胶原纤维排列密集。

3 讨论

创面愈合过程中胶原代谢的状况可反映创面愈合的情况,羟脯氨酸在胶原中所占比例相对恒定(大约12%~15%)^[4]。测定羟脯氨酸水平可间接反映胶原水平。本实验结果表明各组羟脯氨酸水平伤后第4天开始升高,至第12天达到峰值,随后降低。在伤后第8天和第12天,烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组创面羟脯氨酸水平明显高于阴性对照组。提示烧烫安乳膏可促进烧(烫)伤创面胶原的合成,促进创面的愈合,这与形态学的变化基本相一致。

烧(烫)伤创面修复以创面完全上皮化作为创面愈合的终点,因此表皮细胞分化、增殖和迁移是烧(烫)伤创面愈合过程中最重要的环节。本实验在病理切片中观察到伤后烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组烫伤创面表皮细胞增殖和迁移非常活跃,明显早于阴性对照组,说明烧烫安乳膏可加速创面上皮化,促进创面愈合。

烧(烫)伤创面愈合时间和创面愈合面积百分比

是评价创面愈合的综合性指标。在本实验中烧烫安乳膏可明显提高创面愈合面积百分比,缩短创面愈合时间,加速创面愈合。

成纤维细胞生长因子(FGFs)无论在体内还是在体外,都能刺激创面愈合中几乎所有类型的细胞的增殖。Takenaka等在创面愈合过程中,应用免疫组化和Westernblot方法,来检测创面成纤维细胞生长因子受体-1(FGFR-1)水平的高低以反映FGF的水平,从而评价创面愈合的能力^[5]。本实验采用免疫组化的方法成功检测到烧烫安乳膏中、高剂量组及湿润烧伤膏组与阴性对照组创面局部FGF- β_1 表达有显著差异,特别是烧烫安乳膏高剂量组FGF- β_1 表达非常强烈,有力地证实了烧烫安乳膏促进创面愈合。

本实验采用大鼠皮肤深二度烫伤模型证实了烧烫安乳膏能够缩小大鼠烫伤创面面积,促进创面愈合,增加创面愈合面积,从而为烧(烫)伤的临床治疗提供了一条崭新而有效的中医药治疗途径。

References:

- [1] Feng S J, Hua L N, Jin S W, et al. Making the rat scald model [J]. *Acta Univ Med Second Shanghai* (上海第二医科大学学报), 1996, 15(2): 195-197.
- [2] Sun T Z, Fu X B, Gu X M, et al. The Effect of recombinant human epidermal growth factor improving burn healing in rabbits [J]. *Lab Anim Sci Adm* (实验动物科学与管理), 2000, 17(4): 12-14.
- [3] Huang K, Chen Y L. Progress on evaluation criterion of wound healing [J]. *Chin J Repair Reconstruct Surg* (中国修复重建外科杂志), 2001, 15(2): 126-129.
- [4] Dimicco M A, Waters S N, Akesson W H, et al. Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002, 10: 218-225.
- [5] Onathan G, Michael O. The role of transforming growth factor β_1 in the vascular system [J]. *Cardiovascular pathology*, 2004, 44(2005): 28-36.