

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

李巧芬¹, 李春深¹, 李云平¹, 常柏^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300070; 2. 天津医科大学代谢病医院, 天津 300070)

[摘要] **目的:**探讨生肌象皮膏促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合的免疫-炎症反应机制。**方法:**将 Wistar 大鼠随机分成 4 组, 一组为正常对照组, 其余 3 组采用链脲佐菌素 (STZ) 尾静脉注射制备糖尿病动物模型, 4 组动物均于背部打孔, 造成溃疡模型。3 组糖尿病溃疡大鼠按照血糖和体重分层随机分为糖尿病对照组、凡士林组、生肌象皮膏组。生肌象皮膏组外用生肌象皮膏纱条外敷, 凡士林组用凡士林纱条外敷, 正常对照组、糖尿病对照组均以生理盐水纱条外敷, 观察血清白介素-2 (IL-2) 水平与创面组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量的变化。**结果:**生肌象皮膏组大鼠糖尿病溃疡创面的愈合速度加快, 与糖尿病对照组比较于第 7, 14, 21, 30 天有显著性差异; 生肌象皮膏组大鼠血清 IL-2 水平与糖尿病对照组比较于第 21, 30 天降低, 有显著性差异, 与凡士林组比较第 21, 30 天降低, 有显著性差异; 生肌象皮膏组大鼠创面组织 TNF- α mRNA 表达水平与糖尿病对照组比较于第 21, 30 天降低, 有显著性差异, 与凡士林组比较第 21, 30 天降低, 有显著性差异。**结论:**生肌象皮膏可以促进糖尿病大鼠溃疡创面的愈合与调节免疫-炎症反应密切相关。

[关键词] 生肌象皮膏; 糖尿病溃疡; 免疫-炎症反应; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0279-04

[doi] 10.11653/syfy2013180279

Effect of Shengji Xiangpi Mastic on IL-2 and TNF- α in Rats with Diabetic Ulcer During Wound Healing

LI Qiao-fen¹, LI Chun-shen¹, LI Yun-ping¹, CHANG Bai^{2*}

(1. Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300070, China;

2. Metabolic Diseases Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms of the immune-inflammatory response of the Shengji Xiangpi mastic (SM) promoting the ulcer healing in diabetic rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into four groups, one group as the normal control group, the remaining three groups rats were injected streptozotocin (STZ) into vena caudalis as the diabetic model. All the four group rats were punched in back to establish the diabetic ulcer model. The three group rats with diabetic ulcers were randomly divided into diabetic control group, vaseline group and SM group according to the blood glucose and body weight. The rats in SM group were treated with SM gauze compress, those in vaseline group treated with vaseline gauze compress, and those in normal control group and diabetic control group treated with physiological saline, then the content of serum IL-2 level and wound tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the wound tissue were observed. **Result:** The diabetic ulcer wounds in the back of the rats in SM group healed faster than those in the rats in diabetic control group and vaseline group, and the difference was significant on the day 7, 14, 21 and 30 compared with diabetic control group, respectively; the contents of serum interleukin-2 (IL-2) in the rats in SM group were lower than those in the rats in diabetic control

[收稿日期] 20121212(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072817)

[第一作者] 李巧芬, 硕士, 副主任医师, 从事内分泌疾病的临床及实验研究, Tel:15922236071, E-mail:897873342@qq.com

[通讯作者] * 常柏, 博士, 副主任医师, 从事糖尿病及其并发症的临床及基础研究, 尤其擅长于糖尿病合并周围神经和血管病变, Tel:13388039172, E-mail:changbai1972@126.com

group on the day 21 and 30, and the difference was significant; it was also lower than those in the rats in vaseline group on the day 21th and 30 and the difference was significant. The expression levels of TNF- α mRNA of the diabetic ulcer wounds in the rats in SM group were lower compared to those in the rats in diabetic control group on the day 21 and 30, and the difference was significant; it was also lower than those in the rats in vaseline group on the day, 21 and 30 and the difference was significant. **Conclusion:** The Shengji Xiangpi mastic can promote the ulcer healing in diabetic rats, and it is closely related to regulating the immune-inflammatory response.

[**Key words**] Shengji Xiangpi mastic; diabetic ulcer; immune-inflammatory response; IL-2; TNF- α

生肌象皮膏是临床常用的具有生肌敛口作用的外用药,由血余炭、当归、生地黄、生龟板、炉甘石、生石膏、象皮粉组成,其促进创面愈合作用显著,已在临床中得到广泛应用。前期研究证明,生肌象皮膏可加速糖尿病大鼠溃疡创面的愈合^[1]。糖尿病属于中医“消渴病”的范畴^[2],为了进一步证实生肌象皮膏对糖尿病溃疡的作用机制,本实验设计以糖尿病大鼠溃疡模型为载体,通过对生肌象皮膏在糖尿病大鼠创面愈合过程中不同时间点、不同组间血清白介素-2(IL-2)水平与创面组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量的变化进行实验观察,探讨生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡创面的免疫-炎症反应影响的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立^[3] Wistar 雄性清洁级大鼠,300 只,体重(180 \pm 20)g[天津实验动物中心提供,动物合格证号为 SCXK(津)2005-001]。随机选取其中 48 只,采用正常饲料喂养,作为正常对照组。其余大鼠(285 只),采用高糖高脂饲料喂养^[4]至 12 周时尾静脉注射链脲佐菌素,将随机血糖超过 16.7 mmol·L⁻¹大鼠作为糖尿病大鼠(144 只),将正常对照组和糖尿病大鼠以水合氯醛腹腔麻醉后,背部剃毛,常规消毒,于大鼠背部脊柱左侧在无菌条件下用特制的打孔器打孔(直径 2 cm),溃疡深及筋膜层,止血后以无菌纱布包扎,自由饮水与喂食。3 d 后创面有肉芽组织开始生长,溃疡模型制备成功。将糖尿病大鼠按照血糖、体重分层随机分成糖尿病对照组、凡士林组、生肌象皮膏组。

1.2 治疗方法 正常对照组、糖尿病对照组予以严格外科无菌换药,生理盐水纱布外敷,生肌象皮膏组外用生肌象皮膏。高温高压制成无菌生肌象皮膏纱条,用生肌象皮膏纱条完全覆盖创面,外用无菌纱布包扎固定。凡士林组外用凡士林方法与生肌象皮膏组相同。4 组均每日换药 1 次。

1.3 药品与试剂 生肌象皮膏的主要药物为象皮粉,由于大象属于二级保护动物,药物的来源受到限

制,天津中医药大学第一附属医院制剂室应用驴皮代替象皮制备生肌象皮膏(天津中医药大学第一附属医院制剂室提供,执行标准依据天津市食品药品监督管理局医疗机构制剂标准批号 TJZB2008080502,);凡士林(天津中医药大学第一附属医院提供);链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,批号 S0130)。

1.4 标本采集及检测 4 组实验大鼠分别于用药 1,3,7,14,21,30 d(共 6 个时间点)进行创面照相,应用计算机图像分析系统进行处理,计算创面的大小;各时相点将大鼠麻醉,在无菌条件下经心脏取血,应用 ELISA 法检测血清白介素-2(IL-2)含量;同时于大鼠溃疡创面 2,4,6,8,10,12 点共 6 个位置点对应前述 6 个时间点依次取创面组织(每个时间点对应一个位置点取一次创面组织),放入不同冻存管,置于液氮中,后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,后采用 RT-PCR 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较时,组间方差齐性的采用 LSD 法,方差不齐的采用 DUNNET'S T3 法, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点创面面积大小比较 生肌象皮膏组大鼠糖尿病溃疡创面的愈合速度加快,与糖尿病对照组比较于第 7,14,21,30 天有显著性差异($P < 0.05$),与凡士林组比较第 21,30 天有显著性差异($P < 0.05$);凡士林组大鼠糖尿病溃疡创面的愈合速度加快,与糖尿病对照组比较第 21,30 天有显著性差异($P < 0.05$)。说明生肌象皮膏可以明显加速糖尿病大鼠溃疡创面的愈合,凡士林也可以促进糖尿病大鼠溃疡的愈合,但愈合速度明显低于生肌象皮膏组,见表 1。

2.2 各组大鼠血清 IL-2 含量的比较 生肌象皮膏组大鼠血清 IL-2 水平与糖尿病对照组比较于第 21,

30天降低,有显著性差异($P < 0.05$),与凡士林组比较第21,30天降低,有显著性差异($P < 0.05$);正常对照组大鼠血清IL-2水平与糖尿病对照组比较于第21,30天有显著性差异($P < 0.05$),见表2。

2.3 生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡创面中TNF- α mRNA基因表达的影响

表1 各组大鼠不同时间点创面面积大小比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	30 d
正常对照	3.20 \pm 0.07	3.05 \pm 0.25	1.71 \pm 0.29 ¹⁾	0.54 \pm 0.16 ¹⁾	0.30 \pm 0.21 ¹⁾	0.22 \pm 0.13 ¹⁾
糖尿病对照	3.20 \pm 0.06	3.17 \pm 0.24	2.34 \pm 0.14	2.16 \pm 0.15	1.98 \pm 0.31	1.68 \pm 0.27
凡士林	3.20 \pm 0.08	3.12 \pm 0.26	2.07 \pm 0.32	1.97 \pm 0.11	1.63 \pm 0.15 ¹⁾	1.30 \pm 0.18 ¹⁾
生肌象皮膏	3.20 \pm 0.07	3.09 \pm 0.15	1.89 \pm 0.22 ^{1,2)}	0.96 \pm 0.17 ^{1,2)}	0.54 \pm 0.19 ^{1,2)}	0.31 \pm 0.10 ^{1,2)}

注:与糖尿病对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与凡士林组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2同)。

表2 各组大鼠血清IL-2水平的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	30 d
正常对照	15.04 \pm 0.93	15.17 \pm 1.16	15.11 \pm 1.32	15.03 \pm 1.21	14.97 \pm 1.11 ¹⁾	15.08 \pm 1.17 ¹⁾
糖尿病对照	14.99 \pm 0.96	15.27 \pm 1.03	15.61 \pm 1.24	16.30 \pm 1.14	16.68 \pm 1.06	16.76 \pm 1.01
凡士林	15.12 \pm 0.67	15.26 \pm 1.31	15.47 \pm 1.09	15.95 \pm 1.29	16.41 \pm 1.03	16.39 \pm 1.15
生肌象皮膏	15.06 \pm 0.89	15.29 \pm 1.08	15.40 \pm 1.10	15.78 \pm 1.12	15.83 \pm 1.11 ^{1,2)}	15.80 \pm 1.11 ^{1,2)}

表3 不同时间点大鼠创面组织TNF- α mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	30 d
正常对照	1.20 \pm 0.06	1.22 \pm 0.11	1.21 \pm 0.03 ¹⁾	1.20 \pm 0.04 ¹⁾	1.21 \pm 0.21 ¹⁾	1.20 \pm 0.14 ¹⁾
糖尿病对照	1.22 \pm 0.18	1.35 \pm 0.16	1.70 \pm 0.31	2.21 \pm 0.25	2.11 \pm 0.16	1.98 \pm 0.13
凡士林	1.19 \pm 0.15	1.35 \pm 0.21	1.66 \pm 0.14	1.94 \pm 0.13	1.88 \pm 0.11	1.78 \pm 0.17
生肌象皮膏	1.20 \pm 0.03	1.31 \pm 0.25	1.62 \pm 0.21	1.75 \pm 0.18 ¹⁾	1.53 \pm 0.15 ^{2,3)}	1.39 \pm 0.14 ^{2,3)}

注:与糖尿病对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与凡士林组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 生肌象皮膏对糖尿病创面治疗作用的理论依据 生肌象皮膏由驴皮、当归、血余、龟板、生地黄、生炉甘石、生石膏、香油、白蜡组成,是生肌长皮的代表方剂。方中以驴皮为主药,配以滋阴养血、清热解毒、活血化瘀收敛之品,共奏生肌长皮、活血养血、清热解毒之功效。生肌象皮膏经临床应用和实验研究证实有消炎抑菌、促进肉芽组织生长的作用,可活血祛瘀、通络的功能,能改善局部微循环,化瘀生新,增加局部的抗感染能力,同时促进坏死组织液化脱落,保护残存的上皮细胞,使它们能在良好的环境中迅速生长,促进残存上皮细胞和创面周围上皮细胞的良好生长,使创面较快愈合^[5-6]。无菌凡士林纱布,具有润滑作用,在临床上用于创面覆盖、引流、填塞等。

研究表明生肌象皮膏有激活免疫系统,使局部溶菌酶含量增高和巨噬细胞增多,有抗感染的作用。同时加速局部血液循环,促进细胞增生分化促进皮岛的形成^[7]。笔者通过动物实验结果证实:生肌象

皮膏能增强创面微血管通透性,促进中性粒细胞透出增强其吞噬作用,抑制和杀灭疮面的细菌,对大肠埃希菌、绿脓杆菌等需氧菌和厌氧菌有明显的杀伤和抑制作用。同时,生肌象皮膏能明显提高创面的成纤维细胞、内皮细胞数目,从而促进肉芽组织形成和上皮组织增生,促使伤口愈合^[8]。

“提脓祛腐,煨脓长肉”是伤口换药的基本原则。中医学理论认为“腐者,坏肉也,诸书云,腐不去,新不生”。“煨脓”中的脓即是分泌物,凡有创面就有分泌物,分泌物的堆积可促使肉芽组织和上皮组织增生,促进局部气血运行通畅,增强其防御能力,使创口脓液渗出增多,载邪外出,祛腐生肌,促进创面的愈合^[9]。

本研究发现,生肌象皮膏组在糖尿病溃疡创面的愈合速度上与糖尿病对照组比较于第7,14,21,30天有显著性差异;第5,7,14,21,30天空白组、生肌象皮膏组与凡士林组比较有显著性差异。凡士林组与糖尿病对照组比较第21,30天有显著性差异,说明生肌象皮膏可以加速糖尿病大鼠难治性溃疡创

面的愈合。

3.2 IL-2 与 TNF- α 在糖尿病创面愈合修复中的作用 正常机体中各种 T 淋巴细胞亚群相互作用,维持着机体正常的免疫功能。机体免疫系统的稳定有赖于 T 细胞这两个亚群之间的平衡。Th1 可产生 IL-2 与 TNF- α , 促进细胞免疫反应。IL-2 和 TNF- α 作为重要的致炎因子和免疫调节因子,其过高表达会使各种炎症细胞聚集,引起强烈炎症反应,导致机体免疫功能损害或诱发各种炎症性疾病^[10]。

IL-2 主要由活化的淋巴细胞产生,具有多种生物学活性的淋巴因子,是调节机体免疫功能最主要的淋巴因子之一,能激活多种免疫细胞,诱导淋巴细胞的增生与免疫效应,促进 B 细胞的免疫应答以及 NK 细胞、单核巨噬细胞的增生。IL-2 与 T 细胞、B 细胞、单核细胞表面的 IL-2 受体结合后,能引起 T 细胞活化、增殖,促进 T 细胞的杀伤作用,增强 NK 细胞活性,促进 B 细胞分泌免疫球蛋白等细胞免疫反应^[11]。IL-2 还可刺激自然杀伤细胞的活化与增殖,诱导淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK 细胞)活化^[12]。

TNF- α 可刺激中性粒细胞脱颗粒,增加自由基的生成,以提高中性粒细胞的吞噬杀菌作用。TNF- α 是参与炎症反应最重要的介质之一,TNF- α 单独作用并不能引起机体的严重损害,但在致病因素作用下,TNF- α 在循环血中首先升高并达高峰,触发细胞因子网络,形成细胞因子的基本级联反应^[13]。动物实验发现,降低血清 TNF- α 含量可保护血管内皮细胞免受损伤,降低糖尿病血管并发症发生的风险^[14]。

本研究发现,生肌象皮膏于第 21, 30 天能明显降低糖尿病大鼠血清 IL-2 水平以及创面组织 TNF- α mRNA 表达水平。

3.3 总结 中国的糖尿病发病率高达 9.7%,成为全球糖尿病第一大国^[15]。糖尿病的病程比较长,并发病复杂,进行治疗糖尿病新药的研究,开发中药新制剂势在必行^[16]。本实验进一步证实,生肌象皮膏组大鼠的糖尿病溃疡愈合速度快于糖尿病对照组,其炎症因子 IL-2 在血清的含量以及创面组织 TNF- α mRNA 表达水平降低(在实验后期尤为明显),表明生肌象皮膏促进糖尿病溃疡伤口愈合的过程,可能与其影响炎症-免疫反应有密切关系,其详细机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 吴春,徐寒松. 糖尿病前期的中医辨证施治[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):316.

[3] 李巧芬,常柏,李晓军,等. 糖尿病大鼠难治性溃疡模型的复制及病理学观察[J]. 天津中医药大学学报, 2008,27(2):72.

[4] 李爱卿,王志慧,赵跃斌. 高糖高脂饲料诱导 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 临床医药实践,2005,2(1):130.

[5] 闫军,胡波,周劲松,等. 负压封闭引流联合生肌象皮膏在足背部大面积软组织缺损修复中的应用[J]. 临床骨科杂志,2011,14(1):45.

[6] 孙彩青,刘建茹. 皮肤缺损生肌象皮膏应用体会[J]. 中国实用医药杂志,2007,14(2):113.

[7] 常柏. 中西医结合点状植皮法治疗糖尿病坏疽 98 例[J]. 中西医结合外科杂志,2002,8(1):28.

[8] 李军. 生肌象皮膏作用机理的分析[J]. 辽宁中医学院学报,2005,7(4):329.

[9] 邓青秀,彭成,敖慧,等. 参术胶囊对脾虚胃癌小鼠 ERK 信号通路中 AP-1 和 IL-2 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):177.

[10] Oreja-Guevara C, Ramos-Cejudo J, Stark Aroeira L, et al. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab[J]. BMC Neurol,2012,12(1):95.

[11] Malekshahi Moghadam A, Saedisomeolia A, Djalali M, et al. Efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on serum levels of tumour necrosis factor-alpha, C-reactive protein and interleukin-2 in type 2 diabetes mellitus patients[J]. Singapore Med J,2012,53(9):615.

[12] 王宏婷,郑书国,苏云明. 肌瘤清胶囊对子宫肌瘤模型大鼠血清 NOS,TNF- α 和 IL-2 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):66.

[13] Mahalle N P, Kulkarni M V, Pendse N M, et al. Association of constitutional type of Ayurveda with cardiovascular risk factors, inflammatory markers and insulin resistance[J]. J Ayurveda Integr Med,2012,3(3):150.

[14] 冯天保,陈灯德,王倩,等. 糖肾安对糖尿病肾病炎症因子影响的临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(16):320.

[15] 梅君. 中医治疗 2 型糖尿病用药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):290.

[16] 张海燕,邬伟魁,李芳,等. 针药结合治疗糖尿病及其并发症研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):260.

[责任编辑 邹晓翠]