

疮灵液湿敷对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染疮面及免疫炎症因子的影响

刘莉¹, 段培蓓¹, 王朝晖¹, 火秀芳¹, 严士海²

1. 南京中医药大学附属医院护理部, 江苏 南京 210029;

2. 南京中医药大学附属医院药理室, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 探讨疮灵液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染大鼠慢性皮肤疮面模型疮面及局部免疫炎症反应的影响。**方法** 制作 MRSA 感染大鼠慢性皮肤疮面模型 30 只,造模成功后随机分成对照组、疮灵液组、夫西地酸组,每组 10 只,其中对照组以 4 层生理盐水纱布覆盖疮面,疮灵液组以 4 层疮灵液纱布覆盖疮面,夫西地酸组以 4 层夫西地酸纱布覆盖疮面,隔日换药。干预后 3、7 d 测定疮面面积;干预后 7 d 酶联免疫吸附法(ELISA)检测疮面肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6(IL-6)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 G(IgG)的变化;Western blot 检测各组疮面组织血管内皮生长因子(VEGF)表达情况。**结果** 干预后 3、7 d,疮灵液组和夫西地酸组疮面面积小于对照组,且干预后 7 d,疮灵液组疮面面积小于夫西地酸组($P < 0.05$)。与对照组比较,疮灵液组和夫西地酸组 TNF- α 、IL-6 水平显著降低,且疮灵液组低于夫西地酸组($P < 0.05$)。疮灵液组 IgA、IgG、VEGF 水平高于对照组和夫西地酸组($P < 0.05$)。**结论** 疮灵液显著减小疮面面积,促进 MRSA 感染慢性疮面的愈合,这可能与其抗菌、调控免疫炎症因子与促进 VEGF 表达的综合作用有关。

关键词: 疮灵液; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 慢性疮面; 免疫炎症; 肿瘤坏死因子 α ; 血管内皮生长因子
中图分类号: R 289.6 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2018)12-1692-04

Influence of Chuanglingye hydropathic compress on wound surface infected by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and immune inflammatory factors

LIU Li*, DUAN Pei-bei, WANG Zhao-hui, HUO Xiu-fang, YAN Shi-hai

* Department of Nursing, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Corresponding author: YAN Shi-hai, E-mail: sea-y@qq.com

Abstract: Objective To investigate the influence of Chuanglingye hydropathic compress on chronic wound surface infected by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) and local immune inflammatory response in rats. **Methods**

The animal model of chronic wound was made by dripping MRSA on the wound surface. A total of 30 rats with successful modeling were randomly divided into control group, Chuanglingye group and fusidic acid group ($n = 10$, each). The control group was treated with 4 saline gauze, and the Chuanglingye group was treated with 4 Chuanglingye gauze and the fusidic acid group was treated with 4 fusidic acid gauze on the wound surface, the dressings were changed on each other day. At 3 and 7 days after the treatment, the wound area was determined. The level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), immunoglobulin (Ig) A and IgG of the wound surface were detected at 7 days after the treatment. Western blot was used to detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) of the wound surface. **Results** On the 3rd and 7th day after intervention, the wound area of Chuanglingye group and fusidic acid group was smaller than that of control group, and on the 7th day after intervention, the wound area of Chuanglingye group was smaller than that of fusidic acid group (all $P < 0.05$). The level of IgA, IgG and VEGF in Chuanglingye group were significant higher than those in fusidic acid group and control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Chuanglingye could significantly reduce the wound area and promote the healing of wound surface infected by MRSA, which may be related to its comprehensive effect of antibacterial, regulating immune-inflammatory factors and promoting the expression of VEGF.

Key words: Chuanglingye; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Chronic wound; Immune inflammatory; Tumor necrosis factor- α ; Vascular endothelial growth factor

疮灵液是南京中医药大学附属医院研发的院内制剂,由大黄、诃子、黄蜀葵花等经提取精制而成的灭菌液体剂,具有解毒消炎、收敛生肌、活血化瘀作用,临床用于压疮、溃疡等的治疗,疗效显著^[1-2]。疮面细菌菌谱耐药性的产生是疮面难愈的重要原因,耐药病原菌感染疮面的治疗是外科临床公认的治疗难题之一。目前对耐药病原菌感染疮面的治疗规程尽早根据药敏试验选药,合理使用抗生素。即使如此,抗生素使用依然难以避免产生耐药问题,而有些中药对耐药菌株具有良好的作用^[3-5]。本实验观测疮灵液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染疮面模型的干预作用,为临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 疮灵液,由江苏省中医院制剂部提供,批号:20180102,由大黄、黄蜀葵花、诃子、红花等组成(450 mg/ml);营养肉汤,上海医学化验所,批号:160623;夫西地酸乳膏,爱尔兰利奥制药,批号 A42226;大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:20170623GF;大鼠白介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:20170822DS;免疫球蛋白(Ig)A ELISA 测试盒,购自 R&D 公司,批号:20170622BN;IgG ELISA 测试盒,购自 R&D 公司,批号:20170812BN。

1.2 实验菌株、实验动物及饲养环境 MRSA 由南京中医药大学附属医院检验科提供。8 周龄 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体重(220 \pm 20)g,南通实验动物中心提供,许可证号:SXX(苏)2014-0001。饲养环境:南京中医药大学附属医院 SPF 实验动物中心,室温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,常规饲料喂养,自由饮水,12 h 光照/12 h 黑夜,室温 22~24 $^{\circ}$ C,相对湿度 40%~50%。动物实验遵守南京中医药大学附属医院动物实验伦理规程。

1.3 仪器设备 电子天平(FA1004),上海精科天平厂;电热恒温水槽(DKB-SA),上海精宏实验设备公司;倒置显微镜(IX50),Olympus 公司;凝胶成像系统(FlurChem FC3),美国 Alpha Innotech 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 MRSA 体表感染动物模型建立 MRSA 经复苏、接种、传代和培养等步骤制成浓度 1×10^9 CFU/ml 的菌液。按参考文献[6]方法,SD 大鼠均腹腔内

注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,于每只大鼠右侧背部用剃毛刀剃毛 3 cm²,然后轻涂脱毛膏 8 min,用纱布擦去。用刀片在脱毛部位划十字切口,区域大小为 1 cm²,即刻于表皮剥脱处以取样器滴注 5 μ l 金黄色葡萄球菌菌液,每天 1 次,连续 3 d,至伤口周围出现红肿、触痛,可见脓性分泌物为止。

1.4.2 分组与干预 造模动物随机分为对照组、疮灵液组(临床剂量外用)、夫西地酸组。每组 10 只,雌雄各半。根据分组,对照组以 4 层生理盐水纱布覆盖疮面,疮灵液组以 4 层疮灵液纱布覆盖疮面,夫西地酸组以 4 层夫西地酸纱布覆盖疮面,疮面覆盖后以贴膜粘贴固定,隔日换药。

1.5 观测指标 (1)干预后 3、7 d 量测疮面面积。(2)干预后 7 d 检测免疫炎症因子,脱颈椎处死大鼠,分别取脱皮局部靠近中心部包括皮肤至肌层各层组织约 1 cm²,立刻以打孔器于活检标本取下直径约 3 mm 组织,低温冰箱保存备检测。TNF- α 、IL-6、IgA、IgG 测定:采集冻存组织,称重,匀浆,离心后取上清液,采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、IgA、IgG,具体方法参照试剂盒说明书。(3)Western blot 检测血管内皮生长因子(VEGF)的表达:严格按试剂盒提示提取总蛋白,采用 BCA 法定量蛋白。取 40 μ g 蛋白,加入缓冲液变性,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,染色观察条带,TBST 洗膜,5% 脱脂牛奶 TBST 封闭 1 h,分别加兔抗大鼠 VEGF 抗体室温孵育 2 h, TBST 洗膜,加二抗反应 1 h, TBST 洗膜,增强化学发光(ECL)试剂发光。采用凝胶图像分析软件进行吸光度扫描,将 VEGF 蛋白条带的吸光度与 β -actin 比值作为信号强弱比较。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组干预后疮面面积比较 3 组干预后 3、7 d 疮面面积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两两比较显示,干预后 3、7 d,疮灵液组和夫西地酸组疮面面积小于对照组,且干预后 7 d,疮灵液组疮面面积小于夫西地酸组($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 3 组疮面免疫炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平比较 干预 7 d 后,3 组 TNF- α 、IL-6 水平差异有统计学意

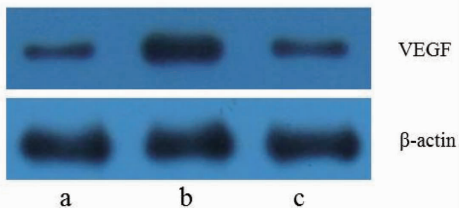
义($P < 0.05$)。与对照组比较,疮灵液组和夫西地酸组 TNF- α 、IL-6 水平显著降低,且疮灵液组低于夫西地酸组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组疮面局部 IgA、IgG、VEGF 比较 3 组疮面局部 IgA、IgG、VEGF 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。疮灵液组 IgA、IgG、VEGF 水平高于对照组和夫西地酸组($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 干预 7 d 后各组 TNF- α 、IL-6、IgA、IgG 水平及 VEGF 相对表达水平比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IgA (mg/ml)	IgG (mg/ml)	VEGF/ β -actin
对照组	211.60 \pm 19.22	182.50 \pm 11.51	0.85 \pm 0.32	1.56 \pm 0.58	0.23 \pm 0.06
疮灵液组	133.20 \pm 8.44 ^{#*}	91.10 \pm 13.54 ^{#*}	1.73 \pm 0.62 ^{#*}	4.61 \pm 0.61 ^{#*}	0.90 \pm 0.06 ^{#*}
夫西地酸组	160.60 \pm 15.56 [#]	105.40 \pm 15.23 [#]	1.03 \pm 0.36	2.02 \pm 0.63	0.27 \pm 0.05
F 值	69.559	132.382	10.519	73.377	436.804
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$;与夫西地酸组比较,^{*} $P < 0.05$ 。



注:a:对照组;b:疮灵液组;c:夫西地酸组。

图 1 各组疮面 VEGF 表达的电泳图

3 讨论

疮疡经久不愈的主要原因一方面是细菌感染,另一方面是疮面局部环血量不足,抵抗力低下,局部组织营养状态差,出现反复感染。中医一般采用清热解毒、活血化瘀、收敛生肌药治疗^[7-8]。疮灵液由大黄、诃子、黄蜀葵花等组成,大黄味苦性寒,具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经作用,具有推陈致新、促进创口愈合而达到止血生肌的作用^[9]。诃子味苦、酸、涩,性平,外用有收敛的作用^[10]。黄蜀葵花味甘性寒,归肾、膀胱经,具有清利湿热,消肿解毒功效,用于疔疽肿毒,水火烫伤^[11]。疮面愈合是个复杂的生物学过程,受多种因素的调控和影响,其中免疫炎症因子是目前疮面愈合研究的重要环节。

TNF- α 、IL-6 是促炎细胞因子,在疮面感染部位高度表达,导致疮面难以愈合^[12-14]。本实验结果显示干预后 3、7 d,疮灵液组和夫西地酸组疮面面积小于对照组,且干预后 7 d,疮灵液组疮面面积小于夫西地酸组,提示疮灵液具有良好的抗炎症因子作用,这与任晓梅等^[15]报道一致。IgA、IgG 是人体免疫球蛋白的主要成分,当机体受到感染时候,机体会启动自身的免疫系统,发生保护性的免疫反应^[16-17]。为探

表 1 各组干预后 3、7 d 疮面面积比较 ($n = 10, \text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	干预后 3 d	干预后 7 d
对照组	0.98 \pm 0.10	1.03 \pm 0.08
疮灵液组	0.84 \pm 0.10 [#]	0.43 \pm 0.07 ^{#*}
夫西地酸组	0.83 \pm 0.10 [#]	0.73 \pm 0.06 [#]
F 值	7.033	181.208
P 值	<0.05	<0.05

注:与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$;与夫西地酸组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

讨疮灵液对机体免疫功能的影响,本研究检测了各组局部 IgA、IgG 含量,发现疮灵液组 IgA、IgG 水平高于对照组和夫西地酸组,证明疮灵液上调免疫功能是其治疗疮疡的机制之一。VEGF 是血管生成的重要调节因子,在血管的再生过程中发挥着重要作用,在创伤愈合中表现较为典型,不仅促进愈合时的血管增生,还可增加血管通透性,促进血浆蛋白沉积在细胞间质,为成纤维细胞与血管内皮细胞长入提供基质^[18-19]。本研究结果显示疮灵液组 VEGF 表达较对照组和夫西地酸组显著增加。

中药外用是中医外科治疗疾病的特色,但因中药成分复杂,作用机制不明确,缺乏基础性实验研究阐述可能机理,一定程度上限制了大多数中药外用制剂的临床推广。本研究为中药外用的机理探讨提供了参考,实验结果表明,疮灵液具有抗炎、抑制炎症介质释放、促进血管生成的多重作用,对 MRSA 感染疮面有明显的治疗效果。

参考文献

- [1] 缪红梅. 疮灵液湿敷联合热敏灸治疗老年脑卒中患者 III - IV 期压疮的效果观察[J]. 护理学报, 2013, 20(22): 68 - 70.
- [2] 滕德凤, 季春艳. 疮灵液联合美皮康治疗 II 期压疮 30 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2016, 48(12): 33 - 34.
- [3] 蔡香菊, 马骏, 王志晓, 等. 黄芩等中药及复方制剂对多重耐药鲍曼不动杆菌体外抑菌活性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(1): 8 - 10.
- [4] 耿丽娜. 香药消腐生肌膏治疗多重耐药菌感染性创面 25 例[J]. 中国实用医药, 2013, 8(36): 193 - 194.
- [5] 薛春兰, 李颖, 高玮, 等. 复方芦荟药膜抑菌效果的研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(4): 287 - 291.

与精子 DFI 指数改善有关,并没有发现药物引起精子活力提高的具体作用机制,另外弱精子症严重后果是可能导致男性不育,那么此类患者经过治疗后精子质量改善是否最终成功生育还需要进一步密切随访。

综上所述,本研究结果表明萆薢分清丸有助于增强肾虚夹湿型弱精子症青年军人患者精子活力,改善不适症状并提高疗效。今后应开展特殊暴露环境对青年军人精子质量影响的大样本调查研究,并制定针对性防护措施。

参考文献

[1] 陆金春. 中华医学会男科学分会第七次全国男科学术会议纪要[J]. 中华男科学杂志,2006,12(10):952-952.

[2] 姜辉,邓春华,商学军,等. 左卡尼汀在男性不育中临床应用专家共识(2014 版)[J]. 中华男科学杂志,2015,21(1):82-85.

[3] 欧洋帆. 石菖汤对肾虚夹湿型弱精子症精浆果糖的影响[D]. 福州:福建中医药大学,2015.

[4] 舒金辉,冯贵雪,李劲,等. 按 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版标准探讨精子形态对 IVF—ET 助孕结局的预测价值[J]. 中华男科学杂志,2013,19(5):414-417.

[5] 张敏建,张球勇,程宛钧,等. 石菖汤治疗肾虚夹湿型弱精子症 49 例临床观察[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(1):4-5,14.

[6] 王志勇,韩玉芬,王瑜,等. 强精活力汤治疗脾肾两虚型弱精子症的临床观察[J]. 中国男科学杂志,2010,24(4):50-53,57.

[7] 刘绍明,郭军,张岳阳,等. 二仙补肾益精解毒方改善无症状性弱精子症患者精子活力临床研究[J]. 中国性科学,2017,26(12):70-73.

[8] Eslamian G, Amirjannati N, Rashidkhani B, et al. Adherence to the western pattern is potentially an unfavorable indicator of asthenozoospermia risk: A case-control study [J]. J Am Coll Nutr, 2016, 35(1):50-58.

[9] Huang C, Li B, Xu K, et al. Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015 [J]. Fertil Steril, 2017, 107(1):83-88, e2.

[10] 崔鑫,曹东华,郑春杨,等. 某部男性精液质量现状调查[J]. 解放军医药杂志,2014,26(5):68-71.

[11] 胡海翔,颜伟,方红,等. 微波辐射损伤对雷达作业人员精子结构及功能的影响[J]. 中华航空航天医学杂志,2016,27(4):280-285,324.

[12] 徐少强,胡海翔,罗少波,等. 雷达微波辐射对作业人员性激素和精液质量的影响[J]. 解放军医药杂志,2013,25(12):41-43.

[13] 徐少强,孙哲,高雅静,等. 某部阴虚体质雷达作业人员精液质量分析[J]. 解放军医药杂志,2017,29(1):108-110.

[14] 胡海翔,谢亚兰,徐少强,等. 某部气虚体质雷达作业人员精液质量分析[J]. 人民军医,2015,58(10):1172-1173.

[15] 徐景军,肖飞. 萆薢分清丸联合左氧氟沙星治疗ⅢA 型前列腺炎临床观察[J]. 中国医刊,2013,48(8):87-89.

[16] 尹丽丽. 羟苯磺酸钙胶囊联合萆薢分清丸改善糖尿病肾病肾功能疗效观察[J]. 临床医学研究与实践,2016,1(4):15.

[17] 葛昱旻,赵建华. 萆薢分清丸治疗肾盂结晶 62 例临床观察[J]. 江苏中医药,2011,43(4):46-47.

[18] 王长芸,刘桂先. 中西医结合治疗盆腔炎 48 例[J]. 赣南医学院学报,2012,32(4):646.

[19] 程宛钧,陈阿文,史亚磊,等. 张敏建教授辨湿论治男科病的经验[J]. 福建中医药,2016,47(1):5-6.

收稿日期:2018-07-15 编辑:王娜娜

(上接第 1694 页)

[6] 苗明三,崔体圣,席鹏,等. 不同品种苦杏仁油糊外用对疮疡大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,32(3):821-824.

[7] 张幼雯,刘明. 基于文献整理的疮疡四畔用药规律研究[C]//中国中西医结合学会周围血管病专业委员会年会,2015.

[8] 岳金换,张秦宏,孙忠人. 中药外治疮疡的临床研究现状及分析[J]. 中医外治杂志,2013,22(4):55-56.

[9] 商广耀,崔云竹. 大黄油纱促进糖尿病足创面愈合的临床研究[J]. 河南中医,2013,33(12):2146-2147.

[10] 彭汉光,文振. 褥疮的外搽剂的制备及应用[J]. 陕西中医,1995,16(6):283.

[11] 周青,张丹,徐超,等. 黄蜀葵花研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(13):231-234.

[12] 黄治官,谢单洁,李裕和. 有氧运动对大鼠创面愈合及血清 TNF- α 、IL-1 β 及 TGF- β 1 的影响[J]. 长江大学学报:自科版,2013,10(33):1-4.

[13] 丁伟佳,陈茵,郑伟基,等. 大鼠压疮局部皮肤组织中 TNF- α 、MMP-2 的表达和胶原含量及其意义[J]. 中国临床研究,2017,30(1):45-47.

[14] 陈建聪,余李彬. 探讨生肌散外敷联合负压引流术治疗压疮感染的临床价值[J]. 中医临床研究,2018,10(9):68-70.

[15] 任晓梅,姚昶,朱永康,等. 疮液液胶原对创面愈合的促进作用[J]. 山东医药,2013,53(43):27-29.

[16] 王艳,郑国荣,高金华,等. 鱼油对老年 I 期压疮模型大鼠免疫功能、炎症反应及细胞凋亡的影响[J]. 中国医药导报,2013,10(17):10-12.

[17] 李巧芬,李春深,李云平,等. 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中白介素-2 与肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(18):279-282.

[18] 肖洪玲,龙子江,施慧,等. 压疮灵对大鼠压疮模型局部 SOD、MDA、VEGF 和 EGF 表达的影响[J]. 中药药理与临床,2016,32(1):137-140.

[19] 刘鹏,周军. 蒲黄压疮散对大鼠压疮模型创面血管内皮生长因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2015,24(15):1606-1608.

收稿日期:2018-07-01 修回日期:2018-07-20 编辑:王宇