

京万红软膏对糖尿病足大鼠的作用及其机制研究

岳莹, 郝文立, 甘永康

天津市中医药研究院附属医院 疮疡科, 天津 300131

摘要: **目的** 探究京万红软膏对糖尿病足大鼠的作用及其机制。**方法** 选取 40 只健康大鼠, 分为对照、模型、京万红软膏、重组人表皮生长因子(rhEGF) 4 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余大鼠均建立糖尿病足模型, 建模成功后第 2 天给药, 将大鼠足部创面周围用生理盐水清洁后上药, 模型组大鼠每日涂抹生理盐水, 并与对照组大鼠进行常规喂养; 京万红软膏组每天外敷涂抹 3 g/kg 京万红软膏覆盖创面, rhEGF 组每天给予 1 次 rhEGF 外用溶液 4 000 U。各组均连续给药 15 d。通过大鼠足部图像观察创面愈合情况; 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测糖基化终末产物(AGEs)、糖基化终末产物受体(RAGE)及血糖水平; 苏木精-伊红(HE)染色观察病理学变化情况; 免疫印迹检测结缔组织生长因子(CTGF)、细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、p-ERK 蛋白表达情况; PCR 法检测 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达情况。**结果** 与模型组比较, 京万红软膏组和 rhEGF 组大鼠的创面均减小, 并以京万红软膏组的效果最为显著($P < 0.05$)。与模型组比较, 京万红软膏组和 rhEGF 组大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖水平均显著降低($P < 0.05$), 以京万红软膏组的降低最为显著($P < 0.05$)。对照组大鼠皮肤组织结构完整且胶原含量丰富, 模型组大鼠表皮结构损伤, 有大量炎性及坏死组织; 京万红软膏组大鼠表皮生长速度较快, 创面组织生长活跃, 毛细血管和成纤维细胞数量增多; rhEGF 组大鼠组织结构稍显完整, 炎性渗出物降低。与模型组比较, 京万红软膏组和 rhEGF 组大鼠创伤组织中 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白表达均明显降低, 且以京万红软膏组的降低最为显著($P < 0.05$)。与模型组比较, 京万红软膏组和 rhEGF 组大鼠创伤组织中 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达显著降低, 以京万红软膏组的降低最为显著($P < 0.05$)。**结论** 京万红软膏可促进糖尿病足大鼠的创面愈合、减小创伤面积, 降低 AGEs、RAGE 水平, 作用机制可能与抑制 HMGB 及 ERK 相关通路有关。

关键词: 京万红软膏; 重组人表皮生长因子; 糖尿病足; 糖基化终末产物; 结缔组织生长因子; 细胞外信号调节蛋白激酶
中图分类号: R982 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)05-0924-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.05.002

Effect and mechanism of Jingwanhong Ointment on diabetic foot rats

YUE Ying, HAO Wen-li, GAN Yong-kang

Department of Sore Surgery, Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300131, China

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of Jingwanhong Ointment on diabetic foot rats. **Methods** Select 40 healthy rats, divided into control, model, Jingwanhong Ointment, and rhEGF groups, each group had 10 rats. The diabetic foot model was established in all rats except the control group. All rats were given the drug on the 2nd day after modeling, and the area around the foot wound was cleaned with normal saline before the drug was applied. Rats in the model group were applied with normal saline every day, and were routinely fed with rats in the control group. Jingwanhong Ointment group applied 3 g/kg Jingwanhong Ointment every day to cover the wound, rhEGF group was given rhEGF external solution 4 000 U once daily. Rats in each group were continuously given drugs for 15 d. The wound healing was observed by foot images of rats. AGEs, RAGE, and blood glucose levels were determined by ELISA. The pathological expression of HE staining was observed. Western blotting was used to detect the expression of CTGF, ERK, and P-ERK proteins. The mRNA expressions of HMGBA, HMGB1, ERK1 and ERK2 were detected. **Results** Compared with the model control group, the wound surface of Jingwanhong Ointment group and rhEGF group were reduced after treatment, and the effect of Jingwanhong Ointment group was the most significant ($P < 0.05$). Compared with model group, the expressions of AGEs, RAGE, and blood glucose in serum of Jingwanhong Ointment group and rhEGF group were significantly decreased, and the decrease of AGEs, RAGE and blood glucose in Jingwanhong Ointment group was the most significant ($P < 0.05$). The skin structure of rats in the control group was intact, and collagen content was rich, while the skin structure of rats in the model

收稿日期: 2022-02-14

基金项目: 天津市卫健委课题(2015010)

作者简介: 岳莹(1981—), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向为中医外科。E-mail: wanhebi8991063755@163.com

group was damaged, and there were a lot of inflammatory and necrotic tissues. In Jingwanhong Ointment group, the epidermis growth rate was faster, wound tissue growth was active, and the number of capillaries and fibroblasts increased. The tissue structure of rhEGF group was slightly intact, and the inflammatory extract decreased. Compared with model group, the protein expressions of CTGF, ERK and p-ERK in Jingwanhong Ointment group and rhEGF group were significantly decreased, and the decrease was most significant in Jingwanhong Ointment group ($P < 0.05$). Compared with model group, mRNA expressions of HMGBA, HMGB1, ERK1 and ERK2 in Jingwanhong Ointment group and rhEGF group were significantly decreased, and the decrease was most significant in Jingwanhong Ointment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Jingwanhong Ointment can promote the wound healing, reduce the wound area and the expression levels of AGEs and RAGE in diabetic foot rats, and its mechanism may be related to the inhibition of HMGB and ERK related pathways.

Key words: Jingwanhong Ointment; rhEGF; diabetic foot; AGEs; CTGF; ERK

糖尿病是一组以慢性高血糖为特征的代谢性疾病。长期的高糖血症可导致心血管、肾脏、肝脏及视网膜病变等多种并发症的出现^[1]。糖尿病足是糖尿病患者中一种常见的严重并发症,其发病率达 25%左右,是患者在长期高血糖基础上产生的不同程度神经末梢及血管病变所引起的肢体溃疡、感染和深层组织破坏等现象^[2]。该病可对患者造成极大的痛苦,并严重影响患者的生活质量和生命健康。近年来,炎性反应在糖尿病足患者的发病机制中受到越来越多的关注。高迁移率族蛋白 A (HMGBA) 为 HMGB 家族的一员,是一种高度保守的核蛋白,其作为与损伤相关的分子模式广泛分布在哺乳动物细胞中,同时也是一种晚期炎症因子,可参与并加重机体的炎症反应,并通过与其它受体结合参与疾病的发展过程^[3]。细胞外信号调节蛋白激酶 (ERK) 是丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路中的重要通路,能够参与细胞活性及多种生理、病理过程,并在溃疡创面形成及愈合过程中发挥重要作用^[4],也与糖尿病及相关病理改变密切相关,在糖尿病的发生发展中具有关键作用。结缔组织生长因子 (CTGF) 是促进纤维化的细胞因子,在糖尿病及相关疾病的发展中具有重要作用,而糖基化终末产物 (AGEs) 是蛋白质或脂质经过非酶糖基化反应的产物,存在于糖尿病患者的血管中并能够促进动脉粥样硬化疾病的发展,对于创面引发的血管可能具有一定的干预作用^[5]。HMGBA、ERK、AGEs 等在炎症的放大以及维持中发挥至关重要的效用,也为晚期炎症反应的标志物,均与疾病的发生发展具有密切联系,其异常表达可引起机体全身或局部炎症反应综合症,并可能与糖尿病足的发生发展具有一定相关性。京万红软膏是由地榆、当归、黄连、黄柏、红花等 30 余种中药组成的纯中药制剂。相关研究表示,该药在治疗烧伤、烫伤、皮肤

创伤及术后切口感染等多种皮肤损伤中均有不同程度的治疗效果^[6-7]。本研究通过观察糖尿病足大鼠中 HMGBA、ERK、AGEs 等相关指标,探究京万红软膏对糖尿病足大鼠创面愈合的治疗效果,意在为临床京万红软膏治疗糖尿病足的研究提供一定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 SPF 级 SD 大鼠 40 只,月龄 4~6 个月,体质量 180~220 g,购自简阳达硕动物科技有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2020-0080,室温 15~22 °C 室内饲养,湿度约为 60%,每日 12 h 光照,喂养条件为自由摄取标准饲料,饮用干净自来水,严格按照《实验动物管理条例》规定进行实验。

1.2 药物、试剂与仪器

京万红软膏(天津达仁堂京万红药业有限公司,批号 211692),链脲佐菌素(华北制药股份有限公司,批号 S0310),血糖仪(北京利德曼,批号 2011305),重组人表皮生长因子外用溶液(rhEGF, 2 000 U×15 mL,深圳市华生元素基因工程发展有限公司),0.9%生理盐水、柠檬酸缓冲液(山东威高股份有限公司,批号 1207121、1901025),HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG(南京建成生物工程研究所,批号 19980612、12580262、11480157、2080147),ELISA 试剂盒(上海铭修生物科技有限公司,批号 171209),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(上海生工生物技术公司,批号 165809),显微镜(重庆光学仪器厂),切片机(上海医用仪器厂),尿糖试纸(桂林中辉科技发展有限公司),PCR 反应引物(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.3 模型建立

大鼠依据文献方法^[8]建立糖尿病足大鼠模型。

将大鼠俯卧位后进行 ip 麻醉, 用无菌的柠檬酸缓冲液 (pH 4.4) 以质量分数为 1% 浓度配制链脲佐菌素溶液, 据每只大鼠空腹体质量以 50 mg/kg 的剂量快速 ip, 由左后足根部中央位置开始采用无菌手术器械设备依次朝下切开皮肤表层以及皮下组织, 进行分离肌层和暴露血管神经束后小心剥离出股动脉主干并进行剪断结扎, 后滴入适量庆大霉素, 进行皮肤切口缝合, 将大鼠足背部皮肤脱毛并用 7% 硫化钠溶液和生理盐水清洁、擦干消毒后, 于足背中心位置用手术刀片切开 4 mm×5 mm 切口, 并切除全层皮肤, 伤口均深至筋膜层, 1 周后测定大鼠空腹血糖, 血糖值大于 16.7 mmol/L 为糖尿病足部溃疡大鼠造模成功。

1.4 分组与给药

所有分为对照组、模型组、京万红软膏组、rhEGF 组, 每组 10 只。除对照组外其余大鼠建立糖尿病足模型, 建模成功后第 2 天开始给药, 将大鼠足部创面周围用生理盐水清洁后, 擦干上药。模型组大鼠每日给予生理盐水擦洗后与对照组大鼠进行常规饲养, 依据文献方法^[9]京万红软膏组大鼠每天外敷涂抹 1 次 3 g/kg 京万红软膏覆盖创面, rhEGF 组每天 1 次 rhEGF 外用溶液 4 000 U/(10×10) cm², 使用无菌纱布进行包扎, 均连续给药 15 d。

1.5 创面愈合观察

观察各组大鼠日常活动状态、饮食饮水情况, 以及足部的形态与活动能力等, 使用数码相机于给药治疗前及给药治疗 15 d 后采集并记录各组大鼠足部图像, 针对大鼠的足部溃疡面积在给药前及给药 15 d 后的变化情况给予对比分析, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算其面积, 并按照公式计算创面愈合率^[10]。

创面愈合率 = (原始创面面积 - 当前测量面积) / 原始创面面积

1.6 AGEs、糖基化终末产物特异性受体 (RAGE)、血糖检测

抽取大鼠腹部静脉血 1 mL, 3 000 r/min 离心 15 min 低速离心后保留上清液, 酶联免疫吸附法检测血清中 AGEs、RAGE、血糖水平, 严格按照试剂盒说明书操作, 在对应孔板中加入 100 μL 标准品工作液, 37 °C 恒温孵育 1 h, 取出孔板去板内液体后加 100 μL 生物素化抗体工作液, 进行 37 °C 恒温孵育 1 h, 取孔板后去板内液体并冲洗 3 次, 洗涤后每孔加 100 μL HRP 酶结合物工作液, 37 °C

恒温箱孵育 30 min, 洗涤后每孔加入 100 μL 底物溶液, 37 °C 恒温孵育 30 min, 加入 100 μL 终止液, 在 200 nm 波长处检测吸光度 (A) 值, 根据标准曲线和 A 值计算 AGEs、RAGE 及血糖的含量。

1.7 足部创伤部位组织病理学观察

经断头法处死大鼠后, 取大鼠足部创伤部位组织, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 于 24 h 后采用 pH 7.2 的乙二胺四乙酸溶液脱钙, 每日 3 次进行更换, 4 周后可将大头针刺入骨组织表示脱钙完全, 采用酒精脱水, 将选好的石蜡切片置于 70 °C 的保温箱中 1 h 进行烘干, 经无水乙醇、80% 乙醇、60% 乙醇和 70% 乙醇脱水后用清水冲洗, 70 °C 烤箱中烘烤 15 min 后于苏木素中染色 15 min, 清洗后采用 HE 染色 5 min, 80 °C 烘箱烤干后进行中性树脂封片, 骨组织切片于显微镜下观察后拍照。

1.8 免疫印迹检测 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白水平

将大鼠足部创伤部位组织加入包含磷酸化酶抑制剂及蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液 5 °C 冰浴 1 h, 离心 10 000 r/min, 离心 5 min 取上清为组织总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 100 μg 总蛋白样品于 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转后采用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 CTGF 抗体 (1:3 000)、ERK 抗体 (1:2 500)、p-ERK (1:5 000) 进行 5 °C 孵育过夜, 洗膜后加入稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:2 000), 37 °C 孵育 1 h 后进行胶片曝光显影。

1.9 PCR 检测 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达

将 0.2 g 大鼠足部创伤部位组织分离置于组织匀浆器中, 加入 1 000 μL Trizol 溶液, 研磨均匀且无小块聚集后悬浮于 Trizol 液中, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 操作步骤按说明书严格操作, 将总 RNA 经紫外分光光度计测定, 240 和 260 nm 处吸光度比值 (A₂₄₀/A₂₆₀) 为 1.9~2.1, 按照 PCR 试剂盒说明进行逆转录和 PCR 操作, 使用 Primer 3 软件设计特异性引物, 将 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 作为目的基因, 反应体系为 30 μL, 反应条件为 90 °C 变性 5 min, 60 °C 退火 3 min, 70 °C 延伸 5 min, 共 30 个循环, 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, Bio-Rad 凝胶图像分析系统扫描半定量分析, PCR 产物量以光密度×面积方式表示, 并根据 2^{-△△Ct} 值计算相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	方向	引物序列
HMGBA	F	5'-ACATGAGTGCAGCTTGTTC-3'
	R	5'-TTGTCTCTTGTGGCCTTCTGT-3'
HMGB1	F	5'-GCAGCAGTGTGTTCCACAT-3'
	R	5'-CGGCCTTCTGTCTCTGTTTGT-3'
ERK1	F	5'-GCAGCGTTCCACATGAGTTT-3'
	R	5'-GTGGCTTGTCTCTCTGTTCTT-3'
ERK2	F	5'-CCAACAGTACTCTATGAAGAC-3'
	R	5'-GCTGGACGTACTTCCTCATC-3'
β -actin	F	5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'
	R	5'-GGACTCATCGTACTCTCTGCT-3'

1.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验或 SNK-*q* 检验;不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数[M (P25, P75)]表示,组间比较用 Mann-Whitney U 检验。

2 结果

2.1 大鼠创伤面积

与对照组比较,模型组大鼠治疗后创伤面积增大 ($P < 0.05$);与模型组比较,京万红软膏组大鼠治疗后创伤面积显著减小 ($P < 0.05$),与京万红软膏组比较,rhEGF 组大鼠治疗后创伤面积增大 ($P < 0.05$),见表 2、图 1。

2.2 各组大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖水平

与对照组比较,模型大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,京

表 2 各组大鼠创伤面积 ($n = 10$)Table 2 Wound area of rats in each group ($n = 10$)

组别	剂量	创伤面积/mm ²	
		治疗前	治疗后
对照	—	—	—
模型	—	18.56 (4.64, 23.20) [#]	18.48 (4.62, 23.10) [#]
京万红软膏	3 g·kg ⁻¹	18.49 (4.62, 23.11) ^{##}	5.32 (1.33, 6.65) ^{##}
rhEGF	4 000 U	18.57 (4.64, 23.21) ^{##▲}	9.02 (2.26, 11.28) ^{##▲}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与京万红软膏组比较: [▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Jingwanhong Ointment group

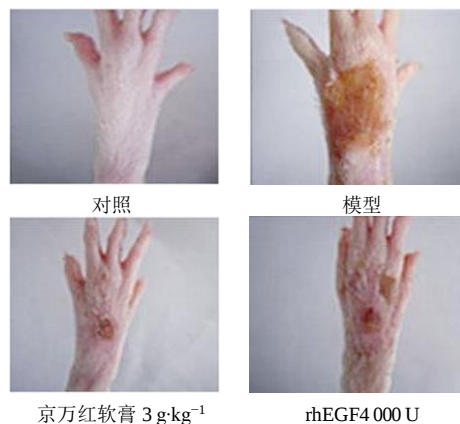


图 1 各组大鼠创面愈合情况

Fig. 1 Wound healing of rats in each group

万红软膏大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖水平显著降低 ($P < 0.05$);与京万红软膏比较,rhEGF 组大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖水平显著升高 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖表达 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Expression of AGEs, RAGE and blood glucose in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量	AGEs/(AU·mg ⁻¹)	RAGE/(mg·mL ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)
对照	10	—	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.04	4.12 ± 0.39
模型	10	—	0.75 ± 0.18 [#]	0.77 ± 0.18 [#]	27.75 ± 6.18 [#]
京万红软膏	10	3 g·kg ⁻¹	0.38 ± 0.08 ^{##}	0.36 ± 0.09 ^{##}	10.55 ± 1.68 ^{##}
rhEGF	10	4 000 U	0.47 ± 0.12 ^{##▲}	0.49 ± 0.13 ^{##▲}	19.64 ± 3.20 ^{##▲}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与京万红软膏组比较: [▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Jingwanhong Ointment group

2.3 各组大鼠 HE 染色结果

对照组大鼠皮肤组织结构完整且层次清晰、排列有序且胶原含量丰富;模型组大鼠表皮结构不完整,炎性浸润严重,坏死组织较多;京万红软膏组大鼠有明显上皮组织新生,表皮生长速度较快,且创面纤维组织生长活跃,毛细血管和成纤维细胞数量增多,炎性细胞浸润较少;rhEGF 组大鼠组织结

构稍显完整,炎性浸出物略有降低,创面纤维组织生长较缓慢,见图 2。

2.4 各组大鼠创伤组织中 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白表达水平

与对照组比较,模型组大鼠创伤组织中 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,京万红软膏组大鼠创伤组织中 CTGF、

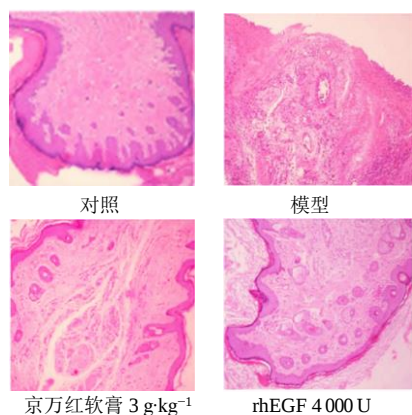


图 2 HE 染色结果 (×200)
Fig. 2 Results of HE staining (×200)

表 4 各组大鼠创伤组织中 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Protein expressions of CTGF, ERK and P-ERK in wound tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量	CTGF	ERK	p-ERK
对照	10	—	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.02	1.09 ± 0.03
模型	10	—	2.11 ± 0.12 [#]	2.58 ± 0.09 [#]	2.79 ± 0.21 [#]
京万红软膏	10	3 g·kg ⁻¹	1.10 ± 0.06 ^{**}	0.35 ± 0.05 ^{**}	1.56 ± 0.09 ^{**}
rhEGF	10	4 000 U	1.65 ± 0.09 ^{**▲}	1.40 ± 0.07 ^{**▲}	2.03 ± 0.15 ^{**▲}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与京万红软膏组比较: [▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Jingwanhong Ointment group

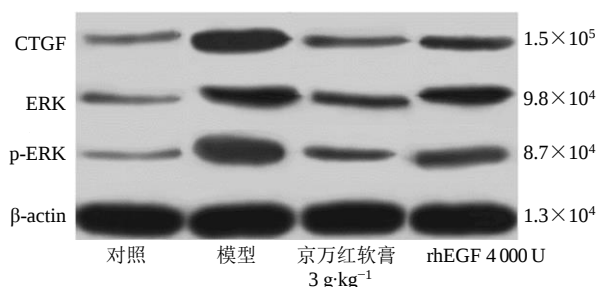


图 3 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白表达情况
Fig. 3 Protein expression of CTGF, ERK and P-ERK

表 5 各组大鼠创伤组织中 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 mRNA expressions of HMGBA, HMGB1, ERK1 and ERK2 in wound tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量	HMGBA	HMGB1	ERK1	ERK2
对照	10	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	10	—	3.15 ± 0.25 [#]	3.31 ± 0.28 [#]	2.56 ± 0.20 [#]	2.74 ± 0.22 [#]
京万红软膏	10	3 g·kg ⁻¹	1.82 ± 0.10 ^{**}	1.86 ± 0.12 ^{**}	1.41 ± 0.08 ^{**}	1.52 ± 0.09 ^{**}
rhEGF	10	4 000 U	2.36 ± 0.17 ^{**▲}	2.48 ± 0.19 ^{**▲}	2.08 ± 0.11 ^{**▲}	2.16 ± 0.12 ^{**▲}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与京万红软膏组比较: [▲] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs Jingwanhong Ointment group

ERK、p-ERK 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与京万红软膏组比较, rhEGF 组大鼠创伤组织中 CTGF、ERK、p-ERK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 见表 4、图 3。

2.5 各组大鼠 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达水平

与对照组比较, 模型组大鼠创伤组织中 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 京万红软膏组大鼠创伤组织中 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与京万红软膏组比较, rhEGF 组大鼠创伤组织中 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 见表 5。

3 讨论

糖尿病足是糖尿病患者足部存在的周围神经、外周血管以及皮肤病变现象。该病好发于足趾间, 且由于患者普遍存在神经病变, 导致感觉功能减退、甚至丧失, 使处在糖尿病足期的患者不能及时感受到外源性创伤刺激和不适症状, 进而使病变时期的血管仅可维持皮肤组织的生存, 却无法对创伤和感染等做出相应的自我保护, 致使糖尿病足部创伤的发生率加剧, 严重危害患者生命安全^[11]。中医研究表示, 糖尿病由消渴日久而生, 其发病与湿热、

火毒、气血瘀滞等因素有关,以脉络瘀阻、血行不畅为病机关键^[12]。京万红软膏为中药制剂,具有活血解毒、排脓、消肿止痛、祛腐生肌等功效。本研究将京万红软膏运用于大鼠糖尿病足创伤的治疗,通过评价药效和探究作用机制,意在为临床糖尿病足创伤的治疗提供用药依据。

近年来,AGEs 和 RAGE 的相互作用在糖尿病的发病机制中得到了较高关注,二者是蛋白质或脂质经过非酶糖基化反应的产物,在糖尿病患者的外周血中高表达,可促进疾病的发展^[13]。本研究中,与模型组相比,治疗后大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖表达均降低,其中京万红软膏组降低最为显著,表示京万红软膏治疗糖尿病足的作用可能与抑制大鼠血清中 AGEs、RAGE、血糖表达相关。以往研究表示,持续高血糖是导致糖尿病及相关病变的始动因素,而葡萄糖可与蛋白质的氨基相关基团发生非酶促糖化反应形成 AGEs 及相关因子,并通过与细胞外基质基底膜上的分子形成交联,与其受体 RAGE 结合改变蛋白质结构,引起糖尿病相关并发症的产生^[14]。京万红软膏的组分包括大黄、地榆、黄连、当归、黄芩、红花等。中药黄连具有清热解毒、清热凉血、清热祛湿等功效,对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、溶血性链球菌及白色葡萄球菌等具有明显的抑制作用^[15]。京万红软膏可能通过增强病变组织中血红蛋白非酶促糖基化作用的抑制强度,降低凝血因子与葡萄糖的结合,进而起到抑制蛋白质糖基化、细菌形成及机体内氧化应激的过度反应。本研究推测京万红软膏通过降低创伤组织中 AGEs、RAGE 的表达含量和组织内纤维蛋白形成进而起到稳定血糖水平、抑制疾病发展的作用。

糖尿病足的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等^[16]。本研究中,与模型组相比,京万红软膏组和 rhEGF 组大鼠经治疗后创伤面积均有所减小,其中京万红软膏组降低最为显著,表示京万红软膏对促进糖尿病足大鼠创伤愈合具有积极作用。相关研究显示,糖尿病发生时,由于患者下肢常发生动脉闭塞性和神经性病变,往往会导致足部感觉障碍而引起外伤,严重者易发生细菌感染而形成创面溃疡,而创面溃烂难愈则是导致糖尿病患者截肢或致命的重要诱因^[17]。药理学研究发现,京万红软膏中的紫草具有凉血消肿、活血生肌等功效,有促进肉芽组织生长和肌纤维组织增生的作用。本研究推

测,糖尿病足中可能通过使中性粒细胞、单核细胞、成纤维细胞等向创伤组织迁移,并通过诱导成纤维细胞再生和血管新生,激活巨噬细胞合成血管因子,进而增加微静脉和小静脉的通透性,并为胶原纤维的合成提供物质基础,增加组织修复及胶原蛋白酶等调节细胞外基质成分的分泌,进而促进修复创伤部位肉芽和瘢痕组织的形成。

近年来对于糖尿病的相关研究发现,糖尿病的发生发展与机体内相关蛋白表达的异常密切相关。ERK1/ERK2 作为 ERK 的 2 个重要亚类,被激活后保留在胞质也有转移至胞核,并通过活化部分转录因子调控疾病中相关基因表达^[18]。ERK1/ERK2 信号通路抑制剂可通过抑制系膜细胞增生以及细胞外基质聚集,并避免没了足细胞的损伤,在早期还可使肾脏体积缩小进而抑制疾病的发展。HMGB1 是一种与炎症反应、组织修复相关的多功能细胞因子。当糖尿病发生时,机体由于受到缺血、缺氧、炎症等刺激,中性粒细胞、单核巨噬细胞、免疫细胞等可主动分泌 HMGB 因子,并通过坏死细胞的被动释放转移至细胞外,在炎症放大及维持中起重要作用^[19]。本研究中,与模型组相比,京万红软膏组和 rhEGF 组以上表达均显著降低,其中京万红软膏组降低最为显著,表示京万红软膏对抑制糖尿病足大鼠 HMGBA、HMGB1、ERK1、ERK2 及 CTGF、ERK、p-ERK 表达具有一定积极影响。相关研究表示,糖尿病足发生时 HMGB1 可由坏死细胞、感染细胞分泌至细胞外,同时作为一种信号分子发挥促进细胞增殖分化并向损伤组织迁移的作用^[20]。HMGB1 可通过刺激促炎因子及 p-ERK2 相关蛋白及其结缔组织生长因子的释放,并在多种趋化因子的作用下启动损伤部位的炎症反应,进一步引起全身或局部的不良反应综合症,进而加重患处的病理损伤活化^[21-22]。CTGF 作为转化生长因子 β 的下游产物,其介导 TGF β 的促成纤维细胞增殖、促纤维化、诱导黏附及迁移等均是影响创面愈合的多重因素之一。京万红软膏主治脉络瘀阻、血行不畅、电解质紊乱、机体免疫力下降等共性。由此推测,糖尿病足中可能通过增强糖尿病机体中血红蛋白非酶促糖基化作用的抑制强度,降低凝血因子与葡萄糖的结合,抑制 HMGB1 并对皮肤成纤维细胞、表皮细胞迁移产生促进作用,并通过调解 CTGF、ERK、p-ERK 刺激成纤维细胞增殖,诱导细胞糖蛋白、硫酸乙酰肝素、纤维状胶原蛋白等细胞外基质

产生,刺激内皮细胞基底膜生成和新生血管生成,进而抑制相关蛋白质糖基化作用,降低组织内 ERK 及纤维蛋白形成,抑制炎症因子的释放、氧化应激增强,起到稳定血糖水平和抑制机体损伤的作用。

综上所述,京万红软膏对可促进糖尿病足大鼠的创面愈合、减小创伤面积,降低 AGEs、RAGE 表达水平,其作用机制可能与抑制 HMGB 及 ERK 相关通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈诗梅, 韦芳. DNA 损伤修复与糖尿病及其并发症研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(11): 2203-2208.
- [2] 李海燕, 单国林, 黄生才, 等. 糖尿病足患者感染特征与下肢血管病变及免疫功能关系的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(4): 574-577.
- [3] 张玉凤, 邓慧玲, 符佳, 等. 高迁移率族蛋白 B1 的临床研究进展 [J]. 中国小儿急救医学, 2017, 24(8): 606-609.
- [4] 郝志楠, 郑勇斌, 肖高春, 等. 丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶信号通路与肿瘤血管新生的关系 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(1): 148-151.
- [5] 龚冬火, 代杨, 丁风华, 等. 晚期糖基化终末产物促进糖尿病动脉粥样硬化形成的研究进展 [J]. 国际心血管病杂志, 2017, 44(6): 326-328.
- [6] 张密霞, 王景文, 张德生, 等. 京万红软膏对烫伤及创伤大鼠创面愈合、瘢痕形成的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 3007-3010.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 高艳, 崔文钰, 卢志强, 等. 京万红软膏对大鼠糖尿病足烫伤的疗效及机制研究 [J]. 天津中医药, 2020, 37(5): 578-582.
- [10] 王甜甜, 程玉芳, 徐江平. 重组人神经生长因子对糖尿病大鼠难愈创面愈合的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(6): 793-796.
- [11] 李欣仪, 罗文静, 赵楠, 等. 糖尿病患者合并足部皮肤问题现状及其影响因素 [J]. 解放军护理杂志, 2020, 37(10): 5-9.
- [12] 孙大伟, 冯丽莎, 吴晓翠, 等. 基于 Sirt1 探讨糖尿病脑病“瘀毒阻络”中医病机及治法 [J]. 中医学报, 2019, 34(8): 1621-1624.
- [13] 沈志祥, 朱立勋, 徐伟红. 有氧运动对 2 型糖尿病大鼠 AGE-RAGE 轴及 NF- κ B 通路的影响 [J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(1): 16-19.
- [14] 张宏, 张宇, 曹钰羚, 等. 复方足疡平促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合及对 RAGE/NF- κ Bp65/VEGF 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(14): 1405-1409.
- [15] 毛磊, 王炜, 马立艳, 等. 黄连生物碱及衍生物对多重耐药铜绿假单胞菌体外抗菌活性的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(15): 1574-1578.
- [16] 徐鋈, 麦梨芳, 李永洁, 等. 不同部位糖尿病足溃疡愈合情况分析 [J]. 护理学杂志, 2017, 32(3): 12-14.
- [17] 刘雪梅, 何峥, 吴凡, 等. 超声对糖尿病性下肢动脉狭窄及闭塞病变评估及相关危险因素的分析 [J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(1): 94-96.
- [18] Brevoord D, Smit K F, Wang Y, et al. A randomized controlled trial on the effect of remote ischemic preconditioning on ERK1, ERK2, STAT3 and STAT 5 in patients with and without diabetes mellitus undergoing CABG surgery [EB/OL]. DOI:10.21203/rs.2.9489/v1.
- [19] Yang L, Zhou L, Wang X, et al. Inhibition of HMGB1 involved in the protective of salidroside on liver injury in diabetes mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(PtA): 106987.
- [20] 谢瑞敏, 李想, 李强强, 等. HMGB1 对大鼠糖尿病足溃疡炎症的影响及机制分析 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(13): 2430-2434.
- [21] 吴标良, 唐乾利, 覃晓洁, 等. 基于 MEET/MEBO 的 ERK1/2 和 p38 信号通路与糖尿病足免疫表达关系的研究 [J]. 重庆医学, 2016, 45(36): 5069-5071.
- [22] Hafez Y M, El-Deeb O S, Atef M M, et al. The emerging role of the epigenetic enzyme Sirtuin-1 and high mobility group Box 1 in patients with diabetic foot ulceration [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(6): 1065-1070.

[责任编辑 高源]