

[文章编号] 1671-587X(2025)05-1221-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250508

生肌玉红膏提取物对斑马鱼皮肤创面愈合的促进作用及其机制

滕欢欢¹, 孙光^{1,2}, 姜锐², 孙立伟², 刘建增³

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学附属医院中医药研究中心, 吉林 长春 130021; 3. 长春中医药大学东北亚中医药研究院中药所, 吉林 长春 130117)

[摘要] **目的:** 探究生肌玉红膏提取物(SYOE)对斑马鱼皮肤创面愈合的促进作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 取320条野生型AB系斑马鱼, 于侧腹部切口建立创面模型后, 随机分为对照组、低剂量SYOE组(置于含 $0.625\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SYOE的水中饲养)、高剂量SYOE组(置于含 $1.250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SYOE的水中饲养)和尿囊素组(置于含 $1.000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿囊素的水中饲养), 每组80条。分别于损伤后第7、14和21天拍照记录斑马鱼皮肤创面面积, 计算创面愈合率。于不同时间点收集各组斑马鱼创面皮肤组织制作组织切片, 采用HE染色观察第0、7、14和21天各组斑马鱼皮肤创面边缘宽度, 天狼星红染色检测损伤后第2、4、6和8天各组斑马鱼皮肤创面组织中的胶原蛋白水平, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测损伤后第4天各组斑马鱼皮肤创面组织中I型胶原蛋白(Col I)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法分析损伤后第4天各组斑马鱼皮肤创面组织中Col I编码基因 $coll1a1a$ 、 $coll1a1b$ 、 $coll1a2$ 和 α -SMA以及转化生长因子 β (TGF- β)/Smad信号通路关键因子 $tgfb1a$ 、 $smad2$ 和 $smad3a$ mRNA表达水平。**结果:** 创面愈合评估, 与对照组比较, 损伤后第7、14和21天低剂量SYOE组、高剂量SYOE组及尿囊素组斑马鱼皮肤创面愈合率明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 其中高剂量SYOE组在第21天时斑马鱼皮肤创面愈合率达84%。HE染色, 与对照组比较, 损伤后第14和21天, 低剂量SYOE组、高剂量SYOE组及尿囊素组斑马鱼皮肤创面边缘宽度明显减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。天狼星红染色, 损伤后第6和8天, 与对照组比较, 低剂量SYOE组、高剂量SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面组织中胶原蛋白水平明显升高($P<0.01$)。ELISA法检测, 损伤后第4天, 与对照组比较, 低剂量SYOE组、高剂量SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面组织中Col I及 α -SMA水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。RT-qPCR法检测, 损伤后第4天, 与对照组比较, 低剂量SYOE组斑马鱼皮肤创面组织中 $coll1a1b$ 、 $coll1a2$ 、 α -SMA、 $tgfb1a$ 和 $smad2$ mRNA表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 高剂量SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面组织中 $coll1a1a$ 、 $coll1a1b$ 、 $coll1a2$ 、 α -SMA、 $tgfb1a$ 、 $smad2$ 及 $smad3a$ mRNA表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论:** SYOE能够增加斑马鱼皮肤创面的胶原蛋白沉积, 促进皮肤创面愈合, 并提高TGF- β /Smad信号通路相关基因的表达水平。

[关键词] 生肌玉红膏提取物; 创面愈合; 斑马鱼; 胶原蛋白沉积; 转化生长因子 β ; Smad

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-11-08 [录用日期] 2024-12-19

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(YDZJ202201ZYTS283); 吉林省中医药管理局中医药科技项目(2022123)

[作者简介] 滕欢欢(1997-), 女, 黑龙江省绥化市人, 在读硕士研究生, 主要从事中药健康产品研发和开发方面的研究。

[通信作者] 孙立伟, 教授, 博士研究生导师(E-mail: sunyililwei@163.com);

刘建增, 助理研究员(E-mail: liujz_1988@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Promotive effect of Shengji Yuhong Ointment extract on skin wound healing of zebrafish and its mechanism

TENG Huanhuan¹, SUN Guang^{1,2}, JIANG Rui², SUN Liwei², LIU Jianzeng³

(1. School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Research Center of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China; 3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Northeast Asia Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the promotive effect of Shengji Yuhong Ointment extract (SYOE) on skin wound healing of zebrafish, and to clarify its mechanism. **Methods:** A total of 320 wild-type AB strain zebrafish were used to establish a wound model by making an incision on the lateral abdomen. The zebrafish were randomly divided into control group, low dose of SYOE group (raised in water containing $0.625 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SYOE), high dose of SYOE group (raised in water containing $1.250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SYOE), and allantoin group (raised in water containing $1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ allantoin), and there were 80 zebrafish in each group. The wound areas were recorded by photographs on days 7, 14, and 21 after injury, and the wound healing rates were calculated. The skin tissue samples from the wound sites of the zebrafish in various groups were collected at different time points to prepare histological sections. HE staining was used to observe the widths of skin wound edges of the zebrafish on days 0, 7, 14, and 21 in various groups; Sirius red staining was used to detect the collagen levels in the wound tissues of the zebrafish on days 2, 4, 6, and 8 after injury in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of type I collagen (Col I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in the wound tissues on day 4 after injury; real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the mRNA expression levels of Col I-encoding genes (*colla1a*, *colla1b*, and *colla2*) and α -SMA as well as key factors of the transforming growth factor β (TGF- β)/Smad signaling pathway (*tgfb1a*, *smad2*, and *smad3a*) in the wound tissues of the zebrafish in various groups on day 4 after injury. **Results:** The wound healing assessment results showed that compared with control group, the wound healing rates of the zebrafish in low dose of SYOE group, high dose of SYOE group, and allantoin group were significantly increased on days 7, 14, and 21 after injury ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the wound healing rate in high dose of SYOE group achieved 84% on day 21. The HE staining results showed that compared with control group, the widths of skin wound edges of the zebrafish in low dose of SYOE group, high dose of SYOE group, and allantoin group were significantly decreased on days 14 and 21 after injury ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Sirius red staining results showed that compared with control group, the collagen levels in the skin wound tissue of the zebrafish in low dose of SYOE group, high dose of SYOE group, and allantoin group were significantly increased on days 6 and 8 after injury ($P < 0.01$). The ELISA results showed that on day 4 after injury, compared with control group, the levels of Col I and α -SMA in the skin wound tissue of the zebrafish in low dose of SYOE group, high dose of SYOE group, and allantoin group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The RT-qPCR results showed that on day 4 after injury, compared with control group, the expression levels of *colla1b*, *colla2*, α -SMA, *tgfb1a*, and *smad2* mRNA in the skin wound tissue of the zebrafish in low dose of SYOE group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression levels of *colla1a*, *colla1b*, *colla2*, α -SMA, *tgfb1a*, *smad2*, and *smad3a* mRNA in the skin wound tissue of the zebrafish in high dose of SYOE group and allantoin group were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** SYOE can increase the collagen deposition in skin wound of zebrafish, promote wound healing, and upregulate the expression of genes related to the TGF- β /Smad signaling pathway.

KEYWORDS Shengji Yuhong Ointment extract; Wound healing; Zebrafish; Collagen deposition; Transforming growth factor β ; Smad

皮肤作为人体最大的器官和外部屏障, 主要承担着抵御物理刺激、化学损伤、病原微生物侵袭和机械应力等功能^[1]。全层皮肤损伤(严重烧伤、创伤、复杂软组织感染或手术切除)会破坏皮肤的正常生理功能和屏障功能^[2]。皮肤受损后易出现创面愈合不良, 进而引发增生性瘢痕或瘢痕疙瘩, 对患者的生活质量造成严重而持久的负面影响。多年来, 研究人员致力于寻找人类创面修复的有效方法^[3], 但结果并不理想。胶原蛋白作为构成皮肤组织的重要成分, 其在创面修复和愈合中起关键作用。当皮肤受损后, 胶原蛋白沉积和再生能够促进创面愈合^[4]。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) /Smad 信号是经典的胶原蛋白合成通路^[5]。生肌玉红膏 (Shengji Yuhong Ointment, SYO) 被清代《医宗金鉴》誉为“生肌神药”, 其功效包括活血祛瘀、消肿止痛和敛疮生肌, 常应用于慢性创面的中后期治疗^[6-7]。研究^[8-10]表明: SYO对糖尿病足溃疡创面、肛瘘术后创面和犬咬伤创面有明显的促愈合作用, 但其作用机制尚未明确, 这也限制了其在国际上推广。本研究采用斑马鱼全层皮肤缺损模型, 探讨生肌玉红膏提取物 (Shengji Yuhong Ointment extract, SYOE) 通过 TGF- β /Smad 信号通路对斑马鱼皮肤创面的修复作用, 阐明 SYOE 促进皮肤创面愈合的机制, 为其临床应用和中医药的现代化转化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 320条 AB 野生型成年斑马鱼购自上海费曦生物科技有限公司。成年斑马鱼在循环养殖系统中饲养, 养殖期间每日定点喂食2次新鲜丰年虾 (购自上海费曦生物科技有限公司), 每次喂食量控制在鱼体质量的1%~3%, 鱼房内光照/黑暗比为14 h/10 h, 室内温度23℃~25℃, 水温28℃, 且各项水质指标符合要求。多聚甲醛购自北京兰杰柯科技有限公司, HE染液购自武汉赛维尔公司, 斑马鱼I型胶原蛋白 (type I collagen, Col I) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒和斑马鱼 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) ELISA 试剂盒购自江苏晶美生物科技有限公司, TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂、

FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒和 SuperReal 荧光定量预混试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水购自江苏碧云天生物技术公司, 氯仿购自德国 Merck 公司, 异丙醇和无水乙醇购自上海麦克林生化科技股份有限公司。旋转蒸发仪 (型号: SB-1000, 日本 EYELA 公司), 酶标仪 (型号: Multiskan GO, 美国 Thermo 公司), 超纯水机 (型号: Milli-Q, 德国 Merck 公司), 离心机 (型号: Centrifuge 5430 R, 德国 Eppendorf 公司), 生物样品快速制备系统 (型号: BSH-2, 杭州遂真生物技术有限公司), 电子天平 (型号: XPR504SDR/AC, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司), PCR 仪 (型号: Mastercycler[®] nexus X2, 德国 Eppendorf 公司)。

1.2 SYO 活性成分的提取 本实验采用的 SYO 来自长春中医药大学附属医院院内制剂。将 SYO 采用75%乙醇加热回流提取2 h, -20℃冷冻过夜, 过滤离心后取上清, 减压浓缩除去乙醇, 真空干燥后得到 SYOE。

1.3 斑马鱼皮肤创面的制备、实验分组和处理 利用0.04%三卡因麻醉剂将斑马鱼麻醉后, 置于操作台上固定, 使用直径为2.0 mm小动物皮肤组织取样器在鱼侧腹部制造出深度约为700 μ m的圆形创面^[11], 迅速放回。将制备创面后的斑马鱼随机分为对照组 (置于清水中饲养)、低剂量 SYOE 组 (置于含有0.625 mg·L⁻¹ SYOE 的水中饲养)、高剂量 SYOE 组 (置于含有1.250 mg·L⁻¹ SYOE 的水中饲养) 和尿囊素组 (置于含有1.000 mg·L⁻¹ 尿囊素的水中饲养), 每组80条。不同剂量 SYOE 组药物浓度根据前期实验筛选而定。

1.4 各组斑马鱼皮肤创面面积测定和创面愈合率计算 分组处理后, 从每组随机选取10条斑马鱼单独饲养, 于第0、7、14和21天时对各组斑马鱼皮肤创面进行拍照。使用 Image J 软件分析创面图像并测定创面面积, 记录各组斑马鱼皮肤初始创面面积 (第0天) 和各时间点的当前创面面积, 计算创面愈合率。创面愈合率 = (初始创面面积 - 当前创面面积) / 初始创面面积 \times 100%。

1.5 HE 染色测定各组斑马鱼皮肤创面边缘宽度 于处理后第0、7、14和21天, 分别从每组随机

选取10条斑马鱼,制作腹部皮肤组织石蜡切片,并进行梯度乙醇脱水。将切片恢复至室温后,采用苏木素染液染色5 min,自来水冲洗30 s,采用分化液分化10 s后,继续用返蓝液进行返蓝处理,滴加伊红染色6 min并流水冲洗。置于无水乙醇中梯度脱水,最后用中性树胶封片,于显微镜下观察并拍照。采用多点测量法,使用Image J图像分析软件测定各组斑马鱼腹部创面边缘宽度,以mm为标准单位。

1.6 天狼星红染色测量各组斑马鱼皮肤创面组织中胶原蛋白水平 取各组斑马鱼组织切片,使用天狼星红染色液染色8 min,无水乙醇脱水。切片放入新鲜二甲苯溶液中透明化处理5 min,中性树胶封固,干燥后于显微镜下进行观察并拍照。使用Image J软件测定图像中红色区域面积和图像总面积。胶原蛋白水平=红色区域面积/总面积 $\times 100\%$ 。

1.7 ELISA法检测各组斑马鱼皮肤创面组织中Col I和 α -SMA水平 于处理后第4天,分别从各组随机选取10条斑马鱼,0.1%三卡因进行安乐死并收集皮肤组织,使用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液(pH 7.4)冲洗,去除残留血液。称质量后,按照组织与PBS缓冲液体积比为1:9加入EP管中,于生物样品快速制备系统进行充分研磨。将匀浆液于5 000 g离心10 min,取上清。按照试剂盒说明书操作,检测各组鱼皮肤创面组织中Col I和 α -SMA水平。

1.8 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组斑马鱼皮肤创面组织中TGF- β /Smad信号通路相关基因和colla1a、colla1b、colla2及 α -SMA mRNA表达水平

于处理后第4天,分别从各组随机选取10条斑马鱼,取创面皮肤组织20~50 mg置于含有研磨磁珠的1.5 mL RNase free EP管中,加入预冷的TRNzol颠倒混匀提取总RNA,每组取1 μ L RNA样品通过超微量核酸浓度检测仪检测RNA浓度。A(260)/A(280)比值为1.8~2.0。反转录得cDNA后,采用Bio-Rad CFX96实时PCR检测系统进行RT-qPCR检测,以GAPDH为内参,以对照组为参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算样品中目的基因的mRNA表达水平。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s。引物序列见表1。

1.9 统计学分析 采用GraphPad Prism 10统计软件进行统计学分析。各组斑马鱼皮肤创面愈合率,

表1 RT-qPCR引物序列

Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence(5'-3')
tgfb1a F	GCACCGTGATACTCCATGACTTG
tgfb1a R	GATCTCTGACCTGATGTAGAATGTTCC
α -SMA F	GTGTTCCGCTGTTGCCTATGAG
α -SMA R	ACTGGTTACGCTGCTTGATGTTAC
smad2 F	GACGCAAGACCGCTGAAGAAC
smad2 R	TTCATTCGCTGTATGCTCTGCTAAG
smad3a F	GCCCACGCAGCAGCAAAC
smad3a R	ATTGTATCCTCCATCGGTTGTTCCAC
colla1a F	ACCGTAATGTGCGACGAAGT
colla1a R	CCTGGAAATCGTCGTCTGGG
colla1b F	TTTCTGCTAGGGTCTGGATTGG
colla1b R	AGCTGCAGTAACTTCGTCGG
colla2 F	GCTGGTCAAGATGGTCGCA
colla2 R	CAGCCTCGCCAGAAGGTC
GAPDH F	CTTGCTGTAGTAAGTGTGCTTGGCTGCG
GAPDH R	AACCTGGTGCTCCGTGTATCC

创面边缘宽度和创面组织中胶原蛋白水平,皮肤创面组织中Col I和 α -SMA蛋白水平,皮肤创面组织中colla1a、colla1b、colla2、tgfb1a、smad2、smad3a和 α -SMA mRNA表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两样本均数比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组斑马鱼皮肤创面愈合率 创面愈合评估实验结果显示:损伤后第7、14及21天,与对照组比较,低剂量SYOE组、高剂量SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面愈合率明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中,在第21天时高剂量SYOE组斑马鱼皮肤创面愈合率达84%。见图1和2。

2.2 各组斑马鱼皮肤创面边缘宽度 HE染色结果显示:与对照组比较,低剂量SYOE组斑马鱼皮肤创面边缘宽度在损伤后第14和21天明显减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$),高剂量SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面边缘宽度在损伤后第7、14和21天均明显减小($P<0.01$)。见图3和4。

2.3 各组斑马鱼皮肤创面组织中胶原蛋白水平 天狼星红染色结果显示:与对照组比较,低剂量SYOE组斑马鱼皮肤创面组织中胶原蛋白水平在损伤后第6和8天明显升高($P<0.01$),高剂量

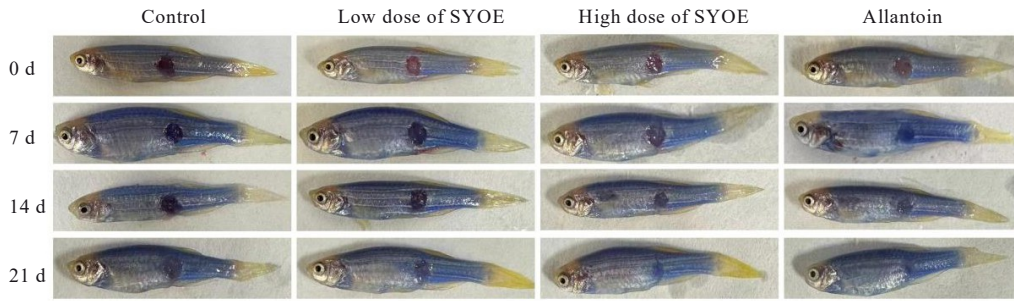
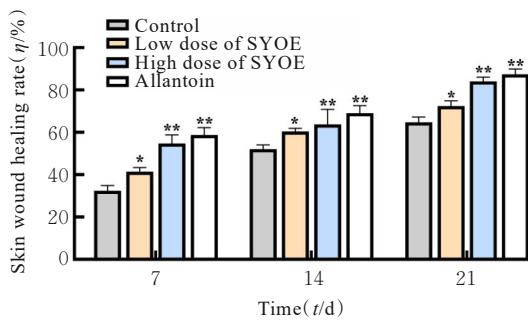


图1 各组斑马鱼皮肤创面情况

Fig. 1 Skin wound condition of zebrafish in various groups



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图2 各组斑马鱼皮肤创面愈合率

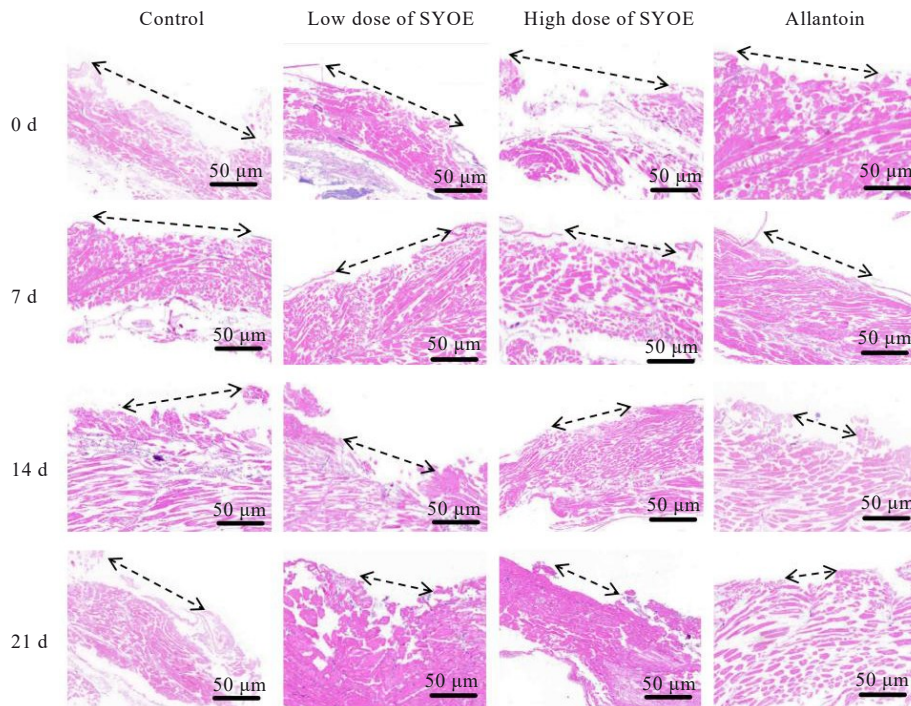
Fig. 2 Skin wound healing rates of zebrafish in various groups

SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面组织中胶原蛋白水平在损伤后第4、6及8天明显升高 ($P < 0.01$)。见图5和6。

2.4 各组斑马鱼皮肤创面组织中 Col I 和 α -SMA 水平 ELISA法检测结果显示: 损伤后第4天, 与对照组比较, 低剂量SYOE、高剂量SYOE和尿囊素组斑马鱼皮肤创面组织中Col I及 α -SMA水平均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表2。

2.5 各组斑马鱼皮肤创面组织中 Col I 编码基因 *colla1a*、*colla1b*、*colla2* 和 α -SMA mRNA 表达水平

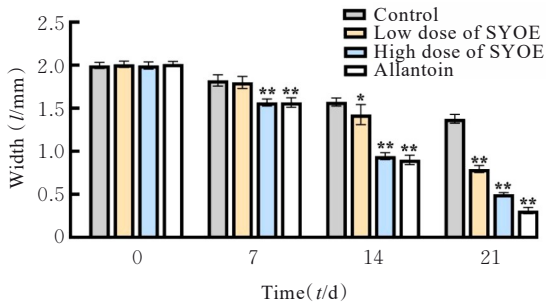
RT-qPCR法检测结果显示: 损伤后第4天, 与对照组比较, 低剂量SYOE组斑马鱼皮肤创面组



Dotted arrows indicated skin wounds.

图3 各组斑马鱼皮肤创面形态表现 (HE)

Fig. 3 Morphology of skin wound of zebrafish in various groups (HE)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图4 各组斑马鱼皮肤创面边缘宽度

Fig. 4 Widths of skin wound edges of zebrafish in various groups

织中 *coll1a1b*、*coll1a2* 和 α -SMA mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 高剂量 SYOE 组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面组织中 *coll1a1a*、*coll1a1b*、*coll1a2* 及 α -SMA mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见表3。

2.6 各组斑马鱼皮肤创面组织中 *tgfb1a*、*smad2* 和 *smad3a* mRNA 表达水平 RT-qPCR 法检测结果显示: 与对照组比较, 低剂量 SYOE 组斑马鱼皮肤创面组织中 *tgfb1a* 和 *smad2* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 高剂量 SYOE 组和尿囊素组斑

鱼皮肤创面组织中 *tgfb1a*、*smad2* 及 *smad3a* mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。见表4。

3 讨论

皮肤的全层创面需采取及时有效的修复措施, 以预防感染和促进组织再生愈合^[12]。SYO可作为治疗创面的有效药物, 具有创面愈合速度快、抗菌时间长和无不良反应等优点, 其临床应用受到广泛关注。斑马鱼因其与哺乳动物在生理学和解剖学上的相似性, 兼具成本低廉和操作便利的优势, 已成为创面愈合研究的理想模式动物^[13]。斑马鱼创面愈合包括急性炎症期、细胞增生期、瘢痕形成期和表皮及其他组织再生期, 这与哺乳动物皮肤创面修复顺序高度一致^[14]。因此, 本研究采用斑马鱼构建侧腹部全层皮肤损伤模型, 评估SYOE对皮肤创面的修复作用。由于尿囊素被广泛用于烧伤、创伤和皮肤溃疡等皮肤相关疾病治疗, 是加速创面愈合和促进组织修复的常见药物成分^[15-16], 因此本研究将尿囊素组设置为阳性对照。本研究结果显示: SYOE组和尿囊素组斑马鱼皮肤创面面积和创面边缘宽度明显减小, 且创面愈合率明显升高, 其中高剂量SYOE组和尿囊素组作用效果最为明显, 提示SYOE可促进斑马鱼皮肤创面愈合。

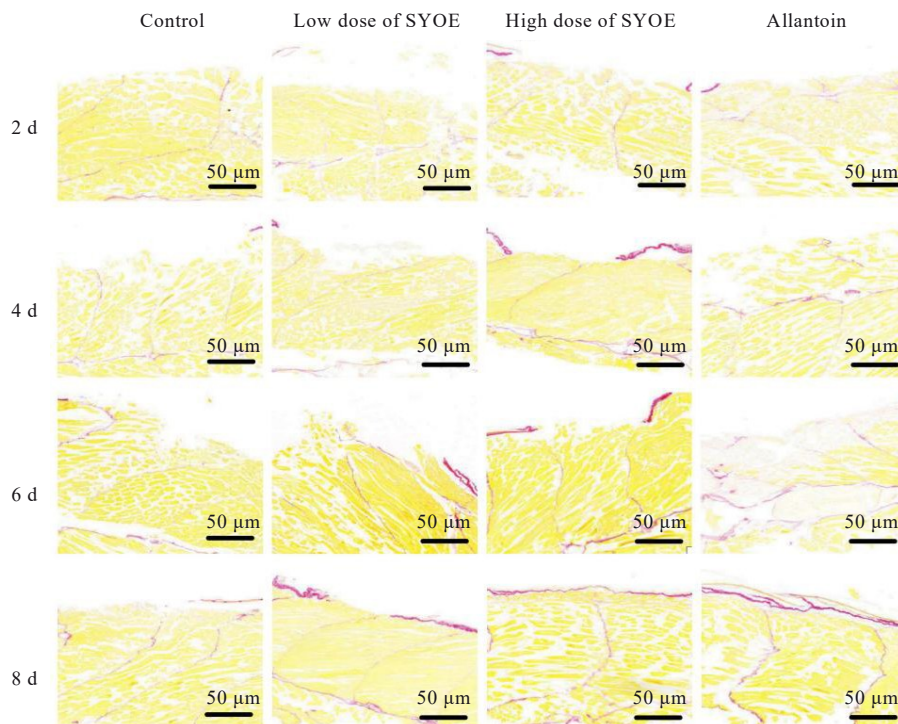
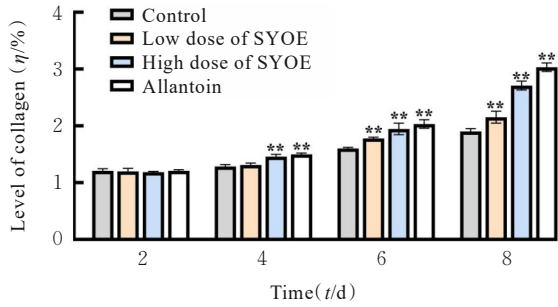


图5 各组斑马鱼皮肤创面组织形态表现(天狼星红染色)

Fig. 5 Morphology of skin wound tissue of zebrafish in various groups (Sirius red staining)



**P<0.01 compared with control group.

图6 各组斑马鱼皮肤创面组织中胶原蛋白水平

Fig. 6 Levels of collagen in skin wound tissue of zebrafish in various groups

表2 各组斑马鱼皮肤创面组织中 Col I 和 α -SMA 水平

Tab. 2 Levels of Col I and α -SMA in skin wound tissue of zebrafish in various groups (n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	Col I [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	α -SMA [$\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]
Control	16.06 \pm 2.39	14.95 \pm 0.12
Low dose of SYOE	19.05 \pm 0.19*	18.26 \pm 0.29**
High dose of SYOE	20.13 \pm 0.11**	22.97 \pm 0.19**
Allantoin	21.00 \pm 0.37**	24.42 \pm 1.32**

*P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

表3 各组斑马鱼皮肤创面组织中 *coll1a1a*、*coll1a1b*、*coll1a2* 和 α -SMA mRNA 表达水平

Tab. 3 Expression levels of *coll1a1a*, *coll1a1b*, *coll1a2*, and α -SMA mRNA in skin wound tissue of zebrafish in various groups (n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	<i>coll1a1a</i> mRNA	<i>coll1a1b</i> mRNA	<i>coll1a2</i> mRNA	α -SMA mRNA
Control	1.01 \pm 0.02	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.08	1.03 \pm 0.02
Low dose of SYOE	1.02 \pm 0.03	1.20 \pm 0.04**	1.16 \pm 0.01**	1.63 \pm 0.09*
High dose of SYOE	1.37 \pm 0.04**	1.34 \pm 0.02**	1.25 \pm 0.04**	2.51 \pm 0.05**
Allantoin	1.46 \pm 0.04**	1.39 \pm 0.05**	1.31 \pm 0.05**	2.80 \pm 0.34**

*P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

胶原蛋白沉积是决定创面愈合质量的关键环节^[17], 其有助于提高创面的弹性和韧性, 使受损皮肤愈合后功能恢复趋近正常状态, 因此胶原蛋白沉积也是评估创面愈合情况的核心指标^[18-20]。本研究结果显示: SYOE可促进斑马鱼皮肤创面中的胶原蛋白沉积, 提高胶原蛋白水平, 说明其能够通过促进创面的胶原蛋白沉积发挥创面修复效应。

胶原蛋白家族种类繁多, Col I 在鱼类皮肤中

表4 各组斑马鱼皮肤创面组织中 *tgfb1a*、*smad2* 和 *smad3a* mRNA 表达水平

Tab. 4 Expression levels of *tgfb1a*, *smad2*, and *smad3a* mRNA in skin wound tissue of zebrafish in various groups

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	<i>tgfb1a</i> mRNA	<i>smad2</i> mRNA	<i>smad3a</i> mRNA
Control	1.00 \pm 0.00	1.03 \pm 0.02	1.00 \pm 0.05
Low dose of SYOE	1.15 \pm 0.02*	1.34 \pm 0.04*	1.14 \pm 0.08
High dose of SYOE	1.27 \pm 0.05**	1.48 \pm 0.01**	1.36 \pm 0.09**
Allantoin	1.35 \pm 0.07**	2.18 \pm 0.15**	1.58 \pm 0.05**

*P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

分布最为广泛且含量最高, 其代谢直接影响创面的修复质量^[21-22]。本研究结果显示: SYOE组斑马鱼皮肤创面组织中 Col I 水平明显升高。研究^[23]显示: 在创面愈合过程中, 肌成纤维细胞通过分泌 Col I 来填充创面。肌成纤维细胞由各种生长因子和细胞因子刺激成纤维细胞分化而来, 其中 α -SMA 是肌成纤维细胞的特征性标志物^[24]。在创面愈合期间, 肌成纤维细胞可通过分泌大量胶原蛋白和细胞外基质促进创面收缩^[25]。本研究结果显示: SYOE组斑马鱼皮肤创面组织中 α -SMA 蛋白水平明显升高, 证实 SYOE 是通过介导胶原蛋白沉积从而发挥促进创面愈合的作用。

TGF- β 信号通路调控皮肤中胶原蛋白合成和纤维生成, 对于维持皮肤的正常结构和功能具有重要作用^[26]。该信号通路的激活可促进皮肤创面愈合^[27]。在创面愈合过程中, TGF- β 1 与下游 *smad2* 和 *smad3* 相互作用, 被激活的 *smad2* 和 *smad3* 将信号传递给下游靶基因 α -SMA, 促进胶原蛋白沉积和创面愈合^[28]。本研究结果显示: SYOE组斑马鱼皮肤创面组织中 *tgfb1a*、*smad2* 和 *smad3a* 基因表达水平明显升高, 且 α -SMA 基因表达水平升高, 上述结果均提示 SYOE 可以促进创面重塑。Col I 由 *coll1a1a*、*coll1a1b* 和 *coll1a2* 这 3 种基因所编码^[29], 该基因簇与人类的 *Col I* 基因 (*COL1A1* 和 *COL1A2*) 在数量和结构上虽存在差异, 但其基本功能相似, 负责为皮肤组织提供结构支撑^[30-31], 维持皮肤的稳定性和促进创面愈合^[32]。本研究结果显示: SYOE组斑马鱼皮肤创面组织中编码 Col I 的 *coll1a1a*、*coll1a1b* 和 *coll1a2* 基因表达水平均明显升高, 表明 SYOE 可能通过调节 TGF- β /Smad 信

号通路相关基因的表达,进而影响胶原蛋白沉积。

综上所述,SYOE能够增加斑马鱼皮肤创面的胶原蛋白沉积,促进皮肤创面愈合,并提高TGF- β /Smad信号通路相关基因的表达水平。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

滕欢欢参与实验操作、论文撰写和修改,孙光和姜锐参与数据分析,孙立伟参与实验设计,刘建增参与文献整理和论文审阅。

[参考文献]

- [1] WU H F, LI Z T, TANG J Q, et al. The *in vitro* and *in vivo* anti-melanoma effects of hydroxyapatite nanoparticles: influences of material factors [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 1177-1191.
- [2] PERSINAL-MEDINA M, LLAMES S, CHACÓN M, et al. Polymerizable skin hydrogel for full thickness wound healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4837.
- [3] 张 婧.巨噬细胞在皮肤伤口愈合过程中的调控作用及其机制研究[D].西安:西北大学,2019.
- [4] YUAN M, LIU K, JIANG T, et al. GelMA/PEGDA microneedles patch loaded with HUVECs-derived exosomes and Tazarotene promote diabetic wound healing [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 147.
- [5] CAO C W, XIAO Z C, TONG H Q, et al. Oral intake of chicken bone collagen peptides anti-skin aging in mice by regulating collagen degradation and synthesis, inhibiting inflammation and activating lysosomes [J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1622.
- [6] YU Q, SHEN Y X, XIAO F Q, et al. Yuhong ointment ameliorates inflammatory responses and wound healing in scalded mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 306: 116118.
- [7] 陈若岚,薛慧琴,丁 劲,等.艾灸联合生肌玉红膏对压疮大鼠皮肤损伤修复的作用机制[J].*陕西中医*, 2024, 45(8): 1042-1047.
- [8] YANG Y W, ZHOU Y W, GE M L. The effect of externally applied traditional Chinese medicine in diabetic foot: a systematic review and meta-analysis of 34 RCTs [J]. *Foot*, 2023, 56: 102045.
- [9] 唐丽利,冯文哲,石 鹏,等.加味生肌玉红膏促进湿热证肛肠术后创面愈合的实验研究[J].*时珍国医国药*, 2023, 34(8): 1798-1802.
- [10] 刘 恒,李爱茹,高 岩,等.基于微环境生态观察生肌玉红膏对犬咬伤创面愈合的促进作用[J].*现代中医临床*, 2023, 30(6): 7-11.
- [11] GREENSPAN L J, AMEYAW K K, CASTRANOVA D, et al. Live imaging of cutaneous wound healing after rotary tool injury in zebrafish [J]. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(4): 888-897.e6.
- [12] WILKINSON H N, IVESON S, CATHERALL P, et al. A novel silver bioactive glass elicits antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *ex vivo* skin wound biofilm model [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1450.
- [13] EDIRISINGHE S L, RAJAPAKSHA D C, NIKAPITIYA C, et al. Spirulina maxima derived marine pectin promotes the *in vitro* and *in vivo* regeneration and wound healing in zebrafish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 107: 414-425.
- [14] RICHARDSON R, SLANCHEV K, KRAUS C, et al. Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(6): 1655-1665.
- [15] XIE H J, BAI Q, KONG F K, et al. Allantoin-functionalized silk fibroin/sodium alginate transparent scaffold for cutaneous wound healing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 207: 859-872.
- [16] ZHU H C, AO H T, FU Y L, et al. Optimizing alginate dressings with allantoin and chemical modifiers to promote wound healing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 275(Pt 1): 133524.
- [17] CHEN Y X, ZHANG X R, LIU Z H, et al. Obstruction of the formation of granulation tissue leads to delayed wound healing after scald burn injury in mice [J]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkab004.
- [18] HE S Q, WALIMBE T, CHEN H Y, et al. Bioactive extracellular matrix scaffolds engineered with proangiogenic proteoglycan mimetics and loaded with endothelial progenitor cells promote neovascularization and diabetic wound healing [J]. *Bioact Mater*, 2021, 10: 460-473.
- [19] ZHOU W C, ZI L, CEN Y, et al. Copper sulfide nanoparticles-incorporated hyaluronic acid injectable hydrogel with enhanced angiogenesis to promote wound healing [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 417.
- [20] ZHAO R L, JIN X Y, LI A, et al. Precise diabetic wound therapy: PLS nanospheres eliminate senescent cells *via* DPP4 targeting and PARP1 activation [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(1): 2104128.
- [21] YANG X Y, ZHI X Y, SONG Z L, et al. Flesh quality of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) fed with hydrolyzed porcine

- mucosa-supplemented low fishmeal diet[J]. *Anim Nutr*, 2022, 8(1): 114-124.
- [22] XIE Y J, QIAO K, YUE L N, et al. A self-crosslinking, double-functional group modified bacterial cellulose gel used for antibacterial and healing of infected wound[J]. *Bioact Mater*, 2022, 17: 248-260.
- [23] CUI H S, JOO S Y, CHO Y S, et al. Effect of combining low temperature plasma, negative pressure wound therapy, and bone marrow mesenchymal stem cells on an acute skin wound healing mouse model[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3675.
- [24] NAGASAKI K, NAKASHIMA A, TAMURA R, et al. Mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium ameliorate experimental peritoneal fibrosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 203.
- [25] WU S Y, CHEN Y T, TSAI G Y, et al. Protective effect of low-molecular-weight fucoidan on radiation-induced fibrosis through TGF- β 1/Smad pathway-mediated inhibition of collagen I accumulation [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(3): 136.
- [26] 邵世清, 曲长萍, 李好山, 等. 脂联素干预对宫腔粘连大鼠子宫内膜组织中NLRP3、TGF- β 1和Smad2表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2024, 59(6): 777-782.
- [27] KIM H G, LIM Y S, HWANG S, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate triggers proliferation, migration, stemness, and epithelial-mesenchymal transition in human endometrial and endometriotic epithelial cells via the transforming growth factor- β /Smad signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3938.
- [28] PENG Y, WU S, TANG Q Y, et al. KGF-1 accelerates wound contraction through the TGF- β 1/Smad signaling pathway in a double-paracrine manner[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(21): 8361-8370.
- [29] HAU H T A, OGUNDELE O, HIBBERT A H, et al. Maternal Larp6 controls oocyte development, chorion formation and elevation[J]. *Development*, 2020, 147(4): dev187385.
- [30] PALUNGWACHIRA P, TANCHAROEN S, PHRUKSANIYOM C, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of anthocyanins extracted from *Oryza sativa* L. in primary dermal fibroblasts [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2089817.
- [31] LEE J J, NG S C, NI Y T, et al. Protective effects of galangin against H₂O₂/UVB-induced dermal fibroblast collagen degradation *via* hsa-microRNA-4535-mediated TGF β /Smad signaling[J]. *Aging*, 2021, 13(23): 25342-25364.
- [32] CHENG Y T, LI Y F, HUANG S Y, et al. Hybrid freeze-dried dressings composed of epidermal growth factor and recombinant human-like collagen enhance cutaneous wound healing in rats [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 742.