

消毒愈肌膏对大鼠糖尿病足溃疡组织 BMP-9、TGF- β 1 表达的影响

郑德松 李旗 田福玲 刘国荣 陈金铭 马树祥 崔建美 王洪彬 李雪青

【摘要】 目的 观察消毒愈肌膏对大鼠糖尿病足溃疡组织骨形态发生蛋白-9 (bone morphogenetic protein-9, BMP-9) 和转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 表达的影响。**方法** 选用链脲佐菌-素腹腔注射与薄铁片固定法制备模型,按随机数字表法分为中药组、模型组、BMP-9 对照组和 TGF- β 1 对照组,每组 20 只,并将大鼠足部溃疡处分别外敷消毒愈肌膏和无菌盐水,腹腔注射外源性 BMP-9、TGF- β 1,30 天后取四组溃疡组织标本,采用 miRCU-RYTm 芯片检测各组基因并分析基因表达。**结果** BMP-9 对照组和中药组中 BMP-9 基因表达明显增加,与模型组相比有显著差异 ($P \leq 0.01$),BMP-9 对照组与中药组 BMP-9 基因相比有显著差异 ($P \leq 0.05$);TGF- β 1 对照组和中药组 TGF- β 1 基因表达明显增高,与模型组相比有显著差异 ($P \leq 0.01$),TGF- β 1 对照组与中药组相比,TGF- β 1 基因表达无明显差异 ($P \geq 0.05$),中药组中 BMP-9 和 TGF- β 1 表达变化呈显著正相关。**结论** 消毒愈肌膏能显著调控 BMP-9、TGF- β 1 表达水平,间接刺激组织细胞的分裂增殖,以利于创伤修复。

【关键词】 消毒愈肌膏; 糖尿病足; 骨形态发生蛋白-9; 转化生长因子 β 1

【中图分类号】 R 587.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.07.002

Analysis on effects of Xiaodu Yuji Paste on of the ulcer diabetic feet by BMP-9, TGF- β 1 gene expression ZHENG De-song, LI Qi, TIAN Fu-ling, et al. College of TCM, Hebei Unite University, Tangshan 063000, China

Corresponding author: LI Qi, E-mail: liqi19801211@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Xiaodu Yuji Paste on treatment of diabetic feet from the level of genome. **Methods** 80 rats of diabetic foot ulcer were randomly divided into four groups (20 each) to receive traditional Chinese medicine, intraperitoneal injection of exogenous BMP-9, TGF- β 1 and saline for 30 days. Total RNA was extracted from the tissue collected near the wound, and the expression profile of gens demonstrated using the miRCU-RYTm for rats. **Results** The levels of serum BMP-9 in BMP-9 group and TCM group were significantly higher than those in model group. The levels of serum BMP-9 in TCM group were significantly higher than those in BMP-9 group. The levels of serum TGF- β 1 in TGF- β 1 group and TCM group were significantly higher than those in model group. There are not difference in the levels of serum TGF- β 1 in TGF- β 1 group and TCM group. The levels of serum BMP-9 and TGF- β 1 are significantly positively related to change in TCM group. **Conclusion** These findings suggest that the Xiaodu Yuji Paste can regulate the differential expression of some genes. Indirect stimulation of cell proliferation, in order to facilitate wound healing.

【Key words】 Xiaodu Yuji Paste; Diabetic foot; BMP-9; TGF- β 1

基金项目:唐山市科技计划(121302118b)

作者单位:063000 唐山,河北联合大学附属医院康复科(郑德松);河北联合大学中医学院(李旗、田福玲、马树祥、崔建美、王洪彬、李雪青),校医院(刘国荣),中药学院(陈金铭)

作者简介:郑德松(1982-),硕士,主治医师。研究方向:中西医结合内分泌系统疾病。E-mail: 58761595@qq.com

通讯作者:李旗(1980-),硕士,讲师。研究方向:中西医结合内分泌系统疾病。E-mail: liqi19801211@163.com

糖尿病足是糖尿病常见的、严重的临床并发症之一,局部溃疡既是糖尿病足的一种临床主要表现形式,也是糖尿病足恢复的一大障碍。本研究应用消毒愈肌膏对大鼠糖尿病足溃疡进行干预,观察基因骨形态发生蛋白-9(bone morphogenetic protein-9, BMP-9)和转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 表达的变化,为糖尿病足的临床防治提供理论依据和实验基础,对糖尿病足的发展、维持和预后形成新认识,并在此基础上开展相应的防治措施。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药品

消毒愈肌膏由黄连 20 g、黄柏 30 g、白芷 25 g、甘草 60 g、当归 10 g、血竭 20 g、轻粉 20 g、虫白蜡 10 g、紫草 10 g、麻油 500 g 组成(参照《中国药典》2005 年版一部,由河北联合大学附属医院制剂室制备)。TGF- β 参照文献方法,从人血小板中提纯鉴定^[1]。BMP 参照文献方法,从牛皮质骨中提纯鉴定^[2]。焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC), TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司, RNeasy Mini kitRNA 试剂盒购于 QIAGEN 公司, miRCU-RYTMArray Power 标记试剂盒、PhalanxTM 的热收缩杂交袋及 miRCU-RYTM(v. 11.0)芯片购于 Exiqon 公司, Prime-ScriptTMRT Reagent kit 逆转录试剂盒及 SYBR(Premix ExTaqTM)实时定量 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司,目的基因及内参引物均由奥科生物技术公司合成, GenePix pro V6.0 和 AxonGenePix 4000B 芯片扫描分析仪购于美国 Axon 公司, NanoDrop(ND-1000)购于摩根生物科技公司。

1.2 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半(河北联合大学动物实验中心提供,动物合格证号为 SCXK11-00-0010),按随机数字表法分为中药组、BMP-9 对照组、TGF- $\beta 1$ 对照组、模型组,每组 20 只。中药组:在患处外敷消毒愈肌膏无菌纱布条外敷,无菌纱布包扎,每 2 天换药 1 次,观察 30 天。BMP-9 对照组:腹腔注射外源性 BMP-9, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每两天注射一次,观察 30 天。TGF- $\beta 1$ 对照组:腹腔注射外源性 TGF- $\beta 1$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每两天注射一次,观察 30 天。模型组:在患处应用无菌盐水,无菌纱布包扎,每 2 天换药 1 次,观察 30 天。

1.3 模型制备

参考文献^[3],选用 Wistar 大鼠饲养 28 天后,禁食 6 小时后,以 pH = 4.2, 0.1 mmol/L 的枸橼酸钠缓冲液在 4℃ 条件下,链脲佐菌素 STZ 配成 1% 溶液,以 55.0 mg/kg 的剂量在大鼠空腹时左下腹注射,注射后第 5 天起连续 3 天监测空腹血糖,空腹血糖在 12.0 mmol/ml 以上者(80 只)入选继续造模。选择大鼠的足背皮肤,用薄铁片固定,持续按压直径 5 mm 的铁片,每次 30 分钟,每天 2 次。按压后用 50% 冰醋酸涂抹创面,连续刺激 1 周后形成缺损性皮肤溃疡大鼠模型。

1.4 检测指标

溃疡区组织 BMP-9, TGF- $\beta 1$ 含量。

1.5 基因表达谱检测

取大鼠足背部溃疡区组织标本,置液氮中保存。标本总 RNA 抽提及质量检测:每 100 mg 组织标本,加入 1 ml 的 Trizol 提取总 RNA,应用 kitRNA 纯化总 RNA。使用 NanoDrop 测定 RNA 在分光光度计 260 nm、280 nm 和 230 nm 的吸收值,计算浓度并评估纯度。另外,进行变性琼脂糖凝胶电泳,紫外透射光下观察并拍摄,以检测 RNA 纯度及完整性。RNA 的标记及芯片杂交:采用 miRCU-RYTMArray Power 标记酶将 Hy3TM 荧光基团标记 RNA,得到用于与芯片杂交的荧光探针。在标准条件下使用 PhalanxTM 的热收缩杂交袋将标记好的探针和 miRCU-RYTM 芯片进行杂交。采用 AxonGenePix 扫描芯片的荧光强度,使用 GenePix pro 进行 BMP-9, TGF- $\beta 1$ 含量数据分析及统计处理。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, BMP-9 和 TGF- $\beta 1$ 作为计量资料,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

BMP-9 对照组和中药组中 BMP-9 基因表达明显增加,与模型组相比有显著差异($t = 12.740, P = 0.000$; $t = 3.947, P = 0.009$), BMP-9 对照组与中药组 BMP-9 基因表达相比有显著差异($t = 3479, P = 0.03$); TGF- $\beta 1$ 对照组和中药组中 TGF- $\beta 1$ 基因表达明显增高,与模型组相比有极显著差异($t = 7.024, P = 0.000$; $t = 8.193, P = 0.009$), TGF- $\beta 1$ 对照组与中药组相比, TGF- $\beta 1$ 基因表达无明显差异($t = 0.240, P = 0.813$), BMP-9 和 TGF- $\beta 1$ 表达变化

呈显著正相关($r=0.951, P\leq 0.000$), 见表 1。

表 1 BMP-9 和 TGF- β 1 在糖尿病足
溃疡组织表达($\bar{x}\pm s, n=20$)

组 别	BMP-9 ($\mu\text{g} / \text{L}$)	TGF- β 1 ($\mu\text{g} / \text{L}$)
模型组	83.268 \pm 12.36 ^a	698.32 \pm 75.12 ^a
BMP-9 对照组	206.33 \pm 45.32 ^b	—
TGF- β 1 对照组	—	1326.45 \pm 401.39 ^c
中药组	153.02 \pm 33.68	1283.99 \pm 312.94

注:与 BMP-9、TGF- β 1 对照组和中药组比较^a $P<0.01$;与中药组比较^b $P<0.05$,^c $P>0.05$

3 讨论

本研究中消毒愈肌膏是以《外科正宗》生肌玉红膏为主方,加上黄连,黄柏,其功用具有解毒消肿、生肌止痛。诸多研究报道表明 TGF- β 1 在糖尿病创面愈合过程中的具有积极作用,在组织修复病理过程中具有调节血管和成纤维细胞增生、间质蛋白合成等作用,同时可以中和抗体的应用大大减少了纤维细胞介质对皮肤成纤维细胞增殖、迁移和胶原收缩的影响^[4-6]。另一方面,TGF- β 1 可抑制 NO/cGMP 信号以确保其对皮肤成纤维细胞胶原生产的刺激作用,在一定程度上不仅利于创面愈合,而且对于组织疤痕的形成有一定的抑制作用^[7-9]。本研究经过对各组实验数据的分析发现,TGF- β 1 对照组和中药组 TGF- β 1 基因表达明显增高,与模型组相比有显著差异($P<0.01$),证明消毒愈肌膏能显著调控 TGF- β 1 表达水平,间接刺激组织细胞的分裂增殖,以利于创伤修复。

近几年研究发现,BMP-9 可诱导骨骼肌源性干细胞的成骨分化,骨骼肌源性干细胞存在于骨骼肌中,它是一种具有分化为肌细胞等多种细胞系能力的细胞^[10-12]。BMP-9 对照组和中药组 BMP-9 基因明显增加,与模型组相比有极显著差异($P<0.01$),BMP-9 对照组与中药组 BMP-9 基因相比有显著差异($P<0.05$)证明消毒愈肌膏能显著调控 BMP-9 表达水平,间接刺激肌组织细胞的分裂增殖,以利于创伤修复。

在消毒愈肌膏干预下,基因表达发生积极的变化,对糖尿病足溃疡组织愈合提供生物基础。但消毒愈肌膏成分复杂、途径繁多、靶点多样的

特点,基因的变化受到多种因素的影响,这些基因是始动因素还是下游产物,就基因谱表达本身尚难定论,需要在后续的研究中进一步的验证和探讨。

参 考 文 献

- [1] 唐康来,杨柳,卢卫忠,等.人血小板中 TGF-B 的提取纯化及鉴定[J].第三军医大学学报,1999,21(11):880-884.
- [2] 卢卫忠,唐康来,朱庆和,等.TGF-B 和 BMP 对胎兔颅骨成骨样细胞增殖和分化相互作用的实验研究[J].中华创伤骨科杂志,2004,6(4):450-452.
- [3] 陈群力,杨五彪,马灵筠.实验性糖尿病足大鼠模型的建立[J].河南预防医学杂志,2004,15(1):1-3.
- [4] Schor SL, Ellis IR, Jones SJ, et al. Bistable switch in MSF expression is regulated by the concerted signalling of TGF- β 1 and the extracellular matrix[J]. Int J Cancer, 2012,130(9):2024-2032.
- [5] Adams DH, Ruzehaji N, Strudwick XL, et al. Attenuation of Flightless I, an act in-remodelling protein, improves burn injury repair via modulation of transforming growth factor (TGF)-betal and TGF-beta3[J]. Br J Dermatol, 2009,161(2):326-336.
- [6] Wang JF, Jiao H, Stewart TL, et al. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts[J]. Wound Repair Regen, 2007,15(1):113-121.
- [7] Chu AJ, Prasad JK. Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production incultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling[J]. J Am Coll Surg, 1999,188(3):271-280.
- [8] Nishimura T, Nishiura T, deSerres S, et al. Transforming growth factor-betal and splenocyte apoptotic cell death after burn injuries[J]. J Burn Care Rehabil, 2000,21(2):128-134.
- [9] Yang L, Chan T, Demare J, et al. Healing of burn wounds in-transgenic mice overexpressing transforming growth factor-betal in the epidermis[J]. Am J Pathol, 2001,159(6):2147-2157.
- [10] 李翔,林春阳,邱北溟,等.骨形态发生蛋 9 诱导骨骼肌源性干细胞的成骨分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(32):5971-5974.
- [11] Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, et al. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing [J]. J Cell Biol, 2000,150(5):1085-1100.
- [12] Matsumoto T, Cooper GM, Gharaibeh B, et al. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1[J]. Arthritis Rheum, 2009,60(5):1390-1405.

(收稿日期:2013-06-09)

(本文编辑:黄凡)