

复方苦参黄柏溶液经氧驱动雾化对急性创伤修复模型大鼠EGF、VEGF、TGF- β 的影响

窦群立¹, 袁韩涛², 黄雅松², 申海滨²

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712000)

【摘要】目的 探讨复方苦参黄柏溶液经氧驱动雾化对急性创伤修复模型大鼠EGF、VEGF、TGF- β 的影响。**方法** 选取SPF级成熟年龄SD大鼠75只, 随机分成五组, 各15只: 生理盐水组、复方苦参黄柏溶液组、氧疗组、复方苦参黄柏溶液+氧疗组、康复新液组。适应性喂养1周后进行造模, 并于造模成功之后的第2天开始给药, 在造模后的第3天、第7天、第10天、第14天观察创面组织学的改变。在第3天、第7天、第14天对创面进行标本采集, 用ELISA检测标本中EGF、VEGF、TGF- β 的含量。**结果** 创面组织学生长情况: 在检测的同一时期, 复方苦参黄柏溶液+氧疗组成纤维细胞数量, 新生毛细血管, 胶原纤维等生长明显强于其余四组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。生理盐水组最差, 其余三组介于三者之间且差异不大。标本中EGF、VEGF、TGF- β 含量检测情况: 在检测的同一时段, 复方苦参黄柏溶液+氧疗组EGF、VEGF、TGF- β 含量明显高于其余四组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 生理盐水组EGF、VEGF、TGF- β 含量最低, 其余三组EGF、VEGF、TGF- β 含量介于三者之间且差异不大。**结论** 复方苦参黄柏溶液经氧驱动雾化对急性创伤修复模型大鼠的创面修复有促进作用、亦可提高组织中EGF、VEGF、TGF- β 的含量, 且三者对创面的修复可能具有相关性。

【关键词】 复方苦参黄柏溶液; 氧驱动雾化; 创伤修复; EGF; VEGF; TGF- β

【中图分类号】 R856.2

【文献标识码】 B

【文章编号】 ISSN.2095-6681.2018.12.192.03

DOI:10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2018.12.150

当前经济全球化的高速的发展, 创伤的发病情况成为心脏病、脑血管病、肿瘤疾病之后, 导致人类伤残甚至死亡第四个原因^[1]。本实验从传统中药联合局部氧疗治疗创伤修复的思路出发, 结合传统中药与氧疗的方法, 创新氧驱动中药雾化局部外治的新型治疗方法, 实验研究复方苦参黄柏溶液经氧驱动雾化外治对创伤修复模型大鼠的治疗作用, 并对其作用机理进行初步探讨, 以期治疗创伤皮肤修复提供新方法, 并为新治疗方法提供实验依据。现将实验方法及结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级SD大鼠75只, 雄性, 体重大约在200~250 g, 由第四军医大学实验动物中心提供(动物合格证号: SCXK(军)2012-0007), 在实验动物中心适应性饲养1周。

1.2 药物与试剂

复方苦参黄柏溶液的组成有: 苦参30 g、黄柏20 g、苍术15 g、艾叶10 g、重楼25 g、花椒12 g。由陕西中医药大学附属医院中药房提供, 饮片经提纯加工成每10 mL相当于原药材3.5 g的溶液, 由陕西中医药大学附属医院制剂中心制备。康复新液由四川好医生攀西药业有限责任公司提供。TGF- β 、VEGF、EGF试剂盒由上海恒远生物工程有限公司提供。

1.3 主要仪器

离心机, KDC-40(科大创新股份有限公司中佳分公司); 酶标仪, RT-6000(深圳雷杜生命科学股份有限公司); 自动组织包埋机, STD-30(德国莱卡公司); 组织切片机, KHF-524(德国莱卡公司)等。

1.4 方法

1.4.1 造模

造模前大鼠背部脱毛、称重, 腹腔注射10%戊巴比妥钠

3.5 ml/kg麻醉后, 消毒铺巾, 在脊旁0.5 cm两侧, 各作一个1.6*1.6 cm²矩形标记, 切除全层皮肤, 止血后用无菌纱布包扎, 常规饲养。

1.4.2 分组及换药

造模完成后, 利用随机法分组。造模成功后第2天, 按文献方法折算大鼠用药量^[2]。模型组: 15只, 每天用生理盐水湿敷创面20 min。中药组: 15只, 每天用复方苦参黄柏溶液湿敷创面20 min。氧疗组: 15只, 每天局部氧疗20分钟。4.康复新液组: 15只, 每天用康复新液湿敷创面20 min。中药氧疗组: 15只, 每天用氧驱复方苦参黄柏溶液雾化创面20 min。雾化步骤: 10 ml复方苦参黄柏溶液加入储药罐内, 通过连接雾化嘴、雾化器储药罐、吸入管与氧气导管作为雾化管道, 调节氧气装置直至储药罐有雾化液气出现, 用雾化液气对创面进行治疗。换药每天1次, 共14天, 各组治疗完成后用无菌敷料包扎创面。

1.4.3 取材

对创面干预后第3、7、14天。每组5只大鼠, 消毒, 铺巾, 切除全层皮肤不伤及皮下脂肪及深筋膜, 采取标本后颈椎脱臼处死实验动物。标本一部分称取重量, 加入一定量的磷酸缓冲盐溶液(PBS), 备用。使用时, 用匀浆器将标本和PBS的混合物研磨充分。用离心机在转速为2000~3000转/分下保持20 min后移液枪收集上清液等待检测各项指标。标本融化后仍然保持2~8℃的温度, 使用EGF、VEGF和TGF- β 试剂盒进行细胞因子水平检测; 另一部分放在10%福尔马林溶液中固定24 h, 然后脱钙48 h备用, 后期做石蜡切片。

2 检测项目及方法

2.1 创面组织学观察

光镜观察创面组织HE染色变化: 新生表皮结构完整性, 真皮中成纤维细胞和炎性细胞的分布情况, 组织胶原

纤维及微血管含量情况。

2.2 EGF、VEGF、TGF- β 的含量检测

采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定创面组织中EGF、VEGF、TGF- β 的含量。

2.3 统计学处理

各组实验结果运用统计软件SPSS 22.0统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组实验大鼠创面组织学大体观察的比较

通过光镜观察创面组织HE染色变化:五组实验在创面成纤维细胞数量及体积、新生毛细血管、胶原纤维、等指标在检测的每个时期,中药氧疗组各项指标明显强于其余四组,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组各个指标最差,其余三组之间各个指标无明显差异,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 各组大鼠创面组织中TGF- β 含量(见表1)

表1 各组实验大鼠创面组织中TGF- β 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	创面组织中TGF- β 含量(pg/ml)		
	3 d	7 d	14 d
模型组	128 $\pm$ 5.15	134 $\pm$ 3.57	168 $\pm$ 7.67
中药组	165 $\pm$ 6.06	232 $\pm$ 4.85	201 $\pm$ 3.728
氧疗组	158 $\pm$ 2.40	210 $\pm$ 7.60	191 $\pm$ 8.39
中药氧疗组	203 $\pm$ 4.12	318 $\pm$ 7.53	223 $\pm$ 5.34
康复新液组	167 $\pm$ 8.57	246 $\pm$ 7.64	218 $\pm$ 8.74

表1可知:用药后第3天,中药氧疗组、中药组、康复新液组分别与模型组相比,创面肉芽组织中TGF- β 含量显著增多,差异均具有显著性($P < 0.01$);中药氧疗组分别与康复新液组、中药组比较,新生创面组织中TGF- β 含量明显增加,差异有显著性($P < 0.05$);氧疗组与模型组相比,新生创面组织中TGF- β 含量没有明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第7天,中药氧疗组、中药组、康复新液组分别与模型组相比,创面肉芽组织中TGF- β 含量显著增多,差异有显著性($P < 0.05$);中药氧疗组分别与中药组、康复新液组、氧疗组相比,创面组织中TGF- β 含量增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组、康复新液组、氧疗组创面组织中TGF- β 含量比较未见明显差异($P > 0.05$)。第14天,中药氧疗组、康复新液组、中药组、模型组比较,创面组织中TGF- β 含量无显著性差异($P > 0.05$)。

3.3 各组大鼠创面组织中EGF含量(见表2)

表2 各组实验大鼠创面组织中EGF含量的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	创面组织中EGF含量(pg/ml)		
	3 d	7 d	14 d
模型组	345.6 $\pm$ 5.3	860.4 $\pm$ 2.8	892.2 $\pm$ 9.8
中药组	477.7 $\pm$ 5.2	1299.4 $\pm$ 13.3	928.2 $\pm$ 2.7
氧疗组	354.8 $\pm$ 5.6	1267.3 $\pm$ 43.6	925.4 $\pm$ 6.8
中药氧疗组	579.8 $\pm$ 22.1	1616.4 $\pm$ 8.7	965.6 $\pm$ 8.6
康复新液组	456.5 $\pm$ 10.2	1320.2 $\pm$ 9.6	924.7 $\pm$ 2.6

表2可知,用药后第3天,中药氧疗组、中药组、康复新液组分别与模型组相比,创面肉芽组织中EGF含量显著增

多,差异均具有显著性($P < 0.05$);中药氧疗组分别与康复新液组、中药组相比较,新生创面组织中EGF含量明显增加,差异具有显著性($P < 0.05$);氧疗组与模型组相比,新生创面组织中EGF含量没有明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第7天,中药氧疗组、中药组、康复新液组分别与模型组相比,创面肉芽组织中EGF含量显著增多,差异均具有显著性($P < 0.05$);中药氧疗组分别与中药组、康复新液组、氧疗组相比,创面组织中EGF含量增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组、康复新液组、氧疗组创面组织中EGF含量比较无明显差异($P > 0.05$)。第14天,中药氧疗组、康复新液组、氧疗组、中药组、模型组两两比较,创面组织中EGF含量无显著性差异($P > 0.05$)。

3.4 各组大鼠创面组织中VEGF含量(见表3)

表3 不同治疗组新生创面组织中VEGF含量比较($\bar{x} \pm s$)

分组	创面组织中VEGF含量(pg/mL)		
	3 d	7 d	14 d
模型组	532.14 $\pm$ 22.63	645.65 $\pm$ 18.40	484.71 $\pm$ 19.09
中药组	630.98 $\pm$ 12.67	725.23 $\pm$ 14.41	522.32 $\pm$ 6.20
氧疗组	617.60 $\pm$ 9.59	662.70 $\pm$ 18.58	519.27 $\pm$ 10.11
中药氧疗组	696.89 $\pm$ 9.29	773.99 $\pm$ 10.39	566.70 $\pm$ 25.34
康复新液组	641.02 $\pm$ 10.81	715.74 $\pm$ 5.01	527.06 $\pm$ 10.65

表3可知,用药后第3天,中药氧疗组、中药组、康复新液组分别与模型组相比,创面肉芽组织中VEGF含量显著增多,差异有显著性($P < 0.05$);中药氧疗组分别与康复新液组、中药组相比较,新生创面组织中VEGF含量明显增加,差异具有显著性;氧疗组与模型组相比,新生创面组织中VEGF含量没有明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第7天,中药氧疗组、中药组、康复新液组分别与模型组相比,创面肉芽组织中VEGF含量显著增多,差异有显著性($P < 0.05$);中药氧疗组分别与中药组、康复新液组、氧疗组相比,创面组织中VEGF含量增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组、康复新液组、氧疗组创面组织中VEGF含量比较无明显差异($P > 0.05$)。第14天,中药氧疗组、康复新液组、氧疗组、中药组、模型组两两比较,创面组织中VEGF含量无显著性差异($P > 0.05$)。

4 讨论

急性创伤皮肤缺损后,机体首先进入炎症反应阶段,此阶段由血小板释放出的EGF、TGF- β 等作为炎症细胞的趋化剂而发挥重要作用,复方苦参黄柏溶液是促进创伤修复的有效方剂,临床应用作用突出、疗效显著^[3-4]。该方用苦参、黄柏,两药性味苦寒,苦能泻火坚阴,寒能清热凉血,具有清热燥湿、泻火解毒、杀虫止痒之功;苍术、艾叶,性味辛、苦、温,两药温中散寒,开窍配神,化湿辟秽;花椒温中,逐骨节皮肤死肌;蚤休苦泄解毒。全方寒温并举,标本兼治,体现了辨证施治的中医治疗原则。方中各药药理作用研究:苦参有抗炎、抗免疫、抗菌作用^[5]。黄柏抗菌、抗炎、解热作用^[6]。苍术有抗菌、抗炎、抗缺氧作用^[7]。艾叶有抗菌、止血、抗炎、抗过敏、镇痛作用^[8]。蚤休:有止血、抑菌、抗炎作用^[9]。花椒有抗菌杀虫、抗凝、抗氧化作用^[10]。

复方苦参黄柏溶液经氧驱动雾化这样给药主要优势

(下转第196页)

3 讨论

麻醉深度是不是会对POCD产生影响现在并没有确定的证据。有^[3-4]研究显示深麻醉能改善短期的术后认知功能,但也有研究报道麻醉深度与术后认知功能的降低无显著的关联^[5-6]。本研究结果表明,深麻醉能改善患者术后7 d内的认知功能,但对远期认知功能无明显影响。考虑原因有:BIS值54时,大脑代谢率下降了46%;而BIS值37时,大脑的代谢率下降了60%^[7]。深麻醉可能通过降低脑代谢率产生脑保护作用;围术期外显记忆及疼痛能抑制术后恢复并造成一定的心理创伤^[8]。本研究两组患者均无术中知晓,可排除外显记忆的影响。但不能排除内隐记忆对POCD的影响。有可能深麻醉组BIS维持在30~45,抑制了内隐记忆从而降低了POCD的发生率。深麻醉时可以通过抑制应激反应,减少炎症因子释放来降低术后POCD的发生率。HMGB1作为NF- κ B的多种调控转录因子之一,与炎症因子相互作用,介导炎症级联反应,导致组织损伤。深麻醉可能通过降低剖腹术中老年患者术后HMGB1升高的幅度,抑制炎症反应,起到一定的神经保护作用^[9-10]。因此,深麻醉是有可能减轻老年患者近期的POCD。但对于远期来说,影响意义并不大。不同麻醉深度会对脑代谢率、脑血流量、突触可塑性及炎症因子促发产生不同的影响,加大麻醉及镇静深度会显著降低脑代谢率,减少脑血流量,影响脑功能,造成中枢神经递质和受体系统出现异常,影响递质的生成、贮存、释放及灭活过程,引起神经突触可塑性改变,促进炎症因子的释放,最终导致术后认知功能发生变化。

术后意识障碍与很多因素相关,如患者本身因素,如年龄、生理情况及合并症、受教育程度,手术时间,术中出血。患者受教育程度高,使新大脑皮质突触的密度增加,加强神经元与神经元的连接,提高认知功能障碍的耐受能力。受教育程度会直接影响患者术前及术后认知功能评分对研究结果也有一定影响。而本次实验没有考虑患者的受教育程度,是本实验的设计不足之处。

参考文献

- [1] 卢文字,高德伟,王 蓉.老年骨折患者谵妄的发生率及危险因素分析[J].中华老年心脑血管病杂志,2017,12(12):1291-1294.
- [2] Shin JE,Kyeong S, Lee JS,et al.A personality trait contributes to the occurrence of postoperative delirium: a prospective study[J]. BMC Psychiatry,2016,16(1),371.
- [3] 郝 冬,郅 冶,张 锦.不同麻醉深度对老年患者术后认知功能障碍发生的影响[J].中华麻醉学杂志,2014,34(2):251-252.
- [4] 吴平蕾.BIS脑电双频指数监护仪监测不同麻醉深度对全麻患者POCD发生与 S100 β 蛋白水平关系的临床分析[J].中国高等医学教育,2015,29(3):135-136.
- [5] 王毅源,陈元良,胡崇辉.不同麻醉深度对腹腔镜胆囊切除术老年患者认知功能及应激反应的影响[J].全科医学临床与教育,2014,12(4):392-394.
- [6] Radtke FM,Franck M,Lendner J,etal.Monitoring depth of anaesthesia in a randomized trial decreases the rate of postoperative delirium but not postoperative cognitive dysfunction[J].Br J Anaesth,2013,110(Suppl 1):i98-105.
- [7] Alkire MT.Quantitative EEG correlations with brain glucose metabolic rate during anesthesia in volunteers.Anesthesiology,1998,89(2):323-333.
- [8] 陈 佳,全承炫,汤观秀,等.麻醉深度对中老年患者术后认知功能及外周血 高迁移率族蛋白 B1的影响 [J].临床麻醉学杂志,2015,31(3):238-242.
- [9] Fidalgo AR,Cibeli M,White JP,et al.Systemic inflammation enhances surgery-induced cognitive dysfunction in mice. Neurosci Lett,2011,498(1):63-66.
- [10] Chavan SS,Huerta PT,Robbiati S,et al.HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors.Mol Med,2012,18: 930-937
- [11] 岳 芳.不同BIS值对术后认知功能障碍的影响Meta分析[J].临床麻醉学杂志,2015,31(8):743-746.
- [12] 陈星曲,余得水,孙广运,等.麻醉深度对老年患者术后认知功能障碍的影响[J].四川医学,2017,38(7):844-846.

本文编辑: 吴宏艳

(上接第193页)

有:维持创面湿润状态、利于毛细血管的生长、提高创面的氧分压、细胞的分裂和代谢、改善创面的微循环、增进单核巨噬细胞系统的吞噬功能、有利于药物的吸收、加快肉芽组织上皮化速度、减少感染。本实验说明了:复方苦参黄柏溶液经氧驱动雾化的治疗方法是通过增加创面组织中EGF、VEGF、TGF- β 的含量达到促进创面修复的作用。急性创伤修复机制复杂,目前尚未完全阐明,各个机制之间相互作用也难以详细阐明,本实验从单方面研究,存在一定局限性;实验受客观因素限制,未进行大样本实验,研究时间段需进一步细化。今后实验研究工作中,中药经氧驱动雾化治疗方法的利用率及治疗方式问题有待进一步研究提高,发挥其优势,为急性创伤修复的治疗开拓

新的前景。

参考文献

- [1] 张彩珍,王云芳.严重创伤的评估救护进展[J].医学理论与实践,2012,25(20):2496-2497.
- [2] 施新猷.现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社,1999:209-211.
- [3] 窦群立,杨 锋,刘 波,等.抗感染洗剂治疗四肢开放性感染1363例体会[J].四川中医,2006,24(3):92-93.
- [4] 杨 宁,窦群立.抗感染洗剂治疗四肢开放性感染1180例疗效分析[J].陕西中医学院学报,2001,24(6):31-32.

本文编辑: 吴宏艳