

泽及流浸膏纳米材料干预结核性创面的临床研究

——附31例临床资料

朱 珠¹ 施 怡¹ 钮晓红² 高金辉² 傅良杰² 薛倩一²

(1.南京中医药大学,江苏南京210023;2.南京中医药大学附属南京市中西医结合医院,江苏南京210014)

摘 要 目的:观察泽及流浸膏纳米材料干预结核性创面后创面巨噬细胞超微结构变化,并评价其临床疗效。方法:选择患淋巴结核并形成结核性创面者61例,随机分为治疗组与对照组。治疗组在口服异烟肼等基础治疗的同时用泽及流浸膏纳米材料填塞于创面引流,对照组在基础治疗的同时用医用凡士林纱布填塞于创面引流,2组均每2 d换药1次,疗程均为28 d。分别于换药第1、15、28日取患者同一位置创面病灶内及边缘皮肤的组织,于透射电镜下观察巨噬细胞超微结构变化。治疗前后彩超测量2组患者病灶大小,监测外周血的安全性指标;治疗后评估临床疗效。结果:治疗组临床总有效率为96.77%,明显高于对照组的63.33% ($P<0.01$)。透射电镜结果表明,治疗组创面组织和创缘周围皮肤组织中巨噬细胞的形态结构明显优于对照组。2组治疗后白细胞、谷丙转氨酶等安全性指标均在正常范围。结论:基础治疗联合泽及流浸膏纳米材料填塞创面可明显促进结核性创面的愈合,中药的功效可能通过纳米材料的缓释及降解作用得以充分发挥。

关键词 淋巴结核;创面;抗结核药;泽及流浸膏;纳米材料;经验方;外用

中图分类号 R259.22 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X (2021) 03-0030-04

基金项目 江苏省中医药领军人才培养项目(LJ200921);南京市转化医学中心基地建设项目(11)

结核病在全球范围内仍威胁着人类的健康。2019年,我国统计报告了结核病新发患者86.6万余例^[1]。研究发现,肺外结核占有结核病总数的20%~50%^[2],肺外结核患者中约有50%可发生结核性创面^[3],其中淋巴结核创面占比最高^{[4]86}。巨噬细胞作为机体免疫的重要防线,吞噬入侵的结核分枝杆菌(MTB)^[5],引发细胞凋亡。泽及流浸膏为钮晓红教授经验方,临床治疗结核性创面安全有效^[6-7]。但泽及流浸膏为液态制剂,灌注窦道后,药液纱条填塞过紧不利于引流,过松则药液易从窦道流出。前期研究显示,纳米材料载入水溶性药物时具有良好的降解缓释作用,可延长药物在创面的停留时间,促进疮面腐肉脱落,纳米纤维还能促进细胞迁移和增殖^[8]。与此同时,正常的皮肤组织细胞必须贴附于细胞外基质(ECM)才能生长与分化,纳米材料具有与皮肤基质相似的生物学特性和化学成分,有利于维持细胞的寿命,且实验证明在较长的培养期内,纳米材料对部分成纤维细胞增殖有较高的促进作用^[9]。为此,我们与南京理工大学合作研制了泽及流浸膏纳米材料,临床观察其能够促进结核性创面的愈合。本研究观察经泽及流浸膏纳米材料干预后结核性创面巨噬细胞超

微结构的变化,探究创面愈合动态过程,并与凡士林纱布做疗效对比观察,现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 选择2019年3月至9月南京市中西医结合医院瘰癧科病房确诊为淋巴结核并出现结核性创面的患者61例,采用随机数字表法分为治疗组31例和对照组30例。治疗组男14例,女17例;平均年龄(37.04 ± 12.38)岁;病程 ≤ 6 个月18例,6~12个月7例, >12 个月6例;局部病灶 ≤ 3 cm者13例, >3 cm者18例;切开引流15例,已破溃16例。对照组男14例,女16例;平均年龄(34.67 ± 11.04)岁;病程 ≤ 6 个月19例,6~12个月8例, >12 个月3例;局部病灶 ≤ 3 cm者14例, >3 cm者16例;切开引流13例,已破溃17例。2组患者性别、年龄、病程等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过南京市中西医结合医院伦理委员会审查,批件号:201807001。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 淋巴结核伴结核性创面西医诊断标准参考《临床诊疗指南:外科学分册》^{[4]87}:哑铃型脓肿反复破溃流脓,创面经久不愈;病理确定为

结核,创面组织或脓液做实时荧光PCR-结核分枝杆菌rpoB基因检测为阳性。

1.2.2 中医诊断标准 参考《中医病证诊断疗效标准》^[10]中瘰癧病阴虚火旺证诊断标准。主证:脓肿溃破,疮面肉芽疏松、色苍白或黯红,可有潜行性空腔,窦道迂曲复杂,流出清稀脓液,夹有败絮样物或豆渣样物,疮周皮色紫黯或黯红。次证:潮热盗汗,舌红少苔,脉细数。主证必备,结合次证,即可诊断。

1.3 纳入标准 符合中西医诊断标准;创面面积1~18 cm²,窦道长度1~18 cm;年龄18~65岁;患者自愿参加本研究并签署知情同意书。

1.4 排除标准 非结核性创面者;对本研究用药过敏者;合并其他机能系统严重原发性疾病者;肌酐(CRE) >1×N (N为正常值上限),谷丙转氨酶(ALT) >2×N (N为正常值上限);精神性疾病患者或孕产妇。

2 治疗方法

2.1 基础治疗 予异烟肼(杭州民生药业有限公司,批号:T18F009)每次0.3 g,每日1次,口服;利福平(沈阳红旗制药有限公司,批号:1812291),每次0.45 g,每日1次,晨起空腹顿服;盐酸乙胺丁醇(上海新亚药业闵行有限公司,批号:063180753),每次0.75 g,每日1次,口服;双环醇(北京协和药厂,批号:180606),每次25 mg,每日3次,口服。

2.2 治疗组 予基础治疗联合泽及流浸膏纳米材料外用。消毒皮肤、清创去除病灶内坏死组织及脓性分泌物,根据创面深度和宽度剪裁泽及流浸膏纳米材料,填塞进创腔内,松紧适宜,医用纱布或医用棉垫外覆,医用胶布固定,每2 d换药1次。

泽及流浸膏由南京市中西医结合医院制剂室提供,制备方法:取泽漆、白及、猫爪草按8.33:1.00:1.67剂量配比,水煎浓缩至流浸膏剂型,每毫升含生药4.37 g。纳米材料的主要成分为壳聚糖和纤维素,此二者也是常用于创面敷料的材料,安全无毒^[11]。室温下将壳聚糖溶解于2%的醋酸溶液中,得到浓度为1%的壳聚糖醋酸溶液。磁力搅拌壳聚糖醋酸溶液并缓慢滴加浓度为4%的氢氧化钠溶液至壳聚糖完全析出,最终得到均一的壳聚糖凝胶沉淀的悬浊液。将悬浊液离心洗涤得到纯净的壳聚糖凝胶沉淀,置于冰箱保存。于凝胶沉淀中加入提纯的泽及流浸膏(壳聚糖凝胶沉淀与泽及流浸膏质量比为10:1)后混合均匀,纤维素经羧甲基化后得到羧甲基纤维素,最后按比例加入氧化羧甲基纤维素和甘油,冷冻24 h后再冻干2 d,得到最终的泽及流浸膏纳米材料(由南京理工大学材料学院制备)。

2.3 对照组 予基础治疗联合医用凡士林油纱布外用。消毒清创等方法同治疗组,予医用凡士林油纱布(新乡市华西卫材有限公司,6 cm×20 cm,批号:1933007)填塞创腔,每2 d换药1次。

2组疗程均为28 d。

3 疗效观察

3.1 观察指标

3.1.1 创面及皮肤组织巨噬细胞超微结构 于换药第1、15、28日在创面及边缘皮肤同一位置取得大小为1 mm×1 mm×1 mm的组织,务必做到“快,准,小,冷”,取材后置于标记序号的装有4%戊二醛溶液的离心管中,冰箱冷藏室固定4 h以上。磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗,脱水,包埋,最后超薄切片后置透射电镜(型号:JEM-1010,南京医科大学电镜分析测试中心)下观察巨噬细胞情况。

3.1.2 创面宽度、深度 于换药第1、28日行彩超检查,记录脓腔上下径、左右径、前后径的测量值。

3.1.3 安全性观察及复发情况 于换药第1、28日抽取2组患者静脉血,查血常规、肝肾功能主要指标。治疗结束后随访6个月,统计2组痊愈患者的复发情况。

3.2 疗效判定标准 参考《中药新药临床研究指导原则》^[12]拟定疗效判定标准,于疗程结束后判定疗效。临床痊愈:全身症状消失,创面愈合,实验室检查指标正常;显效:创面缩小1/2以上,或数量减少1/2以上,实验室检查指标正常;有效:创面缩小或数量减少不足1/2,实验室检查指标有改善;无效:创面大小及数量无改善。

3.3 统计学方法 采用Graphpad prism 8.0软件对数据进行统计分析,组间比较采用方差分析,组间疗效差异性比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3.4 治疗结果

3.4.1 2组患者临床疗效比较 见表1。

表1 治疗组与对照组患者临床疗效比较 单位:例						
组别	例数	临床痊愈	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	31	19	5	6	1	96.77% ^{##}
对照组	30	5	6	8	11	63.33%

注:与对照组比较,## $P<0.01$ 。

3.4.2 2组患者创面及皮肤组织巨噬细胞超微结构比较 见图1。换药第1日:2组患者创面组织巨噬细胞形态结构特征基本一致,镜下均可见大量线粒体肿胀呈空泡状,细胞核崩解为小碎片,核膜消失,提示核碎裂,细胞内高尔基体、内质网、溶酶体等结

构基本不存在,提示细胞死亡。换药第15日:治疗组创面组织巨噬细胞的大量线粒体扩张呈空泡状,相互聚集挤压,部分线粒体嵴结构存在,可见数个髓样小体,部分内质网轻度扩张呈囊泡状;对照组创面巨噬细胞可见大量线粒体无线粒体嵴呈空泡状,核外形虽存在但核仁消失,可见少量次级溶酶体。换药第28日:治疗组创面巨噬细胞结构明显生长良好,可观察到大量结构完整规则的内质网和线粒体,线粒体嵴结构明显,内质网上附着大量核糖体,可见细胞膜形态完整,细胞核膜结构清晰,核仁形态正常,溶酶体数量减少;对照组创面巨噬细胞仍可见线粒体肿胀溶解,大量呈空泡状,仅见少量线粒体嵴结构明显的线粒体,内质网轻度扩张,吞噬小体内可见残余细胞器。

换药第1日:2组患者皮肤组织巨噬细胞形态结构特征基本一致,镜下均可见大量线粒体肿胀呈空泡状,偶可见线粒体嵴,染色质碎片分散在胞核内,核膜消失,呈核坏死的表现,细胞内高尔基体、内质网、溶酶体等结构及细胞膜基本不存在。换药第15日:治疗组皮肤组织巨噬细胞出现较多线粒体,其嵴结构显现,相互聚集挤压,细胞膜结构完整,可见少量伪足,核仁清晰,细胞质内可见吞噬小体,部分内质网轻度扩张;对照组皮肤组织巨噬细胞仅可见线粒体膜结构,细胞内质网轻度扩张,可见少量高尔基体。2组均可见细胞周围皮肤组织特有的胶原纤维。换药第28日:治疗组皮肤组织巨噬细胞结构明显生长良好,可观察到大量结构完整规则的线粒体、粗面内质网,线粒体嵴结构明显,细胞核膜结构清晰,核仁形态正常,核体积无增大,核内物质结构稳定,细胞膜形态完整,伪足清晰可见;对照组皮肤组织巨噬细胞可见线粒体肿胀溶解,大量呈空泡状,仅见少量线粒体嵴结构明显的线粒体,细胞膜部分溶解,核体积略增大,内质网轻度扩张,吞噬小体内可见残余细胞器。2组均可见细胞周围皮肤组织特有的胶原纤维。

3.4.3 2组患者治疗前后创面宽度、深度比较 见表2。

3.5 安全性观察及随访复发情况 2组患者治疗前后血常规及肝功能指标均在正常值范围。随访6个月,治疗组痊愈病例创腔愈合好,无全身不适,无复发,对照组有1例复发。

4 讨论

结核性创面最常见于淋巴结核中后期寒性脓肿破溃,其特点是长期流脓难愈。根据淋巴结核诊疗指南,在用抗结核药物基础治疗的同时对寒性脓肿可采取切开引流术或窦道切除术,但手术存在病灶清除不彻底,术中损伤神经、血管或淋巴管,术后创面难愈等风险^[13-14],因此如何提高结核性创面的疗效仍是亟待解决的难题。淋巴结核属于中医学“瘰癧”范畴,其核心病机是毒、瘀、腐、虚。毒为标,素体本虚染毒而发病,毒邪瘀滞,为生腐之源,瘀腐积热,日久伤阴,故成瘰癧病阴虚火旺之证。瘀腐缠绵,新肉不生,损耗逾甚。毒、瘀、腐、虚四者互为因果,循环往复,使疮面难以向愈。治疗当以解毒祛瘀、化腐生肌为大法,我们采用泽及流浸膏纳米材料直接作用于疮面起到祛腐拔毒、提脓敛疮、生肌收口的作用。

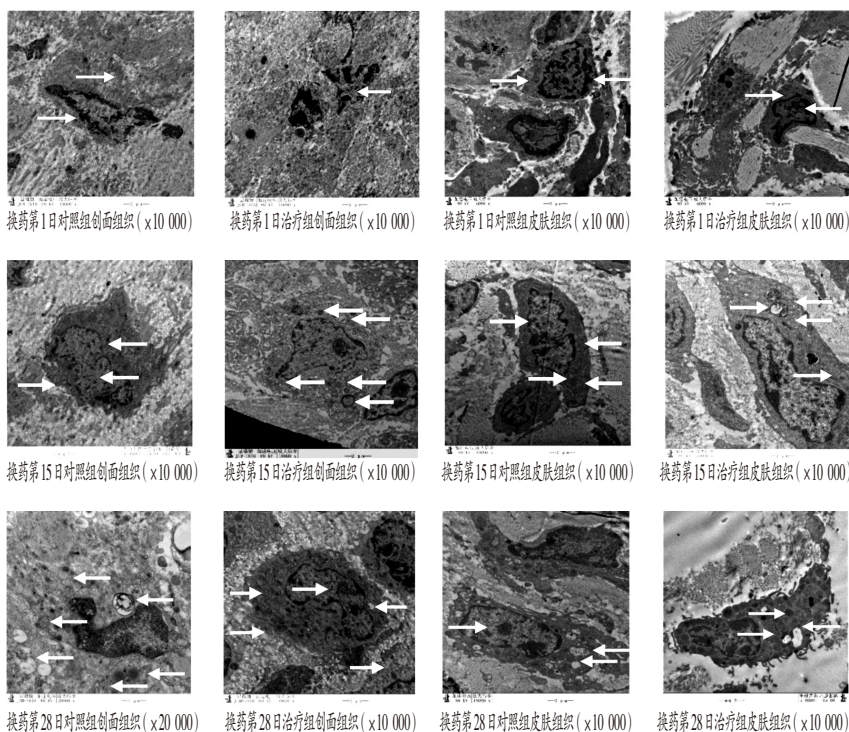


图1 换药各时期治疗组与对照组创面组织、皮肤组织巨噬细胞超微结构(醋酸铀、柠檬酸铅染色法)

表2 治疗组与对照患者治疗前后创面各径测量值比较($\bar{x} \pm s$) 单位:mm

组别	例数	治疗前			治疗后		
		上下径	左右径	前后径	上下径	左右径	前后径
治疗组	31	27.77±7.23	22.84±6.01	29.90±8.93	7.97±3.93***	5.07±3.79***	5.36±3.92***
对照组	30	24.37±9.46	25.10±7.40	25.20±10.22	19.17±7.44*	18.00±5.69**	19.53±8.22*

注:与本组治疗前相同径比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组治疗后相同径比较,## $P<0.01$ 。

明·邝璠《便民图纂》云：“男妇瘰癧，猫儿眼睛草一二捆……乃搽此膏，数次愈。”指出猫儿眼睛草（即泽漆）外用瘰癧疮面数次可愈。明·李时珍《本草纲目》记载：白及主治“发背瘰癧……生肌止痛”。泽漆杀虫消肿、化痰祛瘀，猫爪草解毒祛腐、化痰散结，白及收敛消肿、生肌止痛。泽漆与猫爪草味辛，能散能行，有散结行瘀之效，可将疮面的瘀腐拔除；泽漆与白及性微寒、味苦，滋阴降火；白及与猫爪草味甘，能补虚生新。现代研究也表明这三种草药具有良好的抗结核作用^[15-17]。

MTB是一种可寄生于宿主巨噬细胞的细胞内病原体，巨噬细胞可以通过不同的方式消除MTB，因此在结核性创面治疗过程中起到关键的作用。结核性创面液化坏死高峰期时，创腔内存在大量坏死组织，清除这些组织不仅是去除了创面收缩的障碍，同时也去除了内含的MTB以及其他削弱宿主免疫力的物质，因此清除坏死组织对结核性创面的愈合至关重要。泽及流浸膏纳米材料的优势在于祛腐以促肌生，并可以调控和诱导巨噬细胞分化，吸收渗液，在疮面创造相对洁净的微环境，有利肉芽、皮肤的生长。

透射电镜结果表明，治疗初始时2组患者创面和皮肤组织巨噬细胞可见大量线粒体肿胀呈空泡状，各大细胞器结构紊乱不可辨。换药15 d，2组患者创面和皮肤组织巨噬细胞均可见溶酶体样结构而治疗组明显多于对照组。换药28 d，治疗组的各大细胞器超微结构恢复。说明泽及流浸膏纳米材料能改善因结核杆菌入侵而导致的内质网的重度扩张状态，重建核仁。值得关注的是，本研究观察到巨噬细胞超微病理恢复正常与彩超测得的脓腔上下、左右、前后径的缩小呈正相关，即随着巨噬细胞的细胞器改善，创面脓腔也随之愈合，且治疗组的愈合程度远大于对照组。

综上，泽及流浸膏纳米材料外用治疗结核性创面效果明显优于医用凡士林纱布，并对创面和皮肤组织巨噬细胞有明显的修复作用，安全有效。泽及流浸膏纳米材料使中药行瘀祛腐、解毒生肌的功效通过纳米材料的缓释及降解作用得以充分发挥，明显促进了结核性创面愈合，值得临床推广，并拟进行药效学及分子生物学方面的深入研究。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019[M]. Geneva: World Health Organization, 2019: 36.
- [2] 黄少君. 分子生物学诊断新方法在淋巴结核诊断中的应用研究[D]. 北京: 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 2016.
- [3] 贾赤字. 结核性创面——一个被忽视且值得重视的临床问题[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2014, 9(4): 355.
- [4] 中华医学会. 临床诊疗指南: 外科学分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [5] RUAN C, LI J, NIU J, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv0426c promotes recombinant Mycobacteria intracellular survival via manipulating host inflammatory cytokines and suppressing cell apoptosis[J]. Infect Genet Evol, 2020, 77: 104070.
- [6] 钮晓红, 卞勇, 蒋宝平, 等. 泽及流浸膏外用安全性实验研究[J]. 江苏中医药, 2016, 48(11): 75.
- [7] 钮晓红, 卞勇, 蒋宝平, 等. 泽及流浸膏对大鼠长期毒性研究[J]. 中医药信息, 2016, 33(6): 28.
- [8] GARCIA-ORUE I, PEDRAZ J L, HERNANDEZ R M, et al. Nanotechnology-based delivery systems to release growth factors and other endogenous molecules for chronic wound healing[J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2017, 42: 2.
- [9] XING L, MA Y, TAN H P, et al. Alginate membrane dressing toughened by chitosan floccule to load antibacterial drugs for wound healing[J]. Polym Test, 2019, 79: 106039.
- [10] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 43.
- [11] DING L, SHAN X, ZHAO X, et al. Spongy bilayer dressing composed of chitosan-Ag nanoparticles and chitosan-Bletilla striata polysaccharide for wound healing applications[J]. Carbohydr Polym, 2017, 157: 1538.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(第三辑)[M]. 1997: 43.
- [13] 徐磊, 石锦辉. 异烟肼联合康复新治疗脓肿型颈淋巴结术后伤口疗效观察[J]. 吉林医学, 2012, 33(30): 6551.
- [14] 罗琼, 付友琴, 胡春莲. 颈淋巴结结核病灶清除术并发淋巴漏的观察及护理[J]. 中国临床护理, 2010, 2(3): 225.
- [15] 胡小华, 李国强, 贾晓光. 泽漆的研究进展[J]. 新疆中医药, 2008, 26(2): 80.
- [16] XU D, PAN Y, CHEN J. Chemical constituents, pharmacologic properties, and clinical applications of Bletilla striata[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1168.
- [17] DENG K Z, XIONG Y, ZHOU B, et al. Chemical constituents from the roots of Ranunculus ternatus and their inhibitory effects on Mycobacterium tuberculosis[J]. Mol Basel Switz, 2013, 18(10): 11859.

第一作者: 朱珠(1994—), 女, 医学硕士, 住院医师, 中医外科学专业。

通讯作者: 钮晓红, 本科学历, 主任中医师, 二级教授, 博士研究生导师。niuxiaohongllk@163.com

修回日期: 2020-10-14

编辑: 吴 宁