

托里消毒散精简方对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的影响及其机制

李玉珠, 张晓娜, 王 颖, 陈莉明, 常 柏, 李代清, 潘从清*

天津医科大学 卫生部激素与发育重点实验室, 天津医科大学代谢病医院, 天津 300070

摘要: 目的 探讨托里消毒散精简方全方及其拆方影响糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的作用机制。方法 200 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、托里消毒散精简方全方(黄芪、当归、白芷、皂角刺)组、托法(黄芪、当归)组、透法(白芷、皂角刺)组, 采用尾 iv 链脲佐菌素(STZ) 50 mg/kg 制备糖尿病模型, 同时背部打孔法制备糖尿病皮肤溃疡大鼠模型。各组分别 ig 给予托里消毒散精简方全方及其拆方的浸膏, 对照组和模型组 ig 等量生理盐水, 连续给药 14 d, 分别于创伤后 5、8、11、14 d 评价创面溃疡愈合情况。采用 HE 染色观察创面肉芽组织形态学改变; 免疫组织化学法检测创面组织血管生成素受体 2 (Tie-2)、血管生成素 1 (Ang-1)、血管生成素 2 (Ang-2) 在肉芽组织中的定位表达; Western blotting 法检测创面肉芽组织中 Tie-2、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达水平。结果 创伤后 5、8、11、14 d, 各药物组大鼠创面愈合率均高于模型组 ($P < 0.05$); 创伤后 5 d, 透法组愈合率高于托法组和全方组 ($P < 0.05$); 创伤后 8、11、14 d, 全方组愈合率高于托法组和透法组 ($P < 0.05$); 全方组各时间点肉芽组织中 Ang-1、Tie-2 蛋白表达水平均高于模型组 ($P < 0.05$), Ang-2 蛋白表达水平均低于模型组 ($P < 0.05$); 创伤后 5、8 d, 透法组 Ang-2 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$); 创伤后 11、14 d, 托法组 Ang-1、Tie-2 蛋白表达水平上调 ($P < 0.05$)。结论 托里消毒散精简方全方可能通过上调创面肉芽组织中 Ang-1、Tie-2 的蛋白表达水平, 下调 Ang-2 的蛋白表达水平促进创面愈合。

关键词: 托里消毒散; 托法; 透法; 糖尿病; 皮肤溃疡; 血管生成

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1560-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.019

Effects of Tuoli Xiaodu Powder on healing of wound in diabetic rats with skin ulcer and its mechanism

LI Yu-zhu, ZHANG Xiao-na, WANG Ying, CHEN Li-ming, CHANG Bai, LI Dai-qing, PAN Cong-qing,

Key Laboratory of Hormones and Development (Ministry of Health) Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** To study the possible mechanism of Tuoli Xiaodu Powder and disassembled prescriptions for the healing of wound in diabetic rats with skin ulcer. **Methods** Totally 200 male SD rats were randomly divided into control group, model group, two disassembled prescription group, tou disassembled prescription group, and whole prescription group. The diabetes rat model was established using caudal vein injection of Streptozotocin (STZ) and the skin ulcer model was prepared by “back drilling” method. The rats in each group were given different prescriptions and corresponding physiological saline. The healing conditions of ulcer were observed on days 5, 8, 11, and 14 after treatment. The structural changes of granulation tissue were observed by HE staining. Expression of Tie-2, Ang-1, and Ang-2 in the granulation tissues of the wound were detected by Western blotting and immunohistochemistry. **Results** The healing rate of each treatment group was higher than that of the DM group at all the time ($P < 0.05$); The healing rate of the tou group was higher than that of the two group and whole group on day 5 after treatment ($P < 0.05$); The healing rate of the whole group was higher than that of the two and tou group ($P < 0.05$). The expression of Ang-1 and Tie-2 was increased and that of Ang-2 was decreased in the whole group compared with the DM group ($P < 0.05$). Expression of Ang-2 in the tou group was significantly decreased on days 5 and 8 after treatment ($P < 0.05$). Expression of Ang-1 and Tie-2 in the two group was increased on days 11 and 14 after treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** The increased expression of Ang-1 and Tie-2 in the granulation tissue and the decreased expression of Ang-2 maybe the mechanism through which the Tuoli Xiaodu Powder promoting wound healing.

Key words: Tuoli Xiaodu Powder; tou method; tou method; diabetes mellitus; skin ulcer; angiogenesis

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273916)

作者简介: 李玉珠 (1989—), 女, 硕士在读。Tel: 15022773873 E-mail: shuiweng@126.com

*通信作者 潘从清 (1965—), 男, 医学博士, 硕士生导师, 主要研究方向为糖尿病及并发症的中西医结合临床和基础研究。

Tel: (022)23333251 E-mail: cq.pan@163.com

远端缺血、神经损伤、局部感染是糖尿病足溃疡发病的主要原因,而创面微血管形成障碍和功能丧失,被认为是糖尿病溃疡创面难以愈合的主要因素^[1-3]。目前糖尿病足的主要治疗方法有改善血液循环、控制感染、清创术、截肢等^[4]。但是经治疗后,糖尿病足溃疡创面仍然难以愈合。近年来在标准治疗的基础上加用中医药辅助治疗能够明显促进创面愈合、减少瘢痕形成,并可提高愈合质量^[5]。托里消毒散出自明代陈实功所著《外科正宗》,由生黄芪、党参、当归、金银花、连翘、白术、茯苓、赤芍、皂角刺、白芷、生甘草组成,是透托法的主要代表方剂,在中医外科临床上发挥着重要作用^[6],托里消毒散方中黄芪、当归流通气血,防止毒邪内陷,是托法的代表方药;皂角刺善通经活血、消肿溃脓,白芷透脓而载毒外泄,是透法的代表方药。因此本研究采用托里消毒散精简方(黄芪、当归、白芷、皂角刺)及其拆方托法(黄芪、当归)、透法(白芷、皂角刺)为受试药物,观察各组方对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的作用,并探讨其相关机制。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,10 周龄,体重(300±20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2009-0004。

1.2 药物与试剂

托里消毒散精简方药材(当归、黄芪、白芷、皂角刺)购于天津天士力制药股份有限公司,药材样品经天津中医药大学李天祥教授鉴定,结果分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根、豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* Lam. 的干燥棘刺。链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司;山羊抗人血管生成素 1(Ang-1)一抗、山羊抗人血管生成素 2(Ang-2)一抗、兔抗人血管生成素受体 2(Tie-2)一抗(Santa Cruz 公司);GAPDH 鼠单克隆抗体(天津三箭生物技术有限公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L)(天津三箭生物技术有限公司);辣根酶标记兔抗山羊 IgG(H+L,北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 仪器

卓越纤巧型血糖仪及试纸,罗氏诊断产品有限公司;3K30 型高速台式冷冻离心机,美国 Sigma 公司;BioTek Synergy2 多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;Bio-Rad 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Syngene G BOX 凝胶成像系统,英国 Syngene 公司。

2 方法

2.1 中药浸膏的制备

全方及拆方按药物配伍比例采用醇提取浓缩法制备中药浸膏。称取当归 255 g、黄芪 255 g、白芷 204 g、皂角刺 204 g,粉碎,加入 70%乙醇回流提取 2 次,每次乙醇用量分别为 10、8 倍量,每次各提取 1.5 h,药液滤过合并,减压回收乙醇,得到全方组的浸膏,生药质量浓度为 0.267 g/mL。称取当归 255 g、黄芪 255 g,粉碎,加入 70%乙醇回流提取 2 次,每次乙醇用量分别为 10、8 倍量,每次各提取 1.5 h,药液滤过合并,减压回收乙醇,得到托法组的浸膏,生药质量浓度为 0.232 g/mL。称取白芷 500 g、皂角刺 500 g,粉碎,加入 70%乙醇回流提取 2 次,每次乙醇用量分别为 10 倍量、8 倍量,每次各提取 1.5 h,药液滤过合并,减压回收乙醇,得到透法组的浸膏,生药质量浓度为 0.178 g/mL。

2.2 模型制备及分组

健康雄性 SD 大鼠 200 只,适应性喂养 7 d 后随机分为 2 组,对照组 40 只,糖尿病组 160 只。糖尿病组大鼠尾 iv 给予 50 mg/kg STZ 制备糖尿病模型,随机血糖≥16.7 mmol/L 为糖尿病模型诱导成功,死亡及未成模的大鼠予以剔除。常规饲料喂养 1 周后苯巴比妥麻醉,利用直径 1 cm 打孔器在背部皮肤上打孔 2 个,制备皮肤溃疡动物模型。将成模的糖尿病大鼠随机分为 4 组:模型组、托里消毒散精简方(全方)组、托法组、透法组。

2.3 给药及取材

全方组大鼠 ig 给予全方浸膏 2 mL,相当于生药(当归 1.5 g/kg、黄芪 1.5 g/kg、白芷 1.2 g/kg、皂角刺 1.2 g/kg),托法组大鼠 ig 给予托法浸膏 2 mL(相当于生药当归 1.5 g/kg、黄芪 1.5 g/kg),透法组大鼠 ig 给予透法浸膏 2 mL(相当于生药白芷 1.2 g/kg、皂角刺 1.2 g/kg),各组给药体积约 2 mL,对照组和模型组大鼠 ig 给予等量生理盐水,各组每天给药 1 次,连续给药 14 d。分别于创伤 5、8、11、14 d 观察创面溃疡愈合状态,计算创面愈合率。取与造模时溃疡面积、大小相同的溃疡组织,使用直

径 1 cm 的皮肤打孔器取材, 备用。

创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积

2.4 组织病理学检查

将已固定的溃疡组织标本分别经梯度浓度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋, 切片(约 5 μm 厚)。脱蜡至水, 进行 HE 染色、免疫组织化学法染色, 观察各组肉芽组织生成情况及相关因子定位表达情况。

2.5 Western blotting 法检测创面组织 Tie-2、Ang-1、Ang-2 蛋白表达

创面组织称质量, 加入适量含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液(蛋白酶抑制剂-RIPA 裂解液 1:100)裂解组织, 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 蛋白变性, 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 湿法转膜法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 经 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜; TBST 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温孵育 1 h; TBST 漂洗后 ECL 化学发光, 显影, 定影。以 GAPDH 作为内参蛋白, 目的蛋白与 GAPDH 的灰度比值作为蛋白的相对表达丰度, 进行半定量分析。

2.6 统计学方法

数据均采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两样本均数间的比较采用 t 检验; 多个样本均数间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA LSD 法)。

3 结果

3.1 造模情况

注射 STZ 后第 3、5、7 天, 分别尾静脉取血测定大鼠随机血糖, 血糖值 2 次或 2 次以上 ≥ 16.7 mmol/L, 则判定糖尿病造模成功。实验中共 160 只大鼠注射 STZ, 有 4 只大鼠注射后死亡, 8 只大鼠未达到糖尿病成模标准, 剔除实验, 糖尿病成模率

为 92.5% (148/160)。148 只糖尿病大鼠平均分配到糖尿病各干预组, 每组 37 只大鼠。

制作皮肤创伤模型时, 大鼠由于麻醉意外及糖尿病急性并发症、应激能力下降等情况, 在手术后至实验终点, 对照组死亡 1 只大鼠, 糖尿病组死亡 5 只大鼠, 托法组死亡 3 只大鼠, 透法组死亡 4 只大鼠, 全方组死亡 3 只大鼠。创伤后各时间点取材时的情况为: 创伤后 5 天取材时, 对照组 9 只, 糖尿病组 9 只, 托法组 9 只, 透法组 8 只, 全方组 7 只; 创伤后 8 天取材时, 对照组 10 只, 糖尿病组 8 只, 托法组 8 只, 透法组 8 只, 全方组 10 只; 创伤后 11 天取材时, 对照组 10 只, 糖尿病组 8 只, 托法组 8 只, 透法组 8 只, 全方组 9 只; 创伤后 14 天取材时, 对照组 10 只, 糖尿病组 7 只, 托法组 9 只, 透法组 9 只, 全方组 8 只。

3.2 各组大鼠创面愈合情况

创伤后 5、8、11、14 d, 糖尿病各组愈合率均低于对照组 ($P < 0.05$)。创伤后 5 d, 透法组愈合率高于模型组、托法组和全方组 ($P < 0.05$), 全方组和托法组与模型组比较无统计学差异。创伤后 8、11、14 d, 各给药组愈合率均明显高于模型组 ($P < 0.05$)。创伤后 8 d, 全方组愈合率明显高于托法组和透法组 ($P < 0.05$), 透法组高于托法组 ($P < 0.05$)。创伤后 11 d, 全方组和托法组均高于透法组 ($P < 0.05$), 全方组与托法组比较无统计学差异。创伤后 14 d, 全方组愈合率高于托法组和透法组 ($P < 0.05$), 托法组与透法组比较差异无统计学意义。结果见表 1。

3.3 创面肉芽组织病理观察

HE 染色显示: 创伤后 8 d, 对照组创面组织几乎无中性粒细胞浸润, 毛细血管含量丰富, 管腔较大, 多垂直于创面, 可见较多成纤维细胞, 少量胶原沉积。模型组炎症细胞较多, 可见大量中性粒细胞, 新生毛

表 1 各组大鼠创面愈合率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Comparison on wound healing rates of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	创面愈合率/%			
	5 d	8 d	11 d	14 d
对照	50.69 ± 3.69	78.80 ± 5.69	92.43 ± 4.44	98.39 ± 2.11
模型	24.32 ± 17.07*	39.57 ± 4.05*	54.64 ± 6.38*	62.81 ± 8.94*
托法	29.60 ± 7.29*	49.87 ± 8.99*#	78.09 ± 9.81*#	76.34 ± 7.55*#
透法	39.15 ± 5.50*#△	58.44 ± 6.36*#△	66.65 ± 11.09*#△	78.57 ± 10.22*#
全方	26.30 ± 7.94*▲	67.49 ± 6.65*#△▲	79.42 ± 16.41*#▲	87.77 ± 12.13*#△▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与托法组比较: △ $P < 0.05$; 与透法组比较: ▲ $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs tuo group; ▲ $P < 0.05$ vs tou group, same as below

细血管少,且管腔小。全方组可见少量中性粒细胞及巨噬细胞,毛细血管数量较多,毛细血管内径较大。透法组炎症细胞浸润较少,可见少量中性粒细胞,毛细血管数目较模型组略有增加,血管内径较小。托法组炎症细胞浸润较模型组略少,毛细血管数目较多,管腔较大。结果见图 1。

3.4 创面 Tie-2、Ang-1 的蛋白表达水平

创伤后 5、8、11、14 d,糖尿病各组大鼠创面

Ang-1、Tie-2 蛋白表达水平均低于对照组($P<0.05$),全方组大鼠创面 Ang-1、Tie-2 蛋白表达水平明显高于模型组、托法组和透法组($P<0.05$);创伤后 5 d,托法组和透法组与模型组比较差异无统计学意义;创伤后 8 d,托法组和透法组 Ang-1、Tie-2 表达水平均高于模型组($P<0.05$),两组比较无统计学差异。创伤后 11、14 d,托法组 Ang-1、Tie-2 蛋白表达水平高于透法组($P<0.05$)。结果见图 2 和表 2、3。

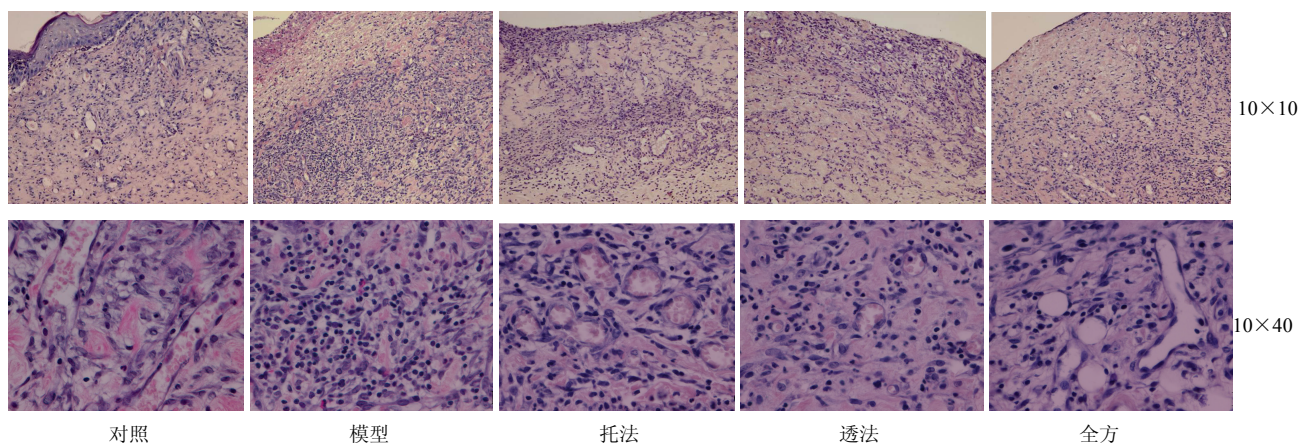


图 1 创伤后 8 d 各组大鼠创面肉芽组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining of wound granulation of rats in each group after mediation for 8 d

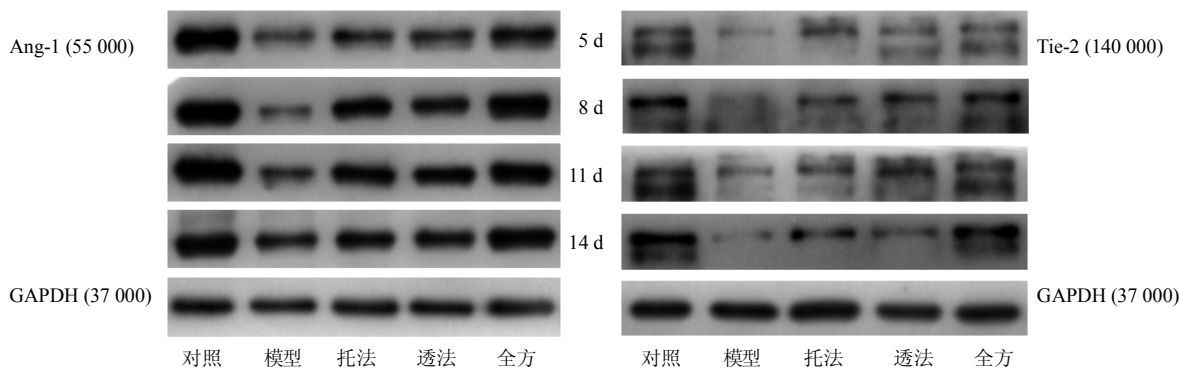


图 2 各组大鼠创面组织中 Ang-1 和 Tie-2 蛋白表达 (Western blotting)

Fig. 2 Protein expression of Ang-1 and Tie-2 in wound of rats in each group (Western blotting)

表 2 各组大鼠创面组织中 Ang-1 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 2 Comparison on protein expression of Ang-1 in wound granulation tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	Ang-1/GAPDH			
	5 d	8 d	11 d	14 d
对照	3.047 2 $\pm$ 0.037 4	3.119 7 $\pm$ 0.050 0	3.280 6 $\pm$ 0.037 7	3.309 1 $\pm$ 0.056 1
模型	0.919 2 $\pm$ 0.035 2*	0.950 5 $\pm$ 0.026 8*	0.392 5 $\pm$ 0.030 2*	0.433 6 $\pm$ 0.049 6*
托法	1.132 8 $\pm$ 0.027 0*	1.113 2 $\pm$ 0.031 3*#	1.831 7 $\pm$ 0.023 4*#	2.189 0 $\pm$ 0.028 6*#
透法	1.075 5 $\pm$ 0.056 2*	1.153 2 $\pm$ 0.033 7*#	1.530 7 $\pm$ 0.033 8*#△	1.890 5 $\pm$ 0.078 2*#△
全方	2.233 5 $\pm$ 0.042 1*#△▲	2.397 2 $\pm$ 0.056 6*#△▲	2.470 4 $\pm$ 0.024 4*#△▲	2.827 8 $\pm$ 0.035 7*#△▲

表 3 各组大鼠创面组织 Tie-2 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 3 Comparison on protein expression of Tie-2 in wound granulation tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	Tie-2/GAPDH			
	5 d	8 d	11 d	14 d
对照	1.114 1 $\pm$ 0.052 6	1.217 7 $\pm$ 0.088 2	1.251 2 $\pm$ 0.022 9	1.322 9 $\pm$ 0.050 1
模型	0.412 8 $\pm$ 0.066 1*	0.432 8 $\pm$ 0.066 1*	0.359 2 $\pm$ 0.012 8*	0.362 3 $\pm$ 0.040 4*
托法	0.463 1 $\pm$ 0.076 2*	0.563 1 $\pm$ 0.076 2*#	0.626 3 $\pm$ 0.015 1*#	0.687 5 $\pm$ 0.068 5*#
透法	0.435 5 $\pm$ 0.008 5*	0.534 4 $\pm$ 0.052 4*#	0.496 5 $\pm$ 0.041 4*#△	0.507 9 $\pm$ 0.028 3*#△
全方	0.698 9 $\pm$ 0.025 9*#△▲	0.785 2 $\pm$ 0.067 0*#△▲	0.770 5 $\pm$ 0.076 1*#△▲	0.865 6 $\pm$ 0.069 5*#△▲

3.5 创面 Ang-2 的蛋白表达水平

创伤后 5、8、11、14 d, 糖尿病各组大鼠创面 Ang-2 蛋白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 各给药组均低于模型组 ($P < 0.05$); 创伤后 5 d, 透法组 Ang-2 蛋白表达水平低于全方组和托法组 ($P < 0.05$), 且全方组低于托法组 ($P < 0.05$); 创伤后 8、11、14 d, 全方组 Ang-2 蛋白表达水平低于托法组和透法组 ($P < 0.05$)。结果见图 3 和表 4。

3.6 免疫组化法染色观察创面 Tie-2、Ang-1、Ang-2 蛋白的定位表达

镜下可见 Tie-2 阳性物质呈棕黄色, 分布于血管内皮细胞胞膜, 对照组血管丰富, 管腔大, Tie-2

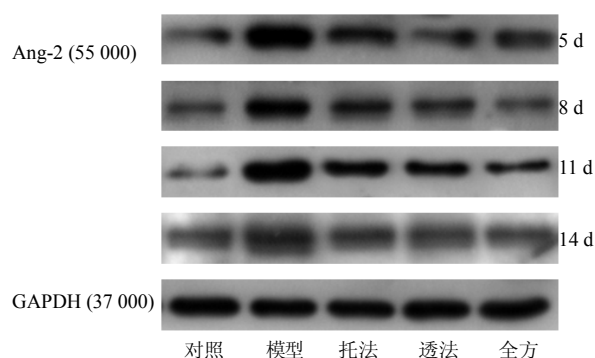


图 3 各组大鼠创面组织中 Ang-2 的蛋白表达 (Western blotting)

Fig. 3 Protein expression of Ang-2 in wound of rats in each group (Western blotting)

表 4 各组大鼠创面肉芽组织 Ang-2 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 4 Comparison on protein expression of Ang-2 in wound granulation tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	Ang-2/GAPDH			
	5 d	8 d	11 d	14 d
对照	0.281 0 $\pm$ 0.038 2	0.276 0 $\pm$ 0.098 5	0.254 0 $\pm$ 0.012 3	0.253 0 $\pm$ 0.014 0
模型	2.860 9 $\pm$ 0.764 3*	2.037 9 $\pm$ 0.464 6*	1.581 9 $\pm$ 0.435 9*	1.346 7 $\pm$ 0.243 0*
托法	1.854 6 $\pm$ 0.320 7*#	1.434 8 $\pm$ 0.039 7*#	0.796 5 $\pm$ 0.198 5*#	0.698 3 $\pm$ 0.126 9*#
透法	0.948 2 $\pm$ 0.185 2*#△	0.971 0 $\pm$ 0.084 0*#△	0.819 3 $\pm$ 0.195 9*#	0.768 8 $\pm$ 0.220 2*#
全方	1.303 3 $\pm$ 0.306 0*#△▲	0.701 0 $\pm$ 0.083 9*#△▲	0.577 3 $\pm$ 0.045 6*#△▲	0.529 3 $\pm$ 0.067 2*#△▲

强阳性表达; 模型组血管少, 管腔小, Tie-2 呈弱阳性表达; 全方组血管较多, 管腔较大, Tie-2 阳性表达较多; 托法组和透法组血管较少, 管腔较小, Tie-2 阳性表达较模型组多。Ang-1 阳性物质呈棕黄色分布于血管周围, 对照组表达较多, 模型组表达较少, 全方组多于模型组、托法组和透法组。镜下可见 Ang-2 阳性物质呈棕黄色颗粒状, 分布于血管周围基质中, 对照组 Ang-2 呈弱阳性表达; 模型组 Ang-2 呈强阳性表达; 全方组 Ang-2 表达较少; 托法组和透法组 Ang-2 表达均低于模型组。结果见图 4。

4 讨论

皮肤创伤愈合是一个有序的、复杂的过程, 包

括炎症反应、肉芽组织形成、组织重塑和再上皮化等^[7]。高血糖条件下, 创伤愈合受损, 主要表现为早期炎症反应低下、炎症阶段延长、血管生成受损、肉芽组织形成减少、基质蛋白水解酶水平升高、胶原合成减少等^[8]。肉芽组织填充是创面愈合的关键步骤, 肉芽组织形成质量的好坏可直接影响创伤愈合的程度及其预后, 其中血管再生及血管网的形成起着极其重要的作用。丰富的新生血管改善创面微循环, 为组织修复提供所必须的氧及丰富的营养物质, 从而有利于创面愈合。此外, 炎症细胞需要与内皮细胞基底膜相互作用从而进入创伤部位, 因此, 血管生成是创面修复的关键环节^[9]。血管生成是一个动态过程, 受多种因子调控, 血管生成素/受体

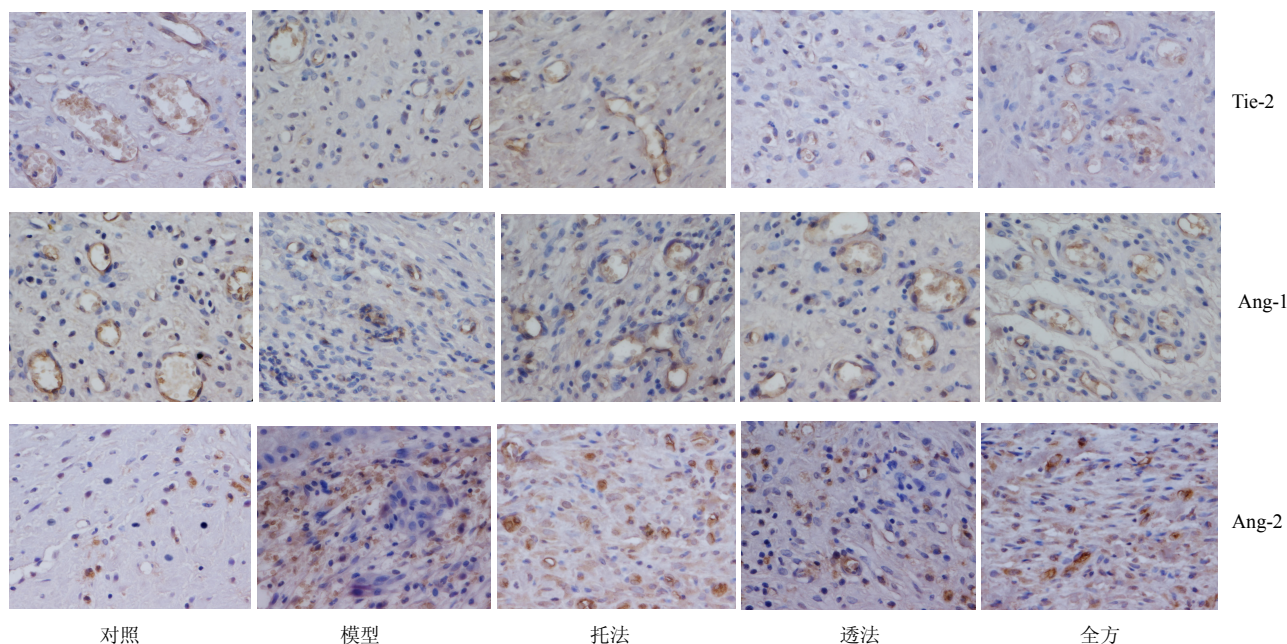


图 4 创伤后 8 d 各组大鼠创面肉芽组织 Tie-2、Ang-1、Ang-2 阳性表达情况 (免疫组化)

Fig. 4 Positive expression of Tie-2, Ang-1, and Ang-2 protein in wound granulation of rats in each group after mediation for 8 d (immunohistochemistry)

(Ang/Tie) 系统是近年来发现的有效创面血管生成因子, 在控制新生血管萌芽、血管重塑及调节内皮细胞状态中发挥重要作用。Ang-1 和 Ang-2 均是血管内皮细胞酪氨酸激酶受体 Tie-2 的内源性配体, 均可以与 Tie-2 结合。Ang-1 与 Tie-2 结合引起受体磷酸化, Ang-2 与 Tie-2 结合, 占据 Ang-1 结合位点, 不引起受体磷酸化, 因而被认为是 Ang-1 的天然拮抗剂。研究表明, Ang-1 主要由周细胞、血管平滑肌细胞、纤维母细胞等分泌^[10], 在血管生成的后期如血管重塑、新生血管系统的成熟以及稳定毛细血管方面起重要作用^[11]。此外, Ang-1 还能抑制内皮细胞凋亡, 并能募集周细胞等血管支持细胞促进内皮细胞存活, 维持血管的完整性^[10]。Ang-2 作为 Ang-1 的拮抗剂, 主要由内皮细胞分泌, 并储存在 Weibel palade 小体中, 在各种刺激的作用下迅速释放, 使内皮细胞处于不稳定的激活状态, 促进血管结构松解, 消除血管基底膜和周围细胞对内皮的支撑作用, 失去正常微环境的内皮细胞非常容易浸润、迁移, 形成新生血管^[12]。因此, Ang-2 主要在血管生成的早期起作用。同时, Ang-2 还能增加血管的渗透性, 引起蛋白酶、细胞因子、炎症因子等渗透到局部组织, 参与炎症反应^[12]。因此, 血管生成素/受体系统在维持血管的完整性和内皮细胞稳态中起重要作用, Ang-1 激活 Tie-2 受体维持内皮

细胞的静息状态, Ang-2 打破内皮细胞的稳态, 增加内皮细胞对外源性刺激的反应性, 促进炎症因子和血管生成相关因子的活动, 因此, 血管生成素/受体系统是连接血管生成和炎症反应的桥梁^[13]。

研究表明, 高糖水平可以刺激 Ang-2 的表达^[14], 且高糖条件下 Ang-1、Tie-2 表达水平降低^[15]。本研究结果与既往研究一致, 与同时时间对照组相比, 模型组创面肉芽组织中 Ang-2 的表达水平明显升高, Ang-1、Tie-2 表达水平明显降低。且创伤愈合后期对照组 Ang-2 表达水平明显降低, 模型组 Ang-2 表达水平无明显下降, 提示糖尿病皮肤溃疡愈合困难可能与创面局部 Ang-2 表达水平持续升高及 Ang-1、Tie-2 表达水平下降有关。升高的 Ang-2 水平一方面导致炎症过程延长, 另一方面拮抗 Ang-1 的作用, 导致新生毛细血管成熟障碍、渗透性增加、创面愈合缓慢。与同时时间点模型组相比, 全方组 Ang-2 表达水平明显下降, 且 Ang-1、Tie-2 表达水平上调, 提示托里消毒散精简方可能通过上调创面肉芽组织中 Ang-1、Tie-2 的表达水平, 下调 Ang-2 的表达水平促进创面愈合。本研究中托法组 Ang-1、Tie-2 表达水平较模型组均有不同程度的上调, 且现代研究表明当归中的有效成分阿魏酸能提高膜稳定性、保护内皮细胞^[16], 黄芪中的有效成分黄芪多糖能有效地降低高血糖, 改善胰岛

素抵抗^[17-18], 黄芪甲苷具有抗氧化功能, 可以改善高血糖条件下内皮细胞功能障碍^[19], 提示托法方药可能通过上调 Ang-1、Tie-2 的表达水平, 促进血管重塑及新生血管成熟, 防止血管渗漏, 抑制内皮细胞凋亡, 促进肉芽组织生长, 进而促进伤口愈合。本实验中, 透法方药在创伤愈合早期能显著下调 Ang-2 的表达水平, 方中白芷有效成分欧前胡素具有舒张血管活性的作用, 临床上与其他中药配伍常用于各类炎症、溃疡病及皮肤问题^[20-21], 皂角刺有抗菌、抗炎作用, 多用于消炎、镇痛^[22], 临床上亦有助于下肢溃疡治疗, 疗效颇佳, 提示透法可能通过降低 Ang-2 表达水平, 一方面减轻 Ang-2 引起的炎症反应, 一方面减轻 Ang-2 对 Ang-1 的拮抗作用, 从而促进创面愈合。

以上实验表明, 托里消毒散精简方及其拆方可以改善糖尿病皮肤溃疡大鼠的创面愈合情况, 抑制炎症反应, 促进肉芽组织生长和创面愈合。托法和透法在创伤愈合的不同阶段发挥了不同作用, 全方应用优于拆方。但是托里消毒散精简方促进糖尿病皮肤溃疡愈合的具体作用机制及物质基础, 还需要进一步实验研究。

参考文献

- [1] Al-Kaabi J M, Al Maskari F, Cragg P, *et al.* Illiteracy and diabetic foot complications [J]. *Prim Care Diabetes*, 2015, 9(6): 465-472.
- [2] Bowling F L, Rashid S T, Boulton A J. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(10): 606-616.
- [3] Noor S, Zubair M, Ahmad J. Diabetic foot ulcer-A review on pathophysiology, classification and microbial etiology [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(3): 192-199.
- [4] Helary C, Zarka M, Giraud-Guille M M. Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(3): 225-237.
- [5] 冯鑫, 周永梅, 房德敏. 中药对伤口愈合干预作用的机理研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(8): 1498-1501.
- [6] 郝福明. 托里消毒散研究评述 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(3): 598-599.
- [7] Zielins E R, Atashroo D A, Maan Z N, *et al.* Wound healing: an update [J]. *Regen Med*, 2014, 9(6): 817-830.
- [8] Lee Y H, Chang J J, Chien C T, *et al.* Antioxidant sol-gel improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012. doi: 10.1155/2012/504693.
- [9] Bodnar R J. Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing [J]. *Adv Wound Care*, 2015, 4(11): 641-650.
- [10] Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 18-26.
- [11] Koh G Y. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(1): 31-39.
- [12] Reiss Y. Angiopoietins [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 180: 3-13.
- [13] Kreuger J, Phillipson M. Targeting vascular and leukocyte communication in angiogenesis, inflammation and fibrosis [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(2): 125-142.
- [14] Yao D, Taguchi T, Matsumura T, *et al.* High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(42): 31038-31045.
- [15] Kämpfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair [J]. *Lab Invest*, 2001, 81(3): 361-373.
- [16] 赵保胜, 桂海水, 朱寅荻, 等. 阿魏化学成分、药理作用及毒性研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(17): 279-281.
- [17] Mao X Q, Yu F, Wang N, *et al.* Hypoglycemic effect of polysaccharide enriched extract of Astragalus membranaceus in diet induced insulin resistant C57BL/6J mice and its potential mechanism [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(5): 416-425.
- [18] 韩镕徽, 王洪新, 唐富天, 等. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(24): 3722-3726.
- [19] Zhang N, Wang X H, Mao S L, *et al.* Astragaloside IV improves metabolic syndrome and endothelium dysfunction in fructose-fed rats [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 3896-3907.
- [20] 朱艺欣, 李宝莉, 马宏胜, 等. 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(31): 159-162.
- [21] Nie H, Meng L Z, Zhou J Y, *et al.* Imperatorin is responsible for the vasodilatation activity of Angelica Dahurica var. Formosana regulated by nitric oxide in an endothelium-dependent manner [J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(6): 442-447.
- [22] 覃华亮, 韦怡. 皂角刺研究进展及临床应用 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(17): 54-56.