

· 方药研究 ·

祛瘀生肌法对糖尿病大鼠创面新生肉芽组织凋亡相关基因的动态影响

李 斌 李福伦 王振宜 范 斌 徐文彬 金 伟 王一飞 肖秀丽

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海市虹口区甘沙路110号, 200437)

[摘要] **目的** 探讨祛瘀生肌法对糖尿病溃疡大鼠创面愈合中凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响。**方法** 48只 SD 大鼠采用四氧嘧啶造成糖尿病模型后, 剪去背部局部全层皮肤造成糖尿病溃疡。将大鼠随机分成生肌化瘀方1组、生肌化瘀方2组、生肌化瘀方3组和生理盐水对照组。分别于创面修复第3天、11天取材, 采用实时 PCR 法检测新生肉芽组织中凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 mRNA 变化。**结果** 创面修复第3天, 生肌化瘀方1组和生肌化瘀方2组 Bcl-2拷贝数及 Bax/Bcl-2比值均高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$); 创面修复后第11天, 生肌化瘀方1组 Bcl-2拷贝数和 Bax/Bcl-2比值仍高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 而生肌化瘀方2组 Bax/Bcl-2比值与生理盐水对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 祛瘀生肌中药调节糖尿病溃疡大鼠模型新生肉芽组织中凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达是促进创面愈合的原因之一。早期重用化瘀药物能抑制细胞凋亡, 有利于创面愈合, 而晚期重用生肌药物能促进细胞凋亡, 有利于减少疤痕形成。

[关键词] 祛瘀生肌; 糖尿病; 创面愈合; Bax; Bcl-2

Effect of Stasis-removing and Muscle-regeneration Therapy on Apoptosis-related Gene Expression in Granulation Tissue of Diabetic Rat Wound Healing

LI Bin, LI Fu-lun, WANG Zhen-yi, et al.

(Yueyang Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Stasis-removing and muscle-regeneration therapy on the expression of Bax and Bcl-2 mRNA in granulation tissue of diabetic rats wound healing. **Methods** Totally 48 male SD diabetic rats with full-thickness skin lesion were randomized into 4 groups: Shengji Huayu (Muscle-regeneration and stasis-removing) Recipe-treated group 1, 2, 3 and normal saline control group. The tissues for test were collected on the 3rd and 11th day of the wound healing and the apoptosis-related gene Bax and Bcl-2 mRNA in granulation tissue were tested with real-time PCR method. **Results** On the 3rd day of wound healing, Bcl-2 mRNA copies and Bax/Bcl-2 mRNA of the rats in Shengji Huayu Recipe-treated group 1 and 2 were higher than those in the control group ($P < 0.05$). On the 11th day of wound healing, Bcl-2 mRNA copies of the rats in Shengji Huayu Recipe-treated group 1 was still higher than that in the control group ($P < 0.05$), but Bax/Bcl-2 mRNA of Shengji Huayu Recipe-treated group 2 was not significantly different from that of control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Stasis-removing and muscle-regeneration herbs may promote wound healing in diabetic rats through regulating Bax and Bcl-2 mRNA expression in granulation tissue. At the early stage, using more stasis-removing herbs can inhibit the apoptosis, benefiting the wound healing, while using more muscle-regeneration herbs can promote the apoptosis at the late stage, benefiting the reduction of scar formation.

Key Words Stasis-removing and muscle-regeneration therapy; Diabetes; Wound healing; Bax; Bcl-2

促进创面修复和减少瘢痕形成是外科领域中相互联系又相互矛盾的两个方面。既往临床实验表明, 中药能有效促进创面愈合^[1,2], 并且能够减少瘢痕形成。本研究通过祛瘀生肌中药对 SD 大鼠糖尿病模型溃疡创面的干预作用, 观察祛瘀生肌中药对 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的影响, 以期阐明祛瘀生肌中药促进糖尿病创面愈合的部分机理和用药规律, 报道如下。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠48只, 质量(250±20)g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(医动字第04-20-3号)。由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院清洁级动物实验室饲养。

1.2 药物

生肌方: 黄芪15g, 太子参15g, 白术15g, 生地黄15g。化瘀方: 丹参15g, 水蛭9g, 桃仁9g, 当归9g。生肌化瘀1方: 生肌方+化瘀方=1方; 生肌化瘀2方: 生肌方+化瘀方=2方。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(A39900495); 上海市重点学科建设项目资助项目(T0304); 上海市卫生局基金项目(044009)

通讯作者: 李斌, drlibin888@yahoo.com, 13601979339

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

瘀方=2纛;生肌化瘀3方:生肌方纛化瘀方=1纛;药液由上海中医药大学岳阳中西医结合医院制剂室制备成合剂(批号:040720)。使其含生药分别为生肌方0.6g/ml,化瘀方0.6g/ml。按比例配制生肌化瘀1方、生肌化瘀2方、生肌化瘀3方。

1.3 主要药物、试剂及仪器

1.3.1 real-time PCR 试剂和仪器 TRIZOL 试剂:上海生工生物工程技术有限公司产品。RT 试剂盒:DR019A,上海宝生物工程技术有限公司产品。MARK D501A:上海宝生物工程技术有限公司产品。Tvector:PROMEGA 公司产品。DEPC 试剂:上海生工生物工程技术有限公司产品。RNA 反转录试剂盒:TAKARA 公司产品。实时荧光定量 PCR 试剂盒:中山大学达安基因股份有限公司产品。全自动实时荧光定量 PCR 仪:美国 PE 公司产品。上述试剂和仪器均由中山大学达安基因股份有限公司代理提供。

1.3.2 大鼠创面模型制备用药 新洁尔灭酊、0.9%生理盐水由上海中医药大学附属岳阳医院提供。0.1%盐酸氯胺酮为上海中西药业股份公司产品。四氧嘧啶试剂编号:2244-11-3,瑞士 FULKA 公司产品,由上海中医药大学药理毒性实验室提供。罗氏 ACCU-CHEK ACTIVE 血糖仪和血糖测试试纸,编号:2005-10,22896931,瑞士 Roche 公司产品。

2 方法

2.1 造模方法

糖尿病大鼠造模参照付小兵等^[3]方法改进。动物禁食24小时后(饮水不限),在乙醚麻醉下尾静脉一次注射1.5%四氧嘧啶(50mg/kg),造模后4小时给予5%葡萄糖水溶液饮用,次日经尾部取血测血糖,血糖值大于11mmol/L,表明造模成功。模型制成后,每3天测血糖1次,直到动物处死。

动物糖尿病难愈创面造模:糖尿病大鼠造模完成后3天,用1%盐酸氯胺酮(0.3ml/100g)腹腔注射麻醉大鼠。局部备皮,常规消毒后,于大鼠背部取直径3cm左右圆形切口,剪开皮肤全层,至皮下筋膜,加盖无菌敷料,每日换药1次。

2.2 分组及给药方法

大鼠随机分为创面造模后喂药3天、11天两个观测时段。每个时段分为生肌化瘀方1组、生肌化瘀方2组、生肌化瘀方3组及生理盐水对照组,每组各6只。按3天、11天时段4组动物给药剂量如下:根据成人日服用药量折算成大鼠灌胃剂量为6g·kg⁻¹·d⁻¹,从创面造模后第二天起,每天灌胃1次,连续灌胃3天和11天;生理盐水对照组灌服等量生理盐水,每天1次。

2.3 检测方法

2.3.1 实验步骤 大鼠在喂养后的第3天和第11天分别予麻醉后,用灭菌和灭酶处理过的手术器械采集背部新生肉芽组织,组织块放入液氮罐中保存,并在标本采集完成后放入-80℃冰箱保存。

2.3.2 引物、探针的设计与合成 引物由上海博亚生物技术公司合成,探针由中山大学达安基因诊断中心合成。根据 Gen Bank 提供的 CRD-BP mRNA 序列(LOCUS ID:AF198254),利用 Primer Premier 5.0设计内、外引物及探针,引物均跨内含子序列,保证扩增的特异性。

2.3.3 组织 RNA 提取 组织块(约100mg)置研钵,加液氮的同时用力研磨,组织呈粉末状后补加1.5ml TRIZOL,置 Eppendorf 管,15~30℃孵育5分钟,加入氯仿(0.2ml 氯仿/1ml TRIZOL),用力摇动15秒,15~30℃孵育2~3分钟,4℃ 12000转/分钟离心15分钟,取上清液至新的 Eppendorf 管,加异丙醇(0.5ml 异丙醇/ml TRIZOL),15~30℃孵育样品10分钟,4℃ 12000转/分钟离心10分钟,弃上清液,75%乙醇洗涤沉淀(至少1ml 75%乙醇/ml TRIZOL),4℃ 7500转/分钟离心5分钟,弃乙醇,空气或真空干燥5~10分钟(不要完全干燥),加 DEPC 处理水溶解 RNA,-80℃保存备用。

2.3.4 RT-PCR 实验步骤 取出模板分别加入2μl 已经标记好的消毒离心管中。取出 RT-PCR 试剂盒解冻。依次加入稀释好的逆转录酶0.5μl、dNTPs 0.2μl、上、下游引物各0.2μl、DEPC 水4.9μl、RT-buffer 2μl、总体积10μl。依次插入预先设置(37℃ 1小时、95℃ 3分钟)加热模块。逆转录 cDNA 完成,放入-80℃冰箱备用。

2.3.5 FQ-PCR 检测实验步骤 取已消毒的96孔联体反应板,分别加入 cDNA 模板。依次加入 Taq 酶1μl, dNTPs 0.5μl,上、下游引物各0.5μl,荧光标记探针0.5μl,5×buffer 10μl,ddH₂O 32μl,cDNA 5μl。放入全自动实时荧光定量 PCR 仪板槽中。扩增条件:(1) 93℃ 2分钟,(2) 93℃ 30秒、55℃ 1分钟共40个循环,反应结束数据保存。

2.4 统计学方法

数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS11.0统计软件包对相关数据进行双侧 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 创面修复第3天各组大鼠新生肉芽组织中 Bcl-2、Bax mRNA 的比较

表1示,生肌化瘀方1组和生肌化瘀方2组 Bcl-2 拷

贝数高于生理盐水对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);生肌化痰方2组 Bax 拷贝数高于生理盐水对照组($P < 0.05$)。生肌化痰方1组 Bcl-2/Bax 比值大于1,高于生理盐水对照组($P < 0.05$)。生肌化痰方2组 Bcl-2/Bax 比值大于1,但与生理盐水对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 第3天各组大鼠新生肉芽组织 Bcl-2、Bax mRNA 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2(拷贝 $\times 10^5$ /mg)	Bax(拷贝 $\times 10^5$ /mg)	Bcl-2/Bax
生肌化痰方1组	6	4.46 $\pm$ 0.26 *	1.67 $\pm$ 0.36	2.80 $\pm$ 0.76 *
生肌化痰方2组	6	6.70 $\pm$ 2.50 *	5.80 $\pm$ 3.72 *	1.75 $\pm$ 1.25
生肌化痰方3组	6	1.49 $\pm$ 0.53	3.98 $\pm$ 1.15	0.37 $\pm$ 0.03
生理盐水对照组	6	1.29 $\pm$ 0.15	2.91 $\pm$ 0.64	0.46 $\pm$ 0.11

与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$

3.2 创面修复第11天各组大鼠新生肉芽组织中 Bcl-2、Bax mRNA 的比较

生肌化痰方1组和生肌化痰方2组 Bcl-2拷贝数高于生理盐水对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);生肌化痰方1组和生肌化痰方3组 Bax 拷贝数低于生理盐水对照组($P < 0.05$);生肌化痰方1组 Bcl-2/Bax 大于1,与生理盐水对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 第11天各组大鼠新生肉芽组织 Bcl-2、Bax mRNA 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2(拷贝 $\times 10^5$ /mg)	Bax(拷贝 $\times 10^5$ /mg)	Bcl-2/Bax
生肌化痰方1组	6	5.62 $\pm$ 0.35 *	3.87 $\pm$ 0.53 *	1.47 $\pm$ 0.20 *
生肌化痰方2组	6	5.29 $\pm$ 3.96 *	7.83 $\pm$ 6.10	0.75 $\pm$ 0.33
生肌化痰方3组	6	2.57 $\pm$ 1.65	3.17 $\pm$ 2.46 *	0.87 $\pm$ 0.11
生理盐水对照组	6	3.72 $\pm$ 1.17	7.10 $\pm$ 3.43	0.57 $\pm$ 0.13

与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$

4 讨论

糖尿病溃疡是糖尿病患者临床常见的并发症之一,属于难愈性溃疡。近来有研究表明,糖尿病患者难愈性溃疡创面与细胞凋亡失衡有关^[4]。中医学在难愈性溃疡创面治疗中积累了丰富的临床经验,长期以来以“祛腐生肌”理论指导慢性皮肤溃疡的治疗,有着扎实的临床基础。在传统“祛腐生肌”基础上,本研究课题组提出“祛瘀生肌”作为其补充和发展,并在其长期的临床实践中得到了验证,取得了较好的临床疗效。

Bcl-2与 Bax 是影响细胞凋亡的重要调控基因。研究表明,Bcl-2基因是一个细胞凋亡的抑制基因,能够有效地抑制多种因素诱导的细胞凋亡,但 Bcl-2抑制细胞凋亡必须通过 Bax 形成异聚体实现,因此,Bax 基因虽

为 Bcl-2基因家族的成员,但功能与 Bcl-2相反。两者联合表达调节细胞凋亡^[5],Bax 与 Bcl-2的比值决定细胞受刺激后是凋亡还是存活,Bax 占优时细胞凋亡,Bcl-2占优时细胞存活^[6]。

国内有研究表明,难愈性溃疡创面不仅细胞凋亡发生多、形态典型,而且主要是与修复密切相关的表皮基层细胞和成纤维细胞发生凋亡,从而导致创口愈合迟缓,形成难愈性溃疡^[5]。我们的实验结果显示,创伤后3天,生肌化痰方1组和生肌化痰方2组 Bcl-2拷贝数均高于生理盐水对照组($P < 0.05$);Bcl-2/Bax 的比率均值分别为2.80和1.75,远高于生理盐水对照组0.46($P < 0.05$)。说明创伤早期生理盐水对照组的肉芽组织中即有较多的凋亡调控基因表达,且以抑制基因 Bcl-2 mRNA 为主,推测重用化痰药物的中药处方有减缓细胞凋亡的作用,与生肌药物作用相似,从而为祛瘀生肌理论中“化瘀利于生肌”提供科学依据。

而创伤后11天,不同方剂对 Bcl-2、Bax 的 mRNA 影响结果显示,生肌化痰方1组和生肌化痰方2组 Bcl-2拷贝数仍高于生理盐水对照组($P < 0.05$);生肌化痰方2组 Bcl-2/Bax 高于生理盐水对照组,新生肉芽组织中的凋亡基因表达仍以抑制为主。而生肌化痰方2组 Bcl-2/Bax 比值与生理盐水对照组比较,差异无统计学意义,说明创面后期重用生肌药物以促进凋亡基因表达为主,推测重用生肌药物具有“生肌不致成癍”的作用。

参考文献

[1]肖秀丽,王振宜,范斌,等.祛瘀生肌(内外合治)法治疗慢性下肢皮肤溃疡50例临床观察.中国中西医结合皮肤性病学杂志,2005,4(3):176~178.
[2]王春丽,唐汉钧.皮肤溃疡的中药外治近况.中医外治杂志,2004,13(6):40~41.
[3]付小兵,孙同柱,盛志勇.几种用于创伤修复研究的动物模型.中华实验外科杂志,1999,16(5):479~480.
[4]Galkowska H, Olszewski WL, Wojewodzka U, et al. Expression of apoptosis and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers. Surgery, 2003, 134(2):213~220.
[5]陈伟,付小兵,孙同柱,等.皮肤溃疡伤口中 Bax 和 Bcl-2蛋白含量的变化及其与溃疡发生的关系.现代康复,2001,5(12):54~55.
[6]李金清,付小兵,都义日,等.猪全层皮肤缺损创面 Bax 和 Bax mRNA 的表达.中华实验外科杂志,2005,22(8):1007~1008.

(收稿日期:2006-12-19;修回日期:2007-03-23)

[编辑:李春梅]