

补中益气汤对脾气虚症大鼠伤口肌肉组织 Hyp, VEGF,
α-SMA 表达的影响

樊慧杰¹, 柴智¹, 闫润红¹, 李艳彦^{1,2}, 周然^{1*}

(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 山西中医学院第二中医院, 太原 030024)

〔摘要〕 目的:研究补中益气汤对脾气虚症大鼠伤口愈合的影响和其机制的研究,以验证伤口愈合从脾论治。方法:60 只 SD 大鼠随机分为正常组、脾气虚模型组、补中益气汤组(7 g·kg⁻¹),各组又分为术后 3,7 d 2 个亚组。模型组和补中益气汤组每日灌服生大黄(20 g·kg⁻¹),连续灌胃 18 d,正常组给予等体积蒸馏水。第 19 天各组均制作手术伤口,当日起补中益气汤组给予灌胃补中益气汤,连续给药至大鼠处死之日。正常组和模型组给予等体积蒸馏水。分别于术后 3,7 d 处死大鼠,制备肌肉组织样本,采用碱水解法检测羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量,应用 Western blot 法检测血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)的表达。结果:模型组的 Hyp, VEGF, α-SMA 均降低,与正常组的差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);与术后 3 d 模型组比较,术后 3 d 补中益气汤组的 Hyp, VEGF, α-SMA 均升高($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$),但是仍低于术后 3 d 正常组(均 $P < 0.05$);与术后 7 d 模型组比较,术后 7 d 补中益气汤组的 Hyp, VEGF, α-SMA 均升高($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$),并与术后 7 d 正常组的差异均无统计学意义。结论:补中益气汤通过升高肌肉组织中的 Hyp, VEGF, α-SMA,可有效促进伤口的愈合,同时该药用药时间的延长也有助于伤口的愈合。

〔关键词〕 补中益气汤;脾气虚;羟脯氨酸;α-平滑肌肌动蛋白;血管内皮细胞生长因子

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2013)21-0214-04

〔doi〕 10.11653/syfy2013210214

Effects of Buzhong Yiqi Decoction on Expression of Hydroxyproline,
α-Smooth Muscle Actin and Vascular Endothelial Growth Factor
in Muscle Tissue of Wound in Spleen Deficiency Rats

FAN Hui-jie¹, CHAI Zhi¹, YAN Run-hong¹, LI Yan-yan^{1,2}, ZHOU Ran^{1*}

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030024, China;

2. Second Affiliated Hospital of Shanxi College of TCM, Taiyuan 030024, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the effect and mechanism of Buzhong Yiqi decoction on rats' wound healing, and to achieve the purpose of wound healing from medical treatment of spleen. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, spleen deficiency model group and Buzhong Yiqi decoction group (7 g·kg⁻¹), and each group is divided into two subgroups of postoperative 3 d and 7 d. Model group and Buzhong Yiqi decoction group were fed with Rhubarb (20 g·kg⁻¹) for 18 days, and normal group was given an equal volume of distilled water. From the 19th day, rats of each group were made the surgical wound; Buzhong Yiqi decoction group were administered with Buzhong Yiqi decoction until the date of sacrifice, and other groups given an equal volume of distilled water. After rats were sacrificed, muscle tissue of wound was prepared. Hydroxyproline (Hyp) was measured using alkaline hydrolysis, and vascular endothelial growth factor (VEGF) and α-smooth muscle actin

〔收稿日期〕 20130507(019)

〔基金项目〕 山西省高校科技开发项目(20101106);山西中医学院基础与临床研究计划项目(2011JC02)

〔第一作者〕 樊慧杰,博士,讲师,从事中药的分子生物学研究, Tel:0351-2272378, E-mail: fanhuijie. happy@163. com

〔通讯作者〕 * 周然,博士,教授,博士生导师,从事方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-2272390, E-mail: zhour58@sohu. com

(α -SMA) were detected using Western blot. **Result:** Compared with the normal group, Hyp, VEGF and α -SMA of model group were significantly decreased (all $P < 0.01$). Compared with model group of postoperative 3 d, Hyp, VEGF and α -SMA of Buzhong Yiqi decoction group of postoperative 3 d were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), but much lower than those of normal group of postoperative 3 d (all $P < 0.05$). Compared with model group of postoperative 7 d, Hyp, VEGF and α -SMA of Buzhong Yiqi decoction group of postoperative 7 d were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), but there were no statistical difference between Buzhong Yiqi decoction group and normal group. **Conclusion:** Buzhong Yiqi decoction can effectively promote wound healing by increasing Hyp, VEGF and α -SMA, and extension of administration time is more conducive to wound healing.

[**Key words**] Buzhong Yiqi decoction; spleen deficiency; hydroxyproline; α -smooth muscle actin; vascular endothelial growth factor

伤口愈合延迟不仅给患者本人带来精神痛苦,而且也是摆在医护人员面前一个棘手的问题,这是多因素综合作用的结果,而现代医学对伤口愈合延迟的处理原则是伤口局部的清理和抗感染,所以效果并不显著。祖国医学认为肌肉是由脾所主,则伤口不能正常愈合的原因在于“脾”功能异常。所以从“脾主肌肉”理论出发,选用补脾代表方补中益气汤用于实验研究。本研究通过大鼠脾气虚模型的建立和手术伤口的制作,并用补中益气汤进行干预,观察伤口局部肌肉组织羟脯氨酸(Hyp)的浓度和血管内皮生长因子(VEGF), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的相对表达量,探讨补中益气汤对伤口愈合的影响以及其作用机制,以达到对伤口愈合从脾进行论治的目的。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(210 $\pm$ 10)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2009-0004。

1.2 药物和试剂 补中益气汤(由黄芪 18 g,炙甘草 9 g,人参 6 g,当归 3 g,陈皮 6 g,升麻 6 g,柴胡 6 g,白术 9 g 组成)和大黄由山西中医学院第二中医院提供,均常规煎煮,制备成水煎剂,质量浓度均为 1 g $\cdot$ mL⁻¹,低温保存备用。 α -SMA 小鼠抗大鼠抗体(Sigma 公司),VEGF 小鼠抗大鼠抗体(Santa Cruz 公司),HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),全蛋白抽提试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),Hyp 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器 SpectraMax 190 全波长酶标仪(美国 MD 公司),Gel Dox-XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),3k30 台式高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司),TE 70 PWR 转膜仪(美国 Amersham 公司),BS224S 型电子天平(德国赛多利斯集团)。

2 方法

2.1 分组和建立脾气虚动物模型 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组:正常组、脾气虚模型组、补中益气汤组,各组又分为术后 3 d 和术后 7 d 2 个亚组,各亚组 10 只 SD 大鼠。根据李东垣《脾胃论》中“苦寒之药损其脾胃”的记载,应用苦寒泻下法建立脾气虚动物模型。脾气虚模型组和补中益气汤组 SD 大鼠每日灌服生大黄煎剂 20 g $\cdot$ kg⁻¹,每天 2 次,连续灌胃 18 d^[1]。正常组 SD 大鼠给予等体积蒸馏水。

2.2 制作手术伤口和给药 第 18 天 SD 大鼠背部剪毛,10% 硫化钠脱毛。第 19 天 3 组均制作手术伤口:术前禁食 12 h,以戊巴比妥钠 45 mg $\cdot$ kg⁻¹ ip 麻醉大鼠,常规消毒后于背部脊柱旁开 1 cm 处平行脊柱做长约 4 cm 的切口,切开皮肤深达肌层,伤口用 3-0 丝线缝合后用无菌纱布包扎,每日更换纱 1 次,至术后 3 d 或 7 d^[2]。行手术切口当天起,补中益气汤组 SD 大鼠每日 ig 7 g $\cdot$ kg⁻¹ 的补中益气汤(按体表面积折算,相当于成人临床用量),每天 2 次,连续给药至大鼠处死之日。正常组和脾气虚模型组 SD 大鼠给予等体积蒸馏水。末次灌胃 6 h 后处死大鼠。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 羟脯氨酸含量测定 取 3 大组术后 3,7 d 大鼠各 10 只,在戊巴比妥钠 45 mg $\cdot$ kg⁻¹ ip 麻醉下处死,取距切口两侧各 0.3 cm、长 3.0 cm 肌肉样本。液氮条件下研磨肌肉组织,取一部分粉末称重,采用碱水解法检测其所含的羟脯氨酸含量,具体操作参照试剂盒说明书。在波长 550 nm 处测定吸光度(A),计算公式为:

$$\text{Hyp 含量} = [\text{测定管 } A - \text{空白管 } A] / [\text{标准管 } A - \text{空白管 } A] \times \text{标准管含量} (5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{水解液总体积} (10 \text{ mL}) / \text{组织质量} (\text{mg})$$

2.3.2 VEGF,α-SMA 蛋白表达检测 另取一部分肌肉粉末、称重,按全蛋白抽提试剂盒提取各组肌肉组织的总蛋白,收集上清,-70℃保存备用。用 Bradford 法测定蛋白质浓度,以此取等量蛋白质上样用于跑 SDS-PAGE 电泳,经过 5% 积层胶和 12% 分离胶电泳分离蛋白质。将分离后蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉在摇床上室温封闭 2 h, TBST 漂洗膜 3 次。一抗 4℃摇床孵育过夜,TBST 漂洗膜 3 次。二抗室温摇床孵育 1 h,TBST 充分漂洗,加入 ECL 液反应显影、曝光。用凝胶成像系统自带软件来定量检测蛋白质的相对表达量,以正常组术后 3 d 为比较基准,数据均用内参 GAPDH 进行标准化处理。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

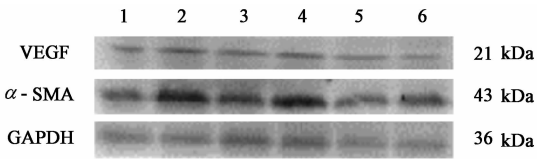
3 结果

3.1 脾气虚动物模型综合观察 灌服大黄后第 2 天多数大鼠泄泻、便形质软或溏稀,肛周红且有污物,第 3 天起逐渐出现大鼠食量减少、体重减轻,懒动、蜷缩、弓背、眯眼,喜扎堆,易惊,毛污黄无光泽、毛粘成缕状甚至稀疏,10 d 以后表现出行动缓慢、嗜睡、精神萎靡、明显消瘦、久泻不止甚至有脱肛现象,符合脾气虚症。

3.2 对脾气虚大鼠肌肉 Hyp 含量的影响 与正常组术后 3 d 比较,模型组和补中益气汤组术后 3 d 的大鼠 Hyp 含量均显著降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。

与正常组术后 7 d 比较,模型组术后 7 d 的 Hyp 含量显著降低($P < 0.01$);而补中益气汤组术后 7 d 的 Hyp 含量无显著差别。与模型组术后 3 d 比较,补中益气汤组术后 3 d 的 Hyp 含量显著升高($P < 0.01$);术后 7 d 的补中益气汤组较模型组相比,也呈现显著升高($P < 0.01$),见表 1。

3.3 对脾气虚大鼠肌肉 VEGF,α-SMA 相对表达量的影响 术后 3 d 各组间的结果比较:与正常组比较,模型组大鼠 VEGF,α-SMA 相对表达量均明显降低(均 $P < 0.01$),补中益气汤组大鼠 VEGF,α-SMA 相对表达量也均显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,补中益气汤组 VEGF,α-SMA 相对表达量显著增加($P < 0.01, P < 0.05$)。术后 7 d 各组间的结果比较:与正常组比较,模型组 VEGF,α-SMA 相对表达量均明显降低(均 $P < 0.01$),而补中益气汤组 VEGF,α-SMA 相对表达量的差异均无统计学意义;与模型组比较,补中益气汤组 VEGF,α-SMA 相对表达量呈现明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),见图 1,表 1。



1. 正常组术后 3 d;2. 正常组术后 7 d;
3. 补中益气汤 7 g·kg⁻¹ 术后 3 d;4. 补中益气汤组术后 7 d;
5. 模型组术后 3 d;6. 模型组术后 7 d

图 1 各组大鼠 VEGF,α-SMA 的 Western blot 检测

表 1 补中益气汤对脾气虚大鼠肌肉 Hyp 含量,VEGF 和 α-SMA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	术后天数/d	剂量/g·kg ⁻¹	Hyp/mg·g ⁻¹	VEGF/GAPDH	α-SMA/GAPDH
正常	3	-	38.42 ± 2.66	1.01 ± 0.06	1.01 ± 0.09
	7	-	47.93 ± 3.87	1.12 ± 0.18	2.07 ± 0.20
模型	3	-	31.59 ± 2.27 ²⁾	0.82 ± 0.08 ²⁾	0.89 ± 0.04 ²⁾
	7	-	40.11 ± 4.17 ²⁾	0.90 ± 0.15 ²⁾	1.50 ± 0.17 ²⁾
补中益气汤	3	7.00	35.82 ± 3.33 ^{1,4)}	0.94 ± 0.07 ^{1,4)}	0.95 ± 0.04 ^{1,3)}
	7	7.00	46.00 ± 2.24 ⁴⁾	1.09 ± 0.15 ³⁾	1.88 ± 0.30 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同期模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

《素问集注·五脏生成》中说“脾主运化水谷之精,以生养肌肉,故主肉”;《四圣心源》中说“肌肉者,脾土之所生也,脾气盛则肌肉丰满而充实”。祖国医学认为:脾气盛,则脾所运化的水谷精微能正常营养肌肉,肌肉才能发达、健壮;反之肌肉得不到滋养,因而可能出现伤口愈合延迟或经久不愈的现象。

补中益气汤出自李东垣《脾胃论》,当脾胃虚弱,受纳和运化都不足,故应当补之,方中诸药合用,具有补中益气、升阳举陷的疗效。通过动物实验研究,也已经多方面证实补中益气汤能明显改善脾气虚证^[3-6]。

在伤口愈合过程中,胶原蛋白由肉芽组织中的成纤维细胞合成和分泌,与其他成分共同作用以能

修复组织的结构、改善组织的强度。除弹性蛋白含少量 Hyp 外,Hyp 主要存在于胶原蛋白中,且含量稳定。有研究报道,大鼠组织胶原蛋白中的羟脯氨酸含量为 9.2%^[6]。因此检测组织中羟脯氨酸的含量,可以反映创伤愈合的情况^[7]。α-SMA 是肌成纤维细胞的特异性标记物,只出现在正常组织的血管平滑肌细胞和肌肉组织中。在伤口愈合时,肉芽组织中丰富的肌成纤维细胞通过其细胞骨架成分 α-SMA 的收缩,促进伤口的收缩,皮缘靠拢,从而闭合伤口^[8]。肉芽组织中血管再生是多因素参与的过程,目前已经明确有多个血管形成刺激因子均能促进血管生成,VEGF 是其中关键因子之一。VEGF 在伤口局部的浓度明显增高,与伤口部位肉芽组织的形成有关^[9];其具体作用是增加伤口部位通透性、刺激血管内皮细胞分裂增殖,诱导血管生成,促进创面愈合^[10]。

本研究用补中益气汤干预脾气虚症大鼠的伤口愈合,实验说明补中益气汤通过提高 Hyp,VEGF,α-SMA 的量可有效促进伤口的愈合。术后 3 d 补中益气汤组 3 项指标虽然高于术后 3 d 模型组,但是仍然低于术后 3 d 正常组;表明用补中益气汤干预脾气虚大鼠 3 d,可促进伤口的愈合但仍未达到正常水平。术后 7 d 补中益气汤组 3 项指标均高于术后 7 d 模型组,并且与术后 7 d 正常组的差异无统计学意义;表明用补中益气汤干预脾气虚大鼠 7 d,可使伤口的愈合达到正常水平。所以补中益气汤干预伤口 7 d 的效果优于 3 d 的效果,用药时间的延长有助于伤口的愈合,提示增加补中益气汤剂量也有可能更能促进脾气虚症者伤口的愈合,但是这需要进一步的实验来验证。

[参考文献]

[1] 李家邦,杨冬花,蒋荣鑫,等. NF-ATc 在肝气郁结、脾

气虚证模型大鼠的表达以及柴胡疏肝散、四君子汤的干预作用[J]. 中国现代医学杂志,2005,15(10):1515.

[2] 任贵云,董福生,王洁,等. 透明质酸外敷膜对大鼠手术切口愈合的影响[J]. 中华整形外科杂志,2004,9(20):380.

[3] 刘群英. 补中益气汤治疗脾虚证作用机制研究[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(7):799.

[4] 刘瑜彬,王晖,唐晓峰,等. 灰关联聚类法评价补中益气汤对大鼠气虚发热的效果[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):124.

[5] 刘进娜,谢鸣,高秀兰,等. 补中益气汤退热作用及机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):174.

[6] 王娜,张建平,徐华洲,等. 补中益气汤对阿霉素诱导心衰大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):508.

[7] Seifter E, Manner G, Crowley L V, et al. Enhancement by cultured fibroblasts of reparative collagen synthesis in rats[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1974, 146(1):8.

[8] 索伟,马爱敏,王兴林,等. 短波紫外线照射后大鼠皮肤羟脯氨酸含量的变化[J]. 中国康复理论与实践,2003,9(11):662.

[9] Tomasek J J, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(5):349.

[10] 初同伟,王正国,朱佩芳. 血管内皮细胞生长因子的作用及调节[J]. 第三军医大学学报,2000,22(7):705.

[11] Dvorak H K. Angiogenesis:update 2005[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(8):1835.

[责任编辑 聂淑琴]