

## 金鸡毛草水提物对糖尿病足模型大鼠的作用

乐瞰<sup>1,2</sup>, 王蕾<sup>2</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 舒朝林<sup>2</sup>, 牟华明<sup>2\*</sup>

(1. 川北医学院, 四川 南充 637000; 2. 重庆三峡中心医院, 重庆 404000)

**[摘要]** 目的:探讨金鸡毛草水提物对糖尿病足(DF)模型大鼠足部创伤的治疗作用,并探讨其可能的作用机制。方法:80 只 SD 大鼠,随机选取 8 只作为正常组,其余大鼠高脂高糖饲料联合腹腔小剂量链脲佐菌素(STZ)的方法建立糖尿病模型大鼠,再行下肢血管结扎及足部手术,建立 DF 大鼠模型。模型大鼠随机分为 5 组,分别为模型组,二甲双胍组( $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),金鸡毛草水提物高、中、低剂量( $16, 8, 4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组。分别于给药第 1, 4, 7, 14, 21 天对大鼠进行创面拍照观察溃疡愈合情况,治疗 28 d 后对缺血下肢进行免疫组织化学法观察大鼠缺血下肢肌肉组织血管新生情况,酶联免疫吸附法(ELISA)法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1), C 反应蛋白(CRP), 白细胞介素-6(IL-6), 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 内皮素-1(ET-1), 血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>), 硝酸还原法测定一氧化氮(NO), 一氧化氮合酶(NOS);实时荧光定量-聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹(Western blot)法测定缺血下肢肌肉组织中血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 和蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠足部创面愈合延迟,金鸡毛草水提物治疗组创面愈合优于模型组;与正常组比较,模型组大鼠微血管新生情况、血清 NO, NOS 水平及缺血组织 VEGF mRNA 和蛋白表达均下降,金鸡毛草水提物高、中、低剂量组均明显升高血清 NO, NOS 水平及缺血组织 VEGF mRNA 和蛋白表达( $P < 0.05, P < 0.01$ );与正常组比较,模型组 ICAM-1, CRP, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ET-1, TXA<sub>2</sub> 水平显著增高( $P < 0.01$ ),金鸡毛草水提物高、中、低剂量组均明显降低 ICAM-1, CRP, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ET-1, TXA<sub>2</sub> 水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:金鸡毛草水提物可促进 DF 大鼠足背创面愈合,其机制可能与其抑制炎症,调节血管内皮功能,提高下肢缺血组织 VEGF 表达,促进血管新生改善下肢血供有关。

**[关键词]** 金鸡毛草水提物; 糖尿病足; 炎症因子; 内皮功能障碍; 血管内皮生长因子(VEGF)

**[中图分类号]** R22; R24; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0134-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.20180825

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1545.024.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-25 9:16

### Effect of *Gynura divaricata* Aqueous Extract in Diabetic Foot Model Rats

YUE Tun<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, SHU Chao-lin<sup>2</sup>, MOU Hua-ming<sup>2\*</sup>

(1. North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;

2. Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of *Gynura divaricata* aqueous extract on foot injury in diabetic foot (DF) model rats, and explore its possible mechanism. **Method:** A total of 80 SD rats were included in the study. Among them, 8 rats were randomly selected as control group, while the other rats were given with high-fat and glucose feed and intraperitoneally injected with low-dose streptozotocin (STZ) to establish the rat model of diabetes; then, the model of DF was established by ligating their lower extremity vascular and making foot surgery. The model rats ( $n = 40$ ) were randomly divided into model group, metformin group ( $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and *Gynura divaricata* aqueous extract groups ( $16, 8, 4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The healing of ulcer were observed on day 1, 4, 7, 14, 21. After 28 days, the immunohistochemical method was used to observe the angiogenesis of the ischemic lower

**[收稿日期]** 20171124(012)

**[基金项目]** 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(一般)(cstc2016shmszx130074);重庆市卫计委中医药科技项目(ZY201703065)

**[第一作者]** 乐瞰,在读硕士,医师,从事心血管病方向研究, Tel:0235-8131119, E-mail: yuetun\_happy@163.com

**[通信作者]** \* 牟华明, 博士, 主任医师, 从事心血管病方向研究, Tel:0235-8131119, E-mail: mouhm2002@aliyun.com

limb muscles. The content of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), endothelin-1 (ET-1) and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) were determined by ELISA, and NO and nitric oxide synthase (NOS) content were determined by nitric acid reduction method. Real-time PCR and Western blot were used to determine vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA and protein expressions in ischemic lower limb muscles. **Result:** Compared with the normal group, the wound healing in the model group was delayed, while that of the *G. divaricata* aqueous extract group; Compared with the normal group, the microangiogenesis, serum NO and NOS levels, and VEGF mRNA and protein expressions in the model group decreased, whereas serum NO and NOS levels, and VEGF mRNA and protein expressions in the *G. divaricata* aqueous extract groups increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); compared with the normal group, ICAM-1, CRP, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ET-1, TXA<sub>2</sub> levels in the model group significantly increased ( $P < 0.01$ ), while those in the *G. divaricata* aqueous extract groups decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *G. divaricata* aqueous extract could promote the foot wound healing of DF model rats, and its mechanism may be related to the inhibition of inflammation, the regulation of vascular endothelial function, the increase in the expression of VEGF, the promotion of the angiogenesis in ischemic tissues, and the improvement of the blood supply of the lower extremity.

[**Key words**] *Gynura divaricata* aqueous extract; diabetic foot (DF); inflammatory factor; endothelial dysfunction; vascular endothelial growth factor (VEGF)

糖尿病足(DF)是糖尿病慢性并发症之一,病程长,治疗效果差,其难愈合性以及截肢风险仍是临床面临的重大难题,其发病重要原因是下肢神经系统异常及深部组织感染和破溃,以及外周血管疾病共同作用的结果<sup>[1]</sup>。传统中草药治疗糖尿病历史悠久,金鸡毛草作为一种传统中草药,又名背白三七、白子菜、富贵草等,菊科土三七属植物,为多年生草本,其性凉,味甘,有清热解毒、舒筋接骨、凉血止血、散瘀消肿之功效,常用于治疗糖尿病、高血压、风湿热、百日咳、臃痈疮疖等疾病<sup>[2-3]</sup>,其含有丰富的黄酮、多糖等多种活性物质,具有降血糖、降血脂、抗血管动脉粥样硬化等作用<sup>[4-5]</sup>,本课题组前期实验也证实金鸡毛草可降低血糖,改善脂代谢紊乱、抗氧化应激及抗动脉粥样硬化,但目前研究治疗糖尿病足的报道尚少,在此基础上,本实验采用高脂高糖饲料联合小剂量链脲佐菌素(STZ)加上下肢血管及足部手术复制糖尿病足模型,研究金鸡毛草对糖尿病足的治疗作用,旨在为临床提供更好的实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 选取 SPF 级 SD 雄性大鼠 80 只,体重(80 ± 10) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(渝)2012-0001,伦理编号 2017-19(科),涉及动物实验均符合动物伦理委员会要求,所有大鼠均在重庆医科大学动物实验中心饲养(SPF 级屏障系统)。

**1.2 药物及试剂** 本实验药材金鸡毛草由重庆医

科大学董志教授及三峡中心医院中医科郑邦本教授鉴定为菊科植物金鸡毛草 *Gynura divaricata* 地上部分。以 10 倍量水提取 2 次,每次 2 h 过滤,合并滤液,醇沉,浓缩至含生药 2.0 g·mL<sup>-1</sup> 浸膏,保存至 4 °C 冰箱备;盐酸二甲双胍片(天方药业有限公司,批号 161209123)。STZ(美国 Sigma 公司,批号 10120791),一氧化氮(NO),一氧化氮合酶(NOS)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A012, A014-2);白细胞介素-6(IL-6),IL-1 $\beta$ ,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(欣博盛科技有限公司,批号分别为 R170220-007a, R170220-003a, R170220-102a);细胞间黏附分子-1(ICAM-1),C 反应蛋白(CRP),内皮素-1(ET-1),血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)ELISA 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司,批号均为 201702);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026);TIANScript RT KIT, SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(天根生物科技有限公司,批号分别为 KR104-02, FP205);一抗血管内皮生长因子(VEGF,武汉博士德有限公司,批号 BA0407),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号 BS-0061R)。

**1.3 仪器** GM300 型瑞特血糖仪(华广生技股份有限公司)及配套血糖试纸;400c 型低速医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司);1510 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);UV-5200PC 型紫外可见

分光光度计(上海元析仪器有限公司);1-14ED 型切片机(德国 Thermo Electron 公司);QL-902 型涡旋震荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),SLAN8.0 型荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗科技有限公司),Power Pac Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

**1.4 饲料** 高脂高糖饲料(配方:10%猪油,20%蔗糖,2.5%蛋黄,67.5%基础饲料)、普通饲料均由北京市科澳协力饲料有限公司提供。

## 2 方法

**2.1 动物模型的建立** 实验用动物选取 80 只,大鼠适应性喂养 3 d,自由进食、自由进水。随机分组选取 8 只大鼠作为正常组,给予普通饲料喂养,其余 72 只大鼠予以高脂高糖饲料喂养 4 周后禁食不禁水 12 h,按 40 mg·kg<sup>-1</sup>剂量一次性腹腔注射 1% STZ 液(用 pH 4.2~4.5 柠檬酸缓冲液低温、避光配置,现配现用,30 min 内使用完),正常组给予等剂量柠檬酸缓冲液腹腔注射。3 d 后,大鼠尾静脉采血,测空腹血糖 ≥16.7 mmol·L<sup>-1</sup>,出现多饮、多食、多尿的大鼠为糖尿病大鼠<sup>[6-7]</sup>。用 3% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉大鼠,常规无菌消毒行右侧腹股沟处切开,分离股动脉、旋髂浅动脉,在分出旋髂浅动脉、隐动脉之前结扎股动脉<sup>[8]</sup>,并使用印章在对应足背做矩形标记(3 mm×7 mm),去掉矩形标记的全层皮肤,制备下肢缺血的糖尿病足模型<sup>[9]</sup>。正常组用同法施行足部手术。

**2.2 分组与给药** 选取成功造模的 40 只大鼠随机分为模型组,金鸡毛草水提物 16,8,4 g·kg<sup>-1</sup>和二甲双胍 0.2 g·kg<sup>-1</sup>组,每组 8 只,术后第 1 天开始给药,正常组及模型组分别予以等体积生理盐水灌胃,每天给药 1 次,并于第 1,4,7,14,21 天对大鼠足部创面进行照相,计算创口面积。灌胃 28 d 后禁食不禁水 12 h,3% 戊巴比妥钠溶液麻醉,颈总动脉插管采血,收集标本,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,留取血清备检。

**2.3 创面愈合情况观察** 每天观察创面愈合情况,以完全上皮覆盖创面作为愈合标准,给药第 1,4,7,14,21 对大鼠溃疡创面照相,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定溃疡创面面积,按公式计算:

$$\text{创面愈合率} = [(\text{原始创面面积} - \text{未愈合创面面积}) / \text{原始创面面积}] \times 100\%$$

**2.4 血清中血管内皮功能相关因子检测** 取血清,硝酸还原法按实际盒说明书在紫外分光光度计 550 nm 测吸光度 A 并计算 NO 浓度,按试剂盒说明书在 530 nm 测 A 并计算 NOS 浓度,ELISA 法按试

剂盒说明书测血清 ET, TXA<sub>2</sub> 的含量。

**2.5 血清中炎症因子的检测** 取血清 ELSIA 法按试剂盒说明书测定血清中 ICAM-1, CRP, IL-1, IL-6, TNF-α 的含量。

**2.6 大鼠缺血肢体 VEGF mRNA 和蛋白表达及新生毛细血管数的测定** 取缺血下肢局部肌肉组织,一部分置于 10% 甲醛溶液固定,脱水后石蜡包埋切片,作免疫组化测定,检测缺血肢体肌肉的微血管新生情况,血管内皮呈棕黄色为阳性。一部分洗净称质量, mRNA later 液中置于 -80 ℃ 冰箱保存,利用实时荧光定量酶聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 VEGF 的表达含量,取大鼠缺血肌肉组织 0.15 g,用 trizol 提取组织样本中总的 RNA,逆转录 cDNA 进行 Real-time PCR,引物长度 89 bp,引物序列上游 5'-GCTGCTGCAATGATGAA-3' 下游 5'-GCTTTGGTGA GGTTCAT-3'; GAPDH 序列片段长度 191 bp,上游 5'-TATGTGCTGGAGTCTACTGGCGTCT-3',下游 5'-AAGCAGTTGCTGCTGCAGGATG-3'。总体系 20 μL, PCR 扩增条件为 95 ℃ 变性 15 min, 95 ℃ 退火 10 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s 进行延伸,共 40 个循环。每个基因设 3 复孔。目的基因 mRNA 定量按照 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 相对定量计算公式计算相对定量结果,以 GAPDH 作为内参。取大鼠缺血肌肉组织 0.15 g 加入组织裂解液,进行蛋白定量,根据蛋白定量结果加入相应体积的总蛋白样品与 4×蛋白质凝胶电泳上样缓冲液,变性后进行电泳,半干转膜后封闭,用一抗(1:200)结合后洗膜,再与二抗(1:3 000)结合,洗膜后采用 ECL 化学发光法显色,根据条带亮度选择曝光时间扫描灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 比值表示。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较采用 LSD 法,数据经 Levene 检验方差不齐者,应用 Dunnett's T3 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 金鸡毛草水提物对 DF 大鼠足部创面不同时间愈合情况及愈合率的影响** 灌胃第 21 天,正常组大鼠足部创口基本完全愈合,模型组与其他各组比较,创面愈合较缓慢(P < 0.01);各给药组可促进创面愈合,与模型组比较,金鸡毛草水提物高、中剂量及二甲双胍在各时间点均可提高创面愈合率(P < 0.05, P < 0.01),金鸡毛草水提物低剂量对溃疡愈

合有促进作用,除第 4 天外( $P < 0.05$ ),余无统计学 差异。见表 1 及图 1。

表 1 金鸡毛草水提物对 DF 大鼠创面愈合率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常	-	27.16 ± 2.99	51.16 ± 6.70	78.58 ± 8.05	91.75 ± 5.05
模型	-	16.53 ± 1.95 <sup>2)</sup>	34.11 ± 3.33 <sup>2)</sup>	48.73 ± 5.71 <sup>2)</sup>	70.90 ± 9.02 <sup>2)</sup>
金鸡毛草水提物	16	22.90 ± 2.09 <sup>4)</sup>	44.34 ± 4.36 <sup>4)</sup>	72.68 ± 6.98 <sup>4)</sup>	86.32 ± 6.13 <sup>4)</sup>
	8	19.29 ± 1.53 <sup>3)</sup>	39.81 ± 2.61 <sup>3)</sup>	60.02 ± 7.89 <sup>4)</sup>	81.90 ± 5.47 <sup>4)</sup>
	4	19.08 ± 1.65 <sup>3)</sup>	34.89 ± 3.67	51.31 ± 5.37	76.70 ± 6.65
二甲双胍	0.2	20.53 ± 1.79 <sup>4)</sup>	39.88 ± 3.07 <sup>3)</sup>	59.28 ± 8.17 <sup>4)</sup>	81.87 ± 5.49 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

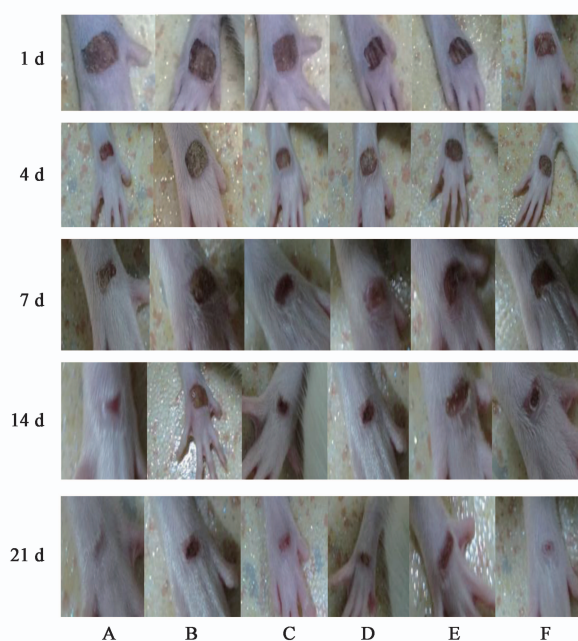


图 1 DF 大鼠不同时间创面愈合情况  
A. 正常组;B. 模型组;C. 金鸡毛草水提物 16  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;D. 金鸡毛草水提物 8  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;E. 金鸡毛草水提物 4  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;F. 二甲双胍组(图 2,3 同)

图 1 DF 大鼠不同时间创面愈合情况

Fig.1 Wound healing of different time points in DF rats

表 2 金鸡毛草水提物对 DF 大鼠血管内皮相关因子的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ET-1/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TXA <sub>2</sub> / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NOS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常	-	53.91 ± 8.30	69.25 ± 9.27	63.33 ± 9.32	25.52 ± 4.11
模型	-	97.68 ± 9.56 <sup>2)</sup>	101.66 ± 11.73 <sup>2)</sup>	27.22 ± 3.87 <sup>2)</sup>	19.24 ± 1.99 <sup>1)</sup>
金鸡毛草水提物	16	67.96 ± 7.18 <sup>4)</sup>	79.59 ± 8.59 <sup>4)</sup>	48.07 ± 2.95 <sup>4)</sup>	22.90 ± 2.16 <sup>3)</sup>
	8	76.91 ± 7.12 <sup>4)</sup>	85.36 ± 8.73 <sup>4)</sup>	41.76 ± 4.09 <sup>4)</sup>	20.46 ± 2.07
	4	88.53 ± 7.40 <sup>3)</sup>	94.46 ± 12.03	39.99 ± 3.36 <sup>4)</sup>	19.53 ± 1.84
二甲双胍	0.2	89.53 ± 5.86 <sup>3)</sup>	96.36 ± 11.26	44.27 ± 3.84 <sup>4)</sup>	21.20 ± 1.78

3.2 对 DF 大鼠血管内皮相关因子的影响 与正常组比较,模型组血清 ET-1, TXA<sub>2</sub> 水平明显升高, NO, NOS 水平显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ );经治疗后,与模型组比较,金鸡毛草水提物高、中、低剂量组 ET-1 水平显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,金鸡毛草水提物高、中剂量治疗组 TXA<sub>2</sub> 水平显著降低( $P < 0.01$ ),其余组差异无统计学意义;与模型组比较各治疗组 NO 水平均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,金鸡毛草水提物高剂量组 NOS 水平明显升高( $P < 0.05$ ),金鸡毛草水提物中、低剂量、二甲双胍组 NOS 水平差异无统计学意义。见表 2。

3.3 对 DF 大鼠炎症因子的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清炎症因子 ICAM-1, CRP, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  水平均升高( $P < 0.01$ );经治疗后,与模型组比较,金鸡毛草水提物各剂量组 ICAM-1, CRP, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.01$ ),二甲双胍组 ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),CRP 水平虽有降低,但差异无统计学意义。见表 3。

表 3 金鸡毛草水提物对 DF 大鼠炎症因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of *Gynura divaricata* aqueous extracts on inflammatory factors in DF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ICAM-1/ng·L <sup>-1</sup>	CRP/μg·L <sup>-1</sup>	IL-6/ng·L <sup>-1</sup>	IL-1β/ng·L <sup>-1</sup>	TNF-α/ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	2.35 ± 0.16	2.05 ± 0.21	59.52 ± 9.06	25.83 ± 2.63	16.97 ± 2.07
模型	-	7.99 ± 0.38 <sup>2)</sup>	10.35 ± 0.79 <sup>2)</sup>	144.03 ± 12.42 <sup>2)</sup>	114.26 ± 8.96 <sup>2)</sup>	47.03 ± 3.69 <sup>2)</sup>
金鸡毛草水提物	16	3.92 ± 0.35 <sup>4)</sup>	5.15 ± 0.40 <sup>4)</sup>	82.90 ± 10.84 <sup>4)</sup>	61.38 ± 6.94 <sup>4)</sup>	26.17 ± 3.76 <sup>4)</sup>
	8	4.27 ± 0.45 <sup>4)</sup>	5.66 ± 0.42 <sup>4)</sup>	108.35 ± 12.56 <sup>4)</sup>	74.68 ± 8.80 <sup>4)</sup>	34.34 ± 3.69 <sup>4)</sup>
	4	4.24 ± 0.32 <sup>4)</sup>	5.96 ± 0.32 <sup>4)</sup>	118.59 ± 12.56 <sup>4)</sup>	83.97 ± 7.54 <sup>4)</sup>	39.36 ± 3.82 <sup>4)</sup>
二甲双胍	0.2	7.29 ± 0.36 <sup>4)</sup>	9.26 ± 0.39	129.59 ± 11.20 <sup>3)</sup>	95.35 ± 8.99 <sup>4)</sup>	40.64 ± 3.86 <sup>4)</sup>

3.4 对 DF 大鼠局部组织新生血管的影响 与正常组比较,模型组缺血组织新生血管较少,经治疗后,金鸡毛草水提物高、中剂量组及二甲双胍组新生血管明显增多,金鸡毛草水提物低剂量组新生血管情况不如高、中剂量组明显。见图 2。

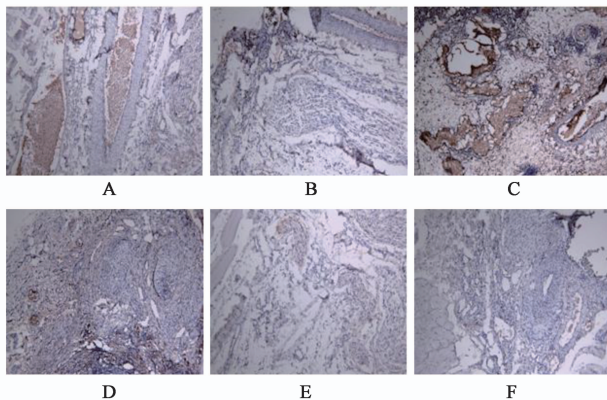


图 2 金鸡毛草水提物对 DF 大鼠局部组织新生血管的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of *Gynura divaricata* aqueous extracts on neovascularization of lower limb ischemia tissue in DF rats (IHC, ×200)

3.5 对 DF 大鼠局部组织 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 VEGF mRNA 和蛋白的表达均升高 ( $P < 0.05$ );经治疗后,金鸡毛草水提物高、中、低剂量组及二甲双胍组 VEGF 的表达均明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3,表 4。

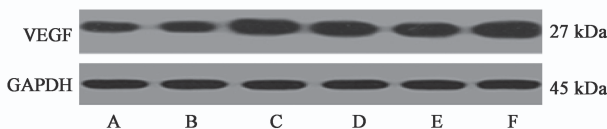


图 3 各组大鼠下肢缺血组织 VEGF 蛋白的表达

Fig. 3 VEGF protein expression of lower limb ischemic tissues in DF rats

#### 4 讨论

随着生活水平及饮食习惯糖尿病患者数量的不断增长,加剧了这一现状,据统计,近 25% 的糖尿病患

表 4 金鸡毛草水提物对大鼠下肢缺血组织 VEGF mRNA 及蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of *Gynura divaricata* aqueous extracts on VEGF mRNA and protein expression of lower limb ischemic tissues in DF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	VEGF /GAPDH mRNA	VEGF /GAPDH 蛋白
正常	-	1	0.67 ± 0.11
模型	-	1.32 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.91 ± 0.08 <sup>1)</sup>
金鸡毛草水提物	16	5.65 ± 0.20 <sup>4)</sup>	1.63 ± 0.24 <sup>4)</sup>
	8	3.52 ± 0.36 <sup>4)</sup>	1.42 ± 0.09 <sup>4)</sup>
	4	1.72 ± 0.39 <sup>3)</sup>	1.26 ± 0.10 <sup>3)</sup>
二甲双胍	0.2	4.99 ± 0.12 <sup>4)</sup>	1.60 ± 0.22 <sup>4)</sup>

者都会经受足疾问题,给患者带来巨大的精神和身体伤害<sup>[10]</sup>,尤其在中国这个人口基数巨大的国家尤为严峻,如何促进糖尿病难愈性皮肤溃疡的愈合、缩短病程和降低致残率已经越来越引起医务工作者和研究人员的重视。因此对 DF 模型的研究及药物研究为疾病发生机制及治疗药物的作用机制提供了实验依据。

血管内皮细胞可分泌 ET-1, NO 等来调节血管的收缩和舒张, TXA<sub>2</sub> 主要来源于血小板,少数来源于内皮细胞,具有强烈的缩血管作用,并促进血小板聚集。高血糖、高胰岛素使内皮细胞损伤,导致 ET-1, NO/NOS 失衡<sup>[11-12]</sup>,血管收缩舒张功能失调,血小板活化增强,致使血液流变学紊乱,局部组织缺血缺氧,进一步加重血管内膜损伤,血管内膜损伤是血管病变的基础,而血管病变被认为是 DF 发生机制的重要组成部分,糖尿病患者血管病变非常广泛,几乎累及所有血管,血管病变如动脉硬化、斑块形成、血管狭窄,导致血流减少甚至闭塞,成为下肢坏疽的病理基础<sup>[13]</sup>。炎症介质不仅促进动脉粥样硬化的发生,而且与糖尿病及其并发症密切相关。在炎症因子介导下,血管内皮细胞高表达 ICAM-1, ICAM-1 水平的增高,会进一步促进白细胞黏附于血管内皮细胞,进而释放多种炎性介质如白细胞介素、肿瘤坏死因子等,最终导致细

胞功能的改变,这些细胞因子组成了复杂的网络作用于血管内皮细胞,促进血管病变的发生发展,形成恶性循环<sup>[14]</sup>。研究表明<sup>[15]</sup>,DF 创面的愈合缓慢与血管生成受损有关,而血管生成与 VEGF 的表达有关,目前 VEGF 被认为是最强的促血管生成因子,能促进血管内皮细胞分裂与增殖,诱导血管生成,在创面及缺血组织修复过程中扮演着重要作用。

本实验结果显示,糖尿病足模型大鼠创面愈合较正常组慢,经金鸡毛草水提物高、中剂量组治疗后,明显加快足部创面愈合,提高创面愈合率,低剂量组对溃疡愈合虽有促进作用,但与模型组差异不明显。说明金鸡毛草水提物有促进 DF 创口愈合的作用,与剂量呈一定依赖性。

本实验检测了大鼠血清的 ET-1, TXA<sub>2</sub>, NO, NOS 及炎症因子的含量,模型组大鼠 ET-1, TXA<sub>2</sub>, ICAM-1, CRP, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  水平升高, NO, NOS 水平降低,说明糖尿病大鼠高脂高糖会引起血管内皮损伤,导致炎症因子释放,影响 DF 溃疡的愈合。实验结果表明,金鸡毛草水提物高剂量治疗组 ET-1, TXA<sub>2</sub> 水平降低, NO, NOS 水平升高,各剂量治疗组 ICAM-1, CRP, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  含量明显低于模型组。由此可见,金鸡毛草水提物可提高 NO, NOS 活力并降低 ET-1, TXA<sub>2</sub>, 保护血管内皮,抑制炎症介质释放,促进体内内皮损伤的修复,维持血管舒缩功能的平衡,减轻炎症反应,加快足部溃疡的恢复,对 DF 具有良好的治疗效果。

免疫组化染色检测了缺血组织新生血管的新生情况,检测缺血组织 VEGF mRNA 和蛋白的表达情况,VEGF 是影响血管新生的关键因子,血管新生与编码 VEGF mRNA 和 VEGF 的含量有关,VEGF 的 mRNA 可增强 VEGF 与其他生长因子间的协同作用,促进内皮祖细胞的循环,增加微血管网的形成,恢复血供,为缺血组织带来促进修复的介质及充足的营养。当周围组织完全修复后,VEGF 转录下降。本实验结果也证实,金鸡毛草水提物各治疗组缺血组织中 VEGF 表达明显高于 DF 模型大鼠,血管新生情况优于模型组,加速 DF 创面的愈合。而正常组末期创面基本完全恢复,VEGF 的表达较各治疗组低。说明金鸡毛草水提物可促进 DF 缺血组织血管内皮因子的高表达及新生血管形成,恢复缺血组织血供,加快 DF 的恢复。

综上所述,本实验证明了金鸡毛草水提物对 DF 的治疗作用,其机制可能与增加 VEGF 的表达及血管新生,保护血管内皮细胞,改善缺血组织血液循

环,抑制炎症介质释放有关。但实验中,金鸡毛草水提物对 DF 修复的各个时间段各种介质的变化及机制未完全明了,有待进一步实验进行研究。

#### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 7 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:6894.
- [2] Newrick P. International consensus on the diabetic foot [J]. BMJ, 2000,321(7261):642A.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 77 卷. 第一分册[M]. 北京:科学出版社,1999:317-318.
- [4] 童娟,李东晓,李晓娟. 白子菜提取物对高脂血症模型大鼠的降血脂作用[J]. 江西中医学院学报,2012,24(5):70-72.
- [5] 高云丽. 金鸡毛草有效成分的提取纯化及对血糖的影响研究[D]. 武汉:武汉理工大学,2013.
- [6] 殷成坤,李晓霞,彭佳玉,等. 高脂饮食联合 STZ 建立 2 型糖尿病动物模型研究概况[J]. 四川解剖学杂志,2014,22(4):15-17,22.
- [7] Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin [J]. J Diabetes Investig,2014,5(4):349-358.
- [8] 齐一侠,张超,崔世军,等. 糖尿病后肢缺血大鼠模型的建立与评估[J]. 中国实验动物学报,2015,23(6):586-596.
- [9] Lau T W, Sahota D S, Lau C H, et al. An *in vivo* investigation on the wound-healing effect of two medicinal herbs using an animal model with foot ulcer [J]. Eur Surg Res,2008,41(1):15-23.
- [10] Setacci C, de Donato G, Setacci F, et al. Diabetic patients: epidemiology and global impact [J]. J Cardiovasc Surg (Torino),2009,50(3):263-273.
- [11] Jude E B, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes-a review [J]. Diabet Med, 2010,27(1):4-14.
- [12] WANG C C L, Hess C N, Hiatt W R, et al. Atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes-mechanisms, management, and clinical considerations [J]. Circulation,2016,133(24):2459-2502.
- [13] Mwebazer M, Kibirige D. Peripheral arterial disease among adult diabetic patients attending a large outpatient diabetic clinic at a national referral hospital in Uganda: a descriptive cross sectional study [J]. PLoS One,2014,9(8):e105211.
- [14] Libby P, Ridker P M, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. Circulation,2002,105:1135-1143.
- [15] Marrotte E J, Chen D D, Hakim J S, et al. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice [J]. J Clin Invest,2010,120(12):4207-4219.

[责任编辑 周冰冰]