

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.11.015

回阳生肌膏对糖尿病大鼠阴证疮面氧化应激的影响

贾湘隆¹, 徐旭英^{1*}, 周敏²

(1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010; 2. 北京中医药大学)

摘要 目的 探讨回阳生肌膏治疗糖尿病阴证疮面的作用机制。方法 108 只雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组 18 只, 糖尿病组 90 只。将糖尿病组大鼠按照链脲佐菌素-激素干预-皮肤缺损-塑料环埋置方法制备糖尿病阴证疮面动物模型。造模成功的 72 只大鼠分为模型组、中药组、中药+抑制剂组、模型+抑制剂组各 18 只; 空白组和模型组予以凡士林纱条, 中药组予以回阳生肌纱条, 中药+抑制剂组予以回阳生肌纱条并腹腔注射 LY294002 抑制剂, 模型+抑制剂组予以凡士林纱条并腹腔注射 LY294002 抑制剂。在给药第 3、7、10 天检测疮面肉芽组织中磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (AKT)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) mRNA 含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 蛋白含量。结果 各组第 3、7、10 天大鼠疮面肉芽组织中 SOD、MDA、GSH-Px 含量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。与空白组同时间比较, 模型组第 3、7、10 天大鼠疮面肉芽组织中 MDA、SOD 和 GSH-Px 含量明显增高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 中药组可显著提高大鼠疮面肉芽组织中 SOD 和 GSH-Px 含量, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$); 与中药组同时间比较, 中药+抑制剂组各时间 SOD 和 GSH-Px 含量均下降, MDA 含量均升高 ($P < 0.05$)。与空白组同时间相比, 模型组第 3、7、10 天 PI3K、AKT、eNOS mRNA 水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组同时间比较, 中药组第 3、7、10 天 PI3K、AKT、eNOS mRNA 水平显著提高 ($P < 0.05$); 与中药组同时间比较, 中药+抑制剂组 PI3K、AKT、eNOS mRNA 水平下降 ($P < 0.05$)。结论 回阳生肌膏可能通过 PI3K/AKT 通路抑制糖尿病阴证疮面氧化应激。

关键词 回阳生肌膏; 糖尿病; 阴证疮面; 氧化应激; PI3K/AKT 通路

糖尿病足中, 慢性难愈合的皮肤溃疡被称为糖尿病阴证疮面, 其临床表现为疮面脓液稀薄, 生肌长肉迟缓, 病程日久, 疮口难以收敛, 疮面平塌下陷, 色泽晦暗, 肉芽苍白或紫暗等^[1], 西医称之为慢性难愈性糖尿病足溃疡。研究显示, 氧化应激反应的过度激活引起局部氧自由基的大量生成, 对血管内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞等造成损伤, 进而不利于疮面的修复和愈合^[2]。回阳生肌膏是国家名老中医赵炳南研制的, 前期研究结果显示其对阴证疮面有良好的效果^[3-5]。磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 通路可以调节肌肉、皮肤等组织的各项功能, 如氧化应激、细胞凋亡、血管新生等, 能促进难愈性疮面的愈合^[6]。本研究观察回阳生肌膏通过对 PI3K/AKT 通路相关指标的影响, 探讨其对糖尿病大鼠阴证疮面抗氧化

应激的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 雄性 Wistar 大鼠 108 只, 体质量 (300 ± 20) g, 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) 2013-0001。无菌手术在中国中医科学院中药研究所屏障动物实验设施内进行, 温度 $20 \sim 22^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $40\% \sim 60\%$, 12 h 光照、12 h 避光循环饲养。

1.2 药物

回阳生肌膏由首都医科大学附属北京中医医院中医疮疡血管外科提供, 由肉桂、炮姜、人参、黄芪、川芎、当归、白芥子、白蔹按 1:1:1:3:1:1:3:1.5 比例与凡士林调匀制成。将回阳生肌膏和凡士林分别均匀涂抹于纱条上, 制成药纱条和凡士林纱条, 纱条上含回阳生肌膏或凡士林 0.018 g/cm^2 。LY294002 抑制剂溶液配制: 使用

基金项目: 国家自然科学基金 (81673975)

* 通讯作者: xxying7341@126.com, (010) 52176058

99% 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 浓度为 0.3 g/L。

1.3 主要试剂和仪器

链脲佐菌素 (STZ, 批号: S0130)、戊巴比妥钠 (批号: P376) 美国 Sigma 公司; 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-967); 酶联免疫试剂盒: 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: SBJ-R0005)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: SBJ-R0007)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (批号: SBJ-M0019) 均为南京森贝伽生物技术有限公司产品; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: P0012)、RNA 提取试剂盒 (批号: R0118)、逆转录试剂盒 (批号: D7168M), 均为碧云天生物技术公司产品。

罗氏卓越纤巧型血糖仪及配套试纸, 罗氏诊断产品有限公司; BSA1Z4S-CW 型电子天平, 上海方瑞仪器有限公司; BS60 型电热三用水箱, 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 型生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Multiskan Mk3 型酶标仪, Thermo 电子公司; ABI 7500 fast 型 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 3-18KS 型离心机, Sigma 公司。

2 方法

2.1 模型制备及分组

108 只大鼠适应性喂养 3 天后, 按体重分层, 分配虚拟笼, 虚拟笼内按随机数 (从 Excel 2010 表获取) 排序进行分组, 分为空白组 18 只, 糖尿病组 90 只。糖尿病组大鼠参照文献 [7] 方法一次性腹腔注射 STZ 溶液 (65 mg/kg), 第 3、7、14 天后随机血糖浓度均 > 16.7 mmol/L 时, 即为糖尿病大鼠造模成功。7 只血糖浓度未到 16.7 mmol/L, 予以剔除。将 83 只造模成功的糖尿病大鼠以 20 mg/kg 剂量肌肉注射氢化可的松注射液, 每日 1 次, 共 3 天。手术过程先给大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (0.5 ml/100 g), 麻醉后在造模区 (腰椎正中偏上) 脱毛, 剪皮深达筋膜, 造成一个边长为 18 mm $\times$ 18 mm 的正方形伤口, 将自制消毒塑胶环 (内环直径 18 mm, 外环直径 20 mm) 埋入切口边缘, 并与皮肤缝合, 拍照后用 6 层医用纱布、橡皮膏包扎固定 [8]。手术后大鼠饮水量、禁食量、排尿量明显量多, 毛色发黄, 体型较瘦, 且疮面发白, 分泌物清稀较少, 可以判定为糖尿病大鼠阴证

疮面模型成功 [9]。实验过程中死亡 11 只, 死亡率 12.22%, 可能由于部分体重减轻太过不耐受造模的损伤, 麻醉过量, 手术过程中长时间低温, 以及误伤脏器等。用 Excel 2007 生成随机数字, 将 72 只造模成功大鼠分为中药组、中药 + 抑制剂组、模型组和模型 + 抑制剂组每组 18 只。

2.2 给药

造模后中药组和中药 + 抑制剂组给予回阳生肌膏纱条, 空白组、模型组和模型 + 抑制剂组给予凡士林纱条; 同时中药 + 抑制剂组和模型 + 抑制剂组腹腔注射 LY294002 抑制剂 (0.3 mg/kg), 空白组、中药组和模型组腹腔注射 0.3 mg/kg 生理盐水, 每天给药 1 次, 共给药 10 天。

2.3 观察指标及方法

各组分别在给药第 3、7、10 天麻醉 6 只大鼠, 用手术剪取在塑料胶环内包围的肉芽组织先放入液氮中, 之后移入 -80°C 的冰箱中备用。

2.3.1 肉芽组织中 SOD、MAD、GSH-Px 含量 取 1 g 肉芽组织, 剪碎后放入裂解液内 1 min 4°C 7500 r/min, 离心半径 6 cm, 离心 15 min, 取上清液采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测。首先进行标准品稀释, 设立标准品孔, 空白孔和样本孔, 加样后进行温育 30 min, 洗涤后加入酶标试剂, 温育后再次洗涤, 加入显色剂温育 15 min 后加入终止液终止反应, 使用酶标仪在 450 nm 波长进行吸光度 (OD) 检测, 按照标准品及 OD 值绘制标准曲线, 计算出样本实际浓度。

2.3.2 肉芽组织中磷脂酰肌醇激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (AKT)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) mRNA 含量 RNA 提取按照常规方法进行, 提取后的 RNA 进行浓度测定, 使用 2 μg RNA 进行逆转录, 体系为 50 μl 。反应结束后, 进行 RT-PCR 反应。引物由北京梓熙生物技术公司合成, 引物序列见表 1, 引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的 cDNA 使用 2 μl , 反应条件按照说明书采用两步法进行, 95°C 15 min 预变性, 95°C 10 s 变性, 60°C 32 s 退火延伸, 40 个循环。反应结束后, 分析 CT 值, 以 GAPDH 为内部参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法进行 mRNA 相对表达量分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行统计。计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 组间比较采用单因素方差分析; 方差齐两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Tamhane's 法。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准。

表 1 PI3K、AKT、eNOS、GAPDH 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 (dp)
PI3K	上游 CCCCATTTCATCCTTGTG	99
	下游 AAGGCTGGAGGAGTTTCG	99
AKT	上游 TTCCACCTGTCTCGTGAGC	175
	下游 GCGCGAAGTCCGTTATCT	175
eNOS	上游 GGACTGCGTCCGTTTCATTAG	152
	下游 GGGCCTTGCGCTTCCTAG	152
GAPDH	上游 CCATCTTCCAGGAGCGAG	115
	下游 TTCAGGTGAGCCCCAGC	115

注: PI3K, 磷脂酰肌醇激酶; AKT, 蛋白激酶 B; eNOS, 内皮型一氧化氮合酶

3 结果

3.1 各组大鼠不同时间疮面肉芽组织中 SOD、MDA、GSH-Px 含量比较

表 2 示, 各组第 3、7、10 天 SOD ($F = 105.88$ 、 89.74 、 86.77 , 均 $P < 0.001$)、MDA ($F = 60.90$ 、 45.17 、 19.82 , 均 $P < 0.001$)、GSH-Px ($F = 65.02$ 、 83.50 、 47.82 , 均 $P < 0.001$) 比较, 差异均有统计学意义。与空白组同时间比较, 模型组第 3、7、10 天大鼠局部疮面组织中 MDA、SOD 和 GSH-Px 含量明显增高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 模型 + 抑制剂组 MDA 含量升高, SOD、GSH-Px 含量降低 ($P < 0.05$), 中药组可显著提高大鼠疮面肉芽组织中 SOD 和 GSH-Px 含量, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$); 与中药组同时间比较, 中药 + 抑制剂组各时间 SOD 和 GSH-Px 含量均下降, MDA 含量均升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时间疮面肉芽组织中 SOD、MDA、GSH-Px 含量比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	SOD	MDA	GSH-Px
空白组	第 3d	6	99.67 ± 4.20	43.26 ± 0.18	22.22 ± 1.64
	第 7d	6	112.12 ± 4.70	43.26 ± 0.18	22.41 ± 0.91
	第 10d	6	108.34 ± 3.30	42.73 ± 0.20	23.03 ± 1.94
模型组	第 3d	6	132.95 ± 4.30*	44.39 ± 0.29*	25.63 ± 0.91*
	第 7d	6	134.42 ± 2.70*	44.19 ± 0.26*	26.35 ± 1.11*
	第 10d	6	140.70 ± 4.40*	43.98 ± 0.31*	28.40 ± 1.05*
模型 + 抑制剂组	第 3d	6	114.97 ± 6.26 [△] ▲	45.04 ± 0.19 [△] ▲	23.78 ± 1.28 [△] ▲
	第 7d	6	118.17 ± 7.48 [△] ▲	45.04 ± 0.27 [△] ▲	24.41 ± 1.66 [△] ▲
	第 10d	6	119.12 ± 4.90 [△] ▲	44.26 ± 0.40 [△] ▲	26.46 ± 1.07 [△] ▲
中药 + 抑制剂组	第 3d	6	144.99 ± 4.98*	44.39 ± 0.25*	30.64 ± 1.28*
	第 7d	6	145.95 ± 3.70*	44.14 ± 0.19*	31.03 ± 1.14*
	第 10d	6	153.63 ± 8.36*	43.83 ± 0.34*	32.80 ± 1.24*
中药组	第 3d	6	162.34 ± 8.38* [△] ▲	43.66 ± 0.10* [△] ▲	33.04 ± 1.70* [△] ▲
	第 7d	6	163.30 ± 6.68* [△] ▲	43.55 ± 0.31* [△] ▲	34.01 ± 1.43* [△] ▲
	第 10d	6	167.29 ± 8.78* [△] ▲	43.07 ± 0.45* [△] ▲	34.02 ± 2.28* [△] ▲

注: SOD, 超氧化物歧化酶; MDA, 丙二醛; GSH-Px, 谷胱甘肽过氧化物酶; 与空白组同时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药 + 抑制剂组同时间比较, $\blacktriangle P < 0.05$

3.2 各组大鼠不同时间疮面肉芽组织中 PI3K、AKT、eNOS mRNA 表达比较

表 3 示, 与空白组同时间比较, 模型组第 3、7、10 天 PI3K、AKT、eNOS mRNA 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组同时间比较, 模型 + 抑制剂组各指标各时间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 而中药组第 3、7、10 天 PI3K、AKT、eNOS mRNA 水平显著提高 ($P < 0.05$); 与中药组同时间比较, 中药 + 抑制剂组 PI3K、AKT、eNOS mRNA 水平下降 ($P < 0.05$)。

4 讨论

糖尿病患者长期处于高血糖状态, 皮肤组织局部氧化产物蓄积, 导致氧化应激亢进和抗氧化能力下降, 产生细胞毒性作用, 进一步可引起神经和微血管损伤^[8]。皮肤组织内部结构的改变是造成阴证疮面的重要因素^[9]。氧化应激通过多种途径对糖尿病创面产生影响, 其中 PI3K/AKT 通路是目前认可最为常见的影响途径^[10]。

回阳生肌膏是根据“阳化气, 阴成形”理论研制的外用药, 能够促进微血管生成进而促进疮面愈合^[7, 11-12]。阴证疮面局部伤口组织过度的氧化应激反应产生细胞毒性, 抑制气血运行, 造成疮面阳气虚衰, 阴血不足, 表现为疮面脓液稀薄, 生肌长肉迟缓, 病程日久, 疮口难以收敛, 疮面平塌下陷, 色泽晦暗, 肉芽苍白或紫暗。回阳生肌膏可温阳化气、活血生肌, 从而抑制阴证疮面氧化应激亢

表 3 各组大鼠不同时间疮面肉芽组织中 PI3K、AKT、eNOS mRNA 表达水平 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	PI3K	AKT	eNOS
空白组	第 3d	6	1	1	1
	第 7d	6	1	1	1
	第 10d	6	1	1	1
模型组	第 3d	6	1.02 ± 0.49*	1.15 ± 0.09*	1.42 ± 0.36*
	第 7d	6	1.03 ± 0.29*	1.27 ± 0.10*	1.56 ± 0.66*
	第 10d	6	1.09 ± 0.60*	1.30 ± 0.14*	1.79 ± 0.57*
模型 + 抑制剂组	第 3d	6	1.00 ± 0.38▲	0.94 ± 0.10▲	0.98 ± 0.21▲
	第 7d	6	1.02 ± 0.34▲	1.21 ± 0.39▲	1.21 ± 0.39▲
	第 10d	6	1.08 ± 0.63▲	1.06 ± 0.11▲	1.53 ± 0.22▲
中药 + 抑制剂组	第 3d	6	1.47 ± 0.73	1.46 ± 0.12	1.59 ± 0.66
	第 7d	6	1.79 ± 0.80	1.57 ± 0.12	1.71 ± 0.70
	第 10d	6	1.49 ± 0.67	1.48 ± 0.17	1.72 ± 0.73
中药组	第 3d	6	2.38 ± 1.36*△▲	1.81 ± 0.15*△▲	2.38 ± 0.58*△▲
	第 7d	6	2.99 ± 1.33*△▲	1.95 ± 0.26*△▲	2.46 ± 0.90*△▲
	第 10d	6	2.42 ± 1.34*△▲	1.93 ± 0.20*△▲	2.40 ± 0.81*△▲

注: PI3K, 磷脂酰肌醇激酶; AKT, 蛋白激酶 B; eNOS, 内皮型一氧化氮合酶; 与空白组同时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药 + 抑制剂组同时间比较, $\Delta P < 0.05$

进, 助其温阳化气, 改善局部阳虚阴亏的状态。

SOD 是生物体内清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶, 可保护细胞免受氧化应激的损伤^[3]。GSH-Px 广泛存在于线粒体中, 对过氧化氢的还原反应可起到保护细胞膜结构和功能完整的作用, 而 GSH-Px 的缺乏或耗竭会增加机体的氧化损伤^[4]。自由基引发的脂质过氧化反应是细胞损伤的主要机制之一, MDA 是脂质过氧化反应的主要分解产物, 其含量可提示机体所面临的氧化应激情况^[3]。因此, SOD、GSH-Px、MDA 含量的变化能间接地反映局部疮面氧化应激的程度^[4]。本研究中与空白组比较, 模型组大鼠氧化应激产物 MDA 水平显著升高, 表明糖尿病阴证疮面氧化应激反应亢进。而中药组疮面的氧化应激反应较模型组受到了抑制, 表现为抗氧化物 GSH-Px 及 SOD 水平升高, 氧化应激产物 MDA 水平下降。

PI3K/AKT 通路可调节细胞毒性, 促进血管生成, 降低氧化应激反应等作用^[5]。本实验通过 PI3K 激酶抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/AKT 通路, 导致了 MDA 含量增高, SOD 和 GSH-Px 含量降低。中药组和中药 + 抑制剂的 PI3K、AKT、eNOS mRNA 含量明显高于模型组, 说明回阳生肌膏通过 PI3K/AKT 信号通路抑制氧化应激反应的过度激活, 进而减轻细胞凋亡和血管损伤等。其中模型组和中药组较空白组的 PI3K、AKT、eNOS mRNA 相对含量较高, 可知正常疮面可能不通过激活 PI3K/AKT 信号通路来促进伤口愈合。中药组 PI3K、AKT、eNOS mRNA 含量明显高于模型组, 说明回阳生肌膏通过 PI3K/AKT 通路抑制糖尿病阴证疮面的氧化

应激反应、模型 + 抑制组低于模型组, 中药 + 抑制剂组低于中药组, 说明 PI3K 的特异性抑制剂可有效抑制 PI3K/AKT 通路。

本研究证明回阳生肌膏对糖尿病足阴证疮面通过 PI3K/AKT 途径途径抑制了氧化应激过激反应来促进伤口愈合。但实验中影响 AKT 和 eNOS 磷酸化水平的因素很多, 本研究未设计 AKT 抑制剂将 PI3K/AKT 通路彻底阻断来进行实验, 有待今后继续研究。

参考文献

- [1] 李媛. 糖尿病慢性皮肤溃疡阴证模型建立及回阳生肌膏对糖尿病大鼠阴证溃疡创面不同时相的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014: 29-35.
- [2] 吴海霞. 氧化应激反应在糖尿病慢性皮肤溃疡中的作用 [J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(5): 185-187.
- [3] 贾连城, 盛巡, 孙明杰, 等. 回阳生肌膏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.
- [4] 谢志钧. 回阳生肌膏治疗慢性皮肤溃疡临床研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(17): 123-124.
- [5] 王广宇, 董建勋, 徐旭英, 等. 回阳生肌散对慢性难愈性皮肤溃疡伴铜绿假单胞菌感染 31 例 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(10): 2045-2048.
- [6] HUANG X, LIU G, GUO J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [7] 付小兵. 糖尿病慢性难愈合创面大鼠模型的制备 [J]. 上海实验动物科学, 1997, 17(4): 217-219.
- [8] MIRANDA-DÍAZ AG, PAZARÍN-VILLASEÑOR L, YANOWSKY-ESCATTELL FG, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease [J].

- J DIABETES RES, 2016; 7047238. doi: 10.1155/2016/7047238.
- [J] LI W, KANDHARE AD, MUKHERJEE AA, et al. Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats: role of TGF- β /Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways [J]. EXCLI J, 2018, 17: 399-419. doi: 10.17179/excli2018-1036.
- [10] 刘继松, 方勇. 氧化应激和糖尿病创面的延迟愈合 [J]. 蚌埠医学院学报, 2010, 35 (7): 756-757.
- [11] 赵光明, 董建勋, 李媛, 等. 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 [J]. 中医杂志, 2014, 55 (6): 504-507.
- [12] 李媛, 赵光明, 董建勋, 等. 回阳生肌膏及其拆方对糖尿病慢性皮肤溃疡大鼠血清白介素-1 α 和血栓素 B2 含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21 (7): 43-46.
- [13] MA L, LI P, SHI Z, et al. A prospective, randomized, controlled study of hyperbaric oxygen therapy: effects on healing and oxidative stress of ulcer tissue in patients with a diabetic foot ulcer [J]. Ostomy Wound Manage, 2013, 59 (3): 18-24.
- [14] ASHAFAQ M, VARSHNEY L, KHAN MH, et al. Neuromodulatory effects of hesperidin in mitigating oxidative stress in streptozotocin induced diabetes [J]. Biomed Res Int, 2014; 249031. doi: 10.1155/2014/249031.
- [15] AN ZM, DONG XG, GUO Y, et al. Effects and clinical significance of pentoxifylline on the oxidative stress of rats with diabetic nephropathy [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2015, 35 (3): 356-361.
- [16] VAIRAMON SJ, BABU M, VISWANATHAN V. Oxidative stress markers regulating the healing of foot ulcers in patients with type 2 diabetes [J]. Wounds, 2009, 21 (10): 273-279.

Effects of *Huiyang Shengji Ointment* (回阳生肌膏) on the Oxidative Stress of the Ulcer Surface with Yin Syndrome of Diabetes Mellitus Rats

JIA Xianglong¹, XU Xuying¹, ZHOU Min²

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

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Huiyang Shengji Ointment* (回阳生肌膏) in treating skin ulcers of diabetic rats with Yin syndrome. **Methods** A total of 108 male Wistar rats were randomly divided into blank group (n = 18) and diabetic group (n = 90). The diabetic rats were treated according to the method of embedding the streptozotocin hormone into the skin defect plastic ring to prepare the animal model of diabetic skin ulcer negative syndrome. The 72 successfully modeling rats were divided into a model group (n = 18), a Chinese medicine group (n = 18), a Chinese medicine + inhibitor group (n = 18) and a model + inhibitor group (n = 18). The blank group and the model group were given Vaseline gauze. The Chinese medicine group was given *Huiyang Shengji Ointment*. The Chinese medicine + inhibitor group was given the *Huiyang Shengji Ointment* and intraperitoneal injection of LY294002 inhibitor. The model + inhibitor group was given Vaseline gauze and intraperitoneal injection of LY294002 inhibitor. After administration for 3 d, 7 d, 10 d, the phosphoinositide 3-Kinases (PI3K), protein kinase B (AKT), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels, and superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) protein contents in sore granulation tissue were detected. **Results** The contents of SOD, MDA and GSH-Px in the sore granulation tissue on the 3rd, 7th and 10th day of each group were statistically significant (P < 0.001). Compared with the blank group, the contents of MDA, SOD and GSH-Px in the sore granulation tissue of the model group were significantly increased on the 3rd, 7th and 10th day (P < 0.05). Compared with the model group, the Chinese medicine group can significantly increase the content of SOD and GSH-Px in the granulation tissue of the rat sore surface and reduce the MDA content (P < 0.05). Compared with the Chinese medicine group, the SOD and GSH-Px of the Chinese medicine + inhibitor group at each time decreased and the content of MDA increased (P < 0.05). Compared with the blank group, the levels of PI3K, AKT and eNOS mRNA increased on the 3rd, 7th and 10th day of the model group (P < 0.05). Compared with the model group, the levels of PI3K, AKT and eNOS mRNA the on the 3rd, 7th and 10th day of the Chinese medicine group, were significantly increased (P < 0.05). Compared with the Chinese medicine group, the levels of PI3K, AKT and eNOS mRNA in the Chinese medicine + inhibitor group decreased (P < 0.05). **Conclusion** *Huiyang Shengji Ointment* can inhibit oxidative stress of skin ulcers of diabetic negative syndrome through the PI3K/AKT pathway.

Keywords *Huiyang Shengji Ointment* (回阳生肌膏); diabetes; wound with yin syndrome; oxidative stress; PI3K/AKT pathway

(收稿日期: 2018-09-17; 修回日期: 2018-12-28)

编辑: 王利芬