

马勃孢子粉醇提物对小鼠全层皮肤缺损性创面的 治疗作用考察

丁晓桐¹, 王裔惟¹, 闵文², 陈军^{1*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中医外用开发与应用工程研究中心, 南京 210023;

2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:比较马勃孢子粉和子实体的不同溶剂提取物对成纤维细胞和小鼠全层皮肤缺损性创面的药效差异,筛选马勃治疗创面的最佳用药部位。方法:将马勃孢子粉和子实体的水提物、醇提物对体外培养的小鼠皮肤成纤维细胞(MSF)进行干预,通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法比较细胞增殖、划痕实验比较细胞迁移、流式细胞技术探究细胞周期、酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定I型和III型胶原蛋白生成量,同时建立小鼠背部全层皮肤缺损性创面模型,考察马勃孢子粉不同溶剂提取物的治疗效果,并采用紫外-可见分光光度法测定其不同溶剂提取物中指标成分的含量。结果:马勃水提物具有一定细胞增殖抑制作用,醇提物具有促进MSF增殖、迁移、分泌I型和III型胶原蛋白的作用,且孢子粉功效显著优于子实体。在质量浓度为10 mg·L⁻¹时,马勃孢子粉醇提物处理的细胞增殖率最高可达(159.22±15.95)%,并促进MSF从G₀/G₁期的静止状态进入S期和G₂/M期的增殖状态,增殖指数增大,增高成纤维细胞迁移率及I型、III型胶原蛋白的生成量。马勃孢子粉醇提物能有效促进创面愈合、促进创面组织上皮化完整、减少炎性细胞浸润、生成新生胶原纤维。成分含量测定结果显示,与子实体醇提物比较,孢子粉醇提物中多酚及黄酮类成分含量更高。结论:马勃孢子粉醇提物是马勃促进创面愈合的主要活性部位,具有较好的开发前景,其药效成分可能为多酚和黄酮类。

[关键词] 马勃; 慢性难愈性创面; 孢子粉; 醇提物; 成纤维细胞; 子实体; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)

[中图分类号] R22;R28;R96;R751 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0149-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211777 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210719.0958.001.html>

[网络出版日期] 2021-07-19 13:43

Effect of Alcohol Extract of Spore Powder of *Lasiosphaera Calvatia* on Wound Healing of Full-thickness Skin Defect in Mice

DING Xiao-tong¹, WANG Yi-wei¹, MIN Wen², CHEN Jun^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Provincial Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine External Medication Development and Application,

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effect of different solvent extracts of spore powder and fruiting body of *Lasiosphaera Calvatia* on fibroblasts and wound healing of full-thickness skin defect, in order to screen the optimal medication part of *Lasiosphaera Calvatia*. **Method:** The effect of water extract and alcohol extract of spore powder and fruiting body on cell proliferation and cell migration of mouse skin fibroblasts (MSF) were examined *in vitro*. Cell proliferation and activity test (CCK-8) method was used for cell proliferation, scratch

[收稿日期] 2021-05-12

[基金项目] 2021年度南京中医药大学自然科学基金项目(XZR2020048);南京中医药大学“江苏高校护理学优势学科建设工程项目”(2019YSHL077);2021年江苏省研究生培养创新工程研究生科研与实践创新计划项目(SJCX21-0685)

[第一作者] 丁晓桐,在读硕士,从事中药外用制剂研究,E-mail:20190462@njucm.edu.cn

[通信作者] *陈军,博士,教授,从事中药外用制剂研究,Tel:025-85811611,E-mail:chenjun75@163.com

assay was used for cell migration, flow cytometry was conducted to explore cell cycle, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the production of collagen I and III. At the same time, a full-thickness skin defect wound model was established to investigate the therapeutic effect of different solvent extracts of spore powder. Ultraviolet-visible spectrophotometry was used to measure the contents of index components in different solvent extracts. **Result:** The water extract of spore powder and fruiting body had certain cytotoxicity, while the alcohol extract could promote proliferation, migration and production of collagen I and III of MSF, and the effect of spore powder was significantly higher than that of fruiting body. When the concentration was $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the cell proliferation rate of alcohol extract of spore powder was as high as $(159.22\pm 15.95)\%$, and could promote MSF from the G_0/G_1 phase to S phase and G_2/M phase with an increased proliferation index. The alcohol extract also promoted the migration of fibroblasts, secreted collagen I and III. On *in vivo* model, the alcohol extract of spore powder significantly accelerated wound healing on mice, effectively promoted the complete epithelialization of wound tissue, and generated new collagen fiber. The results of determination showed that the contents of polyphenols and flavonoids in the alcohol extract were higher than the alcohol extract of fruiting body. **Conclusion:** The alcohol extract of spore powder in *Lasiosphaera Calvatia* has active components in the treatment of wounds with good development prospect, and the medicinal components may be polyphenols and flavonoids.

[Keywords] *Lasiosphaera Calvatia*; chronic refractory wound; spore powder; alcohol extract; fibroblasts; fruiting body; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

慢性难愈性创面,是指在1个月内无法通过正常有序的修复过程达到解剖和功能完整状态的病理性伤口^[1]。我国慢性创面患者占外科住院患者的1.5%~3.0%^[2],发达国家有1%~2%的人口会在其一生中患慢性创伤,全球每年新增的慢性难愈性创面患者达1 000万^[3],随着人口老龄化加剧,病情愈发严重。慢性难愈性创面的高致残率、高致死率和高医疗支出为患者和社会带来沉重负担。目前,其临床主要治疗手段包括手术植皮、皮瓣移植、细胞疗法等,但普遍存在治疗周期长、成本高昂、受医疗条件限制、生物制品易降解失活等问题,亟需发掘服用便捷、效果显著、价格低廉的治疗药物。

马勃属于真菌类中药,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的马勃为灰包科真菌脱皮马勃 *Lasiosphaera fenzlii*、大马勃 *Calvatia gigantea* 或紫色马勃 *C. lilacina* 的干燥子实体^[4],可外治鼻衄、创伤出血。古代医籍中也有其治疗创面的记载,《名医别录》谓:“马勃味辛平无毒,主治恶疮马疥”^[5]。在现代临床中,马勃以粉末直接外敷、与明胶海绵联用^[6]、凡士林油纱布^[7]和液体制剂^[8]等形式治疗疔疮、褥疮、压疮、冻疮、湿疹和糖尿病坏疽等各种难愈性创面,其中压疮的治愈率可达92.5%^[9],褥疮^[7]、疔疮^[8]、冻疮^[10]等治愈率均可达95%以上,进一步证明了马勃治疗慢性难愈性创面的功效。然而,目前马勃的化学成分不清、作用机

制不明、临床应用形式不定,极大限制了其在创面治疗中的应用与开发。

马勃的传统用法为干燥子实体外敷出血和创伤处,但块状子实体不易贴服伤口,棉絮状子实体粉末则不易吸附创面,均不太适于临床给药。类比为真菌的灵芝,虽然2020年版《中国药典》中规定其用药部位也为子实体,但大量文献报道灵芝孢子粉的药效成分及活性显著优于子实体,是药材的精华部位^[11]。本课题组前期研究发现,马勃孢子粉比子实体具有更好的粉体学性质,孢子粉粒径小、密度大,易吸附于创面,能有效避免棉絮状的子实体粉末不贴服的问题,更适合临床用药。基于此,本研究拟选择马勃孢子粉为研究对象,以马勃子实体为参照,分别考察两者不同溶剂提取物对慢性难愈性创面易阻滞的关键增殖期细胞——成纤维细胞增殖、迁移、生成胶原的作用差异,同时考察马勃孢子粉不同溶剂提取物对小鼠背部全层皮肤缺损创面的治疗情况,以期筛选出马勃治疗创面的有效用药部分。

1 材料

Q-500B型高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司),BSA124S和BT25S型电子天平(德国Sartorius公司),SCIENTZ-10N型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司),2800UV/VIS型紫外-可见分光光度计(UNIC公司),FC500型流式细胞仪

(美国 Beckman Coulter 公司), Synergy H1 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), Axio Vert A1 型倒置显微镜(德国 ZEISS 公司), ABM 型小动物气体麻醉机(上海玉研科学仪器有限公司), RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司), KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司), GFL-230 型烤箱(天津市莱玻瑞仪器设备有限公司), JJ-12J 型脱水机、JB-P5 型包埋机和 JB-L5 型冻台(武汉俊杰电子有限公司)。

聚氨基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒[包括牛血清白蛋白(BSA)]、10% 甲醛(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 20200110、20210111), 无水葡萄糖、二甲苯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司, 批号分别为 63005518、10023418、10004160), 没食子酸(上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C11062421), DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Gibco 公司, 批号分别为 8121032、8120398), 二甲基亚砜(DMSO, 广东光华科技股份有限公司, 批号 20190605), 胎牛血清(上海亚瑟生物科技有限公司, 批号 C9866BAF), 细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国 APEX BIO 公司, 批号 K101812133EF5E), 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(兰杰柯科技有限公司, 批号 70110100), 小鼠 I 型胶原蛋白(collagen I)和 III 型胶原蛋白(collagen III)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司, 批号分别为 YFXEM00777、YFXEM00115), 苏木素-伊红(HE)染液、丽春红酸性品红-苯胺蓝(Masson)染液、分化液、返蓝液(武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号分别为 G1005、G1006、G1005-3、G1005-4), 重组人表皮生长因子(rhEGF)凝胶(桂林华诺威基因药业有限公司, 批号 202010039B), 血竭素高氯酸盐对照品(成都德思特生物技术有限公司, 批号 DX0074, 纯度 $\geq 98\%$), 芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号 Y24F11Y17051, 纯度 99.1%)。

小鼠皮肤成纤维细胞(MSF)购于上海富衡生物科技有限公司。选用 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 24 只, 体质量 20~30 g, 周龄 13 周, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SYXK(苏)2018-0049。本文所涉及的动物实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准号 202101A020。小鼠分笼饲养, 自由饮水摄食, 维持饲养环境稳定, 适应环境 1 周后开始实验。

马勃购于安徽省万生中药饮片有限公司(批号

190801), 经南京中医药大学药学院刘圣金教授鉴定为灰包科真菌大马勃 *C. gigantea* 的干燥子实体。将马勃饮片去除外壳, 粉碎, 得子实体粉末, 过五号筛, 除去棉絮状部分, 即得马勃孢子粉。取子实体粉末和孢子粉, 精密称定, 分别加入 15 倍量水或 95% 乙醇, 搅拌均匀, 室温浸渍 24 h(期间不断搅拌摇匀), 超声提取 2 h, 抽滤, 离心($1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 时间 5 min, 半径 16 cm, 下同), 取上清, 得马勃子实体水提物、醇提物和马勃孢子粉水提物、醇提物, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱避光储存。将上述提取物于 $50\ ^\circ\text{C}$ 旋转蒸发浓缩, 浓缩液置于棕色西林瓶中, 真空冷冻干燥, 得马勃子实体水提物、醇提物和马勃孢子粉水提物、醇提物的冻干粉, 置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存^[12]。

2 方法与结果

2.1 马勃不同提取物对 MSF 的影响

2.1.1 MSF 的培养与分组 MSF 培养于 DMEM 高糖培养液中(含青霉素 $100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 15% 胎牛血清, 链霉素 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养, 每 3 d 传代 1 次, 取对数期细胞进行实验。细胞分为空白组、药物组和阳性药组(血竭素高氯酸盐组)。药物组为马勃子实体或孢子粉的水提物、醇提物的冻干粉, 水提物冻干粉以少量 DMEM 高糖培养液稀释成一定浓度母液, 醇提物冻干粉以少量 DMSO 稀释成一定浓度母液, 临用前均以无血清培养基稀释至 1、5、10、20、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个质量浓度均设置 5 个复孔。

2.1.2 马勃提取物对 MSF 增殖的影响 取对数生长期的 MSF 以 1×10^5 个/mL 的密度接种至 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养 24 h(细胞生长率 80%~90%), 换成含有不同药物的培养基处理 24 h, 弃去旧培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 加入无血清培养基 100 μL , 再加入 CCK-8 试剂 10 μL , 于恒温培养箱中孵育 2 h, 置于低速摇床上震荡 5 min, 于 450 nm 处检测各孔吸光度 A , 计算细胞增殖率, 计算公式为细胞增殖率 = $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\%$ ^[13], 见表 1。结果发现血竭素高氯酸盐组在低浓度(1~10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时有促进 MSF 增殖的作用, 证明试验体系成立; 马勃水提物对 MSF 有毒性, 马勃醇提物则能促进其增殖, 且马勃孢子粉醇提物的促增殖效果优于子实体醇提物。推测马勃醇提物通过促成纤维细胞增殖而发挥创面愈合作用, 且孢子粉效果优于子实体。后续实验主要研究马勃子实体、孢子粉的醇提物对 MSF 的作用, 并选择马勃孢子粉醇提物质量浓度 $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表1 马勃子实体和孢子粉不同溶剂提取物对MSF增殖作用的比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of different solvent extracts of fruiting body and spore powder of *Lasiosphaera Calvatia* on proliferation of MSF ($\bar{x}\pm s, n=5$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L ⁻¹ | 增殖率/% |
|------------|-------------------------|-----------------------------|
| 马勃子实体水提取物组 | 1 | 85.13±10.95 |
| | 5 | 72.63±5.27 ²⁾ |
| | 10 | 70.07±10.77 ²⁾ |
| | 20 | 78.04±10.89 ²⁾ |
| | 50 | 70.02±12.00 ²⁾ |
| 马勃孢子粉水提取物组 | 1 | 95.77±5.91 |
| | 5 | 83.96±5.63 ¹⁾ |
| | 10 | 75.67±7.89 ²⁾ |
| | 20 | 81.51±8.35 ²⁾ |
| | 50 | 73.26±6.99 ²⁾ |
| 马勃子实体醇提取物组 | 1 | 105.43±12.43 ³⁾ |
| | 5 | 110.57±2.82 ³⁾ |
| | 10 | 120.18±6.56 ^{2,4)} |
| | 20 | 121.43±8.72 ^{2,4)} |
| | 50 | 134.89±3.92 ^{2,4)} |
| 马勃孢子粉醇提取物组 | 1 | 124.25±11.97 |
| | 5 | 145.07±20.35 ²⁾ |
| | 10 | 159.22±15.95 ²⁾ |
| | 20 | 146.47±13.86 ²⁾ |
| | 50 | 150.27±10.61 ²⁾ |
| 血竭素高氯酸盐组 | 1 | 150.87±3.97 ^{2,4)} |
| | 5 | 158.09±20.85 ²⁾ |
| | 10 | 130.02±0.00 ^{2,4)} |
| | 20 | 64.93±4.81 ^{2,4)} |
| | 50 | 24.98±0.73 ^{2,4)} |

注:空白组增殖率为100%;与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与同质量浓度的马勃孢子粉醇提取物组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

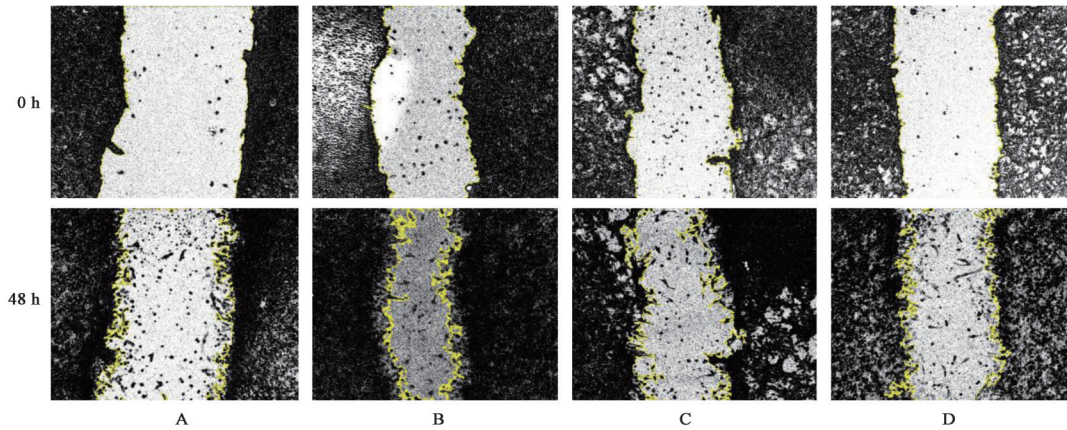
2.1.3 马勃提取物对MSF迁移的影响 采用划痕实验。种板前用马克笔在12孔板背面划等间距横线标记,取对数生长期的MSF以 5×10^5 个/mL的密度接种至12孔板中,每孔1 mL,置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养至细胞完全融合。用200 μL微量移液头垂直于孔板制造细胞划痕,用PBS清洗2次,以含有不同药物的培养基处理一段时间,分别于0、12、24、48 h在显微镜下观察,采用Image J 1.53软件分析划痕面积,计算细胞迁移率,公式为细胞迁移率=迁移面积/0 h划痕面积×100%。结果表明随着时间增长,各组的细胞迁移率不断增加,其中

马勃孢子粉醇提取物组的迁移效果最佳,在48 h达最大值。推测马勃醇提取物通过促进成纤维细胞迁移而加快创面上皮化进程,促进创面愈合,且孢子粉效果优于子实体。见图1和表2。

2.1.4 马勃提取物对MSF周期的影响 取对数生长期的MSF以 5×10^5 个/mL的密度接种至6孔板中,每孔2 mL,置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养过夜(细胞生长率80%~90%)。采用含有不同药物的培养基孵育24 h,吸出旧培养液至离心管中备用,PBS清洗贴壁细胞,以不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化液消化细胞,显微镜下观察至细胞皱缩,吹打混匀成单细胞并转移至离心管中,离心,弃上清,以预冷的70%乙醇固定细胞,吹打均匀,置于4 °C冰箱固定12 h。PBS清洗乙醇,离心,弃上清,加入适量脱氧核糖核酸(DNA)染色液,37 °C避光孵育30 min,采用流式细胞仪测定细胞周期,计算细胞增殖指数,公式为细胞增殖指数=(S期细胞比例+G₂/M期细胞比例)/(G₀/G₁期细胞比例+S期细胞比例+G₂/M期细胞比例)×100%。以G₀/G₁期细胞作为静止细胞,S期和G₂/M期细胞作为增殖期细胞。结果发现马勃孢子粉醇提取物处理MSF后能减少G₀/G₁期占比,与空白组和马勃子实体醇提取物组比较差异具有统计学意义($P<0.01$),同时能增大S期和G₂/M期占比。马勃孢子粉醇提取物组的增殖指数最高,达(48.05±5.26)%,与空白组的(6.73±0.66)%和马勃子实体醇提取物组的(26.90±1.75)%比较显著升高($P<0.01$),与血竭素高氯酸盐组的(50.71±0.90)%比较则差异无统计学意义。细胞周期结果与细胞增殖结果一致,推测马勃醇提取物通过改变细胞周期,促进G₀/G₁期的静止细胞进入S期和G₂/M期的增殖状态,实现对细胞周期的推动和转化,促进MSF增殖,加快创面愈合,且孢子粉的作用效果优于子实体。见表3和增强出版附加材料。

2.1.5 对MSF生成胶原蛋白的影响 取2.1.4项下药物处理细胞24 h的旧培养液,离心(2万 r·min⁻¹, 20 min,半径16 cm),取上清液,按照ELISA试剂盒说明书操作,通过酶标仪检测collagen I和collagen III含量。结果发现马勃孢子粉、子实体醇提取物都能增高collagen I、collagen III的分泌,且collagen III的生成量高于collagen I;其中马勃孢子粉醇提取物组的胶原蛋白生成量都明显高于空白组($P<0.05$)。见表4。

2.2 对小鼠全层皮肤缺损性创面的治疗作用 基于上述的结果,发现马勃孢子粉醇提取物促进成纤维



注:A. 空白组;B. 马勃孢子粉醇提物组;C. 马勃子实体醇提物组;D. 血竭素高氯酸盐组

图1 马勃孢子粉、孢子粉醇提物对MSF划痕愈合的影响($\times 50$)

Fig. 1 Effect of alcohol extracts of fruiting body and spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* on scratch healing of MSF ($\times 50$)

表2 马勃不同醇提物对MSF迁移作用的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of alcohol extracts of fruiting body and spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* on migration of MSF ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | 迁移率/% | | |
|-----------|-----------------------------|------------|------------|--------------------------|
| | | 12 h | 24 h | 48 h |
| 空白组 | | 11.83±3.45 | 27.30±6.59 | 36.17±9.87 ¹⁾ |
| 马勃孢子粉醇提物组 | 10 | 10.18±1.60 | 30.26±4.92 | 47.61±8.43 |
| 马勃子实体醇提物组 | 10 | 11.45±5.53 | 23.61±5.85 | 34.08±5.44 ¹⁾ |
| 血竭素高氯酸盐组 | 10 | 10.34±2.07 | 23.92±5.64 | 36.45±5.22 ¹⁾ |

注:与同时时间点的马勃孢子粉醇提物组比较¹⁾ $P < 0.05$

表3 马勃不同醇提物对MSF细胞周期的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of different alcohol extracts of *Lasio-sphaera Calvatia* on cell cycle of MSF ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

| 组别 | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | G ₀ /G ₁ 期 | S期 | G ₂ /M期 |
|-----------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 93.30±0.66 ²⁾ | 2.75±2.63 ²⁾ | 3.98±1.97 ¹⁾ |
| 马勃孢子粉醇提物组 | 10 | 51.93±5.26 | 31.30±7.88 | 16.73±4.58 |
| 马勃子实体醇提物组 | 10 | 73.10±1.74 ²⁾ | 15.83±7.09 ¹⁾ | 11.06±8.03 |
| 血竭素高氯酸盐组 | 10 | 49.27±0.91 | 45.57±3.50 ¹⁾ | 5.13±2.75 ¹⁾ |

注:与马勃孢子粉醇提物组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表4-表5同)

细胞增殖、迁移和生成胶原蛋白的作用优于子实体,判断孢子粉的创面治疗效果更强,故动物实验主要考察孢子粉提取物的创面治疗活性。虽然孢子粉水提物质量浓度在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上显示出细胞增殖抑制,但创面愈合不能仅以成纤维细胞的活性作为判断标准,故建立小鼠背部全层皮肤缺损性创面模型,考察马勃孢子粉醇提物和水提物的治疗效

表4 马勃不同醇提物对MSF分泌胶原蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of alcohol extracts of fruiting body and spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* on secretion of collagen by MSF ($\bar{x} \pm s, n=6$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

| 组别 | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | collagen I | collagen III |
|-----------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 空白组 | | 5.78±0.36 ¹⁾ | 7.43±0.94 ^{1,3)} |
| 马勃孢子粉醇提物组 | 10 | 6.48±0.35 | 9.34±1.47 |
| 马勃子实体醇提物组 | 10 | 5.92±0.60 | 7.62±0.52 ³⁾ |
| 血竭素高氯酸盐组 | 10 | 6.27±0.10 | 7.15±1.44 ¹⁾ |

注:³⁾ $n=5$

果,进一步筛选马勃孢子粉的药效部位。

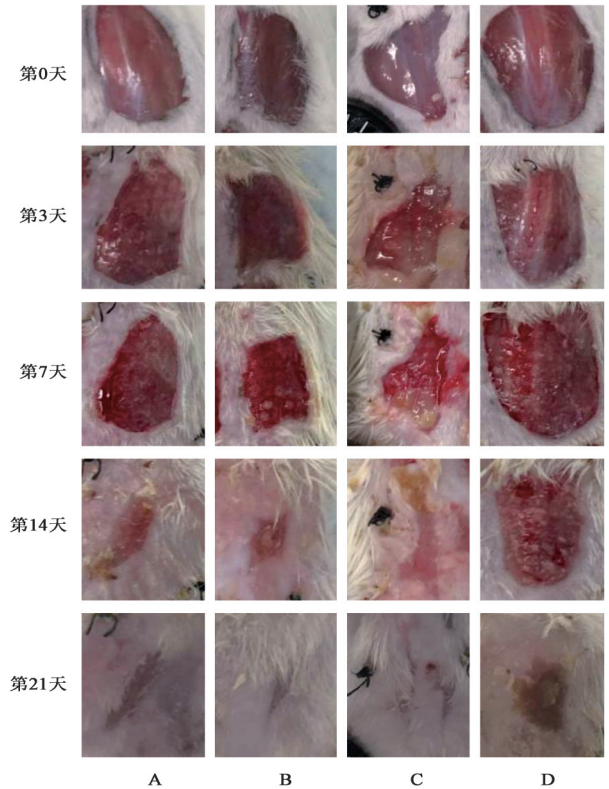
2.2.1 模型的建立及分组 小鼠适应性喂养1周后,使用吸入式麻醉法,用异氟烷麻醉,麻醉成功后用小动物电推剪脱去小鼠背部毛发,并用生理盐水擦拭干净,于小鼠背部脊椎两侧脱毛处标记4个相同的方形区域(每个大小约 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$),沿标记剪去皮肤及皮下组织深至筋膜层,4个切除部分由完整的皮肤分开。为减少小鼠背部皮肤收缩愈合的干扰,将创面4个方向的皮肤与肌肉缝合固定。采用随机分组法对小鼠背部4个创面进行分组,分别为空白组、阳性药组(rhEGF凝胶组)、马勃孢子粉醇提物组和马勃孢子粉水提物组。空白组给予无菌生理盐水,阳性药组给予rhEGF凝胶^[14-16],马勃孢子粉醇提物组、马勃孢子粉水提物组分别给予马勃孢子粉醇提物、水提物的冻干粉,水提物冻干粉先用少量生理盐水使溶解,醇提物冻干粉用少量DMSO使溶解,然后均用无菌生理盐水配成质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。造模后小鼠单笼饲养,分别在第0、3、7、14天于各组创面给予等量相应药物(体积 $100 \mu\text{L}$),之后用纱布、IV3000透明敷料、弹性绷带

和缝线固定,以上操作均在无菌操作台内完成。

2.2.2 创面标本采集 用药后第14天采用简单随机抽样法采集小鼠背部创面肉芽组织标本,每组各取6份,小鼠吸入式麻醉后在无菌条件下沿创面边缘约1 mm切下完整的创面组织,将组织用10%甲醛固定24 h,用于石蜡包埋后切片,小鼠取材后采用颈椎脱臼法处死。

2.2.3 创面愈合率考察 由2名观察员分别于第0、3、7、14、21天观察拍摄各组创面,采用Image J 1.53软件测量创面面积,计算创面愈合率,公式为创面愈合率=(治疗前创面面积-治疗后创面面积)/治疗前创面面积×100%。结果发现造模后第3天,各组创面有不同程度缩小,马勃孢子粉醇提物组的创面湿润且无明显渗出,创面愈合率显著高于马勃孢子粉水提物组($P<0.01$)。造模后第14天,各组创面明显缩小,马勃孢子粉醇提物组、马勃孢子粉水提物组和空白组可见创面周围部分新生上皮组织,马勃孢子粉醇提物组的创面愈合率明显高于rhEGF凝胶组($P<0.01$)。造模后第21天,各组创面基本愈合,颜色接近正常皮肤。由于马勃孢子粉醇提物的促愈合作用在造模后第14天之前效果显著,造模后第21天愈合情况与其他3组差异不具有统计学意义,推测马勃孢子粉醇提物主要在创面愈合炎症期发挥促进愈合的作用。见图2和表5。

2.2.4 创面组织病理学观察 取造模后第14天的创面组织切片进行脱蜡、水化,随后进行HE染色和Masson染色,采用光学显微镜观察染色和胶原生成情况,Masson胶原染色切片中胶原纤维呈蓝色,肌纤维、纤维素和红细胞呈红色,在创面两侧边缘和创面中央各随机选取3块区域,采用Image J 1.53软件测定胶原纤维密度。HE染色结果表明,在造模后第14天,马勃孢子粉醇提物组和空白组可见表皮在创面基本覆盖,细胞排列整齐,上皮化完整,皮肤层次结构完整清晰,炎性细胞浸润较少,其中马勃孢子粉醇提物组的创面区域明显小于空白组,结构与正常皮肤接近。rhEGF凝胶组和马勃孢子粉水提物组创面伴随严重的炎性细胞浸润,上皮化不完整,皮肤层次不清晰,愈合效果较差,病理学染色结果与创面愈合速度一致。创面愈合的标志之一是胶原纤维的新生,Masson染色可以将胶原纤维染成蓝色,对比蓝色区域的密度可以判断创面用药后胶原纤维的形成情况。由Masson染色结果可知,造模后第14天,各组创面出现密度不等的蓝色区域,说明创面处新生了不同含量的胶原纤维,其中马勃孢



注:A. 空白组;B. 马勃孢子粉醇提物组;C. 马勃孢子粉水提物组;D. rhEGF凝胶组(图3同)

图2 马勃孢子粉不同溶剂提取物对小鼠皮肤缺损性创面的作用

Fig. 2 Effect of different solvent extracts of spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* on full-thickness skin defect wounds on mice

表5 马勃孢子粉不同溶剂提取物的创面治愈率比较($\bar{x}\pm s$)

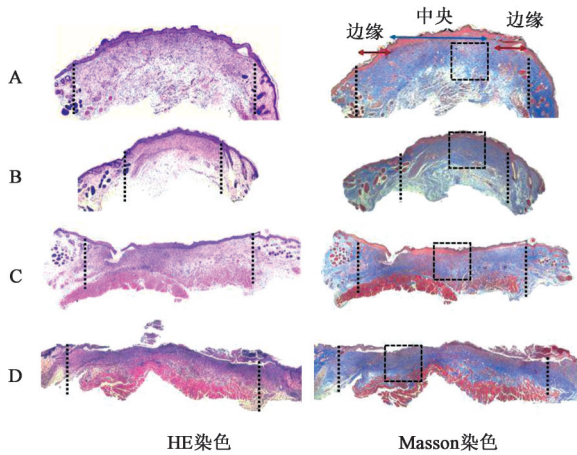
Table 5 Comparison of wound healing rates of different solvent extracts from spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 创面治愈率/% | | | |
|-----------|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | 第3天 (n=22) | 第7天 (n=16) | 第14天 (n=10) | 第21天 (n=4) |
| 空白组 | 17.20±12.03 | 34.36±14.93 | 63.56±12.18 | 78.18±10.93 |
| 马勃孢子粉醇提物组 | 22.84±20.57 | 35.15±18.82 | 74.20±11.09 | 86.88±8.10 |
| 马勃孢子粉水提物组 | 3.65±24.78 ²⁾ | 23.46±21.83 | 62.08±12.45 | 82.79±6.86 |
| rhEGF凝胶组 | 6.08±15.45 ¹⁾ | 20.06±21.25 | 54.57±11.55 ²⁾ | 81.12±8.18 |

子粉醇提物组的胶原纤维生成情况最好,创面边缘和中央区域的胶原纤维密度都显著高于空白组和马勃孢子粉水提物组($P<0.01$),进一步证明马勃孢子粉醇提物在促进胶原新生、肉芽组织形成而加快创面愈合方面的优势。见图3和表6。

2.3 马勃不同提取物含固量与成分含量的测定

2.3.1 含固量测定 精密量取马勃子实体、孢子粉的水提物和醇提物适量于已干燥至恒重的称量瓶中,105 °C干燥3 h,置于干燥器中冷却30 min,重复



注:虚线中央为创面区域,虚线两侧为正常皮肤,虚线方框内标注为新生胶原纤维

图3 马勃孢子粉不同溶剂提取物对创面组织的影响($\times 50$)

Fig. 3 Effect of different solvent extracts of spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* on wounds ($\times 50$)

表6 马勃孢子粉不同提取物对创面胶原纤维密度的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of extracts of spore powder of *Lasio-sphaera Calvatia* on collagen fiber density of wounds($\bar{x}\pm s$) %

| 组别 | 边缘胶原纤维密度 | | 中央胶原纤维密度 | |
|-----------|----------|---------------------------------|----------|---------------------------------|
| | n | 数值 | n | 数值 |
| 空白组 | 30 | 62.07 \pm 16.76 ¹⁾ | 15 | 62.71 \pm 16.22 ¹⁾ |
| 马勃孢子粉醇提物组 | 30 | 78.22 \pm 10.08 | 15 | 82.12 \pm 7.80 |
| 马勃孢子粉水提物组 | 30 | 63.87 \pm 18.61 ¹⁾ | 15 | 59.02 \pm 21.94 ¹⁾ |
| rhEGF凝胶组 | 18 | 60.56 \pm 17.63 ¹⁾ | 9 | 50.59 \pm 15.53 ¹⁾ |

注:与马勃孢子粉醇提物组比较¹⁾ $P < 0.01$

干燥至恒重,迅速称定质量,计算马勃孢子粉水提物、醇提物的含固量分别为(0.434 \pm 0.014)%、(0.191 \pm 0.016)%,分别高于子实体水提物含固量(0.386 \pm 0.009)%和醇提物含固量(0.164 \pm 0.005)%,孢子粉水提物和子实体水提物含固量差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明马勃孢子粉和子实体的极性物质含量比中性物质更高。

2.3.2 蛋白质及多肽含量测定 按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书操作,配制0.5 g \cdot L⁻¹ BSA对照品溶液,取该对照品溶液2、4、6、8、12、16、20 μ L至96孔板中,加PBS补至20 μ L,每孔加入BCA工作液200 μ L,于37 $^{\circ}$ C水浴30 min,于562 nm处测定A,以BSA对照品质量浓度为横坐标,A为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=10.248X+0.1345$ ($r=0.9966$),线性范围0.0045~0.0455 g \cdot L⁻¹。取马勃孢子粉、子实体的水提物适量,平行3份,同法测定A,计算蛋白质及多肽含量,见表7。

2.3.3 多糖含量测定 采用苯酚硫酸法测定,以葡

表7 马勃不同溶剂提取物中指标成分的质量分数($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Contents of index components in different solvent extracts of *Lasio-sphaera Calvatia* ($\bar{x}\pm s$) mg \cdot g⁻¹

| 物质 | 蛋白质+多肽 (n=4) | 多糖 (n=6) | 多酚 (n=6) | 总黄酮 (n=6) |
|----------|----------------------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 马勃孢子粉水提物 | 386.18 \pm 11.66 | 30.38 \pm 1.25 | - | - |
| 马勃子实体水提物 | 355.75 \pm 13.70 ¹⁾ | 29.50 \pm 0.96 | - | - |
| 马勃孢子粉醇提物 | - | - | 62.41 \pm 0.36 | 21.99 \pm 1.90 |
| 马勃子实体醇提物 | - | - | 54.10 \pm 0.34 ²⁾ | 14.43 \pm 0.64 ²⁾ |

注:与马勃孢子粉相应溶剂提取物组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

萄糖当量计。精密量取马勃孢子粉或子实体的水提物适量,50 $^{\circ}$ C旋转蒸发至质量浓度1 g \cdot mL⁻¹,加入3倍量95%乙醇,慢加快搅,搅拌均匀后于4 $^{\circ}$ C静置12 h,离心(1万 r \cdot min⁻¹,30 min,半径16 cm),弃上清,沉淀加水使溶解并定容至10 mL,混匀,得马勃子实体和孢子粉的多糖溶液。精密移取0.1 g \cdot L⁻¹葡萄糖对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别置于10 mL具塞试管中,均加水至2 mL,加入5%苯酚溶液1.0 mL,迅速垂直液面加入浓硫酸5 mL,摇匀,100 $^{\circ}$ C水浴加热15 min,冰浴10 min,完全冷却后在490 nm处测定A,以对照品质量浓度为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $Y=50.744X-0.01$ ($r=0.997$),线性范围0.0025~0.015 g \cdot L⁻¹。精密量取同一葡萄糖对照品溶液1 mL,同法连续测定6次,计算A的相对标准偏差(RSD)1.9%,说明仪器精密度良好。马勃孢子粉和子实体多糖溶液分别加水稀释20倍,精密量取1 mL,分别于制备后0、5、10、15、20、25 min测定A,计算二者A的RSD分别为1.3%和2.2%,说明供试品溶液在25 min内稳定性良好。取马勃孢子粉和子实体的水提物适量,平行6份,同法制备多糖溶液,稀释20倍后分别精密量取1 mL,同法测定,计算二者A的RSD分别为2.8%和3.5%,说明该方法重复性良好。取马勃孢子粉和子实体的水提物适量,平行6份,同法制备多糖溶液,稀释20倍后精密量取1 mL,分别加入葡萄糖对照品溶液0.7 mL,同法测定A,计算二者的加样回收率分别为99.40%~104.69%和95.29%~104.81%,RSD分别为2.3%和4.4%,说明该方法准确可靠。取马勃孢子粉和子实体的多糖溶液适量,平行3份,同法测定A,计算多糖含量,见表7。

2.3.4 多酚含量测定 采用Folin-Ciocalteu比色

法,以没食子酸当量计。精密移取 $0.104\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 没食子酸对照品溶液 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 mL 于 10 mL 具塞试管中,加入蒸馏水 6 mL ,混匀,加 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Folin-Ciocalteu试剂 0.5 mL ,混匀,加入 20% 碳酸钠溶液 0.75 mL ,混匀,补水至 10 mL , $40\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴反应 40 min ,于 755 nm 处测定 A 。以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y=0.1381X+0.0184$ ($r=0.9971$),线性范围 $1.04\sim 5.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。精密量取没食子酸对照品溶液 1 mL ,同法测定 A ,一共连续测定 6 次,计算RSD 0.9% ,说明仪器精密度良好。精密量取马勃子实体和孢子粉醇提物各 1 mL ,分别于制备后 0 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 min 测定 A ,计算二者RSD分别为 0.4% 和 0.5% ,说明供试品溶液在 25 min 内稳定性良好。取马勃孢子粉和子实体适量($n=6$),制备马勃孢子粉和子实体醇提物,精密量取 1 mL ,同法测定 A ,计算二者RSD均为 0.6% ,说明该方法重复性良好。取马勃孢子粉和子实体适量($n=6$),制备马勃孢子粉和子实体醇提物,精密量取 1 mL ,分别加入没食子酸对照品溶液 0.9 、 1.0 mL ,同法测定 A ,计算二者加样回收率分别为 $97.71\%\sim 104.32\%$ 和 $96.25\%\sim 102.92\%$,RSD分别为 2.3% 和 2.8% ,说明该方法准确可靠。取马勃孢子粉和子实体的醇提物,平行 3 份,同法测定 A ,计算多酚含量,见表7。

2.3.5 黄酮含量测定 采用 AlCl_3 比色法测定,以芦丁当量计。精密吸取 $0.228\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦丁对照品溶液 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 、 0.7 、 0.8 mL 于 10 mL 具塞试管中,加 1% 氯化铝溶液 4 mL ,加无水乙醇定容至 10 mL , $40\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 20 min ,在 407 nm 处测定 A ,以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y=22.293X-0.0357$ ($r=0.997$),线性范围 $6.84\sim 18.24\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。精密量取芦丁对照品溶液 0.4 mL ,同法测定 A ,连续测定 6 次,计算RSD 0.9% ,说明仪器精密度良好。精密量取马勃子实体和孢子粉醇提物各 2 mL ,分别于制备后 0 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 min 测定 A ,计算二者RSD分别为 3.0% 和 1.7% ,说明供试品溶液在 25 min 内稳定性良好。取马勃孢子粉和子实体,平行 6 份,制备马勃孢子粉和子实体醇提物,精密量取 2 mL ,各平行 6 份,同法测定 A ,计算二者RSD分别为 0.8% 和 1.9% ,说明该方法重复性良好。取马勃孢子粉和子实体,平行 6 份,制备马勃孢子粉和子实体醇提物,精密量取 2 mL ,分别加入芦丁对照品溶液 0.2 、 0.3 mL ,同法测定 A ,计算二者加样回收率分别为 $95.33\%\sim 102.87\%$ 和 $96.23\%\sim 104.13\%$,RSD均为 2.8% ,说明该方法准确可靠。取马勃孢子粉和子实

体醇提物适量,平行 3 份,同法测定 A ,计算总黄酮含量,见表7。

2.4 统计学处理 采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

创面愈合过程包括止血期、炎症期、增殖期和重塑期^[17]。其中,增殖期依靠修复细胞的增殖迁移完成再上皮化、肉芽组织生成和新生组织血管化,重建皮肤屏障,是创面愈合的关键时期。增殖期的发生受阻与慢性难愈性创面的形成息息相关,病理机制包括皮肤修复细胞发生增殖、迁移障碍及过度凋亡,细胞外基质产生量过少或被过度破坏。成纤维细胞是创面愈合增殖期的主体修复细胞,发挥分泌胶原蛋白、构建细胞外基质、促进肉芽组织形成等作用。报道显示,慢性难愈性创面,尤其是糖尿病皮肤溃疡,愈合延迟甚至不愈主要与成纤维细胞的功能异常相关^[18]。当成纤维细胞的增殖能力下降、迁移功能异常则会引发胶原蛋白、纤维蛋白、玻连蛋白构成的细胞外基质形成不足,最终表现为缺乏上皮再生,创面无法进入增殖期,伤口难以愈合。因此,能够恢复成纤维细胞的正常功能,促进成纤维细胞增殖、迁移、分泌胶原蛋白是恢复增殖期功能、促进创面愈合、降低慢性难愈性创面患者截肢率和死亡率的重中之重,同时也是治疗慢性难愈性创面的研究重点及难点。

马勃味辛性平,外治鼻衄、创伤出血。其传统用法是外用干燥子实体,但子实体不易吸附于创面,不适合临床长期用药。马勃孢子粉作为药材的主要内容物,具有良好的粉体学性质,更加适于临床给药。已有研究证明马勃乙醇提取物对大鼠皮肤成纤维细胞具有促增殖效果^[19],与本研究结论基本一致。在文献^[19]研究基础上,本文聚焦于马勃孢子粉和子实体的药效对比,增加对MSF的迁移、胶原蛋白生成、细胞周期变化的考察,筛选出马勃治疗创面的最佳用药部分为孢子粉醇提物,并通过建立小鼠背部全层皮肤缺损性创面模型验证了孢子粉醇提物的创面治疗优势,此外,运用紫外-可见分光光度法测定提取物中指标成分含量,推测马勃孢子粉治疗创面的药效成分可能是多酚与黄酮类成分。

本文研究结果显示,马勃孢子粉和子实体水提物具有细胞增殖抑制,水提物中蛋白质、多肽和多

糖等大分子物质含量较高。这可能与高渗作用导致细胞破裂有关;另外,马勃中蛋白质、多肽和多糖已被证明具有消杀肿瘤细胞、抑制癌细胞分裂增殖的作用^[20-23],提示水提物细胞增殖抑制作用较强。马勃孢子粉和子实体醇提物对MSF具有促增殖功效,且孢子粉效果明显高于子实体。采用流式细胞技术对马勃孢子粉、子实体醇提物促进细胞增殖的机制进行了初步研究,发现其均能缩短G₀/G₁期,增大S期和G₂/M期,且孢子粉醇提物的增殖指数显著高于子实体醇提物,与细胞增殖结果一致,推测马勃孢子粉、子实体的醇提物通过推动转化MSF细胞周期,促进MSF增殖。再上皮化是创面愈合过程中不可或缺的步骤^[24],划痕实验结果表明,马勃不同醇提物有显著的促进细胞迁移效果,有利于MSF从创缘向创面中央迁移,加快再上皮化进程,且孢子粉效果优于子实体。胶原蛋白是细胞外基质的主要成分,人体皮肤中主要存在的是collagen I、collagen III,发挥支持组织结构、调节细胞增殖迁移、促进再上皮化的功效^[25-26]。ELISA检测结果表明,马勃不同醇提物促进成纤维细胞生成并分泌collagen I、collagen III,推测其通过促进collagen I、collagen III的生成加快形成细胞外基质,调控新生组织弹性及柔韧性,提高创面愈合质量,促进创面愈合,且孢子粉效果优于子实体。小鼠背部全层皮肤缺损性创面模型实验进一步证明,孢子粉醇提物具有更高的创面愈合率,可有效促进创面组织上皮化、减少炎性细胞浸润、促进新生胶原纤维的产生。马勃不同醇提物含有较高的多酚和黄酮类成分,这两类成分是公认的抗氧化来源^[27],能有效避免创面中过量活性氧和自由基所致氧化应激。已有文献证明多酚和黄酮类成分与慢性难愈性创面的治疗紧密相关,例如,黄蜀葵花总黄酮可通过促进血管新生、成纤维细胞增殖和胶原纤维沉积促进大鼠慢性难愈性创面愈合^[28];毛蕊异黄酮对人脐静脉内皮细胞具有促增殖作用^[29];骨碎补总黄酮有促进成骨细胞增殖和血管新生的功效^[30];海马酚类提取物能有效提高collagen I水平^[31],故推测马勃不同醇提物中的多酚和黄酮类成分可能是其促进创面愈合的药效成分。

本研究选择马勃孢子粉为治疗创面的研究对象,发现马勃孢子粉醇提物对MSF的增殖、迁移、分泌胶原蛋白、加快创面愈合速率、创面组织上皮化、新生胶原纤维生成等作用均强于传统用药部分子实体,表明马勃孢子粉醇提物在创面治疗领域具有

良好的开发应用前景。后续可结合气相色谱-质谱法(GC-MS)、高效液相色谱串联四级杆/飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF/MS)等技术对马勃孢子粉醇提物的化学成分进行定性、定量研究,尝试建立完整的质量控制体系;同时,研究马勃孢子粉醇提物对人皮肤成纤维细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、角质形成细胞等创面修复相关细胞及慢性难愈性创面动物模型的作用,进一步考察其对调控创面炎症水平、血管生成、再上皮化、促难愈性创面愈合的功能;此外,可将适用于创面的新型材料与马勃孢子粉醇提物相结合,对传统剂型进行改进,促进马勃在创面治疗领域的临床应用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WU Y K, CHENG N C, CHENG C M. Biofilms in chronic wounds: Pathogenesis and diagnosis [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(5): 505-517.
- [2] 廖新成, 郭光华. 慢性难愈性创面的分类鉴别及临床评估[J]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2017, 12(4): 303-305.
- [3] JÄRBRINK K, NI G, SÖNNERGREH H, et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: A protocol for a systematic review[J]. Syst Rev, 2016, 5(1): 152.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 52.
- [5] 陶弘景. 名医别录[M]. 尚志钧, 辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [6] 赵志新. 马勃明胶海绵治疗干槽症112例临床观察[J]. 河北中医, 2011, 33(12): 1809-1810.
- [7] 孙玲. 马勃油膏治疗褥疮[J]. 医药产业资讯, 2006(14): 320.
- [8] 董鹏, 张丽兰. 复方马勃煎剂治疗臃疮28例[J]. 中国社区医师, 2002(15): 41.
- [9] 戴小青, 王丽萍, 李华, 等. 马勃联合鱼肝油滴剂治疗压疮的疗效观察及护理体会[J]. 基层医学论坛, 2016, 20(1): 34-35.
- [10] 仲济民, 陈爱东. 马勃纱布治疗冻疮[J]. 中成药研究, 1982(12): 44.
- [11] 烁文. 灵芝及灵芝孢子粉的药用价值[J]. 中医健康养生, 2019, 5(8): 80.
- [12] 相聪坤, 关胜江, 王巧, 等. 不同提取方法马勃中药材挥发性成分的GC-MS分析[J]. 河北医药, 2016, 38(23): 3545-3547.
- [13] 邱琦, 胡中花, 徐红丹, 等. 柚皮素对A β_{25-35} 损伤PC12细胞氧化应激及Tau蛋白磷酸化的影响[J]. 中国实

- 验方剂学杂志, 2020, 26(21): 92-99.
- [14] SINGLA S, GARG R, KUMAR A, et al. Efficacy of topical application of beta urogastrone (recombinant human epidermal growth factor) in Wagner's Grade 1 and 2 diabetic foot ulcers: Comparative analysis of 50 patients[J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2014, 5(2): 273-277.
- [15] SANTANA H, GARCÍA G, VEGA M, et al. Stability studies of a freeze-dried recombinant human epidermal growth factor formulation for wound healing[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2015, 69(3): 399-416.
- [16] VISWANATHAN V, JUTTADA U, BABU M. Efficacy of recombinant human epidermal growth factor (regend 150) in healing diabetic foot ulcers: A hospital-based randomized controlled trial [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2020, 19(2): 158-164.
- [17] IBNALWALID S, CRAIG T F, RICKESHA L W, et al. Thioredoxin-1 augments wound healing and promote angiogenesis in a murine ischemic full-thickness wound model[J]. *Surgery*, 2018, 164(5): 1077-1086.
- [18] PANG L, WANG Y, ZHENG M, et al. Transcriptomic study of high glucose effects on human skin fibroblast cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2627-2634.
- [19] 石毅, 马莹慧, 门丽慧, 等. 中药马勃促大鼠成纤维细胞增殖的有效成分[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(13): 2762-2764.
- [20] LAM Y W, NG T B, WANG H X. Antiproliferative and antimutagenic activities in a peptide from puffball mushroom *Calvatia caelata*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(3): 744-749.
- [21] Ng T B, LAM Y W, WANG H X. Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimutagenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*[J]. *Planta Med*, 2003, 69(3): 212-217.
- [22] 赵友生, 王进平, 宋爱荣, 等. 马勃多糖提取及体外抗肿瘤研究[J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(7): 574-578.
- [23] 武翠玲, 万兵, 李钰娜. 马勃多糖 CGP- II 抗 S180 肉瘤及体外抗氧化研究[J]. *长治医学院学报*, 2016, 30(3): 169-171.
- [24] KIM D J, MUSTOE T, CLARK R A. Cutaneous wound healing in aging small mammals: A systematic review [J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(3): 318-339.
- [25] 赵鑫, 石新, 陈贝, 等. 负压封闭引流技术对大鼠急性创面愈合过程中 I / III 型胶原比例变化的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(32): 5122-5127.
- [26] 卓燊, 乔雪, 陈君, 等. 复方愈疡散治疗糖尿病慢性难愈性创面的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4): 115-119.
- [27] PETROVIĆ P, VUNDUK J, KLAUS A, et al. Biological potential of puffballs: A comparative analysis[J]. *J Funct Foods*, 2016, 21: 36-49.
- [28] 朱桂松. 黄蜀葵花总黄酮对慢性难愈性创面修复作用及其效应机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [29] 唐菁燕, 胡光, 许贝文, 等. 毛蕊异黄酮通过雌激素受体促进内皮细胞增殖[J]. *中药药理与临床*, 2009, 25(6): 14-17.
- [30] 李晋玉. 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料对成骨细胞增殖分化及血管新生的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [31] 袁琼. TiO₂/SrHA 复合材料负载海马酚类提取物促进成骨细胞增殖分化的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.

[责任编辑 刘德文]