

从 bFGF/Akt/Caspase 通路探讨生肌象皮膏促进糖尿病大鼠溃疡愈合的机制

石慧青¹, 李巧芬², 翟仰魁¹, 田翰林², 常柏^{1*}

(1. 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 卫生部激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300070; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:通过观察 2 型糖尿病 Sprague Dawley (SD) 大鼠溃疡创面肉芽组织中碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase, Akt), 半胱氨酸天冬氨酸酶-9 (cystein-aspartate protease-9, Caspase-9) 的表达, 探讨生肌象皮膏促进糖尿病大鼠溃疡愈合的作用机制。方法:制备 2 型糖尿病 SD 大鼠溃疡模型, 随机分为糖尿病生肌象皮膏组、糖尿病凡士林组、糖尿病生理盐水组, 正常组大鼠溃疡模型成模即为模型组。糖尿病生肌象皮膏组用生肌象皮膏纱条外敷, 糖尿病凡士林组用凡士林纱条外敷, 糖尿病生理盐水组和模型组用生理盐水纱条外敷伤口。各组分别于在造模后第 1, 3, 7, 14, 21 天观察创面愈合情况, 取溃疡创面肉芽组织备用。采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色法于光镜下观察创面肉芽组织形态学变化, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR), 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测创面中 bFGF 的表达, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定创面 p-Akt 含量, 免疫组织化学法检测创面中 Caspase-9 表达情况。结果:与糖尿病凡士林组、糖尿病生理盐水组比较, 生肌象皮膏显著上调了溃疡创面肉芽组织中 bFGF 表达水平 ($P < 0.05$), 增加了 p-AKT 的含量 ($P < 0.05$), 同时抑制了 Caspase-9 的表达 ($P < 0.05$)。结论:生肌象皮膏可通过 bFGF/Akt/Caspase 通路, 促进糖尿病难愈创面愈合。

[关键词] 生肌象皮膏; 糖尿病溃疡; bFGF/Akt/Caspase 通路

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R275.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0108-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040108

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1855.040.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 18:55

Mechanism of Shengji Xiangpi Mastic in Promoting Wound Healing in Rats with Diabetic Ulcer Through bFGF/Akt/Caspase Pathway

SHI Hui-qing¹, LI Qiao-fen², ZHAI Yang-kui¹, TIAN Han-lin², CHANG Bai^{1*}

(1. Key Laboratory of Hormones and Development Under Ministry of Health, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF), serine/threonine kinase (Akt) and cystein-aspartate protease-9 (Caspase-9) in diabetic rat ulcer granulation tissues, in

[收稿日期] 20170802(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373846, 81473622); 卫生部激素与发育重点实验室 & 天津市代谢性疾病重点实验室开放课题项目(2016DX02)

[第一作者] 石慧青, 在读硕士, 从事中西医结合防治糖尿病及其并发症的基础与临床研究, E-mail: shihuiqing1989@126.com

[通信作者] * 常柏, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治糖尿病及其并发症的基础与临床研究, Tel: 022-23333202, E-mail: changbai1972@126.com

order to investigate the mechanism of Shengji Xiangpi mastic in promoting the ulcer healing in diabetic rats. **Method:** The ulcer model of type 2 diabetic SD rats was established, and randomly divided into normal saline group, vaseline group and Shengji Xiangpi mastic group. The ulcer model of normal rats was set up as the blank control group. The rats in Shengji Xiangpi mastic group were applied with Shengji Xiangpi mastic and covered with gauze, those in vaseline group were applied with vaseline and covered with gauze, and those in normal saline group and blank control group were treated with physiological saline. The wound healing conditions in each group were observed on 1, 3, 7, 14, 21 d after modeling, and ulcer tissues were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the morphological changes in wound granulation tissues. Real-time PCR and Western blot were used to analyze the expression of bFGF, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze the expression of p-Akt, and immunohistochemistry was used to analyze the expression of Caspase-9. **Result:** Compared with vaseline group and saline group, Shengji Xiangpi mastic significantly up-regulated bFGF expression in ulcer granulation tissues of diabetic rats, increased p-Akt content, and inhibited the expression of Caspase-9. **Conclusion:** Shengji Xiangpi mastic can promote ulcer healing in diabetic rats through bFGF/Akt/Caspase pathway.

[**Key words**] Shengji Xiangpi mastic; diabetic ulcer; bFGF/Akt/Caspase pathway

糖尿病足病,是糖尿病最严重并且医治费用最高的慢性并发症之一。糖尿病患者中,糖尿病足的发病率高达 49.5%,严重者可导致截肢,甚至危及患者生命^[1],大约 85%的截肢是因为糖尿病足溃疡导致的^[2]。目前溃疡创面的治疗主要以外用或全身系统应用广谱抗生素及手术和中药制剂为主,部分难愈创面患者往往拒绝手术等治疗手段。但是,非手术治疗如物理治疗、皮肤组织工程、骨髓间充质干细胞等方法尚未完全成熟,因此寻找一种更有效的方法治疗难愈溃疡创面被医学界广泛关注。创面愈合过程需要多种细胞及细胞因子共同调节。目前研究较深入的是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径,两面神激酶-信号传导及转录激活因子(Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription, Jak/STAT)途径,和磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, Akt)途径^[3-4]。课题组既往研究表明,生肌象皮膏在糖尿病溃疡治疗过程中,可以显著缩短溃疡创面的愈合时间,取得了良好的临床疗效^[5]。其机制可能与生肌象皮膏促进胰岛素样生长因子-1,肿瘤坏死因子- α ,白细胞介素-2 等的表达有关^[6-7]。为进一步证实生肌象皮膏对糖尿病溃疡愈合的作用机制,本实验以 2 型糖尿病 Sprague Dawley (SD) 大鼠溃疡模型为研究对象,通过检测碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), Akt, 半胱氨酸天冬氨酸酶-9(cystein-aspartate protease, Caspase-9) 的表达,从 bFGF/Akt/

Caspase 通路,探讨生肌象皮膏促进糖尿病溃疡愈合的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠,普通级,28 d 龄,体重(102.83 \pm 4.10) g,购于北京维通利华实验动物技术有限责任公司,合格证号 SCXK(京)2014-0001。本研究经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准,所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物 生肌象皮膏(天津中医药第一附属医院,津药制字 Z20070742);凡士林(山东利尔康消毒科技股份有限公司,型号利尔康/480);生理盐水(杭州民生药业有限公司,国药准字 H33021575)。

1.3 试剂及仪器 链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 S0130);兔碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)-抗体,鼠 β -肌动蛋白(β -actin)-抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 Ab8880, Ab6276);超纯 RNA 提取试剂,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(宝生物工程大连有限责任公司,批号分别为 D9108B, DRR420A);引物序列为 bFGF 上游 5'-TCCATCAAGGGAGTGTGTGC-3',下游 5'-TCCGTGACCGGTAAGTGTTC-3', 139 bp;内参基因引物 β -actin 上游 5'-ACTCTGTGTGGATTGGTGGC-3',下游 5'-AGAAAGGGTGTAACCGCAGC-3', 155 bp,以上引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。大鼠 Akt 蛋白酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海奥陆生物科技有限公司,批号 F6501-A)。ABI7500 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪

(Applied Biosystems 公司); NANODROP 2000 型离心机(Eppendorf 公司); DYCZ-24F 型电泳仪, DYCZ-20A 型转移电泳槽, WD-9413 型凝胶成像系统(北京六一仪器厂); BX51T-PHD-J11 型显微镜(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 造模和分组 健康雄性 SD 大鼠 120 只,按体重随机分成两组,正常组 20 只,糖尿病组 100 只。正常组大鼠应用普通饲料喂养,糖尿病组大鼠应用高脂饲料喂养。8 周后,糖尿病组应用 1% STZ, 30 mg·kg⁻¹ 经尾静脉注射,制备 2 型糖尿病大鼠模型^[8](除去死亡及不成模大鼠)。成模后,使用直径 2.5 cm 的打孔器在大鼠背部打孔,溃疡深及筋膜层,制备大鼠溃疡模型。随机将 2 型糖尿病溃疡大鼠分为 3 组,糖尿病生肌象皮膏组(A 组),糖尿病凡士林组(B 组),糖尿病生理盐水组(C 组)。正常组大鼠溃疡成模为模型组(D 组)。

2.2 给药和取材 4 组大鼠,分别采取单笼喂养,自由饮食,每日更换垫料 2 次,每日换药 1 次,祛除创口硬痂,使用常规酒精消毒。A 组大鼠应用生肌象皮膏纱条外敷,B 组大鼠应用凡士林纱条外敷,C 组和 D 组大鼠应用生理盐水纱条外敷。分别在成模后第 1,3,7,14,21 天观察创面愈合情况,并处死大鼠,取溃疡创面肉芽组织,液氮冷藏保存备用。

2.3 光镜下观察肉芽组织情况 将经 10% 甲醛固定的创面肉芽组织标本经乙醇脱水,然后应用二甲苯透明,脱蜡,包埋,切片,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,在光镜下观察第 1,3,7,21 天不同组间溃疡创面肉芽组织情况。

2.4 Real-time PCR 技术检测大鼠溃疡肉芽组织 bFGF mRNA 的表达 用超纯 RNA 提取试剂盒提取大鼠溃疡肉芽组织样本总 RNA,用反转录试剂盒进行反转录,成为 cDNA,进行扩增。扩增程序为 95 °C 30 s,之后 95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环扩增完毕后,在 60 ~ 95 °C 条件进行溶解曲线分析。根据 Real-time PCR 原始检测结果,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量计算公式,计算各样品组织中 bFGF mRNA 的相对表达量。

2.5 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测大鼠溃疡肉芽组织 bFGF 蛋白的表达 用 SDS 裂解大鼠溃疡肉芽组织,提取总蛋白;用考马斯亮蓝法测定各组大鼠溃疡肉芽组织样本蛋白含量;电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,半干转膜后封闭;加入一抗(IGF-1

1:300, β -actin 1:1 000)中,4 °C 封闭过夜;洗涤后加入二抗(1:3 000),室温、避光孵育 1 h;洗膜,曝光,显影,应用 Image J 分析灰度值。

2.6 ELISA 检测大鼠溃疡肉芽组织中 p-Akt 的含量 使用纯化大鼠 p-Akt 抗体包被微孔板,制成固相抗体,然后加入 p-Akt 蛋白,用辣根过氧化物酶标记,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,洗涤后加底物显色。用酶标仪,在 450 nm 波长下测定吸光度 A,计算样品中大鼠 p-Akt 的浓度。

2.7 免疫组织化学法检测大鼠溃疡肉芽组织中 Caspase-9 的表达 取样本组织,将组织制作成切片,经过脱蜡、水化、修复后,加一抗(1:200),4 °C 过夜,洗涤后加二抗(1:2 000),37 °C 孵育 20 min,再洗涤后加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 20 min,经 DAB 显色,苏木精染核,封片。显微镜观察,进行图像分析。

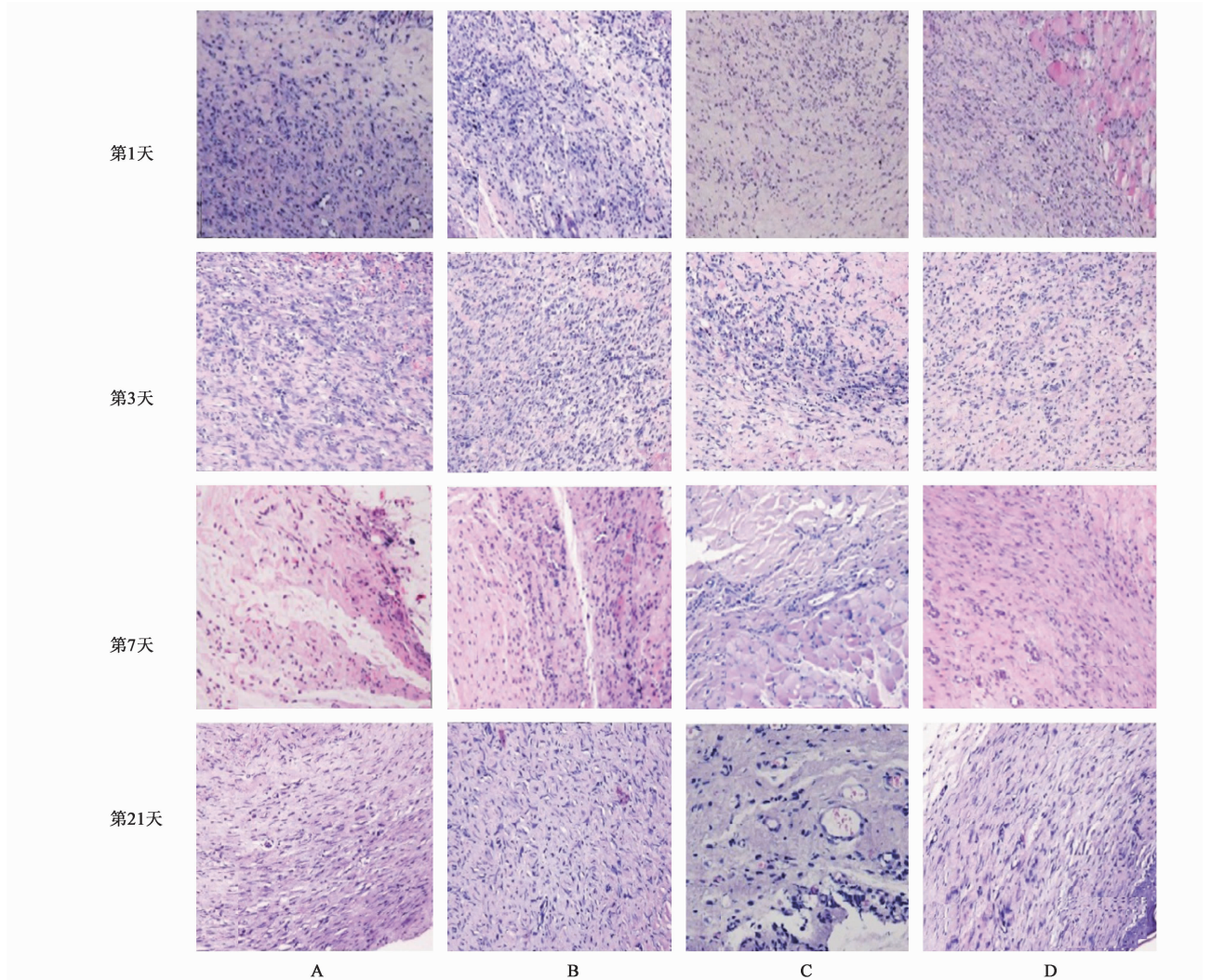
2.8 统计学方法 所有数据均运用 SPSS 21.0 进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 one-way ANOVA 方差分析,组间方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dunnett's T3 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织病理改变的影响 创面组织 HE 染色光镜下示,溃疡模型建立后第 1 天,4 组视野内均有急慢性炎症细胞浸润;模型组可见新生毛细血管、成纤维细胞和较多急慢性炎症细胞;糖尿病生肌象皮膏组、糖尿病凡士林组、糖尿病生理盐水组未见明显新生血管及成纤维细胞。第 3 天,模型组新生毛细血管、成纤维细胞明显增多;糖尿病生肌象皮膏组可见新生毛细血管、炎症细胞、成纤维细胞;糖尿病凡士林组可见炎症细胞、成纤维细胞;糖尿病生理盐水组有较多急慢性炎细胞浸润,新生血管不明显。第 7 天,模型组新生血管、成纤维细胞、炎症细胞较前减少,纤维细胞增多明显;糖尿病生肌象皮膏组可见新生小动静脉,纤维细胞增多;糖尿病凡士林组新生血管少,成纤维细胞少,纤维细胞多;糖尿病生理盐水组炎症细胞浸润较多,新生血管亦不明显。第 21 天,糖尿病生肌象皮膏组纤维细胞明显,可见大量胶原纤维,表皮增厚,细胞排列较整齐;糖尿病凡士林组可见纤维细胞,淋巴细胞,小血管及菲薄表皮;糖尿病生理盐水组仍见较多成纤维细胞及炎性细胞,可见较多新生毛细血管,细胞排列紊乱。结果表明,与模型组相比,糖尿病组

创面炎症反应慢,且持续时间长;糖尿病生肌象皮膏组肉芽组织成熟速度较糖尿病生理盐水组、糖尿病凡士林组为快,在各干预组中效果最佳,新生

血管、成纤维细胞出现早,数量多,为胶原纤维、弹性纤维、网状纤维等创口修复物质的积累、辅助创面修复。见图 1。



A. 糖尿病生肌象皮膏组;B. 糖尿病凡士林组;C. 糖尿病生理盐水组;D. 模型组(图 2 同)

图 1 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织病理学的影响(HE, × 100)

Fig. 1 Effect of Shengji Xiangpi Mastic on pathology of wound granulation tissue(HE, × 100)

3.2 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织 bFGF mRNA 和 bFGF 蛋白表达的影响 创伤后各组大鼠溃疡肉芽组织中 bFGF mRNA 和 bFGF 蛋白表达方面,糖尿病生肌象皮膏组第 3,7 天表达增加达高

峰,且高于糖尿病生理盐水组及糖尿病凡士林组 ($P < 0.05$);糖尿病生肌象皮膏组与模型组表达趋势一致,于第 3,7 天达高峰,然后逐渐下降。见表 1,2,图 2。

表 1 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 bFGF mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Shengji Xiangpi mastic on expression of bFGF mRNA($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g/敷料)	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
模型	-	1.00 ± 0.09	1.60 ± 0.11	1.55 ± 0.02	1.43 ± 0.04	1.26 ± 0.06
糖尿病生肌象皮膏	2	1.00 ± 0.08	1.46 ± 0.08 ^{2,3)}	1.51 ± 0.11 ^{2,3)}	1.36 ± 0.10	1.29 ± 0.02
糖尿病凡士林	2	0.96 ± 0.08	1.17 ± 0.08	1.36 ± 0.08	1.48 ± 0.05	1.51 ± 0.08
糖尿病生理盐水	-	0.96 ± 0.07	1.19 ± 0.07	1.33 ± 0.09	1.33 ± 0.07	1.53 ± 0.06

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与糖尿病生理盐水组比较²⁾ $P < 0.05$;与糖尿病凡士林组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

表 2 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 bFGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Shengji Xiangpi mastic on protein levels of bFGF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g/敷料)	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
模型	-	0.73 ± 0.02	1.11 ± 0.1	1.43 ± 0.02	1.20 ± 0.02	0.71 ± 0.24
糖尿病生肌象皮膏	2	0.65 ± 0.10	1.12 ± 0.21 ^{2,3)}	1.24 ± 0.05 ^{2,3)}	1.10 ± 0.13 ^{2,3)}	1.08 ± 0.07
糖尿病凡士林	2	0.63 ± 0.04	0.71 ± 0.05	0.99 ± 0.09	0.88 ± 0.16	0.90 ± 0.13
糖尿病生理盐水	-	0.64 ± 0.04	0.73 ± 0.06	0.80 ± 0.05	0.94 ± 0.08	0.74 ± 0.13

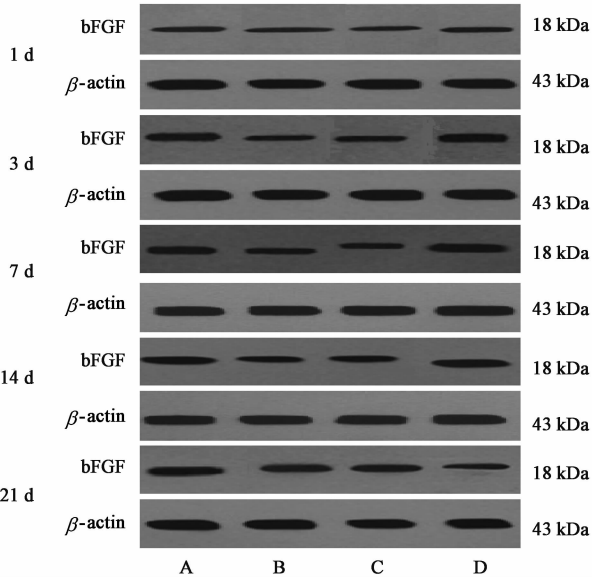


图 2 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 bFGF 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Shengji Xiangpi mastic on protein levels of bFGF

表 3 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 p-Akt 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Shengji Xiangpi mastic on p-Akt content ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/敷料)	n	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
模型	-	20	49.21 ± 5.35	62.17 ± 4.11	57.60 ± 1.85	45.21 ± 2.67	43.24 ± 3.47
糖尿病生肌象皮膏	2	22	41.02 ± 0.67 ¹⁾	61.39 ± 1.87 ^{2,3)}	56.69 ± 2.03 ^{2,3)}	46.12 ± 2.28 ^{2,3)}	43.61 ± 0.57
糖尿病凡士林	2	23	40.97 ± 1.81 ¹⁾	54.31 ± 2.60	46.21 ± 1.85	40.00 ± 2.76	37.87 ± 3.96
糖尿病生理盐水	-	22	40.84 ± 2.85 ¹⁾	53.05 ± 1.88	48.84 ± 0.72	39.30 ± 1.85	34.09 ± 2.50

表 4 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 Caspase-9 阳性细胞率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Shengji Xiangpi mastic on positive cell rate of Caspase-9 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/敷料)	n	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
模型	-	20	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03
糖尿病生肌象皮膏	2	22	0.24 ± 0.03 ¹⁾	0.35 ± 0.07 ^{2,3)}	0.26 ± 0.05 ^{2,3)}	0.24 ± 0.03 ^{2,3)}	0.23 ± 0.05 ^{2,3)}
糖尿病凡士林	2	23	0.29 ± 0.04 ¹⁾	0.38 ± 0.06	0.32 ± 0.08	0.31 ± 0.07	0.28 ± 0.04
糖尿病生理盐水	-	22	0.27 ± 0.04 ¹⁾	0.39 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.07

4 讨论

糖尿病溃疡,是典型的慢性创面,是糖尿病足常见且比较棘手的一种并发症^[9]。糖尿病慢性创面的形成包括诸多因素,其中内在因素如神经病变、血

管问题等,外在因素如创面感染、局部受压、胼胝体形成等^[10]。慢性创面的愈合是新生肉芽组织形成和再上皮化共同作用的结果,其中关键的过程是细胞的增殖和迁移。

3.3 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织 p-Akt 含量的影响 创伤后各组大鼠溃疡肉芽组织 p-Akt 含量都出现先增加后下降的趋势,并均于第 3 天达高峰,之后开始逐渐下降至创伤前状态。糖尿病组大鼠创面第 1 天, p-Akt 表达水平低于模型组大鼠 ($P < 0.05$); 创伤后第 3, 7, 14 天, 糖尿病生肌象皮膏组 p-Akt 表达较糖尿病生理盐水组, 糖尿病凡士林组明显增加 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 Caspase-9 表达的影响 与模型组大鼠相比, 糖尿病组大鼠创伤后 Caspase-9 阳性细胞率增加 ($P < 0.05$); 与糖尿病生理盐水组, 糖尿病凡士林组相比, 糖尿病生肌象皮膏组第 3, 7, 14, 21 天 Caspase-9 阳性细胞率减少 ($P < 0.05$), 但与模型组无差异, 见表 4。

创面愈合的过程需要多种细胞及细胞因子共同参与调节。目前,对参与调节细胞增殖、分化研究较深入的是 MAPK 和 Jak/STAT 途径。近年来,又发现另一个与细胞生长密切相关的信号途径,即 PI3K/Akt 信号通路,该信号通路在调节细胞生长、增殖、凋亡方面具有重要作用^[4]。PI3K/Akt 通路,在建立细胞极性、细胞迁移速度方面,都具有非常重要的作用,各种细胞的迁移都需要 PI3K/Akt 通路的调控,其中也包括成纤维细胞^[11-12]。PI3K/Akt 通路的激活还可以促进肥大细胞和内皮细胞迁移。而 bFGF 作为一种参与血管新生的重要生长因子,通过与受体结合后,可激活下游的 PI3K/Akt 通路,在调节细胞生长、代谢、生存、增殖和迁移等过程中发挥着重要的作用^[13]。

笔者在实验中发现,创伤后糖尿病各组大鼠创面组织中 bFGF 的表达,各时段总体水平低于模型组,创面愈合不良,而糖尿病生肌象皮膏组 bFGF 表达量较糖尿病生理盐水组及糖尿病凡士林组相比增加,且第 3,7 天达高峰。结果表明,糖尿病会影响 bFGF 表达活性,而生肌象皮膏可促进糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中 bFGF 的表达。bFGF 可直接作用于其靶细胞,即成纤维细胞上的特异性受体,通过促有丝分裂反应,使成纤维细胞分裂、增殖,起到促进创面愈合的作用。

bFGF 可通过与其特异的、具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体结合,然后通过多条信号转导通路,参与调节细胞的生长、增殖和分化。成纤维细胞生长因子受体(FGFRs)是一个蛋白质家族,其中 FGFR1 是 bFGF 的高亲和力受体。Akt 作为 PI3K/Akt 通路的下游靶蛋白,是 PI3K/Akt 信号转导通路的核心^[14]。研究表明 bFGF 可通过活化 PI3K,进一步激活 Akt,活化后的 Akt 转移到细胞质或细胞核内,进一步活化下游的靶点,进而调节细胞的生长、增殖与分化,从而达到促进血管新生的作用^[15-16]。本实验结果中可看到,生肌象皮膏在促进创面肉芽组织中 bFGF 表达的同时,可上调 p-Akt 基因表达。由此,笔者初步判断生肌象皮膏可能通过提高 bFGF 的含量,激活 PI3K/Akt 信号通路,促进成纤维细胞、内皮细胞的增殖和迁移,从而促进血管新生,加快创面愈合。

另一方面,bFGF 促进细胞内 Akt 蛋白的磷酸化后,活化的 Akt 能直接抑制 Caspase-9 的活性。本实验结果中可发现,生肌象皮膏上调创面肉芽组织 p-Akt 表达的同时,抑制了 Caspase-9 的表达。Caspase-9 是细胞凋亡的启动者,同时也是效应者。

Akt 可使 Caspase-9 的 ser196 位点磷酸化,失去活性,进而中断下游信号,抑制 Caspase-9 的促凋亡作用^[17]。Sangawa 等^[18]研究发现,活化的 Akt 可进一步磷酸化 Caspase-9,且 Caspase-9 的磷酸化水平与 p-Akt 成正相关,表明 Caspase-9 的活性受 PI3K/Akt 通路的调控。因此,笔者推断生肌象皮膏可通过 bFGF/Akt/Caspase 途径,抑制 Caspase-9 促凋亡作用,抑制 Caspase 家族蛋白瀑布级联反应,减少细胞凋亡。

生肌象皮膏出自古代名医张寿颐的《疡科纲要》,由象皮粉、当归、血余炭、龟甲、地黄、炉甘石、石膏、香油、白蜡组成,全方具有生肌长皮、活血养血之功效,是“假脓长肉”的代表方剂。《医宗必读》述其为“合金疮之要药,长肌肉之神丹”。溃疡愈合是一个复杂过程,涉及多种细胞及生长因子。而糖尿病患者体内生长因子的减少会导致血管新生障碍。通过本实验对 2 型糖尿病溃疡大鼠创面组织中 bFGF, Akt, Caspase-9 表达量的分析,笔者提出,生肌象皮膏可上调 bFGF 表达,进而通过 bFGF/Akt/Caspase 通路,促进成纤维细胞、内皮细胞的增殖、迁移,从而达到促进糖尿病溃疡创面血管新生的效果;同时通过活化的 Akt 抑制 Caspase-9 的表达,抑制 Caspase 家族蛋白瀑布级联反应,减少细胞凋亡,共同促进糖尿病难愈创面愈合。

[参考文献]

- [1] Leone S, Pascale R, Vitale M, et al. Epidemiology of diabetic foot [J]. Infez Med, 2012, 20 (Suppl 1): 8-13.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30 (10): 26-89.
- [3] Inamura K, Matsuzaki Y, Uematsu N, et al. Rapid inhibition of MAPK signaling and anti-proliferation effect via JAK/STAT signaling by interferon- α in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. Bba-Mol Cell Res, 2005, 1745(3): 401-410.
- [4] Agarwal E, Brattain M G, Chowdhury S. Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer [J]. Cell Signal, 2013, 25(8): 1711-1719.
- [5] 李巧芬, 常柏, 李晓军, 等. 生肌象皮膏对糖尿病大鼠难治性溃疡愈合速度的影响 [J]. 中国现代医生, 2008, 46(5): 96-97.
- [6] 李巧芬, 李春深, 李云平, 等. 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡肉芽组织中白介素-2 与肿瘤坏死因子- α 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18):

- 279-282.
- [7] 李巧芬, 常柏. 生肌象皮膏对 2 型糖尿病大鼠溃疡肉芽组织的胰岛素样生长因子-1 及受体的影响[J]. 天津中医药, 2012, 29(6): 570-572.
- [8] 宋绍华, 何黎升, 金岩, 等. 猪糖尿病皮肤溃疡模型建立的实验研究[J]. 中国组织工程研究, 2004, 8(36): 8217-8219.
- [9] 关小宏, 李宝军, 肖黎, 等. 糖尿病足流行病学及糖尿病足截肢(趾)的临床情况分析[J]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2012, 7(4): 406-408.
- [10] Goldberg S R, Diegelmann R F. Wound healing primer [J]. Surg Clin N Am, 2010, 90(6): 1133-1146.
- [11] Sasaki A T, Chun C, Takeda K, et al. Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement[J]. J Cell Biol, 2004, 167(3): 505-518.
- [12] Sepe L, Ferrari M C, Cantarella C, et al. Ras activated ERK and PI3K pathways differentially affect directional movement of cultured fibroblasts [J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(1): 123-142.
- [13] 林敏, 李平, 钱其军. bFGF 激活 PI3K 信号通路调控大鼠胚胎干细胞自我更新[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(5): 550-556.
- [14] 朱金墙, 宋宛珊, 马妍, 等. PI3K/Akt 信号通路与管理性痴呆的关系及中药干预作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 223-229.
- [15] Almhanna K, Strosberg J, Malafa M. Targeting Akt protein kinase in gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2011, 31(12): 4387-4392.
- [16] WANG Z G, WANG Y, YE J M, et al. bFGF attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury on myocardial ischaemia/reperfusion *via* activation of PI3K/Akt/ERK1/2 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(3): 595-607.
- [17] Walther S, Awad S, Lonchyna V A, et al. NFAT transcription factor regulation by urocortin II in cardiac myocytes and heart failure[J]. Am J Physiol-Heart C, 2014, 306(6): H856-H866.
- [18] Sangawa A, Shintani M, Yamao N, et al. Phosphorylation status of Akt and Caspase-9 in gastric and colorectal carcinomas [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(6): 3312-3317.

[责任编辑 邹晓翠]