

复方愈疡散治疗糖尿病慢性难愈性创面的机制

卓燊¹, 乔雪², 陈君³, 秦海洸^{1*}

(1. 广西科技大学医学院, 广西柳州 545005; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001;
3. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] **目的:**研究复方愈疡散治疗糖尿病慢性难愈性创面的作用机制。**方法:**SD大鼠腹腔注射四氧嘧啶,在背部剪出直径约2 cm创面,制造糖尿病慢性难愈合创面大鼠模型,建立糖尿病大鼠创面模型后随机分为模型组、阳性药对照组、复方愈疡散组、补虚组、祛瘀组,每组30只。模型组灌胃生理盐水,阳性药组灌胃康复新液($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),复方愈疡散组灌胃复方愈疡散($13.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),补虚组灌胃补虚方($5.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),祛瘀组灌胃祛瘀方治疗($7.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。于治疗后第10,16,20天于创面组织取材,用酶联免疫吸附测定法检测I, III型胶原, Smad信号蛋白家族-3(Smad3), Smad信号蛋白家族-7(Smad7), 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)含量。**结果:**与模型组比较,复方愈疡散组能够上调III型胶原, Smad7表达($P < 0.05$),降低Smad3的表达($P < 0.05$),其中以第20天效果最佳;补虚组能够上调I型胶原表达,升高Smad7的表达($P < 0.05$),康复新组下调III型胶原表达,升高TGF- β_1 , Smad3表达($P < 0.05$)。祛瘀组能够上调I, III型胶原表达,升高TGF- β_1 , Smad3的表达($P < 0.05$)。**结论:**复方愈疡散促进糖尿病大鼠创面愈合的机制可能与双向调节TGF- β_1 -Smad3, Smad7通路,调整I, III型胶原在创面组织中的比例有关。

[关键词] 复方愈疡散; 糖尿病创面; 胶原; 信号传导

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0115-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040115

Mechanism of Fufang Yuyang Powder on Diabetic Skin Ulcers Healing ZHUO Shen¹, QIAO Xue², CHEN Jun³, QIN Hai-guang^{1*} (1. Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545005, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of Fufang Yuyang powder on the diabetic skin ulcers healing. **Method:** The SD male rats were given alloxan and skin was scratched to establish the diabetic wound model. The modeling rats were randomly divided into 5 groups: model group, positive control group (Kangfuxin prescription $10.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig), Fufang Yuyang powder group (Fufang Yuyang powder $13.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig), reinforce deficiency group (Buxu prescription $5.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig), removing blood stasiss group (Quyu prescription $7.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig). enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assay type I and III collagen, Smad3, Smad7, transforming growth factor (TGF)-beta at 10, 16, 20 days after modeling. **Result:** Compared with the model group, Fufang Yuyang powder increased III type collagen, Smad7 expression ($P < 0.05$), decreased Smad3 expression ($P < 0.05$), on the 20th day, the action was most significant, Buxu prescription increased I type collagen expression ($P < 0.05$), increased TGF- β_1 , Smad3 expression ($P < 0.05$); Quyu prescription increased I, III type collagen expression ($P < 0.05$), increased, Smad7 expression ($P < 0.05$). Kangfuxin group regulated III collagen, increased TGF- β_1 , Smad3 expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** Fufang Yuyang powder can promote the wound healing in diabetes rats, the mechanism may be related to bidirectional

[收稿日期] 20140730(014)

[基金项目] 广西壮族自治区自然科学基金(2009AM4099); 国家科技部第十九次中泰科技合作项目(19-508J); 广西壮族自治区教育厅一般项目(2013YB289); 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(Z2012602)

[第一作者] 卓燊, 硕士, 主管中药师, 从事中药药效与理论研究, Tel: 15878898916, E-mail: zhuoshen@126.com

[通讯作者] * 秦海洸, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事皮肤病、性病的中医药治疗研究, Tel: 0772-5314526, E-mail: qinghaiguang@126.com

regulation of TGF β_1 -Smad3, Smad7 pathway and adjusting of the proportion of I, III type collagen in wound tissue.

[Key words] Fufang Yuyang powder; diabetic wound; collagen; signal transduction

慢性难愈性创面成因复杂类型多样,是临床难治性疾病之一^[1]。传统中医学认为,创面愈合过程是“腐祛肌生,肌平皮长”的过程,“祛腐生肌”的指导思想一直占有重要地位。而慢性难愈性创面常常是“祛腐而腐不脱,腐脱而肌不生”^[2]。现代医学研究表明慢性难愈性创面与多种分子调控有关:Schiller 和 Saika 的研究表明慢性难愈性创面与 Smad 信号蛋白家族及转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 有关:Smad7 高表达能够抑制 TGF- β , Smad3 的表达,减轻瘢痕增生,促进创面愈合^[3-4];孙立虹和万滢聪的研究发现大鼠慢性难愈性创面组织的治疗机制与调整 I, III 型胶原在创面组织中的比例有关^[5-6]。

复方愈疡散主要由黄芪、白术、当归、鬼箭羽组成,经多年临床与实验研究,具有促进伤口愈合、减少瘢痕形成的功效。“复方愈疡散”是在“补虚祛瘀”指导思想下配伍组方,专为慢性难愈性创面而设。在多年的临床应用中,此方剂不但促愈作用明显,而且愈后瘢痕面积小,质量佳,皮色接近正常,愈后不易复发。笔者的前期研究已经证明复方愈疡散能够促进糖尿病大鼠创面愈合^[7],本实验拟在此基础上进一步探讨复方愈疡散对“TGF- β 细胞内信号转导分子 Smad3, Smad7”的影响及对创面胶原代谢的作用,以求为中医药治疗慢性难愈性创面提供更充足的科学依据,使中医外科创面修复理论在现代分子生物学领域得到进一步印证。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,均由广西医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(桂)2009-0002。

1.2 仪器 JY92-2D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所),EL204 型 1/1 万电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),ST-16R 型低温超速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),MCO-18AIC 型 5% CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),海尔 DW-86L386 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.3 中药 康复新液(湖南科伦制药,国药准字 Z51021834),复方愈疡散:将方中黄芪(15.0 g),白术(10.5 g),当归(26.5 g),鬼箭羽(13.3 g)剂量扩大 20 倍。3 kg 药材以 8 倍水提 2 h,过滤,再以 4 倍水提 1 h,合并滤液,加热浓缩,得到生药量为 1 304

g·L⁻¹药液 2.3 L;补虚方:复方愈疡散拆方,将黄芪(15.0 g),白术(10.5 g)按照上述方法操作,得到生药量为 509 g·L⁻¹药液 2 L;祛瘀方:复方愈疡散拆方,将当归(26.5 g),鬼箭羽(13.3 g)按照上述方法操作,得到生药量为 795 g·L⁻¹药液 2 L。

1.4 试剂 四氧嘧啶(美国 Sigma 公司,批号 20120816),I, III 型胶原酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号 20130504,20130412),TGF- β_1 (批号 20130806),Smad3,Smad7 ELISA 试剂盒(批号 20130304,20130510),均购自武汉华美生物公司。

2 方法

2.1 造模方法 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,采用改良糖尿病慢性难愈创面大鼠模型方法^[8],注射 5% 浓度四氧嘧啶(注射前禁食 12 h),注射容积 2 mL·kg⁻¹。次日测得血糖值 >11 mmol·L⁻¹ 表示成功(150 只)。将 150 只大鼠随机分为模型组、阳性药组、复方愈疡散组、补虚组、祛瘀组(每组 30 只)。用儿童理发器剃掉背部毛发,10% 水合氯醛(2 mL·kg⁻¹, ip)麻醉,5% 的碘酒及 75% 乙醇局部消毒,无菌条件下用眼科手术剪在糖尿病大鼠背部剪出直径约 2 cm 的圆形创面,深至筋膜。

2.2 分组及给药 制成糖尿病创面大鼠模型后,模型组大鼠 ig 给予生理盐水 10 mL·kg⁻¹;阳性药组 ig 给予康复新液(10.0 g·kg⁻¹);复方组 ig 给予复方愈疡散(13.0 g·kg⁻¹);补虚组 ig 给予补虚方(5.1 g·kg⁻¹);祛瘀组 ig 给予祛瘀方(7.9 g·kg⁻¹)。

2.3 I, III 型胶原, TGF- β_1 , Smad3, Smad7 含量的测定 取造模后第 10, 16, 20 天大鼠创面组织 100 mg,用 1 × PBS 液洗去血污。剪成小块放 10 mL 离心管中,加入 1 mL 1 × PBS 液,用超声细胞粉碎机匀浆,将组织匀浆液置于 -20 °C 过夜,经过反复冻融 2 次处理破坏细胞膜后,将组织匀浆液于 2 ~ 8 °C 5 000 × g 离心 5 min,取上清液进行测试。I, III 型胶原, TGF- β_1 , Smad3, Smad7 含量的测定采用酶联免疫吸附测定法按试剂盒说明书进行操作。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本均数比较采用 *t* 检验,多个样本之间的两两比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各时段创面组织 I 型胶原含量的影响 第 10 天创面组织 I 型胶原含量, 补虚组高于模型组与阳性药组 ($P < 0.05$); 第 16 天, 祛瘀组高于模型组与康复新组 ($P < 0.05$); 第 20 天, 补虚组高于模型组与阳性药组 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对各时段 III 型胶原含量的影响 第 10 天, 复方组与补虚组 III 型胶原含量高于模型组 ($P < 0.05$); 第

16 天, 复方组与祛瘀组高于模型组与康复新组 ($P < 0.05$); 第 20 天, 复方组高于模型组与康复新组; 祛瘀组含量高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对各时段 TGF- β_1 含量的影响 第 10 天, 补虚组、祛瘀组 TGF- β_1 含量明显低于模型组 ($P < 0.05$); 第 16 天, 复方组、补虚组、祛瘀组低于模型组 ($P < 0.05$); 第 20 天祛瘀组低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 复方愈疡散对各时段 I 型胶原含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 1 Effects of Fufang Yuyang San on I type collagen in wound tissue in rat ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	I 型胶原/ng·g ⁻¹		
		第 10 天	第 16 天	第 20 天
模型	-	12.41 ± 2.07	9.88 ± 2.03	13.08 ± 1.94
康复新	10.0	9.42 ± 1.45	11.41 ± 3.17	14.80 ± 2.58
复方愈疡散	13.0	11.24 ± 1.73	11.23 ± 2.48	13.04 ± 2.60
补虚	5.1	16.46 ± 2.65 ^{1,3)}	12.75 ± 2.1 ¹⁾	24.49 ± 4.23 ^{1,3)}
祛瘀	7.9	12.16 ± 1.74 ³⁾	15.81 ± 1.84 ^{1,3)}	16.25 ± 2.19 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与康复新组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

表 2 复方愈疡散对各时段 III 型胶原含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 2 Effects of Fufang Yuyang San on III type collagen in wound tissue in rat ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	III 型胶原/ng·g ⁻¹		
		第 10 天	第 16 天	第 20 天
模型	-	2.61 ± 0.54	2.83 ± 0.38	3.30 ± 0.34
康复新	10.0	2.53 ± 0.45	1.95 ± 0.40	1.81 ± 0.36
复方愈疡散	13.0	3.02 ± 0.40 ¹⁾	3.97 ± 0.37 ^{1,3)}	4.27 ± 0.34 ^{1,3)}
补虚	5.1	2.96 ± 0.29 ¹⁾	2.21 ± 0.39 ³⁾	2.34 ± 0.50 ^{1,3)}
祛瘀	7.9	2.82 ± 0.40	3.71 ± 0.40 ^{1,3)}	3.57 ± 0.34 ¹⁾

表 3 复方愈疡散对各时段 TGF- β_1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 3 Effects of Fufang Yuyang San on TGF- β_1 in wound tissue in rat ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TGF- β_1 /pg·g ⁻¹		
		第 10 天	第 16 天	第 20 天
模型	-	88.93 ± 7.96	51.80 ± 4.65	27.28 ± 3.81
康复新	10.0	42.76 ± 7.81	36.81 ± 3.76	46.76 ± 8.32
复方愈疡散	13.0	87.39 ± 8.60 ³⁾	44.46 ± 4.81 ¹⁾	32.96 ± 2.43 ³⁾
补虚	5.1	55.09 ± 8.41 ^{1,3)}	48.22 ± 4.30 ^{1,3)}	43.66 ± 5.19 ³⁾
祛瘀	7.9	58.35 ± 8.50 ^{1,3)}	46.09 ± 4.71 ¹⁾	18.66 ± 3.02 ³⁾

3.4 对各时段 Smad3 含量的影响 第 10 天, 复方组、祛瘀组与补虚组含量高于模型组 ($P < 0.05$); 第 16 天, 复方组低于模型组 ($P < 0.05$); 第 20 天, 复方组低于其他各组 ($P < 0.05$) 和模型组 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 对各时段 Smad7 含量的影响 复方组第 10,

16, 20 天, 与祛瘀组复方组 (第 16, 20 天) 含量高于模型组 ($P < 0.05$), 其他组差异无显著性。见表 5。

4 讨论

TGF- β_1 是伤口愈合中重要的调控因子, 同时也被认为最强的致纤维化因子, TGF- β_1 的局部过度表达可导致局部纤维组织增生, 出现皮肤瘢痕。

表 4 复方愈疡散对各时段 Smad3 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of Fufang Yuyang San on Smad3 in wound tissue in rat ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Smad3/ $pg \cdot g^{-1}$		
		第 10 天	第 16 天	第 20 天
模型	-	0.29 ± 0.08	0.52 ± 0.07	1.01 ± 0.13
康复新	10.0	0.25 ± 0.04	1.12 ± 0.10 ¹⁾	4.41 ± 0.21 ¹⁾
复方愈疡散	13.0	0.64 ± 0.16 ^{1,3)}	0.41 ± 0.06 ^{1,3)}	0.20 ± 0.02 ^{1,3)}
补虚	5.1	0.56 ± 0.10 ^{1,3)}	0.98 ± 0.07 ^{1,3)}	2.79 ± 0.18 ^{1,3)}
祛瘀	7.9	0.70 ± 0.09 ^{1,3)}	1.28 ± 0.06 ^{1,3)}	1.05 ± 0.14 ³⁾

表 5 复方愈疡散对各时段 Smad7 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 5 Effects of Fufang Yuyang San on Smad7 in wound tissue in rat ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Smad7/ $pg \cdot g^{-1}$		
		第 10 天	第 16 天	第 20 天
模型	-	287.67 ± 60.89	407.32 ± 81.48	543.41 ± 71.59
康复新	10.0	189.57 ± 43.25	293.40 ± 51.47	429.30 ± 78.84
复方愈疡散	13.0	488.96 ± 76.18 ^{1,3)}	578.25 ± 115.26 ^{1,3)}	776.81 ± 106.09 ^{1,3)}
补虚	5.1	258.09 ± 85.76	376.46 ± 87.49	461.43 ± 61.30
祛瘀	7.9	194.00 ± 55.32 ¹⁾	500.50 ± 106.99 ³⁾	770.13 ± 118.23 ^{1,3)}

TGF-β₁ 激活细胞内信号转导分子 Smad3 是其促进胶原合成的必由途径^[9-12]。Smad3 介导的信号途径在体内抑制创伤愈合,因为祛除 Smad3 可引起上皮化加速和伤口面积的缩小^[3-4,13-14]。Smad7 高表达能够抑制 Smad3 信号转导,抑制体内外纤维生成反应,从而减少 I, III 型胶原的合成,减轻瘢痕增生。现已经证明:在创面修复中 I, III 型胶原是基质的主要成分,2 种胶原在组织间质中的比例同形成的瘢痕质量密切相关^[15-17]。

传统中医学认为,慢性难愈性创面难以愈合之原因在“虚瘀并存,互为标本”,“虚瘀并存”则“腐肉难脱,新肉难生”。复方愈疡散是在“补虚祛瘀”指导思想下配伍组方,笔者为了验证“补虚祛瘀”这一指导思想,对复方愈疡散复方及其拆方(补虚方、祛瘀方)进行研究。在本实验所使用的复方愈疡散中,黄芪和当归能促进成纤维细胞增殖,促进胶原合成^[18-19]。通过对 3 个时间点创面组织中 I 型和 III 型胶原含量的检测,发现复方组的 I 型胶原含量一直维持在相对较低的水平,而 III 型胶原含量逐渐升高,说明在创面愈合后期复方愈疡散能够提高创面组织中 III 型胶原含量,同时能防止 I 型胶原过度增生,调节 I 型和 III 型胶原比例,从而达到改善瘢痕质量或者抑制瘢痕形成的目的,而补虚组和祛瘀组都不能达到这一作用。在实验中笔者还发现复方

愈疡散能够上调 Smad7 表达,从而阻断 TGF-β₁/Smad3 通路,降低 TGF-β₁ 以及 Smad3 在瘢痕组织中的表达,这可能是复方愈疡散能够抑制创面愈合后期瘢痕组织过度增生的作用机制。补虚组和祛瘀组虽然都能上调 Smad7 表达,但降低 TGF-β₁ 以及 Smad3 在瘢痕组织中的表达效果不及复方组。本实验从分子生物学领域证明了“补虚祛瘀”这一指导思想在治疗慢性难愈性创面的重要性。

[参考文献]

[1] 万滢聪,朱以香,韦义红.等. 溃愈速联合明胶海绵对大鼠难愈性创面愈合的作用及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1):63-65.

[2] 唐汉钧,张士云. 复黄生肌愈创油膏减少慢性皮肤溃疡瘢痕形成的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2001(8):26-28.

[3] Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced Smad signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing[J]. J Dermatol Sci, 2004, 35(2):83-92.

[4] Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, et al. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse mode [J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125(5):647-654.

[5] 孙立虹,梁玉磊,孙彦辉,等. 温和灸对大鼠慢性难

- 愈性创面组织巨噬细胞及胶原表达的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(4):259-265.
- [6] 李斌. 生肌化腐方对实验性大鼠创面肉芽组织成纤维细胞形态学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(11):45-47.
- [7] 陈君, 卓桑, 秦海洗. 复方愈疡散对糖尿病大鼠创面愈合影响的实验研究[J]. 广西中医药大学学报, 2013, 16(3):1-3.
- [8] 张子茜, 蒯飞, 郭树忠, 等. 创愈生肌散对糖尿病大鼠模型慢性创面的治疗作用研究[J]. 中国美容医学, 2012, 21(8):1334-1336.
- [9] Chen S J, Yuan W, Mori Y, et al. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad3 [J]. J Invest Dermatol, 1999, 112(1):49-57.
- [10] Rong H, Tang X M, Zhao Y, et al. Postsurgical intraperitoneal exposure to glorie powders modulates inflame mator andimmune-related cytokine production [J]. Wound Rep Reg, 1997, 5(1):89-96.
- [11] Border W A, Noble N A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis[J]. New Engl J Fed, 1993, 331(19):1286-1292.
- [12] 庞久玲, 马征, 刘军, 等. Smad3 和转化生长因子 β_1 在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕及正常皮肤中的表达:48:40:40 例标本病理检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(11):1927-1930.
- [13] Yang X, Letterio J J, Lechleider R J, et al. Targeted disruption of Smad3 results in impaired mucosal immunity and diministed T cell responsiveness to TGF-beta [J]. EMBO J, 1999, 18(5):1280-1291.
- [14] Yu H, Bock O, Bayat A, et al. Decreased expression of inhibitory Smad6 and Smad7 in keloid scarring [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006, 59(3):221-229.
- [15] Chandrakasan G, Rutaka J, Stern R. Hyaluronic acid stimulates collagen sysnthesis and type III collagen in cultures of human fibroblasts[J]. J Cell Biol, 1986(2):103-252.
- [16] Birkedal-Hansen H, Moore W G, Boddien M K, et al. Matrix metalloproteinase: a review [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1993, 4(2):197-250.
- [17] Gomez D E, Alonso D F, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation, and biological functions [J]. Eur J Cell Biol, 1997, 74(2):111-122.
- [18] 周倩, 肖正华. 糖尿病足截肢患者成纤维细胞生物学特性改变及黄芪多糖的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(3):185-188.
- [19] 王刚, 杜士明. 当归多糖对表皮细胞促创面愈合的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):150-153.

[责任编辑 聂淑琴]