

疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面 PCNA 表达 及成纤维细胞的影响

李萍^{1*}, 李光善^{1,2}, 韩秋萍³, 盛巡¹, 王芳¹, 梁代英¹, 刘欣¹, 黄启福²
(1. 北京市中医研究所, 北京 100010; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 山西运城学院, 山西 运城 044000)

[摘要] 目的: 观察疡愈涂剂对链脲佐菌素(STZ)引起的糖尿病大鼠伤口细胞增殖及体外对成纤维细胞增殖迁移的作用。方法: 实验分为正常组、模型组、疡愈涂剂高、中、低剂量组。除正常组外, 大鼠腹腔注射 STZ, 造成高血糖状态。各组动物复合背部全厚皮切除伤口。分别观察疡愈涂剂对创面愈合时间、愈合率; 采用免疫组化法观察细胞核增殖抗原(PCNA)表达; 及 MTT 法和体外伤口法观察疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面成纤维细胞的增殖和迁移作用。结果: 与模型组相比, 不同剂量的疡愈涂剂均能明显缩短 STZ 诱发糖尿病大鼠复合创伤后创面的愈合时间(分别 $P < 0.01$); 提高创面愈合率($P < 0.05$, $P < 0.01$)。创伤 3 天后疡愈涂剂高剂量组 PCNA 表达明显高于模型组; 中剂量组于 5 天后开始增高; 低剂量组 7 天后增高; 分别 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。体外研究表明疡愈涂剂在 29.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 58.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能促进糖尿病大鼠创面成纤维细胞的增殖和迁移, 分别 $P < 0.01$ 。结论: 疡愈涂剂可能通过促进糖尿病大鼠创面成纤维细胞的增殖, 从而加速创面的愈合。

[关键词] 糖尿病; 创伤愈合; 细胞增殖; 成纤维细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)03-0044-04

Effects of YangYuTuJi on PCNA Expression in the Wound of Diabetic Rats Caused by Streptozotocin and Fibroblast Proliferation and Migration in Vitro

LI Ping¹, LI Guang-shan^{1,2}, HAN Qiu-ping³, SHENG Xun¹, WANG Fang¹, LIANG Dai-ying¹, LIU Xin¹
(1. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China;
2. Department of Pathology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Department of Applied Chemistry, Yuncheng University, Shanxi 044000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of YangYuTuJi (YYTJ) on cell proliferation of diabetic rats caused by streptozotocin(STZ), and its effects on fibroblast proliferation and migration in vitro. **Methods:** SD male rats except for control group(C) were given 55mg/kg STZ by intraperitoneal, randomly divided into model group(M) and 3 different dose groups of YYTJ. A round skin of $\phi 1.6\text{cm}$ was excised on the back of rats. The healing time and healing rate were observed. Proliferation cell nuclear antigen(PCNA) was studied by immunohistochemistry assay. Fibroblasts from normal and wounded site of diabetic rat skin were cultured as normal fibroblast (NFB) and diabetic fibroblast (DFB). MTT assay was used for cell proliferation, and cell wound model in vitro for migration analysis. **Results:** Three YYTJ groups shorten the healing time of the wound of diabetic rats caused by STZ($P < 0.01$ respectively), and increased the healing rate($P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively). From day 3 the PCNA expression elevated in YYTJ-H group, day 5 in YYTJ-M group and day 7 in YYTJ-L group($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively). In vitro study we found YYTJ at both 29.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 58.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ promoted DFB proliferation and its migration. **Conclusion:** It is possible that YYTJ accelerates wound healing

[收稿日期] 2005-04-12

[通讯作者] 李萍, Tel: (010) 64016677-679; E-mail: liping411@yahoo.com.cn

by promoting cell proliferation and cell migration.

[**Key words**] Diabetic; Wound healing; Cell proliferation; Fibroblast

慢性皮肤溃疡的阴证创面当以益气、温阳、活血为治则。回阳生肌膏、回阳生肌散、回阳熏药捻等体现了这一治则,临床疗效颇佳。疮愈涂剂以此原则组方而成。细胞的增殖是创面修复的重要方面,成纤维细胞是创面的主要修复细胞。细胞核增殖抗原 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)是一种细胞周期调节蛋白,在DNA复制过程中起重要作用,是一个反映细胞增殖活性的重要指标^[1]。因此本实验在链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠复合伤口模型上,进一步观察其对创面PCNA的表达,及其对体外培养的糖尿病大鼠创面成纤维细胞增殖和迁移作用,探讨“回阳生肌”的作用基础。

1 实验材料

STZ,天青石蓝(celestin blue),天狼星红(siriuere)由Sigma公司提供;PCNA一抗由武汉博士德生物工程有限公司提供;免疫组化两步法试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供;黄芪多糖(美国泛华公司提供250mg/瓶),桂皮醛、川芎嗪、麝香酮为分析纯(含量大于99.98%)由中国药品生物制品检定所提供;疮愈涂剂(YYTJ)由以上药物以8:1;2:0.1的比例稀释于蒸馏水(含0.01%吐温80)。大剂量浓度为1.2g/mL;中剂量浓度为0.6g/mL;小剂量浓度为0.3g/mL;透明型自贴无菌不粘敷料(中国美后,5×4cm);血糖仪(美国Lifescan Smart Scan稳灵型);显微镜(日本Olympus BX51);美国Image-Pro[®] Plus Version 4.5.1(IPP)图象分析软件。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠复合皮肤创面模型复制 除对照组外,各组大鼠于实验前一次性腹腔注射STZ(溶于0.1mmol/L pH 4.2柠檬酸盐缓冲液中)55mg/kg体重。72h后取尾静脉血,用血糖仪测空腹血糖,随后每周定期检测一次空腹血糖,血糖持续保持在16.7mmol/L以上者选用。21天后大鼠腹腔注射戊巴比妥钠40mg/kg体重麻醉。剪去背部毛发,用碘伏及75%酒精棉消毒三次。用特制打孔器切取直径为1.6cm,面积为2.04cm²的皮肤组织,创面深度达到筋膜下^[2]。

2.2 实验分组 健康SD雄性大鼠280只,体重225~250g,SPF级,由中国生物制品检定所提供。实验

分为5组。(1)对照组,不注射STZ,在创伤后,于敷料的明胶海绵上滴加200μL无菌生理盐水,然后包扎伤口;(2)模型组,在糖尿病复合创伤后,同对照组处理;(3)疮愈涂剂高剂量组(YYTJ-H,1.2g/mL);(4)疮愈涂剂中剂量组(YYTJ-M,0.6g/mL);(5)疮愈涂剂低剂量组(YYTJ-L,0.3g/mL)。3个治疗组在敷料的明胶海绵上分别滴加200μL不同浓度的药物,然后用透明型自贴无菌不粘敷料包扎伤口,单笼饲养,隔日换药。

2.3 糖尿病大鼠成纤维细胞(fibroblast, FB)的体外培养 将对照组及模型组大鼠创面愈合后,取创面组织,进行成纤维细胞培养。待细胞75%融合后,消化,离心,传代,接种于25cm²培养瓶内,建立正常大鼠与糖尿病大鼠创面FB系,每4~5d传代1次。从第3代开始用于本实验。

2.4 创面愈合时间 观察记录创面完全上皮覆盖所需要的时间。

2.5 创面愈合率 在复合创伤第3、7、15、30d用数码相机照相,经图像分析计算愈合面积。创面愈合率=[(原始创面面积-现创面面积)/原始创面面积]×100%。

2.6 创面PCNA表达 取创面第3、7、11和15d组织,甲醛固定,石蜡包埋。采用免疫组化二步法染色。组织经脱蜡水化后,浸入3% H₂O₂中5min;用pH7.2的PBS缓冲液洗涤1次后,浸入0.01mol/L pH6.0枸橼酸缓冲液中进行微波抗原修复;然后加50μL一抗(PCNA经过1:100稀释),在37℃孵育1h;PBS缓冲液冲洗2次后,加入20μL二抗,在37℃孵育20min;再次用PBS缓冲液冲洗2次,DAB显色;脱水封片。在100倍光镜下,计数创面5个视野内PCNA阳性表达的细胞总数,采用IPP图象分析软件。

2.7 糖尿病大鼠创面成纤维细胞增殖 将FB调至0.5×10⁴个/mL,接种于96孔培养板。在5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养24h后,每个培养板设对照组(正常FB, NFB)、模型组(糖尿病创面FB, DFB)及治疗组,每组设6个复孔。加入含不同浓度药物的培养液。继续培养72h。在实验前加入20μL MTT,在5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养4h后,加入

100 μ L DMSO, 振荡 10min, 在酶标仪(A = 570nm)测 O. D 值, 计算增殖率。增殖率 = [(实验孔 O. D 值 - 对照孔 O. D 值) \div 对照孔 O. D 值] \times 100%。

2.8 细胞迁移测定 将 FB 调至 1×10^4 个/mL, 接种于 24 孔培养板。在 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24h 后, 用无菌特制划痕棍, 划三条宽 0.5mm 平行线。分别加入含不同药物培养液。每个培养板设 NFB 组、DFB 组及不同浓度药物组, 每组 6 个复孔。第 22h 在 100 倍镜下, 完成照相及计数。

2.9 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS12.0 软件分析, 率的检验采用 χ^2 检验, 其他采用多组间比较, 单因素方差分析(ANOVA) 进行处理。

3 实验结果

3.1 对糖尿病大鼠复合皮肤创面伤口愈合时间的影响 结果见表 1。模型组大鼠创面愈合时间明显长于对照组($P < 0.01$)。痊愈涂剂高、中、低剂量组与模型组相比, 创面愈合时间明显缩短, 统计学表现显著差异, 分别为 $P < 0.01$ 。高、中剂量组与低剂量组相比, 创面愈合时间也显著缩短, 分别为 $P < 0.01$ 。

表 1 痊愈涂剂对糖尿病大鼠复合皮肤创面伤口愈合时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	涂药量(mg)	愈合时间(d)
对照组	—	15.65 \pm 1.67 ¹⁾
模型组	—	27.13 \pm 1.81
YYTJ-H	240	16.38 \pm 1.19 ¹⁾
YYTJ-M	120	17.5 \pm 1.20 ¹⁾
YYTJ-L	60	21.38 \pm 1.30 ¹⁾

注: 与模型组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对糖尿病大鼠复合皮肤创面伤口愈合率的影响 分别计算各组大鼠创面第 3、7 和 11 d 创面愈合率, 结果见表 2。模型组大鼠创面在各时间点的创面愈合率明显小于对照组, 分别为 $P < 0.01$ 。痊愈涂剂高、中剂量组在各时点均高于模型组, 分别为 $P < 0.01, P < 0.05$ 。第 7、11 d, 痊愈涂剂高、中剂量组创面愈合率均高于低剂量组, 两者相比分别为 $P < 0.05, P < 0.01$ 。

3.3 对糖尿病大鼠复合皮肤创面 PCNA 表达的影响 结果见表 3。结果可看到在创伤的第 3d, 模型组创面的 PCNA 阳性细胞数明显少于对照组, $P < 0.05$; 而此时 YYTJ-H 组阳性表达明显升高, 与模型组相比有明显差异, $P < 0.01$; 于创伤后第 5d, YYTJ-

H、YYTJ-M 组阳性表达明显高于模型组, 分别 $P < 0.01$; 从创伤后第 7d 至第 9d, 各治疗组表达均高于模型组, 分别 $P < 0.01, P < 0.05$ 。

表 2 痊愈涂剂对糖尿病大鼠复合皮肤创面伤口愈合率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	涂药量(mg)	伤口愈合率(%)			
		3d	7d	11d	15d
对照组	—	8.45 \pm 0.91 ²⁾	42.61 \pm 4.13 ²⁾	72.48 \pm 5.11 ²⁾	97.34 \pm 1.72 ²⁾
模型组	—	6.05 \pm 0.74	22.96 \pm 3.24	32.21 \pm 3.42	44.67 \pm 3.15
YYTJ-H	240	9.06 \pm 1.17 ²⁾	37.70 \pm 2.92 ^{2,3)}	65.48 \pm 5.32 ^{2,3)}	95.21 \pm 1.57 ^{2,4)}
YYTJ-M	120	8.88 \pm 1.14 ²⁾	38.11 \pm 2.01 ^{2,3)}	66.46 \pm 3.70 ^{2,3)}	95.13 \pm 2.3 ^{2,4)}
YYTJ-L	60	6.61 \pm 1.76 ¹⁾	32.94 \pm 3.32 ²⁾	56.59 \pm 3.91 ²⁾	75.71 \pm 5.87 ²⁾

注: 与模型组相比¹⁾ $P < 0.05, ^2) P < 0.01$; 与 YYTJ-L 组相比, ³⁾ $P < 0.05, ^4) P < 0.01$ 。

表 3 痊愈涂剂对糖尿病大鼠复合皮肤创面 PCNA 表达的影响(阳性细胞数(个), $\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	涂药量(mg)	3d	5d	7d	9d
对照组	—	337.4 \pm 23.95 ¹⁾	466.2 \pm 34.37 ²⁾	703.2 \pm 61.42 ²⁾	801.6 \pm 40.41 ²⁾
模型组	—	286.8 \pm 33.21	345.2 \pm 18.27	406.2 \pm 17.94	453.2 \pm 26.35
YYTJ-H	240	395.2 \pm 37.52 ²⁾	437.4 \pm 84.04 ¹⁾	624.4 \pm 83.61 ^{2,4)}	671.8 \pm 95.32 ^{2,3)}
YYTJ-M	120	331.6 \pm 52.02	522.4 \pm 78.4 ²⁾	661.8 \pm 73.05 ^{2,4)}	718.2 \pm 79.99 ^{2,4)}
YYTJ-L	60	289.6 \pm 43.41	345.8 \pm 17.94	473.6 \pm 21.48 ²⁾	480.4 \pm 23.48 ¹⁾

3.4 对糖尿病大鼠创面来源的成纤维细胞增殖和迁移的影响 结果见表 4。结果可看到 DFB 增殖率比 NFB 降低; 而两个浓度的痊愈涂剂对 DFB 均有促增殖作用, 分别 $P < 0.01$ 。DFB 在细胞伤口 22h 时, 细胞迁移数明显少于 NFB, 而两组治疗组均比模型组明显提高, 分别 $P < 0.01$, 并接近 NFB 组。

表 4 痊愈涂剂对糖尿病大鼠创面来源的成纤维细胞增殖和迁移的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	浓度(μ g/mL)	增殖率(%)	迁移细胞数(细胞数)
NFB	—	100	92.64 \pm 7.50 ²⁾
DFB	—	—	11.43 \pm 0.44
YYTJ	29.23	22.75 \pm 0.75 ²⁾	18.33 \pm 1.63
	58.45	23.73 \pm 0.58 ²⁾	83.83 \pm 4.71 ²⁾
			87.50 \pm 4.37 ²⁾

注: 与 DFB 组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

成纤维细胞是创面愈合过程中的主要修复细胞, 是构成肉芽组织的主要成分, 也是合成和分泌胶原、纤维连接蛋白和透明质酸等细胞外基质的主要

细胞; 并可通过分泌多种细胞因子来参与创伤愈合, 分泌胶原酶来参与创伤修复后的组织改建过程。

成纤维细胞在慢性创面中的增殖发生障碍, 是直接影响创面愈合的重要原因。越来越多的证据表明, 在体外培养的糖尿病成纤维细胞表现出选择性能力下降, 对组织修复中包括细胞迁移, VEGF 产生, 对缺氧的反应性都减弱及对细胞因子的反应性降低^[3,4]。糖尿病小鼠创面的成纤维细胞增殖与迁移明显低于正常成纤维细胞^[5]。糖尿病溃疡患者的成纤维细胞比同年龄正常对照者的增殖明显缓慢^[6]。表明创面细胞增殖的障碍是糖尿病伤口愈合迟缓的重要原因之一。

STZ 对胰岛 β 细胞产生选择性毒害作用。本实验证实 55mg/kg 的 STZ 一次性腹腔注射, 1 周后大鼠血糖全部高于 16.7mmol/L。3 周后制备创面模型, 发现大鼠创面愈合时间明显比对照组延长; 在各时点的愈合率明显低于对照组; 而且创面 PCNA 表达明显减少。体外的实验也表明糖尿病大鼠创面的成纤维细胞增殖率及迁移能力要低于正常大鼠, 表明 STZ 造成的糖尿病过程明显影响了创面成纤维细胞增殖。

疡愈涂剂以黄芪多糖、桂皮醛、川芎嗪、麝香酮组成, 在前期的体外研究中我们发现其中黄芪多糖、桂皮醛对糖尿病大鼠伤口来源的成纤维细胞、人正常成纤维细胞和慢性溃疡疮周的成纤维细胞都表现出促增殖作用^[7,8]。本研究在以往的基础上发现其复方在体外对 STZ 诱导的糖尿病大鼠创面具有明显的修复作用。其高、中、低剂量都在不同程度上提高创面的愈合速率, 并缩短创面的愈合时间。高剂量组从第 3d 起创面的 PCNA 表达就明显高于对照组; 中剂量从第 5d 起升高, 低剂量于第 7d 升高, 表明疡愈涂剂对创面的细胞增殖有明显的促进作用。体外

研究也同样表明疡愈涂剂对糖尿病大鼠创面来源的成纤维细胞有促增殖和迁移作用。提示疡愈涂剂可以通过促进糖尿病大鼠创面细胞增殖而加速创面的愈合。

[参考文献]

- [1] Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms[J]. J Pathol. 1990, 162(4): 285-294.
- [2] 付小兵, 王亚平, 孙同柱, 等. 糖尿病慢性难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.
- [3] Loot MA, Kenter SB, Au FL, et al. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls [J]. Eur J Cell Biol. 2002, 81(3): 153-160.
- [4] Kim BC, Kim HT, Park SH, et al. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- β signaling and decreased TGF- β Type II receptor expression[J]. J Cell Physiol. 2003, 195(3): 331-336.
- [5] Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, et al. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia [J]. Am J Pathol. 2003, 162(1): 303-312.
- [6] Reenstra WR, Veves A, Orlov D, et al. Decreased Proliferation and Cellular Signaling in Primary Dermal Fibroblasts Derived from Diabetics versus Non-diabetic Sibling Controls[J]. Acad Emerg Med 2001, 8(5): 519.
- [7] 李光善, 李萍, 盛巡, 等. 黄芪多糖、桂皮醛、川芎嗪对实验性糖尿病大鼠创面成纤维细胞增殖作用的影响[J]. 中国中医基础理论杂志, 2004, 10(4): 20-22.
- [8] 李萍, 何秀娟, 张颖, 等. 黄芪多糖对细胞增殖及对血管内皮细胞与白细胞粘附作用的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(9): 1677-1680.