

# 中药“蚓黄散”对大鼠糖尿病溃疡创面形态及促愈因子的影响

李友山 杨博华 冀凌云

**【摘要】 目的** 应用中药“蚓黄散”外治糖尿病足溃疡,观察其对创面组织愈合过程中的促进作用,探讨大鼠糖尿病溃疡愈合的作用机制。**方法** 建立大鼠糖尿病足溃疡模型后设模型组、西药组、中药组各 10 只,另设空白组 10 只,空白组及模型组创面不予干预,西药组予甲硝唑注射液外敷,中药组予“蚓黄散”外敷,治疗 10 天后检测大鼠血清中晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGEs)、炎性因子及生长因子含量;增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、CD34 染色分别检测创面肉芽组织中成纤维细胞数、新生毛细血管数;HE 染色观察组织形态学变化。**结果** 与模型组比较,药物干预后大鼠血清中 AGEs 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-1、C-反应蛋白均可降低,碱性成纤维因子、表皮细胞生长因子、血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子水平均有所提高,创面肉芽组织中新生毛细血管数、成纤维细胞数均增多( $P<0.05$ ),而中药组均作用显著( $P<0.05$ )。**结论** “蚓黄散”可明显促进大鼠糖尿病溃疡创面的愈合,其机制可能与改善大鼠的炎性状态,提高大鼠血清中生长因子含量,降低 AGEs 水平,促进新生毛细血管、成纤维细胞的增殖有关。

**【关键词】** 蚓黄散; 创面愈合; 炎性因子; 生长因子; 晚期糖基化终末产物

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.01.003

**Effect of Yinhuangsans on morphology of ulcer wound and ulcer healing factors on diabetic rats** LI You-shan, YANG Bo-hua, JI Ling-yun. Department of peripheral vascular, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding Author: LI You-shan, E-mail: lys4626@sina.com

**【Abstract】 Objective** To study the role of traditional Chinese medicines (TCM) “Yinhuangsans” in the external treatment of diabetic foot ulcers by observing the process of the wound tissue healing and exploring the mechanism of the rat diabetic ulcer healing. **Methods** Diabetic foot ulcer model was established and the rats were randomly divided into model group, western medicine group and TCM group, 10 rats in each group, rats in all groups were respectively by gavage given oral no drug, metronidazole and Yinhuangsans. Another 10 normal rats were set as control group without drug treatment. After 10 days of treatment, the contents of AGEs, inflammatory factor and growth factor in serum were detected. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining and CD34 staining were respectively used to detect the number of fibroblast and number of newly born capillaries in granulation tissue. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe morphological changes. **Results** Compared with the model group, the content of AGEs, tissue necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) and C-reactive protein (CRP) were reduced after drug intervention, basic fibroblast growth factor (bFGF), endothelial growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet derived growth factor (PDGF) were increased after drug intervention, newly born capillaries and fibroblasts were increased in granulation tissue ( $P<0.05$ ), and the effect of TCM group was more pronounced than western medicine group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Yinhuangsans can

基金项目: 国家自然科学基金(81302980)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院周围血管科

作者简介: 李友山(1979-), 博士, 副主任医师。研究方向: 中医外科周围血管病研究。E-mail: lys4626@sina.com

significantly promote the healing of ulcer wound in diabetes rats. The mechanism may be related to reducing inflammatory factor and AGEs in rat serum while improving growth factor, in rat serum, and promoting newly born capillaries and fibroblasts proliferation in the granulation tissue.

**【Key words】** *Yinhuangsan*; Wound healing; Inflammatory factor; Growth factor; Advanced glycosylation end products

糖尿病足的发病是一个多方面的、复杂的疾病,发病机制存在多种学说。近年来,糖尿病足的脂毒性和糖毒性成为研究重点,其中晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGEs)在皮肤组织的大量蓄积导致组织细胞学行为的改变已经成为关注热点<sup>[1]</sup>。研究表明,高血糖及 AGEs 的蓄积不仅造成微血管及外周血管的损伤,还可造成多种血管、神经营养因子的表达降低,这可能是糖尿病足溃疡难以愈合的重要环节<sup>[2]</sup>。糖尿病足溃疡愈合是一个动态的病理、生理过程,在修复过程中分为炎症期、肉芽组织形成期、瘢痕重塑期 3 个连续而又相互重叠的阶段<sup>[3]</sup>。糖尿病足溃疡当属中医“脱疽”“消渴”的范畴,中医多认为该病的主要病机为:气阴亏虚、瘀血阻络、外感湿热<sup>[4]</sup>。笔者认为湿热与毒瘀是糖尿病足溃疡的主要致病因素,所以中医外治重在清热解毒利湿。中药“蚓黄散”由黄柏、地龙、血竭共三味传统中药组成,以清热解毒利湿为法,祛腐与生肌并重的治疗原则,以达到促进创面愈合的目的,一定程度上降低了截肢率<sup>[5]</sup>。

本实验研究应用“蚓黄散”干预糖尿病足溃疡后,创面组织愈合过程中 AGEs、炎性因子——肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、超敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 及生长因子——碱性成纤维因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮细胞生长因子 (endothelial growth factor, EGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 的细胞生物学活性变化,进一步探讨糖尿病足溃疡愈合的相关机制与作用环节。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与药品

链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) (购自 sigma-aldrich, 批号:20120728); 柠檬酸、柠檬酸钠 (购自北京化学试剂厂, 批号:051024); 酶联免疫试剂盒 (购

自上海联硕生物科技有限公司, 批号:23064D433); 免疫组化 PCNA 检测试剂盒 (ZM-0213) (购自北京中杉金桥生物制品有限公司, 批号:13132A10); 免疫组化 CD34 检测试剂盒 (ZM-0046) (购自北京中杉金桥生物制品有限公司, 批号:12201110)。

### 1.2 实验动物与饲料

SD 大鼠, 体质量 80 ~ 100 g, SPF 级, 雄性, 购自中国医学科学院动物所。饲料 (高脂高糖) 配方: 基础饲料 67.5%、蔗糖 20%、猪油 10%、蛋黄 2.5%。

### 1.3 STZ 溶液制备

取柠檬酸 A 溶液和柠檬酸钠 B 溶液, 按照 A : B = 1 : 1.32, 配制 BX 缓冲液, 精确称量 STZ, 按 1% 浓度溶于 BX 缓冲液中。(注意: STZ 见光自然分解, 需避光, 并在冰浴中配制, 要求 15 分钟内使用完毕)。STZ 注射剂量公式: (体重  $\times$  STZ 预设给药剂量) / 1000 = STZ 用量 (mg)

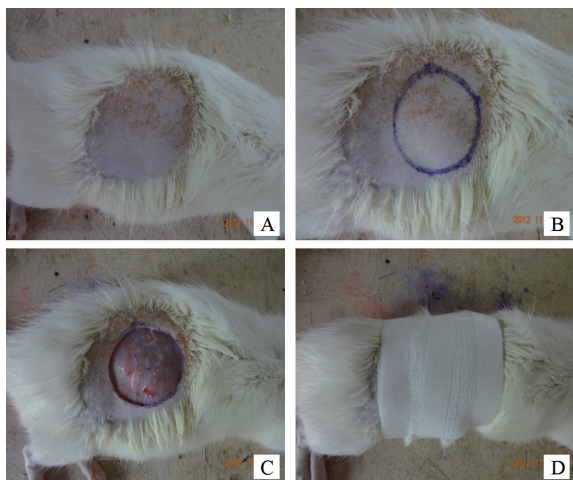
### 1.4 药物制备

“蚓黄散”由北京康仁堂药业有限公司制备, 黄柏 30 g、地龙 20 g、血竭 10 g, 共三味中药各粉碎成细粉 (过六号筛)。对照药选用甲硝唑葡萄糖注射液 (购自北京双鹤药业股份有限公司, 国药准字 1102161)。

### 1.5 实验方法

**1.5.1 糖尿病溃疡大鼠模型制备** 大鼠用高脂高糖饲料喂养一个月, 腹腔注射 STZ 40 mg/kg 制备糖尿病大鼠模型。成模后用龙胆紫在大鼠背部脱毛区标记造模面积, 在无菌条件下, 将造模区皮肤剪去, 深达筋膜。六层医用纱布覆盖创面, 用医用纸胶带包扎固定。见图 1。

**1.5.2 给药方法** 将糖尿病溃疡成模后大鼠随机分为 3 组, 模型对照组 (简称: 模型组) 10 只、西药组 10 只、中药组 10 只; 普通 SD 大鼠 10 只设为空白组。空白组、模型对照组大鼠创面不予处理, 西药组创面外敷甲硝唑葡萄糖注射液小纱布 (4 cm  $\times$  4 cm), 予医用纸胶带包扎固定, 每天 1 次; 中药组创面外敷“蚓黄散”, 六层医用小纱布覆盖创面 (4 cm  $\times$  4 cm), 予医用纸胶带包扎固定, 每天 1 次, 观察 10 天。见图 2。



A 脱毛; B 标记; C 造模; D 包扎

图1 糖尿病溃疡大鼠模型制备

**1.5.3 血清的采集和检测** 取大鼠腹主动脉血液,采用酶联免疫法检测大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1、hs-CRP、EGF、bFGF、VEGF、PDGF、AGEs 的含量。

**1.5.4 肉芽组织的采集及 HE 染色** 创面中心点取肉芽组织(5 g 左右),用 4% 中性多聚甲醛灌注固定,清水冲洗,浸泡,脱水,透明,浸蜡,用石蜡包埋,切片(切片厚 5  $\mu$ m)。HE 染色后,围绕皮肤结构和功能的微小单位(再生结构单位),进行观察比较。采用多功能荧光显微镜(BX60,日本 OLYMPUS 公司)观察组织创面和周围组织的病理形态。

**1.5.5 肉芽组织成纤维细胞数、毛细血管表达检测(PCNA、CD34 染色法)** 大鼠创面肉芽组织石蜡切片采用 PCNA、CD34 免疫组织化学染色 SP 方法:包括防脱处理、脱蜡、灭活内源性酶、热修复抗原、滴加 PCNA(CD34)单克隆抗体,DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。

## 1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计处理。实验数

据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,先进行正态性和方差齐性检验,符合正态分布和方差齐性的数据采用单因素方差分析,多组之间的两两比较采用 LSD 法;不符合正态分布的采用非参数检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 炎症因子及生长因子变化

与空白组比较,模型组大鼠血清中炎症因子显著升高,生长因子显著下降,AGEs 显著升高,差异显著( $P<0.01$ )。与模型组比较,西药组和中药组大鼠血清中炎症因子显著下降,生长因子显著升高,AGEs 显著下降,差异显著( $P<0.01$ )。与西药组比较,中药组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 下降,差异显著( $P<0.01$ ),生长因子显著升高,AGEs 显著下降。见表 1。

### 2.2 大鼠肉芽组织石蜡切片 HE 染色光镜观察结果

空白组可见较少的炎性细胞,大量成纤维细胞,细胞较大,胞浆较多,核仁着色明显。模型组可见较多的中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞,成纤维细胞数量很少,少许新生毛细血管。中药组可见少量的炎性细胞,成纤维细胞数量较多,细胞较大,胞浆较多,核仁着色明显。西药组可见少量的炎性细胞,但较中药组较多,成纤维细胞数量较中药组少,细胞胞体外形较小,胞浆突起不明显。见图 3。

### 2.3 免疫组化

与空白组比较,模型组大鼠新生毛细血管数密度及成纤维细胞数显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,西药组和中药组的新生毛细血管数密度及成纤维细胞数显著升高( $P<0.05$ )。与西药组比较,中

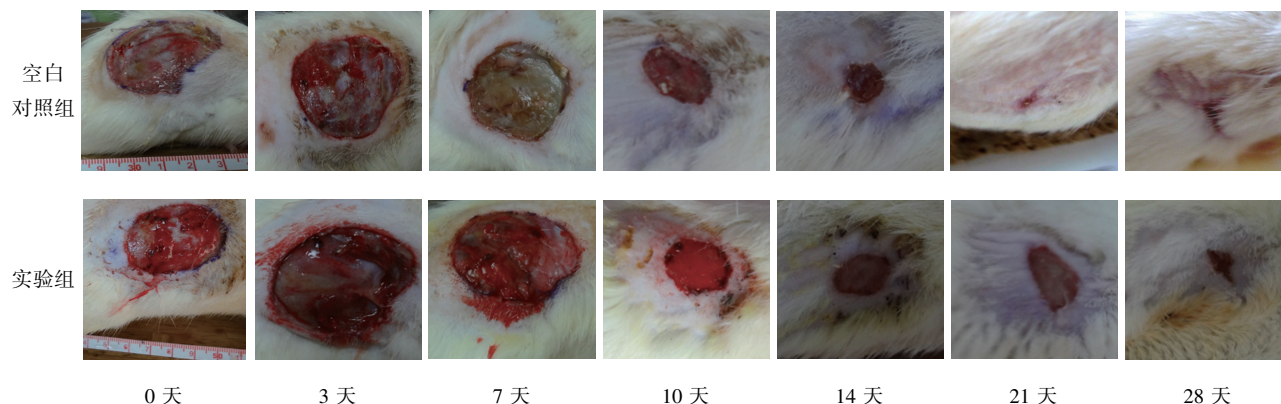


图2 空白对照组与实验组创面情况

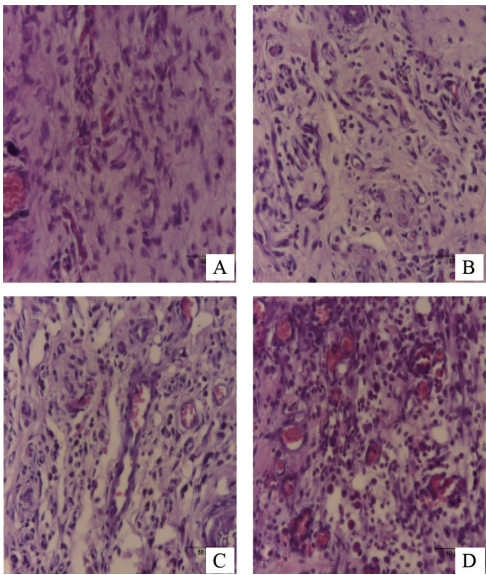


表 1 各组大鼠炎症因子及生长因子检测结果

项目	n	TNF-α (ng/L)	hs-CRP (ng/L)	IL-1 (ng/L)	bFGF (ng/mL)	EGF (ng/mL)	VEGF (pg/mL)	PDGF (ng/mL)	AGEs (ng/mL)
空白组	10	17.51±0.39	0.33±0.03	4.99±0.23	3.04±0.35	903.52±25.60	84.38±6.26	1.43±0.10	55.09±5.82
模型组	10	21.71±1.17 <sup>a</sup>	0.56±0.08 <sup>a</sup>	5.68±0.43 <sup>a</sup>	2.20±0.33 <sup>a</sup>	661.34±30.5 <sup>a</sup>	65.36±2.80 <sup>a</sup>	1.25±0.02 <sup>a</sup>	72.16±5.97 <sup>a</sup>
西药组	10	18.06±0.59 <sup>b</sup>	0.42±0.05 <sup>b</sup>	4.56±0.40 <sup>b</sup>	3.5±0.37 <sup>b</sup>	862.35±33.94 <sup>b</sup>	84.76±2.86 <sup>b</sup>	1.47±0.09 <sup>b</sup>	54.84±6.01 <sup>b</sup>
中药组	10	17.66±0.49 <sup>b</sup>	0.35±0.08 <sup>bc</sup>	4.23±0.40 <sup>bc</sup>	4.47±0.32 <sup>bc</sup>	968.15±30.02 <sup>bc</sup>	95.74±3.02 <sup>bc</sup>	1.64±0.04 <sup>bc</sup>	46.96±2.16 <sup>bc</sup>

注：与空白组比较，<sup>a</sup>*P*<0.01；与模型组比较，<sup>b</sup>*P*<0.01；与西药组比较，<sup>c</sup>*P*<0.01。

药组新生毛细血管数密度及成纤维细胞数显著升高(*P*<0.05)。见表 2。



A 空白组； B 模型组； C 西药组； D 中药组

图 3 各组大鼠肉芽组织石蜡切片 HE 染色(×40)

表 2 各组大鼠毛细血管数密度及成纤维细胞数检测结果

项目	n	新生毛细血管 数密度情况(×10 <sup>-5</sup> /μm <sup>2</sup> )	成纤维细胞数 (数量/每视野)
空白组	10	8.02±0.48	348.24±6.12
模型组	10	4.47±0.32 <sup>a</sup>	157.19±5.23 <sup>a</sup>
西药组	10	6.56±0.27 <sup>b</sup>	259.46±6.71 <sup>b</sup>
中药组	10	7.13±0.17 <sup>c</sup>	302.25±4.15 <sup>c</sup>

注：与空白组比较，<sup>a</sup>*P*<0.01；与模型组比较，<sup>b</sup>*P*<0.01；与西药组比较，<sup>c</sup>*P*<0.01。

3 讨论

3.1 炎症因子对糖尿病溃疡后创面愈合的影响

hs-CRP 是一种非特异性的炎症标志物,由内皮细胞、巨噬细胞和脂肪细胞衍生的促炎症细胞因子(IL-1、TNF-α 等)诱导肝脏产生<sup>[6]</sup>。本病为慢性创面,hs-CRP 持续较高水平将成为创面缺血的因素之一,不利于创面愈合。因此,降低 hs-CRP 的含量,将有效地控制炎症的发生,也减少了创面缺血的发生

几率。TNF-α 主要由单核细胞和巨噬细胞产生,也可由一些炎症细胞分泌,具有多种生物效应,既可增强中性粒细胞的吞噬能力,又抑制肿瘤细胞的产生,作用于肝脏,使 hs-CRP 产生增多<sup>[7]</sup>。IL-1 参与各种炎症现象及新陈代谢和细胞修复。另外,IL-1 作为内分泌激素,可以激发全身的炎症反应,使机体表现为应激状态,对免疫系统内细胞有调节作用<sup>[8]</sup>,与创伤修复密切相关。局部炎症反应对组织造成有一定的损害,降低 hs-CRP、IL-1、TNF-α 等炎症介质的过度合成和释放,有利于控制炎症反应程度,进而有利于创面的愈合。

本实验的结果可以看出经药物干预后大鼠血清中 hs-CRP 和 TNF-α、IL-1 均可降低,而中药治疗组降低 TNF-α、IL-1 作用显著,考虑虻黄散能较好地改善大鼠的炎症状态,这可能与促进创面的愈合有关。

3.2 生长因子对糖尿病溃疡后创面愈合的影响

既往研究表明糖尿病足局部组织 bFGF 的表达并不减少,但大量被糖基化,失去了应有的生物学活性,因此在 bFGF 蛋白被大量糖基化的情况下,加之新生的 bFGF 不足,可能是糖尿病足溃疡创面难以愈合的重要原因之一<sup>[9-10]</sup>。EGF 是一类对多类细胞生长有促进或抑制作用的多肽。体内 EGF 受体与 EGF 结合后,形成受体 EGF 复合物,通过一系列生化反应调控细胞增殖的一系列重要基因,启动创面修复的过程,并对上皮细胞有强烈的促生长作用<sup>[11]</sup>。VEGF 有利于毛细血管融合成较大血管,调节血管内皮细胞的增殖与迁移、促进新生毛细血管的形成<sup>[12]</sup>。在创伤愈合过程中,VEGF 协同 FGF 刺激内皮细胞生长,促进创面血管化的进程<sup>[13]</sup>。PDGF 是一种由巨噬细胞、内皮细胞等释放,储存于血小板 α 颗粒中的血清生长因子。PDGF 可作用于组织修复细胞,加速细胞增殖,促进伤口愈合<sup>[14]</sup>。在创面修复不同过程中,各种生长因子分别起到趋化作用、合成分泌作用、增殖分化作用、诱导凋亡、刺激血管新生等多种生物效应,从而促进创面愈合。当创面内源性生长因子种类、含量

平衡失调或其受体活性下降时,可导致创面修复困难。

本实验研究的结果可以看出经药物干预后大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF、PDGF 水平均可以提高,而蚓黄散可以显著地提高大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF、PDGF 水平,促进糖尿病溃疡的愈合。

### 3.3 AGEs 对糖尿病溃疡后创面愈合的影响

AGEs 是正常体内氨基酸和还原糖生成的阿马多里(Amadori)产物经过一系列脱水、氧化及化学重排,产生高度活性的羰基化合物,进而与蛋白质的自由氨基起反应而凝聚成的不可逆的终末产物<sup>[16]</sup>。持续高糖状态下,糖的醛基与蛋白质的氨基可生成 AGEs,生长因子糖基化时,其功能活性降低,从而影响修复细胞的增殖和迁移;糖基化过程中,可引起蛋白质的断裂;神经鞘磷脂的糖基化可使吞噬细胞分泌蛋白酶,进而引起神经脱髓鞘病变<sup>[15]</sup>。因此,AGEs 的蓄积及高糖状态,可以引起微血管、外周血管损伤,神经营养因子表达下降<sup>[2]</sup>。

本实验的结果可以看出药物干预均可以降低大鼠血清中 AGEs 的含量,而蚓黄散在降低大鼠血清中 AGEs 水平方面作用显著。

### 3.4 血管新生与成纤维细胞

在创面愈合过程中,肉芽组织的形成至关重要,其可直接影响创面愈合的过程及其预后。肉芽组织的本质是丰富的成纤维细胞和大量的新生毛细血管。丰富的新生毛细血管,改善了创面微循环,加速了创面的新陈代谢,为组织的修复提供丰富的营养物质和必须的氧,促进了创面的愈合<sup>[17-18]</sup>。成纤维细胞在皮肤损伤后,创缘真皮成纤维细胞被激活发生转化,胞质出现具有收缩能力的张力纤维,促进创面愈合。

本实验结果表明,甲硝唑葡萄糖注射液与蚓黄散均有促进新生毛细血管生长、增殖的作用,其中蚓黄散在改善新生肉芽组织中数密度效果最显著。而在成纤维细胞方面,甲硝唑葡萄糖注射液与蚓黄散均可升高成纤维细胞数,其中蚓黄散在升高成纤维细胞数效果最显著。笔者推测蚓黄散可能是有利于成纤维细胞、新生毛细血管的增殖、创面肉芽组织的生长,从而促进了创面的愈合。

实验表明:在糖尿病足溃疡愈合过程中,炎症因子及生长因子起到了至关重要的作用,中药“蚓黄散”外用干预糖尿病足溃疡可使炎症因子减少和生长因子增加,从而加快糖尿病足溃疡的愈合。

## 参 考 文 献

- [1] 陆树良,青春,谢挺,等. 糖尿病皮肤“隐性损害”的机制研究[J]. 中华创伤杂志,2004,20(8):468-271.
- [2] 牛铁雯,陆树良. 晚期糖基化终末产物受体与创伤修复[J]. 感染、炎症、修复,2005,6(4):230-233.
- [3] 林源,王润秀,农庆文,等. 糖尿病创面愈合过程的动态组织学特征[J]. 中国临床康复,2005,3(4):119-121.
- [4] 秦海洗. 唐汉钧教授中西医结合治疗糖尿病足溃疡经验介绍[J]. 新中医,2003,35(11):17-19.
- [5] 杨博华,张耀圣,赵树森,等. 蚓黄散外治糖尿病足溃疡的临床观察[J]. 中国外治杂志,2001,8(10):22-23.
- [6] 陈晓红,孙仁山,程天民,等. C 反应蛋白对合并 60Co  $\gamma$  射线放射损伤家兔创面的影响[J]. 基础医学与临床,2006,26(6):575-578.
- [7] 王勇,章敏,施厚银,等. 中药红油膏对大鼠创面愈合影响的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(11):1313-1314.
- [8] 付小兵,王德文. 创伤修复基础[M]. 北京:人民军医出版社,1997:151-153.
- [9] Robert G, Frykberg. 糖尿病足溃疡的发病机理;阻碍伤口愈合的因素[J]. 国外医学内分泌分册,2004,9(24):5:296-298.
- [10] Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1  $\alpha$  [J]. J Clin Invest, 2007,117:1249-1259.
- [11] 唐乾利,韩珊珊,付军,等. MEBT/MEBO 对皮肤创面愈合过程中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达影响的研究[J]. 右江民族医学院学报,2012,34(5):597-601.
- [12] 王建华,尹庆水,黄清春,等. 血管内皮生长因子促血管形成作用及其调控[J]. 第二军医大学学报,2004,25(2):210-212.
- [13] 杨博华,秦建辉,张东萍,等. 清热解秽利湿法治疗糖尿病足湿性坏疽[J]. 中医学,2006,7(24):1205-1206.
- [14] Zucchi P, Ferrari P, spina ML. Diabetic foot: from diagnosis to therapy[J]. G Ital Nefrol, 2005, 22(31):20-22.
- [15] 宋振强,王润秀. 晚期糖基化终末产物修饰人血清白蛋白对离体角质形成细胞迁移功能的影响[J]. 中华医学杂志,2008,38(8):2690-2694.
- [16] 农伟虎,许惠琴. 糖基化终末产物与糖尿病肾病产生机制的研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(2):195-197.
- [17] 阙华发,唐汉钧,王林钧,等. 益气化痰法促进慢性难愈性创面修复愈合的机制研究[J]. 中西医结合学报,2005,3(3):243.
- [18] 廖小波,朱涛,林嘉鑫. 外用中药促进感染创面愈合的机理研究概况[J]. 中医学报,2010,25(5):861.

(收稿日期:2015-03-21)

(本文编辑:韩虹娟)