

实验研究

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.09.021

三七花总皂苷水凝胶促进大鼠急性皮肤创伤愈合作用研究

陈媛媛,潘慧婕,曾臣红,魏莉

上海中医药大学中药学院(上海 201203)

【摘要】 目的 探讨三七花总皂苷水凝胶对皮肤创伤修复作用。**方法** 切除大鼠全层皮肤,形成急性机械损伤动物模型。重组牛碱性成纤维细胞生长因子(rb-bFGF)凝胶做为阳性对照组,三七花总皂苷水凝胶(10 g/L,25 g/L,50 g/L)涂布创伤表面,每日1次,连续10日,比较不同处理方式对创面愈合时间、创面愈合率、创面血管形成、创面组织学的影响。**结果** 三七花总皂苷水凝胶组(10 g/L,25 g/L,50 g/L)随时间和剂量的增加确实有提高创面愈合率和降低感染创面感染反应的作用,病理结果显示三七花总皂苷水凝胶明显促进创面炎性渗出物吸收、肉芽组织形成和表皮增生。**结论** 三七花总皂苷水凝胶能够促进大鼠皮肤创伤的修复。

【关键词】 三七花总皂苷;水凝胶;皮肤创伤;修复;血管生成

Study on the effect of *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel in promoting the healing of acute skin wound in rats

CHEN Yuan-yuan, PAN Hui-jie, ZENG Chen-hong, WEI Li

School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

Abstract: Objective To investigate the repair effect of *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel on skin wound. **Methods** Animal model of acute mechanical skin damage was formed by incisions of full skin in rats. Recombinant bovine basic fibroblast growth factor hydrogel (rb-bFGF) was used as a positive drug. *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel (10g/L,25g/L,50g/L) was administrated by coating the wound surface, once a day and a course of 10 days. The effects of different treatments on wound healing time, wound healing rate, wound angiogenesis and wound histology were compared. **Results** *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel improved wound healing rate and reduced the infection reaction of infected wound with the time and dose increasing. Pathology results showed that *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel significantly promoted the absorption of wound inflammatory exudate, formation of granulation tissue and epidermal hyperplasia. **Conclusion** *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel could promote the repair of skin wounds in rats.

Keywords: *Panax notoginseng* flower saponins hydrogel; hydrogel; skin wounds; healing; angiogenesis

创面愈合是指由于致伤因子的作用造成组织缺失后,局部组织通过再生、修复、重建,进行修补的一系列病理生理过程^[1-2]。它是一个复杂的生物学过程,包括炎症反应、细胞增殖、创面收缩、胶原代谢等基本过程。创面感染是皮肤创伤愈合延迟的主要原因之一,有效控制创面感染和促进创面愈合是皮肤创伤治疗的重要环节^[3]。

三七花是五加科植物三七 [*Panax Notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥花 [Flower buds of *Panax*

notoginseng (Burk.) F. H. Chen], 主产于云南文山。三七花是三七全株中皂苷含量最高的部分^[4-7],具有清热解毒、平肝明目、生津止渴、降压等药理作用^[8]。三七有“止血神药”之称,散瘀血,止血而不留瘀,对出血兼有瘀滞者更为适宜。前期研究中发现,三七花有促进血管生成的作用^[9],而血管生成可以促进创伤的愈合。因此本实验主要采用大鼠急性皮肤创伤模型,研究三七花总皂苷水凝胶对大鼠皮肤创伤的促愈合作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠,雄性,清洁级,40只,体质量(200±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号:SCXK 2012-0002。饲养于上海中医药

[基金项目] 上海市研究生教育创新计划项目(A2-P3550808)

[作者简介] 陈媛媛,女,硕士生,主要从事中药新剂型与新技术方面研究工作

[通讯作者] 魏莉,教授,硕士生导师。

E-mail: weilitcm@163.com

大学实验动物中心。

1.1.2 药物与试剂 三七花购自云南文山三七科技创新中心有限公司,经文山三七研究院崔秀明博士鉴定为五加科植物三七[*Panax Notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥花[Flower buds of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen],产于云南文山;重组牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶(rb-bFGF 凝胶,批号:20130841),珠海亿胜生物制药有限公司。

三七花总皂苷:实验室自提^[10],其中成分组成为三七皂苷 R_1 9.75%,人参皂苷 Re + 人参皂苷 R_{g_1} 4.25%,三七皂苷 L 11.50%,人参皂苷 Ra_3 9.50%,人参皂苷 Rb_1 13.50%,人参皂苷 Rh_1 1.75%,人参皂苷 Rc 10.75%,人参皂苷 Rb_2 6.75%,人参皂苷 Rb_3 14.00%,人参皂苷 Rd 10.50%,人参皂苷 Rg_3 8.75%。

三七花总皂苷水凝胶:卡波姆 940NF 1 g,甘油 5 g,尼泊金乙酯 0.1 g,三乙醇胺适量(调 pH 至中性),三七花总皂苷水溶液(浓度为 10 g/L、25 g/L、50 g/L)加至 100 g。

对照品三七皂苷 R_1 、 L 、 R_2 、人参皂苷 Rb_1 、 Re 、 R_{g_1} 、 Ra_3 [20-(S)原人参三醇型皂苷]、 Rb_2 、 Rb_3 、 Rd 、 Rc [20-(S)原人参二醇型皂苷]、 Rh_1 ,均为实验室自制,所有皂苷单体分子式均经过 C-NMR、DEPT 及现有文献证实,含量均在 98% 以上;卡波姆 940NF(批号:CC74BBC305),上海运宏化工试剂辅料技术有限公司;苏木精(批号:G1004)、伊红(批号 G1001),武汉谷歌生物。

1.1.3 仪器 电子分析天平(CPA225D),德国 Sartorius 公司;旋转蒸发器(R206),上海申生科技有限公司;超声清洗机(SB-5200),宁波新芝生物科技股份有限公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;脱水机(JJ-12J),武汉俊杰电子有限公司;包埋机(KD-BM),浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;冻台(JB-L5),武汉俊杰电子有限公司;切片机(RM2016),上海徕卡仪器有限公司;摊片机(KD-P),浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;烘箱(DGX-9003B),上海福玛实验设备有限公司。

1.2 造模、分组及给药 采用大鼠全层皮肤切除模型:SD 大鼠 40 只,每只大鼠背部两侧用自制刀片各切割 3 个直径为 1 cm 的圆形全层皮肤缺损的创面,深至皮下,形成机械损伤动物模型。每只大鼠的 6 个创面分别作为 rb-bFGF 凝胶组(阳性对照组)、空白基质组、模型对照组及三七花总皂苷水凝胶 3 个不同剂量组,

分别予以市售重组牛碱性成纤维细胞生长因子(rb-bFGF)凝胶、空白水凝胶、不进行干预(全空白皮肤)、10 g/L 三七花总皂苷水凝胶、25 g/L 三七花总皂苷水凝胶、50 g/L 三七花总皂苷水凝胶。

1.3 取材及指标检测

1.3.1 创面强光投射观察 分别在给药后第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天各处死 10 只模型大鼠前,将 SD 大鼠创面自深筋膜掀起,用手电作光源,创面透光观察血管、结缔组织情况,并照相记录。

1.3.2 创面愈合率 在给药后第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天分别处死 10 只模型大鼠,用透明薄膜描记创面面积,与原创面面积比较,计算不同组别创面愈合率。愈合率(%)=(原创面面积-现创面面积)/原创面面积 $\times 100\%$,评价创面愈合速度。

1.3.3 常规病理组织学切片染色(HE 染色) 在给药后第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 10 天分别处死 10 只模型大鼠,以锋利手术刀取皮肤创缘及周围 0.5 cm 左右宽的组织,深达皮下组织,将组织块置于 10% 中性缓和甲醛中固定 5 天后,常规石蜡包埋后备用。将蜡块常规脱水,包埋,切片后作 HE 染色,光镜观察皮肤及肉芽组织结构改变,并在 400 倍光学显微镜下观察毛细血管数。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较使用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

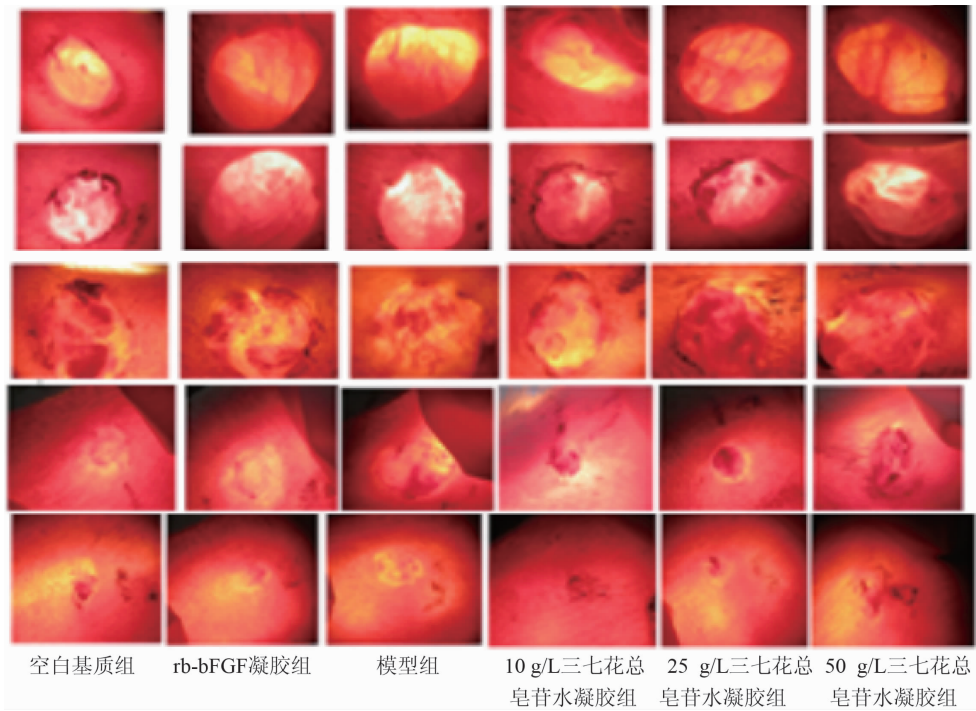
2 结果

2.1 创面强光投射观察 给药前各组模型大鼠在强光投射下,创伤口小血管明显,创伤口边缘明显。

给药 1 天后,10 g/L 三七花总皂苷水凝胶组、25 g/L 三七花总皂苷水凝胶组及 50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组均有明显的肉芽组织开始形成,并有向中心形成的趋势,空白基质组和模型组无明显变化,rb-bFGF 凝胶组也有了肉芽组织的形成。

给药 4 天后,三七花总皂苷水凝胶组有明显的促进愈合作用且有浓度依耐性,50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组愈合效果优于 10 g/L 三七花总皂苷水凝胶组。模型组和空白基质组变化不明显并有少量的炎性液体流出,rb-bFGF 凝胶组也变化明显。

给药 7 天、10 天后,三七花总皂苷水凝胶 3 组已经愈合,rb-bFGF 凝胶组次之,模型组未愈合,空白基质组未完全愈合。见图 1。



注:从上到下分别为给药前及第1、4、7、10 天

图1 不同组别给药前及第1、4、7、10 天伤口透光观察情况

2.2 创面愈合率情况 模型组和空白基质组差异无统计学意义($P>0.05$),表明空白基质对创伤没有促进作用。各给药组与空白基质组比较可见,除第1天外,其余时间内创伤愈合率差异均有统计学意义($P<0.05$),表明 rb-bFGF 凝胶及三七花总皂苷水凝胶均能够促进创伤愈合。各时间点比较发现,给药 5、6、7、8 天时创伤愈合率显著提高($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间的创伤愈合率比较($n=40,\bar{x}\pm s$)

组别	创伤愈合率(%)									
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天	第10天
模型组	3.10±2.30	5.01±3.30	8.59±3.20	20.09±5.21	32.11±7.60 [#]	37.12±10.12 [#]	50.05±13.54 [#]	63.10±11.93 [#]	78.06±9.02	84.29±12.61
空白基质组	3.23±1.07	5.01±1.20	8.60±2.11	22.09±7.34	35.24±9.15 [#]	40.12±6.80 [#]	51.23±10.10 [#]	62.79±15.21 [#]	77.15±8.90	85.00±5.98
rb-bFGF 凝胶组	5.02±0.88	9.02±3.42 [*]	15.02±4.23 [*]	30.01±7.98 [*]	40.00±10.99 ^{##}	53.10±5.43 ^{##}	78.06±14.45 ^{##}	89.03±3.57 ^{##}	91.50±3.15 [*]	96.01±2.97 [*]
10 g/L 三七花总皂苷水凝胶量组	5.10±4.50	7.10±1.39 [*]	15.03±1.76 [*]	28.06±10.03 [*]	40.02±11.89 ^{##}	53.09±1.95 ^{##}	80.00±15.60 ^{##}	93.14±3.50 ^{##}	100.00±0.00 [*]	100.00±0.00 [*]
25 g/L 三七花总皂苷水凝胶量组	5.00±3.12	9.01±1.18 [*]	17.12±1.34 [*]	30.07±6.56 [*]	44.02±9.46 ^{##}	60.09±2.01 ^{##}	80.12±14.55 ^{##}	93.11±2.18 ^{##}	93.06±9.14 [*]	94.03±1.55 [*]
50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组	7.18±2.92	10.90±2.32 [*]	20.05±8.21 [*]	36.51±10.90 [*]	50.12±7.27 ^{##}	61.11±6.78 ^{##}	82.52±17.21 ^{##}	91.07±8.12 ^{##}	95.57±5.02 [*]	96.02±8.15 [*]

注:与空白基质组比较,* $P<0.05$;各时间点比较,## $P<0.05$

2.3 各组病理组织学切片情况 在给药后第1天(图2),各组皮肤缺损严重,皮肤组织重度坏死,各组有不同程度的炎细胞浸润;相较之下,50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组的炎细胞浸润程度较轻,空白基质组和模型组伴有轻微程度的出血。给药后第4天(图3),10 g/L、25 g/L、50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组及rb-bFGF凝胶组皮肤缺损减少,组织轻度坏死,少量炎细胞浸润,同时肉芽组织、成纤维细胞、毛细血管形成。空白基质组与模型组炎细胞浸润减少。给药后第7天

(图4),10 g/L、25 g/L、50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组及rb-bFGF凝胶组无组织坏死,肉芽组织、成纤维细胞、毛细血管增多,胶原细胞生成;空白基质组和模型组皮肤组织轻度坏死,有肉芽组织、成纤维细胞、毛细血管、胶原细胞形成。给药后第10天(图5),10 g/L、25 g/L、50 g/L 三七花总皂苷水凝胶组及rb-bFGF凝胶组创面完全愈合,胶原细胞形成增多;而空白基质组和模型组未完全愈合,伴有皮肤组织轻度坏死,肉芽组织、成纤维细胞、胶原细胞形成增多,毛细管形成减少。

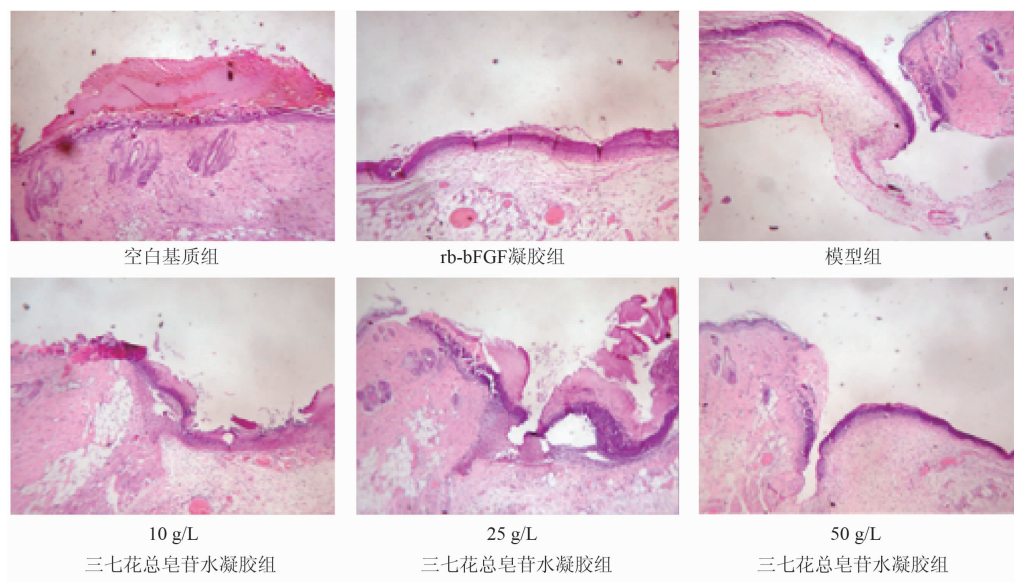


图2 给药1天后常规组织学切片(HE染色, ×400)

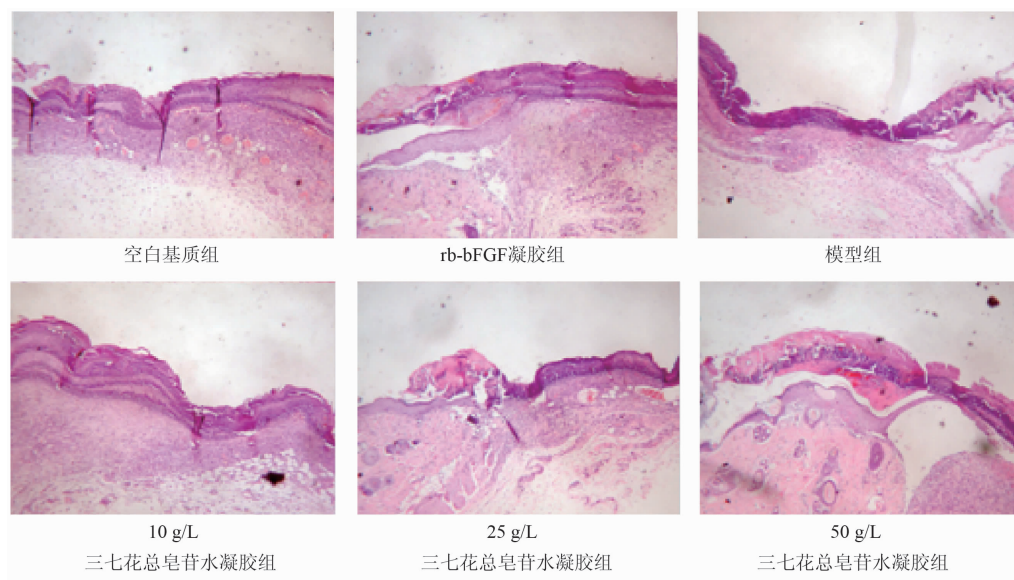


图3 给药4天后常规组织学切片(HE染色, ×400)

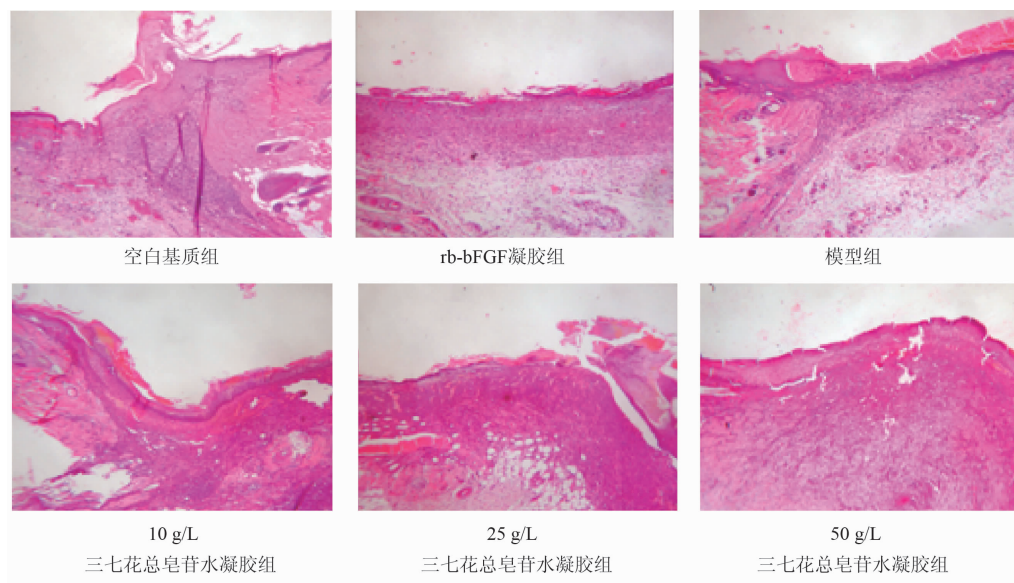


图4 给药7天后常规组织学切片(HE染色, ×400)

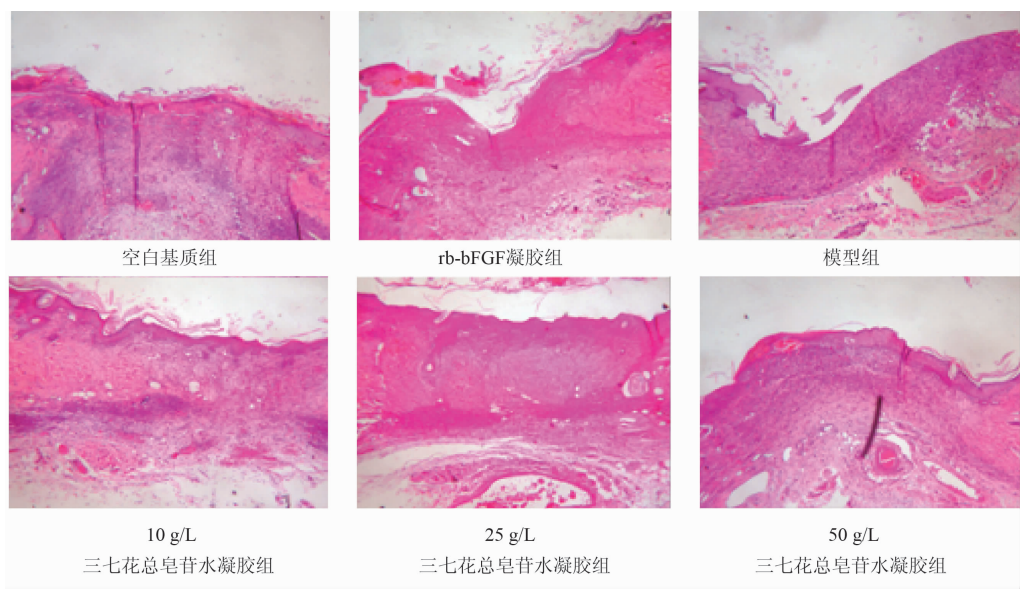


图5 给药 10 天后常规组织学切片 (HE 染色, ×400)

3 讨论

创伤修复是十分复杂的生物学过程,创伤愈合大致可分为 3 个阶段^[11]:①炎症反应,溶解、清除坏死组织和渗出物;②结缔组织细胞和血管内皮细胞游动、增殖,形成肉芽组织;③新生结缔组织基质沉积和新生组织改建。其中最关键的是肉芽组织形成期,肉芽组织数量的多少和质量的好坏直接影响着创面的修复愈合程度及其预后^[12-14]。随着药物作用时间的延长,肉芽组织形成增多,这也可能是伤口愈合加快的原因。

bFGF 具有促进骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化的作用^[15-18]。因此,bFGF 的表达水平可作为评价创伤愈合速度和愈合质量的指标。本实验选择市售 rb-bFGF 凝胶作为阳性参考,10 g/L、25 g/L、50 g/L 三七花总皂苷水凝胶作为给药组连续 10 天给药。由创伤愈合率可以看出,三七花总皂苷水凝胶促进伤口愈合作用明显。前期创伤愈合加快,后期愈合速度减慢,且前期高剂量组的三七花总皂苷水凝胶效果显著,剂量的提高有助于创伤愈合速度加快。后期创伤愈合趋于平缓,3 个剂量组间没有明显差异。综上可知,三七花总皂苷水凝胶能够促进创伤愈合,但其创伤修复的详细机制有待于进一步考察。

参考文献:

[1] Gordts SC, Muthuramu I, Amin R, *et al.* The impact of lipoproteins on wound healing; Topical HDL therapy corrects delayed wound healing in apolipoprotein E deficient mice [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014, 7 (4): 419-432.

[2] He YL, Ye M, Du ZZ, *et al.* Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum YM405* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014 (105): 169-176.

[3] Nakamura T, Daimon T, Mouri N, *et al.* Staphylococcus aureus and repeat bacteremia in febrile patients as early signs of sternal wound infection after cardiac surgery [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2014 (9): 80.

[4] 魏莉,周浩. 大孔吸附树脂分离纯化三七花蕾总皂苷的研究 [J]. *中药材*, 2008, 31 (9): 1418-1420.

[5] 魏莉,杜奕,周浩. 不同产地和生长年限三七花蕾中总皂苷及单体皂苷的含量测定 [J]. *上海中医药杂志*, 2008, 42 (4): 76-78.

[6] Han LF, Sakah KJ, Liu LL, *et al.* Saponins from Roots of *Panax notoginseng* [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2014, 6 (2): 159-163.

[7] Wan JB, Zhang QW, Hong SJ, *et al.* Chemical investigation of saponins in different parts of *Panax notoginseng* by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2012, 17 (5): 5836-5853.

[8] 王相如,朱福. 三七花药理作用及主治功效研究 [J]. *求医问药*, 2012, 10 (8): 594-595.

[9] Wang Y, Qian P, Liu P, *et al.* Effects of *Panax notoginseng* flower extract on the TGF- β /Smad signal transduction pathway in heart remodeling of human chymase transgenic mice [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5 (6): 1443-1448.

[10] Wang Z, Chen YY, Wei Li, *et al.* Saponin accumulation in flower buds of *Panax notoginseng* [J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2015, 7 (2): 179-184.

[11] 薛盛中,刘保健,董万涛,等. 皮肤创伤愈合的分子机制研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2014, 6 (23): 139-140, 142.

[12] 樊慧杰,柴智,闫润红,等. 补中益气汤对脾气虚证模型大鼠手术切口肌肉组织炎症反应和肉芽组织增生的影响 [J]. *中医杂志*, 2014, 55 (3): 238-241.

[13] 王军,张英军,张庚扬,等. 外用中药促进慢性难愈性创面愈合的实验研究进展 [J]. *湖南中医杂志*, 2014, 30 (5): 166-169.

[14] 王小亮,张月娟,奉水华,等. 象皮生肌膏对压疮缺血再灌注损伤大鼠新生肉芽组织中纤维结合蛋白含量的影响 [J]. *中医药导报*, 2015, 21 (8): 22-25.

[15] 陈涛,付小兵,伍津津,等. bFGF 与 MSCs 自体移植对猪皮肤创面 PCNA 和 VIII-R Ag 表达的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29 (2): 91-93.

推测养心汤治疗心力衰竭的机制可能与抑制神经-体液-内分泌系统,降低心室壁压力,延缓心室重构,恢复心肌的收缩功能,减少 BNP 的释放有关,体现了中医药多靶点、多方位干预的优势。

心力衰竭是各种心脏结构或功能改变导致心脏舒缩功能异常而引起的一组临床症状^[10]。心脏彩超作为一种无创的诊疗手段不但能测出心脏大小,并且能动态显示心腔内结构(室壁、室间隔厚度,瓣膜结构^[11],室壁运动情况),心脏的射血分数以及异常结构等,为心力衰竭的分级及进一步监测心脏功能提供客观的临床依据。利用心脏彩超测定左室射血分数(LVEF),因其操作简单、安全、可重复性强、特异性及敏感性高,已经成为心力衰竭的诊断、疗效判定与预后评估的可靠指标,被公认为用于鉴别无症状性心力衰竭的有力工具。而且心脏负荷状态和心率对 LVEF 的影响较小,所以,LVEF 已经成为公认的用于评价心脏收缩力变化的敏感性和特异性的定量指标^[12]。本实验选用 LVEF 作为心功能观察指标,具体原因如下。其一,监测大鼠慢性心力衰竭的模型复制是否成功,与空白对照组比较,造模 6 周后大鼠的心功能明显降低 $\leq 60\%$,再结合大鼠的饮食、运动、呼吸、毛色等情况的改变认为本实验模型造模成功。其二,用于灌胃 4 周后评定养心汤组和卡托普利组的疗效;与模型对照组比较,养心汤组、卡托普利组大鼠心功能明显改善,养心汤组与卡托普利组比较,大鼠心功能改变相当。据此推测养心汤增加心力衰竭大鼠 LVEF 的机制可能是通过养心汤发挥益气养血、宁心安神的功效,从而补益心气,心气充足,则血脉运行通畅,增加心肌收缩力,增加 LVEF 值。

综上所述,养心汤能降低心力衰竭模型大鼠血清 BNP 水平,增加 LVEF 值,延缓心室重构,从而达到治

疗心力衰竭的目的,其疗效与卡托普利相当,值得临床应用和推广。

参考文献:

- [1] Vaz Pérez A, Doehner W, von Haehling S, *et al.* The relationship between tumor necrosis factor- α , brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 141(1):39-43.
- [2] 成忠煌,胡雪峰,彭敏,等.阿霉素诱导大鼠慢性心力衰竭模型给药剂量和频率的优化[J]. *湖北中医杂志*, 2011, 33(4):9-11.
- [3] 皇甫海全,于海睿,张文钊,等.养心汤临床应用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(7):129-131.
- [4] 谭丽娟,张悟棠,冷婧,等.慢性充血性心力衰竭预后评价及危险因素探讨[J]. *中国药物与临床*, 2015, 6(6):884-886.
- [5] 于晓红,周亚滨,孙静,等.养心汤对不稳定型心绞痛患者血浆代谢组学的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(2):191-198.
- [6] 王艳芬,于晓红,周亚滨.养心汤的现代研究[J]. *河南中医*, 2013, 33(3):434-436.
- [7] Nishiyama K, Tsutamoto T, Yamaji M, *et al.* Biological variation of brain natriuretic peptide and cardiac events in stable outpatients with nonischemic chronic heart failure[J]. *Circ J*, 2011, 75(2):341-347.
- [8] Salerno D, Marik PE. Brain natriuretic peptide measurement in pulmonary medicine[J]. *Respir Med*, 2011, 105(12):1770-1775.
- [9] Coutance G, Le Page O, Lo T, *et al.* Prognostic value of brain natriuretic peptide in acute pulmonary embolism[J]. *Crit Care*, 2008, 12(4):R109.
- [10] 王雅君,陈晓虎,刘春玲.中医治疗慢性心力衰竭研究进展[J]. *中国中医急症*, 2013, 22(1):87-89.
- [11] 周自强,胡大一,陈捷,等.中国心高血压左室肥厚伴左心力衰竭的流行病学现状[J]. *中华内科杂志*, 2010, 43(7):491-494.
- [12] 陈健,张连生,祁正军,等.超声对慢性心功能衰竭患者左心功能的评价价值[J]. *河北医学*, 18(12):1740-1742.

编辑:季春来

收稿日期:2015-10-25

(上接第 76 页)

- [16] 靳波,徐盈斌,刘旭盛,等. aFGF、bFGF 和 EGF 对小鼠皮肤成纤维细胞生长及蛋白酶活化受体 1 的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(3):180-182, 186.
- [17] Zhang HY, Zhang X, Wang ZG, *et al.* Exogenous basic fibroblast growth factor inhibits ER stress-induced apoptosis and improves recovery from spinal cord injury[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 19(1):

20-29.

- [18] Wang Z, Zhang H, Xu X, *et al.* bFGF inhibits ER stress induced by ischemic oxidative injury via activation of the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(2):137-146.

编辑:季春来

收稿日期:2016-04-05