

姜露散对大鼠感染性创面提脓祛腐的作用及机制

王佳雯 陆金根 曹永清 潘一滨

(上海中医药大学附属龙华医院肛肠科, 上海, 200032)

摘要 目的:研究姜露散对大鼠感染性创面提脓祛腐的作用及机制。方法:制备大鼠背部感染性创面模型。将大鼠随机分为姜露散组、九一丹组、模型组。每天分别给予姜露散、九一丹创面换药,模型组给予生理盐水创面换药,1次/d,连续治疗14d。观察大鼠一般情况及创面脓腐脱落时间。第3、7、14d,记录创面分泌物量;免疫组化法检测创面肉芽组织中溶菌酶含量;ELISA法检测创面肉芽组织中IL-1 β 含量。第7、14d,酶法检测主要肝肾功能指标。结果:姜露散组和九一丹组创面脓腐脱落时间均明显短于模型组($P < 0.01$)。姜露散组和九一丹组第3d创面分泌物量计分均明显高于模型组($P < 0.01$)。第3、7d,姜露散组和九一丹组创面肉芽组织中溶菌酶含量均明显高于模型组($P < 0.01$),创面肉芽组织中IL-1 β 含量均明显高于模型组($P < 0.01$)。第7、14d,九一丹组血清BUN、CREA、ALT含量明显高于姜露散组和模型组($P < 0.05$)。结论:姜露散可能通过提高创面肉芽组织中吞噬细胞溶菌酶含量及创面肉芽组织中IL-1 β 含量来达到对感染性创面提脓祛腐的作用,其用药安全性优于升丹制剂(九一丹)。

关键词 姜露散;感染性创面;提脓祛腐;创面修复;溶菌酶;IL-1 β ;升丹制剂

Effect and Mechanism of Jianglu Powder in Absorbing Pus and Removing Slough on Infected Wound Surface of Rats

Wang Jiawen, Lu Jing, Cao Yongqing, Pan Yibin

(Longhua Hospital Affiliated to Shang University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract Objective: To explore the effect and mechanism of Jianglu powder (JLP) in absorbing pus and removing slough on infected wound surface of rats. **Methods:** Rat models of infected wound surface on the back were successfully established. The model rats were randomly divided into the JLP group, the Jiuyi Powder (JYP) group and the model group. The wound surfaces of rats in JLP group were treated with JLP, while those in JYP group were given JYP every day. The wound surfaces of rats in model group were only treated with normal saline (NS) every day. The treatment lasted for fourteen days. The rats' general situation and the dropping off time of pus and slough were observed. On the 3rd, 7th, and 14th day, the amount of wound surface secretion was calculated. The level of macrophages lysosome in wound tissues was detected by immunohistochemistry; the content of IL-1 β in wound tissues was detected by ELISA. On the 7th and 14th day, serum liver and renal function indexes were detected by enzymic method. **Results:** In terms of the dropping off time of pus and slough, JLP group and JYP group had significantly shorter results compared with the model group ($P < 0.01$). As for score of wound surface secretion, on the 3rd day, JLP group and JYP group showed significantly higher outcomes than model group ($P < 0.01$). In terms of the level of macrophages lysosome in wound tissues, on the 3rd and 7th day, JLP group and JYP group had significantly higher scores than the model group ($P < 0.01$). The content of IL-1 β in wound tissues on the 3rd and 7th day in JLP group and JYP group were significantly more than those in model group ($P < 0.01$). Serum total BUN, CREA and ALT; on the 7th and 14th day in JYP group was significantly higher than JLP group and model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** JLP could absorb pus and remove slough of infected wound surface by increasing the level of macrophages lysosome and IL-1 β in wound tissues. The safety of JLP is better than Shengdan preparation (JYP).

Key Words Jianglu powder; Infected wound surface; Absorbing pus and removing slough; Wound healing; Macrophages lysosome; IL-1 β ; Shengdan preparation

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.028

升丹是目前临床应用的主要提脓祛腐药物。但近年临床和动物实验均表明溃疡创面应用升丹都会有不同程度的汞吸收,其毒性有蓄积性,可对内脏等造成损害,甚至可以引起中毒致死。其他类提脓祛腐药物大多数也是有毒性的药物。因此,寻求高效、无毒的升丹替代品无疑成为中医外科工作者迫在眉睫的任

务^[1-3]。上海中医药大学附属龙华医院陆金根教授通过对古代医籍和现代文献的回顾性理论研究^[4-19],并结合中医外科多年的临床用药经验,拟方姜露散。本研究通过动物实验,观察该方对感染性创面提脓祛腐的作用,并探讨其作用的可能机制及用药安全性,为中药提脓祛腐药物提供高效、无毒的升丹替代品。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 SD 大鼠 72 只,SPF 级,体质量 200 ~ 220 g/只,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,饲养于上海中医药大学附属龙华医院科研中心。

1.2 药物 姜露散由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备。九一丹由上海华鹰药业有限公司提供。

1.3 细菌 采用上海市临床检验中心提供的大肠埃希菌标准菌株(ATCC 25922),配制成浓度为 5 亿菌株/mL 的大肠埃希菌混悬液。

1.4 主要试剂与仪器 溶酶体抗体(美国 Santa Cru)、EnVision 试剂即用型(丹麦 Dako)、33-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)显色液试剂盒(武汉博士德)、大鼠 IL-1 β 定量 ELISA 试剂盒(美国 RD);生物显微镜(Olympus BH2)、数码相机(Nikon E4500)、紫光分光光度计(日本 Beckman Du-600)、全自动生化检测分析仪(OLYMPUS AU460)。

1.5 方法

1.5.1 分组、造模与给药 参照上海中医药大学附属曙光医院张雅明^[20]以及南京市中医院郑雪平^[21]等造模方法,并改良付小兵^[22-23]全层皮肤缺损法建立大鼠感染性创面模型。在麻醉后的大鼠颈背部作一直径 2 cm 的圆形切口,深达肌筋膜,破坏部分肌肉表面筋膜,止血后在创面上覆盖大小相仿的纱布,纱布中浸入新培养的大肠埃希菌标准菌株 1 mL(约 5 亿菌株)。3 d 后,创口表面附有脓性分泌物,周围皮温略升高,感染性创面模型造模成功。将大鼠随机分为三组:姜露散组、九一丹组、模型组,每组 24 只。造模各组大鼠每天分别给予姜露散、九一丹创面换药,模型组给予生理盐水创面换药,1 次/d,连续治疗 14 d。

1.5.2 观察大鼠一般情况 包括精神状态、活动情况、进食量、大小便情况。

1.5.3 创面脓腐脱落时间 从用药开始到脓腐脱落的时间(通过创面色泽的变化判断,即当创面变为鲜红色,见到肉芽组织为止)。

1.5.4 创面分泌物量 第 3、7、14 d,无明显分泌物,计 0 分;分泌物量少,用一根消毒棉签可以吸净,计 1 分;分泌物量较多,用二根消毒棉签可以吸净,计 2 分;分泌物量大,用二根以上消毒棉签可以吸净,计 3 分。

1.5.5 免疫组化 EnVision 法检测创面肉芽组织中溶菌酶含量 第 3、7、14 d,各组随机处死 8 只大鼠,取近创缘约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的肉芽组织,按免疫组化试剂盒操作说明进行。对每张免疫组化片高倍镜下($\times$ 250)随机取 3 个视野窗,在 OLYMPUS 1X70 倒置荧光图像采集分析系统上利用 Imge-Pro Plus 分析软件,

将阳性细胞用像素点表示并换算成 μm^2 ,采用 Image-pro-plus 图像分析系统分析软件,以阳性反映细胞总面积代表阳性反应细胞数,结果取均值。

1.5.6 双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测创面肉芽组织中 IL-1 β 含量 第 3、7、14 d,各组随机处死 8 只大鼠,取近创缘约 100 mg 的肉芽组织,按大鼠 IL-1 β 定量 ELISA 试剂盒操作说明进行。以标准品不同稀释浓度为横坐标,光学密度值(optical density,OD)为纵坐标作标准曲线图,根据样品 OD 值查出相应 IL-1 β 含量。

1.5.7 酶法检测主要肝肾功能指标 第 7、14 d,各组随机处死 8 只大鼠,腹主动脉采血。将取得的血清置于全自动生化检测分析仪中,直接读取血清 BUN,CREA,ALT 值。

1.5.8 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件进行数据处理及分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者用 LSD 法,方差不齐者用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 造模成功后各组动物都呈病态,皮毛杂乱,倦缩少动,摄食量、摄水量明显减少。

表 1 各组创面脓腐脱落时间比较($\bar{d}, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	创面脓腐脱落时间
姜露散	16	6.67 $\pm$ 0.651 *
九一丹	16	7.08 $\pm$ 0.900 **
模型	16	9.67 $\pm$ 0.888

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与九一丹组比较,* $P > 0.05$ 。

表 2 第 3 d、7 d、14 d、各组创面分泌物量计分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d		7 d		14 d	
	只数	计分	只数	计分	只数	计分
姜露散	24	2.39 $\pm$ 0.502 **	16	1.67 $\pm$ 0.651 *	8	0.67 $\pm$ 0.516 *
九一丹	24	2.33 $\pm$ 0.485 **	16	1.33 $\pm$ 0.492 *	8	0.50 $\pm$ 0.548 *
模型	24	1.78 $\pm$ 0.428	16	1.25 $\pm$ 0.452 *	8	0.33 $\pm$ 0.516 *

注:与模型组比较,** $P < 0.01$;与九一丹组比较,* $P > 0.05$ 。

表 3 各组创面肉芽组织中溶菌酶含量比较($\mu\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	3 d	7 d	14 d
姜露散	8	1283.3550 $\pm$ 66.39142 **	1266.5400 $\pm$ 70.97180 **	597.9617 $\pm$ 71.72339
九一丹	8	1276.5467 $\pm$ 73.77489 **	1258.2908 $\pm$ 75.02942 **	559.6925 $\pm$ 55.83410
模型	8	691.9958 $\pm$ 206.29910	749.2492 $\pm$ 65.48238	602.9333 $\pm$ 78.02048

注:与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

表 4 各组创面肉芽组织中 IL-1 β 含量比较($\text{pg/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	3 d	7 d	14 d
姜露散	8	51.6633 $\pm$ 9.44752 **	27.9583 $\pm$ 7.54641 **	13.6467 $\pm$ 2.93296
九一丹	8	50.6633 $\pm$ 8.64725 **	27.0633 $\pm$ 7.56325 **	12.4250 $\pm$ 2.38189
模型	8	14.1333 $\pm$ 3.7858	11.6967 $\pm$ 2.25507	11.2200 $\pm$ 2.28874

注:与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

2.2 各组创面脓腐脱落时间比较 见表 1。

2.3 各组创面分泌物量比较 见表 2。

2.4 各组创面肉芽组织中溶菌酶含量比较 见表 3。

2.5 各组创面肉芽组织中 IL-1 β 含量比较 见表 4。

2.6 各组血清 BUN、CREA、ALT 含量比较 见表 5。

表 5 各组血清 BUN、CREA、ALT 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BUN(mmol/L)		CREA(mmol/L)		ALT(U/L)	
		7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
姜露散	8	7.2283 $\pm$ 0.24302 $^{\Delta}$	8.0167 $\pm$ 0.76995 $^{\Delta}$	35.1033 $\pm$ 3.13722 $^{\Delta}$	33.8683 $\pm$ 3.79128 $^{\Delta}$	38.7000 $\pm$ 4.93994 $^{\Delta}$	38.6400 $\pm$ 4.36148 $^{\Delta\Delta}$
九一丹	8	9.1700 $\pm$ 1.14745 *	10.5850 $\pm$ 1.80280 *	47.2250 $\pm$ 2.43482 *	49.4300 $\pm$ 2.27716 *	43.6317 $\pm$ 2.48398 *	52.9633 $\pm$ 9.04799 **
模型	8	6.6583 $\pm$ 0.29546	7.0533 $\pm$ 0.33285	32.8667 $\pm$ 2.40935	32.6983 $\pm$ 2.32029	37.3183 $\pm$ 2.90987	39.7467 $\pm$ 2.32760

注:与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与九一丹组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

3 讨论

3.1 中医对“提脓祛腐法”的认识 “提脓祛腐法”是中医外科治疗急慢性感染性创面的治疗大法之一,其包含“提脓”和“祛腐”两个方面的内容。“提脓”为化腐成脓,只有将腐肉转化成脓汁,才能利于创面的引流;同时,“脓”本身又能促进创面的愈合及加强创面的炎症反应。“祛腐”即通过药物或手术的作用,将创面上的坏死组织、过度增生的病理性肉芽组织以及其他影响创口顺利愈合的各种病理组织(如囊壁、瘘管壁等)逐渐清除,形成相对新鲜的、引流通畅的创面,为新生肉芽组织的生长创造有利条件。“祛腐”是“提脓”的目的;“提脓”是“祛腐”的方式和手段。提脓祛腐药物疗法是中医的特色和优势。肛肠科常见的感染性疾病(肛周脓肿和肛瘘)的术后创面都是经过一定的手术清创过程,但是对于深部肛周脓肿及复杂性肛瘘,前者术中无法做到彻底清创,后者临床为了保护肛门括约肌正常形态及功能,不可能将瘘管全部切除,如果能够使用提脓祛腐药物配合术后换药,便能加快创面坏死及病理组织的脱落,缩短创面愈合的时间。再者,某些肛肠手术切口较小,导致术后创面引流不畅,局部出现感染或慢性炎症反应至赘肉增生时,如果能够使用提脓祛腐药物进行换药,便能避免部分术后并发症的发生。此外,肛肠疾病中藏毛窦、骶前囊肿等疾病,其手术成功的关键是彻底清除病理组织,但有时由于结构的复杂性和种种限制,无法全面彻底地清除这些病理组织,此时如果能够使用提脓祛腐药配合术后换药,便能够大大提高治疗的成功率^[24]。因此,提脓祛腐药物疗法在肛肠科乃至整个中医外科学领域承担着非常重要的任务。

3.2 西医对“提脓祛腐法”的认识 “提脓祛腐法”是一种湿润的药物清创法,与西医学近年发展起来的“酶学清创”在方法与效果上相似。两者虽源于不同医学,但却殊途同归^[24-28]。

3.3 升丹制剂不良反应 升丹制剂在临床上疗效显著,已沿用千余年,但升丹制剂具有一定的不良反应,

过量可导致肝肾损害。其主要化学成份是粗制的 HgO 及 Hg(NO₃)₂ 等,属中等毒性药物。临床和实验表明通过皮肤创面外用升丹制剂都有不同程度的汞吸收,其毒性有蓄积性,造成内脏的损害,甚至导致中毒死亡^[29-32]。其主要的靶器官是肾脏。

3.4 姜露散全方由姜黄、露蜂房、皂角刺等组成,具有清热解毒,提脓祛腐之功效 本研究结果显示,姜露散组和九一丹组创面脓腐脱落时间均明显短于模型组($P<0.01$);姜露散组和九一丹组第 3 d 创面分泌物量计分均明显高于模型组($P<0.01$)。提示姜露散和九一丹能够迅速“化腐提脓”,促进创面腐肉脱落,将其转化成脓汁,使得创面引流通畅,从而促进新生肉芽组织的生长。第 3、7 d 姜露散组和九一丹组创面肉芽组织中溶菌酶含量均明显高于模型组($P<0.01$)。溶菌酶含量分布基本表现为先升高后逐渐下降的趋势,与创面炎症反应的时间和程度变化基本一致,而姜露散组与九一丹组第 3 d 溶菌酶含量就达到峰值,至第 7 d 时仍然保持高水平,第 14 d 显著下降,且姜露散组溶菌酶含量相对较高,提示姜露散能有效地趋化和活化吞噬细胞,使得吞噬细胞能够迅速聚集在感染创面处,来清除细菌、中和异物及细菌所产生的毒素,溶解及清除坏死组织;渗出的蛋白凝固后成为创面的保护屏障,起到为炎症反应细胞移动提供网架结构等作用。这些作用为下一步的创面修复打下了良好的基础。因此,提高创面肉芽组织中溶菌酶的含量以调节机体局部免疫功能可能是姜露散提脓祛腐作用的机制之一^[24,33]。第 3、7 d 姜露散组、九一丹组创面肉芽组织中 IL-1 β 含量均明显高于模型组($P<0.01$)。各组创面肉芽组织中 IL-1 β 含量基本在第 3 d 时达到峰值,此后逐渐下降,可能与第 3 d 时炎症反应程度最高有关。创面肉芽组织中的 IL-1 β 为血管促进因子和炎症反应因子,能够刺激创伤修复早期炎症反应,从而促进创面的修复。这可能也是解释姜露散提脓祛腐的作用机制之一^[24,33]。第 7、14 d 血清 BUN、CREA、ALT 含量,九一丹组明显高于姜露散组和模型组($P<0.05$)。提示

姜露散对肾功能影响小,用药安全性优于九一丹。

综上,姜露散可能通过提高创面肉芽组织中溶菌酶含量及创面肉芽组织中 IL-1 β 含量来起到对感染性创面提脓祛腐的作用,其用药安全性优于升丹制剂(九一丹),为寻找升丹制剂替代品提供更多选择空间。本次实验仅从创面肉芽组织中溶菌酶、IL-1 β 等方面探讨姜露散提脓祛腐的作用机制,如需进一步明确其机制,还有待大样本的多靶点的研究。

参考文献

- [1] 陈红风,朱滢. 红升丹现代研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,3(6):746-749.
- [2] 李永刚,潘立群. 外用升丹制剂研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(10):88-89.
- [3] 代红雨,唐汉钧. “提脓祛腐法”浅析[J]. 上海中医药大学学报,2002,16(1):35-36.
- [4] 清·吴谦. 医宗金鉴[M]. 北京:人民卫生出版社,1974.
- [5] 顾伯华. 实用中医外科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985.
- [6] 晋·刘涓子著,南齐·龚倾宣编. 刘涓子鬼遗方[M]. 北京:中医古籍出版社,1975.
- [7] 明·汪机. 外科理例[M]. 北京:人民卫生出版社,1963.
- [8] 明·陈实功. 外科正宗[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1973.
- [9] 赵鹏,蔡辉. 姜黄素药理作用研究进展[J]. 中医药临床杂志,2012,24(4):380-382.
- [10] 吴宏伟,李洪梅,唐仕欢,等. 姜黄药效物质基础研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(2):104-106.
- [11] Lin JK, Shin CA. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells[J]. Carcinogenesis,1994,158:1717-1721.
- [12] 李彦,贾恩礼,栾琳. 蜂房药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2004,21(5):21-22.
- [13] 张新. 蜂房治外伤感染[J]. 中国民间疗法,2003,11(4):28.
- [14] 李遇春,梁伯. 浅谈蜂房的研究进展[J]. 河南中医,1994,14(3):189-191.
- [15] 邓明鲁. 中国动物药[M]. 长春:吉林人民出版社,1981.
- [16] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典第一部[S]. 广

东:广东科技出版社,1995.

- [17] 王占彬,郭鲜敏,杨兰香,等. 皂角刺提取物对肉仔鸡免疫功能的影响[J]. 养禽与禽病防治,2005,11(1):23-25.
- [18] 刘建建,时鹏,黄涛,等. 皂角刺提取物体外抑菌杀菌作用研究[J]. 医药导报,2013,32(3):300-302.
- [19] 吕正涛,牟子君. 中药复方制剂的体外抗菌活性研究[J]. 中医学报,2013,41(4):72-75.
- [20] 张雅明,叶伟成,杨巍,等. 痔科熏洗方对大鼠术后伤口愈合的实验研究[J]. 中国肛肠病杂志,2000,20(3):3-5.
- [21] 郑雪平,许慧琴,丁义江,等. 复方珠黄霜对兔背部人粪污染创面愈合的实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志,2002,8(5):361-364.
- [22] 付小兵,王德文. 创伤修复基础[M]. 北京:人民军医出版社,1997:378-380.
- [23] 付小兵,孙同柱,盛志勇. 几种用于创伤修复研究的动物模型[J]. 中华实验外科杂志,1999,16(5):479-480.
- [24] 袁亮,李国栋,洪子夫,等. 中医祛腐生肌法祛腐作用机理的实验研究[J]. 成都中医药大学学报,2007,30(2):45-47.
- [25] 阙华发. 外科疔疮长肉湿润法研究[J]. 中医函授通讯,1999,18:3-5.
- [26] 程洪伟. 胶原酶注射治疗人增生瘢痕的动物实验性研究[J]. 实验动物科学与管理,1996,13(3):33.
- [27] 张幼林,张秀华,常明泉,等. “瑰及”乳膏祛腐生肌作用机理的实验研究[J]. 中国药事,2011,25(3):242-244.
- [28] 丁继存,杨六中. 祛腐生肌膏促进创伤感染创面愈合作用的临床观察[J]. 南京中医药大学学报,2009,25(3):225-227.
- [29] 中华本草编委会. 中华本草精选本[M]. 上海:上海科技出版社,1983.
- [30] 张绍昌. 药理学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1962.
- [31] 陈荣明,许芝银. 小鼠皮肤创面外用红升丹及其制剂对肾脏的毒性和机理初探[J]. 南京中医药大学学报,1995,11(2):73-75.
- [32] 潘立群,陈荣明. 升丹制剂临床安全用药的指标观察[J]. 江苏中医,2000,21(8):40.
- [33] 赵永娇,何颖华,智建文,等. 中医祛腐生肌法治疗慢性难愈性创面研究现状[J]. 北京中医药,2010,29(6):466-469.

(2013-10-08 收稿)

(上接第1466页)

但是心肌梗死后大鼠行为学的异常发生的机制目前尚未阐明,这也是本研究下一步的工作方向。

参考文献

- [1] 赵洪云,管慧红,钟雪云,等. 开胸冠状动脉结扎法制作大鼠心肌梗死模型[J]. 国外医学内科学分册,2005,32(12):540-542.
- [2] Benelli A, Filafferro M, Bertolini A, et al. Influence of S-adenosyl-1-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats[J]. Br J Pharmacol,1999,127:645.
- [3] WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10 year review and evaluation[J]. Psychopharma-

cology (Berl),1997,134:319-329.

- [4] FLEETRP, BEITMAN B D. Cardiovascular death from panic disorder. a critical review of the literature[J]. J Psychosom Res,1999,44(1):71-80.
- [5] Boubacar Pasto Wann, MSc; Thierno Madjou Bah, MSc; Matthieu Boucher, MSc; et al. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats; a possible model for human postinfarct major depression[J]. J Psychiatry Neurosci,2007,32(1):11-16.
- [6] Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, et al. Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction; effects of sertraline[J]. J Psychopharmacol,2009 Jun,23(4):451-459.

(2013-09-06 收稿)