

• 实验研究 •

奇蒿不同溶剂提取物对大鼠烧伤创面愈合的作用

Effects of *Artemisia anomala* S. Moore extracts on wound healing of burned rats

年 华¹, 秦路平^{1*}, 郑汉臣¹, 张巧燕¹, 邢 新²

(1. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 2. 长海医院整形外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**研究奇蒿对伤口愈合的影响,以证实其在创面愈合过程中所起的重要作用。**方法:**将奇蒿不同溶剂(石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇)提取物应用于大鼠背部深Ⅱ度烫伤模型,通过不同时间创面愈合的肉眼观察、计算机图像分析、活检标本的细胞DNA周期分析及创面组织病理切片等方法观察上皮愈合的情况。**结果:**奇蒿氯仿提取物组创面平均愈合时间为 (15.01 ± 1.00) d,空白组为 (21.12 ± 1.34) d ($P < 0.01$);氯仿组创面羟脯氨酸(伤后5、10、15 d)及S期细胞百分比(伤后10、20 d)明显高于对照组 ($P < 0.01$),提示其有促进创面愈合的疗效。**结论:**奇蒿氯仿提取物有明显的促进创面愈合的作用。

[关键词] 奇蒿;氯仿;创面愈合;烧伤

[中图分类号] R 282.710.7

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1385-03

奇蒿(*Artemisia anomala* S. Moore)又名南刘寄奴、六月霜,全草入药,始载于南北朝的《雷公炮制论》,以后历代主要本草如《唐本草》、《证类本草》和《中华本草》等均有记载,为传统中药刘寄奴的正品。《本草蒙笙》^[1]中就有记载其能“消瘀肿毒,灭汤火热痛。”中医认为奇蒿具有敛疮消肿、破瘀通经的功效,主治跌打损伤、金疮出血、烫伤等症。尤其在治疗跌打损伤、金疮出血方面有非常好的疗效。本研究应用大鼠背部深Ⅱ度烧伤创面模型,研究奇蒿的促伤口愈合作用,并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 奇蒿药材(购于杭州胡庆余堂药店),积雪草苷(上海亚东制药厂),氯氨T(Sigma),胶原酶(Worthington),RNA酶(Amresco),碘化丙啶(上海普飞生物技术有限公司)。流式细胞计数仪(Becson Dickinson),计算机图像分析仪(AST 386/PFG Image broad),控温控压电烫仪(第二军医大学烧伤中心研制),Ultrospec3000型分光光度仪(Pharmacia Biotech),电子恒温电烫仪。

1.2 提取物的制备 将40 kg干燥原药材用80%乙醇渗漉法提取(65℃),渗漉液经薄膜蒸发装置浓缩、干燥成粉末,取干燥粉末约1 kg,用石油醚浸泡24 h,过滤、浓缩、干燥得石油醚提取物;滤渣干燥后以氯仿浸泡24 h,过滤、浓缩得氯仿提取物;滤渣干燥后用乙酸乙酯浸泡24 h,过滤、浓缩得乙酸乙酯提取物;滤渣干燥后再用正丁醇浸泡24 h,过滤、浓缩得正丁醇提取物。

1.3 动物模型的建立 清洁级SD大鼠,体质量200~250 g,雌雄各半(由第二军医大学实验动物中心提供)。随机分成6组:空白组(生理盐水组)、积雪草苷组(阳性对照组)、奇蒿石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇提取物组。实验前1 d,剪去大鼠背部毛,用8%硫化钠脱毛。实验当天动物在2.5%戊巴比妥钠(35 mg/kg,腹腔注射)麻醉下,用恒温控压电烫仪在动物背部一侧以90℃烫10 s的致伤条件,制成直径为2.5 cm的圆形深Ⅱ度烧伤创面(烧伤深度由病理组织切片证实),待醒后分组给药,单笼饲养。

1.4 创面处理和用药方法 用药前用无菌生理盐水(NS)擦拭创面,去腐皮及局部坏死组织。清创后,每个创面按分组分别滴加NS(0.2 ml)、奇蒿不同提取物(每个创面每天用药量以生药计为1 g/cm²,再覆盖无菌纱布包扎)、积雪草苷0.2 ml(浓度为20%,以NS配制),连续20 d每天1次。

1.5 治疗效果评价 在创面愈合过程中照相,用计算机图像灰度积分分析系统来比较创面愈合的程度。通过观察伤后不同时间点的创面面积大小,同原始创面比较,计算愈合率和平均愈合天数。在用药的第10、20天,取创面组织做活检,经胶原酶37℃恒温烘箱内消化30 min,分离表皮及上皮细胞,用流式细胞计数仪分析创面愈合过程中细胞DNA周期的变化^[2,3]。伤后第10、15、20天,取创面组织进行匀浆,采用氯氨T氧化法^[4,5]测定组织中羟脯氨酸含量。每天观察创面的干湿度和上皮皮岛出现的情况,同时观察创面愈合情况。病理活检组织取下后置40%甲醛中保存,采用石蜡包埋切片,行常规H-E染色病理学观察,观察皮肤组织形态学变化。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 创面大体观察和病理活检 与空白组相比,奇蒿氯仿提取物创面上皮皮岛出现多,伤后24 h氯仿提取物组伤口开始出现少许红晕,表明肉芽组织已在生长,而空白组伤口湿润;伤后3 d,氯仿提取物组肉芽组织生长明显,局部已长出薄层或点状上皮,创缘皮肤收缩明显,其余各提取物组与空白组无明显差异;伤后10 d,氯仿提取物组伤口干燥、无感染,创面已基本为肉芽组织所填充,而阳性对照组伤口湿润,渗出物较多,收缩不明显,仅见薄层肉芽,未见明显的新生上皮。病理活检表明,伤后第5天氯仿提取物组毛囊残余上皮细胞生长明显(图1A),空白组毛囊残余上皮细胞仅有少量

[基金项目] 全军医药科研“十五”规划课题青年课题(01Q085)。

[作者简介] 年 华(1978-),男(纳西族),博士生。

E-mail:jackynian@hotmail.com

*Corresponding author. E-mail:qinluping@hotmail.com

增生;伤后第 10 天,氯仿提取物组上皮生长活跃,胶原粗大(图 1B),空白组细胞结构较疏松,胶原纤维稀疏,生长缓慢。伤后 10 d 氯仿提取物组上皮层次多,纤维组织增生较厚,真皮层有较丰富的毛细血管。

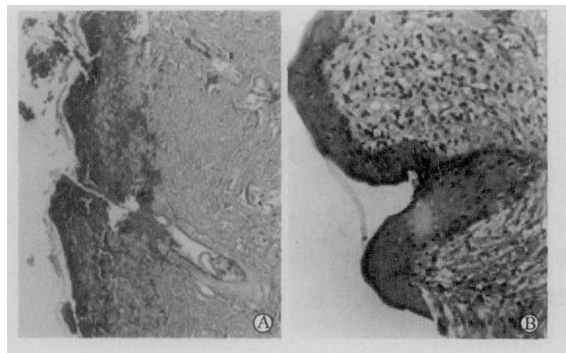


图 1 创面组织病理检查结果(H-E)

A: 伤后 5 d(×4); B: 伤后 10 d(×10)

2.2 创面愈合结果 奇蒿各提取物组创面结痂时间较对照组早,创面渗出物少;氯仿提取物平均愈合时间为(15.01±1.00) d,积雪草苷组为(17.23±0.14) d,与空白组(21.12±1.34) d 相比存在显著差异($P<0.01$)。同时外用氯仿提取物伤后 5、10 和 15 d 的创面愈合率也高于空白组($P<0.01$,表 1)。

表 1 奇蒿提取物对烧伤创面愈合率的影响

($n=15, \bar{x} \pm s, \%$)

组 别	伤后天数(t/d)		
	5	10	15
空白	0.25±0.11	0.51±0.09	0.77±0.12
积雪草苷	0.29±0.10*	0.61±0.11*	0.81±0.14*
石油醚提取物	0.22±0.08	0.40±0.08	0.68±0.13
氯仿提取物	0.34±0.12**	0.70±0.06**	0.98±0.16**
乙酸乙酯提取物	0.23±0.10	0.47±0.07	0.70±0.11
正丁醇提取物	0.25±0.12	0.52±0.11	0.76±0.11

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与空白组比较

2.3 全厚皮肤 DNA 的流式细胞仪分析结果 奇蒿氯仿提取物的 S 期细胞百分比均高于空白组($P<0.01$,表 2),表明其具有促进表皮细胞和上皮组织的细胞增殖与修复的功能。

表 2 外用奇蒿不同提取物后烧伤

创面 S 期细胞百分比的变化

($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组 别	伤后天数(t/d)	
	10	20
空白	10.01±1.43	4.15±0.42
积雪草苷	12.98±1.67*	5.97±0.50*
石油醚提取物	10.02±1.11	4.01±0.77
氯仿提取物	35.58±2.97**	10.35±1.49**
乙酸乙酯提取物	9.34±1.00	3.92±0.22
正丁醇提取物	9.32±1.03	4.12±0.37

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与空白组比较

2.4 创面组织羟脯氨酸含量 奇蒿氯仿提取物的创面羟脯氨酸含量均高于空白组($P<0.05$, $P<0.01$,表 3),实验结果与光镜检测及 DNA 检测结果相一致,提示其具有很好的胶原修复及重塑能力。

表 3 创面羟脯氨酸含量的变化

($n=8, \bar{x} \pm s, \text{mg}/\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)

组 别	伤后天数(t/d)		
	5	10	15
空白	20.34±0.46	20.63±0.42	18.35±0.34
积雪草苷	21.86±0.67*	20.78±0.50	18.98±0.56*
石油醚提取物	18.97±0.32	20.42±0.77	17.96±0.73
氯仿提取物	23.98±0.97**	22.89±0.49**	19.97±0.42*
乙酸乙酯提取物	19.78±0.55	20.58±0.22	17.94±0.57
正丁醇提取物	20.01±0.53	19.96±0.37	18.21±0.41

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与空白组比较

3 讨 论

烧伤创面愈合主要包括炎症反应、细胞增殖、结缔组织形成和组织塑形等过程,且创面愈合又要符合细胞生长的许多微环境。炎症反应不仅为清除坏死组织和异物所必需,且同时启动和调控创面修复。细胞增殖主要为成纤维细胞和表皮细胞的增殖,是烧伤愈合过程关键环节。创面愈合是细胞不断增殖分化的过程,当细胞分裂增殖时,细胞周期中的 G 期细胞不断进入 S 期,使 S 期细胞所占比例增加, DNA 的合成和含量就增加,检测 S 期细胞比例是评价创面细胞增殖强弱的有效指标^[6],本组结果表明,氯仿提取物组 S 期细胞百分率较空白组高,说明细胞增殖更活跃,从而使创面愈合时间缩短。此外,结缔组织主要成分是成纤维细胞及其形成的胶原蛋白。胶原的沉积和修复是创面愈合的重要表现,胶原的主要成分是羟脯氨酸,其在胶原中所占的比例是恒定的,测羟脯氨酸含量可反映胶原含量,这也是创面愈合的主要指标^[7],实验发现奇蒿氯仿提取物能明显促进创面胶原的合成,与空白组相比羟脯氨酸含量达峰时间早且峰值高。

通过前期的大量实验研究观察了低、中、高不同浓度剂量下外用提取物对伤口愈合的影响,我们发现实验中的剂量能很好的在创面发挥作用,不同提取物的化学成分稳定、无不良作用。而且,我们采用了目前临床上疗效确切的中药提取物积雪草苷为阳性对照,增强了模型筛选的可靠性^[8,9]。

研究结果提示:奇蒿氯仿提取物对烧伤创面的愈合具有很好的促进作用,这可能是通过促进胶原合成及影响细胞增殖的途径来实现的。我们的研究还发现奇蒿氯仿提取部位的化学成分主要为黄酮类化合物,该类成分有很强的抗炎、抗菌活性,这可能更好的帮助创面愈合,为创面修复提供合适的微环境,其促进愈合的确切机制及活性成分的研究有待进一步探索。

【参 考 文 献】

- [1] 陈嘉谟.本草蒙筌[M].北京:人民卫生出版社,1988.194.
- [2] 刘 琰,陆树良,王志勇,等. EGF 对大鼠深Ⅱ度烫伤创面成纤维细胞的影响[J].上海第二医科大学学报,2002,22(2):134-136.

- [3] Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, et al. Flow cytometric identification of proliferative subpopulation within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis[J]. *J Exp Med*, 1993, 178(4):1271-1281.
- [4] 张远贵, 许伟石, 史济湘. 类肝素对大鼠Ⅱ度烫伤创面愈合的影响[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1998, 14(2):100-103.
- [5] Bingol-Kologlu M, Tanyel FC, Muftuoglu S, et al. The preventive effect of heparin on stricture formation after caustic esophageal burns[J]. *J Pediatr Surg*, 1999, 34(2):291-294.
- [6] 陈玉林, 方勇, 衣承东, 等. 细胞免疫与烧伤创面愈合的实验研究[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1997, 13(5):326-329.
- [7] 黄康, 陈玉林. 创面愈合评价指标进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2001, 15(2):126-129.
- [8] 吕洛, 魏少敏, 林惠芬, 等. 积雪草提取物对皮肤细胞生物学特征的影响[J]. *日用化学工业*, 2003, 33(1):19-21.
- [9] 崔文华, 刘光亮, 李尧宾, 等. 积雪草治疗烧伤的止痛、防瘢痕疗效观察[J]. *中国临床康复*, 2002, 6(6):839.
- [收稿日期] 2004-08-04 [修回日期] 2004-09-10
[本文编辑] 尹茶

• 临床研究 •

卵巢上皮癌组织及腹腔液中 CK7 mRNA 表达的意义

Expression of CK7 mRNA in epithelial tissue of ovarian neoplasm and in ascites

仲建新^{1*}, 张弘², 邓艳¹, 魏群², 史锦云¹, 施公胜³

(1. 南通医学院附属医院妇产科, 南通 226001; 2. 消化实验室; 3. 病理科)

[摘要] 目的: 探讨 CK7 mRNA 在检测卵巢上皮癌腹腔液微转移的价值。方法: 用 RT-PCR 法检测 39 例卵巢上皮癌组织及腹腔液中 CK7 mRNA 的表达, 腹腔液常规作细胞学检查; 同时检测 26 例良性卵巢上皮性肿瘤及 16 例正常卵巢组织及腹腔液作对照。结果: 癌组织及其腹腔液中 CK7 mRNA 的阳性率分别为 100% 和 89.7%, 两者差异无显著性, 与腹腔液细胞学检查结果 (61.5%) 具有显著差异 ($P < 0.05$); I ~ II 期卵巢上皮性癌腹腔液的 CK7 mRNA 的阳性率为 84.6%, 明显高于其细胞学检查结果 (30.8%, $P < 0.05$) 及良性肿瘤组 (26.9%, $P < 0.01$); III ~ IV 期卵巢上皮性癌腹腔液的 CK7 mRNA 的阳性率为 92.3%, 高于其细胞学的阳性率 (76.9%, $P < 0.05$)。结论: 卵巢上皮癌腹腔液中 CK7 mRNA 的表达是检测腹腔液中癌细胞微转移的有效方法, 结合腹腔液的细胞学检查, 更有助于诊断。

[关键词] 卵巢肿瘤; 腹腔液; CK7 mRNA; 肿瘤转移

[中图分类号] R 737.31 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1387-03

由于现代医学的发展, 诸多恶性肿瘤的预后有了很大改善, 但卵巢癌由于易扩散、复发及缺乏有效的早期诊断方法, 近 20 年来 5 年生存率无明显提高。因此及早发现卵巢癌的微转移癌细胞, 对预防复发及转移, 指导临床治疗, 改善临床预后非常重要。本研究应用 RT-PCR 法, 检测正常卵巢、良、恶性卵巢上皮性肿瘤组织及腹腔液中 CK7 mRNA 的表达, 旨在寻找一种早期、特异、灵敏的诊断方法, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2001 年 8 月至 2003 年 12 月在我科行卵巢肿瘤手术患者术后病理证实的新鲜标本及腹水或腹腔冲洗液。其中良性卵巢上皮性肿瘤 26 例, 包括浆液性囊腺瘤 18 例, 黏液性囊腺瘤 8 例; 卵巢上皮性癌 39 例, 浆液性囊腺癌 23 例, 黏液性囊腺癌 12 例, 子宫内膜样癌 3 例, 透明细胞癌 1 例。39 例卵巢上皮性癌按 FIGO 分期 I 期 9 例, II 期 4 例, III 期 16 例, IV 期 10 例。另收集 16 例正常卵巢组织及腹腔冲洗液。

1.2 标本的收集与保存 术中探查时取腹水 (或腹腔冲洗液) 200 ml, 3 000 r/min 离心; 取沉渣, 一半送细胞学检查, 另一半 -80℃ 冷冻保存。切取肿瘤组织约 40 g, 一半送病理学检查, 另一半 -80℃ 冷冻保存待用。子宫肌瘤手术时取部分卵巢组织及腹腔冲洗液作为对照。

1.3 RT-PCR 检测 CK7 mRNA 用天平分别称取正常卵巢、良、恶性卵巢肿瘤组织 50 mg, 腹腔液离心沉淀标本进行细胞计数, 调节细胞密度为 $10^6 \sim 10^7$ /ml。然后均采用 TRIzol 一步法抽提各标本的总 mRNA, 按说明书操作, 并于紫外分光光度计上检测其光密度值 (D)。结果显示 D_{260}/D_{280} 大于 1.80, 提示 RNA 的纯度良好。CK7 mRNA 基因引物序列参照文献 [1], 采用 Primer 3 软件设计, 引物序列为: CK7 正义 5'-CAC CAT GTC CAT CCA CTT CA-3', 反义 5'-CTT GAT CT GCT CGC TCT CCT-3', 每例标本均用管家基因 β -actin 作为内参照, 引物均由上海生物工程公司合成, RT-PCR 采用晶美生物工程有限公司 Robus TI RT-PCR 试剂盒, 按说明书操作。逆转录反应条件: 56℃ 45 min 逆转录合成 cDNA。PCR 反应条件: 预变性 94℃ 3 min; 变性 94℃ 30 s, 退火 55℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 循环 40 次; 最后 72℃ 延伸 5 min, 得到反应终产物。用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外线灯下观察。

1.4 病理学检查 甲醛固定标本, 石蜡包埋切片, H-E 染色

[基金项目] 南通市科技局社会发展基金资助项目 (S1031)。

[作者简介] 仲建新 (1965-), 男 (汉族), 硕士, 副教授、副主任医师。

*Corresponding author. E-mail: ntzjx@pub.nt.jsinfo.net