

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.06.016

回阳生肌散对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面血管生成相关因子的影响

赵光明¹, 董建勋², 李媛¹, 徐旭英², 张旭辉¹, 王乐平¹, 路广林^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072808); 北京市教育委员会科技计划项目 (KM201110025023); 北京市高层次卫生技术人才学科带头人项目 (2011-2-44)

摘要 目的 探讨回阳生肌散促进糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的可能作用机制。方法 56 只 SD 大鼠随机分为对照组 8 只、模型组 12 只、全方组 12 只、温阳组 12 只和活血组 12 只。除对照组外其余各组采用“腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 激素干预-皮肤缺损-塑料环埋置”方法制备糖尿病皮肤溃疡动物模型。对照组和模型组给予黄凡士林纱条, 全方组给予回阳生肌散全方药纱条, 将回阳生肌散方拆方为温阳益气方和活血生肌方, 温阳组给予温阳益气方药纱条, 活血组给予活血生肌方药纱条。各组每天给药 1 次, 15 天后检测创面新生肉芽组织中血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体-2 (VEGFR-2)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达水平。结果 模型组肉芽组织中 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达水平均明显低于对照组 ($P < 0.01$), 全方组 VEGF 表达水平明显高于模型组和活血组 ($P < 0.01$), 全方组 VEGFR-2、eNOS 表达水平明显高于模型组、温阳组和活血组 ($P < 0.01$)。结论 回阳生肌散可能通过提高创面肉芽组织中 VEGF、VEGFR-2、eNOS 的表达水平, 促进创面愈合。

关键词 回阳生肌散; 糖尿病; 皮肤溃疡; 血管内皮生长因子; 血管内皮细胞生长因子受体 2; 内皮型一氧化氮合酶

皮肤溃疡是常见的糖尿病并发症之一, 往往反复发作, 迁延不愈, 形成顽固难愈性溃疡, 严重危害人类健康^[1]。回阳生肌散是北京中医医院全国名老中医赵炳南、王玉章教授的经验方, 临床治疗慢性皮肤溃疡疗效显著^[2]。本研究对回阳生肌散促进糖尿病皮肤溃疡创面愈合的血管生成机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠 56 只, 体重 (200 ± 20) g, SPF 级, 雄性, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

回阳生肌散、回阳生肌散拆方 1、回阳生肌散拆方 2 和凡士林, 由首都医科大学附属北京中医医院中心制剂室提供。回阳生肌散由肉桂、炮姜、人

参、黄芪、川芎、当归、白芥子、白蔹等药物组成, 配伍比例为 1: 1: 1: 3: 1: 1: 3: 1.5; 回阳生肌散拆方 1 由肉桂、炮姜、人参、黄芪、白芥子等药物组成, 配伍比例为 1: 1: 1: 3: 3; 回阳生肌散拆方 2 由川芎、当归、白蔹等药物组成, 配伍比例为 1: 1: 1.5。将回阳生肌散、回阳生肌散拆方 1 和回阳生肌散拆方 2 与凡士林调匀, 制成药膏, 均匀涂抹于纱条上制成油纱条 (简称药纱条), 并制作凡士林纱条, 纱条上含药膏 (或凡士林) 0.018 g/cm^2 。

1.3 试剂

链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 批号: S0130); 氢化可的松注射液 (天津金耀氨基酸公司, 批号: 1303011); EDTA 修复液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZLI-9067); 羊抗大鼠血管内皮生长因子 (VEGF) 一抗 (美国 RD 公司, 批号: AF564); 兔抗大鼠血管内皮细胞生长因子受体-2 (VEGFR-2) 一抗 (美国 SAB 公司,

* 通讯作者: lugl66@sina.com, (010) 64297405

批号: 21078-2); 兔抗大鼠内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 一抗 (北京赛尔合生公司, 批号: HZ911201); 山羊超敏二步法免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: PV-9003); 兔超敏二步法免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: PV-9001); DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZLI-9018)。

1.4 仪器

卓越纤巧型血糖仪及试纸, 罗氏诊断产品有限公司。1/10000 电子天平, 上海方瑞仪器有限公司。RM2235 石蜡切片机, 德国 Leica 公司。BS60 电热三用水箱, 北京市医疗设备厂。DH4000AB 型电热恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司。LRH-150 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。光学显微镜, 日本 Olympus 公司。Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件, 美国 Media Cybernetics 公司。

2 方法

2.1 模型制备及分组

大鼠适应性喂养 3 天后, 按体重分层, 分配虚拟笼, 虚拟笼内按随机数 (从 Excel 表获取) 排序进行分组, 分为对照组 8 只, 糖尿病组 48 只。参照文献 [6] 方法将糖尿病组大鼠一次性腹腔注射 STZ 溶液 (55 mg/kg), 72 h 后随机血糖浓度 > 16.7 mmol/L 时, 即为糖尿病大鼠。糖尿病组大鼠 5 只未成模, 予以剔除, 成模率为 79.17%。实验过程中, 5 只死亡, 推测原因可能为不能耐受造模的损伤、麻醉药过量等。将 38 只糖尿病大鼠按上述随机方法分为模型组 10 只、全方组 10 只、温阳组 8 只和活血组 10 只。各组大鼠以 20 mg/kg 剂量肌肉注射氢化可的松注射液, 每天 1 次, 共 3 天。将大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛 (1 ml/100 g), 麻醉后在造模区 (腰椎正中偏上) 脱毛, 剪皮深达筋膜; 将消毒塑胶环 (内环直径 25 mm, 外环直径 28 mm) 埋入切口边缘, 并与皮肤缝合, 六层医用纱布、橡皮膏包扎固定。

2.2 给药方法

造模后对照组和模型组给予凡士林纱条, 全方组、温阳组、活血组分别给予回阳生肌散药纱条、回阳生肌散拆方 1 药纱条、回阳生肌散拆方 2 药纱条, 每天 1 次, 给药 15 天。以 4% 水合氯醛麻醉, 取创面肉芽组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。

2.3 免疫组织化学方法检测 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达

常规包埋、切片, 切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水, PBS 洗涤 (1 min × 3 次), 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 (1 min × 3 次)。将切片浸入 EDTA 修复液中, 微波抗原修复, 滴加 VEGF (40 μg/ml)、VEGFR-2 (1: 25)、eNOS (1: 25) 一抗, 4℃ 冰箱过夜, 按二抗试剂盒说明添加二抗, DAB 显色、苏木精复染、中性树胶封片。光镜下棕黄色或棕褐色颗粒判定为阳性细胞。每张切片随机选取 6 个 100 倍视野, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行测量、分析图中累积光密度值 (IOD)。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 分析, 方差齐两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠创面肉芽组织 VEGF、VEGFR-2 表达比较

VEGF 阳性物质呈棕黄色颗粒样分布于真皮细胞胞质。正常皮肤 VEGF 在毛囊、内皮细胞及成纤维细胞内有弱阳性表达; 对照组呈阳性; 模型组呈阴性, 胶原纤维细小; 全方组呈强阳性, 胶原纤维较粗; 温阳组呈强阳性; 活血组呈弱阳性, 胶原纤维较细。

VEGFR-2 阳性物质呈棕黄色颗粒样分布于真皮细胞膜。正常皮肤 VEGFR-2 在血管内皮上弱阳性。对照组血管内皮细胞呈阳性; 模型组呈阴性, 胶原纤维细小; 全方组呈强阳性, 胶原纤维较粗较多; 温阳组和活血组呈弱阳性表达。

表 1 各组大鼠创面肉芽组织中 VEGF、VEGFR-2 表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF	VEGFR-2
对照组	8	40628.23 ± 13767.60	15389.22 ± 4273.95
模型组	10	3944.59 ± 1741.24*	1094.23 ± 44.01*
全方组	10	41137.98 ± 16356.61 [△]	17725.03 ± 8697.11 [△]
温阳组	8	27103.61 ± 5317.86 [△]	7376.46 ± 396.40*
活血组	10	12570.49 ± 2200.71**	3957.93 ± 499.97*

注: 与对照组比较, * *P* < 0.01; 与模型组比较, [△]*P* < 0.01; 与全方组比较, ☆*P* < 0.01; 与温阳组比较, ★*P* < 0.05

表 1 示, 与对照组比较, 模型组肉芽组织中 VEGF、VEGFR-2 表达水平显著降低 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 全方组 VEGF、VEGFR-2 含量显著

升高, 温阳组 VEGF 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与全方组比较, 活血组 VEGF、VEGFR-2 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 温阳组 VEGFR-2 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与温阳组比较, 活血组 VEGF 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠创面肉芽组织 eNOS 表达比较

eNOS 阳性物质呈棕黄色颗粒样分布于表皮细胞胞浆。正常皮肤 eNOS 在棘细胞层、颗粒层阳性表达。对照组棘细胞层呈弱阳性; 模型组基底层呈阴性; 全方组棘细胞层呈弱阳性; 温阳组棘细胞层呈弱阳性表达; 活血组基底层呈弱阳性表达。

表 2 示, 与对照组比较, 模型组肉芽组织中 eNOS 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 全方组 eNOS 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与全方组比较, 温阳组和活血组 eNOS 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠创面肉芽组织中 eNOS 表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	eNOS
对照组	8	34219.99 ± 15344.61
模型组	10	1377.44 ± 465.90*
全方组	10	17096.54 ± 4819.38 Δ
温阳组	8	3907.67 ± 2293.32*
活血组	10	3018.86 ± 1434.24*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$, 与模型组比较 $\Delta P < 0.01$, 与全方组比较, ☆ $P < 0.01$

4 讨论

近年来研究表明, 糖尿病皮肤在组织完整性和连续性未遭到破坏的情况下, 就已发生组织学和细胞生物学明显病理改变的“内源性损害”^[4-5], 而致创面愈合各个阶段相关生长因子的生成和调控机制失调, 最终延迟了创面的愈合^[6]。肉芽组织内血管形成是创伤愈合的首要条件。VEGF 是血管内皮细胞的特异性有丝分裂原, 是目前公认的最强的促血管生成因子。VEGF 通过对血管内皮细胞发挥强烈的促分化作用和趋化作用, 促进内皮细胞的增殖和迁移, 从而刺激新生血管形成^[7]。VEGF 主要是以自分泌和旁分泌的方式起作用^[8], 通过与其受体结合而行使其各项功能的。

VEGFR-2 是促使 VEGF 有丝分裂, 促使血管生成的主要受体^[9-10], 其亲和力较高, 具有受体型酪氨酸激酶活性, 主要表达在内皮细胞, 它在介导 VEGF 的内皮细胞增殖、迁移、血管生成^[11]和血管通透性等生物学功能中起着非常重要的作

用^[12]。VEGF 作用于内皮细胞上的受体, 使得受体自身二聚化和磷酸化, 激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K), 活化的 PI3K 进一步使丝氨酸-苏氨酸激酶 Akt 磷酸化。活化的 Akt 使得 eNOS 激活, 促进精氨酸转变为瓜氨酸, 同时释放出 NO^[13]。NO 在皮肤损伤愈合过程中炎症介导、细胞增殖、分化、凋亡及血管形成等中发挥重要作用。组织细胞中产生 NO 的关键酶 eNOS 的动态表达, 可间接反映组织中 NO 的生成量及其发挥的生物学作用^[14]。

由此可见, VEGF、VEGFR-2 和 eNOS 均为影响血管生成的关键因子。本研究发现, 与对照组比较, 模型组创面肉芽组织中 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 提示糖尿病皮肤溃疡愈合困难可能与创面局部 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达水平下降有关系。文献报道, 当糖尿病伴有创伤时, 小鼠表现出几种合成生长因子减少, 包括 VEGF^[15]。

全方组创面肉芽组织中 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达水平均明显高于模型组 ($P < 0.01$), 提示回阳生肌散全方可能通过提高创面局部 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达水平, 促进内皮细胞增殖迁移, 改善内皮功能, 促进血管生成和趋化, 而促进伤口愈合。温阳组和活血组创面肉芽组织中 VEGFR-2、eNOS 表达水平与模型组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示单独应用拆方不能显著的促进糖尿病皮肤溃疡大鼠创面的血管生成。

已故全国名老中医赵炳南、王玉章教授认为糖尿病等引起的慢性皮肤溃疡属于阴证疮疡, “阴中之阴”证, 病机为阳衰阴亏, 治宜温阳益气、活血生肌, 研制了“回阳生肌散”外用方药。《素问·阴阳应象大论》云“阴阳者, 万物之能使也”, “阳化气, 阴成形”。阳气可以激发促进有形的血脉肌肤的生成。本实验结果表明回阳生肌散能通过提高创面局部 VEGF、VEGFR-2、eNOS 表达水平, 促进肉芽生长和毛细血管新生, 从而促进创面愈合, 验证了此“回阳生肌”学术理论。

参考文献

- [1] 徐海环, 董化江, 单娜娜, 等. 三七总甙对糖尿病皮肤溃疡大鼠内皮素-1 水平的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(11): 815-817.
- [2] 贾连城, 盛巡, 孙明杰, 等. 回阳生肌散治疗慢性难愈性皮肤溃疡疗效观察及作用机制探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(10): 10-12.
- [3] 安宏元, 陈杰翔. 重组人表皮生长因子不同剂型作用于

糖尿病溃疡动物模型的疗效比较 [J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(10): 82-85.

[4] Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in development of atherosclerosis [J]. Curr Diab Rep, 2004, 4(1): 31-36.

[5] 陆树良, 谢挺, 牛轶雯. 创面难愈机制研究: 糖尿病皮肤的“微环境污染” [J]. 中华烧伤杂志, 2008, 24(1): 3-5.

[6] 吴正球, 梁自乾. 中医药治疗糖尿病难愈性创面作用机理的研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2012, 5(7): 683-686.

[7] Kilic U, Kilic E, Jarve A, et al. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways [J]. J Neurosci, 2006, 26(48): 12439-12446.

[8] Merlak M, Kovacevic D, Balog T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy [J]. Coll Antropol, 2008, 32(Suppl 2): 39-43.

[9] Parikh AA, Ellis LH. The vascular endothelial growth factor family and its receptors [J]. Hematol Oncol Clin North

Am, 2004, 18(5): 951-971.

[10] Hyde CA, Giese A, Stuttfeld E, et al. Targeting extracellular domains D4 and D7 of vascular endothelial growth factor receptor 2 reveals allosteric receptor regulatory sites [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(19): 3802-3813.

[11] Xu HY, Pan YM, Chen ZW, et al. 12-Deoxyphorbol 13-palmitate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of VEGFR-2-signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(3): 724-733.

[12] 倪效, 燕敏. VEGF 受体功能研究进展 [J]. 生命科学, 2008, 20(1): 120-124.

[13] 王磊, 张敏州, 訾勇, 等. 通冠胶囊对大鼠颈动脉内皮损伤后血管 VEGF、eNOS 表达和血清 NO 浓度的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(7): 1393-1395.

[14] 赵锐. 小鼠皮肤切创愈合过程中 iNOS 和 eNOS 表达的免疫组织化学研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2004: 1-43.

[15] Amery CM. Growth factors and the management of diabetic foot [J]. Diabet Med, 2005, 22(Suppl 1): 12-14.

Effects of Huiyang Shengji Powder (回阳生肌散) on Angiogenesis-Related Factors in Rats With Diabetic Skin Ulcer

ZHAO Guangming¹, DONG Jianxun², LI Yuan¹, XU Xuying², ZHANG Xuhui¹, WANG Leping¹, LU Guanglin¹

(1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010; 2. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Huiyang Shengji Powder* (powder to return yang and engender flesh, 回阳生肌散) on angiogenesis-related factors in rat with diabetic skin ulcer. **Methods** Fifty-six SD rats were randomized into the control group (n=8), model group (n=12), whole formula group (n=12), Wenyang group (n=12) and Huoxue group (n=12). The rat models of diabetic skin ulcer were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), hormone intervention, artificial skin defects and stimulation of plastic ring in all groups except the control group. The control group and model group were given petrolatum gauze. *Huiyang Shengji Powder* was disassembled into *Wenyang Yiqi Formula* (Yang-Warming Qi-Boosting Formula, 温阳益气方) and *Huoxue Shengji Formula* (Blood-Quickening Flesh-Engendering Formula, 活血生肌方). The whole formula group, Wenyang group and Huoxue group were given ointment gauze with *Huiyang Shengji Powder*, *Wenyang Yiqi Formula* and *Huoxue Shengji Formula* respectively. Each group was treated once daily for 15 days. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in granulation tissue were detected. **Results** The expression levels of VEGF, VEGFR-2 and eNOS in the model group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). The expression level of VEGF in the whole formula group was significantly higher than that in the Huoxue group and model group ($P < 0.01$). The expression levels of VEGFR-2 and eNOS in the whole formula group were significantly higher than those in the Wenyang group, Huoxue group and model group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Huiyang Shengji Powder* can promote wound healing by increasing the expression levels of VEGF, VEGFR-2 and eNOS in granulation tissue.

Keywords *Huiyang Shengji Powder*; diabetes mellitus; skin ulcer; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor-2; endothelial nitric oxide synthase

(收稿日期: 2013-08-26; 修回日期: 2013-12-05)

编辑: 洪 涛