

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.10.017

愈疡灵软膏对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

赵亚男¹, 刘明^{2*}, 张玥², 王彬², 张玉冬², 苏海文³, 任晓兰³, 郝清智²

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250014; 2. 山东中医药大学附属医院; 3. 青岛市第三人民医院)

摘要 目的 观察愈疡灵软膏对糖尿病溃疡大鼠创面愈合的影响及其可能作用机制。方法 60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、凡士林组、愈疡灵组, 每组 15 只。除对照组外其余各组采用高脂高糖饲料联合小剂量链脲佐菌素腹腔注射法制备糖尿病大鼠模型, 后各组大鼠均制作溃疡模型。于溃疡造模后第 2 天愈疡灵组大鼠创面以愈疡灵软膏涂敷其上, 约厚 2 mm, 外用无菌纱布包扎固定; 凡士林组采用凡士林油纱外敷; 对照组及模型组采用生理盐水纱布外敷, 各组每日换药 1 次。观察给药第 3、7、14 天各组大鼠创面愈合情况, 并采用 HE 染色法检测创面组织形态结构的变化, 检测溃疡组织中 Wnt 信号通路相关的 β -连环素 (β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、R-脊椎蛋白 3 (Rspo-3) 蛋白及 mRNA 的变化。结果 与对照组比较, 模型组、凡士林组、愈疡灵组大鼠在第 3、7、14 天创面愈合率, 创面组织中 β -catenin、Rspo-3 蛋白及 mRNA 表达均降低, GSK-3 β 蛋白及 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$)。与模型组、凡士林组比较, 愈疡灵组大鼠的创面愈合率、创面组织病理学变化、创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白及 mRNA 的表达水平均得到不同程度改善, 尤其以第 14 天最为明显 ($P < 0.05$)。结论 愈疡灵软膏可促进糖尿病溃疡大鼠创面的愈合, 其机制可能通过对 Wnt/ β -catenin 信号通路进行调节。

关键词 糖尿病溃疡; 愈疡灵软膏; Wnt 信号通路; 创面愈合

糖尿病溃疡是极具代表性的难愈性溃疡, 据统计, 30% 的糖尿病患者会发生皮肤溃疡, 且反复发作, 经久不愈, 严重者会导致截肢或引发脓毒血症而危及生命^[1]。愈疡灵软膏是我们在中医学“凉血散瘀”的治疗原则下创立的, 经研究发现, 其对慢性难愈性创面有较好的促愈作用^[2]。为研究愈疡灵软膏对糖尿病溃疡的促愈机制, 我们通过制作糖尿病溃疡大鼠模型, 并给予外用愈疡灵软膏进行干预, 观察溃疡组织形态结构的变化, 检测溃疡组织中 Wnt 信号通路相关的 β -连环素 (β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、R-脊椎蛋白 3 (Rspo-3) 蛋白及 mRNA 的表达水平, 以探讨愈疡灵软膏对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠 68 只, 雌性, 7 周龄, 体重 160 ~ 180 g, 购自山东大学动物实验中心, 实验动物许可证号: SCXK (鲁) 20130009。

1.2 药品

愈疡灵软膏, 主要组成: 象皮粉 48 g、紫草 40 g、当归 60 g、血竭 20 g 等, 由山东中医药大学附属医院药剂科加工成油膏制剂, 批号: 济卫药制 [7] FZ053-03。

1.3 主要试剂及仪器

高脂高糖饲料, 由 59% 基础饲料 + 20% 蔗糖 + 18% 猪油 + 3% 蛋黄组成, 北京科澳协力饲料有限公司加工制作; 链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司, 批号: S0130); 大鼠 β -catenin ELISA 检测试剂盒 (批号: CK-E06287R)、大鼠 GSK-3 β ELISA 检测试剂盒 (批号: CK-E332807R)、大鼠 Rspo-3

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2012HL14); 济南市青年科技明星计划 (20120145)

* 通讯作者: liuming404@163.com, 13515416013

ELISA 检测试剂盒 (批号: CK-E27664R) 均为 R&D 公司产品; Oligo (dT) (批号: OB1124)、Ribonuclease inhibitor (批号: EO0387 - 400U)、DEPC (批号: DD1005) 均为 Bio Basic INC 公司产品; Reverse Transcriptase (批号: 4311235)、Taq DNA Polymerase (批号: EP0701)、Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (批号: SM0242) 均为 Fermentas 公司产品; Agarose I-B (批号: AB0014)、无水乙醇 (批号: A500737)、异丙醇 (批号: IT7048) 均为上海生工生物工程有限公司产品; 柠檬酸 (批号: C8610)、柠檬酸钠 (批号: S8220)、氯仿 (批号: 0757) 均为北京索莱宝科技有限公司产品; 戊巴比妥钠 (上海榕柏生物技术有限公司, 批号: 57-33-0), 凡士林油纱 (河南省安邦卫材有限公司, 批号: 0042)。

酶标仪 (Labsystems Multiskan MS 公司, 352 型), 罗氏血糖仪 (罗氏诊断产品有限公司, 罗康全活力 II 型), 高速低温离心机 (Sorvall Super 公司, T1 型), 紫外分光光度计 (Nanodrop 公司, ND1000 型), 梯度 PCR 扩增仪 (Biometra, T-Gradient 型), 凝胶成像系统 (Alpha Innotech 公司, Alpha Imager™ 2200), 电泳仪 (Bio-Rad 公司, PowerPac™), 石蜡切片机 (Lecia 公司, RM2235 型), 光学显微镜照相系统 (Lecia 公司, M420 型), 普通光学显微镜 (Olympus 公司, CX40 型)。

1.4 动物分组及处理方法

大鼠按随机数字表法分为对照组 (17 只) 和造模组 (51 只)。适应性饲养 1 周后, 对照组给予普通饲料, 造模组给予高脂高糖饲料, 饲养 4 周后, 大鼠均禁食 12 h 后给予 30 mg/kg、1% STZ 溶液 (临用前用 0.1 mol/L、pH 4.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制) 单次腹腔注射, 对照组注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射后第 3 天采用断尾取血法测血糖, 随机血糖 ≥ 16.67 mmol/L 为糖尿病造模成功^[9]; 造模不成功者再次空腹 12 h 后注射 10 mg/kg、1% STZ 溶液。4 周后, 对照组和造模组大鼠以 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射进行麻醉, 背部脱毛, 常规消毒, 在背部制作直径约为 2.5 cm 的圆形创面, 深至皮下^[9]。对照组溃疡造模成功 15 只, 造模组造模成功 45 只, 将 45 只糖尿病溃疡模型大鼠采用随机数字表法分为模型组、凡士林组及愈疡灵组各 15 只。于造模后第 2 天愈疡灵组大鼠创面采用生理盐水棉球蘸拭后, 以愈疡灵软膏涂敷其上, 约厚 2 mm, 外用无菌纱布

包扎固定; 凡士林组采用凡士林油纱外敷换药; 对照组及模型组采用生理盐水纱布外敷换药。各组均每日换药 1 次。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 创面愈合情况 分别于给药第 3、7、14 天对创面进行大体观察, 主要包括创面颜色、肿胀程度、渗液量等, 并用数码相机拍照, 通过 Photoshop 14.0 软件记录创面面积^[9], 并分别计算各组大鼠创面愈合率, 计算方法为: (创面初始面积 - 给药第 n 天创面面积) / 创面初始面积 $\times 100\%$ 。

1.5.2 创面组织 HE 染色 分别于给药第 3、7、14 天每组大鼠采用随机数字表法抽取 5 只, 戊巴比妥钠麻醉后, 采集创面及创周 2mm 的组织, 4% 多聚甲醛固定后, 经冲洗-取材-脱水-透明-浸蜡-包埋-切片-贴片等步骤后制成组织切片, 再将石蜡切片脱蜡、水化后, 进行组织切片的苏木精-伊红染色 (HE 染色, $\times 40$), 以观察创面的组织学变化, 包括毛细血管、胶原蛋白、成纤维细胞等的变化。

1.5.3 创面组织 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白检测 分别于给药第 3、7、14 天每组大鼠采用随机数字表法抽取 5 只, 采集创面及创周 2mm 的组织, 应用 ELISA 法检测其中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白的含量。

1.5.4 创面组织 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 检测 分别于给药第 3、7、14 天每组大鼠采用随机数字表法抽取 5 只, 采集创面及创周 2mm 的组织, 应用 RT-PCR 法检测其中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 的含量。采用 Trizol 法提取总 RNA, 测 RNA 浓度及纯度, 调整 RNA 浓度, 建立 30 μ l 的 RT-PCR 体系。产物进行 PCR, 建立 25 μ l 体系。引物由上海博尚生物技术有限公司合成, β -catenin 引物序列: 上游: 5'-cTGACCAAACTGCTA-AATGACG-3', 下游: 5'-GTGGTGTATGCCGTAGAA-CAGTA-3'; GSK-3 β 引物序列: 上游: GGAC-CTCGGAGCAAGTTTCA, 下游: AGGCTCCCTC-CAAGATCCAT; Rspo-3 引物序列: 上游: GTA-CACTGTGAGGCCAGTGAA, 下游: ATGGCTAGAA-CACCTGTCCTG。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 各组数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠创面愈合情况

对照组给药第 3 天,创面色红润,轻度水肿,少量渗出,可见少量肉芽组织;第 7 天,创面缩小明显,肉芽色红润,无明显渗出,表面有痂皮覆盖,创缘可见淡红色新生上皮;第 14 天,创面缩小明显,创周可见淡红色新生上皮。模型组给药第 3 天,创面组织轻度水肿,色暗红,渗出较多,可见少量黄白色分泌物;第 7 天,肉芽水肿,色暗红、无光泽,渗出多;第 14 天,创面缩小,渗出减少,创周可见淡红色上皮爬行。凡士林组给药第 3 天,创面组织轻度水肿,色暗红,渗出较多,可见少量黄白色分泌物;第 7 天,可见少量肉芽组织,色暗红,肉芽水肿;第 14 天,创面缩小,渗出减少,创周可见淡红色上皮爬行。愈疡灵组给药第 3 天,创面组织水肿,色暗红,渗出较多,可见少量黄白色分泌物;第 7 天,创面可见淡红色肉芽组织,轻度水肿,创周可见上皮爬行;第 14 天,创面缩小,肉芽色红润,部分痂皮覆盖,创周可见淡红色新生上皮。

2.2 各组大鼠创面愈合率比较

表 1 示,与对照组比较,其余各组在第 3、7、14 天创面愈合率均明显降低 ($P < 0.05$)。第 3 天,模型组、凡士林组和愈疡灵组创面愈合率差异无统计学意义 ($P > 0.05$);第 7、14 天时,凡士林组和愈疡灵组创面愈合率较模型组明显提高,并且愈疡灵组创面愈合率明显高于凡士林组 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠创面组织 HE 染色比较

对照组:给药第 3 天,创面组织炎症细胞浸润明显,有少量纤维母细胞及少量新生毛细血管;第 7 天,可见肉芽组织,纤维母细胞生长活跃,新生毛细血管数量增加,有较多炎症细胞及少量胶原纤维;第 14 天,可见新生表皮及肉芽组织,有少量炎症细胞、纤维母细胞及毛细血管,可见较多胶原纤维。模型组:给药第 3 天,创面组织有少量炎症细胞、纤维母细胞及新生毛细血管;第 7 天,可见

炎症细胞浸润,有少量纤维母细胞及新生毛细血管,少量胶原纤维;第 14 天,可见新生表皮及肉芽组织,有少量炎症细胞、纤维母细胞及毛细血管,可见胶原纤维。凡士林组:给药第 3 天,创面组织有少量炎症细胞、纤维母细胞及新生毛细血管;第 7 天,纤维母细胞数量增加,可见炎症细胞浸润,少量胶原纤维及少量新生毛细血管;第 14 天,可见新生表皮及肉芽组织,有少量炎症细胞、纤维母细胞、毛细血管及胶原纤维。愈疡灵组:给药第 3 天,创面组织有少量炎症细胞、纤维母细胞及新生毛细血管;第 7 天,纤维母细胞及新生毛细血管数量增加,可见炎症细胞浸润及少量胶原纤维;第 14 天,可见新生表皮及肉芽组织,有少量相对成熟的毛细血管及胶原纤维,可见少量炎症细胞、纤维母细胞。

2.4 各组大鼠创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白及 mRNA 表达比较

表 2 示,与对照组比较,其余各组大鼠在第 3、7、14 天创面组织中 β -catenin、Rspo-3 蛋白及 mRNA 表达及显著降低, GSK-3 β 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。愈疡灵组第 7、14 天时创面组织中 β -catenin、Rspo-3 蛋白较同时时间点的模型组和凡士林组升高, GSK-3 β 蛋白降低 ($P < 0.05$)。而凡士林组在第 3、7、14 天时 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与同时时间点的模型组和凡士林组比较,愈疡灵组在第 7、14 天时创面组织中 Rspo-3 mRNA 升高,在第 3、7、14 天时 GSK-3 β mRNA 降低 ($P < 0.05$)。而模型组、凡士林组和愈疡灵组在第 3、7、14 天时 β -catenin mRNA 组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

糖尿病溃疡是糖尿病的常见并发症之一,中医学认为其病因病机主要为因虚感邪,邪气致瘀,瘀久化热,瘀热互结,肉腐致损,其中“瘀”“热”是创面难以愈合的主因^[8]。愈疡灵软膏正是在“凉

表 1 各组大鼠不同时间创面愈合率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	20.87 $\pm$ 1.39 (15)	49.99 $\pm$ 1.58 (10)	91.60 $\pm$ 1.58 (5)
模型组	5.21 $\pm$ 0.94* (15)	31.70 $\pm$ 1.21* (10)	62.20 $\pm$ 1.37* (5)
凡士林组	5.47 $\pm$ 0.86* (15)	33.10 $\pm$ 1.28* Δ (10)	64.83 $\pm$ 1.45* Δ (5)
愈疡灵组	5.81 $\pm$ 0.93* (15)	39.20 $\pm$ 1.21* Δ $\blacktriangle$ (10)	75.45 $\pm$ 1.59* Δ $\blacktriangle$ (5)

注:与对照组同时时间点比较,* $P < 0.05$;与模型组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$;与凡士林组同时时间点比较, $\blacktriangle P < 0.05$;() 内为鼠数

表 2 各组大鼠不同时间创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo3 蛋白及 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	β -catenin		GSK-3 β		Rspo-3	
			蛋白($\times 10^2$ pg/g)	mRNA(ng/ μ l)	蛋白($\times 10^2$ pg/g)	mRNA(ng/ μ l)	蛋白($\times 10^2$ pg/g)	mRNA(ng/ μ l)
对照组	第 3 天	5	9.04 $\pm$ 0.65	6.92 $\pm$ 0.16	7.04 $\pm$ 0.53	3.55 $\pm$ 0.32	4.83 $\pm$ 0.28	3.93 $\pm$ 0.27
	第 7 天	5	10.08 $\pm$ 0.35	7.12 $\pm$ 0.48	6.05 $\pm$ 0.23	3.00 $\pm$ 0.28	6.76 $\pm$ 0.31	5.32 $\pm$ 0.32
	第 14 天	5	12.77 $\pm$ 0.30	9.24 $\pm$ 0.55	4.49 $\pm$ 0.37	1.98 $\pm$ 0.19	5.75 $\pm$ 0.30	4.43 $\pm$ 0.23
模型组	第 3 天	5	5.14 $\pm$ 0.56*	4.40 $\pm$ 0.35*	15.52 $\pm$ 1.00*	7.07 $\pm$ 0.29*	3.47 $\pm$ 0.28*	2.40 $\pm$ 0.30*
	第 7 天	5	5.83 $\pm$ 0.43*	5.20 $\pm$ 0.49*	14.58 $\pm$ 0.45*	6.64 $\pm$ 0.47*	4.69 $\pm$ 0.30*	3.19 $\pm$ 0.27*
	第 14 天	5	6.55 $\pm$ 0.58*	6.06 $\pm$ 0.47*	13.37 $\pm$ 0.62*	5.68 $\pm$ 0.46*	3.96 $\pm$ 0.25*	2.73 $\pm$ 0.29*
凡士林组	第 3 天	5	5.35 $\pm$ 0.53*	4.44 $\pm$ 0.26*	15.38 $\pm$ 0.61*	6.93 $\pm$ 0.29*	3.48 $\pm$ 0.21*	2.42 $\pm$ 0.30*
	第 7 天	5	6.07 $\pm$ 0.50*	5.20 $\pm$ 0.38*	14.19 $\pm$ 0.53*	6.49 $\pm$ 0.38*	4.72 $\pm$ 0.25*	3.22 $\pm$ 0.36*
	第 14 天	5	6.95 $\pm$ 0.63*	6.17 $\pm$ 0.46*	12.96 $\pm$ 0.67*	5.42 $\pm$ 0.49*	4.10 $\pm$ 0.24*	2.69 $\pm$ 0.26*
愈疡灵组	第 3 天	5	5.85 $\pm$ 0.56*	4.78 $\pm$ 0.41*	14.87 $\pm$ 0.48*	6.46 $\pm$ 0.32* Δ $\blacktriangle$	3.51 $\pm$ 0.24*	2.61 $\pm$ 0.31*
	第 7 天	5	7.21 $\pm$ 0.68* Δ $\blacktriangle$	5.43 $\pm$ 0.46*	11.83 $\pm$ 0.55* Δ $\blacktriangle$	4.83 $\pm$ 0.27* Δ $\blacktriangle$	5.12 $\pm$ 0.21* Δ $\blacktriangle$	4.19 $\pm$ 0.31* Δ $\blacktriangle$
	第 14 天	5	9.48 $\pm$ 0.85* Δ $\blacktriangle$	6.41 $\pm$ 0.63*	8.78 $\pm$ 0.49* Δ $\blacktriangle$	3.67 $\pm$ 0.35* Δ $\blacktriangle$	4.67 $\pm$ 0.25* Δ $\blacktriangle$	3.42 $\pm$ 0.29* Δ $\blacktriangle$

注: β -catenin, β -连环素; GSK-3 β , 糖原合成激酶-3 β ; Rspo-3, R-脊蛋白 3; 与对照组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$; 与凡士林组同时时间点比较, $\blacktriangle P < 0.05$

血散瘀”的治疗原则指导下创立的,方中象皮粉为主药,具有祛腐生新、生肌敛疮的功效,配合紫草、血竭、当归等,共奏清热活血、消肿止痛、生肌收口之功。前期研究已经证实,愈疡灵软膏治疗皮肤慢性溃疡时可提高碱性成纤维细胞生长因子的表达,增加毛细血管数量,从而改善创面微循环、促进伤口愈合^[7]。在本实验中,模型组大鼠溃疡愈合较对照组减慢,肉芽生长不良;创面组织的 HE 染色证实,模型组炎症细胞、纤维母细胞、新生毛细血管等均较对照组减少,证明本实验成功模拟了糖尿病难愈性溃疡。而采用愈疡灵软膏干预后,创面愈合率及创面的组织学变化较模型组与凡士林组均得到改善,尤其从给药第 7 天开始,差异逐渐明显,说明愈疡灵软膏加速了糖尿病溃疡的愈合,且对创面修复增生期的效果更显著。

Wnt 信号通路是一条高度保守的信号传导通路被认为具有促进创面血管新生及上皮重塑等多方面的功能^[8]。Wnt/ β -catenin 通路作为经典的 Wnt 信号通路在正常成熟细胞中处于关闭状态。当 Wnt 信号通路被激活时, Wnt 蛋白与细胞表面受体卷曲蛋白及低密度脂蛋白相关蛋白 5/6 结合,胞内散乱蛋白与 Frz 胞内区结合后被磷酸化激活,抑制 GSK-3 β 的活性,使得 β -catenin 不能被磷酸化降解,进而在胞质内大量积累并进入核内,启动下游靶基因的表达^[9]。 β -catenin 在 Wnt 信号通路中具有核心作用, Wnt 信号通路的刺激是使 β -catenin 稳定性增强的唯一机制^[10]。GSK-3 β 位于降解复合体 β -catenin-APC-Axin 的关键位置,是决定 β -catenin 磷酸化的重要激酶,是 Wnt/ β -catenin 通路的负性调控因子^[11]。Rspo-3 是 Rspo 蛋白家族成员之

一^[12],有研究发现, Rspo 蛋白能在受体水平激活经典的 Wnt 信号通道并诱导 β -catenin/TCF 依赖的基因活化^[13]。

本研究结果显示,模型组大鼠创面组织中 β -catenin 的表达低于对照组,这与研究发现的高浓度葡萄糖可使细胞中 β -catenin 蛋白表达下降的结果相一致^[14]。另外,模型组大鼠创面组织中 GSK-3 β 的表达高于对照组,这与 GSK-3 β 作为 Wnt 信号通路的负性调控因子的生理作用是相符的。Rspo 蛋白作为 Wnt 信号通路的激活因子,在本实验中模型组大鼠创面组织中呈现低表达,据此推测糖尿病溃疡中 Wnt 信号通路的下调有可能源自其对 Rspo 蛋白的调降作用。应用愈疡灵软膏干预后,大鼠组织中 β -catenin、Rspo 蛋白在第 7、14 天表达均增加, GSK-3 β 蛋白表达水平下降,但在第 3 天各蛋白表达水平较模型组无明显差异,说明愈疡灵软膏有可能通过对 Wnt/ β -catenin 通路进行干预而实现促进愈合的作用,且这种干预作用主要体现在创面修复的增生期。愈疡灵组大鼠创面组织中 GSK-3 β mRNA 水平较模型组明显下降,而 Rspo-3 mRNA 水平于第 7 天、14 天较模型组明显上升,说明愈疡灵软膏对 Wnt/ β -catenin 通路的干预有可能主要通过通过对 GSK-3 β 、Rspo-3 进行调控而发挥作用,但其具体机制仍需进一步探索。本研究应用凡士林油纱为对照药物,其创面愈合率虽有所提高,但是 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达水平与模型组相比变化不大,说明凡士林对糖尿病溃疡虽有一定程度的促愈作用,但可能并未通过 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥作用。

参考文献

- [1] SHAKIL S, KHAN AU. Infected foot ulcers in male and female diabetic patients: a clinico-bioinformative study [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2010, 14(9): 1-10.
- [2] 刘明, 张玥, 刘春梅, 等. 愈疡灵软膏治疗下肢静脉性溃疡临床研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2003, 27(6): 419-421.
- [3] DAVIDSON EP, COPPEY LJ, HOLMES A, et al. Effect of treatment of high fat fed/low dose streptozotocin-diabetic rats with Ilepatriol on vascular and neural complications [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 668(3): 497-506.
- [4] 燕晓宇, 杨光, 成亮, 等. 低能量体外震波对糖尿病慢性创面模型血管新生和血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2745-2749.
- [5] 余舰, 程华刚, 李航. 临床法医学损伤面积测量的图像处理 [J]. 遵义医学院学报, 2007, 30(3): 422-424.
- [6] 刘政, 刘明, 张莉. 名老中医侯玉芬临证辑要 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2014: 83.
- [7] 刘春梅, 刘明, 侯玉芬, 等. 愈疡灵软膏促进溃疡内源性细胞生长因子(bFGF) 表达的研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2004, 28(5): 384-386.
- [8] 韩昌鹏, 姜文成, 厉复伦. Wnt 信号通路与创面愈合 [J]. 中国美容医学, 2012, 21(7): 1257-1260.
- [9] 孙晓磊, 施森, 何延政. 糖尿病创面难愈机制的研究进展 [J]. 西南军医, 2008, 10(5): 92-94.
- [10] 林常敏, 李宇. β -连环蛋白在毛囊形态发生及毛囊干细胞增生分化的作用 [J]. 医学研究生学报, 2004, 17(4): 358-360.
- [11] CHEN Y, WHETSTONE HC, YOUN A, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation [J]. J Biol Chem, 2007, 282(1): 526-533.
- [12] KIM KA, WAGLE M, TRAN K, et al. R-Spondin family members regulate the wnt pathway by a common mechanism [J]. Mol Bio Cell, 2008, 19(6): 2588-2596.
- [13] WEI Q, YOKOTA C, SEMENOV MV, et al. R-spondin proteins a novel link to β -catenin activation [J]. Cell Cycle, 2006, 5(1): 23-26.
- [14] 主父中印. 高葡萄糖高游离脂肪酸对皮肤成纤维细胞 β -catenin 表达影响的实验研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2013.

Impact of Yuyangling Ointment (愈疡灵软膏) on Wnt/ β -catenin Signal Pathway of Rats with Diabetic Ulcer
ZHAO Ya'nan¹, LIU Ming², ZHANG Yue², WANG Bin², ZHANG Yudong², SU Haiwen³, REN Xiaolan³, HAO Qingzhi²

(1. First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan, Shandong 250014; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 3. The Third People's Hospital of Qingdao)

ABSTRACT Objective To observe the impact and possible mechanism of *Yuyangling Ointment* on wound healing in rats with diabetic ulcer. **Methods** Sixty Wistar rats were randomized into a control group, a model group, a vaseline group and a Yuyangling group, with 15 rats in each group. Rats were given high-sugar-fat-diet and small dose streptozotocin intraperitoneal injection to establish diabetes rat models except those in the control group. Rats in all groups were established ulcer models. The second day after ulcer modeling, the wound surface of rats in the Yuyangling group was plastered *Yuyangling Ointment*, with the thickness of about 2 mm, bandaged and fixed externally by sterile gauze. The vaseline group applied vaseline oil gauze externally. The control group and the model group applied normal saline gauze externally. Each group changed dressing once every day. The wound healing of rats in all groups was examined on the 3rd, 7th and 14th day of administration. The changes of wound tissue morphological structure were detected with hematoxylin and eosin (HE) stain. The changes of β -catenin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), R-spinal protein 3 (Rspo-3) and mRNA in ulcer tissue, related to Wnt signal pathway, were detected. **Results** Compared with the control group, the wound healing rate on the 3rd, 7th and 14th day, as well as the expressions of β -catenin, Rspo-3 and mRNA decreased, but the expressions of GSK-3 β and mRNA increased in the model group, the vaseline group, and the Yuyangling group ($P < 0.05$). Compared with the model group and the vaseline group, the wound healing rate, the pathological changes of wound surface tissue, as well as the expressions of β -catenin, GSK-3 β , Rspo-3 and mRNA were improved by different degree in Yuyangling group. The changes on the 14th day were the most obvious ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yuyangling Ointment* might improve wound healing of rats with diabetic ulcer. The mechanism might be regulated with the signal pathway of Wnt/ β -catenin.

Keywords diabetic ulcer; *Yuyangling Ointment* (愈疡灵); Wnt signal pathway; wound healing

(收稿日期: 2015-09-15; 修回日期: 2015-12-08)

编辑: 邓 媛