

京万红软膏上调 PDGF mRNA 表达改善大鼠缺血合并外伤型糖尿病足的研究

高 艳¹, 崔文钰¹, 卢志强², 崔广智^{3*}

1. 天津市儿童医院, 天津 300134

2. 广东工业大学, 广东 广州 510006

3. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: **目的** 考察京万红软膏对大鼠缺血合并外伤型糖尿病足的疗效及作用机制。**方法** 建立糖尿病大鼠模型, 在此基础上建立大鼠缺血合并外伤型糖尿病足模型。实验设置4组, 每组大鼠15只, 分别为假手术组、模型组、京万红软膏组、重组人表皮生长因子外用溶液(rhEGF)组。给药14d, 记录给药前后大鼠体质量、血糖、足部形态及溃疡面积的变化情况。并于给药后取足部溃疡部位组织行HE染色, 采用RT-PCR法检测京万红软膏对血小板源性生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)及其受体FLT-1 mRNA表达的影响。**结果** 京万红软膏对大鼠缺血合并外伤型糖尿病足具有消肿生肌, 促进创面愈合的功效。与模型组相比, 京万红软膏组给药14d后可极显著减少大鼠足部外伤部位的溃疡面积($P < 0.01$); 可极显著上调PDGF mRNA的表达($P < 0.01$)。**结论** 京万红软膏对大鼠缺血合并外伤型糖尿病足具有促进伤口愈合的功效, 可能与上调PDGF mRNA的表达相关, 但对VEGF及其受体Flt-1 mRNA的表达没有影响。

关键词: 京万红软膏; 缺血; 外伤; 糖尿病足; PDGF mRNA; Flt-1 mRNA

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)12-3512-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.12.003

Improvement of Jingwanhong Ointment on diabetic foot with ischemia and trauma in rats by regulating the expression of PDGF mRNA

GAO Yan¹, CUI Wen-yu¹, LU Zhi-qiang², CUI Guang-zhi³

1. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China

2. Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract Objective To investigate the efficacy and mechanism of Jingwanhong Ointment on ischemic and traumatic diabetes foot in rats. **Methods** The diabetic rat model was reproduced. On this basis, the diabetic foot model of rats with ischemia and trauma was reproduced. Four groups were set up with 15 rats in each group, including sham operation group, model group, Jingwanhong Ointment group and recombinant human epidermal growth factor external solution (rhEGF) group. The changes of body weight, blood sugar, foot shape, and ulcer area were recorded before and after administration for 14 d. After administration, HE staining was performed on foot ulcer tissue. The effects of Jingwanhong Ointment on the expression of platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor FLT-1 were detected by RT-PCR. **Results** Jingwanhong Ointment had the effect of detumescence and muscle regeneration and wound healing in rats with ischemia and traumatic diabetic foot. Compared with the model group, Jingwanhong Ointment group could significantly reduce the ulcer area of foot injury in rats after 14 d of administration ($P < 0.01$), and significantly up-regulate the expression of PDGF ($P < 0.01$). **Conclusion** Jingwanhong Ointment can promote wound healing in rats with ischemia and traumatic diabetic foot. The mechanism may be related to the up-regulation of PDGF expression, but it has no effect on the expression of VEGF and Flt-1 receptor.

Key words: Jingwanhong ointment; ischemia; trauma; diabetic foot; PDGF mRNA; Flt-1 mRNA

收稿日期: 2019-08-05

作者简介: 高 艳, 女, 研究方向为中药学。E-mail: gaoyanduoduo@126.com

*通信作者 崔广智

世界卫生组织(WHO)将糖尿病足定义为糖尿病患者由于合并神经病变及各种不同程度末梢血管病变而导致下肢感染、溃疡形成和(或)深部组织的破坏^[1]。糖尿病现已成为全球性普遍疾病,据统计,糖尿病发病率为糖尿病患者的1%~4%,且以每年2%速度增长。作为糖尿病患者常见且严重的并发症之一,糖尿病足极度降低了患者的生活质量^[2],其高致残、致死率已引起越来越多的重视^[3]。

糖尿病足是由血管和神经病变、损伤、感染等多种复杂因素共同作用而致,其中下肢动脉病变引起的局部缺血是糖尿病足的重要发病因素,足部皮肤损伤更是其溃疡难愈的常见诱因。京万红软膏结合“黄连解毒膏”与“生肌玉红膏”等民间验方化裁研制而成,其在褥疮、烫伤、创面溃烂等溃疡的治疗中已取得满意的疗效^[4]。故本研究以大鼠股动脉缺血合并外伤的糖尿病足为研究对象,以京万红软膏为治疗药物,考察其对大鼠足部溃疡模型的愈合效果并初步探究其机制,为临床治疗提供可靠的实验依据。

1 实验材料

1.1 动物

雄性 Wista 大鼠,60 只,体质量 200~220 g;天津市山川红实验动物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(津)2011-0001。

1.2 实验药品及主要试剂

京万红软膏(20 g,天津达仁堂京万红药业有限公司,批号 211692);链脲佐菌素(Sigma 公司,S0310);重组人表皮生长因子外用溶液(rhEGF,2 000 IU:15 mL,深圳市华生元素基因工程发展有限公司)。TRNzol 总 RNA 提取试剂盒,RNase Free Water(RT 121-01)、EB(RT 203)、Quant cDNA 第一链合成试剂盒、2*Taq Plus PCR Mastermix(天根生化科技北京有限公司)DNA Ladder Maker(宝生物工程大连有限公司,D526A)琼脂糖(BIOWEST,111860);Tris、EDTA(Solarbio,T8060,E8040);PCR 反应引物(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.3 主要仪器

血糖仪(美国强生稳豪型);血糖试纸(强生医疗器械有限公司,2996565);结扎线;KD-T 电脑生物组织烤片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);切片机(American optical);低温高速离心机(BECKMAN,美国);Flexstation 3 多功能酶标仪工作站(Molecular Devices);PCR 扩增仪(PE-

480KIYBAID);实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems,7500 Fast);凝胶成像分析仪(Cuene Genins);EC250-90 电泳仪(Thermo EC);BCD-256KF B 型-20℃冰箱(青岛海尔股份有限公司);MDF-U4086 型-80℃低温冰箱(日本 SanY 公司)。

2 方法

2.1 大鼠缺血合并外伤型糖尿病足模型的建立

选用 Wista 大鼠,雄性,体质量 200~220 g。造模前大鼠禁食不禁水 12 h,用无菌的柠檬酸缓冲液(pH 4.35)以 1%(质量分数)浓度配制链脲佐菌素(streptozocin,STZ)溶液,据每只大鼠空腹体质量以 50 mg/kg 的剂量快速腹腔注射。一周后测定大鼠空腹血糖,血糖值大于 16.65 mmol/L 视为大鼠糖尿病模型建模成功。

缺血合并外伤型糖尿病足模型的复制:将 Wista 大鼠俯卧位,10%水合氯醛腹腔麻醉,于左后肢根部正中位置开始,向下以无菌手术器械依次切开皮肤表层及皮下组织,分离肌层,暴露血管神经束后小心剥离出股动脉主干并结扎剪断,滴入适量庆大霉素,缝合皮肤切口。再用 8%的硫化钠溶液将大鼠足背部皮肤脱毛并用生理盐水洗净擦干,于足背正中位置用刀片切下 3 mm×7 mm 深浅一致的切口,切除全层皮肤,伤口均深至筋膜层,视为足部溃疡造模成功^[5-6]。

2.2 分组和给药方法

大鼠血糖值达标后饲养 1 个月,期间备有充足的水源及常规饲料,每天清洁卫生一次,温度保持(25±2)℃,12 h 明暗循环,进行分组。测量 60 只大鼠的体质量和空腹血糖,并按其结果平行分为 4 组:假手术组、模型组、京万红软膏组、rhEGF 组。成模后第 2 天开始给药,每天上午 9:00 一次,连续换药 14 d。将各组大鼠足部创面周围用生理盐水清洁后,擦干均匀上药:模型组给予生理盐水、京万红软膏组按照 1 g/kg 体质量给予京万红软膏^[7]、rhEGF 组按照 4 000 IU/10 cm×10 cm 给予重组人表皮生长因子外用溶液^[8],以覆盖创面为度,涂药后用无菌纱布包扎。

2.3 体质量和血糖的测量

分别于给药前和给药 14 d 后对各组大鼠的体质量和血糖进行测量并记录结果。

2.4 形态观察

2.4.1 宏观形态 给药后每天观察各组大鼠精神状态、进食及排便情况,以及足部的形态及活动能

力等,用数码相机(E5200,尼康)于给药前、给药7、14 d后采集各组大鼠足部图像,并记录足部溃疡面积在给药前、给药7、14 d后的变化情况。

2.4.2 病理形态(HE 染色) 将各组大鼠足部外伤部位的组织剔除骨骼后,置于4%多聚甲醛中固定,经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋后做常规石蜡切片,将切片脱蜡、复水、染色、脱水、透明、封藏后进行表皮和皮下组织结构的观察。

2.5 采用 RT-PCR 法检测大鼠足部组织中 PDGF、VEGF 及其受体 Flt-1 mRNA 的表达情况

按照说明书用 TRNzol 总 RNA 提取试剂盒提取

大鼠给药14 d后足部外伤部位的总 RNA 和 mRNA,采用反转录试剂盒制得 cDNA 第一链,然后行 RT-PCR 扩增,引物序列见表1。以 GAPDH 为内参来计算 PDGF、VEGF 及其受体 Flt-1 mRNA 的表达水平。将 PCR 反应液 10 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳。即取 5 μ L 目的基因反应液、5 μ L 内参基因反应液混合,进行 0.5%琼脂糖凝胶电泳,以 1 000 bp DNA Ladder marker 参照,应用 BIO IMAGING SYSTEM (Gene Snap) 采集图像,进行灰度扫描,以目的基因 GAPDH 灰度比值进行半定量比较分析。

目的基因灰度比值=目的基因灰度值/GAPDH 灰度值

表1 PCR 引物信息

Table 1 PCR primer information

基因	序列	产物长度/ bp	退火温度/°C
GAPDH	正向: CCAAGGTCATCCATGACAA	579	55.0
	反向: TGTCATACCAGGAAATGAGC		
PDGF	正向: CCTGTGCCCATCCGCAGGAAGAGA	227	65.9
	反向: TTGGCCACCTTGACGCTGCGGTG		
VEGF	正向: CTGCTCTCTTGGGTGCACTGG	320	62.3
	反向: GGTTTGATCCGCATGATCTGCAT		
FLT-1	正向: CAAGGGACTCTACACTTGTC	240	53.1
	反向: CCGAATAGCGAGCAGATTTC		

2.6 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析方法进行显著性检验。

3 结果

3.1 京万红软膏对大鼠体质量和血糖的影响

各组大鼠的空腹血糖值均在 16.65 mmol/L 以上,表明大鼠糖尿病模型建模成功。给药前和给药14 d后,各组大鼠的体质量和血糖均无显著性差异,表明各给药组对大鼠的体质量和血糖无显著影响,

见表2。

3.2 京万红软膏对大鼠足部形态的影响

3.2.1 宏观形态观察结果 糖尿病大鼠较正常大鼠食量、饮水量异常增多,排泄物气味非常刺激,尿量多、粪便稀黄且不成形,消瘦、活动减少、精神不振、反抗能力下降且容易死亡。模型组、京万红软膏组和 rhEGF 组大鼠足部由于股动脉缺血造成足部皮肤色白发凉,足部常呈弓形,足趾常呈爪形,出现间歇型跛行。观察表明模型组的溃疡面积给药前后无明显的改变,无新生表皮生成。京万红软膏

表2 京万红软膏对大鼠体质量和血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of Jingwanhong Ointment on body weight and blood glucose of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	体质量/g		血糖/(mmol L ⁻¹)	
		给药前	给药14 d后	给药前	给药14 d后
假手术	—	225.43 $\pm$ 77.17	216.71 $\pm$ 79.26	28.79 $\pm$ 6.16	28.91 $\pm$ 5.59
模型	—	226.25 $\pm$ 66.10	220.88 $\pm$ 65.03	30.12 $\pm$ 5.89	30.36 $\pm$ 5.73
京万红软膏	1	217.89 $\pm$ 47.39	215.67 $\pm$ 43.12	29.50 $\pm$ 3.51	29.58 $\pm$ 3.95
rhEGF	4 000 IU	205.14 $\pm$ 53.61	202.57 $\pm$ 55.07	29.10 $\pm$ 4.54	29.17 $\pm$ 4.84

组和 rhEGF 组随着给药天数的增加, 溃疡面积逐渐缩小, 炎症逐渐减轻, 并有表皮新生, 愈后良好, 见图 1。

3.2.2 京万红软膏对大鼠足部溃疡面积的影响 模

型组大鼠足部溃疡面积给药前后没有明显改变, 京万红软膏组和 rhEGF 组溃疡面积随着给药时间的增加而逐渐减小, 给药 14 d 后, 溃疡面积明显缩小, 与模型组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 3。



图 1 京万红软膏对大鼠足部宏观形态的影响

Fig. 1 Effects of Jingwanhong Ointment on macromorphology of rat foot

表 3 京万红软膏对大鼠足部溃疡面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of Jingwanhong Ointment on foot ulcer area of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	溃疡面积/mm ²		
		给药前	给药 7 d 后	给药 14 d 后
模型	—	21.09 ± 1.37	22.16 ± 4.23	19.41 ± 3.29
京万红软膏	1	21.22 ± 0.58	15.69 ± 3.28*	6.52 ± 2.65**
rhEGF	4 000 IU	20.53 ± 0.78	12.94 ± 2.76**	5.15 ± 1.61**

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

3.2.3 病理形态学观察结果 给药 14 d 后, 假手术组大鼠皮肤组织结构完整, 层次清晰, 胶原含量丰富, 排列有序; 模型组大鼠表皮结构不完整, 炎性坏死物较多; 京万红软膏组上皮组织新生, 表皮生长速度快, 结构完整且炎性浸出物较少, 愈后良好; rhEGF 组创面纤维组织生长活跃, 毛细血管和成纤维细胞数量增多, 见图 2。

3.3 京万红软膏对大鼠 PDGF mRNA、VEGF mRNA、FLT-1 mRNA 的影响

给药 14 d 后, 与模型组相比, 京万红软膏组可显著上调 PDGF mRNA 的表达 ($P < 0.01$), rhEGF

组可显著上调 PDGF mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。而京万红软膏组和 rhEGF 组对 VEGF mRNA 及其受体 FLT-1 mRNA 的表达没有显著性影响, 见表 4、图 3。

4 讨论

中医学认为糖尿病足是由消渴日久而生, 其发病与湿、热、火毒、气血淤滞有关, 以脉络淤阻、血行不畅为病机关键。可见血管病变是引起糖尿病足的重要因素, 动脉粥样硬化或斑块、血栓是导致血管狭窄甚至闭塞或周围组织坏死的重要原因, 特别是下肢远端重力部位的足部组织。此外, 由于神经病变往往导致足部感觉障碍而易引起外伤, 发

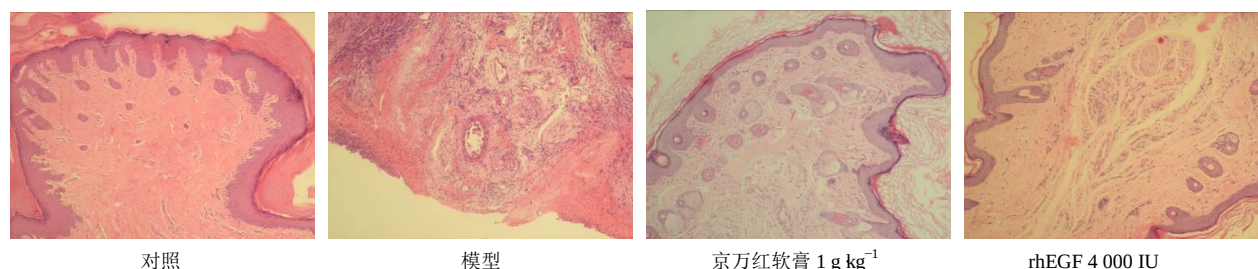


图 2 大鼠足部组织切片 HE 染色结果 (×40)

Fig. 2 HE staining results of rat foot tissue sections (×40)

表 4 京万红软膏对大鼠 PDGF mRNA、VEGF mRNA、FLT-1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Effects of Jingwanhong Ointment on expression of PDGF mRNA, VEGF mRNA, and FLT-1 mRNA of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	PDGF mRNA 表达水平	VEGF mRNA 表达水平	FLT-1 mRNA 表达水平
假手术	—	1.08 ± 0.08	1.17 ± 0.10	0.59 ± 0.19
模型	—	0.84 ± 0.14 [#]	0.86 ± 0.05 [#]	0.56 ± 0.07 [#]
京万红软膏	1	1.20 ± 0.06 ^{**}	0.88 ± 0.07	0.64 ± 0.16
rhEGF	4 000 IU	1.11 ± 0.09 [*]	1.03 ± 0.21	0.68 ± 0.18

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

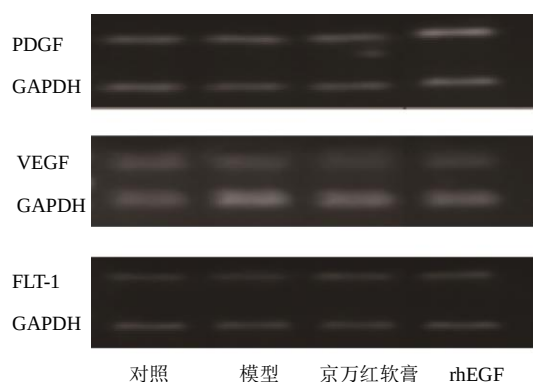


图 3 京万红软膏对大鼠 PDGF mRNA、VEGF mRNA、FLT-1 mRNA 的影响

Fig. 3 Effects of Jingwanhong Ointment on expression of PDGF mRNA, VEGF mRNA, and FLT-1 mRNA of rats

生细菌感染而形成溃疡,创面溃烂难愈是导致糖尿病患者截肢或致命的重要诱因^[9]。基于糖尿病患者下肢常发生动脉闭塞性病变,并且足部易于感染形成溃疡,故本模型从大鼠下肢股动脉缺血入手,并在此基础上于足背部设置面积、深浅统一的溃疡,所造模型与临床具有一定的相似性。

《疮疡科纲要》中指出:“疮疡为病,发见于外,外治药尤为重要”。祖国医学采用去腐生肌类中药治疗创面难愈性疾病历史悠久、疗效独特。本研究

京万红软膏为中药制剂,由地榆、当归、红花、黄连、黄柏、山栀子、川芎等 30 余味中药组方而成,诸药合用,具有活血解毒、消肿止痛、去腐生肌的功效。宏观观察及 HE 染色结果均表明将该药涂敷于创面作用 14 d 后,京万红软膏组可促进溃疡部位上皮组织新生,减少炎性物质浸出,活血而又止血,止血而不留瘀,与模型组相比较,溃疡面积显著减小 ($P < 0.01$)。这与京万红软膏具有凉血消肿、敛疮生肌,促进肉芽组织生长和肌纤维组织增生的作用相吻合^[10]。

创面愈合是一个复杂而有序的生物学过程,主要包括炎症反应、组织再生及瘢痕形成三部分。已有研究证实生长因子与细胞的修复及增生密切相关,特别 PDGF、VEGF 等在促进血管新生及创面愈合的过程中起着关键作用。PDGF 是一种血清生长因子,所具有的趋化作用可使中性粒细胞、单核细胞、成纤维细胞向创伤组织迁移;诱导成纤维细胞的再生;并通过激活巨噬细胞合成 VEGF 而促进血管新生。在创伤组织中,PDGF 的含量和活性的高低对修复质量具有重要影响。VEGF 是一种多功能的特异性细胞因子,与其酪氨酸激酶受体 FLT-1 的胞外部分发生特异性的结合而发挥一系列的生物学效应,其中包括促使内皮细胞增殖和迁移,增加微静脉和小静脉的通透性,诱导血管生成;同时为

胶原纤维的合成提供物质基础,从而促进肉芽和瘢痕组织的形成。

本研究运用了 RT-PCR 法检测京万红软膏对 PDGF、VEGF 及其受体 FLT-1 mRNA 表达的影响,结果表明京万红软膏组能极显著上调 PDGF mRNA 的表达 ($P<0.01$),但对 VEGF、FLT-1 mRNA 的表达没有显著性影响。据报道 PDGF 在创面炎症反应、肉芽组织形成和基质沉积等几乎所有阶段都具有潜在的作用^[11]。炎症反应阶段,PDGF 通过增加前列腺素 E₂ 的含量来趋化大量的炎症细胞和修复细胞作用于创面,从而促进组织修复;组织再生阶段,PDGF 诱导成纤维细胞的增殖、分化、迁移、分泌来参与肉芽组织的生成;瘢痕形成阶段,PDGF 通过促使组织修复细胞分化及分泌胶原、胶原蛋白酶等调节细胞外基质成分,从而形成瘢痕组织,修复创伤。此外,在糖尿病足的治疗中,可采用补充外源性的 PDGF 促进创面的愈合^[12]。

综上所述,京万红软膏对大鼠足部消肿生肌、促进溃疡愈合的作用有可能有赖于上调 PDGF mRNA 的表达,且这种影响与血糖的控制无关。

参考文献

- [1] Shahbazian H, Yazdanpanah L, Latifi S M. Risk assessment of patients with diabetes for foot ulcers according to risk classification consensus of international working group on diabetic foot [J]. *Park J Med Sci*, 2013, 29(3): 730-734.
- [2] Sothornwit J, Srisawasdi G, Suwannakin A, et al. Decreased health-related quality of life in patients with diabetic foot problems [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2018, 11: 35-43.
- [3] 汪涛,赵珺,梅家才,等. WiFi 分级用于预测糖尿病足合并周围血管病变病人下肢血管再通后伤口愈合效果研究 [J]. *中国实用外科杂志*, 2016, 36(12): 1293-1297.
- [4] 王景文. 京万红软膏治疗皮肤损伤的临床应用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(4): 375-380.
- [5] Lau T W, Sahota D S, Lau C H, et al. An in vivo investigation on the wound-healing effect of two medicinal herbs using an animal model with foot ulcer [J]. *Eur Surg Res*, 2008, 41(1): 15-23.
- [6] 董方,蔡黔,刘毅. 糖尿病足溃疡大鼠模型的建立 [J]. *山东医药*, 2010, 50(14): 34-35.
- [7] 史向华. 烧烫伤软膏对实验性小鼠、大鼠烧烫伤的作用 [J]. *山西中医学院学报*, 2011, 12(3): 18-19.
- [8] 裴瑾,姜晶,赵丽娟,等. 外用重组人粒细胞-巨噬细胞刺激因子凝胶与注射用重组人生长激素联合应用对实验性烫伤动物的疗效 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(7): 602-604.
- [9] 曾庆,曾宪强,翟涛,等. 比较踝肱指数与趾肱指数在评估糖尿病足血管介入治疗效果中的意义 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2018, 26(11): 895-899.
- [10] 宋长满,董毅,朱美誉. 肛周脓肿及肛瘘术后为促进创面愈合应用中医祛腐生肌法联合京万红软膏的价值探讨 [J]. *中国实用医药*, 2018, 13(6): 129-130.
- [11] Tyrone J W, Moford J E, Chandler L A, et al. Collagen-embedded platelet-derived growth factor DNA plasmid promotes wound healing in a dermal ulcer model [J]. *J Surg Res*, 2000, 93(2): 230-236.
- [12] Bhansali A, Venkatesh S, Dutta P, et al. Which is the better option: recombinant human PDGF-BB 0.01% gel or standard wound care, in diabetic neuropathic large plantar ulcers off-loaded by a customized contact cast? [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 83(1): 13-16.