

丹黄散对糖尿病大鼠溃疡创面愈合的影响机制*

邸铁涛¹, 张春玲^{1**}, 陈露¹, 侯丹², 刘涸颖², 龙丽², 黄蔷²

(1. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 探究中药丹黄散对糖尿病大鼠溃疡创面愈合的作用机制。方法: 将 SD 大鼠随机分为正常对照组(NC 组)、糖尿病溃疡组(DM 组)、糖尿病溃疡-中药组(DM-中药组)、糖尿病溃疡-西药组(DM-西药组), 后 3 组大鼠建立糖尿病溃疡模型, NC 组大鼠仅建立溃疡模型; DM-中药组给予中药丹黄散外敷, DM-西药组给予重组人表皮生长因子(EGF)凝胶外敷, NC 组和 DM 组不予药物干预; 干预后第 14、28 天检测各组大鼠溃疡创面愈合率, ELISA 法检测各组大鼠血清 EGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管内皮生长因子(VEGF)水平, Q-PCR 及 Western Blot 分别各组大鼠检测新生创面组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 及蛋白表达水平。结果: 干预后第 14、28 天, 与 DM 组比较, NC 组、DM-中药组及 DM-西药组创面愈合率, 血清 bFGF、EGF 及 VEGF 表达水平及溃疡面新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 及蛋白表达水平均明显提高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 干预后第 28 天, DM-中药组创面愈合率, 血清 bFGF、EGF 及 VEGF 水平及溃疡面新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 及蛋白表达水平高于 DM-西药组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 丹黄散外敷促进糖尿病大鼠溃疡创面的愈合, 其机制可能与上调血清和新生创面组织中 bFGF、EGF、VEGF 的表达水平有关。

[关键词] 糖尿病; 溃疡; 伤口愈合; 表皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 血管内皮生长因子类; 丹黄散

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0798-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.011

Effect of Chinese Medicine Danhuang Powder on Ulcer Healing in Diabetic Rats

DI Tietao¹, ZHANG Chunling¹, CHEN Lu¹, HOU Dan², LIU Huanying², LONG Li², HUANG Qiang²
(1. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China;
2. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Chinese medicine Danhuang powder on ulcer wound healing in diabetic rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into 4 groups: normal control group (NC group), diabetic ulcer group (DM group), DM group + Chinese medicine Danhuang Powder treatment (DM-C group) and DM group + Western medicine treatment (DM-W group). The ulcer model was established in the NC group, and a diabetic ulcer model was established in other three groups. The treatment method was externally applied on ulcer sites. DM-C group was given the traditional Chinese medicine Danhuang powder, and the DM-Western medicine group was given the recombinant human epidermal growth factor (EGF) gel external application. NC and DM groups were not given any intervention. The wound healing rate of each group was detected on the 14th and 28th day after intervention. The levels of serum EGF, basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by ELISA. qPCR and Western Blot were used to detect the expression of bFGF, EGF and VEGF at mRNA and protein levels in newborn tissues in ulcer sites.

*[基金项目] 贵州省科技厅、贵阳中医学院联合基金项目[黔科合 LH 字(2015)7269 号]

** 通信作者 E-mail: zcl1564@126.com

网络出版时间: 2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0040.011.html>

Results: On the 14th and 28th day after intervention, compared with the DM group, the wound healing rate, serum bFGF, EGF and VEGF expression levels were increased in the NC group, DM-C group and DM-W group. In addition, bFGF, EGF and VEGF were remarkably elevated in newborn granulation tissues in the ulcer surface ($P < 0.05$). On the 28th day after intervention, the wound healing rates, the levels of serum bFGF, EGF and VEGF as well as the levels of bFGF in newborn granulation tissues in the ulcer surface were higher in DM-C group than those in DM-W group. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** External application of Danhuang powder was superior to EGF treatment. The mechanism may be related to the upregulation of the expression levels of bFGF, EGF and VEGF in serum and newborn tissue in ulcer sites.

[**Key words**] diabetes; ulcer; wound healing; epidermal growth factor; basic fibroblast growth factor; vascular endothelial growth factor; Danhuang powder

糖尿病溃疡(diabetic ulcers,DU)是糖尿病(diabetes mellitus,DM)最常见的并发症之一,据统计30% 的糖尿病患者会发生皮肤溃疡,且溃疡存在难以愈合等问题。目前促进糖尿病溃疡愈合成为研究热点,调控生长因子的辅助疗法在糖尿病溃疡治疗中具有显著优势^[1]。研究发现,溃疡的愈合与创面的表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管内皮生长因子(VEGF)等密切相关,这些因子的表达可促进创面的愈合^[2]。中药丹黄散由大黄、丹参、当归、沉香、松香、没药共六味传统中药组成,具有清热解毒、祛腐生肌等功效^[3-5]。研究显示,丹黄散可明显促进糖尿病患者溃疡创面的愈合,具体有很好的临床疗效^[6],但其促愈机制尚未见报道。本实验通过建立SD大鼠糖尿病溃疡模型,使用中药丹黄散外敷糖尿病大鼠溃疡创面,观察创面愈合过程中大鼠血清及局部创面组织中EGF、bFGF、VEGF的表达水平,探讨丹黄散促进糖尿病溃疡愈合的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物、试剂与仪器 SPF级SD大鼠,雄性,200 g左右,购自重庆医科大学动物研究所。酶联免疫试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,VF-GF、 β -actin 购自 proteintech 公司,bFGF、EGF 购自美国 abcam 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/山羊抗小鼠 IgG 购自中山金桥公司。

1.1.2 药物制备 中药丹黄散由贵州中医药大学第二附属医院药剂科制备,大黄、丹参、当归、沉香、松香、没药六味中药按照 1:1 比例混合、粉碎、过六号筛后取细粉。对照西药选用重组人 EGF 凝胶

(购自桂林华诺威基因药业有限责任公司,批号 14020213)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 12 只对照组大鼠正常饲料喂养。36 只大鼠制作糖尿病大鼠模型。糖尿病大鼠模型制备采用目前较为常用糖尿病溃疡制作方法^[7]。SD 大鼠采用高脂高糖饲料喂养一个月,隔夜禁食后腹腔注射 STZ 40 mg/kg,3 d 后测空腹血糖大于 16.7 mmol/L 为造模成功。糖尿病大鼠造模成功后第 5 天,在所有大鼠(含正常对照组)背部较为平坦之处脱毛,龙胆紫标记约 1.5 cm \times 1.5 cm 面积,将该区域皮肤剪去,深达筋膜。

1.2.2 分组与给药 将实验大鼠随机分为正常对照组(NC)、糖尿病溃疡组(DM)、糖尿病溃疡-丹黄散组(DM-中药)、糖尿病溃疡-EGF 组(DM-西药),每组各 12 只大鼠;后 3 组大鼠制备糖尿病溃疡模型,造模成功 24 h 后,DM 组大鼠创面仅用碘伏消毒,DM-中药组大鼠创面碘伏消毒后外敷“丹黄散”,DM-西药组大鼠创面碘伏消毒后外敷重组人 EGF 凝胶;NC 组大鼠溃疡表面用碘伏消毒;各组大鼠背部溃疡均用 6 层医用小纱布(6 cm \times 6 cm)覆盖,用医用胶布包扎固定,每天换药 1 次,观察至溃疡创面完全愈合,隔日创面拍照并记录最终愈合时间。丹黄散用量参照临床成人用量,根据徐叔云^[8]的计算公式,大鼠等效剂量相当于人的 9.1 倍,得出大鼠丹黄散膏剂用量为 2 g;重组人 EGF 凝胶用量也为 2 g;敷药面积均为超出创面边缘 0.2 cm,厚度为 0.2 cm。

1.2.3 溃疡愈合率 造模后第 1 天、14 天、28 天测定大鼠溃疡创面面积,采用快示格胶贴勾画溃疡场面轮廓线,置于白色背景 A4 纸上,拍照,采用 ImageJ 计算其面积。创面愈合率(%) = (初始面

积 - 当前测量面积) / 初始面积 $\times 100\%$ [9]。

1.2.4 血清 bFGF、EGF 及 VEGF 水平检测 干预后第 14、28 天,大鼠内眦取血,分离血清,按照 bFGF、EGF 及 VEGF 的酶联免疫试剂盒说明书操作并制作标准曲线,每孔加待测样本 10 μL 、样品稀释液 40 μL ,加酶 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 5 次,显色,终止,检测 OD₄₅₀ 值,计算大鼠血清中 bFGF、EGF 及 VEGF 的含量,记录实验数据。

1.2.5 Q-PCR 检测大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 的表达 干预后第 14、28 天取各组大鼠新生肉芽组织,提取 RNA,采用 Q-PCR 法检测大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 的表达量。引物序列:EGF 上游引物为 5'-AAGATCGTAGAGCCAGGC,下游引为 CCTCGATGCTCTGCT TTA-3';bFGF 上游引物为 5'-TCCAGCGTTCAAAGAAGAA-3',下游引物为 5'-CCATCAAGGGAGTGTGTGC-3';VEGF 上游引物为 5'-GGCA GCTTGTAACGAAC-3',下游引物为 5'-TG-GTGACATGGTTAATCGGTC-3'。反应体系为:SYBR Premix Ex Taq II 10 μL 、PCR Forward Primer 0.8 μL 、PCR Reverse Primer 0.8 μL 、ROX Reference Dye 0.4 μL 、dH₂O 6 μL 、DNA 模板 2 μL ,进行相对定量,实验结果重复 3 次以上。

1.2.6 Western Blot 检测大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF 蛋白表达 干预后第 14、28 天取各组大鼠少量新生肉芽组织,提取蛋白定量后保存。配置 10% 的 SDS-PAGE 蛋白凝胶进行电泳,转膜,封闭,随后分别用 bFGF、EGF、VEGF 及 β -actin 的一抗室温孵育 2 ~ 3 h,用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:4 000)室温孵育 1 h,超敏发光液显色,Western Blot 曝光仪中曝光。

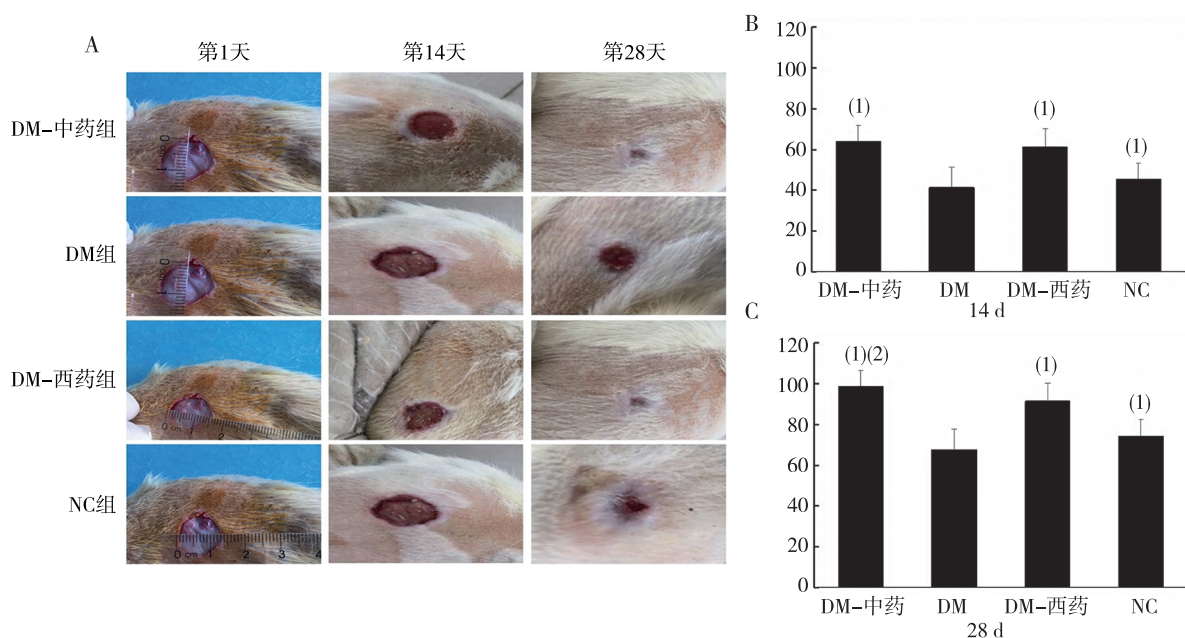
1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料如服从正态分布且方差齐,多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较使用独立样本 t 检验,不满足正态分布则作非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 创面愈合情况

干预后第 14、28 天,与 DM 组比较,NC 组、DM-中药组及 DM-西药组大鼠背部创面愈合率均明显提高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);干预后第 28 天,DM-中药组创面愈合率高于 DM-西药组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:A 为大鼠背部创面,B 为干预第 14 天,C 为干预第 28 天,(1) 与 DM 组比较, $P < 0.05$;(2) 与 DM-西药组比较, $P < 0.05$

图 1 各组大鼠不同时间点背部溃疡创面愈合情况及愈合率

Fig. 1 The effect of Danhuang powder on wound healing and healing rate of rat back ulcers at different time points

2.2 血清中 bFGF、EGF、VEGF 含量

干预后第 14、28 天,与 DM 组比较,NC 组、DM-中药组、DM-西药组大鼠血清中 bFGF、EGF 及 VEGF 含量明显提高($P < 0.05$);干预后第 28 天,DM-中药组大鼠血清中 bFGF、EGF 及 VEGF 含量高于 DM-西药组($P < 0.05$)。见表 1。

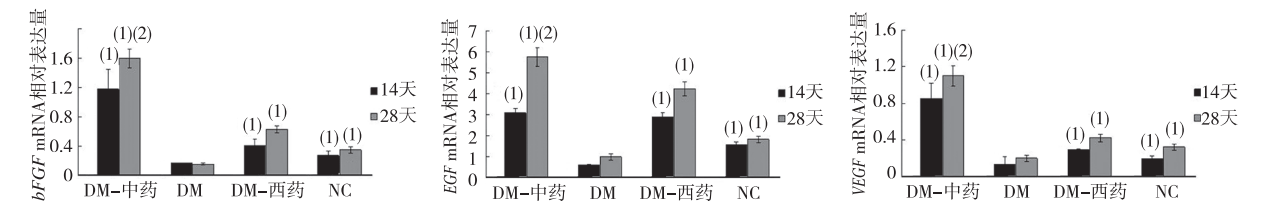
表 1 各组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 水平
Tab. 1 The effect of Danhuang powder on the levels of serum bFGF, EGF and VEGF

组别	bFGF($\mu\text{g/L}$)		EGF($\mu\text{g/L}$)		VEGF(ng/L)	
	第 14 天	第 28 天	第 14 天	第 28 天	第 14 天	第 28 天
DM-中药组	4. 21 \pm 0. 21 ⁽¹⁾	4. 58 \pm 0. 231 ⁽¹⁾⁽²⁾	907. 93 \pm 53. 22 ⁽¹⁾	997. 13 \pm 27. 98 ⁽¹⁾⁽²⁾	106. 22 \pm 5. 60 ⁽¹⁾	121. 54 \pm 4. 51 ⁽¹⁾⁽²⁾
DM 组	1. 06 \pm 0. 21	2. 71 \pm 0. 12	630. 34 \pm 41. 39	535. 66 \pm 29. 13	49. 36 \pm 4. 93	63. 65 \pm 2. 83
DM-西药组	4. 01 \pm 0. 26 ⁽¹⁾	4. 11 \pm 0. 27 ⁽¹⁾	807. 83 \pm 39. 21 ⁽¹⁾	976. 24 \pm 34. 42 ⁽¹⁾	91. 64 \pm 4. 27 ⁽¹⁾	102. 32 \pm 3. 76 ⁽¹⁾
NC 组	3. 36 \pm 0. 32 ⁽¹⁾	3. 37 \pm 0. 31 ⁽¹⁾	655. 40 \pm 28. 21 ⁽¹⁾	653. 38 \pm 31. 36 ⁽¹⁾	71. 26 \pm 3. 98 ⁽¹⁾	79. 81 \pm 4. 18 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与 DM 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 DM-西药组比较, $P < 0.05$

2.3 背部溃疡创面新生肉芽组织中 bFGF、EGF、VEGF mRNA 表达

干预后第 14、28 天,与 DM 组比较,NC 组、DM-中药组、DM-西药组大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 表达水平明显提高($P < 0.05$);干预后第 28 天,DM-中药组大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF mRNA 表达水平高于 DM-西药组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



⁽¹⁾与 DM 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 DM-西药组比较, $P < 0.05$

图 2 各组大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF、VEGF mRNA 表达水平

Fig. 2 The effect of Danhuang powder on the mRNA expression levels of bFGF, EGF and VEGF in newborn granulation tissues

2.4 背部溃疡新生肉芽组织中 bFGF、EGF 及 VEGF 蛋白表达

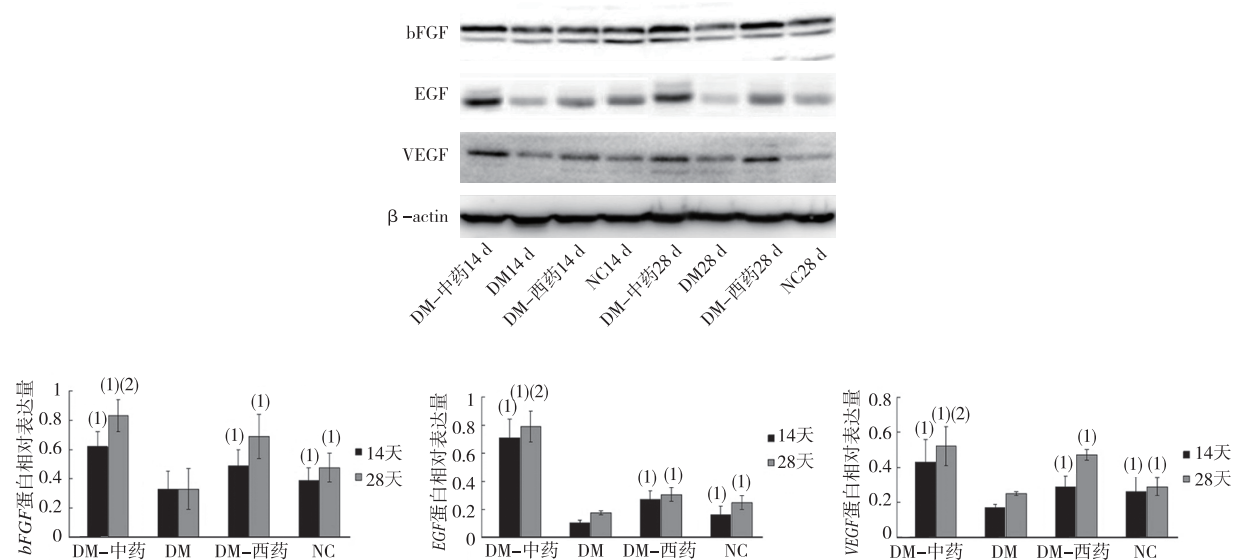
干预后第 14、28 天,与 DM 组比较,NC 组、DM-中药组、DM-西药组大鼠背部溃疡新生肉芽组织中 bFGF、EGF、VEGF 蛋白表达水平明显提高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);干预后第 28 天,DM-中药组大鼠新生肉芽组织中 bFGF、EGF、VEGF 蛋白表达水平高于 DM-西药组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

糖尿病溃疡是糖尿病常见并发症之一,具有迁延不愈、反复发作等特点,给患者带来极大的心理压力和经济负担,是临床急需解决的重要问题之一^[10]。糖尿病溃疡创面愈合的过程是多因子共同参与的。分子辅助治疗糖尿病溃疡过程中,bFGF、

EGF 和 VEGF 三者均扮演着重要的作用^[11]。bFGF 可直接作用于其靶细胞,通过促有丝分裂反应,使成纤维细胞分裂、增殖,起到促进创面愈合的作用。EGF 是一种广泛存在于人和动物体内的细胞因子,EGF 受体存在于多种细胞膜上,受体与 EGF 结合后形成受体-EGF 复合物,通过自磷酸化等一系列生化反应诱导或直接调控细胞增殖,从而启动创面修复的过程^[12]。VEGF 是一种特异性作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,它不仅能引起血管通透性增加、细胞外基质成分改变,还能诱导新生血管形成^[13-14]。

中药的有效成分外用外治法是中医治疗糖尿病足的特色疗法,在糖尿病溃疡的研究中存在重要的临床意义^[15]。丹黄散主要功效有活血化瘀、拔脓祛腐、托疮生肌、利湿解毒等。方中丹参、大黄共为君药,丹参不仅除了具有活血痛经、清心除烦、保护心脑血管等作用,还具备促进糖尿病溃疡坏疽愈



(¹) 与 DM 组比较, $P < 0.05$; (²) 与 DM-西药组比较, $P < 0.05$

图3 各组大鼠背部溃疡新生肉芽组织中 bFGF、EGF、VEGF 蛋白表达

Fig.3 The effect of Danhuang powder on the protein expression levels of bFGF, EGF and VEGF in newborn granulation tissues

合、保肝、抗肿瘤、抗心肌缺血等作用^[16]；大黄的有效成分不仅具有抗肿瘤、辅助治疗糖尿病肾病的作用,还可以保护脓毒症胃肠功能衰竭患者,与此同时其提取物对脂多糖诱导的内皮细胞损伤也具有一定的保护作用^[17]；当归为臣药,能够补气活血,在抗肿瘤、糖尿病治疗、血管性痴呆中发挥作用^[18]；没药、沉香为佐药,具有止痛、活血、抗菌消炎作用^[19]；松香与丹参具有相似的促进糖尿病溃疡创面愈合的作用为使药^[20]。

本研究应用将中药丹黄散外敷于糖尿病大鼠溃疡创面,利用中药外治溃疡,从实验结果来看,糖尿病溃疡组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 较正常大鼠显著降低,使用丹黄散外敷后,在大鼠血清及新生肉芽组织中 bFGF、EGF、VEGF 因子表达水平升高,表明丹黄散能够上调 3 者的表达进而促进溃疡创面的愈合,且效果优于重组人 EGF 凝胶外敷。

综上所述,本实验使用中药丹黄散外敷能促进于糖尿病大鼠溃疡创面的愈合,可能是通过上调 bFGF、EGF、VEGF 的表达量的表达水平,促进成纤维细胞和新生毛细血管增殖,改善创面的血液循环,促进肉芽组织生长及肉芽组织在创面的填充,加快上皮细胞生长,最终加快创面愈合的进程。这为促进糖尿病溃疡创面愈合的药物开发提供了新的参考依据,也为丹黄散促进糖尿病溃疡创面愈合

的作用机制提供新的理论基础。

4 参考文献

- [1] NSAIF H S. Treatment of infected diabetic ulcer with laser biostimulation a case report[J]. Biophysical Journal, 2014, 96(3):3a.
- [2] BUCHBERGER B, FOLLMANN M, FREYER D, et al. The importance of growth factors for the treatment of chronic wounds in the case of diabetic foot ulcers[J]. Gms Health Technology Assessment, 2010, (6):866-871.
- [3] MCDONALD A M, BONBRIGHT D I, OERS W T, 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]. European Journal of Cell Biology, 2002, 81(3):153-160.
- [4] KARAM R A, REZK N A, ABDEL RAHMAN T M, et al. Effect of negative pressure wound therapy on molecular markers in diabetic foot ulcers[J]. Gene, 2018, 15(667):56-61.
- [5] CHOI J S, LEONG K W, YOO H S. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF)[J]. Biomaterials, 2008, 29(5):587-596.
- [6] 王安宇,乔艺杰,魏良纲. 丹黄散外敷治疗糖尿病足的临床疗效观察[J]. 贵州医药, 2011, 35(6):505-507.

- [7] 屈璐, 候胜开, 高楠楠, 等. 糖尿病周围神经病变大鼠模型制作的实验研究[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(1): 60-63.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [9] SHEEHAN P, JONES P, CASELLI A, et al. Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial[J]. Diabetes Care, 2003, 26(6): 1879-1882.
- [10] HINGORANI A, LAMURAGLIA G M, HENKE P, et al. The management of diabetic foot: a clinical practice guideline by the society for vascular surgery in collaboration with the american podiatric medical association and the society for vascular medicine[J]. Journal of Vascular Surgery, 2016, 63(2): 3S-21S.
- [11] VISWANATHAN V, DHAMODHARAN U, SRINIWASAN V, et al. Single nucleotide polymorphisms in cytokine/chemokine genes are associated with severe infection, ulcer grade and amputation in diabetic foot ulcer[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118(Pt B): 1995-2000.
- [12] MORIMOTO N, KAKUDO N, NOTODIHARDJO P V, et al. Comparison of neovascularization in dermal substitutes seeded with autologous fibroblasts or impregnated with bFGF applied to diabetic foot ulcers using laser doppler imaging[J]. Journal of Artificial Organs, 2014, 17(4): 352-357.
- [13] NGUYEN C M, GOROUHI F, DAVARI P, et al. 161 mesenchymal stem cells for diabetic ulcers: protocol for a systematic review of preclinical studies[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2016, 136(5): S29-S29.
- [14] ROBSON, MARTINr C. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers[J]. Annals of Plastic Surgery, 2006, 56(4): 399-400.
- [15] 朱朝军, 吕佳康, 周贝, 等. 糖尿病足溃疡外用中药新药临床研究的思考[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(13): 1257-1259.
- [16] 王凡. 益气活血法联用蝮蛇抗栓酶治疗糖尿病足 28 例[J]. 中医杂志, 2001, 42(3): 170-170.
- [17] 杨俊伟, 黎磊石. 大黄治疗糖尿病肾病的实验研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1993, 9(4): 31-33; 61.
- [18] 侯仙明, 王亚利, 牛冰, 等. 活血、补肾、化痰三种方法对血管性痴呆大鼠脑组织中超氧化物歧化酶活性和一氧化氮含量的调整[J]. 中国组织工程研究, 2006, 10(43): 52-54.
- [19] 翟春涛, 田岳凤, 李玮. 复方隔药灸的现代临床应用分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 4880-4884.
- [20] 郑琪, 李友山. 四效散对糖尿病足溃疡大鼠创面愈合的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 13(22): 114-118.

(2019-03-28 收稿, 2019-06-13 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳