

朱氏脱疽方对大鼠糖尿病性溃疡创面炎症因子和细菌感染的影响

于天一^{1,2}, 杨春雨^{1,2}, 梁学威^{1,3}, 乔文琪^{1,2}, 赵 钢^{1,3}

摘要 目的:观察朱氏脱疽方外敷治疗对大鼠糖尿病性溃疡面积、创面炎症因子和细菌感染水平的影响。**方法:**将 80 只 10 周龄 Wistar 大鼠随机分成 20 只和 60 只,其中 20 只为空白组,其余 60 只制备糖尿病性溃疡模型,随机分为模型组、对照组、实验组,每组各 20 只。实验组局部清创,表皮生长因子凝胶外用联合朱氏脱疽方油剂外敷,无菌纱布包扎;对照组局部清创,表皮生长因子凝胶外用,无菌油纱外敷,无菌纱布包扎;模型组局部清创,无菌油纱外敷,无菌纱布包扎;空白组不予处置。治疗第 16 天,测量并比较各组的溃疡面积、创面菌落浓度,以及创面炎症因子水平。**结果:**治疗第 16 天,与模型组相比,对照组和实验组的溃疡面积均缩小、白细胞介素(IL)-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平均降低,IL-10 和 IL-12 水平均升高,创面菌落浓度降低。实验组改善程度均优于对照组($P<0.05$)。**结论:**朱氏脱疽方油剂联合表皮生长因子外敷应用于糖尿病性溃疡大鼠,能够改善大鼠的创面面积,降低促炎因子水平,升高抑炎因子水平,降低创面菌落数,效果优于单纯应用表皮生长因子,其作用机制可能与组方中的有效成分对炎症因子的调节和对致病微生物的直接杀灭作用有关。

关键词:糖尿病;溃疡;脱疽;细菌感染;炎症因子

中图分类号:R654.4;R285.6 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1007-6948.2026.01.022

Effect of Zhushi Tuoju recipe on inflammatory factors and bacterial infection of diabetes ulcer wound in rats YU Tian-yi, YANG Chun-yu, LIANG Xue-wei, et al. *Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin (150040), China.*

Abstract: Objective To observe the effect of Zhushi Tuoju recipe on diabetes ulcer in rats, and compare the changes of inflammatory factors and bacterial infection levels of the wound before and after treatment. **Methods** A total of eighty 10 weeks old Wistar rats were randomly assigned to two groups: a blank control group ($n=20$) and a model preparation group ($n=60$). The model preparation group then underwent induction of diabetic ulcer. Subsequently, the successfully modeled rats were randomly divided into three groups ($n=20$ per group): model group, control group, and treatment group. In the treatment group, local debridement, external application of epidermal growth factor gel, external application of Zhushi Tuoju recipe oil, and dressing with sterile gauze; In the control group, local debridement, external application of epidermal growth factor gel, external application of sterile gauze, and dressing with sterile gauze; Local debridement of the model group, application of sterile oil gauze, and bandaging with sterile gauze; the blank group will not be treated. On the 16th day of treatment, measure and compare the ulcer area, wound colony concentration, and inflammatory factor levels of each group. **Results** Compared with the control group after treatment, the treatment group showed a reduction in ulcer area, a decrease in IL-6 levels and TNF- α levels, an increase in IL-10 levels and IL-12 levels, and a decrease in wound bacterial count levels. The improvement degrees of treatment group were better than that of the control group, and there were a statistical difference ($P<0.05$).

Conclusion It is preliminarily proved that the external application of Zhushi Tuoju recipe oil can improve the wound area of rats before and after treatment, reduce the level of proinflammatory factors, increase the level of anti-inflammatory factors, and

基金项目:黑龙江省中医药科研项目(ZHY2023-118);哈尔滨市科技局科技计划自筹经费项目(2023CZJNS088)

- 1.黑龙江中医药大学(哈尔滨 150040)
- 2.黑龙江中医药大学附属第三医院(哈尔滨 150030)
- 3.黑龙江中医药大学附属第一医院(哈尔滨 150040)

通信作者:赵 钢, E-mail: zhaogang1120@126.com

reduce the bacterial count. Its therapeutic effect may be related to the effective ingredients in the formula, the regulation of inflammatory factors, and the direct killing of pathogenic microorganisms.

Key words: Diabetes; ulcer; gangrene; bacterial infection; inflammatory factor

根据 Whiting 等^[1]做的前瞻性研究,预计到 2030 年,全世界糖尿病患者人数将达 5.52 亿例。受气候、饮食因素影响,该病在我国北方省份尤为高发。据统计,糖尿病患者一生中约有 15%~25% 的概率发生糖尿病性溃疡,一旦发生,创面迁延不愈,经有效干预后,5 年复发率仍高达 50%~70%,糖尿病患者因糖尿病性溃疡所导致的截肢率是普通人群的 15 倍以上^[2-3]。由于糖尿病性溃疡严重的后果,对于该病的研究一直是国内外医学界的热点、重点和难点问题。道光年间名医朱费元尤善治疡,著有《临证一得方》四卷,系清代重要医学典籍,内有《脱疽论》一篇,载有脱疽方用治该病,据记载疗效颇佳^[4]。黑龙江中医药大学附属第一医院周围血管病科赵钢教授在对医籍进行梳理研究后,认为朱氏脱疽方构思严整,方证对应巧妙,以清热、活血、敛疮为主要功效。黑龙江省处于北方地区,气候寒冷且地势较高,常见寒气凝聚、郁而化火所致的湿热毒盛型脱疽,此型病证在理法方药上与朱氏脱疽方相契合,因而在该地区能够适用广泛,且该方具有药材常见、价格低廉、安全性高的特点,遂于 2018 年开始应用该方。考虑到水煎剂长时间外敷对创面造成一定的侵蚀,而油剂具有较好的密封保护作用,故在应用过程中采用油剂。目前该方剂在临床上应用已收到可喜的疗效,其促进创面愈合、缩小溃疡面积的效果优于传统治疗方法,但其具体的作用机制尚未明确,因此本研究着眼于创面炎症因子和细菌水平,对朱氏脱疽方的作用机制进行研究。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 10 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 80 只,其中雄性、雌性各 40 只,雄性大鼠体质量 280~300 g,雌性大鼠体质量 170~260 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,许可证号:SYXK(川)2024-0028。本研究动物实验已通过黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会审批(审批号:2025050936)。

1.1.2 实验试剂 柠檬酸钠(02102900.5)、链脲佐菌素(MS0710)、戊巴比妥钠(MP0787)、高脂饲料(Research Diets_D12492)、对照饲料(Research Diets_D12450)均由北京博奥派克生物科技有限公

司提供;金黄色葡萄球菌菌株(MRSA USA300)由北京百欧博伟生物技术有限公司提供;黄芩、黄连、黄柏、金银花、白及、川芎、丹参、当归饮片(符合《中国药典》2020 版相关标准)由黑龙江中医药大学附属第一医院中药局提供;其他试剂均由哈尔滨玛缇娜生物科技有限公司提供。

1.1.3 实验仪器 酶标仪(Multiskan FC),洗板机(Wellwash)、离心机(Sorvall™ ST 8)由赛默飞世尔科技(中国)有限公司提供;微量加样器(Rainin)由梅特勒托利多国际有限公司提供;水浴锅(BKMAMLAB WB-1)由常德比克曼生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 分组方法 采用随机数字表法将 80 只大鼠随机分成 20 只和 60 只。其中 20 只为空白组,不建模;余 60 只构建糖尿病大鼠模型。建模成功后随机分为模型组、对照组、实验组,每组各 20 只。

1.2.2 建模方法 饲养室内通风良好,室温 20~23 ℃,相对湿度 55%~75%,自然昼夜交替照明,自主取食取水。建模组大鼠以高脂饲料(脂肪占 60.0%)饲养 6 周;非建模组大鼠用对照饲料(脂肪占 10.0%)饲养 6 周。糖尿病模型构建:禁食、禁水 12 h,使用 4 ℃柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH=4.5)稀释链脲佐菌素,35 mg/kg 腹腔注射 1 次。恢复自主取食取水,72 h 后,用血糖仪测量大鼠尾尖血糖,以随机血糖大于 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠成模标准。溃疡模型构建:继续饲养 4 周,使用 3%的戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉大鼠,用橡皮筋将大鼠以俯卧位固定于手术板上,背部备皮,在背部正中作直径 10 mm 的圆形标记,无菌条件下,用电动砂轮磨去标记处全层皮肤,创面深达筋膜,止血后充分暴露 48 h,即成糖尿病性溃疡模型。感染模型构建:创面部位皮下注射 1 mL 金黄色葡萄球菌菌株悬液(5×10^9 CFU/mL),以脱毛区出现脓性感染灶为成模标准。

1.2.3 朱氏脱疽方油剂制备方法 将以下 8 味中药(黄芩 30 g,黄连 30 g,黄柏 30 g,金银花 30 g,白及 20 g,川芎 20 g,丹参 20 g,当归 20 g)打粉后放入 1000 mL 麻油中密封浸泡,期间每 24 h 充分搅拌一次,使药物与麻油充分接触;72 h 后过滤药渣,取其油液,使用文火熬煮 60 min,期间不断搅拌,防止

底层药油焦糊;静置至室温后再次过滤去渣,装入无菌容器中密封保存;外用时提前取出药液,无菌条件下常温使用。

1.2.4 治疗方法 实验组:创面局部涂抹人表皮生长因子凝胶 1 g,使用无菌纱布外敷朱氏脱疽方油剂 5 mL,无菌油纱条外敷、无菌纱布包扎、塑料薄膜外包;对照组:创面局部涂抹人表皮生长因子凝胶 1 g,无菌油纱条外敷、无菌纱布包扎、塑料薄膜外包;模型组:无菌油纱条外敷、无菌纱布包扎、塑料薄膜外包;空白组:不建模,仅进行麻醉及背部备皮,用无菌油纱条外敷、无菌纱布包扎、塑料薄膜外包。所有大鼠换药后固定 3 h,防止撕咬包扎物,3 h 后不再干预,均敷药 1 次/d。

1.2.5 创面面积测定 治疗第 16 天,采用网格法测定大鼠创面面积。透明薄膜描记创面轮廓,将薄膜敷于标准面积网格上,统计覆盖网格总数,获得创面面积。

1.2.6 创面菌落测定 治疗第 16 天,采用稀释涂布平板法测定创面细菌数。用组织钳夹取创面中部组织,制备组织匀浆,无菌生理盐水漂洗,匀浆制备组织悬液,按 10^{-4} ~ 10^{-6} 梯度稀释,分别取 100 μ L 涂于血琼脂平板,40 $^{\circ}$ C 培养 48 h,统计菌落数并计算每克组织中的菌落浓度(CFU/g)=平均菌落数 \times 稀释倍数 \times 10。

1.2.7 创面组织炎症因子测定 治疗第 16 天,采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定各炎症因子水平。用组织钳夹取创面中部组织,制备组织匀浆,用离心机以转速 3000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用 ELISA 标准试剂盒,用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度,计算白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-10 和 IL-12 水平,严格按照试剂盒说明操作。

1.2.8 统计学方法 采用统计软件 SPSS 28.0 进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示,多组比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 创面面积 用药第 16 天,与模型组比较,对照组和实验组创面面积均缩小;与对照组比较,实验组创面面积更小,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 创面菌落数 用药第 16 天,与模型组比较,对照组和实验组创面组织培养菌落浓度均降低;与对照组比较,实验组菌落浓度更低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组大鼠溃疡面积及创面菌落浓度比较

组别	例数(n)	创面面积(cm ²)	菌落浓度(CFU/g)
空白组	20	0	0
模型组	20	0.45 \pm 0.10	9.05 \pm 2.95
对照组	20	0.29 \pm 0.08 ^a	6.55 \pm 2.01 ^a
实验组	20	0.21 \pm 0.09 ^{ab}	4.85 \pm 2.11 ^{ab}
F		34.57	15.59
P		<0.001	<0.001

注:^a与模型组比较, $P < 0.05$;^b与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 创面促炎因子水平 治疗第 16 天,与空白组比较,模型组、对照组、实验组的创面组织 IL-6、TNF- α 水平均升高;与对照组比较,实验组 IL-6、TNF- α 水平更低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.4 创面抑炎因子水平 治疗第 16 天,与空白组比较,模型组、对照组、实验组的创面组织 IL-10、IL-12 水平均升高;与对照组比较,实验组 IL-10、IL-12 水平更高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠溃疡创面炎症因子水平比较

组别	例数(n)	IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)	IL-10(ng/mL)	IL-12(ng/mL)
空白组	20	29.90 \pm 10.43	38.30 \pm 12.41	46.65 \pm 6.98	16.10 \pm 7.17
模型组	20	122.60 \pm 17.46 ^a	104.25 \pm 10.61 ^a	57.75 \pm 10.35	22.55 \pm 5.74
对照组	20	95.90 \pm 16.37 ^a	82.65 \pm 13.90 ^a	62.00 \pm 11.07 ^a	34.95 \pm 7.96 ^a
实验组	20	80.80 \pm 18.20 ^{ab}	61.35 \pm 9.57 ^{ab}	68.15 \pm 8.71 ^{ab}	40.30 \pm 8.65 ^{ab}
F		30.76	57.33	5.368	29.1
P		<0.001	<0.001	<0.01	<0.001

注:^a与空白组比较, $P < 0.05$;^b与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

在朱费元朱氏脱疽方的基础上,经赵钢教授加减化裁,现组方包括黄芩、黄连、黄柏、金银花、白及、川芎、丹参、当归共 8 味药物。该方黄柏以清热燥湿、解毒疗疮为主要功效,为君药;黄芩、黄连、金银花能清热、燥湿、解毒,辅助黄柏解毒联创,为臣药;白及善能敛疮,恢复创面,为佐药;川芎、丹参、当归活血化瘀,促进局部供血恢复,滋养筋肉,为佐药;全方以清热、敛疮、活血为主要功效,针对糖尿病性溃疡疾病的创面腐溃、血运不畅、经久不愈进行治疗。

本研究主要针对该方的清热之功进行研究,讨论其在调控炎症因子和抗常见致病微生物中的作用。糖尿病性溃疡创面局部由于缺血、高糖、创伤、感染的联合作用,以 IL-6、TNF- α 为代表的促炎因子水平升高,以 IL-10、IL-12 为代表的抑炎因子水平降低,在免疫反应过程中,促炎因子促进炎症过程,帮助机体清除坏死细胞和外来微生物,但由于感染导致的机体过度反应,可以引起促炎和抑炎二者关系的失衡,最终导致炎症风暴,大幅延长炎症持续时间,增加对正常组织的损害,延缓创面恢复,导致溃疡反复不愈。针对这一病理过程,理论上可从杀灭致病微生物和调节炎症因子两方面入手进行治疗,结合已有研究,朱氏脱疽方中黄芩、黄连、黄柏、金银花四种成分同时具有此两方面作用。周颖等^[9]研究指出,黄芩具有良好的抗炎效果,对多种炎症因子有调控作用;朱金华等^[6]研究发现,黄连能够通过核因子(NF)- κ B 通路动态调节炎症因子水平;王茜等^[7]将黄柏水溶液应用于大鼠,能影响大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平;李畅^[8]研究发现,金银花能够调节 TNF- α 、IL-1 β 水平,从而达到抑炎的目的;黄芩提取物具有较强的广谱抗菌和抑菌作用^[9-10];张庆莲等^[11]认为黄连对革兰阳性菌和革兰阴性菌均具有抗菌作用;李文裕等^[12]认为黄柏具有广谱抗菌作用;肖蕾等^[13]认为金银花的多个化学组成具有抗菌、抑菌作用。

本研究结果表明,治疗第 15 天,与单纯使用表皮生长因子的对照组对比,实验组采用朱氏脱疽方联合表皮生长因子可以更有效地缩小创面

面积,同时降低促炎因子水平,提高抑炎因子水平,抑制金黄色葡萄球菌计数。说明该方对比单纯应用现有常规治疗途径有更好的疗效,动态调节炎症因子和控制致病菌计数可能是该方的作用机制。

综上所述,朱氏脱疽方对糖尿病性溃疡具有一定的治疗作用,其机制可能与组方成分调节炎症因子水平、控制致病微生物计数,从而双向抑制炎症瀑布链反应,从而促进创面恢复有关。

参考文献:

- [1] Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94(3): 311-321.
- [2] Wrobel JS, Mayfield JA, Reiber GE. Geographic variation of lower-extremity major amputation in individuals with and without diabetes in the Medicare population[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(5): 860-864.
- [3] Alavi A, Sibbald RG, Mayer D, et al. Diabetic foot ulcers part I. pathophysiology and prevention[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2014, 70(1): 1.e1-1.e18.
- [4] 张林落, 郭立中, 罗磊. 《临证一得方》治胃疽奇验探微[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(3): 12-14, 17.
- [5] 周颖, 张珂, 庄煜, 等. 黄芩苷抗炎作用机制的研究进展[J]. *激光生物学报*, 2021, 30(5): 400.
- [6] 朱金华, 周军, 万红娇, 等. 黄连温胆汤对 2 型糖尿病模型大鼠细胞因子及 TLR4、NF- κ B 变化的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(3): 6-11.
- [7] 王茜, 刘歧, 赵钢. 黄柏水溶液对大鼠下肢静脉性溃疡创面修复中 NF- κ B、TNFAIP3/A20 表达的影响 [J]. *中医药学报*, 2017, 45(6): 52-56.
- [8] 李畅. 金银花颗粒剂对调节兔耳瘻疮 NF- κ B 信号通路的实验研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019.
- [9] 刘柏杉, 李晓仪, 王秀芹, 等. 黄芩提取物对金黄色葡萄球菌的体外抗菌活性及作用机制[J]. *饲料研究*, 2023, 46(12): 84-88.
- [10] 冯倩倩, 陈森, 何嘉丽, 等. 黄芩素抗菌作用研究进展[J]. *宜春学院学报*, 2022, 44(9): 21-24, 51.
- [11] 张庆莲, 黄娟, 邵单炫, 等. 黄连抗菌作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2019, 36(5): 125-127.
- [12] 李文裕, 肖候兰. 黄柏煎剂的抗炎和抗菌作用研究[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2018, 16(23): 90-91.
- [13] 肖蕾, 包正雪, 郁阳, 等. 金银花化学成分及抗菌消炎活性研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20(8): 1773-1780.

(收稿日期:2025-03-01 本文编辑:徐妍)