

益气化痰法中药对糖尿病大鼠肉芽增生期创面 TGF- β /ALK5/Smad2/3 通路的影响

张臻, 阙华发

上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所, 上海 200032

[摘要] 目的: 探讨益气化痰法中药对糖尿病大鼠肉芽增生期创面转化生长因子- β (TGF- β) /激活素受体样激酶 (ALK) 5/Smad 蛋白 2/3 通路的影响。方法: 将 50 只大鼠随机分为益气化痰组、益气组、化痰组、糖尿病对照组、正常对照组。通过腹腔注射链脲佐菌素和外科方法建立糖尿病大鼠全层皮肤缺损模型, 运用 Westernblot 技术手段分别检测各组肉芽增生期创面成纤维细胞 ALK5/Smad2/3 的表达水平。结果: 糖尿病对照组 ALK5 表达水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 益气化痰组 ALK5 表达水平明显低于糖尿病对照组 ($P < 0.05$), 其与益气组、化痰组、正常对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。糖尿病对照组 smad2 表达水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 益气化痰组 smad2 表达水平与各组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。糖尿病对照组 smad3 表达水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 益气化痰组 smad3 表达水平低于化痰组 ($P < 0.05$), 明显低于糖尿病对照组、益气组 ($P < 0.01$), 高于正常对照组 ($P < 0.05$)。结论: 糖尿病创面难以愈合及瘢痕形成的机制可能与 ALK5/Smad2/3 通路有关, 益气化痰中药可能通过抑制 ALK5/Smad2/3 通路, 加速创面愈合, 减少瘢痕形成。

[关键词] 糖尿病; 溃疡; 益气化痰法; 转化生长因子- β (TGF- β) /激活素受体样激酶 (ALK) 5/Smad 蛋白 2/3 通路

[中图分类号] R587.2 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 06-0270-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.127

Effects of Chinese Herbs of Replenishing Qi and Resolving Stagnation on Pathways of TGF- β /ALK5/Smad2/3 of Granulation-proliferative Skin Ulcers in Diabetic Rats

ZHANG Zhen, QUE Huafa

Abstract: Objective: To explore the effect of Chinese herbs of replenishing qi and resolving stagnation on the pathways of TGF- β /ALK5/Smad2/3 of skin ulcers at granulation proliferative stage in diabetic rats. Methods: Fifty rats were randomly divided into five groups: replenishing qi and resolving stagnation(RQRS)group, replenishing qi(RQ)group, resolving stagnation(RS)group, diabetes control(DC)group, and normal control(NC)group. Diabetes model was induced by peritoneal injection of streptozotocin and skin ulcers were caused by surgery method in rats. And then the expression of ALK5, Smad2 and Smad3 was detected with the method of Western blotting. Results: The levels of ALK5/Smad3 of the DC group were higher than those of NC group. The levels of ALK5/Smad2/3 of all the medication groups were lower than those in DC group, and those in RQRS group were lower than those in RQ and RS groups. Conclusion: The therapy of replenishing qi and resolving stagnation can accelerate the wound healing and reduce the scar formation probably by modulating the pathways of TGF- β /ALK5/Smad2/3.

Keyword: Diabetes mellitus; Ulcer; Therapy of replenishing qi and resolving stagnation; Pathways of TGF- β /ALK5/ Smad2/3

笔者在应用益气化痰中药治疗糖尿病溃疡取得显著临床疗效的基础上^[1], 通过实验研究已初步证实, 创面转化生长因子- β (TGF- β) 1 的低表达可能是糖尿病溃疡难以愈合的原因之

一, 益气化痰法可以通过上调 TGF- β 1 的表达水平, 同时促进转化生长因子- β 受体 (TGF- β R) 的表达, 并下调 smad3、smad4 的表达水平, 从而提高创面愈合的速度和质

[收稿日期] 2015-01-02

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81202698); 国家自然科学基金项目 (81173266); 上海市海派中医传承研究项目 (ZYSNXd-CC-APGC-JD002)

[作者简介] 张臻 (1977-), 女, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医外科学。

量^[2-5]。为进一步深入探讨益气化痰法促进糖尿病溃疡创面愈合的机制,本文研究了其对糖尿病大鼠肉芽增生期创面成纤维细胞 TGF- β / 激活素受体样激酶(activin receptor-like kinase, ALK)/Smad 通路的影响。

1 材料与方

1.1 药物与试剂 益气化痰方由生黄芪、太子参、桃仁、地龙组成,剂量比例 2.5:2.5:1:1,人鼠等效剂量为 11.61 g/kg,减压浓缩至浓度为含生药 2.5 g/mL。拆方益气方由生黄芪、太子参等组成,人鼠等效剂量为 6.75 g/kg,减压浓缩至浓度为含生药 1.5 g/mL。拆方化痰方由桃仁、地龙等组成,人鼠等效剂量为 4.86 g/kg,减压浓缩至浓度为含生药 1 g/mL^[3]。均由上海中医药大学附属龙华医院制剂室按水煎醇沉工艺制备成煎剂浓缩,4℃冰箱保存备用。ALK5 一抗,Abcam 公司产品(Ab155258); Smad2 一抗, Abcam 公司产品(Ab33875); Smad3 一抗, Abcam 公司产品(Ab40854); 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗,北京中山生物工程公司产品(ZB-2301)。

1.2 仪器 RM2145 切片机, Leica 公司产品; IMS 细胞图像分析仪,上海申腾信息技术有限公司产品; MV-CP410 摄像机, Panasonic 公司产品; BH2 显微镜, Olympus 公司产品。

1.3 动物分组及处理 3月龄雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 200~250 g,平均体重(224.13 \pm 13.77)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[许可证号码: SCXK(沪)2012-0002]。将 50 只大鼠随机取 10 只为正常对照组,其余 40 只大鼠复制糖尿病性模型,随机取 10 只为糖尿病对照组,其余 30 只随机分为益气化痰组、益气组、化痰组。糖尿病性模型鼠实验前 12 h 禁食,定量饮水。实验当日称体重,尾静脉采血和收集尿液,用血糖仪和试纸法分别测定基础血糖和尿糖,然后以 pH4.6、0.1 mmol/L 的枸橼酸钠缓冲液溶解链脲佐菌素(STZ),配成 1% 溶液,以 60 mg/kg 体重单次腹腔内注射 STZ 溶液,48 h 后动物血糖浓度 > 16.65 mmol/L 及尿糖为 +++ 时,即成糖尿病鼠模型^[6]。将所有大鼠麻醉后背部备皮,作直径 10 mm 的圆形标记,在无菌条件下,用外科方法切除标记处全层皮肤,止血后用无菌纱布覆盖,糖尿病性模型鼠即成糖尿病溃疡模型。造模后每只大鼠连续 4 天后腿肌肉注射青霉素 40 万单位。各组于创面造模后次日开始给药,换药前均以 1/5000 呋喃西林溶液清洁创面,外敷单层生理盐水纱布;正常对照组、糖尿病对照组生理盐水灌胃,每天 1 次;各用药组,药物灌胃,每天 1 次。10 天后将大鼠麻醉处死,用眼科手术剪剪取全层肉芽组织,观察各组组织病理学,并以植快培养法进行成纤维细胞培养,Westernblot 法检测 ALK5、smad2、smad3 各指标水平变化。

1.4 Westernblot 法检测 每组随机抽取 8 个标本作为实验样本,各样品取 25 μ g 上样,marker 取 10 μ L 上样(上样前按说明书进行预处理),将配制好的 PAGE 胶放入电泳槽中,加入

适量电泳缓冲液,进行电泳。然后转移至 PVDF 上,用 5% 脱脂奶粉封闭,分别与特异性的抗体进行孵育(稀释浓度分别为 ALK5, 1:500; smad2, 1:1000; smad3, 1:5000; GAPDH, 1:1500),充分洗涤后孵育 HRP 标记山羊抗兔二抗, ECL 化学发光,显影,扫描分析,测定蛋白表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS18.0 统计软件,采用方差分析比较各组间 ALK5、smad2、smad3 表达水平的差异。

2 实验结果

各组 ALK5、Smad2、Smad3 比较,见表 1。糖尿病对照组 ALK5 表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$);益气化痰组 ALK5 表达水平明显低于糖尿病对照组($P < 0.05$),其与益气组、化痰组、正常对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。糖尿病对照组 smad2 表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$);益气化痰组 smad2 表达水平与各组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。糖尿病对照组 smad3 表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$);益气化痰组 smad3 表达水平低于化痰组($P < 0.05$),明显低于糖尿病对照组、益气组($P < 0.01$),高于正常对照组($P < 0.05$)。

表 1 各组 ALK5、Smad2、Smad3 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALK5	Smad2	Smad3
益气化痰组	8	4215.59 \pm 1194.82 ^②	2351.63 \pm 629.05	4283.12 \pm 1286.48 ^{③④⑤}
益气组	8	5205.97 \pm 1327.38	2597.17 \pm 997.99	6222.98 \pm 1270.56
化痰组	8	4878.53 \pm 1239.51	2611.01 \pm 1201.05	6037.45 \pm 1663.62
糖尿病对照组	8	6720.21 \pm 2137.36 ^①	3384.09 \pm 1609.57 ^①	8478.76 \pm 2147.60 ^①
正常对照组	8	3210.52 \pm 767.67	2056.53 \pm 195.06	1203.67 \pm 772.35

与正常对照组比较,① $P < 0.05$;与糖尿病对照组比较,② $P < 0.05$,③ $P < 0.01$;与化痰组比较,④ $P < 0.05$;与益气组比较,⑤ $P < 0.01$

3 讨论

糖尿病溃疡属中医学溃疡、消渴等范畴。自 20 世纪 60 年代起,在传承全国中医外科大家顾伯华先生经验的基础上,笔者从中医理论、文献、临床和基础研究等方面,对中医药治疗糖尿病溃疡进行了系统、深入研究,取得了一系列丰硕的成果。提出糖尿病溃疡病机演变的特点为“因感虚邪,邪气致瘀,瘀阻伤正,化腐致损”,其中“虚”、“瘀”是创面难以愈合的主因。根据《医林改错》所述“元气既虚,必不能达于血管,血管无力,必停留而瘀”等中医药理论,建立“益气化痰法”贯穿疾病治疗始终的新观点,确立了“益气化痰法”的治疗法则和系列方剂,形成了“益气化痰法治疗糖尿病溃疡”的学术思想体系,明显提高了糖尿病溃疡的临床疗效,同时一定程度上能缓解瘢痕形成,提高愈合质量^[7]。

随着近年来分子生物学等学科的发展,对糖尿病创面愈合机制及瘢痕形成的研究日趋深入。增生性瘢痕是临床常见的病理性瘢痕,其病理基础是以成纤维细胞为主的细胞成分的过度

增殖和以胶原为主的细胞外基质的过度沉积。TGF-β 是一种重要的血管形成因子，具有广泛的生物学活性，在溃疡创面组织中含量的变化对溃疡发生、修复愈合发挥核心作用，同时 TGF-β 也是公认为最强的致纤维化因子，是影响瘢痕形成的关键因素^[8-9]。TGF-β 可能通过增加 I、III 型胶原(特别是 I 型胶原)沉积，抑制胶原酶活性、促进纤维粘连蛋白(FN)表达等因素，促进细胞外基质沉积，导致组织纤维化，瘢痕形成^[10]。Smads 蛋白家族是细胞内特异转导 TGF-β 调控信息的信号转导分子，它们可将 TGF-β 信号直接从细胞膜转入细胞核内，并激活靶基因的转入^[11-12]，目前已被公认为修复相关基因，与创面的愈合有密切的关系。ALK 是 TGF-β 的 II 型受体，与其配体结合传导信号。Smad 是 TGF-β 的胞浆递质，参与 TGF-β 的信号传导。最新研究发现，TGF-β 超家族信号传导有 2 条通路：一条是 TGF-β /ALK1/Smad1/5 途径，与新生血管形成有关；另一条是 TGF-β /ALK5/Smad2/3 途径，拮抗 ALK1 信号通道，并与纤维化有关^[13]。对动物脏器纤维化模型研究结果表明，采用小分子抑制剂抑制 ALK5 活性可降低脏器中纤维化基因表达和胶原沉积，减少纤维化程度。

实验结果显示，糖尿病对照组 ALK5/Smad2/3 明显高于正常对照组，提示糖尿病性溃疡难以愈合及瘢痕形成的原因可能与之有关。益气化瘀组及其拆方组能不同程度的抑制 ALK5/Smad2/3 通路，且益气化瘀组更优于其拆方组。由此可以认为，抑制 ALK5/Smad2/3 通路可能是益气化瘀中药促进创面愈合，减少瘢痕形成的途径之一，初步印证了“补虚生肌”“化瘀生肌”的学术理论。同时，益气化瘀组更优于拆方组更进一步说明，益气法与化瘀法合用，能更大程度的逆转“因虚致瘀”“瘀阻伤正”的致损病机，更体现中医相须配伍的科学性。

[参考文献]

[1] 阙华发, 唐汉钧, 向震宇, 等. 益气化瘀为主综合方案治疗糖尿病性足溃疡临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(1): 14-17.
 [2] 张臻, 阙华发, 朱元颖, 等. 益气化瘀生肌法中药促进

糖尿病大鼠创面愈合的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(4): 277-279.
 [3] 张臻, 阙华发, 朱元颖, 等. 益气化瘀中药对糖尿病皮肤溃疡大鼠转化生长因子 β 1 的影响[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(4): 416 - 420.
 [4] 张臻, 阙华发, 朱元颖, 等. 益气化瘀中药对大鼠糖尿病皮肤溃疡 TGF-β 受体的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(5): 487-490.
 [5] 阙华发, 张臻, 王云飞, 等. 益气化瘀方对糖尿病溃疡大鼠 Smad3、Smad4 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(2): 24-27.
 [6] 于德民, 吴锐, 尹潍, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3(2): 105-109.
 [7] 阙华发. 糖尿病性足病的中医诊治[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(1): 2-6.
 [8] 邱林, 金先庆. 转化生长因子 β 在创伤愈合、瘢痕增生以及骨形成方面的研究与进展[J]. 中国临床康复, 2005, 9(10): 178-179.
 [9] 程颢, 付小兵, 刘文忠, 等. 创面愈合过程中脂肪细胞内转化生长因子-β 各亚型的表达特点及其生物学意义[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(3): 360-362.
 [10] 王荣国, 周卫, 章永东. TGF-β 促纤维化机制及中药干预的研究进展[J]. 中国骨伤, 2008, 21(2): 161-163.
 [11] 杨力. Smad 蛋白家族与 TGF-β 信号转导[J]. 中国美容医学, 2001, 10(6): 547-549.
 [12] Akman HO, Zhang H, Siddiqui MA, et al. Response to hypoxia involves transforming growth factor-β 2 and SMAD proteins in human endothelial [J]. Blood, 2001, 98(12): 3324-3331.
 [13] 陈开容, 李万成, 黄旭晴. 转化生长因子 β /smad 途径在血管生成和促纤维化中的作用及切换[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(4): 244-247.

(责任编辑: 骆欢欢)



·书讯·《〈内经〉临证温课与辅导》由广州中医药大学黎敬波教授编著，人民卫生出版社出版。本书针对目前中医经典教学与临床实践相脱节的问题，力图贴近临床，深度挖掘《内经》临证思想，以指导解决临床实际问题。本书的特点是精简、实用和归真，书中引用原文较广泛，是对本科学习经文的扩展，书中对原文的解释尽量精简，点到即止。全书与疾病及诊治的相关内容较多，分析解释也尽量做到联系实际，实用与归真并重是本书的特点。每本 35 元（含包装邮费），欲购者请汇款至广州市番禺区大学城外环东路 232 号广州中医药大学《新中医》编辑部发行科，邮政编码：510006。