

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.04.010

温阳生肌膏对糖尿病阴证创面模型大鼠创面组织
甲基乙二醛含量及 HIF-1 α /VEGF 通路的影响黄新宇^{1,2}, 陈丽³, 丁雅容¹, 王君⁴, 奉水华¹, 周忠志¹✉

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市韶山中路95号, 410007; 2. 湖南中医药大学第一中医临床学院;
3. 湖南中医药大学血管生物学与转化医学湖南省重点实验室; 4. 海南省人民医院

[摘要] **目的** 探讨温阳生肌膏治疗糖尿病阴证创面的可能作用机制。**方法** 24只SD大鼠随机分为正常组6只及造模组18只。造模组大鼠以高脂饲料喂养14天后联合链脲霉素腹腔注射制备糖尿病模型,以糖皮质激素肌肉注射后于大鼠背部手术形成全层皮肤缺损进而建立糖尿病阴证创面大鼠模型;正常组普通饲料喂养,于大鼠背部手术形成全层皮肤缺损创面。将18只造模成功大鼠随机分为模型组、温阳生肌膏组、贝复新组各6只。温阳生肌膏组创面涂抹温阳生肌膏,贝复新组创面涂抹贝复新凝胶,正常组、模型组大鼠创面常规消毒后予生理盐水涂抹。各组均每日换药1次,共给药14天。分别在给药第0、3、7、14天记录创面愈合情况并计算第3、7、14天时创面愈合率。第14天给药后HE染色观察各组大鼠创面组织病理形态;Western Blot法检测创面组织缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白相对含量;免疫荧光法检测创面组织HIF-1 α 荧光强度;ELISA法检测创面组织甲基乙二醛(MGO)含量。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠给药第3、7、14天创面修复情况较差,创面愈合率降低($P<0.01$);HE染色显示,创面组织痂皮覆盖,有炎细胞浸润,胶原排列紊乱;创面组织VEGF蛋白相对含量显著降低,HIF-1 α 蛋白相对含量及MGO含量显著增加($P<0.01$),HIF-1 α 荧光强度增强。与模型组比较,温阳生肌膏组、贝复新组给药第3、7、14天创面愈合情况较好,创面愈合率均增高($P<0.01$);创面组织可见清晰完整的上皮层结构,炎细胞消退,肉芽组织成熟,胶原排列整齐;MGO含量均显著降低($P<0.01$);温阳生肌膏组HIF-1 α 、VEGF蛋白相对含量均显著增加,而贝复新组仅VEGF蛋白相对含量增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与贝复新组比较,温阳生肌膏组创面表皮层较厚,可见粗大胶原形成,HIF-1 α 荧光表达明显增加,创面组织MGO含量下调,HIF-1 α 蛋白相对含量增高($P<0.05$)。**结论** 温阳生肌膏可减少糖尿病阴证创面组织MGO堆积,激活HIF-1 α /VEGF通路,可能是其促进创面愈合的机制之一。

[关键词] 糖尿病;创面愈合;甲基乙二醛;缺氧诱导因子1 α ;血管内皮生长因子;阴证;温阳生肌膏

糖尿病创面是糖尿病常见并发症之一,具有迁延不愈、发病率较高、修复难度大等特点,属于慢性难愈性创面中的一种,给患者带来了沉重的心理及经济负担^[1]。临床上糖尿病创面大多具有色泽灰白、创周平塌干枯、脓液清稀、腐肉不脱、新肉不

生、创口经久难敛等特点,中医辨证属阴证范畴^[2]。中医药干预可促进糖尿病皮肤伤口愈合^[3]。温阳生肌膏是湖南中医药大学第一附属医院院内制剂,前期研究表明,温阳生肌膏具有温阳祛腐生肌功效,能促进糖尿病阴证慢性创面修复^[4],其作用机制可能与增加局部皮损处新生肉芽组织中的新生微血管数量有关^[5]。

现代研究表明,缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路受损是糖尿病创面血管生成障碍的主要原因^[6],而高糖环境下甲

基金项目:国家自然科学基金(82074447);湖南省“十四五”重点学科和应用特色学科建设项目(湘教通[2022]351号);湖南省科学技术厅湖南省重点实验室(2023TP1018);海南省科学技术厅重点研发项目(ZDYF2023SHFZ123);湖南省自然科学基金(2023JJ60348, 2024JJ9430);湖南中医药大学研究生创新课题(2023CX93)

✉ 通讯作者:3z_cl@163.com;(0731)89669012

基乙二醛(MGO)的大量堆积,是影响 HIF-1 α /VEGF 通路平衡的关键因素^[7]。因此,本研究从 MGO 含量和 HIF-1 α /VEGF 信号通路探讨温阳生肌膏促进糖尿病阴证创面愈合的可能作用机制,以期温阳生肌膏的临床应用提供实验依据。本实验通过湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会审查,伦理批号:LL2020071402。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 200~220 g, 6~8 周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号:430727231102158954。饲养及相关处理均在湖南中医药大学动物实验中心屏障动物实验设施内进行,温度 20~22℃,相对湿度 40%~60%,实验期间动物自由进食、饮水。

1.2 药物

温阳生肌膏由丁香、肉桂、乳香和没药按照 2:2:1:1 比例配制而成,由湖南中医药大学第一附属医院制剂科制备。贝复新凝胶,珠海亿胜生物制药有限公司(批号:S20040001)。

1.3 主要试剂及仪器

高脂饮食饲料(组成:67%的维持饲料、10%的猪油、20%的蔗糖、2.5%的胆固醇、0.5%的胆酸钠,批号:202300000001264),湖南斯莱克景达实验动物有限公司;链脲霉素(STZ,货号:S8050)、苏木素-伊红(HE,货号:G1120)染色试剂盒、5%BSA 封闭液(货号:SW3015)、封闭山羊血清(货号:SL038),北京索莱宝科技有限公司;DAB 染液(货号:G1213)、辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔二抗(货号:G1214)、荧光二抗(货号:G1213),武汉赛维尔生物科技有限公司;HIF-1 α 一抗(货号:GTx127309),美国 Gene Tex 公司;VEGF 一抗(货号:ab1316),英国 Abcam 公司;兔抗 β -actin 一抗(货号:AC038),武汉爱博泰克生物科技有限公司;ECL 显影液(货号:34577),美国 ThermoFisher 公司;MGO 检测试剂盒(货号:ml027126),上海酶联生物科技有限公司;BCA 试剂盒(货号:KTD3001),亚科因生物技术有限公司;氢化可的松注射液(货号:B61935),国药集团容生制药有限公司;RIPA 裂解液(货号:ES-8150),广州亿涛生物科技有限公司;DAPI 染色液(货号:072723240327),碧云天生物技术有限公司。

RM2235 型切片机,上海徕卡仪器有限公司;Axio Examiner 型荧光显微镜,德国 ZEISS 公司;PowerPacBasic 型电泳转膜装置、721BR17573 Chemi-DoC-XRS+ 型化学发光成像分析仪,美国 Bio-Rad 公司;spark 型多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;D5500 型摄像机,日本尼康公司;Heraeus Fresco 型高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher 公司;712BR17573 型化学发光凝胶成像系统,伯乐生命医学产品有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

24 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组 6 只,造模组 18 只。造模组大鼠高脂饲料喂养 14 天后,采用一次性腹腔注射 STZ 45 mg/kg 建立糖尿病大鼠模型^[8]。若大鼠连续 3 天随机血糖值 ≥ 16.7 mmol/L,即为糖尿病大鼠模型成功。在此基础上连续 7 天肌肉注射氢化可的松注射液 20 mg/(kg·d),若大鼠表现为畏寒肢冷、身体蜷缩、体毛不荣、鼠质量下降、纳食差等阳虚症状,则认为糖尿病大鼠阴证模型成功^[9]。随后用 1%戊巴比妥钠 0.2 ml/kg 腹腔注射麻醉,在背部备皮,形成两个 4 cm $\times$ 4 cm 的正方形裸皮区域。依次用络合碘与 75%乙醇消毒,在大鼠背部手术形成两个直径为 1 cm 的圆形全层皮肤缺损创面。造模后若出现创面散漫、平坦塌陷,肉芽生长缓慢、颜色苍白等特征,则认为糖尿病大鼠阴证创面模型成功^[9],18 只大鼠均造模成功。正常组普通饲料喂养,于大鼠背部手术形成两个直径为 1 cm 的圆形全层皮肤缺损创面,创面制备过程同造模组。

将造模成功的 18 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、温阳生肌膏组和贝复新组,每组 6 只。正常组和模型组创面常规消毒后予生理盐水涂抹,温阳生肌膏组创面予以温阳生肌膏覆盖,贝复新组创面予以贝复新凝胶覆盖,各给药组药物覆盖全部创面,厚度均匀。每日换药 1 次,共给药 14 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 创面修复情况及愈合率计算 分别于给药第 0、3、7、14 天观察各组大鼠创面修复情况,并用图像分析软件 Image J (V1.8.0) 测定拍摄创面的面积,计算给药第 3、7、14 天的创面愈合率。创面愈合率=(第 0 天创面面积-相应观察时间点创面面积)/原创面面积 $\times$ 100%。

1.5.2 HE 染色观察创面组织病理形态 给药第 14 天拍照记录后,用 1%戊巴比妥钠溶液 0.2 ml/kg 腹腔注射麻醉处死大鼠。以创面为中心取得面积

2 cm×2 cm 的标本, 分成相等的两块, 一块于 4% 多聚甲醛瓶中固定保存, 用于组织病理学检测, 另一块液氮冻存用于分子生物学检测。皮肤组织取材后经过固定、脱水、包埋步骤制作成 4 μ m 切片。切片经过烘烤、脱蜡、水洗、染色、透明、封片等处理后制成大鼠创面组织 HE 染色玻片样本, 显微镜观察创面组织显微结构及其修复情况。

1.5.3 Western Bolt 法检测创面组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白含量 100 mg 皮肤创面组织解冻后于 RIPA 裂解液研磨, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min (半径 8.6 cm) 离心 20 min 离心取上清, BCA 法测定总蛋白浓度, 选择蛋白质量为 40 μ g 进行电泳。恒压 60 V 将样本电泳至浓缩胶分离胶交界线后转 100 V 电泳至胶板底部; 恒电流 200 mA 转膜 100 min; 10% 脱脂奶粉常温孵育 2 h; 一抗 HIF-1 α 、VEGF、 β -actin 分别按照 1: 3000、1: 500、1: 15000 进行稀释; 4 $^{\circ}$ C 摇晃孵育过夜; 洗膜后以 HRP 山羊抗兔二抗(1:4000); 洗膜后滴加 ECL 显影液后以化学发光凝胶成像系统显影。以 Image J (V1.8.0) 软件计算条带平均灰度值, 以 β -actin 为内参, 反映各组蛋白相对含量。

1.5.4 免疫荧光法检测创面组织 HIF-1 α 表达 大鼠创面组织 (0.5 cm×2 cm) 经常规石蜡包埋, 切片后置于载玻片上, 烘干箱中烤片 2 h, 二甲苯两次脱蜡 10 min, 梯度乙醇复水, 枸橼酸钠抗原修复液中进行抗原修复, 微波炉中加热 30 min 后, 自然冷却至室温, PBS 洗去修复液, 5% BSA+10% 山羊血清封闭 1 h, 弃去山羊血清后一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗去一抗, 用荧光二抗孵育大鼠创面组织切片 1 h, PBS 洗去二抗, 以 DAPI 染核 5 min, PBS 洗去 DAPI, 用抗荧光衰减封片剂封片, 在荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.5.5 ELISA 法检测创面组织 MGO 含量 100 mg 皮肤创面组织解冻后于 RIPA 裂解液研磨, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min (半径 8.6 cm) 离心 10 min 取上清。分别设空白孔、待测样品孔按照相关试剂盒步骤检测创面组织 MGO 含量。多功能酶标仪依序测量各孔的光密度 (OD 值) 以表示 MGO 含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料数据均符合正态分布且方差齐, 用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 采用 LSD 进行组间两两分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

研究过程中模型组和温阳生肌膏组各有 1 只大鼠由于大剂量 STZ 冲击后血糖骤降, 出现死亡, 最后取材时剩 22 只大鼠。根据愈合率, 去除正常组和贝复新组误差相对较大的大鼠各 1 只, 每组 5 只进行数据分析。

2.1 各组大鼠不同时间创面愈合情况

图 1 示, 给药第 3 天, 模型组创面愈合不明显, 同时仍可见深部组织且光泽晦暗, 渗出较多; 正常组、温阳生肌膏组、贝复新组创面均较为干燥, 创缘可见明显收敛现象, 创面较前缩小。给药第 7 天, 模型组创面组织晦暗、光泽较差, 创面面积缩小小情况较其余各组差; 温阳生肌膏组创面较其余组可见其明显结痂、色泽较好, 创面面积缩小与贝复新组相似, 但稍差于正常组。给药第 14 天, 除模型组外, 温阳生肌膏组、正常组、贝复新组大鼠创面基本愈合, 仅残余较小破口, 创周皮肤再生良好; 而模型组大鼠创面仍存在渗血现象, 创缘有红肿, 修复情况较其他组明显不良。

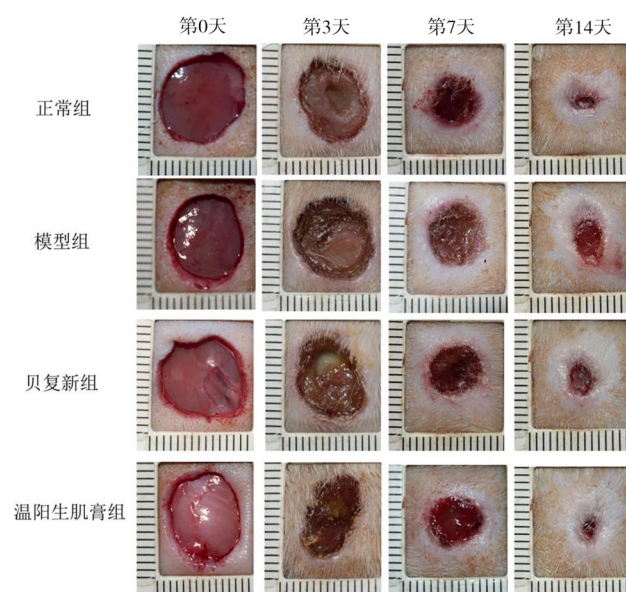


图 1 各组大鼠不同时间创面愈合情况比较

Figure 1 Comparison of wound healing in rats of different groups at different time points

2.2 各组大鼠不同时间创面愈合率比较

表 1 示, 与正常组同时时间比较, 模型组大鼠创面愈合率在给药第 3、7、14 天均明显降低 ($P<0.01$); 与模型组同时时间比较, 温阳生肌膏组、贝复新组大鼠在各时间点创面愈合率均明显升高 ($P<0.01$); 与贝复新组同时时间比较, 温阳生肌膏组各

时间点创面愈合率显著增高 ($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间创面愈合率比较

Table 1 Comparison of wound healing rates in rats of different groups at different time points ($\%$, $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	第 3 天	第 7 天	第 14 天
正常组	5	28.83 $\pm$ 1.01	68.95 $\pm$ 7.52	94.77 $\pm$ 1.87
模型组	5	7.55 $\pm$ 1.12 ^{a)}	31.44 $\pm$ 5.18 ^{a)}	75.84 $\pm$ 2.68 ^{a)}
贝复新组	5	22.97 $\pm$ 2.81 ^{b)}	55.96 $\pm$ 3.39 ^{b)}	88.53 $\pm$ 1.86 ^{b)}
温阳生肌膏组	5	28.39 $\pm$ 2.97 ^{b) c)}	67.17 $\pm$ 3.67 ^{b) c)}	95.09 $\pm$ 1.98 ^{b) c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与贝复新组比较， $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠创面组织 HE 染色情况比较

图 2 示，正常组大鼠创面组织形成粗大的胶原纤维，可见新生毛囊，创面塑形完成；模型组大鼠创面组织仍存在痂皮，有炎细胞浸润，胶原排列紊乱；温阳生肌膏组和贝复新组大鼠创面组织可见清晰完整的上皮层结构，炎细胞消退，肉芽组织成熟，胶原、血管排列整齐，且温阳生肌膏组表皮厚度优于贝复新组，可见粗大胶原、血管形成。

2.4 各组大鼠创面组织 MGO 含量及 HIF-1 α 、VEGF 蛋白相对含量比较

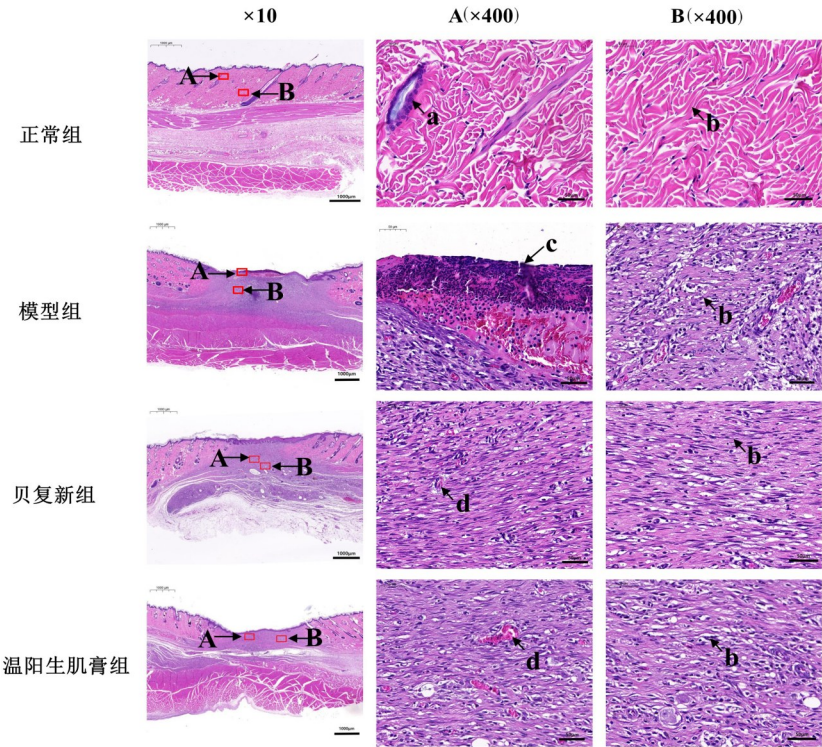
表 2 示，与正常组比较，模型组大鼠创面组织 MGO 含量上调，HIF-1 α 蛋白相对含量升高，VEGF 蛋白相对含量降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，

表 2 各组大鼠创面 MGO 含量及 HIF-1 α 、VEGF 蛋白相对含量比较

Table 2 Comparison of MGO content and relative protein levels of HIF-1 α and VEGF in wound tissue of rats from different groups ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	MGO/mg $\cdot$ L ⁻¹	HIF-1 α / β -actin	VEGF / β -actin
正常组	5	5.78 $\pm$ 0.52	0.37 $\pm$ 0.12	1.11 $\pm$ 0.15
模型组	5	8.01 $\pm$ 0.26 ^{a)}	0.75 $\pm$ 0.13 ^{a)}	0.33 $\pm$ 0.11 ^{a)}
贝复新组	5	7.02 $\pm$ 0.35 ^{b)}	0.75 $\pm$ 0.16	0.64 $\pm$ 0.13 ^{c)}
温阳生肌膏组	5	6.35 $\pm$ 0.41 ^{b) d)}	1.10 $\pm$ 0.10 ^{c) d)}	0.81 $\pm$ 0.27 ^{b)}

注：MGO，甲基乙二醛；HIF-1 α ，缺氧诱导因子-1 α ；VEGF，血管内皮生长因子。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与贝复新组比较， $P<0.05$ 。

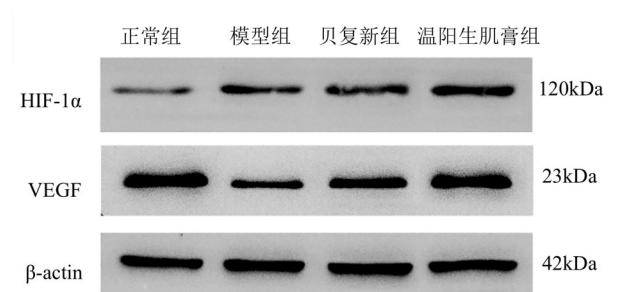


注：每组图片的第 1 张图是 $\times 10$ 放大的整体；第 2 张是第 1 张图中红框的 A 箭头所指部分 $\times 400$ 的放大图；第 3 张是第 1 张图中红框的 B 箭头所指部分 $\times 400$ 的放大图；a 箭头指示为毛囊；b 箭头指示为胶原；c 箭头指示为痂皮；d 箭头指示为新生毛细血管。

图 2 各组大鼠创面组织 HE 染色结果比较

Figure 2 Comparison of HE staining results of wound tissue in rats of different groups

温阳生肌膏组与贝复新组 MGO 含量下调, 温阳生肌膏组 HIF-1 α 、VEGF 蛋白相对含量均显著增加, 贝复新组 VEGF 蛋白相对含量显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与贝复新组比较, 温阳生肌膏组 MGO 含量显著下调, HIF-1 α 蛋白相对含量显著增高 ($P<0.05$)。各组大鼠创面组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白电泳图见图 3。



注: HIF-1 α , 缺氧诱导因子-1 α ; VEGF, 血管内皮生长因子。

图3 各组大鼠创面 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达电泳图

Figure 3 Electropherogram of HIF-1 α and VEGF protein expression in wound tissue of rats from different groups

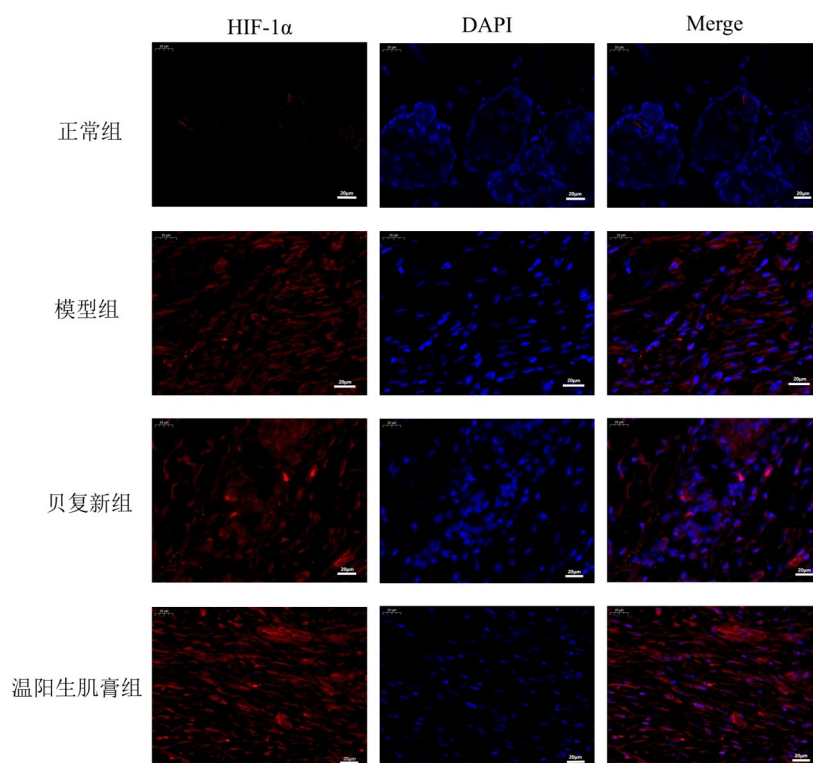
2.5 各组大鼠创面组织 HIF-1 α 荧光表达比较

图 4 示, 与正常组比较, 模型组大鼠创面组织 HIF-1 α 荧光表达明显增加。与模型组比较, 温阳生

肌膏组大鼠创面组织 HIF-1 α 荧光表达明显增多, 且细胞核内表达显著增多, 而贝复新组创面组织 HIF-1 α 组荧光表达无明显增加。

3 讨论

糖尿病创面属于中医学“阴疽”“疮疡”等范畴, 其修复难、发病率高^[10]。糖尿病阴证创面由阳虚所致, 阳气虚衰、阴血不足而致迁延难愈, 气血瘀滞, 无以化生, 故温法为治疗阴证创面基本原则。所谓“阴病治阳”, 扶阳抑阴, 阳盛则阴衰, 则阴疽可除^[11]。温阳生肌膏中肉桂“内托痈疽”(《本草纲目》), 其性大热, 味辛、甘, 为升阳助火之品, 剽悍猛烈, 走而不守, 温通气血, 且有引火归元之功, 可宣导他药, 鼓舞阳气, 化生气血修复创面, 重用为君。丁香味辛, 辛香走窜作为引药, 又性温散, 既可助阳化气、理气活血, 亦可助他药吸收扩散, 为臣药。乳香辛温芳香, 善走窜而行气活血, 没药性平, 重在苦泄散血化瘀, 虽为开通之品, 但不至于耗伤气血, 二药相须为用, 可协同互补, 增强药力促创面修复, 两者共为佐药。全方温补阳气和辛散温行配伍, 补不敛邪, 散不伤正, 共同发挥温阳祛腐生肌修复创面的功效。贝复



注: HIF-1 α , 缺氧诱导因子-1 α 。

图4 各组大鼠创面组织 HIF-1 α 荧光表达情况 ($\times 200$)

Figure 4 HIF-1 α fluorescence expression in wound tissue of rats from different groups

新凝胶为临床创面常用药物,故本研究中用作对照药物。

糖尿病状态下,各种途径造成创面血管新生障碍,创面缺血缺氧,难以启动修复进程,故促进血管新生是糖尿病创面修复的核心环节之一^[12]。本研究发现,与模型组比较,温阳生肌膏组和贝复新组大鼠创面愈合率显著提升,镜下可见清晰完整的上皮层结构,肉芽组织成熟,胶原、血管排列整齐,且温阳生肌膏组表皮厚度优于贝复新组,提示温阳生肌膏能促进毛细血管、胶原新生,加速糖尿病阴证创面上皮化,修复创面,且疗效优于贝复新。

MGO 是机体糖代谢过程中产生的一种活性产物,随着糖尿病患者体内活性氧堆积导致 MGO 显著增加,诱导糖尿病血管并发症发生,故抑制 MGO 生成在一定程度上可减少糖尿病血管病变发生率^[13-14]。HIF-1 α /VEGF 是血管新生关键通路,HIF-1 α 作为 VEGF 转录的主要调节因子,二者的平衡是促进新生血管形成的主要因素^[15]。HIF-1 α 作为氧稳态的主要调节因子,可介导细胞对缺氧的适应性反应,当氧水平降低时 HIF-1 α 含量增加以适应缺氧状态^[16]。糖尿病创面虽存在持续缺氧,但高血糖会对 HIF-1 α 负调控,HIF-1 α 信号通路受到抑制,无法维持缺氧稳态,糖尿病创面修复进程受阻,创面难愈^[17-18]。VEGF 作为调控血管新生关键的生长因子之一,是目前已知最强的内皮细胞有丝分裂原,与血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 结合后刺激内皮细胞的增殖和迁移,促进糖尿病创面血管新生^[19]。糖尿病环境下 HIF-1 α 含量下降会下调 VEGF 的表达,从而抑制糖尿病创面血管生成,不利于创面修复^[20]。糖尿病高糖环境下异常代谢方式会促进 MGO 大量堆积,诱导 HIF-1 α 降解与泛素化,同时对 HIF-1 α 的共激活因子 p300 起共价修饰作用,使得 HIF-1 α 的转录活性急剧降低,HIF-1 α 含量大幅下降,继而抑制下游信号 VEGF 表达^[21];MGO 亦可同时抑制 VEGF 诱导的 VEGFR2 磷酸化,减少 VEGFR2 与 VEGF 结合,无法发挥促血管新生效应^[22]。由此可见,糖尿病状态下,MGO 含量增加,HIF-1 α /VEGF 通路受到抑制,可显著抑制糖尿病创面血管生成,不利于创面修复。本研究结果发现,与正常组比较,模型组大鼠创面 MGO 含量增加,HIF-1 α 水平显著升高,VEGF 蛋白水平显著降低。与模型组相比,温阳生肌膏组 MGO 水平降低,HIF-1 α 、VEGF 水平升高,而贝复新组 MGO 水平降低、VEGF 水平升高,HIF-1 α 无

明显变化,提示贝复新凝胶促进糖尿病创面愈合的机制可能不通过 HIF-1 α 通路调控。本结果亦发现,模型组 HIF-1 α 与正常组创面相比反而出现了增高,考虑可能是此正常创面不存在缺氧情况,HIF-1 α 通路尚未被激活,但温阳生肌膏上调了 HIF-1 α 表达,使得 HIF-1 α 达到维持缺氧稳态的阈值,从而激活下游靶基因转录。

综上所述,温阳生肌膏可显著抑制糖尿病阴证创面 MGO 生成,激活 HIF-1 α /VEGF 通路,促进血管新生,从而加速创面修复,可为临床运用温阳生肌膏治疗糖尿病阴证创面提供科学依据,亦为中医临床采用温阳祛腐原则治疗糖尿病阴证创面提供实验依据。本研究尚未使用通路相关激动剂或抑制剂做对照,对 HIF-1 α /VEGF 通路的调节作用还需进一步验证,并对该通路调控机制进行深入探索。

参考文献

- [1] ARMSTRONG DG, TAN TW, BOULTON A, et al. Diabetic foot ulcers: a review [J]. JAMA, 2023, 330 (1): 62-75.
- [2] 杜志欣,郭卉,郭敬拙,等. 回阳生肌法辨治糖尿病足阴证疮面经验[J]. 河北中医, 2022, 44(2): 302-305.
- [3] 史君鹤,曲华,何山,等. 中医药干预糖尿病皮肤伤口愈合的研究进展[J]. 中医杂志, 2023, 64(10): 1076-1080.
- [4] 田京. 温阳生肌膏促慢性阴证创面愈合的临床观察[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2023.
- [5] 张欢欢,唐金强,周忠志,等. 温阳生肌膏对糖尿病大鼠阴证慢性创面 CD34 和 VEGF 表达及血管重建的影响[J]. 感染、炎症、修复, 2021, 22(2): 67-71, 64.
- [6] LIN CJ, LAN YM, OU MQ, et al. Expression of miR-217 and HIF-1 α /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats[J]. J Endocrinol Invest, 42(11): 1307-1317.
- [7] SOLANKI AK, LALI FV, AUTEFAGE H, et al. Bioactive glasses and electrospun composites that release cobalt to stimulate the HIF pathway for wound healing applications[J]. Biomater Res, 2021, 25(1): 1.
- [8] 赵凌云,钟成元,戴保民. 链脲佐菌素实验性糖尿病研究: I. 链脲佐菌素诱发大鼠糖尿病模型[J]. 四川医学院学报, 1985, 16 (4): 289-291.
- [9] 周佳俞,陈丽,康瀚云,等. 糖尿病阴证大鼠创面模型的制备[J]. 中医药信息, 2023, 40(9): 46-53.
- [10] 杜明威,朱信霖,廖万清,等. 中西医结合治疗糖尿病足溃疡的研究现状[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2024, 38 (2): 128-133.
- [11] 徐阳,王军. 糖尿病足溃疡复发的防治经验[J]. 中国

- 中西医结合外科杂志, 2024, 30(6): 926–928.
- [12] ZAIDI MB, KHAN F, JAMEEL F, et al. Temporal and differential proteomic profile of molecular mediators associated with chronic and acute wound healing [J]. Cell Biochem Funct, 2024, 42(2): e3946.
- [13] SCHALKWIJK CG, STEHOUWER C. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases [J]. Physiol Rev, 2020, 100(1): 407–461.
- [14] WANG G, WANG Y, YANG Q, et al. Metformin prevents methylglyoxal-induced apoptosis by suppressing oxidative stress in vitro and in vivo [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(1): 29.
- [15] YAMAGUCHI S, HIGASHI M, KANETAKA K, et al. Rapid and chronological expression of angiogenic genes is a major mechanism involved in cell sheet transplantation in a rat gastric ulcer model [J]. Regen Ther, 2022, 21: 372–379. doi: 10.1016/j.reth.2022.08.008.
- [16] COLOMBANI T, BHATT K, EPEL B, et al. HIF-stabilizing biomaterials: from hypoxia-mimicking to hypoxia-inducing [J]. Mater Adv, 4(15): 3084–3090.
- [17] LI G, KO CN, LI D, et al. A small molecule HIF-1 α stabilizer that accelerates diabetic wound healing [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3363.
- [18] KERSTAN A, DIETER K, NIEBERGALL-ROTH E, et al. Translational development of ABCB5⁺ dermal mesenchymal stem cells for therapeutic induction of angiogenesis in non-healing diabetic foot ulcers [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 455.
- [19] ZHANG Z, HUANG C, GUAN S, et al. Hybrid gelatin-ascorbyl phosphate scaffolds accelerate diabetic wound healing via ROS scavenging, angiogenesis and collagen remodeling [J]. Biomater Adv, 2024, 158: 213779. doi: 10.1016/j.bioadv.2024.213779.
- [20] ESAKKIMUTHUKUMAR M, SWAROOP AK, PATNAIK SK, et al. A novel family of small molecule HIF-1 α stabilizers for the treatment of diabetic wounds; an integrated in silico, in vitro, and in vivo strategy [J]. RSC Adv, 2022, 12(48): 31293–31302.
- [21] IACOBINI C, VITALE M, PUGLIESE G, et al. Normalizing HIF-1 α signaling improves cellular glucose metabolism and blocks the pathological pathways of hyperglycemic damage [J]. Biomedicines, 2021, 9(9): 1139.
- [22] BETTING F, SCHLUNCK G, AGOSTINI HT, et al. Methylglyoxal and high glucose inhibit VEGFR2 phosphorylation at specific tyrosine residues [J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2022, 77(11/12): 493–500.

Effect of *Wenyang Shengji Ointment* (温阳生肌膏) on MGO Content and HIF-1 α /VEGF Pathway in Wound Tissue of Diabetic Wound Model Rats with *Yin Syndrome*

HUANG Xinyu^{1,2}, CHEN Li³, DING Yarong¹, WANG Jun⁴, FENG Shuihua¹, ZHOU Zhongzhi¹

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. The First Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine; 3. Provincial Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine, Hunan University of Chinese medicine; 4. Hainan General Hospital

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Wenyang Shengji Ointment* (温阳生肌膏, WSO) in the treatment of diabetic wounds with *yin syndrome*. **Methods** A total of 24 SD rats were randomly divided into a group (n=6) and modeling group (n=18). The modeling group rats were fed with high-fat diet for 14 days and then were injected intraperitoneally with streptozotocin to induce diabetic model. After steroid injection, full-thickness skin defects were created on the back of the rats to establish a diabetic wound with *yin syndrome* model. The normal group was fed with regular diet, and full-thickness skin defects were created surgically on the back of the rats. The 18 successfully modeled rats were further divided into three groups, the model group, the WSO group, and the *Beifuxin* (Recombinant Bovine Basic Fibroblast Growth Factor Gel, BX) group, 6 rats in each group. The WSO group was given the ointment to the wound, the *Beifuxin* group was given BX gel, and the normal group and model group was disinfected and treated with saline. All groups had their dressings changed once daily for 14 days. Wound healing was recorded on days 0, 3, 7, and 14, and the wound healing rate was calculated on day 3, 7, and 14. On day 14 after treatment, HE staining was performed to observe the pathological morphology of the wound tissue. Western Blot was used to detect the relative protein levels of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Immunofluorescence was used to measure the fluorescence intensity of HIF-1 α in the wound tissue, and ELISA was used to detect the methylglyoxal (MGO) content in the wound tissue. **Results** Compared with the normal group, the model group showed poor wound healing on day 3, 7, and 14, with a low wound healing rate ($P < 0.01$). HE

staining showed scab coverage on the wound, with inflammatory cell infiltration and disorganized collagen arrangement. The relative protein levels of VEGF were significantly reduced, while the relative protein levels of HIF-1 α and the MGO content significantly increased ($P<0.01$), and the fluorescence intensity of HIF-1 α was enhanced. Compared to the model group, the WSO group and *Beifuxin* group showed better wound healing on day 3, 7, and 14, with an increased wound healing rate ($P<0.01$). The wound tissue showed clear and complete epithelial structure, reduced inflammatory cells, mature granulation tissue, and organized collagen arrangement. MGO content was significantly reduced ($P<0.01$). The relative protein levels of HIF-1 α and VEGF both significantly increased in the WSO group, while only VEGF increased in the *Beifuxin* group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the *Beifuxin* group, the WSO group had a thicker epidermal layer, prominent collagen formation, significantly increased HIF-1 α fluorescence expression, reduced MGO content in the wound tissue, and higher relative protein levels of HIF-1 α ($P<0.05$). **Conclusion** WSO can reduce the accumulation of MGO in diabetic wound tissue with *yin* syndrome and activate the HIF-1 α /VEGF pathway, which could be one of the mechanisms for promoting wound healing.

Keywords diabetes; wound healing; methylglyoxal; hypoxia-inducible factor 1 α ; vascular endothelial growth factor; *yin* syndrome; *Wenyang Shengji Ointment* (温阳生肌膏)

(收稿日期: 2024-09-08; 修回日期: 2024-10-30)

[编辑: 王利芬]

广告

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了1951—2013年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址: 北京东直门内南小街16号中医杂志社, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632 联系人: 杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986年光盘合订本每套(4张光盘) 480元

1987—1994年光盘合订本每套(1张光盘) 260元

1995—2004年光盘合订本每套(1张光盘) 280元

2005—2013年光盘合订本每套(1张光盘) 300元

科技精品光盘全文检索管理系统3.5-《中医杂志》(1987-1994)

1. 系统工具 2. 检索结果 3. 检索设置 4. 桌面设置 5. 帮助

检索 二次检索 全选

期刊目录

1. 泄泻证治
2. 厥脱与中风的关系
3. 脉法三论
4. 针灸保健益寿法探
5. 清热解毒法治疗瘰疬
6. 余无言医方治验选介
7. 中医治疗高热症三例
8. 丁仲山外科医案三则
9. 月经溢乳综合征证治探讨
10. 医话二则
11. 甘露消毒丹新用
12. 中药结合消痔治疗皮肤切
13. 失眠从气论治2例
14. 男性不育症从肝肾论治
15. 东垣升阳泻火法在针灸
16. 井穴的贯通应用法
17. 萎缩性胃炎436例中医辨
18. 中药熏洗治疗滑囊炎腱
19. 三种不同治法治疗急性
20. 桑椹对老年便秘及睡眠
21. 利胆合剂治疗小儿肝炎
22. 中药治疗小儿迁延性血
23. 慢性胃炎辨证论治和血
24. 八种论调中药疗效的对

1951 1952
1953 1954
1955 1956
1957 1958
1959 1960
1961 1962
1963 1964
1965 1966
1967 1968 选择年份

《中医杂志》
中国中医药学会
中国中医研究院
主办

欢迎关注《中医杂志》公众号

1951-1986
中国中医药学会
中国中医研究院
主办

1987-1994
中国中医药学会
中国中医研究院
主办

1995-2004
中国中医药学会
中国中医研究院
主办

2005-2013
中国中医药学会
中国中医研究院
主办