

基于护场理论探讨红肿消酊箍围法对皮肤脓肿大鼠 创周组织 IL-10, IL-1 β 基因表达的影响

徐强¹, 朱朝军¹, 张杨², 郭悦², 赵丽坤², 王婉莹³, 刘婷婷³, 冀晓娜³, 张朝晖^{1*}

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150;
2. 天津医院, 天津 300050; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:观察护场理论指导下红肿消酊剂箍围法对皮肤脓肿大鼠创周组织白细胞介素-10(IL-10),白细胞介素-1 β (IL-1 β)基因表达水平的影响。方法:32只大鼠分为空白组、模型组、莫匹罗星软膏组及红肿消酊剂组。除空白组外,其余3组皮下注射金黄色葡萄球菌1 mL($3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ cfu·mL⁻¹)建立皮下脓肿模型。模型组生理盐水换药,莫匹罗星软膏组采用莫匹罗星软膏2 g外涂换药,红肿消酊剂组采用红肿消2 mL换药,用药范围超过肿胀范围1 cm,换药1次/d。分别于治疗3,7,14,18 d取距离大鼠创面创周1,2,3 cm组织,观察大鼠创面脓肿局限及愈合时间,并检测IL-10,IL-1 β mRNA转录水平。结果:与模型组比较,红肿消酊剂组能够缩短脓肿局限时间及创面愈合时间($P < 0.05, P < 0.01$),红肿消酊剂组与莫匹罗星软膏组比较无统计学差异。红肿消酊剂组距离创周不同范围组织中IL-10水平在治疗过程中呈上升趋势,高于莫匹罗星软膏组及模型组,红肿消酊剂组治疗早期IL-1 β 水平低于莫匹罗星软膏组及模型组($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:红肿消酊剂箍围能够提高IL-10水平,并在脓肿形成早期抑制组织内IL-1 β 表达,从而能够有效减轻脓肿局部炎症反应,促进脓肿局限及创面愈合,为护场形成提供条件。

[关键词] 护场; 箍围法; 大鼠皮肤脓肿; 红肿消酊剂; 白细胞介素-10; 白细胞介素-1 β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0121-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017160121

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1404.066.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 14:04

Effect of Hongzhongxiao Tincture “Hoop Circumference” Method on Gene Expression of IL-10 and IL-1 β in Tissues Around Wound of Rats with Skin Abscess Under Guidance of Theory of “Defended Field”

XU Qiang¹, ZHU Chao-jun¹, ZHANG Yang², GUO Yue², ZHAO Li-kun²,

WANG Wan-ying³, LIU Ting-ting³, JI Xiao-na³, ZHANG Zhao-hui^{1*}

(1. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300150, China; 2. Tianjin Hospital, Tianjin 300050, China; 3. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of ‘hoop circumference’ (Hongzhongxiao tincture) on the gene expression levels of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the tissues around the wound of rats with skin abscess under the guidance of the theory of ‘defended field’. **Method:** The 32 rats were divided into blank group, model group, Mupirocin ointment group and Hongzhongxiao tincture group. Except the rats in blank

[收稿日期] 20161213(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273759)

[第一作者] 徐强, 硕士, 主治医师, 从事中医药治疗糖尿病足、疮疡及慢性不愈合疮面研究, Tel: 13702105138, E-mail: qa1122334@126.com

[通讯作者] *张朝晖, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药治疗糖尿病足、疮疡及慢性不愈合疮面研究, Tel: 022-60335416, E-mail: zzh45@aliyun.com

group, all the rats in other three groups received subcutaneous injection of *Staphylococcus aureus* 1 mL ($3 \times 10^9 - 5 \times 10^9$ cfu·mL⁻¹) to establish subcutaneous abscess models. The rats in model group received normal saline for treatment. Mupirocin ointment 2 g dressing was given in Mupirocin ointment group; and 2 mL Hongzhongxiao dressing was given in Hongzhongxiao tincture group, 1 cm over the swelling range, 1 time a day. The tissues 1, 2, 3 cm around the wound were taken on day 3, 7, 14 and 18 of treatment to observe the healing time and wound abscess limitation time; in addition, the transcription levels of IL-10 and L-1 β mRNA were detected. **Result:** As compared with model group, Hongzhongxiao tincture group could shorten the time of the abscess and wound healing time, ($P < 0.05$, $P < 0.01$); however, there was no significant difference between Hongzhongxiao tincture group and Mupirocin ointment group. The IL-10 level was increased in Hongzhongxiao tincture group, and higher than that in the model group and Mupirocin ointment group during the treatment; while IL-1 β level in Hongzhongxiao tincture group was lower than that in the Mupirocin ointment group and model group at the early treatment stage ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The Hongzhongxiao tincture can increase IL-10 level, and inhibit the expression of IL-1 β in the tissues in the early stage of abscess formation, thus reducing the local inflammatory reaction of the abscess effectively, promoting the limitation of abscess and wound healing, and providing conditions for the formation of the “defended field”.

[**Key words**] defended field; the method of hoop circumference; rat skin abscess; Hongzhongxiao tincture; interleukin-10 (IL-10); interleukin-1 β (IL-1 β)

皮肤及软组织感染属于中医疮疡的范畴,是由化脓性致病菌侵犯表皮、真皮和皮下组织引起的炎症性疾病,临床十分常见,涉及范围广泛,从浅表的局限性感染,到深部组织坏死性感染,甚至截肢致残,危及生命。对于常见的浅表皮肤感染性疾病进行局部外用抗菌素,感染局部药物浓度较高,不良反应较低,在一定程度上可以减少细菌耐药和交叉耐药的危险^[1]。但是随着抗生素的大量应用,出现了各种耐药、甚至多重耐药菌株^[2]。由于感染常可导致创面不愈合,患者长期使用抗生素易产生细菌耐药性^[3]。

目前临床上治疗皮肤金葡菌感染的局部外用抗生素主要有莫匹罗星、夫西地酸和喹诺酮类抗生素(以环丙沙星软膏为代表),这其中以莫匹罗星(百多邦)临床效果最为确切^[4]。但由于感染性皮肤病的病原菌及耐药情况在不断变化,加之外用抗生素副作用一直饱受争议,尤其是近年来莫匹罗星耐药菌在全球各地都呈现了明显上升的趋势,其中以上市较早的欧洲如爱尔兰^[5]、西班牙^[6]、希腊^[7]等国对于莫匹罗星耐药较为严重,成为了皮肤及软组织感染临床治疗中急需解决的重要问题之一。采用中药酊剂箍围消肿则为控制局部炎症扩散前提下避免因局部抗菌素滥用导致耐药菌出现提供了一种新的思路。中药酊剂系指药材用规定体积分数的乙醇提取、溶解或用流浸膏稀释而制成的澄清液体制剂^[8]。中药酊剂箍围消肿在促进炎症消退方面通

过前期临床研究已经得到证实。马静^[9]以如意金黄散为底方制备而成的金黄酊剂治疗下肢丹毒有明显疗效,同时发现,金黄酊在应用过程中具有过敏反应率低、透皮性好等优点。吴颖秀^[10]通过实验证实,如意金黄散酊剂外敷治疗能够在家兔皮肤感染早期迅速控制炎性反应,降低肿瘤坏死因子、白细胞介素(IL)-1 β 表达水平,有效缩短感染周期,避免感染进一步扩散。

护场理论是中医外科体系中重要的理论,前期研究发现,护场理论在以糖尿病足为主的慢性感染伤口治疗、清创时机方面具有重要的指导意义^[11-12]。在脓肿治疗过程中采用箍围药敷贴,能够起到承前启后的作用^[13]。应用箍围药物促进感染消散或促进感染的局限,促进护场形成,护场形成能约束感染的深陷和扩散,促进炎症消退,从而减少抗菌素的使用。基于此可以推测,中药箍围法在约束感染扩散,抑制炎症反应,促进抗炎因子表达方面能够起到一定作用。本实验通过采用中药红肿消酊剂箍围疗法与抗菌药物莫匹罗星软膏作用于金黄色葡萄球菌导致大鼠皮肤脓肿模型进行比较,结合脓肿局限及创面愈合时间研究 IL-10, IL-1 β 在皮肤脓肿模型大鼠创周基因表达情况,揭示其促护场形成的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 32 只, (280 ± 20) g, 雌雄各半, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验

动物中心,合格证号 SCXK(军)2012-0004。实验过程中严格遵守国家《实验动物管理条例》及 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 药物 红肿消酊剂由天津中医药大学第二附属医院制剂室提供。药物为大黄、黄柏、姜黄、白芷各 2 500 g,天南星、陈皮、苍术、厚朴、甘草各 1 000 g,天花粉 5 000 g。制备方法:上述药物等比例粉碎,取粉末过 4 号筛,按 1:8 比例溶于 75% 乙醇内浸泡 48 h,分 2 次回流提取,每次 2~3 h,滤过残渣收集提取液即成。药液收率 $\geq 75\%$,生药含量约 12.5%。

莫匹罗星软膏(中美天津史克制药有限公司,国药准字 H10930064,10 g/支),2 g/次,局部涂于患处。适用范围:革兰氏阳性球菌引起的皮肤感染,如脓疱病、疖肿、毛囊炎等原发性皮肤感染及湿疹合并感染、不超过 10 cm \times 10 cm 面积的浅表性创伤合并感染等继发性皮肤感染。

1.3 菌株来源及菌液制备 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 株,由北京中医药大学基础医学院医学病原学系免疫教研室,中西医结合基础医学国家重点学科和国家中医药管理局重点学科免疫实验室提供。

菌液制备:参考王德成等^[14]菌液制备方法,取金黄色葡萄球菌,在营养琼脂培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,取下菌落,加适量无菌 PBS 快速洗涤 2 次,然后再用无菌 PBS 悬浮细菌至 5 $\times 10^9$ cfu \cdot mL⁻¹。

1.4 仪器 1388 型生物安全柜,21R 型低温微量离心机,Biomate 3S 型微量核酸蛋白测定仪,HPH18 型超净工作台(美国 Thermo 公司);DS-5/K-1 型组织剪切力匀浆机(德国 ART 公司);Power Pac Basic 型水平电泳仪,S1000 型 PCR 仪(美国 Biorad 公司);SN-NG0601 型凝胶成像分析仪(中国信诺莱博公司);LightCycler[®] 480 II 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.5 试剂 Trizol(美国 Ambion 公司,批号 15596018);Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(瑞士 Roche 公司,批号 04896866001);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(TliRNaseH Plus)试剂盒,Taq 酶,DL1000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AK8105,KA2401RA,3591A);焦碳酸二乙酯(DEPC),GelRed(中国 Solarbio 公司,批号分别为 724C025,14G0805);PCR Grade H₂O(美国 Millipore 公司,批号 FIHA82109);琼脂糖(美国 Kirgen 公司,

批号 KG8220);Tris-碱(美国 Sigma 公司,批号 V900483);硼酸(中国科密欧化学试剂有限公司,批号 20130305);EDTA-2Na(天津市光复科技发展有限公司,批号 20140924)。

2 方法

2.1 造模 参考王德成等^[14]实验方法及标准并加以改进,采用注射器在大鼠背侧皮下注射细菌的方法。通过注射器针头提起大鼠背部皮肤,从尾端向头端皮下注射 5 $\times 10^9$ cfu \cdot mL⁻¹菌液 1 mL,使皮丘在圆形观察范围的中央。

在判定感染灶形成方面,由于大鼠皮下即为肌肉,缺少疏松结缔组织,但可以形成脓肿并破溃,因此以感染处大鼠皮肤出现溃疡,皮肤破溃,并有脓汁流出以及大鼠皮下形成硬结后出现脓腔,作为模型成功的标准^[14]。

2.2 分组 大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分 4 组,并予以相应药物外敷治疗,空白组大鼠皮下注射生理盐水,正常喂养。模型组大鼠皮下注射金黄色葡萄球菌造成感染模型,出现脓肿后立即采用生理盐水 2 mL 浸透的 4 层规格为 5 cm \times 7 cm 无菌纱布块,以脓肿最高点为中心将纱布块敷于大鼠背部脓肿上,自黏式绷带包扎。莫匹罗星软膏组大鼠皮下注射金黄色葡萄球菌造成感染模型,出现脓肿后立即将莫匹罗星软膏 2 g 均匀涂抹在 4 层规格为 5 cm \times 7 cm 无菌纱布块敷于大鼠背部脓肿上,自黏式绷带包扎。红肿消酊剂组大鼠皮下注射金黄色葡萄球菌造成感染模型,出现脓肿后立即采用红肿消酊剂 2 mL(2 g)浸透 4 层规格为 5 cm \times 7 cm 无菌纱布块,以脓肿最高点为中心将纱布块敷于大鼠背部脓肿上,自黏式绷带包扎。各组均每日换药 1 次。

2.3 引物序列 引物设计应用软件 Primer 5,根据 Gene Bank 所发布的目的基因序列进行设计,并经 NCBI BLAST 进行同源性序列比对,检索无显著同源性序列,由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游 5'-ACTCTGTGTGGATTGCTGGC-3'	140
	下游 5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	
IL-1 β	上游 5'-TATGGCAACTGTCCCTGAAC-3'	170
	下游 5'-CGAGATCTGCTGTGAGATT-3'	
IL-10	上游 5'-TGGAGTGAAGACCAGCAAAG-3'	173
	下游 5'-GCAGTAAGGAATCTGTACGA-3'	

2.4 RNA 提取与反转录 取距离大鼠创面创周 1, 2, 3 cm 的组织,按照 Trizol 的使用说明提取细胞的 RNA,操作按照试剂盒说明书进行。提取后按照 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明进行 RNA 反转录得到 cDNA。-70 ℃ 保存备用。

2.5 对照品制备 以 cDNA 为模板,PCR 扩增大鼠的 IL-10, IL-1 β 。反应体系为 20.0 μ L, 10 \times Buffer 2.0 μ L, dNTP Mix (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.8 μ L, Taq enzyme 0.2 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的上、下游引物各 0.4 μ L, cDNA 0.8 μ L, 双蒸水补足 20.0 μ L。PCR 扩增标准程序:预变性 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环, 72 ℃ 10 min。

2.6 重组质粒对照品的制备 由大鼠创面周围组织提取的总 RNA 经反转录 cDNA 后,应用特异性引物进行 PCR, 扩增管家基因 IL-10, IL-1 β , 得到了与目的片段大小相符的扩增产物,产物经回收、克隆,获得阳性菌。提取的质粒经 PCR 测序鉴定,证实构建了重组质粒标准品。

2.7 Real-time PCR 反应条件的优化 采用 TaKaRa 生物技术有限公司 SYBR Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus) 试剂盒, 20 μ L 反应体系:SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的上、下游引物各 0.3 μ L, cDNA 1.0 μ L, 双蒸水 8.4 μ L。采用三步法 PCR 扩增标准程序:95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 62 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 50 个循环; 熔解曲线 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 终延伸。

2.8 观察指标

2.8.1 记录大鼠创面脓肿局限及愈合时间 注射前大鼠称重,在注射后 1 d 内每天称重并测量脓肿的长度和宽径,计算自大鼠皮下形成脓肿之日起脓肿局限时间及脓肿创面愈合时间。

2.8.2 检测大鼠创周不同位置组织 IL-10, IL-1 β mRNA 转录水平 分别于治疗 3, 7, 14, 18 d 采集创面周围组织,取总 cDNA 作为模板,分别采用特异性引物,根据优化的反应条件进行 Real-time PCR,检测样本中 IL-10, IL-1 β 的拷贝数。以含有 β -actin 1 万个拷贝的组织中所含有的 IL-10, IL-1 β 拷贝数来表示相应促炎细胞因子的 mRNA 转录水平。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内的比较采用配对的 *T* 检验。多组间比较采用单因素方差分析,并用 LSD 进行验后多重比较,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 红肿消酊对大鼠脓肿范围局限时间及创面愈合时间的影响 红肿消酊剂组脓肿局限时间和创面愈合时间最短。与模型组比较,红肿消酊剂组、莫匹罗星软膏组脓肿范围局限时间均有缩短 (*P* < 0.01)。红肿消酊剂组脓肿范围局限时间短于莫匹罗星软膏组,二者差别无统计学意义。与模型组比较,红肿消酊剂组创面愈合时间缩短 (*P* < 0.05)。红肿消酊剂组创面愈合时间短于莫匹罗星软膏组,二者差别无统计学意义。见表 2。

表 2 红肿消酊对大鼠脓肿范围局限时间及创面愈合时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g \cdot g ⁻¹	脓肿局限时间	创面愈合时间
模型	-	12.63 \pm 1.99	19.92 \pm 2.33
莫匹罗星软膏	0.67 \times 10 ⁻²	9.28 \pm 1.38 ²⁾	18.14 \pm 2.54
红肿消酊剂	0.67 \times 10 ⁻²	7.67 \pm 1.63 ²⁾	16.83 \pm 1.51 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01。

3.2 红肿消酊对大鼠不同阶段创周组织 IL-10 含量的影响 治疗第 3 天,在距离创周 1 cm 处红肿消酊剂组及莫匹罗星软膏组 IL-10 水平明显低于空白组及模型组 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 创周 2 cm 处红肿消酊剂组 IL-10 水平低于空白组及模型组 (*P* < 0.05), 创周 3 cm 处各组间水平无统计学意义。治疗第 7 天,模型组、莫匹罗星软膏组、及红肿消酊剂组 IL-10 水平进一步降低,且 3 组 IL-10 水平在距离创周 1, 2, 3 cm 处均明显低于空白组 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 红肿消酊剂组 IL-10 水平在距离创周 2 cm 处高于模型组及莫匹罗星软膏组 (*P* < 0.05); 创周 3 cm 处,莫匹罗星软膏组 IL-10 水平高于模型组 (*P* < 0.05)。治疗第 14 天,模型组、莫匹罗星软膏组及红肿消酊剂组 IL-10 水平较第 7 天时升高,创周 1 cm 处各组之间 IL-10 水平变化无统计学意义; 创周 2 cm 处,红肿消酊剂组 IL-10 水平低于空白组、莫匹罗星软膏组 (*P* < 0.05); 创周 3 cm 处,莫匹罗星软膏组 IL-10 水平低于空白组 (*P* < 0.05)。治疗第 18 天,红肿消酊剂组 IL-10 水平在距离创周 1, 2, 3 cm 处高于模型组及莫匹罗星软膏组 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 与空白组接近,在距创周 3 cm 处 IL-10 水平高于空白组 (*P* < 0.05)。见表 3。

3.3 红肿消酊对大鼠不同阶段 IL-1 β mRNA 水平的影响 治疗第 3 天,创周 1 cm 处红肿消酊剂组、莫匹罗星软膏组及模型组 IL-1 β mRNA 水平低于

表 3 红肿消酊对大鼠不同阶段创周组织 IL-10 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Hongzhongxiao tincture on IL-10 levels in different stages in tissues around wound in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·g ⁻¹	距创周距离/cm	3 d	7 d	14 d	18 d
空白	-	1	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67
		2	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67
		3	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67	30.62 ± 1.67
模型	-	1	30.46 ± 0.80	27.81 ± 1.32 ²⁾	29.89 ± 3.17	28.11 ± 1.55 ²⁾
		2	31.56 ± 1.83	27.08 ± 1.22 ²⁾	29.50 ± 2.55	28.23 ± 0.71 ²⁾
		3	29.01 ± 2.64	26.95 ± 1.60 ²⁾	30.06 ± 1.87	28.30 ± 0.72 ²⁾
莫匹罗星软膏	0.67 × 10 ⁻²	1	28.61 ± 1.53 ^{2,3)}	27.85 ± 2.43 ²⁾	29.75 ± 2.94	28.29 ± 0.93 ²⁾
		2	30.15 ± 1.63	27.88 ± 0.59 ²⁾	30.76 ± 1.37	28.51 ± 1.03 ¹⁾
		3	30.40 ± 2.17	28.67 ± 1.21 ^{2,3)}	29.03 ± 1.51 ¹⁾	29.57 ± 0.66 ^{3,5)}
红肿消酊剂	0.67 × 10 ⁻²	1	27.89 ± 1.65 ^{2,4)}	28.19 ± 1.97 ¹⁾	29.57 ± 1.11	30.88 ± 1.37 ^{4,6)}
		2	28.98 ± 0.54 ^{1,3)}	28.51 ± 0.93 ^{2,3)}	28.59 ± 0.99 ^{1,5)}	30.56 ± 2.88 ^{4,5)}
		3	30.49 ± 1.64	27.46 ± 1.24 ²⁾	29.79 ± 1.01	31.79 ± 1.05 ^{1,4,6)}

注:与空白组同期比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组同期比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01;与莫匹罗星软膏组同期比较⁵⁾P < 0.05, ⁶⁾P < 0.01 (表 4 同)。

空白组 ($P < 0.01$); 红肿消酊剂组在距离创周 1, 2 cm 处 IL-1 β mRNA 水平低于空白组及模型组 ($P < 0.01$)。治疗第 7 天, 在距离疮周 1, 2, 3 cm 处, 莫匹罗星软膏组及模型组 IL-1 β mRNA 水平低于红肿消酊剂组及空白组 ($P < 0.01$), 红肿消酊剂组 IL-1 β 水平回升, 高于莫匹罗星软膏组及模型组 ($P < 0.01$)。治疗第 14 天, 在距离疮周 1, 2 cm 处, 红肿消酊剂组

IL-1 β mRNA 水平低于模型组、莫匹罗星软膏组, 尤其在距离疮周 2 cm 显著降低 ($P < 0.01$)。治疗第 18 天, 在疮周 1 cm 处, 红肿消酊剂组 IL-1 β mRNA 水平低于空白组, 高于模型组与莫匹罗星软膏组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 疮周 2 cm 处, 模型组、莫匹罗星软膏组及红肿消酊剂组 IL-1 β mRNA 水平均低于空白组 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 红肿消酊对大鼠不同阶段 IL-1 β mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Hongzhongxiao tincture on IL-1 β mRNA levels in different stages in tissues around wound in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·g ⁻¹	距创周距离/cm	3 d	7 d	14 d	18 d
空白	-	1	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46
		2	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46
		3	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46	30.04 ± 2.46
模型	-	1	27.79 ± 0.30 ²⁾	25.66 ± 1.81 ²⁾	28.75 ± 2.05	26.64 ± 0.70 ²⁾
		2	29.86 ± 1.28	25.96 ± 0.46 ²⁾	28.68 ± 1.41 ¹⁾	28.21 ± 1.47 ²⁾
		3	30.72 ± 1.23	26.63 ± 1.66 ²⁾	28.66 ± 1.97	27.78 ± 0.85 ²⁾
莫匹罗星软膏	0.67 × 10 ⁻²	1	27.22 ± 1.04 ²⁾	25.13 ± 0.55 ²⁾	29.69 ± 1.05	26.32 ± 1.91 ²⁾
		2	27.35 ± 1.26	26.81 ± 1.41 ²⁾	29.60 ± 0.88	27.33 ± 0.53 ²⁾
		3	24.08 ± 1.52	25.27 ± 0.91 ²⁾	30.21 ± 2.33	27.07 ± 0.75 ²⁾
红肿消酊剂	0.67 × 10 ⁻²	1	24.08 ± 1.52 ^{2,4,6)}	28.98 ± 1.37 ^{4,6)}	27.23 ± 1.48 ^{2,6)}	27.84 ± 0.84 ^{1,3,6)}
		2	25.61 ± 0.55	28.89 ± 1.01 ^{4,6)}	26.95 ± 0.66 ^{2,4,6)}	27.46 ± 2.18 ²⁾
		3	28.32 ± 0.82	29.86 ± 2.03 ^{4,6)}	29.09 ± 1.12	28.83 ± 0.65 ⁵⁾

4 讨论

为了从分子水平研究红肿消酊剂酊对创面炎症因子 IL-10, IL-1 β 的影响, 从而促进脓肿局部护场形成, 本研究针对大鼠管家基因 β -actin 以及炎症

因子 IL-10, IL-1 β 基因, 构建了重组质粒标准品, 并优化反应条件, 建立了检测 β -actin, IL-10 及 IL-1 β 基因的 Real-time PCR 检测方法。结果表明, 红肿消酊剂箍围能够早期迅速调动体内抗炎免疫因子, 通

过增加 IL-10 在组织内的表达,同时下调 IL-1 β 含量,起到增加机体免疫功能,抑制炎症反应、减轻组织损害等作用,促进脓肿局部护场的形成。

护场理论是中医外科理论体系中独特的理论。护场首见于明·赵宜真《秘传外科方·疔疮治法》：“疮证吉：有应。如生一疔之外，别处肉上再生一小疮，即是有应，可用针挑破，护场”，明·王肯堂《证治准绳·疡医》亦指出：“疔之四围赤肿，名曰护场可治……疔之四围无赤肿，名曰不护场，不可治。”随着中医外科的不断发展，“护场”的含义也在不断扩大。扩展到整个中医学理论中，护场应该分为广义护场和狭义护场，广义护场是调动全身正气对体内一切致病因素进行的抵抗，即大护场。狭义护场是针对局部外科疾病而言^[13]。护场的形成，实际上是对外邪进行围困，在疾病四周形成一个防御性屏障，调动体内正气集聚，使“邪”丧失扩散侵袭机体的机会，并使其在正邪交争中处于劣势，进而被消灭的过程^[15]。在脓肿的形成过程中，如果感染能在短时间内集中于一个固定场所而不向周围及深部组织扩散，借助药物以及通过机体自身的抗炎免疫机制，则可以在小范围内使得脓肿局限，达到易治的目的，而中医外科的箍围法正是通过中药外用药的围敷作用促使脓肿在初期得以消散，既能使毒已结聚，也能使疮形缩小，趋于局限，达到早日成熟和破溃；溃后余肿未消者，也可用之消肿，以化余毒。

红肿消酞剂是在如意金黄散的基础上进行改良，主要药物包括姜黄、大黄、黄柏、苍术、厚朴、陈皮、甘草、天南星、白芷、天花粉、金银花等，通过 75% 乙醇提取而成，具有清热解毒，散结消肿的功效，对以红肿热痛为主要表现的阳证疮疡具有较好的治疗效果。前期实验研究发现，如意金黄散酞剂在治疗早期皮肤感染方面能够增强抗炎疗效，同时避免抗菌药物不当使用而造成耐药等副作用^[10]。

IL 可以由多种细胞产生^[16]，是细胞因子中具有多种生物活性的一组淋巴因子，并在免疫细胞的发育、分化、免疫应答及在炎症反应过程中有重要调节作用^[17]。研究表明，IL-10 是具有极强免疫抑制和抗炎功能的细胞因子，在细胞因子网络调解中发挥重要作用。可以抑制单核细胞生成多种细胞因子刺激单核细胞产生 IL-1 受体拮抗剂，发挥抗炎功能^[18]。IL-10 是近年来发现的一种重要的负调节因子，可抑制细胞免疫，是强有力的免疫和炎症抑制因子，其主要功能是限制和终止炎症反应，具有抑制 T 细胞、单核细胞和巨噬细胞激活，并抑制单核因子

的合成、一氧化氮的产生等作用^[19]。在创面修复过程中局部皮肤组织内 IL 的表达变化可能是其取得较好效果的主要机制之一，例如移植异种真皮脱细胞基质后局部炎症反应轻微与 IL-10 持续表达可能有关^[20]。结果显示，与空白组比较，经过不同药物干预的莫匹罗星软膏组及红肿消酞剂组大鼠在脓肿形成后治疗早期（治疗 3 d），创周组织内 IL-10 水平明显低于空白组及模型组，模型组创周组织内 IL-10 水平则与空白组接近，且高于药物干预的其他两组。在治疗 7 d 后，红肿消酞剂组大鼠距创周组织 1 ~ 2 cm 范围 IL-10 水平出现回升，接近空白组水平，模型组及莫匹罗星软膏组相同范围创周组织内 IL-10 出现下降，且低于红肿消酞剂组，在治疗 18 d 后，除空白组外的 3 组大鼠脓肿基本局限，创面基本愈合之时，红肿消酞剂组距创周不同位置组织内 IL-10 水平均有大范围提升，甚至在距创周 3 cm 之远的组织内高于空白组，提示红肿消酞剂与局部外用抗生素机制不甚相同，红肿消酞剂箍围可能是通过调动脓肿局部组织活性，从而提高 IL-10 因子水平，在一定程度上促进了局部抗炎作用，并能在更广泛的范围内发挥作用。

IL-1 是由单核巨噬细胞产生，或由皮肤成纤维细胞自分泌的炎症反应前细胞因子，IL-1 有 2 种亚型，分别是 IL-1 α 和 IL-1 β ^[21]。其中 IL-1 的活性主要由 IL-1 β 表达，具有广泛的生物学活性，具有促炎、促凝、调节细胞生长等作用，在细菌感染时表达可明显增加^[22]。早期抑制 IL-1 β 可减少白细胞反应，抑制其补充到损伤部位，从而影响组织的净化^[23]。结果显示，虽然 IL-1 β 为促炎因子，但未注射金黄色葡萄球菌的空白组大鼠创周不同位置组织内 IL-1 β 水平均高于其他 3 组，提示 IL-1 β 上升并非评判炎症局限的唯一因素，在治疗 3 d 时，红肿消酞剂组在距创周 1 ~ 3 cm 处组织内 IL-1 β 因子水平明显低于模型组及莫匹罗星软膏组，结合脓肿局限时间可知，红肿消酞剂确实存在抑制组织内 IL-1 β 表达而起到减轻炎症反应的作用，但需要注意的是，必须是外部炎症刺激已经发生，抑制组织内 IL-1 β 表达方可起到上述作用。但当红肿消酞剂组脓肿接近局限，而其他 2 组脓肿尚未局限之时（治疗 7 d），红肿消酞剂组不同位置组织内 IL-1 β 因子水平接近空白组，而随着其他 2 组脓肿接近局限（治疗 14 d，治疗 18 d），4 组大鼠不同位置组织内 IL-1 β 因子水平则无明显规律，提示红肿消酞剂通过早期抑制组织内 IL-1 β 表达能够有效减轻脓肿局部炎症反应，

从而促进脓肿局限及创面愈合。

结果表明,红肿消酊剂在促进脓肿局限以及脓肿破溃创面愈合方面在一定程度上能起到局部外用抗菌素的作用,甚至具有一定优势。但是在大鼠造模及治疗过程中发现,由于酊剂特有的挥发性作用以及大鼠具有活动性较强的特点,可能导致红肿消酊围大鼠背部脓肿有效药物及作用时间不够,有可能导致治疗组治疗效果出现偏差。此外,本研究虽然在一定程度上明确了红肿消酊剂箍围促进脓肿模型大鼠护场形成及疗效,并提示了相关因子所起到的作用,但是炎症指标选择上仍偏少,仍需要进一步加强后期研究。此外,护场形成与相关因子的相关性,各因子之间的关联性,疮周 1, 2, 3 cm 距离与相关因子表达量的关系等仍有待挖掘。

综上所述,红肿消酊剂作为复方制剂,通过局部外敷被表皮吸收,能够调动体内抗炎免疫因子,促进疮周较大范围组织内 IL-10 升高及 IL-1 β 早期迅速下降,从而为护场形成提供有利条件,同时避免了局部外用抗生素所导致的细菌耐药等副作用,对于局部脓肿迅速局限具有显著疗效。本研究只是在较宏观的层次上观察了相关因子的变化。由于感染与炎症的机制复杂,存在多种信号通路等,需要进一步深入研究箍围药红肿消对信号通路、炎症小体等的影响。

[参考文献]

[1] 马琳. 金黄色葡萄球菌感染性皮肤病的外用抗生素选择[J]. 实用皮肤学杂志, 2009, 2(1): 20-22.

[2] Drlica K. Antibiotic resistance: can we beat the bugs [J]. Drug Discov Today, 2001, 6(14): 714-715.

[3] 赵海涛, 陈玉林. 创面用药与创面愈合[J]. 现代康复, 2001, 5(1): 10-11.

[4] Leyden J J, 陈申. 莫匹罗星(百多邦): 全新的外用抗生素-对多种抗生素耐药的细菌有效[J]. 临床外科杂志, 1996, 4(4): 233-234.

[5] Moorhouse E, Fenelon L, Hone R, et al. Staphylococcus aureus sensitivity to various antibiotics-a national survey in Ireland 1993 [J]. Ir J Med Sci, 1996, 165(1): 40-43.

[6] Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Batista N, et al. Mupirocin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates in a Spanish hospital. Co-application of multiplex PCR assay and conventional microbiology methods [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002, 43(2): 123-128.

[7] Petinaki E, Spiliopoulou I, Kontos F, et al. Clonal

dissemination of mupirocin-resistant staphylococci in Greek hospitals [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(1): 105-108.

[8] 施鸿, 孙蕾, 周琴妹, 等. 不同提取方法对中药酊剂微生物检出的影响 [J]. 中国药物与临床, 2008, 8(8): 663-664.

[9] 马静. 金黄酊箍围消肿联合中药内服治疗下肢丹毒临床观察 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(8): 1305-1306.

[10] 吴颖秀. 如意金黄散控制早期浅表皮肤感染的基础研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(9): 141-143.

[11] 徐强, 张朝晖. 护场理论在治疗糖尿病足创面中的应用 [J]. 新中医, 2012, 44(2): 1-2.

[12] 张朝晖, 朱朝军. 护场理论在糖尿病足清创时机中的应用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(9): 99-100.

[13] 徐强, 张朝晖. 护场源流初探 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(8): 828-829.

[14] 王德成, 王星, 周文江, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌皮肤脓肿小鼠感染模型的建立与评估 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 221-224.

[15] 徐强, 张朝晖. 纠结疗法在糖尿病足治疗中的应用 [J]. 四川中医, 2011, 29(11): 27-28.

[16] 杨青, 张连峰. 白介素家族细胞因子与干细胞动员 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 62-65.

[17] 曹秀红, 张学彦, 张晓娜. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(30): 3143-3148.

[18] 徐祥, 梁华平, 高劲谋, 等. 30 例多发伤患者血浆白介素-10 水平与损伤严重程度和预后的关系 [J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(4): 236-238.

[19] 欧阳平, 黄连莲, 徐安龙. 白介素 10 受体及其信号传导 [J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(12S): 56-58.

[20] 彭燕, 刘德伍, 杨慧, 等. 组织工程皮肤移植过程中白介素 10 和肿瘤坏死因子 α 的表达 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37): 6869-6872.

[21] Charles A, Dinarello. Interleukin-1 [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1997, 8(4): 253-265.

[22] 申英姬, 金正勇, 金政, 等. 中枢神经系统感染患儿脑脊液的 TNF 与 IL-1 β 的含量变化及其临床意义 [J]. 中国妇幼保健, 2003, 18(1): 42-43, 45.

[23] Mercado A M, Padgett D A, Sheridan J F, et al. Altered kinetics of IL-1 α , IL-1 β , and KGF-1 gene expression in early wounds of restrained mice [J]. Brain Behav Immun, 2002, 16(2): 150-162.

[责任编辑 张丰丰]