

三七总皂苷调节 PDGF-BB/PDGFR- β 的表达 促进大鼠浅表 II° 烧伤创面愈合

张莉¹⁾, 杨建宇²⁾, 杨艳¹⁾, 杨仁华¹⁾, 沈志强¹⁾, 柴文英³⁾, 陈鹏¹⁾

(1)昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室; 2)基础医学院, 昆明 云南 650500;
3)昆明医科大学第一附属医院乳腺外科, 昆明 云南 650031)

[摘要] 目的 观察三七总皂苷(PNS)对大鼠浅表 II° 烧伤创面的治疗作用及对 PDGF-BB/PDGFR- β 表达的影响, 探讨 PNS 治疗浅表 II° 烧伤的作用机制。方法 复制大鼠浅表 II° 烧伤模型, 模型复制成功的大鼠用 PNS 治疗, 分别于给药后第 0、7、14、21 天活体取材, 应用免疫组化(IHC), Western blot 和 RT-PCR 检测烧伤皮肤组织中 PDGF-BB/PDGFR- β 蛋白和 mRNA 的表达变化。此外, 在不同时间点宏观监测皮肤组织恢复情况。结果 HE 染色提示, 模型复制是成功的。宏观监测数据显示, 和模型组相比, PNS 高剂量组大鼠脱痂、长毛时间均见缩短, 创面愈合率提高($P < 0.05$)。免疫组化, WB 和 RT-PCR 结果显示, PNS 高剂量组的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达在第 7 天急剧增加, 至第 14 天持续维持在较高水平, 第 21 天接近正常组水平; 而模型组表达高峰出现在烧伤后第 21 天, PDGF-BB/PDGFR- β 表达升高是一个缓慢的过程。结论 PNS 能明显促进大鼠浅表 II° 烧伤模型皮肤创面的愈合, 其机制可能与其上调皮肤组织中的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达密切相关。

[关键词] 三七总皂苷; 大鼠; 浅表 II° 烧伤模型; 血小板源性生长因子/血小板源性生长因子受体

[中图分类号] R956.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2021)06-0007-09

PNS Promotes the Wound-healing of Superficial Second-degree Burn Rats by Regulating PDGF-BB/PDGFR- β Expression

ZHANG Li¹⁾, YANG Jian-yu²⁾, YANG Yan¹⁾, YANG Ren-hua¹⁾,
SHEN Zhi-qiang¹⁾, CHAI Wen-ying³⁾, CHEN Peng¹⁾

(1) School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products; 2) School of Basic Medical Science, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Dept. of Breast Surgery First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, PR China)

[Abstract] **Objective** To observe the therapeutic of PNS on wound healing and the expression of PDGF-BB, PDGFR- β in rats superficial second-degree burn model, and to explore the underlying mechanism of PNS on second-degree burn wound healing. **Methods** Rats with superficial second-degree burn were treated with PNS, applying HE staining to detect burn severity, and then biopsied biological tissue on days 0, 7, 14, 21 after administration, respectively. Moreover, Immunohistochemistry (IHC), Western blot and RT-PCR methods were used to detect protein and mRNA expression levels of PDGF-BB/PDGFR- β in skin tissues after treatment with PNS,

[收稿日期] 2021-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81860641); 昆明医科大学博士研究生创新基金(2021D05); 云南省基础研究计划重点项目(202001AS070035); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目[2017FE467(-025)]

[作者简介] 张莉(1984~), 女, 河南南阳人, 在读博士研究生, 主要从事天然药物药理学研究工作。

[通信作者] 柴文英, E-mail: wenyinchai74@126.com; 陈鹏, E-mail: ynkmcpg@gmail.com

respectively. Furthermore, the skin wound healing at different time points was monitored by macroscopic observation. **Results** HE staining suggested that the replication of rats second-degree burn model was successful. Macro monitoring data demonstrates that compared with model group, the removal time of scab and fur-growing were shortened, and the wound healing rate was increased in the PNS high-dose group ($P < 0.05$). Combination of IHC, WB and RT-PCR showed that the expression levels of PDGF-BB/PDGFR- β increased sharply on day 7, maintaining a high level until day 14, approaching normal levels on day 21 after PNS treatment. However, the protein and mRNA expressions of PDGF-BB/PDGFR- β showed high values on day 21 in the model group, which was a slow process. Our results suggest that compared with model group, the peak expression of PDGF-BB/PDGFR- β are earlier, shortening of fur-growing and decrustation time, and improvement of wound healing rate in rats superficial second-degree burn model. **Conclusion** PNS can significantly promote skin wound healing in rats superficial second-degree burn model, and its mechanism is closely related to the up-regulation of the expression levels of PDGF-BB/PDGFR- β in skin tissue.

[**Key words**] PNS; Rats; Superficial second-degree burn model; PDGF-BB/PDGFR- β

人体最大、最易损伤的组织器官是皮肤，烧(烫)伤后常因不恰当治疗使伤创面过度或延迟修复，造成患者较高的致残率。因此，如何对烧(烫)伤创面进行及时有效护理和救治是所有伤科医生的难题。现代烧伤医学对烧烫伤的治疗，局部外用抗菌药物主要是抗生素及银盐等化学药物覆盖创面，以达到保护残存上皮岛、促进烧伤创面愈合的目的，但近年来细菌耐药等问题的凸显使化学药物在烧(烫)伤的救治中孤掌难鸣^[1]。另外，多项研究发现，中药及复方制剂治疗机制多样，作用靶点多，可弥补化学药物的缺点与不足，但对于大多中药的有效性及安全性的研究需要进一步深入。因此在中医药领域进行合理有效的探索成为当前烧(烫)伤创面研究的热点之一。因此，无论从基础研究还是从临床应用角度，寻找疗效肯定、不良反应较少的干预治疗烧烫伤的局部外用药物是十分必要和迫切的。

中药三七，是云南省的优势药材资源之一，为五加科植物(*Panax Notoginseng* Burk F. H.Chen)的干燥根及根茎，传统治疗特应性化脓性皮炎、外伤等创伤的传统中草药，有着悠久的民族药理历史^[2]。三七总皂苷(*panax notoginseng saponins*, PNS)是从中药三七中提取的有效成分，具有较强的抗炎、抗氧化、止血及消肿的作用^[3-4]，而临床治疗烧烫伤创面的策略主要是抗炎、止血消肿，同时防止创面感染，促进创面愈合，故推测 PNS 可能适用于烧烫伤的研究。临床上通常采用Ⅲ度四分法判断烧伤创面深度。浅表Ⅱ°烧伤是临床上常见的急性皮肤损伤，其特点是皮肤表皮层和真皮浅层均遭损伤，组织细胞可见肿胀变性，部分坏死，创面基底苍白，其间可见部分毛细血管

丛充血而导致的散在红^[5]。作为一种急性皮肤损伤，创面愈合过程主要包括 3 个阶段：炎症期、增殖修复期、再塑型期。各个阶段相互交叉、重叠，并涉及多种炎症细胞、生长因子和细胞外基质等成分的共同参与，其中，包括血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)等烧伤相关的生长因子^[6]。PDGF 家族有两个主要成员：PDGF 和 VEGF，它们有相似的结构，但结合不同的受体，如受体 β 识别 PDGF-BB，介导成纤维细胞的趋向性^[3,7]。在炎症早期，炎症反应能促使 PDGF 和 FGF-2 等生长因子的合成和分泌并参与对创面愈合过程的调控^[3]。在增殖修复期，成纤维细胞、血管内皮细胞和表皮角质形成细胞等分泌大量的 PDGF，VEGF 等细胞因子，这些细胞因子对创面组织的再上皮化、肉芽组织的增生等促进创面皮肤修复及瘢痕形成等方面具有极其重要的作用^[4]。已有研究证明：PDGF 及受体基因表达与创面修复存在密切关系，而且作为正因子参与创面修复过程，促进瘢痕的形成、改变伤口愈合的进度，并控制纤维化形成^[8]。

近年来，本课题组一直致力于烧(烫)伤方面的研究，前期研究结果显示：石榴皮复方制剂提高小鼠颈背部皮肤Ⅱ~Ⅲ度烧(烫)伤的创面愈合率，缩短小鼠的脱痂和长毛时间，而石榴皮复方制剂含 30% 的 PNS^[9-10]。本研究应用大鼠浅表Ⅱ°烧伤模型，观察 PNS 对烧伤创面愈合的促进作用，分析 PNS 对烧伤组织中 PDGF-BB/PDGFR- β 表达的影响，探讨其分子生物学机制，为 PNS 在烧(烫)伤治疗中的临床应用提供了进一步的研究依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

三七总皂苷活性提取物由昆明制药厂提供, 纯度 > 95%, 批号: (115704-200618); 京万红软膏(天津达仁堂京万红药业有限公司)国药准字 Z20023137, 批号: 215056; Anti-PDGF-BB antibody (CST, 批号: ab23914); Anti-PDGFR- β antibody (Abcam 公司, 批号: ab5443); 辣根酶标

记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZB2301); 底物增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒(TIANGEN 公司, 批号: PA110); BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天公司, 批号: P1511); ECL 发光试剂(millipore 公司, 批号: WBKLSO100); 动物组织总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司, 版本号: RP120227); Revert Aid First SndcNDASynthesis Kit(Thermo Fisher 公司, 批号 K1622); qPCR MasterMix(Vazyme 公司, 批号: Q311-01/02/03); 引物设计软件 Primer 5.0, 由硕擎科技有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	扩增长度/bp
PDGF-BB	(Forward)CATCGAGCCAAGACACCTCA (Reverse)AGTGCCTTCTTGTCATGGGT	110
PDGFR- β	(Forward)CAAGCCCTCATGTCGGAGTT (Reverse)TGTTTCGGTGCAGGTAGTCC	154
β -actin	(Forward)AGGCCAACCGTGAAAAGATG (Reverse)ATGCCAGTGGTACGACCAGA	115

1.2 动物

健康成年雄性 SD 大鼠 144 只, 体重 250~320 g, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(滇)2015-0002。本实验经昆明医科大学伦理委员会批准(KM16/17), 实验动物符合中国伦理委员会指导原则, 大鼠饲养于昆明医科大学实验动物中心。

1.3 仪器

Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪(TAKARA); Leica DM4000B 高级显微镜; Amersham Imager 600 化学发光成像系统; BIO-RAD 电泳系统; 立式温控型超声波细胞破碎仪(中国北京); 莱卡石蜡切片机; 电动玻璃匀浆机(中国宁波)。

1.4 方法

1.4.1 PNS 制剂的配制 高剂量组称量 PNS 活性提取物 80 g, 羧甲基纤维素钠 5 g, 二者均匀混合后, 缓慢加入 PBS 溶液(PH 值 7.35-7.55), 用玻璃棒均匀搅拌后倒入容量瓶, 定容到 100 mL, 制成膏状制剂, 冰箱冷藏备用。中剂量组、低剂量组取高剂量组依次对半稀释。

1.4.2 浅表 II° 烧伤模型的复制, 给药及取材

(1)分组 144 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组, 病理模型组, 三七总皂苷低剂量组(2 g/kg)、中剂量组(4 g/kg)、高剂量组(8 g/kg)和京万红阳性对照组(20 g/kg), 24 只/组。

造模: 烧伤前饲养大鼠 1 周, 于实验前 24 h 在

大鼠的脊柱两侧, 左右对称, 用 15% 的 Na₂S 脱毛, 面积为 2 cm × 4 cm。实验当日, 通过腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠(0.1 mL/100 g)麻醉。除正常组动物外, 其余各组动物麻醉后将大鼠固定在实验台上, 用自制烧伤石棉网烧伤模具固定烧伤区域, 然后将混合烧伤燃料(配方: 普通汽油 25 mL, 95% 酒精 60 g, 松香 60 g, 生胶 6 g)均匀涂抹在预烧伤皮肤上, 每只大鼠约 0.6 mL, 点火后燃烧 15 s 后以湿布将火焰迅速扑灭, 复制大鼠浅表 II° 烧伤模型。浅表 II° 烧伤组织病理学切片的特点是: 皮肤表皮层和真皮浅层均遭损伤, 真皮浅层部分细胞可见肿胀变性, 组织细胞部分坏死。

给药和取材: 烧伤后 2 h 内分组给药, 病理模型组涂抹 5% 的羧甲基纤维素钠空白基质, PNS 组分别给创面涂搽低、中、高剂量的 PNS 制剂, 阳性对照组涂搽京万红软膏。每天给药 1 次, 连续 28 d, 同时分别于 0, 7, 14, 21 d 的同一时间点, 对烧伤创面行皮肤取样。

1.4.3 HE 染色 皮肤组织常规脱水包埋, 制备 4 μ m 的切片, 经苏木精-伊红染色后于显微镜下观察皮肤组织的病理变化, 每组随机观察 3 例大鼠, 每张切片随机选 5 个高倍视野。

1.4.4 免疫组化法 创面组织活体取材后, 用福尔马林常规固定, 石蜡包埋及切片。抗原修复后, 滴加 Anti-PDGF-BB antibody(1 : 500), Anti-PDGFR- β antibody(1 : 500), 放入湿盒 4 °C 孵育

过夜；分别滴加辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1:300), (1:500); DAB 显色；复染—脱水—透明—中性树胶封片，用 IPP6.0 软件进行分析处理。

1.4.5 Western blot 检测蛋白表达 每例大鼠 500 mg 取样后直接放入 -80 °C 冰箱保存，检测 PDGF-BB, PDGFR- β 蛋白的表达。超声破碎细胞提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。PDGF-BB, PDGFR- β 分别配制 10% 和 8% 的分离胶，转膜后加入 Anti-PDGFR- β antibody(1:1500), Anti-PDGFR- β antibody(1:1500) 过夜，次日洗膜后加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1:2000)。孵育 1 h 后 ECL 发光 3 mins，用 Amersham Imager600 系统采集图像。实验重复 3 次，采用 ImageJ 软件将测得的各组灰度值与对应的内参值比较得出蛋白相对表达量。

1.4.6 RT-PCR 法检测 mRNA 表达 取样后，将 20 mg 皮肤组织立即浸入 RNA 保护液中，4 ~ 8 °C 冰箱中保存 24 h 后转入 -80 °C 冰箱保存，检测 PDGF-BB/PDGFR- β 的 mRNA 的表达，严格按照说明书操作，抽提总 RNA。cDNA 的合成：用 Thermo 的反转录试剂盒，配制总体积 20 μ L 转录的反应体系合成 cDNA，保存于 -80 °C。测定抽提总 RNA 的浓度和质量。实时定量 PCR 检测：配制总体积 20 μ L，配反应体系，用实时荧光定量 PCR 仪进行反应，反应条件：预变性 95 °C，30 s，变性 95 °C，10 s，退火、延伸 60 °C，30 s，40 个循环，每个样品重复检测 3 次。根据公式计算，每个样本的相对 mRNA 表达水平 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ， $\Delta Ct = \text{目的基因 Ct 值} - \beta\text{-actin Ct 值}$ ，并将获得的数据进行统计。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 16.0 进行统计学分析，计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用独立样本 *t* 检验。采用 Graphpad Prism 8.0 对统计结果作柱状图， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

HE 染色显示，空白对照组动物皮肤组织结构层次清楚，基底层细胞呈立方形，排列整齐。皮肤的表皮层和真皮层完整，皮肤附属器健全，未见充血、水肿；模型组大鼠皮肤组织表皮层和真皮浅层均遭损伤，真皮浅层毛细血管扩张充血，明显水肿，大量炎性细胞渗出病理切片证实浅表 II° 烧伤模型复制成功，见图 1。

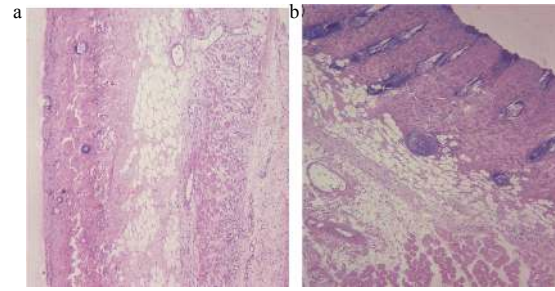


图 1 大鼠浅表 II° 烧伤后皮肤的组织学变化(HE, 100 \times)
Fig.1 The histological changes after superficial second-degree burn injury in rats (HE, 100 \times)

a: 大鼠正常皮肤组织; b: 大鼠浅表 II° 烧伤的皮肤组织。

2.2 浅表 II° 烧伤模型的大体观察

宏观观察大鼠浅表 II° 烧伤模型创面基底较苍白，其间可见部分毛细血管丛充血而导致的散在红点，烧伤区边缘整齐，呈现典型的浅表 II° 烧伤临床表现，见图 2。

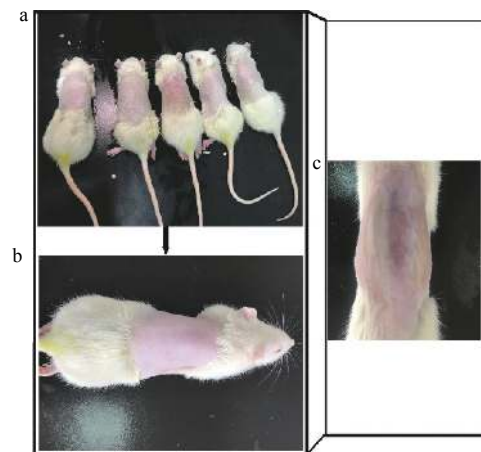


图 2 浅表 II° 大鼠烧伤模型的大体观察

Fig.2 Macroscopic appearance of rats superficial second-degree burn model

a: 麻醉的大鼠; b: 浅表 II° 烧伤的位置在脊柱两侧，左右对称; c: 浅表 II° 烧伤创面。

2.3 PNS 促进烧伤创面的愈合

2.3.1 愈合率统计 模型组分别与京万红组和三七总皂苷组相比，京万红组和三七总皂苷高剂量组大鼠创面愈合率明显提高，创面愈合时间亦见明显缩短，均呈现统计学差异显著性 ($P < 0.05$)。三七总皂苷高剂量组与京万红组的愈合率相近，($P > 0.05$)，见表 2。

2.3.2 脱痂、长毛时间的统计分析 模型组分别与京万红组和 PNS 组相比，京万红组和 PNS 高剂量组大鼠的脱痂和长毛时间均见缩短，均呈现统计学差异显著性 ($P < 0.05$)。PNS 高剂量组与京万红组比，2 组未见统计学差异 ($P > 0.05$)，见表 3。

表 2 不同时间点各组别间愈合率比较 $[(\bar{x} \pm s), \%, (n = 6)]$ Tab. 2 Comparison of cure rates among groups at different time points $[(\bar{x} \pm s), \%, (n = 6)]$

组别	7 d	14 d	21 d	31 d
模型组	7.56 \pm 23.12	56.00 \pm 23.12	65.00 \pm 4.01	96.00 \pm 4.01
京万红组	11.01 \pm 26.40	66.10 \pm 13.00**	86.10 \pm 0.90**	99.60 \pm 0.90**
PNS低剂量组	6.80 \pm 22.13	58.10 \pm 12.14	66.12 \pm 1.02	86.12 \pm 1.02
PNS中剂量组	7.80 \pm 23.12	60.15 \pm 14.23*	77.00 \pm 0.81*	90.00 \pm 0.81*
PNS高剂量组	8.26 \pm 25.12	65.42 \pm 13.22**	87.99 \pm 0.52**	99.99 \pm 0.52**

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 3 不同组间脱痂和长毛时间差异比较 $[(\bar{x} \pm s), d]$ Tab. 3 Comparison of the differences of decrustation and fur-growing time between different groups $[(\bar{x} \pm s), d]$

组别	<i>n</i>	脱痂时间	长毛时间
模型组	24	22.60 \pm 1.21	30.01 \pm 2.80
京万红组	24	17.12 \pm 1.30**	22.10 \pm 2.30**
PNS低剂量组	24	19.85 \pm 1.02	29.01 \pm 3.51
PNS中剂量组	24	18.42 \pm 1.25*	24.62 \pm 1.52*
PNS高剂量组	24	17.31 \pm 1.01**	22.54 \pm 1.50**

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 免疫组化检测 PDGF-BB/PDGFR- β 蛋白表达

免疫组化结果显示, 烧伤实验当天, 各实验组均可见少量 PDGF-BB/PDGFR- β 染色阳性, 见图 3A, 各实验组间相比, 未见显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 3B。烧伤第 7 天, 与空白对照组相比, 各实验组烧伤后表皮层和真皮浅层组织均出现较多的阳性棕黄色染色, 说明 PDGF-BB/PDGFR- β 阳性染色是烧伤刺激后诱导的。此外, 三七总皂苷高剂量组和京万红组的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白表达明显增加, 均高于病理模型组 ($P < 0.001$, $P < 0.001$), 达到峰值; 三七总皂苷高剂量组和京万红组相比, 组间无显著性差异, ($P > 0.05$)。PNS 组间相比, 蛋白表达呈剂量依赖性增加, 且三七总皂苷高剂量组增加明显, 见图 3C。第 14 天, 病理模型组与空白对照组相比, PDGF-BB/PDGFR- β 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$), 三七总皂苷高剂量组和京万红组的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白表达有下降趋势, 但仍维持在较高水平, 2 组间差异无显著性 ($P > 0.05$), 见图 3D。第 21 天, 模型组的 PDGF-BB/PDGFR- β 蛋白表达显著增加, 达到高峰; 三七总皂苷高剂量组和京万红组的 PDGF-BB/PDGFR- β 蛋白表达继续下降, 组间相比未见显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 3E。

2.5 WB 和 RT-PCR 检测 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达

Western blot 和 RT-PCR 结果显示, 烧伤实验当天, 各实验组均有少量 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达, 各实验组间相比, 均无显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 4A, 图 5A。烧伤后第 7 天, 三七总皂苷高剂量组和京万红组大鼠皮肤组织中 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达急剧增加, 达到峰值, 显著高于病理模型组 ($P < 0.001$, $P < 0.001$); 三七总皂苷高剂量组和京万红组组间相比, 未见显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 4B, 图 5B。第 14 天, 和空白对照组相比, 模型组的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达继续增加 ($P < 0.001$, $P < 0.001$); 而三七总皂苷高剂量组和京万红组的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 表达呈下降趋势, 但仍维持在较高水平, 三七总皂苷高剂量组和京万红组组间相比无显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 4C, 图 5C。烧伤后第 21 天, 模型组的 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和 mRNA 达到峰值; 三七总皂苷高剂量组和京万红组蛋白和 mRNA 的阳性表达继续下降, 接近正常组水平 ($P > 0.05$, $P > 0.05$), 而三七总皂苷高剂量组和京万红组间相比无显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 4D, 图 5D。WB 和 RT-PCR 提示, PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白及 mRNA 的变化的表达趋势在同一时间

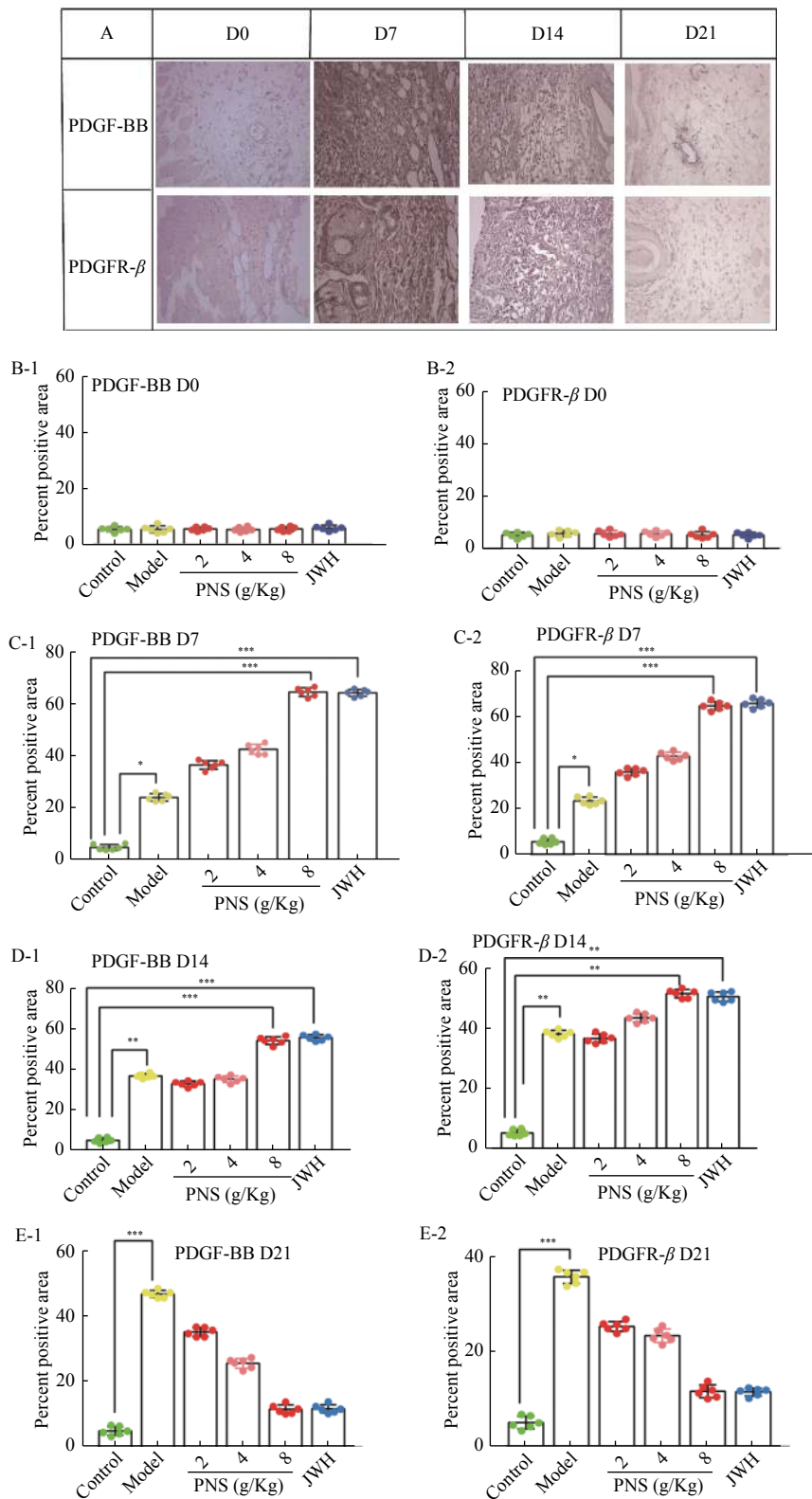


图 3 免疫组化检测烧伤创面中 PDGF-BB/PDGFR-β 蛋白表达的变化 (IHC × 400)

Fig. 3 IHC assay showing the changes of PDGF-BB/PDGFR-β expression in burn wounds tissue (IHC × 400)

A: PNS 高剂量组 PDGF-BB/PDGFR-β 蛋白表达情况; B, C, D, E: 其余各实验组皮肤组 PDGF-BB/PDGFR-β 阳性面积百分比的统计分析。用 IPP6.0 软件对图片进行分析处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 6$; 与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。空白对照组 (Control), 病理模型组 (Model), 三七总皂苷低剂量组 (2 g/kg), 中剂量组 (4 g/kg), 高剂量组 (8 g/kg) 和京万红阳性对照组 (JWH)。

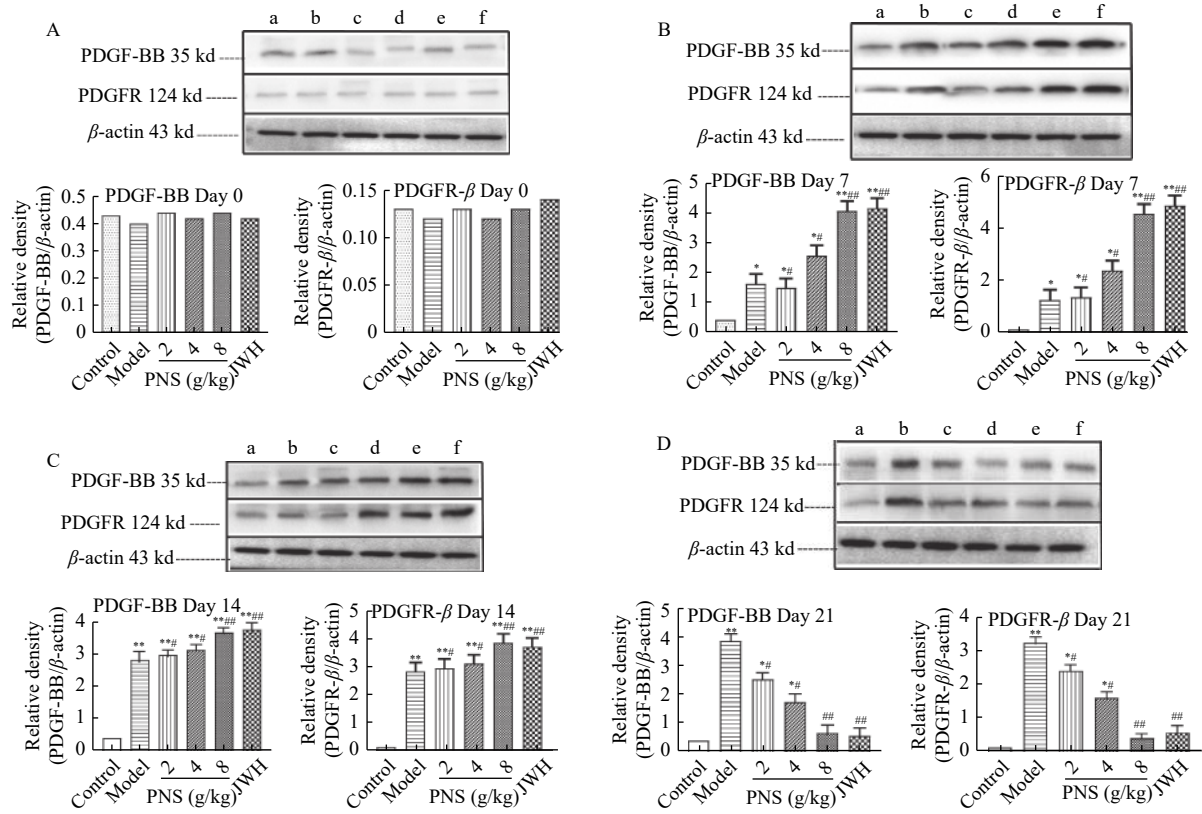


图 4 WB 检测大鼠浅表 II° 烧伤皮肤创面愈合 PDGF-BB/PDGFR-β 的蛋白表达变化

Fig. 4 WB assays showing the changes on expression of PDGF-BB/PDGFR-β in superficial second-degree burn wound healing

A, B, C, D 分别代表烧伤实验第 0, 7, 14, 21 天时皮肤组织中 PDGF-BB/PDGFR-β 蛋白表达变化。用 ImageJ 1.4.3.67 对蛋白条带进行统计分析, β-actin 是内参。与空白对照组相比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较 # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, (x̄ ± s, n = 6)。a. 空白对照组; b. 病理模型组; c. 三七总皂苷低剂量组 (2 g/kg); d. 三七总皂苷中剂量组 (4 g/kg); e. 三七总皂苷高剂量组 (8 g/kg); f. 京万红阳性对照组。

点是一致的。

3 讨论

在过去的 20 a 中, 已经开发了许多烧伤动物模型来阐明烧伤的病理生理学进展, 但鉴于各种烧伤模型的制约性和局限性, 烧伤模型的病理变化和临床实际烧伤的患者病程进展差别较大^[11]。经过多次实验探索, HE 染色显示, 笔者用明火烧伤建立大鼠浅表 II° 烧伤模型是成功的, 此模型病理变化过程更接近于临床实际浅表 II° 烧伤患者的病程进展。为了阐明我们的治疗方案对烧伤愈合过程的有效性, 在不同时间点 (0, 7, 14, 21 d) 检测了烧伤创面愈合标志物血小板源性生长因子 (PDGF-BB) 及其受体 (PDGFR-β) 的蛋白和基因表达水平的变化。

首先, 应用免疫组化检测在 PDGF-BB/PDGFR-β 在用药组和模型组的表达情况。烧伤第 7 天, 与空白对照组相比, 各实验组烧伤后表皮层和真

皮浅层组织均出现较多的阳性棕黄色染色, 说明 PDGF-BB/PDGFR-β 阳性染色是烧伤刺激后诱导的。经 PNS 干预后, PDGF-BB/PDGFR-β 的棕黄色阳性表达在第 14 天时仍然维持在较高水平, 到第 21 天时, PDGF-BB/PDGFR-β 的阳性表达明显下降, 甚至接近正常组水平。免疫组化结果提示, 和病理模型组相比, PNS 高剂量组 PDGF-BB/PDGFR-β 蛋白的阳性高密度表达提前, 这些结果清楚地证明了 PNS 的抗炎作用, 并证实了以前关于三七的根茎传统应用于外伤^[2], 感染以及皮肤炎症治疗的根据^[12-13]。其次, 笔者用 WB 和 RT-PCR 检测创伤愈合各阶段 PDGF-BB/PDGFR-β 的蛋白和 mRNA 表达变化。结果表明, 用药组烧伤大鼠皮肤中的 PDGF-BB/PDGFR-β 的蛋白和 mRNA 表达在烧伤后第 7 天急剧升高, 到第 14 天开始下降, 到第 21 天时接近正常组水平。而模型组的 PDGF-BB/PDGFR-β 的蛋白和 mRNA 强阳性表达出现在烧伤后第 21 天, 提示模型组的 PDGF-BB/PDGFR-β 的蛋白和 mRNA 表达上

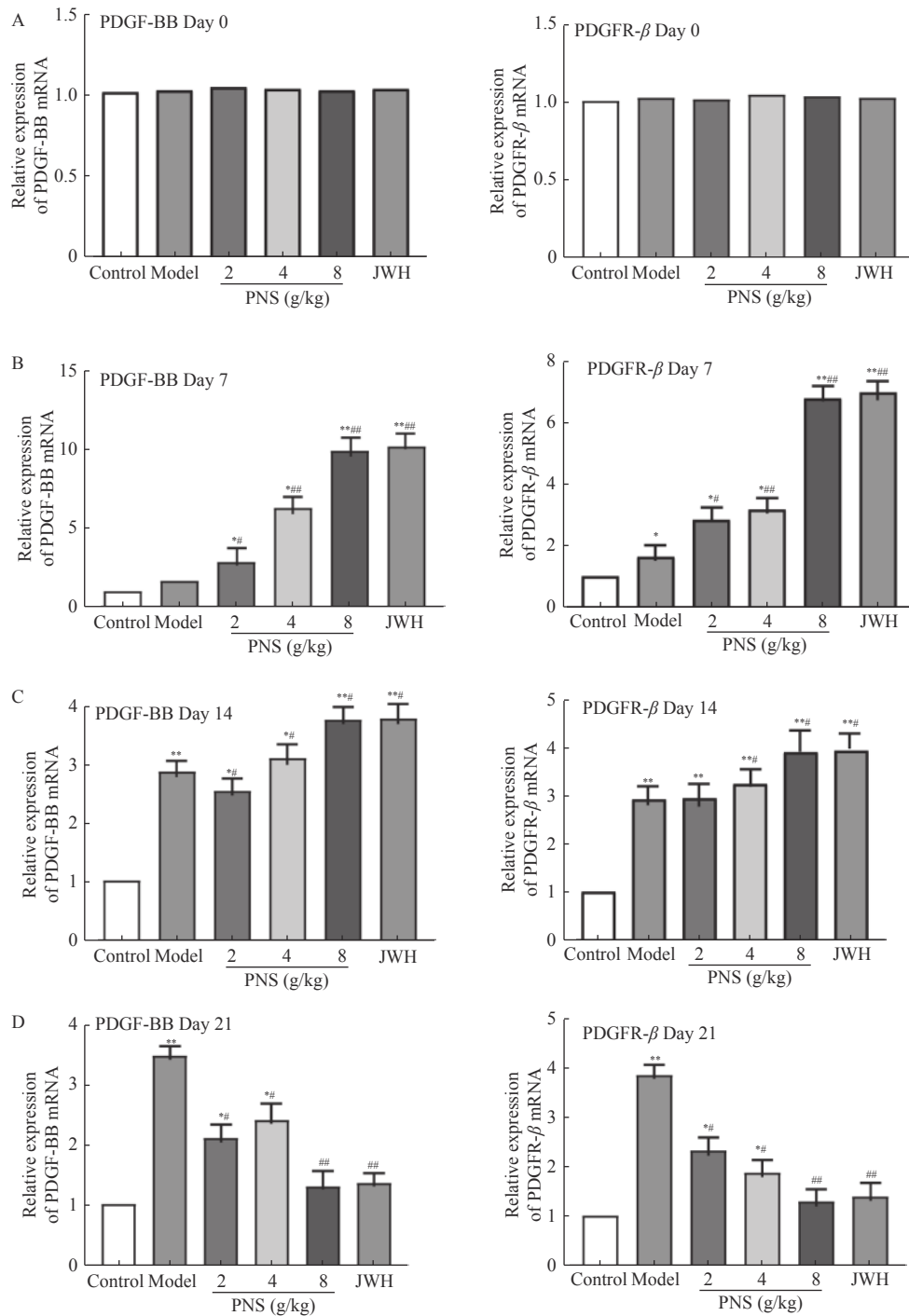


图 5 RT-PCR 检测大鼠浅表 II° 烧伤皮肤创面愈合中 PDGF-BB/PDGFR-β 的 mRNA 表达变化

Fig. 5 RT-PCR assays showing the changes on mRNA expression of PDGF-BB/PDGFR-β in superficial second-degree burn wound healing

(A, B, C, D) 分别代表烧伤实验第 0, 7, 14, 21 天时皮肤组织中 PDGF-BB/PDGFR-β mRNA 的表达变化。与空白对照组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)。

升是一个缓慢的过程。实验数据表明, 通过 PNS 的干预, 大鼠皮肤组织中 PDGF-BB/PDGFR-β 的蛋白和 mRNA 表达高峰提前, 这一作用可能与用药组促进创面愈合及缩短创面愈合时间有关。此外, 笔者的分子生物学检测数据与前人的研究结果是一致的, 急性创伤可诱导受伤部位上皮组

织细胞中编码活性生长因子及其受体的基因表达^[14-15]。创面愈合中, 这些基因的表达又受到抑制, 生长因子基因的表达和抑制反映了调节组织再生与重建分子生物学机制的存在^[1, 16]。根据不同时间点 PNS 对大鼠浅表 II° 烧伤模型皮肤组织 PDGF-BB/PDGFR-β 变化的影响, 可推测 PNS

对烧伤创面的治疗作用可能是通过上调 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白和基因表达, 而促进创面提前愈合。

本研究动态监测了大鼠浅表 II° 烧伤模型中, 创面愈合标志物 PDGF-BB/PDGFR- β 的蛋白及 mRNA 的表达变化, 同时宏观监测大鼠创面的恢复情况, 宏观和分子生物学能相互佐证能直观反映烧伤的病程进展以及 PNS 对烧伤的治疗作用。研究结果提示: 和模型组相比, PNS 干预治疗后, 创面愈合标志物的蛋白和基因表达高峰提前。PNS 表现出较强的抗炎作用, 且在各时间点均有加速创面愈合的作用, 在整个实验过程中未见不良反应。综上所述, PNS 能明显促进大鼠浅表 II° 烧伤模型皮肤创面愈合, 其机制与上调皮肤组织中的 PDGF-BB/PDGFR- β 的表达水平密切相关。

[参考文献]

- [1] Matthew P Rowan, Leopoldo C Cancio, Eric A Elster, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements[J]. *Crit Care*, 2015, 6(19): 243-251.
- [2] Xu Y, Tan H Y, Li S, et al. Panax notoginseng for inflammation-related chronic diseases: A review on the modulations of multiple pathways[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2018, 46(5): 1-26.
- [3] Li Qing-rong, WANG Zi yu. Progress in pharmacological action of panax notoginseng saponins[J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 33(9): 216-218.
- [4] Wang Ting, Guo Ri-xin, Zhou Guo-hong, et al. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Panaxnotoginseng*(Burk.)F. H. Chen: A review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 88(1): 234-258.
- [5] Yang Zong-cheng. Chinese Burn Surgery [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 345-380.
- [6] Reinke J M, Sorg H. Wound repair and regeneration[J]. *Eur Surg Res*, 2012, 49(1): 35-43.
- [7] Giri P, Ebert S, Braumann U. Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping, or topical application of recombinant human erythropoietin gel[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9(3): 2565-2579.
- [8] Fu Ying-ping, Sun Qian-hong, Yang Jan-yu, et al. An experimental research on the treatment of burn rats with PPE compound preparation[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2010, 2(6): 11-15.
- [9] Teng Jia, Guo Hui Yang Jan-yu, et al. Experimental research on the treatment of cautery injury in mice by compound preparation[J]. *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 30(7): 57-58.
- [10] Andrade A L M, Brassolatti P, Luna G F, et al. Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(5): 673-683.
- [11] Luo G X. Mechanism and prevention of organ complications post burn injury[J]. *Zhong hua Shao Shang Za Zhi*, 2019, 35(8): 565-567.
- [12] Xu C, Wang W, Wang B, et al. Analytical methods and biological activities of Panax notoginseng saponins: Recent trends[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 23(236): 443-465.
- [13] Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, et al. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2006, 148(6): 860-70.
- [14] Bayir Y, Un H, Ugan R A, et al. The effects of Beeswax, Olive oil and Butter impregnated bandage on burn wound healing[J]. *Burns*, 2019, 45(6): 1410-1417.
- [15] Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing[J]. *Forensic Sci Int*, 2010, 203(3): 93-98.
- [16] Martin P. Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 75-81.