

生肌象皮膏对糖尿病大鼠溃疡创面肉芽组织的终末糖基化产物及受体的影响*

李巧芬, 常 柏, 李晓军, 庞宗然, 杨继志

摘要: [目的] 通过对糖尿病大鼠溃疡创面肉芽组织的终末糖基化产物及受体的含量的动态观察, 探讨生肌象皮膏促进糖尿病大鼠难治性溃疡愈合的机制。[方法] 制备糖尿病溃疡动物模型, 按照血糖和体质量分层随机分为糖尿病空白对照组、凡士林组、生肌象皮膏组。生肌象皮膏组外用生肌象皮膏纱条外敷, 凡士林组用凡士林纱条外敷, 空白组、糖尿病对照组均以生理盐水纱条外敷, 分别于 1、7、14、21 d 每组处死动物 10 只, 手术取新鲜肉芽组织 160 例。采用实时荧光定量 PCR 法检测终末糖基化产物受体的含量, 免疫组化法检测终末糖基化产物的含量。[结果] 终末糖基化产物的含量于糖尿病各组与空白组比较无显著性差异, 均呈强阳性表达。糖尿病各组间比较无统计学意义。糖尿病各组终末糖基化产物受体(RAGE)于 7 d 有升高的趋势, 14 d 达到高峰, 各组间无统计学意义。从均数趋势上看生肌象皮膏组明显低于凡士林组、糖尿病对照组, 在均数趋势上看生肌象皮膏组可以抑制 RAGE 的产生, 随时间的延长, 更为明显。第 21 天糖尿病各组的 RAGE 呈低表达, 生肌象皮膏组、凡士林组与空白组比较有统计学意义。糖尿病各组组间比较, 无统计学意义。[结论] 生肌象皮膏对终末糖基化产物无明显影响, 可以减少终末糖基化产物受体的产生, 随时间的延长, 更为明显。

关键词: 生肌象皮膏; 糖尿病溃疡; 终末糖基化产物; 终末糖基化产物受体

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-9043(2008)01-0026-03

Effect of shengji corium elephatis mastic on the terminal glycosylation production and acceptor of granulation tissue of ulcer raw surface in rats with diabetes

LI Qiao-fen, CHANG Bai, LI Xiao-jun, et al

(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To dynamic observe the terminal glycosylation production and acceptor of granulation tissue of ulcer raw surface in rats with diabetes and explore the effect mechanism of Shengji corium elephatis mastic on promoting refractoriness ulcer healing in rats with diabetes. [Methods] To establish the animal model of diabetes ulcer. The model rats were demixing randomly divided into diabetes control group, control group, Vasogen group, Shengji corium elephatis mastic group. To put to death the rats in one day, seven day, fourteen day and twenty-one day and obtain fresh granulation tissue by using operation method. To determine the terminal glycosylation production content by using RT-PCR and immunohistochemical method. [Results] The content of terminal glycosylation production wasn't obviously differentiation on the rats of every diabetes model group and the expression of terminal glycosylation production was powerful masculine. The acceptor of terminal glycosylation production (RAGE) had a elevatory tendency in rats of every diabetes group in seven day and may achieve the peak time in fourteen day. But there weren't obviously differentiation in every group ($P>0.05$). From the view of mean tendency, the content of RAGE in Shengji corium elephatis mastic group was obviously lower than that in diabetes control and Vasogen group. The Shengji corium elephatis mastic may inhibit the produc-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400605)。

作者单位: 300193 天津中医药大学(李巧芬, 李晓军, 庞宗然, 杨继志)

300050 天津医科大学代谢病医院(常 柏)

作者简介: 李巧芬(1972-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科、内分泌的临床与科研工作。

tion of RAGE with the prolongation of time. The expression of RAGE was low in rats of every diabetes group in twenty day. [Conclusion] Shengji corium elephatis mastic hadn't obviously influence on the RAGE and may decrease the production of RAGE with the prolongation of time. Key words: Shengji corium elephatis mastic; diabetes ulcus; terminal glycosylation production; RAGE

糖尿病难治性溃疡是常见的糖尿病合并症之一,是导致糖尿病患者截肢致残的主要原因。随着全球性糖尿病患者人数的增加,糖尿病平均寿命的延长以及老龄化的趋势,因糖尿病溃疡而需要截肢的患者也在增加。应用生肌象皮膏在临床上治疗糖尿病溃疡取得良好效果^[1],通过对糖尿病大鼠溃疡创面肉芽组织的终末糖基化产物及受体的含量的观察,探讨生肌象皮膏促进糖尿病大鼠难治性溃疡愈合的机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 Wistar 大鼠,雄性,清洁级,体质量(180±20)g,(北京大学医学部实验动物中心提供)。

1.2 实验试剂 氯仿、异丙醇、无水乙醇(天津中医药大学中医药研究中心);RNase-free 离心管、200 μL 和 1 000 μL Tips、Tris、焦碳酸二乙酯(DEPC)(美国 SIGMA 公司);RT-PCR 一步法试剂盒、引物合成、PCR 小管、1.5 mL 离心管(RNase free)(宝生物工程有 限公司);一步法总 RNA 提取试剂(TRIZOL Reagent)(Invitrogen 公司)。免疫组化试剂盒(北京中杉金桥 生物技术有 限公司),PBS 液(实验室配制,pH 值 7.4),0.1 mol/L 枸 盐酸盐缓冲液[实验室配制,PH 值 (6.0±0.1)],0.3%过氧化氢溶液(实验室配制),DAB 显色增强剂(北京中杉金桥生物技术有 限公司),引物:糖基化终末产物受体前端引物(RAGEF):5-GAATCCTCCCCAATGGTTCA,RAGER:5-GCCCGA-CACCGGAAAGT,由北京三博远志生物技术有 限公司合成。

2 实验方法及步骤

2.1 动物模型的制备 将雄性 Wistar 大鼠,经普通 饲料适应性喂养 1 周后,空腹 6 h,尾静脉注射 1% 链脲佐菌素(STZ)45 mg/kg,1 周后检测血糖,随机血 糖 16.7 mmol/L,视为糖尿病造模成功,选取 120 只 造模成功大鼠按照血糖和体质量分层随机分为糖 尿病对照组、凡士林组、生肌象皮膏组。并选取 40 只 正常大鼠作为空白组。4 组动物均以水合氯醛腹腔 麻醉后,背部剃毛,常规消毒,用打孔器于大鼠背部 脊柱左侧打孔(直径 2 cm),溃疡深及筋膜层,止血 后以无菌纱布包扎,自由饮水与喂食。3 d 后溃疡创

面有肉芽组织开始生长,溃疡模型制备成功。

2.2 治疗方法 4 组大鼠单笼喂养,均每日换药 1 次, 祛除创面上硬痂,常规消毒,用生理盐水冲洗创面。 生肌象皮膏组外用生肌象皮膏纱条外敷,凡士林组 用凡士林纱条外敷,空白组、糖尿病对照组均以生 理盐水纱条外敷。4 组动物均自由饮水、进食,创面 外用无菌纱布包扎,固定。

2.3 取材方法 分别于 1、7、14、21 d 每组处死动 物 10 只,手术取新鲜肉芽组织 160 例,保存备用。

2.4 终末糖基化产物采用免疫组化 SP 法 免疫组 化结果测定:阳性染色为棕色颗粒,定位于胞浆和/ 或胞膜。以 APP6.0 图像分析软件进行光密度[den- sity(mean)]的测量。

2.5 终末糖基化产物受体采用实时荧光定量 PCR 法 原理:利用反转录酶 ExScript RTase 将 RNA 反 转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板利用 ES Taq HS 进行 RealTime PCR 扩增反应。

2.6 统计学处理 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示 以 SPSS 13.0 统计软件进行组间的单因素方差分析。

3 实验结果

各组第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天及第 21 天

表 1 AGEs 光密度统计表($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
生肌象皮膏组	117.27 ±22.62	125.08 ±6.35*	137.32 ±6.63*	160.23 ±6.59*
凡士林组	105.93 ±4.87	113.98 ±7.66*	125.25 ±7.65*	154.18 ±3.53*
糖尿病对照组	103.42 ±21.99	133.57 ±6.95*	144.65 ±4.85*	185.23 ±9.24*
空白组	100.01 ±21.86	92.74 ±6.43	124.65 ±9.66	128.31 ±4.24

注:与空白组比较 *P<0.05。

表 2 各组 RAGE 统计表($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
生肌象皮膏组	1.54 ±0.35	2.02 ±0.44	2.24 ±0.82	0.54 ±0.35*
凡士林组	1.55 ±0.18	2.54 ±0.32	3.14 ±0.88	0.55 ±0.18*
糖尿病对照组	1.35 ±0.65	2.23 ±0.45	2.83 ±1.62	0.79 ±0.65
空白组	1.44 ±0.38	1.38 ±0.27	1.45 ±0.50	1.44 ±0.38

注:与空白组比较 *P<0.05。

终末糖基化产物(AGEs)光密度[$\text{density}(\text{mean})$]及终 末糖基化产物受体(RAGE)的结果,见表 1、表 2。

4 讨论

糖基化终末产物系由还原性糖、醛基与蛋白质 N 端游离氨基酸残基的 - 氨基间, 经非酶促糖基化反应形成的几种复杂分子结构的总称, 该反应在正常人体内进行得非常缓慢, 但 DM 因生化代谢异常, 特别是血糖含量长期处于高水平状态, 机体内非酶促糖基化反应明显加速, 引起 AGEs 的逐渐蓄积^[2]。

AGEs 在单核细胞和巨噬细胞内的沉积, 是因为 AGEs 修饰蛋白对细胞内溶酶体中的蛋白水解酶不敏感, AGEs 修饰蛋白不能被有效的降解, 导致 AGEs 在单核细胞和巨噬细胞内的堆积, 进而可能影响细胞的功能。AGEs 可导致其他蛋白质的糖基化, 生长因子及其受体糖基化使具有功能活性的生长因子及其受体减少, 进而影响修复细胞的增殖及迁移, 从而影响创面修复; AGEs 能抑制内皮细胞增殖, 并可以诱导其凋亡, 且与作用时间与含量有关。而这一作用有可能是通过内皮细胞表面特异性的 AGEs 受体来实现的^[3]。

实验结果显示: 终末糖基化产物的含量于各时间点糖尿病各组与空白组比较有显著性差异, 均呈强阳性表达, 糖尿病各组间比较无统计学意义, 说明生肌象皮膏终末糖基化产物的产生无明显影响。终末糖基化产物受体 (RAGE) 于 14 d 达到高峰虽然各组间无统计学意义, 但在均数趋势上看生肌象皮膏组可以减少 RAGE 的产生, 随时间的延长, 更为明显。第 21 天糖尿病各组的 RAGE 呈低表达, 生肌象皮膏组、凡士林组与空白组比较有统计学意义。

糖尿病各组组间比较, 无统计学意义。

生肌象皮膏出自于张山雷《疡科纲要》, 由象皮粉、当归、血余炭、龟版、生地、生炉甘石、生石膏、香油、白蜡组成, 是生肌收口的代表方剂。方中以象皮粉、生石膏、炉甘石、血余炭为主药, 配以滋阴养血, 活血化瘀收敛之品, 共奏生肌长皮、活血养血之功效。

生肌象皮膏能够通过减少终末糖基化产物受体的产生, 减少终末糖基化产物对组织、细胞、细胞因子的毒副反应不能完全发挥, 而促进糖尿病溃疡的愈合。而在糖尿病溃疡的后期空白组的终末糖基化产物受体高表达而糖尿病各组的低水平表达, 这可能由于 AGEs 在组织细胞中大量蓄积导致细胞的功能下降, 形成 RAGE 的能力下降所致。RAGE 的低表达使溃疡愈合的后期细胞凋亡减慢, 组织细胞不能进行正常的塑形。这可能也是糖尿病溃疡愈合时间延长的另一个因素。

参考文献:

- [1] 常 柏, 李巧芬, 李晓军. 生肌象皮膏治疗糖尿病难治性溃疡 64 例[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(10): 1299- 1299.
- [2] Wendt T, Tanji N, Guo J, et al. Glucose, glycation, and RAGE; implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(5) :1383- 1395.
- [3] Marilena CK, Marcelo BT, Kemli RB, et al. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing[J]. Pathophysiology, 2004, (11):63- 67.

(收稿日期: 2007- 12- 02)

《天津中医药大学学报》被检索系统收录情况

- 美国《化学文摘》(CA) 源期刊
- 全国报刊索引·自然科学技术版
- 中文科技期刊数据库(维普)
- 俄罗斯《文摘杂志》(AJ) 源期刊
- 中国学术期刊(光盘版)
- 中国生物医学文献数据库
- 波兰《哥白尼索引》(IC) 源期刊
- 中文生物医学期刊文献数据库
- 中国药学文摘
- 中国科技信息研究“万方数据网络系统”
- 中文科技资料目录·医药卫生
- 中文科技资料目录·中草药
- 中国医学文摘·中医分册