

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.006>

番红花素促进烧伤大鼠的创面愈合与减轻疼痛

郭洪耀, 林斌, 沙树奎

(南阳市中医院烧伤整形科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 研究番红花素对烧伤大鼠的创面愈合与疼痛影响。方法: 将80只大鼠随机分成假烧伤组($n=16$), 烧伤模型组($n=16$), 烧伤+10 mg/kg番红花素组($n=16$), 烧伤+50 mg/kg番红花素组($n=16$), 烧伤+200 mg/kg番红花素组($n=16$)。使用在干浴中预热至165 °C的铜块(2 cm×2 cm, 150 g)构建大鼠皮肤全厚度烧伤。采用HE染色观察组织学恢复情况, 检测不同处理组大鼠的机械阈值和热阈值, 蛋白质印迹法和ELISA方法检测创面皮肤组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和炎性因子IL-6和TNF- α 的表达。结果: 番红花素的应用可以促进创面皮肤伤口愈合并减轻疼痛。且番红花素抑制创面皮肤组织中iNOS的表达和炎性因子IL-6和TNF- α 水平。这一疗效在应用200 mg/kg的剂量时最为明显。结论: 番红花素可以促进烧伤大鼠的创面愈合并减轻疼痛。

[关键词] 番红花素; 烧伤; 创面愈合

External application of crocetin promotes wound healing and reduces pain in burned rats

GUO Hongyao, LIN Bin, SHA Shukai

(Department of Burn and Plastic Surgery, Nanyang TCM Hospital, Nanyang Henan 473000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of crocetin on wound healing and pain in burned rats. **Methods:** Eighty rats were randomly divided into 5 groups: the sham group ($n=16$), the burn model group ($n=16$), the burn+10 mg/kg crocetin group ($n=16$), the burn + 50 mg/kg crocetin group ($n=16$), and the burn + 200 mg/kg crocetin group ($n=16$). The 165 °C copper block (2 cm×2 cm, 150 g) was used to create full-thickness burn injuries in the rats. The histological recovery was observed by HE staining. The mechanical threshold and thermal threshold of rats in different treatment groups were detected. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inflammatory factors IL-6 and TNF- α in wound skin tissues were detected by Western blot and ELISA assay. **Results:** Crocetin promoted wound healing and reduced pain. Furthermore, crocetin inhibited the expression of iNOS and reduced the levels of inflammatory factors IL-6 and TNF- α in wound skin tissues. This effect was most pronounced at doses of 200 mg/kg. **Conclusion:** Crocetin can promote wound healing and reduce pain in burned rats.

Keywords crocetin; burn; wound healing

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-13

通信作者 (Corresponding author): 郭洪耀, Email: ghyghy212@126.com

烧伤是造成人体创伤的主要原因之一, 甚至可以致残和致死^[1-2]。目前, 针对烧伤已经开发了众多新的药物疗法, 这些疗法能明显降低烧伤后的继发感染和长期不愈合导致的残疾和病死率^[3]。早期清创术和皮肤移植可以获得短暂的疗效, 但移植物供体不足和不适合手术的环境阻碍了患者皮肤移植^[4-5]。在这些情况下, 使用增加伤口愈合过程的产品(敷料或药物)通常会降低患者的发病率和病死率^[6]。针对烧伤目前开发的不同种类的敷料和药物疗法大多数花费昂贵, 且这些疗法的机制尚未完全阐明^[7-8]。

番红花素(8,8'-diapocararoteioic acid)属于源自番红花(藏红花香料)柱头的类胡萝卜素的生物活性家族, 是一种活血化瘀类药物^[9-10]。已知番红花素是有效的自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂。重要的是, 它有效抑制创伤区的氧化应激和炎症反应^[11-13]。抑制炎症对伤口治疗至关重要。此外, 氧化应激的减少可能加速伤口愈合^[14-15]。因此, 基于其抗氧化损伤和抗炎的作用, 番红花素可能促进伤口愈合。本研究通过组织切片分析和蛋白质印迹等方法来评估番红花素对烧伤大鼠模型伤口愈合和疼痛的影响, 评价番红花素治疗烧伤的作用潜力。

1 材料与方法

1.1 烧伤大鼠模型制作和番红花素给药

用2.5%异戊咪唑麻醉雄性Wistar大鼠(200~250 g)。拉伸、固定大鼠的皮肤区域(包含背部和臀部)以确保接触表面平坦。使用在干浴中预热至165 ℃的铜块(2×2 cm², 150 g)与皮肤区域接触10 s, 从而产生全层烧伤。在烧伤创建过程中, 将铜块轻轻摇动, 同时压在皮肤表面上, 形成完整的方形烧伤区域^[16-18]。实验过程中, 不对铜块施加额外的压力, 以确保每次使用同样的压力产生烧伤。番红花素购自美国Sigma公司(货号: 18804), 药物的使用剂量参照既往的文献^[19]设定。将80只大鼠随机分成假烧伤组($n=16$)、烧伤模型组($n=16$)、烧伤+10 mg/kg番红花素组($n=16$)、烧伤+50 mg/kg番红花素组($n=16$)、烧伤+200 mg/kg番红花素组($n=16$)。

假烧伤组: 常温铜块, 没有烧伤或药物。烧伤模型组: 烧伤, 每天涂抹0.2 mL的生理盐水。烧伤+10 mg/kg番红花素组: 烧伤, 每天涂抹0.2 mL的10 mg/kg番红花素。烧伤+50 mg/kg番红花素组: 烧伤, 每天涂抹0.2 mL的50 mg/kg番红花素。烧伤+

200 mg/kg番红花素组: 烧伤, 然后每天涂抹0.2 mL的200 mg/kg番红花素。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

每天在同一时间给大鼠用药。在每次敷料之前, 用无菌盐水溶液清洁伤口以除去残留的药物和异物。使用灭菌棉签吸干盐水溶液, 然后将药物均匀涂抹在伤口上。每天使用数码相机(Coolpix P6000, 日本Nikon公司)拍摄大鼠伤口部位。

1.2 组织病理学分析

每组分别在造模后3, 7, 14, 28 d麻醉处死大鼠, 每次处死4只, 取烧伤区中心或假手术组同位置的皮肤组织, 并在4%多聚甲醛中固定3 d。通过旋转组织处理器(日本Sakura Finetek公司)将样品在梯度乙醇中脱水并用石蜡包埋, 制备4 μm厚度切片用于HE染色以评估一般和病理变化。通过光学显微镜(DM 6000B, 德国Leica公司)观察并拍照。

1.3 机械缩足反射阈值和热阈值的测定

分别用缩爪阈值和缩爪潜伏期测试来测量机械和热阈值^[20], 以此评估烧伤对大鼠痛觉的影响^[21]。对于缩足阈值测试, 将后爪放置在金属网(直径2 mm的金属丝)上并施加机械刺激以刺激足底表面, 压力以2.5 g/s的速率增加直至老鼠缩足; 使用动态足底感应仪(意大利Ugo Basile公司)记录发生这种情况的确切压力(以g为单位)。对于缩爪潜伏期测试, 将红外辐射热源定位在后爪的足底表面下方, 并测量直到大鼠缩足的时间(以s为单位)。每次测量以10 min的间隔重复6次。所有测试均在烧伤0, 3, 7, 14, 21和28 d时进行。

1.4 蛋白质印迹分析

在造模后28 d, 麻醉并处死大鼠, 收集烧伤区域中心或假手术组同位置的皮肤组织, 并按照蛋白萃取试剂盒(PROTTOT-1KT, 美国Sigma-Aldrich公司)方法提取总蛋白, 用BCA蛋白质测定试剂盒(P0012, 上海碧云天生物技术有限公司)检测蛋白质浓度。将20 μg蛋白质样品行SDS-PAGE电泳后转移至硝酸纤维素(NC)膜, 再使用5%脱脂奶粉/磷酸盐缓冲溶液(PBST)于室温下密封2 h。将抗iNOS(1:500), nNOS(1:500)和GADPH(1:1 000)一抗在4 ℃温育过夜。然后将辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体与样品在室温下孵育2 h。使用化学发光成像系统(Leica M205 FCA, 德国Leica公司)观察并定量蛋白质表达水平。

1.5 皮肤组织炎症因子测定

在造模后28 d, 麻醉并处死大鼠, 收集烧伤区域中心或假手术组同位置的皮肤组织, 使用ELISA测定法测量IL-6和TNF- α (ASS3189, KHC3012, 美国Abgent公司)。按照说明书倍比稀释样品后, 在30 min内用酶标仪在450 nm处测吸光度值。根据标准曲线换算相应IL-6和TNF- α 的蛋白浓度。

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 5进行图形分析和数据处理。所有数据以均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示。

通过单向或双向方差分析确定差异是否有统计学意义。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 番红花素对烧伤创面愈合的影响

烧伤0, 3, 7, 14, 21和28 d后(图1), 虽每组伤口随着时间逐渐愈合, 但烧伤+番红花素组的伤口在14 d后开始明显愈合。28 d后, 烧伤+番红花素组的伤口普遍出现大部分愈合, 其中, 烧伤+50 mg/kg番红花素组和烧伤+200 mg/kg番红花素组出现良好表皮愈合的状态。

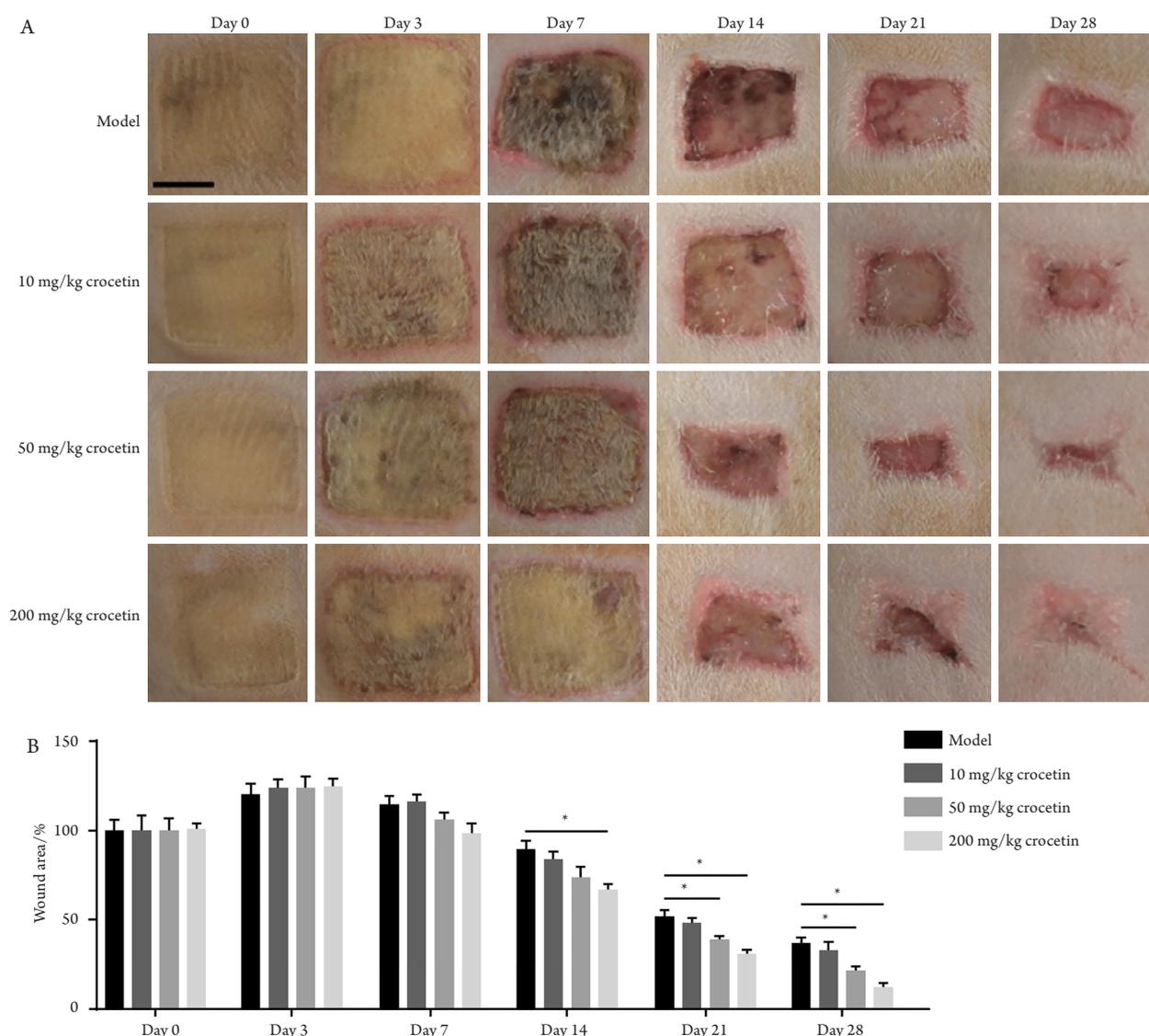


图1 番红花素对大鼠烧伤创面的影响

Figure 1 Effect of crocin on burn wounds in rats

(A) 0, 3, 7, 14, 21和28 d后的伤口外观; (B) 0, 3, 7, 14, 21和28 d后的伤口面积。与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) Appearance of the wound after 0, 3, 7, 14, 21 and 28 days; (B) Wound area after 0, 3, 7, 14, 21 and 28 days. $*P < 0.05$ vs the model group.

2.2 番红花素对烧伤组织病理学的影响

在烧伤治疗3, 7, 14和28 d后, 各组烧伤创面中心组织的HE形态学见图2。烧伤后3 d, 各组均观察到毛囊脱落和表皮增厚, 表皮附近细胞数明显减少。7 d后, 各组毛囊消失, 烧伤+50 mg/kg番红花素组瘢痕形成, 烧伤+200 mg/kg组显示胶原增生。14 d后, 模型组不形成表皮, 而烧伤+50 mg/kg番红花素组表皮开始形成, 并且在该组中观察到大量胶原, 烧伤+200 mg/kg番红花素组表皮已经扩张形成完整的表皮层以及高度沉积的胶原纤维。28 d后, 模型组表现出不完整的表皮结构, 仍观察到肉芽组织; 与模型组相比, 烧伤+10 mg/kg组已经生长

了较厚的表皮, 但其毛囊未出现; 烧伤+50 mg/kg番红花素组和烧伤+200 mg/kg番红花素组的大鼠不仅长出完整的表皮, 还出现了大量的毛囊, 并且组织纤维排列整齐。

2.3 番红花素增加烧伤大鼠的机械阈值

与假烧伤组比较, 烧伤组最初表现为机械阈值的普遍显著降低(图3A)。在应用番红花素后, 大鼠的机械阈值相对于模型组显著增加, 并在应用200 mg/kg的剂量时恢复至最佳状态($P<0.001$)。在28 d评估期间, 各组之间的热阈值差异无统计学意义($P>0.05$, 图3B)。

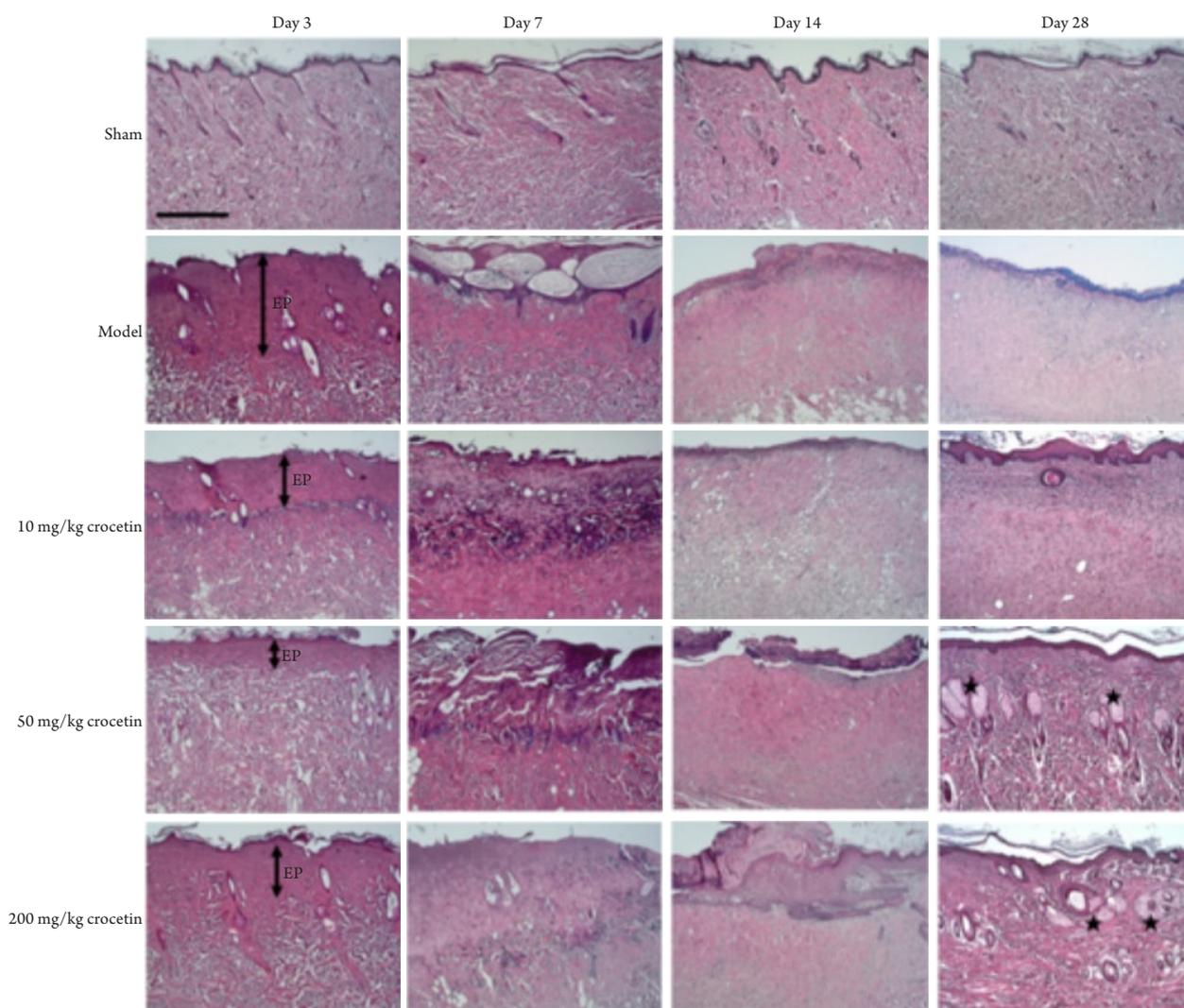


图2 番红花素对烧伤创面愈合效果的组织学评价

Figure 2 Histological evaluation of the effects of crocin on healing of burn wounds

图中所示标度为500 μm 。EP: 上皮层; ★: 毛囊。

The scale shown in the figure is 500 μm . EP: epithelial layer; ★: hair follicles.

2.4 番红花素下调烧伤创面组织iNOS的表达和降低炎症因子的水平

与对照组相比, 模型组iNOS的表达显著增加($P < 0.05$, 图4A); 应用番红花素治疗烧伤大鼠后, iNOS的表达明显降低, 且200 mg/kg

剂量的番红花素疗效最为突出($P < 0.001$)。ELISA法结果(图4B, 4C)显示: 番红花素治疗后, 大鼠皮肤组织中IL-6和TNF- α 水平显著降低, 并在应用200 mg/kg的剂量时最为显著($P < 0.001$)。

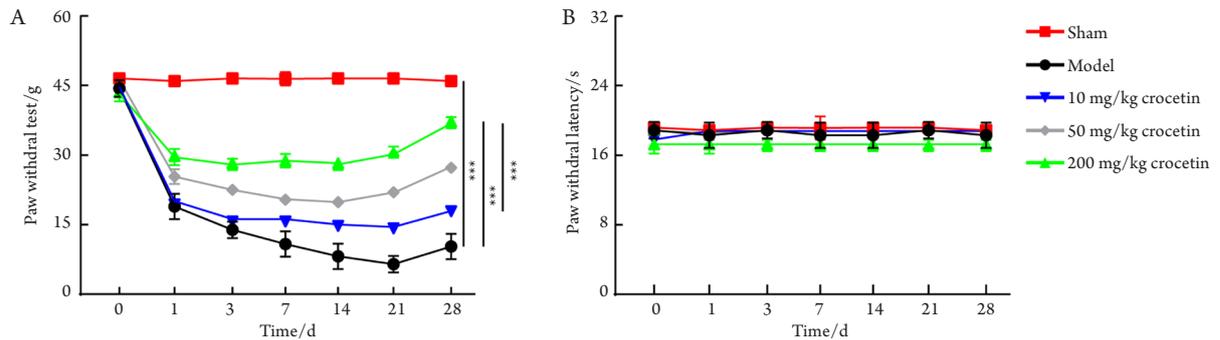


图3 应用番红花素后, 大鼠的机械缩足反射阈值(A)增加, 而热阈值(B)没有显著差异

Figure 3 After application of crocin, the mechanical reflex threshold (A) was increased in rats, while the thermal threshold (B) was not significantly different

每组包含4只大鼠。与模型组比较, $***P < 0.001$ 。

Each group contains 4 rats. Compared with the model group, $***P < 0.001$.

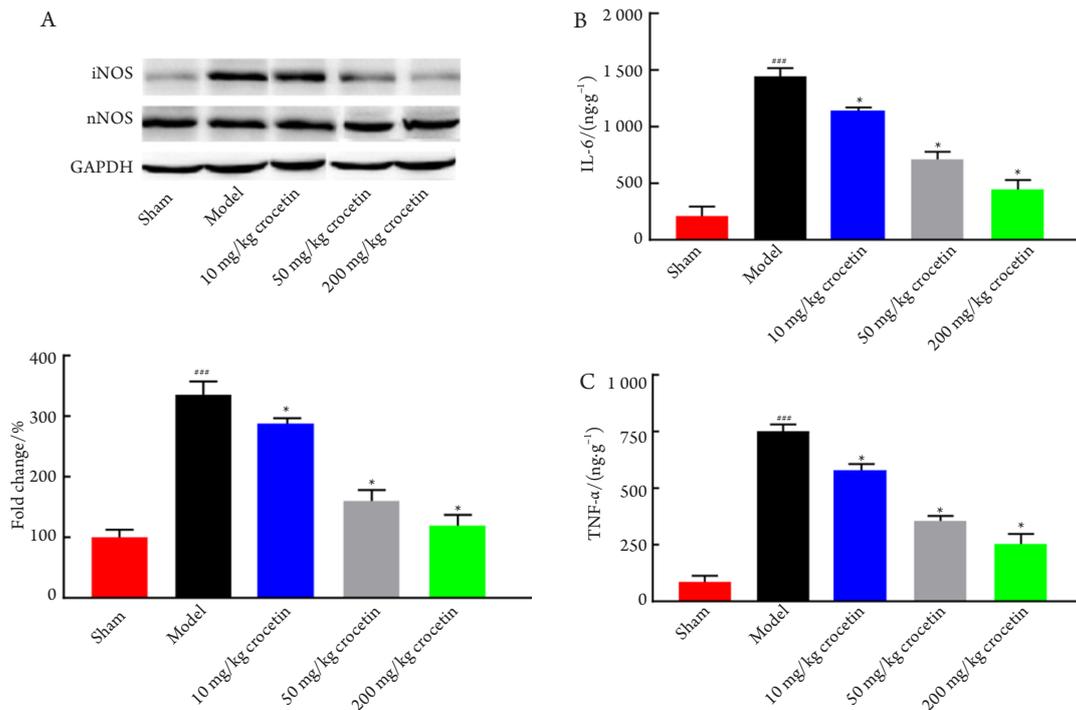


图4 番红花素抑制烧伤大鼠创面皮肤组织中iNOS的表达和炎症因子分泌

Figure 4 Crocin inhibits the expression of iNOS and secretion of inflammatory factors in the skin tissues of burn rats

(A)通过蛋白质印迹检测不同处理组的iNOS和nNOS的表达; (B) ELISA法检测不同处理组大鼠皮肤组织中IL-6的水平; (C) ELISA法检测不同处理组大鼠皮肤组织中TNF- α 的水平。每组包含4只大鼠。与Sham组相比, $***P < 0.001$; 与Model组相比, $*P < 0.05$ 。

(A) Expression levels of iNOS and nNOS in different groups detected by Western blot; (B) Level of IL-6 in skin tissues of rats in different treatment groups detected by ELISA assay; (C) Levels of TNF- α in skin tissues of rats in different treatment groups detected by ELISA assay. Each group contains 4 rats. Compared with the sham group, $***P < 0.001$; Compared with the model group, $*P < 0.05$.

3 讨论

近年来, 全球趋势是使用天然物质作为抗氧化剂和功能性营养素。番红花素是从藏红花 (*Crocus sativus L.*)或栀子 (*Gardenia jasminoides Ellis*)中提取的一种类胡萝卜素化合物。以前的研究^[22]表明: 番红花素有助于调节体内免疫应答, 减少炎症, 促进抗炎细胞因子的表达和分泌。而热力烧伤会造成体内免疫功能失衡和炎症反应。且已有研究^[19]发现: 番红花素能减轻烧伤后诱导的肠损伤。这提示番红花素可能具有治疗烧伤的作用。而目前关于番红花素是否可以作为外敷用药治疗烧伤方面的研究未见报道。

烧伤的愈合过程通常分为3个连续但相互关联的阶段, 即初始阶段、组织形成阶段(增殖阶段)和组织重塑阶段^[23]。烧伤后在初始阶段就表现出典型的炎症症状: 发红、肿胀、发热和疼痛, 并且炎症反应贯穿整个创面愈合过程^[24]。因此, 猜测番红花素可能具有促进烧伤后创面愈合的功能。为证实这一猜测, 本研究利用大鼠烧伤模型, 发现番红花素能剂量依赖性促进烧伤后的创面愈合; 并且本研究进一步利用HE染色法发现, 200 mg/kg番红花素还能促进烧伤后的创面的组织重塑, 表现为恢复毛囊且组织纤维。烧伤可立即导致氧化应激反应和炎症, 进一步导致免疫力下降和各种烧伤并发症, 甚至会发生败血症和死亡^[25]。而烧伤后, 而过激的炎症反应正是创面难以愈合的关键^[26]。烧伤造成的过氧化应激反应可以激活iNOS表达, iNOS表达进一步促进创面组织NO蓄积, 从而进一步加重创面的氧化应激损伤和炎症反应^[27]。而本研究进一步通过大鼠烧伤模型研究番红花素对创面组织炎症因子释放和iNOS表达的影响, 发现番红花素可以减少iNOS的表达和致炎因子IL-6和TNF- α 的含量。这一结果提示在烧伤后, 番红花素对创面组织具有抗炎和抑制iNOS表达的作用。另外, 烧伤后会造成疼痛, 疼痛贯穿整个烧伤后愈合过程。疼痛不仅造成烧伤患者痛苦, 还能不同程度改变内分泌, 延长烧伤后愈合时间^[1]。本研究显示: 番红花素降低烧伤大鼠机械阈值。提示可以番红花素可以减轻烧伤后疼痛。

综上所述, 番红花素外敷可以加速烧伤后创面愈合和减轻疼痛, 这提示番红花素具有作为治疗烧伤外敷药的潜力。

参考文献

1. Wang Y, Beekman J, Hew J, et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 123: 3-17.
2. Fang Q, Guo S, Zhou H, et al. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41440.
3. Hacker S, Dieplinger B, Werba G, et al. Increased serum concentrations of soluble ST2 predict mortality after burn injury[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(12): 2079-2087.
4. Singh M, Nuutila K, Collins KC, et al. Evolution of skin grafting for treatment of burns: Reverdin pinch grafting to Tanner mesh grafting and beyond [J]. *Burns*, 2017, 43(6): 1149-1154.
5. Li RG, Ren GH, Tan XJ, et al. Free flap transplantation combined with skin grafting and vacuum sealing drainage for repair of circumferential or sub-circumferential soft-tissue wounds of the lower leg[J]. *Med Sci Monit*, 2013, 19: 510-517.
6. Kroger K, Storck M, Risse A. Innovative wound care--new studies to increase evidence[J]. *MMW Fortschr Med*, 2013, 155(Suppl 2): 51-55.
7. Redecker J, Wittstock M, Rösche J. The efficacy of different kinds of intravenously applied antiepileptic drugs in the treatment of status epilepticus. How can it be determined[J]. *Epilepsy Behav*, 2017, 71(Pt A): 35-38.
8. Hamed H, Moradi S, Hudson SM, et al. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: a review[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 199: 445-460.
9. Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus L.*) and its ingredients[J]. *Pharmacognosy Res*, 2014, 6(2): 99-107.
10. Gutheil WG, Reed G, Ray A, et al. Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(1): 173-179.
11. Boskabady MH, Farkhondeh T. Antiinflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of crocus sativus L. and its main constituents[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(7): 1072-1094.
12. Yang R, Yang L, Shen X, et al. Suppression of NF- κ B pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2/3): 391-396.
13. Yoshino F, Yoshida A, Umigai N, et al. Crocetin reduces the oxidative stress induced reactive oxygen species in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) brain[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2011, 49(3): 182-187.

14. Tie L, Chen LY, Chen DD, et al. GTP cyclohydrolase I prevents diabetic-impaired endothelial progenitor cells and wound healing by suppressing oxidative stress/thrombospondin-1[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(10): E1120-E1131.
15. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair[J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(2):165-171.
16. Baoyong L, Jian Z, Denglong C, et al. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models[J]. *Burns*, 2010, 36(6): 891-896.
17. Kuroda T, Harada T, Tsutsumi H, et al. Hypernatremia deepens the demarcating borderline of leukocytic infiltration in the burn wound[J]. *Burns*, 1997, 23(5): 432-437.
18. Meyerholz DK, Piester TL, Sokolich JC, et al. Morphological parameters for assessment of burn severity in an acute burn injury rat model[J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(1): 26-33.
19. Zhou C, Bai W, Chen Q, et al. Protective effect of crocetin against burn-induced intestinal injury[J]. *J Surg Res*, 2015, 198(1): 99-107.
20. Huang SH, Wu SH, Chang KP, et al. Autologous fat grafting alleviates burn-induced neuropathic pain in rats[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2014, 133(6): 1396-1405.
21. Lin CH, Wu SH, Lee SS, et al. Autologous adipose-derived stem cells reduce burn-induced neuropathic pain in a rat model[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 19(1): 34.
22. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, et al. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro[J]. *Cancer Lett*, 1996, 100(1/2): 23-30.
23. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing[J]. *Br J Dermatol*, 2015, 173(2): 370-378.
24. Ahmad A, Druzhyina N, Szabo C. Cystathionine-gamma-lyase deficient mice are protected against the development of multiorgan failure and exhibit reduced inflammatory response during burn[J]. *Burns*, 2017, 43(5): 1021-1033.
25. Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Lipid mediators in immune dysfunction after severe inflammation[J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(1): 12-21.
26. Guo Y, Yang Z, Wu S, et al. Inhibition of IRF8 negatively regulates macrophage function and impairs cutaneous wound healing[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 68-78.
27. Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, et al. iNOS as a driver of inflammation and apoptosis in mouse skeletal muscle after burn injury: possible involvement of Sirt1 S-nitrosylation-mediated acetylation of p65 NF- κ B and p53[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170391.

本文引用: 郭洪耀, 林斌, 沙树奎. 番红花素促进烧伤大鼠的创面愈合与减轻疼痛[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(3): 571-577. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.006

Cite this article as: GUO Hongyao, LIN Bin, SHA Shukui. External application of crocetin promotes wound healing and reduces pain in burned rats[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(3): 571-577. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.006