

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003952

富氢水通过调节 TGF- β 1/Smad3 信号通路促进大鼠深 II 度烧伤创面愈合

崔 强, 王洪瑾, 吴晓伟, 冯燕萍, 张科伟, 丁相普, 王献珍

(青海大学附属医院烧伤整形科, 西宁 810001)

【摘要】目的:探讨富氢水促进深 II 度烧伤大鼠创面愈合的作用及其分子机制。**方法:**将 30 只 SD 大鼠随机分为对照组、假烧伤组、模型组、富氢水组、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)抑制剂组 5 组, 每组 6 只大鼠。采用圆形高温烫伤仪建立大鼠深 II 度烧伤模型, TGF- β 1 抑制剂组大鼠在造模前腹腔注射 15 mg/kg 的 SB-431542, 造模成功后给药, 药物组用玻璃瓶每天给大鼠输送两次 200 mL 的富氢水, 其余各组大鼠常规饮水, 连续治疗 2 周。观察各组大鼠皮肤烧伤组织的愈合情况; 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察创面组织的病理形态学变化; 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa)试剂盒检测血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的含量; 生化试剂盒检测创面组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及超氧化物阴离子的含量; TUNEL 染色检测创面组织的细胞凋亡; 免疫组化染色创面组织增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达; JC1 流式检测创面组织中的线粒体膜电位; 蛋白免疫印迹(Western blot, WB)检测创面组织中 TGF- β 1、SMAD 家族成员 3(SMAD family member 3, Smad3)、磷酸化 SMAD 家族成员 3(phosphorylated SMAD family member 3, p-Smad3)的表达。**结果:**与对照组相比, 模型组大鼠创面组织见表皮结构缺失, 真皮层内细胞见大量坏死, 并伴随大量炎性细胞浸润, 皮肤组织有出血且红细胞溢出等病理变化, 这提示模型建立成功。与模型组比较, 富氢水组大鼠血清中 TNF- α (42.18 ± 1.09 , $P < 0.001$)、IL-1 β (4.82 ± 0.24 , $P < 0.001$) 含量降低, IL-10 (7.33 ± 0.46 , $P < 0.001$) 含量升高, 创面组织中 SOD 活性 (28.57 ± 1.58 , $P < 0.001$)、线粒体膜电位 (3.05 ± 0.48 , $P = 0.002$) 升高, MDA 活性 (1.59 ± 0.05 , $P < 0.001$)、细胞凋亡率 (1.30 ± 0.47 , $P = 0.005$)、超氧化物阴离子含量 (0.42 ± 0.01 , $P < 0.001$) 降低, TGF- β 1 (0.62 ± 0.16 , $P = 0.002$) 及 p-Smad3 (0.66 ± 0.23 , $P = 0.018$) 蛋白的表达升高。**结论:**富氢水可能通过激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路抑制烧伤皮肤组织的炎症反应及细胞凋亡, 并缓解氧化应激及线粒体功能障碍从而促进深 II 度烧伤大鼠的创面组织修复。

【关键词】深 II 度烧伤; 富氢水; TGF- β 1/Smad3 信号通路; 创面修复; 伤口愈合

【中图分类号】R644

【文献标志码】A

The mechanism of hydrogen-rich water promoting deep second-degree burn wound healing in rats by regulating TGF- β 1/Smad3 signaling pathway

Cui Qiang, Wang Hongjin, Wu Xiaowei, Feng Yanping, Zhang Kewei, Ding Xiangpu, Wang Xianzhen

(Department of Burn and Plastic Surgery, Qinghai University Affiliated Hospital)

【Abstract】Objective: To explore the effects of hydrogen-rich water in promoting wound healing in rats with deep second-degree burns and the underlying molecular mechanism. **Methods:** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, sham burn group, model group, hydrogen-rich water group, and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) inhibitor group, with six rats in each group. A rat model of deep second-degree burns was established using a circular high-temperature burn device. The rats in the TGF- β 1 inhibitor group were intraperitoneally given SB-431542 at a dose of 15 mg/kg before modeling. After modelling, the TGF- β 1 inhibitor group and hydrogen-rich water group were given 200 mL of hydrogen-rich water twice a day, while the other groups were given normal drinking water for two consecutive weeks. For all the groups, we observed the healing of skin burns; examined the pathological

作者介绍: 崔 强, Email: 1181548413@qq.com,

研究方向: 烧伤、整形、瘢痕、创面修复。

通信作者: 王献珍, Email: 10052690@qq.com。

基金项目: 青海省科技厅资助项目(编号: 2023-ZJ-795)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250925.1128.002>

(2025-09-25)

changes of the wounds with hematoxylin and eosin staining; measured serum levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), and interleukin-10 (IL-10) by enzyme-linked immunosorbent assay; determined the content of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and superoxide anion in wound tissue using biochemical kits; examined cell apoptosis in

wound tissue with TUNEL staining; measured the expression of proliferating cell nuclear antigen in wound tissue with immunohistochemical staining; measured the mitochondrial membrane potential in wound tissue by flow cytometry with JC-1 staining; and measured the expression of TGF- β 1, SMAD family member 3 (Smad3), and phosphorylated Smad3 (p-Smad3) in wound tissue by Western blot. **Results:** Compared with the control group, the model group showed the loss of the epidermal structure of the wound tissue, extensive cell necrosis in the dermis accompanied by massive inflammatory cell infiltration, and bleeding and erythrocyte extravasation in the skin tissue, which indicated that the model was successfully established. Compared with the model group, the hydrogen-rich water group showed significant decreases in serum levels of TNF- α ($42.18 \pm 1.09, P < 0.001$) and IL-1 β ($4.82 \pm 0.24, P < 0.001$), a significant increase in the serum IL-10 level ($7.33 \pm 0.46, P < 0.001$), significant increases in SOD activity ($28.57 \pm 1.58, P < 0.001$) and the mitochondrial membrane potential ($3.05 \pm 0.48, P = 0.002$) in wound tissue, significant reductions in MDA activity ($1.59 \pm 0.05, P < 0.001$), superoxide anion content ($0.42 \pm 0.01, P < 0.001$), and the cell apoptosis rate ($1.30 \pm 0.47, P = 0.005$) in wound tissue, and significant increases in the protein expression of TGF- β 1 ($0.62 \pm 0.16, P = 0.002$) and p-Smad3 ($0.66 \pm 0.23, P = 0.018$) in wound tissue. **Conclusion:** Hydrogen-rich water may activate the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway to inhibit the inflammation and cell apoptosis of burned skin and relieve oxidative stress and mitochondrial dysfunction, thereby promoting wound tissue repair in rats with deep second-degree burns.

[Key words] deep second-degree burn; hydrogen-rich water; TGF- β 1/Smad3 signaling pathway; wound repair; wound healing

烧伤是由于火、电、高温水烫伤等因素引起的一类软组织损伤,是临床上较常见的外伤性疾病,可损害与烧伤区域皮肤接触的组织或器官,甚至导致全身多组织器官并发症^[1-2]。按烧伤深度可将皮肤烧伤分为 I 度、浅 II 度、深 II 度、III 度四种类型,其中最常见的类型是深 II 度烧伤,其损伤可达真皮层,如果不立即处理就可能延长修复周期并留下瘢痕^[3]。深度烧伤创面修复是治疗烧伤过程中的一个难题。目前临床上常采用敷料覆盖、清创术、皮肤移植等手段治疗深 II 度烧伤,但这些方法都有一定的局限性,治疗效果不佳,因此探究能有效治疗烧伤且无副作用的药物具有重大的研究意义^[4]。

近年来,氢分子被证明是一种安全有效的生理调节药物,在许多炎症相关疾病中具有抗氧化、抗炎和抗凋亡作用^[5]。预防性滴注富氢水可有效抑制碱烧伤诱导的炎症,并抑制烧伤后的角膜疤痕的形成,促进组织修复^[6]。动物实验和临床实验的研究也证实了氢分子对伤口愈合的促进作用^[7]。然而截至目前氢分子对深 II 度烧伤大鼠的保护作用及其机制还尚不明确。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是促进成纤维细胞的转化因子,可根据细胞活化或分化程度的不同,双向调节细胞的细胞功能,从而促进伤口的愈合^[8]。SMAD 家族成员 3 (SMAD family member 3, Smad3) 蛋白作为 TGF- β 1 最重要的胞内信号转导蛋白,当 TGF- β 1/Smad3 信号通路被激活时可促进上皮新生组织生成从而修复创面^[9]。因此,本研究基于 TGF-

β 1/Smad3 信号通路出发,探究富氢水促进深 II 度烧伤大鼠的创面愈合的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物

30 只 7 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 (200 ± 10) g,由四川维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号为:SYXK(川)2023-0263;动物使用许可证号为:SCXK(川)2023-0040。随机分笼饲养于屏障环境,每笼 4 只,让大鼠自由饮食和饮水,将室内温度保持在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度保持在 40%~70%,昼夜光照,所有实验已获得实验动物福利伦理委员会批准,并尽最大努力减少动物痛苦。

1.2 药物与试剂

参照文献[10]的方法利用高压将富氢水溶于生理盐水,制备氢含量为 0.5 ppm 的富氢水。富氢水(氢活力官方企业店);SB-431542(MedChemExpress,货号:HY-10431,10 mg);0.9%生理盐水(四川科伦药业股份有限公司);DMSO(Sigma, D4540);75%乙醇(北京西浓科技有限公司);乳酸钠林格溶液(北京百奥莱博科技有限公司 货号:GL2160);Elisa 检测试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,货号:ZC-37624,ZC-36379,ZC-36391);SOD 及 MDA 含量检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A001-3-1,A003-1-1);超氧阴离子含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:BC1290);苏木素染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号:G1004);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,货号:YE2080);免疫组化 SP 法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:SPN-9002);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZLI-9018);增殖细胞核抗原(prolif-

erating cell nuclear antigen, PCNA) 及 HRP 标记山羊抗兔抗体 (Servicebio, 货号: GB11010-1, GB23303); β -actin 肌动蛋白、Smad3、磷酸化 SMAD 家族成员 3 (phosphorylated SMAD family member 3, p-Smad3)、TGF- β 1 抗体 (abclonal 公司, 货号: AC026, AP0727, A19115, A18692), JC-1 检测试剂盒 (碧云天, C2006)。

1.3 主要仪器

小动物控温烫伤仪 (北京冀诺泰科技发展有限公司, 型号: YLS-5Q); 台式高速冷冻离心机 (湘仪集团, 型号: H2050R); 垂直电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号: JY-SCZ4⁺); 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号: JY200C); 脱色摇床 (上海程捷仪器设备有限公司, 型号: HY-5); 化学发光凝胶成像系统 (上海金鹏分析仪器有限公司, JP-K900); 高速低温组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 型号: KZ-III-F); 超低温冰箱 (海尔集团, 型号: DW-86L386); 酶标仪 (美谷分子仪器有限公司, 型号: SpectraMAX Plus384); 分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司, 型号: UV752N 型); 流式分析仪 (Beckman, 型号: cytoflex) 等。

1.4 方法

1.4.1 动物模型制备 随机将大鼠分为对照组、假烧伤组、模型组、富氢水组、TGF- β 1 抑制剂组 5 组, 每组 6 只大鼠。对照组大鼠不做任何处理, 其余各组大鼠以 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉后剃除背部毛发, 用 8% 硫化钠溶液脱毛, 假烧伤组大鼠脱毛后立即腹腔注射 5 mL 乳酸钠林格溶液, 其余 3 组大鼠用直径为 2.5 cm 的圆形烫伤仪探头烫伤脱毛区皮肤, 形成紧靠筋膜的全层皮肤缺损圆形创面, 然后立即腹腔注射 5 mL 乳酸钠林格溶液以抗休克, 通过 HE 染色观察创伤组织的病理变化观察到部分真皮层内细胞坏死、部分毛囊、汗腺等附件结构完整, 即可判定造模成功。

1.4.2 给药及取材 造模成功后开始给药, TGF- β 1 抑制剂组大鼠在造模前腹腔注射用 DMSO 稀释过的 15 mg/kg 的 TGF- β 1 抑制剂 SB-431542, 然后在造模成功后与富氢水组一样在 20 °C~22 °C 下用带有紧密的橡胶盖的玻璃瓶每天灌胃 2 次 200 mL 的富氢水, 其余大鼠常规饮水, 连续治疗 2 周。给药结束后大鼠禁食不禁水 24 h, 用 5% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉采集血液完成后处死大鼠, 采集创面组织后置于 -80 °C 冰箱进行保存和备用。

1.4.3 观察指标及检测方法

1.4.3.1 HE 染色观察创面组织病理学变化 创伤后第 5~14 天, 这是肉芽组织形成和再生的关键阶段, 因此本试验创伤后第 14 天采集大鼠的创面组织, 在取材之前, 使用如氟烷麻醉确保大鼠在整个过程中尽量无痛。为了避免感染, 取材时需使用无菌器械和无菌技术, 保持操作环境的清洁。取材时, 选择创面中央及周围正常皮肤组织, 便于对比。取材范围包括创面及其边缘的 1~2 mm 正常组织。使用手术刀、剪刀和镊子等无菌工具, 轻柔地切除所需的组织样本。取材

后, 立即将组织样本放入适当的固定液 (如 10% 福尔马林) 中, 或用于冷冻保存 (如液氮中)。4% 中性甲醛溶液固定, 不同浓度的乙醇溶液脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋切片, 脱蜡至水, 苏木精与伊红染色, 脱水, 中性树胶封片, 用显微镜在 200 倍和 400 倍下观察创面组织的病理形态学变化, 拍照并保存。

1.4.3.2 Elisa 法检测创面组织中 IL-6、TNF- α 及 IL-10 的水平 大鼠脱颈处死后采集腹主动脉血液 2 mL, 抗凝摇匀后于 2 000 r/min 的条件下离心 15 min, 分离出血清后用试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 的含量。

1.4.3.3 生化试剂盒检测创面组织中 SOD、MDA 及超氧化物阴离子的活性 大鼠脱颈处死后采集创面组织, 按照 SOD、MDA 及超氧化物阴离子检测试剂盒说明书操作, 用分光光度法检测在 530 nm 处的吸光度值。

1.4.3.4 TUNEL 染色检测创面组织中的细胞凋亡 大鼠脱颈处死后采集创面组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h。石蜡包埋后切片, 脱蜡至水, 柠檬酸微波修复, 荧光 TUNEL 试剂孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, DAPI 染细胞核, PBS 冲洗, 甘油明胶封片, 采用 3DHISTECH (Hungary) 生产的 Panoramic 250 数字切片扫描仪进行扫描, 然后进行图像采集, 每张切片先于 100 倍下观察全部组织, 再根据组织大小采集 3 个区域 9 张 400 倍图像, 进行凋亡细胞分析。

1.4.3.5 免疫组化染色检测创面组织中 PCNA 的表达情况 大鼠脱颈处死后采集创面组织, 固定脱水后用石蜡包埋切片, 脱蜡至水, 浸入柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶, 血清封闭, 滴加一抗 PCNA 抗体, PBS 洗后 DAB 显色, 苏木素复染后脱水封片。用显微摄影系统采集图像, 每张切片先于低倍下观察全部组织, 再分别采集 200 倍及 400 倍显微图像, 苏木素染细胞核为蓝色, PCNA 显出的阳性表达棕黄色。

1.4.3.6 Western blot 法检测创面组织中 TGF- β 、Smad3、p-Smad3 的表达 大鼠脱颈处死后采集创面组织, 提取蛋白后用 BCA 法检测蛋白浓度, 将蛋白质样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到 PVDF 膜后, 在 5% 封闭液中 (TBST 配制) 封闭 2 h, 加入 TGF- β 、Smad3、p-Smad3 和 β -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜。加入用 5% BSA 配制的相应二抗, 室温摇床孵育 1.5 h。TBST 洗膜 3 次后进行化学发光法显色, 结果采用 Image J 软件对图像进行定量分析。

1.4.3.7 JC1 流式检测创面组织中线粒体膜电位的水平 大鼠脱颈处死后采集创面组织, 然后按照线粒体提取试剂盒说明书提取线粒体后纯化, 将纯化的线粒体与 JC-1 缓冲液混合后使用荧光酶标仪进行检测, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 590 nm。红色荧光和绿色荧光分别代表正常线粒体和去极化线粒体。以红色荧光/绿色荧光的比值表示线粒体膜电位。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行统计分析, 计量资料

采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, 方差齐用最小差数 (LSD) 法进行多重检验, 方差不齐用 Tamhane's 进行多重检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 富氢水对深 II 度烧伤大鼠创面愈合程度的影响

对照组与假烧伤组无伤口。由图 1 可知, 给药第 1~5 天, 模型组大鼠烧伤创面干燥、厚实, 呈黑褐色; 富氢水组大鼠的创面均比较湿润、柔软, 呈棕褐色, 且出现结痂。给药第 14 天, 富氢水组大鼠创面面积明显缩小, 已有极大程度的愈合; TGF- β 1 抑制剂组大鼠创面处出现结痂, 但其创面面积大于富氢水组。

与模型组比较, 给药第 14、21、28 天富氢水组大鼠创面的愈合率 ($t=7.932, P<0.001; t=3.641, P=0.000; t=4.184, P<0.001$) 显著升高; 与富氢水组比较, 给药第 14 天 TGF- β 1 抑制剂组大鼠创面的愈合率降低 ($t=3.419, P=0.001$), 提示富氢水组大鼠创面具有最佳的愈合情况 (表 1)。

2.2 富氢水对深 II 度烧伤大鼠创面组织病理变化的影响

HE 染色观察创面组织的病理形态学变化, 结果发现对照组未见明显病变; 假烧伤组大鼠的未见明显病理变化; 模型组大鼠的创面皮肤组织表皮层缺失较为严重, 真皮层处胶原纤维发生不同程度的坏死, 见血管及大量纤维组织增生, 并伴有炎性细胞浸润, 皮肤组织出血, 红细胞溢出, 毛囊和皮脂腺等附属器结构完整。富氢水组大鼠的创面组织表皮层增厚, 炎性细胞浸润及皮肤出血程度明显减轻。TGF- β 1 抑

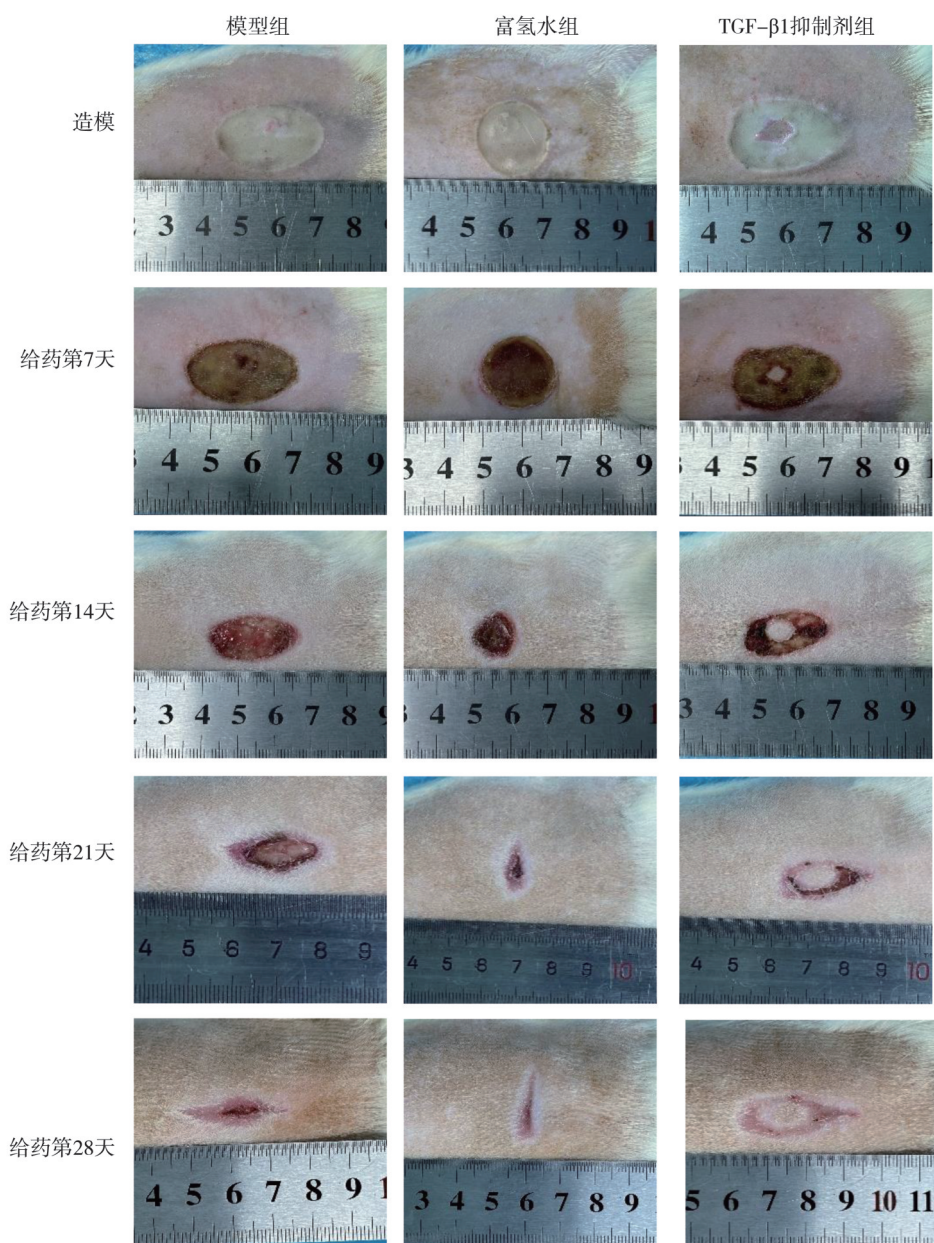


图 1 各组大鼠烧伤创面的愈合情况

制剂组大鼠的创面组织的病变程度有所加重(图2)。

2.3 富氢水对深Ⅱ度烧伤大鼠细胞增殖及凋亡的影响

通过对反映细胞增殖能力的PCNA蛋白含量进行检测,对照组、假烧伤组、模型组、富氢水组、TGF-β1抑制剂组PCNA蛋白含量分别为(2.35±1.09)%、(3.22±0.63)%、(7.57±1.00)%、(19.56±1.60)%、(15.98±1.79)%,差异有统计学意义($P<0.01, F=104.193$)。与对照组相比,假烧伤组大鼠创面组织中PCNA的表达无明显变化。模型组大鼠创面组织PCNA的表达高于对照组($t=6.142, P=0.01$)。富氢水组大鼠创面组织PCNA的表达高于模型组($t=10.770, P=$

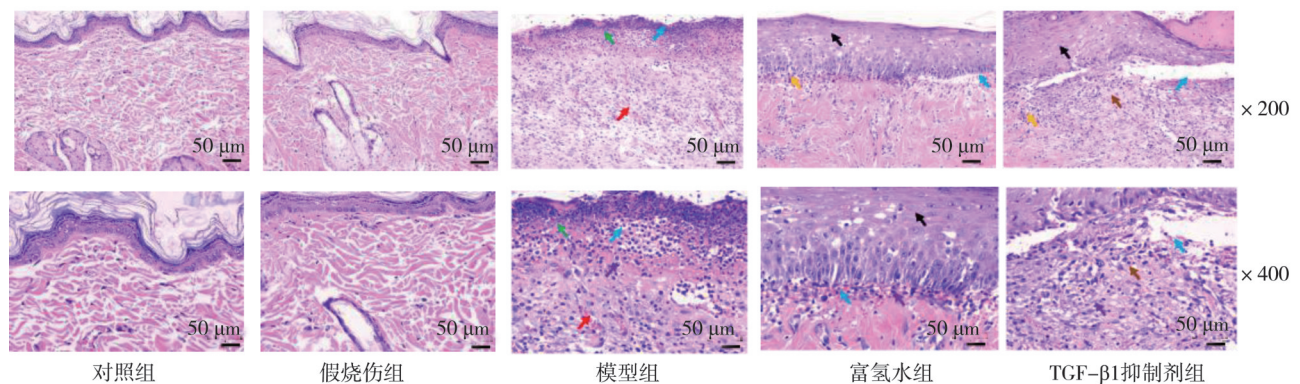
0.001)。TGF-β1抑制剂组大鼠创面组织PCNA的表达低于富氢水组($t=2.362, P=0.011$)(图3)。

用TUNEL染色对创面组织的细胞凋亡率进行检测(图4),对照组、假烧伤组、模型组、富氢水组、TGF-β1抑制剂组细胞凋亡率分别为(0.38±0.17)%、(0.29±0.26)%、(7.50±4.63)%、(1.30±0.47)%、(2.80±0.98)%,差异有统计学意义($P<0.01, F=5.917$)。结果如图5所示,假烧伤组大鼠创面组织的细胞凋亡率与对照组无明显差异。模型组大鼠创面组织的细胞凋亡率高于对照组($t=2.661, P=0.002$)。富氢水组大鼠创面组织的细胞凋亡率低于模型组($t=2.305, P=$

表1 各组大鼠创面愈合率($\bar{x} \pm s$)

组别	第7天(%)	第14天(%)	第21天(%)	第28天(%)
对照组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
假烧伤组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	20.64 ± 1.28	36.93 ± 8.36	71.71 ± 11.15	94.34 ± 2.34
富氢水组	35.05 ± 3.46	75.71 ± 1.34 ^a	95.30 ± 1.25 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
TGF-β1抑制剂组	20.86 ± 5.51	48.07 ± 13.94 ^b	87.49 ± 1.87	99.53 ± 0.64
F值	78.287	59.809	258.626	7 333.530
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:a,与模型组比较, $P<0.01$;b,与富氢水组比较, $P<0.01$



注:真皮层变性、坏死(↑);血管增生(↑);炎性细胞浸润(↑);淋巴细胞(↑);出血(↑);表皮增厚(↑);纤维组织增生(↑)

图2 各组大鼠烧伤皮肤组织的病理形态学变化(HE, 200×和400×)

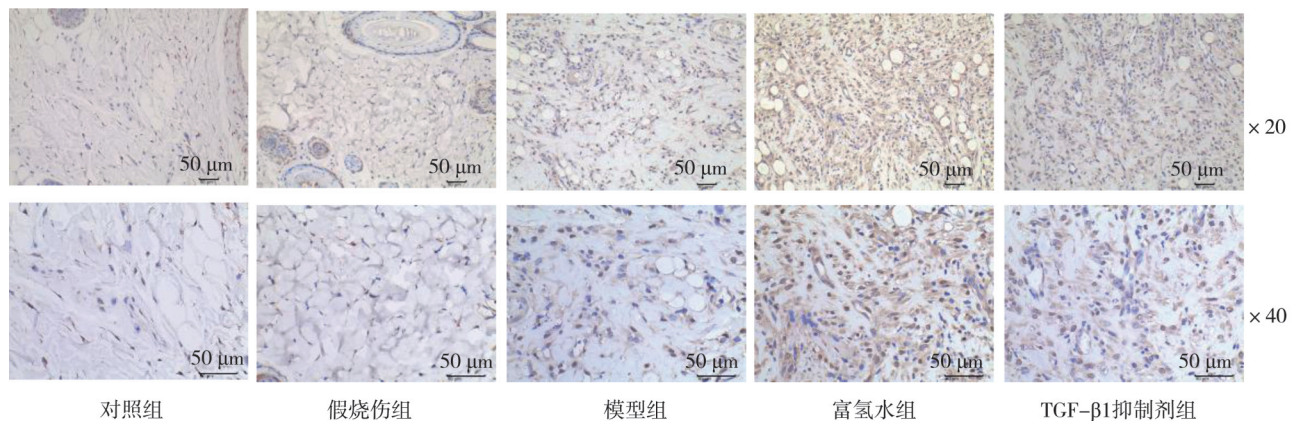


图3 各组大鼠烧伤皮肤组织中PCNA蛋白的表达(20×和40×)

0.005)。TGF-β1 抑制剂组大鼠创面组织的细胞凋亡率高于富氢水组,但差异无统计学意义。

2.4 富氢水对深 II 度烧伤大鼠氧化应激及炎症的影响

由表 2 可知,假烧伤组大鼠创面组织中 SOD 活性及 MDA 活性及血清 TNF-α、IL-1β、IL-10、超氧化物阴离子水平与对照组比较均无明显差异。模型组大鼠 SOD 活性及 IL-10 的水平低于对照组 ($t=5.718, P<0.001; t=17.100, P<0.001$),MDA 活性及 TNF-α、IL-1β、超氧化物阴离子水平高于对照组 ($t=9.630, P<0.001; t=110.900, P<0.001; t=29.080, P<0.001; t=8.402, P<0.001$)。富氢水组大鼠 SOD 活性及 IL-10 水平高于模型组 ($t=5.635, P<0.001; t=10.650, P<0.001$),MDA 活性及 TNF-α、IL-1β、超氧化物阴离子的水平低于模型组 ($t=8.965, P<0.001; t=28.960, P<0.001; t=17.550, P<0.001; t=10.700, P<0.001$)。TGF-β1 抑制剂组大鼠 SOD 活性及 IL-10 水平低于对照组 ($t=5.540, P=0.004; t=4.495, P<0.001$),MDA 活性及 TNF-α、IL-1β、超氧化物阴离子水平高于富氢水组 ($t=4.721, P<0.001; t=10.170, P<0.001; t=8.245, P<0.001; t=5.779, P=0.001$)。

2.5 富氢水对深 II 度烧伤大鼠线粒体功能的影响

对照组、假烧伤组、模型组、富氢水组、TGF-β1 抑制剂组大鼠创面组织线粒体膜电位分别为 $5.79 \pm 1.33, 4.47 \pm 0.51, 0.72 \pm 0.30, 3.05 \pm 0.48, 1.76 \pm 0.37$, 差异有统计学意义 ($P<0.01, F=25.037$)。模型组大鼠线粒体膜电位低于对照组 ($t=6.455, P<0.001$)。富氢水组线粒体膜电位高于模型组 ($t=7.146, P=0.002$)。TGF-β1 抑制剂组线粒体膜电位低于富氢水组 ($t=3.708, P=0.048$) (图 5)。

2.6 富氢水对深 II 度烧伤大鼠 TGF-β1/Smad3 信号通路活化的影响

由图 6,表 3 可知,与对照组比较,假烧伤组大鼠创面组织中 TGF-β1、Smad3 及 p-Smad3 蛋白的表达差异无统计学意义;模型组大鼠创面组织中 TGF-β1、p-Smad3 蛋白的表达明显降低 ($t=14.210, P<0.001; t=5.873, P=0.001$),Smad3 的表达无明显变化。与模型组比较,富氢水组大鼠创面组织中 TGF-β1、p-Smad3 蛋白的表达明显升高 ($t=4.957, P=0.002; t=3.393, P=0.018$)。与富氢水组比较,TGF-β1 抑制剂组创面组织中 TGF-β1、p-Smad3 蛋白的表达均有所降低,TGF-β1 的表达在 2 组间差异有统计学意义 ($t=1.823, P=0.031$)。

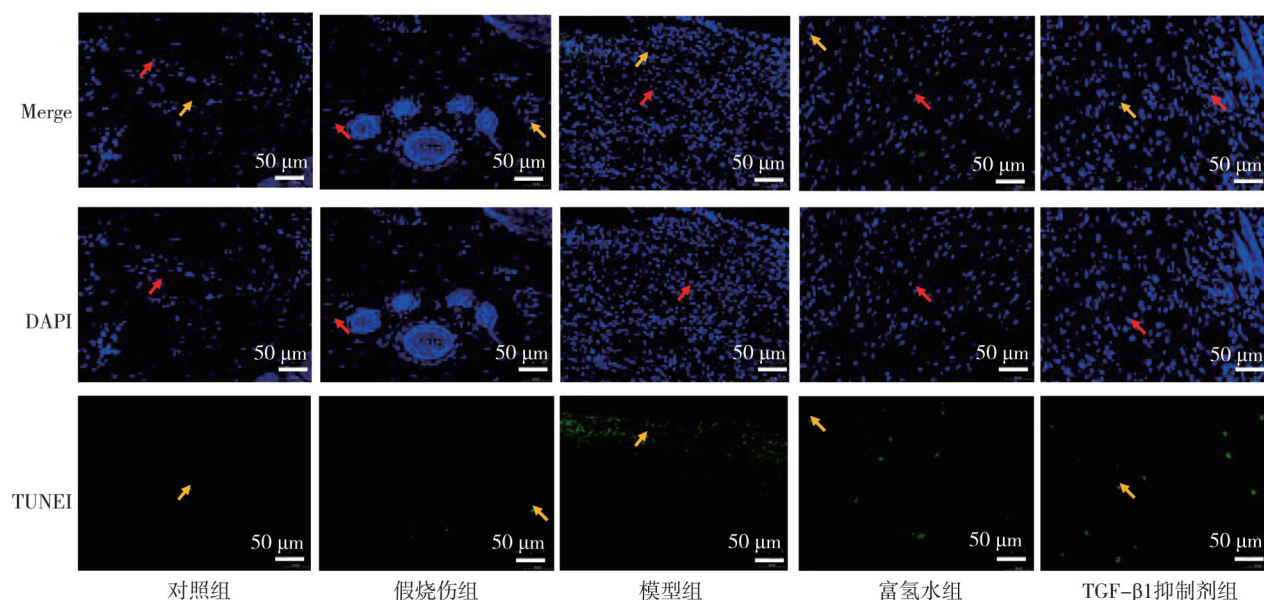


图 4 各组大鼠烧伤皮肤组织的细胞凋亡率 (×400)

表 2 各组大鼠 SOD、MDA 活性及 TNF-α、IL-1β、IL-10、超氧化阴离子水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	超氧化阴离子 (μmol/g)
对照组	32.45 ± 3.16	1.37 ± 0.11	19.32 ± 0.47	4.14 ± 0.15	9.38 ± 0.16	0.39 ± 0.04
假烧伤组	31.97 ± 1.90	1.40 ± 0.07	19.08 ± 0.91	4.13 ± 0.12	9.58 ± 0.32	0.39 ± 0.03
模型组	19.65 ± 2.24 ^a	2.36 ± 0.14 ^a	62.05 ± 0.48 ^a	7.65 ± 0.15 ^a	4.05 ± 0.27 ^a	0.67 ± 0.04 ^a
富氢水组	28.57 ± 1.58 ^b	1.59 ± 0.05 ^b	42.18 ± 1.09 ^b	4.82 ± 0.24 ^b	7.33 ± 0.46 ^b	0.42 ± 0.01 ^b
TGF-β1 抑制剂组	22.20 ± 1.2 ^c	2.06 ± 0.17 ^c	51.23 ± 1.09 ^c	6.04 ± 0.09 ^c	5.20 ± 0.53 ^c	0.57 ± 0.04 ^c
F 值	22.202	42.423	1 513.689	275.662	68.312	37.079
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:a,与对照组比较, $P<0.01$;b,与模型组比较, $P<0.01$;c,与富氢水组比较, $P<0.01$

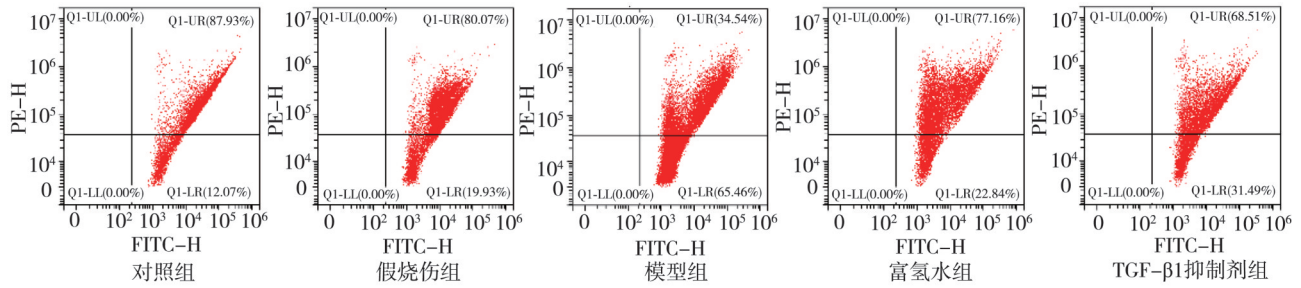


图5 各组大鼠JC-1 流式检测创面组织中线粒体膜电位的水平

表3 各组大鼠TGF-β1、Smad3及p-Smad3蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β1	Smad3	p-Smad3
对照组	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.03	0.99 ± 0.22
假烧伤组	0.99 ± 0.07	0.98 ± 0.02	0.95 ± 0.26
模型组	0.11 ± 0.06 ^a	0.95 ± 0.05	0.18 ± 0.10 ^a
富氢水组	0.62 ± 0.16 ^b	0.99 ± 0.12	0.66 ± 0.23 ^c
TGF-β1抑制剂组	0.38 ± 0.16 ^d	0.99 ± 0.09	0.40 ± 0.22
F值	33.274	0.236	8.312
P值	<0.01	<0.01	<0.01

注:a,与对照组比较, $P < 0.01$;b,与模型组比较, $P < 0.01$;c,与模型组比较, $P < 0.05$;d,与富氢水组比较, $P < 0.05$

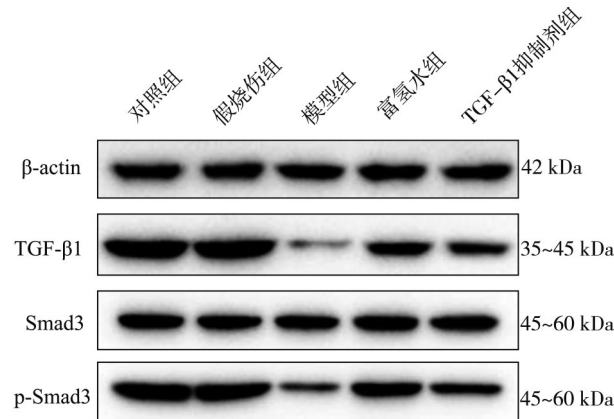


图6 检测大鼠烧伤皮肤组织TGF-β1、Smad3及p-Smad3蛋白表达

3 讨论

烧伤是皮肤损伤的常见原因,严重时会导致皮肤功能的丧失,进而引起代谢紊乱和炎症损伤,甚至会引发全身炎症反应综合征^[11]。探究能够有效促进创面愈合的药物及其作用机制是治疗烧伤面临的一个关键问题。深Ⅱ度烧伤是一种难治愈的创面组织修复类型,其病理机制复杂,致残率及死亡率较高,对烧伤患者的生活质量及生命健康带来了严重的影响^[12]。烧伤组织创面的修复涉及炎症反

应、组织水肿及创面细胞的增殖和凋亡等多个生物学过程^[13],从调节炎症、细胞增殖及凋亡等角度出发分析烧伤的病理机制,可为探索治疗烧伤的有效药物提供科学依据。

氢作为一种新型抗氧化剂,可以选择性清除过氧亚硝酸盐自由基和羟基自由基,具有高效低成本、低毒等优点。氢气分子具有水溶性和脂溶性,可通过自由扩散的方式穿透细胞膜到达线粒体等靶向细胞器。最新的生物学基础和临床研究表明氢气是细胞和器官重要的生理性调节因子。氢分子在氧化还原反应中直接与自由基反应,特别是与羟基自由基反应,从而发挥各种治疗效果^[14]。研究发现氢气可通过调控炎症因子的水平抑制肝脏的炎症反应,并缓解脑缺血再灌注导致的氧化应激损伤^[15]。富氢生理盐水广泛应用于各种疾病的动物模型中,孙强^[16]研究发现腹腔注射氢盐水能有效改善大鼠缺血缺氧性脑损伤,Ikeda M等^[17]研究发现氢气水能够保护肠道组织,避免炎症反应及渗漏。另外,研究已证实氢气水可通过抑制新生血管的生成有效改善大鼠角膜的碱烧伤,并促进伤口的愈合^[10,15]。本研究采用温度 106 °C、压力 0.03 MPa 持续 5 s 的方法制备深Ⅱ度烧伤大鼠模型,经富氢水灌胃 14 d 后大鼠皮肤烧伤组织的创面面积减少,结痂率增加,组织中的炎性细胞浸润减少,且皮肤出血程度有所减轻,提示富氢水能够有效促进创面组织修复。

炎症因子是导致阻碍创面组织修复并使其坏死加重的重要原因。因此,抑制促炎因子释放是促进创面愈合的有效途径。烧伤会导致 ROS 水平异常升高及炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的大量合成与释放,诱导机体发生炎症反应,并使氧化应激相关因子 MDA、SOD 含量异常而造成创面的氧化应激损伤^[18]。TNF-α、IL-1β 作为趋化因子可进

一步促进自身及 IL-6 表达上调,从而形成炎症级联反应而加重炎症损伤,IL-6 能够刺激 ROS 合成与释放,从而加重氧化应激损伤^[19]。本研究结果发现富氢水能有效降低大鼠血清中促炎因子 TNF- α 及 IL-1 β 的水平,同时提升抑炎因子 IL-10 的水平,另外,富氢水组大鼠创面组织中抗氧化应激因子 SOD 的活性明显升高,这表明富氢水可通过减轻炎症反应,缓解动物的氧化应激,从而促进大鼠烧伤皮肤组织愈合。

伤口愈合是一个复杂而动态的过程,由止血、炎症、增殖和重塑 4 个连续和重叠的阶段组成。烧伤会破坏线粒体稳态,导致形态改变、ATP 合成受损和 ROS 生成过多^[20]。线粒体功能调控有可能成为烧伤和伤口治疗的治疗靶点。线粒体是真核生物的主要能量来源,在维持皮肤稳态方面起着关键作用。线粒体功能的破坏会减少能量供应,同时释放线粒体内容物,如细胞色素 c、乙酰辅酶 A、ATP 等从而引发炎症反应和细胞死亡^[21]。线粒体是维持皮肤健康的重要参与者,皮肤表皮的持续再生取决于线粒体产生的 ATP^[22]。此外,线粒体呼吸和 ROS 生成在角质形成细胞的分化中也起着至关重要的作用,线粒体 ROS 激活 Notch 和 β -连环蛋白信号通路以增强表皮分化^[23]。超氧化物阴离子主要包含活性氧类,活性氧能够与细胞内脂质、蛋白质相互作用,导致细胞膜流动性的降低和膜结构的破坏^[24]。线粒体作为细胞中存在数量最多的细胞器,其数量改变可直接反映线粒体损伤情况^[25],当线粒体功能受损时,细胞超氧化物阴离子水平增加、线粒体数量减少、ATP 和线粒体膜电位降低及动力学失衡^[26]。细胞凋亡是指可通过死亡受体途径或线粒体途径发生的程序性细胞死亡,在调节烧伤的进展中起着至关重要的作用^[27]。在角质形成细胞中,烧伤会破坏线粒体膜完整性,导致诱导细胞凋亡^[28]。本研究结果发现富氢水能明显降低深 II 度烧伤大鼠创面组织中的超氧化物阴离子水平,并提高线粒体膜电位,同时降低创面组织的细胞凋亡率,促进创面组织中促增殖标志蛋白 PCNA 的表达,这表明富氢水可通过抑制创面组织的线粒体功能障碍和细胞凋亡从而促进创面愈合。TGF- β 1/Smad3 信号通路是创面愈合的重要调控途径。研究表明 TGF- β 1 能够有效促进伤口愈合;Smad3 蛋白可参与维持细胞内环境稳定,促进创面组织纤维化过程从而加速平滑

肌生长^[29],使创面组织短时间内进入细胞增生与迁移期,多环节治疗烧伤创面^[30]。为了探究富氢水促进创面修复的分子机制,本研究通过用 TGF- β 1 抑制剂干预深 II 度烧伤大鼠模型,结果发现富氢水可激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路,而 TGF- β 1 抑制剂可完全减轻富氢水抑制炎症、氧化应激、细胞凋亡及线粒体功能障碍的作用。

综上所述,富氢水可有效修复深 II 度烧伤大鼠的烧伤皮肤,其机制与激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路从而抑制创面组织的炎症反应及细胞凋亡,并缓解氧化应激及线粒体功能障碍有关。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 崔强:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;王洪瑾、吴晓伟:实施研究、分析数据、论文撰写;冯艳萍、张科伟:实验技术指导、分析数据;丁相普:数据收集;王献珍:研究方案设计、论文修改

参 考 文 献

- [1] 字灿忠,李燕琳.用负压封闭引流术治疗深二度烧伤创面的效果分析[J].中外医疗,2021,40(11):44-46.
- Zi CZ, Li YL. Effect analysis of negative pressure closed drainage in the treatment of deep second degree burn wound[J]. China & Foreign Medical Treatment, 2021, 40(11):44-46.
- [2] 王宇,胡晓红,刘玲英,等.不同浓度 hUCMSCs 对重度烧伤大鼠急性肺损伤的保护作用初探[J].现代生物医学进展,2017,17(24):4626-4630.
- Wang Y, Hu XH, Liu LY, et al. Protective effect of hUCMSCs with different concentrations on acute lung injury in severely burned rats[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(24):4626-4630.
- [3] Ahn HN, Kang HS, Park SJ, et al. Safety and efficacy of basic fibroblast growth factors for deep second-degree burn patients[J]. Burns, 2020, 46(8):1857-1866.
- [4] 姜笃银,贾珊珊,王兴蕾.烧伤治疗与创面修复[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2021,16(4):283-288.
- Jiang DY, Jia SS, Wang XL. Burn treatment and wound repair[J]. Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing(Electronic Edition), 2021, 16(4):283-288.
- [5] Jin ZK, Zhao PH, Gong WJ, et al. Fe-porphyrin: a redox-related biosensor of hydrogen molecule[J]. Nano Res, 2023, 16(2):2020-2025.
- [6] Kasamatsu M, Arima T, Ikebukuro T, et al. Prophylactic instillation of hydrogen-rich water decreases corneal inflammation and promotes wound healing by activating antioxidant activity in a rat alkali burn model[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17):9774.
- [7] Zhu YX, Jiang Q, Jin ZK, et al. Two-dimensional Mg₂Si nanosheet-enabled sustained hydrogen generation for improved repair and regeneration of deeply burned skin[J]. Adv Health Mater, 2023, 12

- (10):e2201705.
- [8] Kang JH, Jung MY, Yin XQ, et al. Cell-penetrating peptides selectively targeting SMAD3 inhibit profibrotic TGF- β signaling[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(7): 2541-2554.
- [9] 王 琰, 余 毅, 张红霞, 等. Akt/mTOR 在高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化中的表达及对核心结合因子的调节[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(18): 6.
- Wang Y, Yu Y, Zhang HX, et al. Expression of Akt/mTOR in high-phosphorus induced vascular smooth muscle cell calcification and its regulation of core binding factors[J]. *Chinese Medical Journal*, 2018, 98(18): 6.
- [10] Takeuchi S, Nagatani K, Otani N, et al. Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke-prone rats[J]. *BMC Neurosci*, 2015, 16: 22.
- [11] 巩文艺, 韩 冬. 黄芪多糖对严重烧伤大鼠心肌组织氧化应激和炎症反应的影响[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(6): 4.
- Gong WY, Han D. Effects of Astragalus polysaccharides on oxidative stress and inflammation in myocardial tissue of severely burned rats[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*, 2016, 25(6): 4.
- [12] 戴如冰, 陈 骅. 芹菜素对深 II 度烧伤模型大鼠急性肺损伤保护作用及机制研究[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2021, 31(3): 204-210.
- Dai R B, Chen H. Protective effect and mechanism of apigenin on acute lung injury in rats with deep II degree burn[J]. *Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2021, 31(3): 204-210.
- [13] 邓碧涵, 成鑫月, 祝筱梅, 等. 烫伤后海水浸泡合并创伤弧菌感染脓毒症大鼠模型的构建[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2026, 42(2): 143-152.
- Deng BH, Cheng XY, Zhu XM, et al. Establishing a rat model of sepsis by seawater immersion combined with *Vibrio vulnificus* infection after scald[J]. *Chin J Burns Wounds*, 2026, 42(2): 143-152.
- [14] Xie KL, Wang YQ, Yin LJ, et al. Hydrogen gas alleviates sepsis-induced brain injury by improving mitochondrial biogenesis through the activation of PGC- α in mice[J]. *Shock*, 2021, 55(1): 100-109.
- [15] 温 舒. 氢气水对大鼠碱烧伤角膜新生血管抑制作用及机制研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2018.
- Wen S. Inhibitory effect of hydrogen water on corneal neovascularization and its mechanism in rats with alkali burn[D]. Xinjiang: Shihezi University, 2018.
- [16] 孙 强. 氢气生物学效应系列研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2011.
- Sun Q. Series study on biological effects of hydrogen[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2011.
- [17] Ikeda M, Shimizu K, Ogura H, et al. Hydrogen-rich saline regulates intestinal barrier dysfunction, dysbiosis, and bacterial translocation in a murine model of sepsis[J]. *Shock*, 2018, 50(6): 640-647.
- [18] Hirano S, Zhou Q, Furuyama A, et al. Differential regulation of IL-1 β and IL-6 release in murine macrophages[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 1933-1943.
- [19] 张丽华, 陈 燕, 范莹盈, 等. 苦参水提物激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制炎症和氧化应激机制研究[J]. *中草药*, 2020, 51(1): 157-162.
- Zhang LH, Chen Y, Fan YY, et al. Study on the mechanism of inhibiting inflammation and oxidative stress by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway from Matrine water extract[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2020, 51(1): 157-162.
- [20] Prabhakaran HS, Hu DX, He WF, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy: crucial players in burn trauma and wound healing[J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkad029.
- [21] Grazioli S, Pugin J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: from inflammatory signaling to human diseases[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 832.
- [22] Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(8): 870-880.
- [23] Hamanaka RB, Glasauer A, Hoover P, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development[J]. *Sci Signal*, 2013, 6(261): ra8.
- [24] Adedara IA, Ojuade TJD, Olabiyi BF, et al. Taurine ameliorates renal oxidative damage and thyroid dysfunction in rats chronically exposed to fluoride[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 175(2): 388-395.
- [25] Duan CY, Kuang L, Xiang XM, et al. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH- pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 251.
- [26] Ning RH, Li Y, Du Z, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ attenuated PM_{2.5}-induced vascular fibrosis via regulating mitophagy[J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102113.
- [27] Bartolo F, Nerino A, Vincenzo G, et al. Role of apoptosis in disease[J]. *Aging*, 2012, 4(5): 12.
- [28] Rennekampff HO, Alharbi Z. Burn injury: mechanisms of keratinocyte cell death[J]. *Med Sci(Basel)*, 2021, 9(3): 51.
- [29] Radtke C, Sinis N, Sauter M, et al. TRPV channel expression in human skin and possible role in thermally induced cell death[J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32(1): 150-159.
- [30] 刘 筱, 伍伟明, 尹 婷, 等. 美洲大蠊提取液对大鼠难愈合创面 TGF- β 表达的影响[J]. *中医药导报*, 2018, 24(6): 5.
- Liu X, Wu WM, Yin T, et al. Effect of *Periplaneta americana* extract on TGF- β expression in refractory wounds of rats[J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2018, 24(6): 5.

(收稿: 2025-01-01; 修回: 2025-07-21; 录用: 2025-07-31)

(责任编辑: 曾 玲)

本文引用格式:

崔 强, 王洪瑾, 吴晓伟, 等. 富氢水通过调节 TGF- β 1/Smad3 信号通路促进大鼠深 II 度烧伤创面愈合[J]. *重庆医科大学学报*, 2026, 51(4): 554-562.