

归知糖疽颗粒对实验性糖尿病大鼠皮肤溃疡的影响

洪晓华, 张金妹, 刘建勋*

(中国中医科学院西苑医院基础研究室, 北京 100091)

[摘要] 目的: 观察归知糖疽颗粒对实验性糖尿病大鼠皮肤溃疡模型创面愈合率、病理组织学、血糖及小鼠微循环障碍的影响。方法: 1. 链脲佐菌素(STZ)腹腔注射造成大鼠糖尿病模型再以外科手术方法制作皮肤损伤; 用医学病理图象分析仪计算创面愈合率, 用血糖检测仪检测血糖值, 创面皮肤常规 HE 染色光镜观察病理变化。2. 末次给药后 30 min 经尾静脉注射高分子右旋糖酐诱发小鼠耳廓微循环障碍模型, 在显微镜下观察不同时段血液流态的改变。结果: 归知糖疽颗粒 0.81, 1.62, 3.24 g·kg⁻¹ 组治疗性灌胃给药 4 周糖尿病大鼠皮肤溃疡模型创面愈合率明显升高, 分别为 88.55%、89.49% 和 89.69% (均 $P < 0.001$); 血糖值明显降低(均 $P < 0.05$); 改善溃疡创面病理改变, 胶原纤维细胞增多, 炎性细胞减少。归知糖疽颗粒灌胃给药 3 d, 1.17 g·kg, 4.68 g·kg⁻¹ 组在 20 min, 30 min 时段明显改善小鼠耳廓微循环障碍的血液流态($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论: 归知糖疽颗粒有促进糖尿病大鼠皮肤溃疡模型皮肤溃疡创面愈合、降低血糖、改善微循环障碍作用。

[关键词] 糖尿病; 皮肤溃疡; 血糖; 微循环

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0027-04

Effects of Guizhi Tangju Granules on Dermal Ulcer in Diabetic Rats

HONG Xiao-hua, ZHANG Jing-mei, LIU Jian-xun*

(Department of Basic Theory, Xi Yuan hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[收稿日期] 2007-06-12

[通讯作者] * 刘建勋, Tel: (010) 62875599-6176

[**Abstract**] **Objective:** To study the effect of Guizhi Tangju Granules on blood sugar, dermal ulcer in streptozotocin induced diabetic rats and effects on microcirculation in mouse. **Methods:** 1. Wistar rats injected with streptozotocin (STZ) ip, at the same time, skin destruction made by surgical intervention. Healing ration and pathological change of dermal ulcer were observed. 2. Microcirculation disturbance induced by injection of dextran intravenously was observed after mouse were fed with Guizhi Tangju Granules for 4 weeks. **Results:** Guizhi Tangju Granules could significantly improve microcirculation disturbance in mouse and reduce blood sugar, increase healing ration of damaged skin in streptozotocin induced diabetic rats, as well as raise collagenous fibers cells and decrease inflammatory cells in pathology. **Conclusion:** Guizhi Tangju Granules could promote healing of damaged skin, decrease serum glucose and improve microcirculation disturbance.

[**Key words**] diabetes; dermal ulcer; serum glucose; microcirculation

糖尿病性皮肤溃疡是糖尿病发展进程中皮肤溃疡性病变统称。糖尿病性肢端坏疽是糖尿病血管、神经病变在肢端的表现,又称为糖尿病性动脉闭塞症,因常见于足部亦为糖尿病足(diabetic foot, DF)。近年糖尿病皮肤溃疡动物模型的建立给中医药新药研究开发提供途径。归知糖疽颗粒为中药复方,临床已使用多年,在治疗糖尿病足等皮肤溃疡疾病方面取得满意效果。本研究皆在通过动物模型观察探讨该中药复方的治疗作用。

1 材料

1.1 动物 125 只 6 周龄雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重(190~210)g,中国医学科学院实验动物研究所,许可证编号:SCXK(京)2005-0013。50 只 ICR 种小鼠,清洁级,♂♀各半,体重(18~22)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品和试剂 归知糖疽颗粒由当归、知母、金银花、地黄、玄参等 9 味中药组成。采用水煎醇沉、真空干燥、干压制颗粒的制备工艺。实验剂量以提取物计算,3.33 g 生药·g⁻¹ 提取膏粉(提取物),批号:050616,中国中医科学院中药所提供。盐酸二甲双胍片,0.25g·片⁻¹,批号:061002,北京协和药厂。盐酸消旋山莨菪碱,5 mg·片⁻¹,批号:T04L505,杭州民生药业集团有限公司。链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ), MW: 256.20, Sigma 公司。柠檬酸,分析纯,北京化工厂,批号:890822;柠檬酸三钠,分析纯,北京化工厂,批号:881007,配制成 pH4.2, 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液。高分子右旋糖酐(DEXTRAN 500),瑞典生产,批号:298001,生理盐水配成 15% 溶液备用。戊巴比妥钠,进口分装,佛山市化工试验厂,批号:860901,蒸馏水配成 0.5% 溶液

备用。

1.3 仪器 GLUCOTREND 血糖检测仪。罗康全活力型血糖试纸(Accu-CHEK)。医学病理图象分析仪。SZX-12 体式显微镜(OLYMPUS)。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠皮肤溃疡模型制备^[1~3] 将动物随机分为空白对照组 10 只,其余动物禁食 16 h,按链脲佐菌素(STZ) 55 mg·kg⁻¹,用 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液(pH4.2)配成 1% 的溶液,经腹腔注射(ip)造成大鼠高血糖,7 d 后测定空腹血糖> 16.6 mmol·L⁻¹ 作为糖尿病成模的标准,动物随机分 5 组,每组 11 只,(1)空白对照组(蒸馏水);(2)模型组;(3)归知糖疽颗粒小剂量(0.81 g·kg⁻¹)组;(4)归知糖疽颗粒中剂量(1.62 g·kg⁻¹)组;(5)归知糖疽颗粒大剂量(3.24 g·kg⁻¹)组。(1)~(5)各组动物经背部脱毛后在脊柱两侧以外科手术方法各制作一个创面,直径约为(18~20)mm 的圆形皮肤破损面,深至筋膜,次日起开始灌胃(ig)给药,连续 4 周。末次药后 24 h 用医学病理图象分析仪测量创面面积,计算创面愈合率(%) = [(原始创面面积-未愈合创面面积)÷原始创面面积] × 100%;摘取创面周围皮肤 10% 甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色,光学显微镜下进行病理组织学检查,以纤维细胞和炎性细胞为观察指标。

2.2 链脲佐菌素(STZ)致实验性糖尿病大鼠模型^[4,5] 除空白对照组 10 只动物,其余动物禁食 16 h,按 STZ 50 mg·kg⁻¹,用 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液(pH4.2)配成 1% 的溶液 ip 引起大鼠高血糖,4 d 后测定空腹血糖> 16.6 mmol·L⁻¹ 作为糖尿病成模的标准,动物随机分 5 组,每组(11~13)只,(1)空白对照组(蒸馏水);(2)模型组(蒸馏水);(3)~(5)归知糖疽颗粒剂量组同试验 1,(6)阳性对照药盐酸二甲

双胍 0.2 g/kg 组。ig 治疗性给药每日 1 次, 连续 4 周。药后每周经大鼠尾尖取血, 测定空腹血糖值。

2.3 小鼠耳廓微循环障碍模型 将小鼠随机分 5 组, 每组 10 只, (1) 对照组(蒸馏水); (2) 归知糖疽颗粒小剂量(1.17 g·kg⁻¹) 组; (3) 归知糖疽颗粒中剂量(2.34 g·kg⁻¹) 组; (4) 归知糖疽颗粒大剂量(4.68 g·kg⁻¹) 组; (5) 盐酸消旋山莨菪碱 20 mg·kg⁻¹ 组。试验前给药 3 d, 末次给药 30 min 后, 用 0.5% 戊巴比妥钠腹腔麻醉 10 mL·kg⁻¹, 经尾静脉注射 15% 高分子右旋糖酐 10 mL·kg⁻¹, 在显微镜下观察对照组在注射前后和其余各组在注射后 0, 10, 20, 30 min 不同时间段的血液流态的改变。血液流态分级: 0 级, 直线(线粒)状; I 级, 虚线状; II 级, 粒(絮)状; III 级, 淤滞状。

2.4 数据处理 创面愈合率(%)、血糖值(mmol·L⁻¹) 以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验比较组间差异; 病理组织学检查、血液流态实验数据按参比差值法^[6] 进行统计学处理。

3 结果

3.1 对糖尿病大鼠皮肤溃疡模型的影响 由表 1, 2 可见, 糖尿病模型组大鼠皮肤创面愈合率 78.01% 明显低于空白对照组的 88.97% ($P < 0.001$), 表明实验性糖尿病大鼠皮肤溃疡模型成立。归知糖疽颗粒低、中、高 3 个组皮肤创面愈合程度明显优于模型组, 创面愈合率分别为 88.55%, 89.49% 和 89.69% 与模型组比较有显著性差异($P < 0.001$)。病理组织学观察显示, 模型组创面可见薄厚不一的炎性结痂, 创面边缘的表皮细胞增厚, 创面下均为肉芽组织, 肉芽组织见丰富的成纤维细胞, 部分纤维细胞, 多数炎细胞, 模型组与空白对照组相比, 在创面愈合程度上明显减慢。归知糖疽颗粒 3 个剂量组创面下为肉芽组织, 肉芽组织内细胞丰富, 丰富的成纤维细胞, 部分纤维细胞, 少数胶原纤维, 较少炎细胞或无炎细

胞。归知糖疽颗粒各组与模型组相比, 在创面愈合程度上明显改善。

3.2 对实验性糖尿病大鼠模型血糖的影响 由表 3 可见, 注射 STZ 72 h 后大鼠血糖升高呈现持续状态, 与空白对照组比较均有显著性差异($P < 0.01$)。阳性对照药二甲双胍在给药后 4 周血糖值均明显下降, 与模型组比较均有显著性差异($P < 0.01$)。归知糖疽颗粒低、中、高 3 个组在给药期间血糖值与模型组比较均有不同程度的下降, 尤其归知糖疽颗粒大剂量(3.24 g·kg⁻¹) 组在给药期间各个时间点血糖值均有下降, 与模型组比较有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。

表 1 对实验性糖尿病大鼠皮肤溃疡模型创面愈合率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	创面愈合率(%)
空白对照组	—	10	88.97 ± 4.37 ³⁾
模型组	—	11	78.01 ± 5.31
归知糖疽颗粒组	0.81	11	88.55 ± 5.23 ³⁾
归知糖疽颗粒组	1.62	11	89.49 ± 4.36 ³⁾
归知糖疽颗粒组	3.24	11	89.69 ± 2.85 ³⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (下同)

表 2 对实验性糖尿病大鼠皮肤溃疡模型溃疡创面病理组织学的影响

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	创面纤维细胞变化				创面炎性细胞浸润			
			成纤维 细胞	纤维 细胞	胶原纤 维细胞	P 值	较少 或无	部分 多数	P 值	
空白对照组	—	10	2	2	6	2)	6	4	2)	
模型组	—	11	10	1			1	3	7	
归知糖疽颗粒组	0.81	11	4	3	4	1)	2	5	4	
归知糖疽颗粒组	1.62	11	3	2	6	1)	5	4	2	
归知糖疽颗粒组	3.24	11	4	1	6	1)	2	7	2	

表 3 对实验性糖尿病大鼠模型血糖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	n	血糖值(mmol·L ⁻¹)				
			药前	药后 1 周	2 周	3 周	4 周
空白对照	—	10	6.6 ± 0.26 ²⁾	6.42 ± 0.26 ²⁾	6.17 ± 0.42 ²⁾	6.1 ± 0.33 ²⁾	6.27 ± 0.27 ²⁾
模型组	—	13	23.63 ± 2.68	24.20 ± 2.11	25.20 ± 2.09	26.88 ± 2.38	26.66 ± 2.80
归知糖疽颗粒	0.81	12	22.40 ± 3.02	20.51 ± 3.24 ²⁾	22.93 ± 1.22 ²⁾	25.31 ± 1.85	25.58 ± 2.12
归知糖疽颗粒	1.62	13	23.28 ± 2.53	21.03 ± 2.33 ²⁾	23.49 ± 1.67 ¹⁾	25.88 ± 1.76	25.75 ± 1.41
归知糖疽颗粒	3.24	12	23.10 ± 2.51	20.78 ± 1.94 ²⁾	22.64 ± 2.42 ¹⁾	23.93 ± 2.49 ²⁾	24.77 ± 1.57 ¹⁾
二甲双胍组	0.2	11	24.69 ± 2.16	20.05 ± 4.48 ²⁾	18.88 ± 2.31 ²⁾	21.05 ± 2.34 ²⁾	20.39 ± 2.15 ²⁾

3.3 对小鼠耳廓微循环的影响 由表 4 可见, 对照组在造模前 10 只动物耳廓微循环血流流态均呈 0 级, 随之经尾静脉注射高分子右旋糖酐即刻至 30 min 血流流态即由 0 级变化为 II 级, 流速由快逐渐减慢, 形成血流障碍, 直至血流停止。对照药山莨菪碱组在造模后四个时段小鼠耳廓微循环血液流态明显

改善, 20 min 和 30 min 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$); 归知糖疽颗粒各组在造模后 20 min 和 30 min 作用较明显, 其中高剂量组在 20 min 和 30 min 能明显改善微循环血液流态, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$); 低剂量组 20 min 作用明显 ($P < 0.05$)。

表 4 对小鼠耳廓微循环障碍血液流态的影响 ($n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	血液流态分级															
		造模前(n)		造模后 0 min(n)		10 min(n)				20 min(n)				30 min(n)			
		0		0	I	0	I	II	III	0	I	II	III	0	I	II	III
对照组		10			10 ³⁾	6	4				9	1			4	6	
归知糖疽	1.17	10	3	7 ³⁾		8	2			5	5	1 ¹⁾		3	4	3	
归知糖疽	2.43	10		10 ³⁾		4	6			4	6				6	4	
归知糖疽	4.68	10		10 ³⁾		9	1			6	4	1 ¹⁾		4	6	2 ²⁾	
山莨菪碱组	0.02	10	2	8 ³⁾		9	1			7	3	2 ²⁾		7	2	1 ²⁾	

注: 与同时时间点对对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与同组造模前比³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

链脲佐菌素(STZ)可选择性地作用于胰岛 β 细胞, 通过释放 NO 和氧自由基, 破坏胰岛 β 细胞, 使胰岛素分泌减少, 血糖、血脂升高, 引发血管病变及周围神经病变, 诱发糖尿病性皮肤溃疡的发生^[3]。本研究首先用 STZ 引起实验性糖尿病, 在此基础上以外科手术方法制作皮肤损伤, 从而建立实验性糖尿病大鼠皮肤溃疡模型。糖尿病性皮肤溃疡属于中医“消渴”“疮疡”“坏疽”病变范畴, 有学者根据该病病因的多样性, 病机的多重性以及病程的不同时期将治则治法归纳为: 益气养阴、活血化瘀; 活血化瘀、通脉活络; 清热解毒、活血化瘀; 清热解毒、祛腐生肌和温阳通络化瘀等 5 种。归知糖疽颗粒即综合以上特点确定本复方活血养阴、清热解毒、生肌愈疮之治则。实验结果表明, 归知糖疽颗粒给药 4 周低、中、高 3 组均有较强的促进实验性糖尿病大鼠溃疡模型皮肤创面愈合作用, 创面愈合率分别达 88.55%, 89.49% 和 89.69%; 病理组织学检查显示, 归知糖疽颗粒与模型组比较对实验性糖尿病大鼠溃疡模型有

明显改善作用; 与此同时能明显的降低血糖、改善微循环这对该病的临床治疗起到关键作用, 亦成为本中药复方的独到之处。

[参考文献]

- [1] 付小兵, 王亚平, 孙一银辉, 等. 糖尿病慢性愈合创面大鼠模型的制备[J]. 上海实验动物科学, 1997, 17(4): 217-219.
- [2] 葛良鹏, 魏泓. 大鼠糖尿病溃疡动物模型的初步研究[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(2): 88-90.
- [3] 陈群力, 马灵筠, 杨五彪. 糖尿病性肢端坏疽大鼠模型的建立及实验研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2003, 17(6): 457-459.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1269.
- [5] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 上册. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 981.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 42.