

◆方药实验研究◆

雷公藤甲素促进 TNF 转基因小鼠破骨前体细胞凋亡及 c-IAP1/2 降解的研究

蔡灯塔, 王新春, 王景春, 李宝印

河南大学第一附属医院药学部, 河南 开封 475000

[摘要] 目的: 用雷公藤甲素 (Triptolide, TPL) 诱导破骨前体细胞 (Osteoclast precursor cells, OCPs) 凋亡, 评价凋亡抑制蛋白 1/2 (cellular inhibitors of apoptosis proteins 1/2, c-IAP1/2) 在 OCPs 凋亡中的参与性。方法: 从具有人类类风湿关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 临床症状的肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) 转基因 RA 小鼠骨髓中分离、诱导 OCPs, 分为 OCPs 组、RANKL/OCPs 组、TNF/OCPs 组、TPL/RANKL/OCPs 组和 TPL/TNF/OCPs 组。TPL 作用于核因子受体激活因子 (Receptor activator of nuclear factor, RANKL) 或 TNF 诱导的 OCPs, 用流式细胞法检测早期细胞凋亡, 用 Western blot 法检测 c-IAP1/2 表达, 以及用 Luminescence 法检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3/7 (Aspartate specific cysteine protease 3/7, Caspase3/7) 表达。结果: 与 OCPs 组比较, RANKL/OCPs 组和 TNF/OCPs 组中凋亡细胞、Caspase3/7 水平显著增加 ($P < 0.05$), RANKL/OCPs 组中 c-IAP1/2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 RANKL/OCPs 组比较, TPL/RANKL/OCPs 组凋亡细胞数、Caspase3/7 水平显著升高, c-IAP1/2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 TNF/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组凋亡细胞、Caspase3/7 水平显著增加、c-IAP1/2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 TPL/RANKL/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组凋亡细胞显著增加, Caspase3/7 水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: TPL 在 OCPs 分化过程中可诱导 OCPs 发生早期凋亡, 而 c-IAP1/2 参与其中, 本研究为 RA 治疗靶点提供实验资料。

[关键词] 类风湿关节炎 (RA); 雷公藤甲素 (TPL); 破骨前体细胞 (OCPs); 凋亡抑制蛋白 1/2 (c-IAP1/2); 动物实验; TNF 转基因小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 01-0001-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.01.001

Study on Triptolide Promoting Apoptosis of Osteoclast Precursor Cells and c-IAP1/2 Degradation in TNF Transgenic Mice

CAI Dengta, WANG Xinchun, WANG Jingchun, LI Baoyin

Abstract: **Objective:** To evaluate the involvement of cellular inhibitors of apoptosis proteins 1/2(c-IAP1/2) in apoptosis of osteoclast precursor cells(OCPs) by using triptolide(TPL) to induce the apoptosis of OCPs. **Methods:** OCPs were induced after being separated from the bone marrow in tumor necrosis factor(TNF) transgenic mice with clinical symptoms of human rheumatoid arthritis (RA). Divided them into the OCPs group, the RANKL/OCPs group, the TNF/OCPs group, the TPL/RANKL/OCPs group and the TPL/TNF/OCPs group respectively. After TPL acted on receptor activator of nuclear factor (RANKL) or TNF to induce OCPs, detected early apoptosis via flow cytometry, detected the expression of cellular inhibitors of apoptosis protein (cIAP1/2) via Western blot, and detected the expression of aspartate specific cysteine protease 3/7 (caspase3/7) via luminescence method. **Results:** Comparing with the OCPs group, the apoptotic cells and levels of caspase3/7 in the RANKL/OCPs group and the TNF/OCPs group were significantly increased($P < 0.05$), and levels of c-IAP1/2 in the RANKL/OCPs group were significantly higher($P < 0.05$). Comparing with the RANKL/OCPs group, the apoptotic cells

[收稿日期] 2018-07-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81471558)

[作者简介] 蔡灯塔 (1977-), 女, 主管药师, 研究方向: 临床药学。

[通信作者] 王景春, E-mail: ja28sy@163.com。

and levels of caspase3/7 in the TPL/RANKL/OCPs group were significantly increased, and levels of c-IAP1/2 were significantly decreased ($P < 0.05$). Comparing with the TNF/OCPs group, the apoptotic cells and levels of caspase3/7 in the TPL/TNF/OCPs group were significantly increased, and levels of c-IAP1/2 were significantly decreased ($P < 0.05$). Comparing with the TPL/RANKL/OCPs group, the apoptotic cells in the TPL/TNF/OCPs group were significantly increased, and the levels of caspase3/7 were significantly decreased, difference being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** TPL can induce the early apoptosis of OCPs during differentiation, with the involvement of c-IAP1/2. This study provides experimental data for therapeutic target of RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis(RA); Triptolide(TPL); Osteoclast precursor cells(OCPs); Cellular inhibitors of apoptosis proteins 1/2(c-IAP1/2); Animal experiment; TNF transgenic mice

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)目前尚无治愈措施^[1], 主要以滑膜关节慢性炎症导致骨和软骨破坏为病理特征。破骨前体细胞(Osteoclast precursor cells, OCPs)不仅浸润滑膜, 产生致炎因子, 而且可分化为破骨细胞, 成为吸收、降解骨组织骨基质的唯一细胞。且破骨细胞属于终末分化细胞, 生存时间短, 在 RA 发病进程中需要 OCPs 的分化和迁移进行不断补充, 因此, 有研究者提出, 控制 OCPs 迁移、分化成破骨细胞, 可能是 1 个控制 RA 的策略。雷公藤甲素(Triptolide, TPL)作为雷公藤发挥抗 RA 作用的主要活性单体, 即可抑制肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)生成^[2], 也可抑制核因子受体激活因子(Receptor activator of nuclear factor, RANKL), 结合对破骨细胞诱导分化的分子机制研究, RANKL 和 TNF 均可引起破骨细胞分化。基于此, 本研究拟用 TPL 抑制 TNF 转基因小鼠 OCPs, 检测凋亡抑制蛋白 1/2(Cellular inhibitors of apoptosis proteins, cIAP1/2) 以及凋亡相关分子的表达变化, 观察 TPL 作用机制, 以及 cIAP1/2 在 OCPs 凋亡过程中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3月龄 TNF 转基因小鼠(TNF/tg 小鼠)由河南大学药学院谢松强教授赠送, 雌雄各半、体质量 15~20 g, 动物生产许可证号: SCXK(豫)2014-0003, 培养于河南大学药学院药理实验室的 SPF 级环境中。

1.2 主要试剂 TPL、巨噬细胞集落刺激因子(Macrophage Colony-Stimulating Factor, M-CSF)、TNF(Sigma 公司), RANKL(Peprotech 公司), PI-膜联蛋白 V(PI-Annexin V)试剂盒(同仁化学公司), α -最低必须培养基(α -Minimum Essential Medium, α -MEM)(Gibco 公司), Caspase-GloR3/7 试剂盒(Promega 公司),

c-IAP1/2 一抗(Santa Cruz 公司), 二抗和增强化学发光法(Enhanced chemiluminescence, ECL)显色试剂(武汉博士德公司)。

1.3 主要仪器 细胞培养箱(ThermoFisher 公司), 化学发光检测仪 EnVision(PerkinElmer 公司), 流式细胞仪 FACSCalibur(BD 公司)。

1.4 OCPs 培养 小鼠脱臼处死并酒精浸泡 5 min 除菌, 无菌环境下剥离双侧股骨, 清除骨表面的软组织以及骨髓后, 剪断骨干 2 侧, 用 1 mL 注射器吸取 PBS 冲洗骨髓腔收集骨髓细胞, 离心收集细胞沉淀后, 用 α -MEM 重悬, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中静置过夜; 收集未贴壁细胞(单核细胞), 离心取细胞沉淀继续培养, 用含 25 mg/L M-CSF 的 α -MEM 培养液继续培养 48 h, 作为 OCPs 用于实验检测。

1.5 药物干预破骨细胞诱导分化 PBS 仔细清洗, 去除未贴壁的淋巴细胞和血细胞, 将贴壁的骨髓单核细胞按 10⁴/cm² 的浓度接种于培养板, 加入 M-CSF/RANKL 或 M-CSF/TNF 诱导分化, 并加入 1 μ mol/L 的 TPL 促 OCPs 凋亡。分为 OCPs 组(加入等量 25 mg/L M-CSF), RANKL/OCPs 组(25 mg/L M-CSF+25 mg/L RANKL); TNF/OCPs 组(25 mg/L M-CSF+20 mg/L TNF); TRL/RANKL/OCPs 组(RANKL/OCPs 组基础上加入 1 μ mol/L TPL), 培养 48 h 后, 检测相应的指标。

1.6 细胞凋亡检测 TPL 处理 48 h 后, 细胞用胰酶消化, 制备单细胞悬液, 计数并调整细胞浓度为 10⁶/mL。离心弃去上清, PBS 洗涤 2 次以去除细胞碎片, 取 100 μ L 细胞悬液, 按照试剂盒说明书要求, 加入 AnnexinV-FITC 结合物, 室温避光 30 min, 再加入蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor, PI), 室温避光 15 min, 最后加入 400 μ L AnnexinV Binding Solution, 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.7 Western Blot 法检测 cIAP1/2 细胞蛋白含量 TPL 处理 48 h 后，用含 0.2% (w/v) SDS, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) 脱氧胆酸钠, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF) 和 1% 蛋白酶抑制剂的裂解液裂解 OCPs, 用蛋白质定量 (Bicinchoninic acid, BAC) 法检测裂解蛋白的总浓度, 取等质量蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 电泳, 并转膜到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 携带蛋白的 PVDF 膜经牛血清白蛋白 (Albumin from bovine serum, BSA) 封闭、一抗 4 °C 过夜孵育后, 用二抗孵育, 最后用 ECL 显色试剂显色。

1.8 Luminescence 法检测 Caspase3/7 活性 OCPs 按照 10⁵/孔接种于 96 孔板中, 按照分组进行相应处理, 24 h 后, 根据说明书要求, 加入相同体积的

Caspase3/7 试剂, 静置 30 min 后, 检测其化学发光表达量。

1.9 统计学方法 用 SPSS15.0 软件对上述数据进行统计分析, 实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 OCPs 凋亡结果比较 见图 1、表 1。与 OCPs 组比较, RANKL/OCPs 组和 TNF/OCPs 组中凋亡细胞显著增加, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。与 RANKL/OCPs 组比较, TPL/RANKL/OCPs 组凋亡细胞显著增加, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 与 TNF/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组凋亡细胞显著增加, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 与 TPL/RANKL/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组凋亡细胞显著增加, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

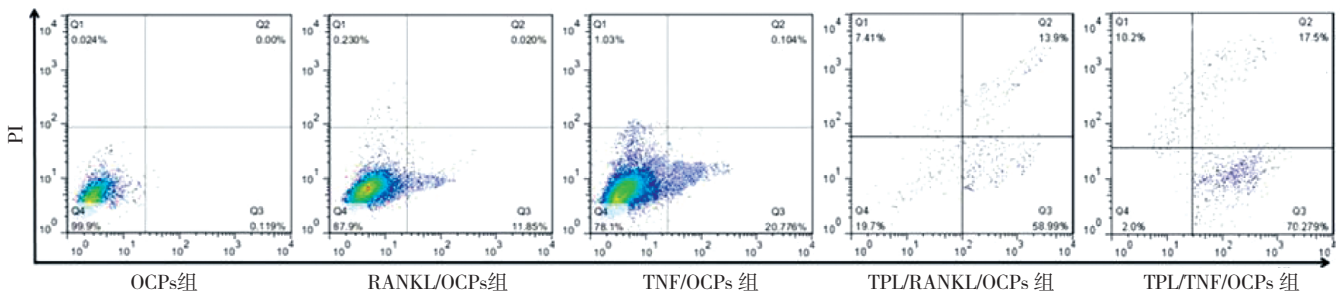


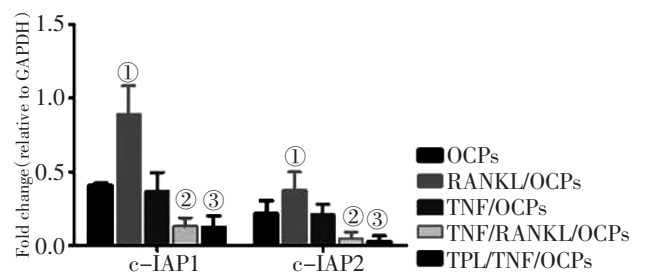
图 1 各组 OCPs 凋亡结果比较

表 1 各组 OCPs 凋亡结果比较 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	OCPs 组	RANKL/OCPs 组	TNF/OCPs 组	TPL/RANKL/OCPs 组	TPL/TNF/OCPs 组
凋亡细胞比率	1.3 ± 1.2	12.3 ± 3.3 ^①	19.4 ± 5.4 ^①	57.6 ± 10.5 ^②	73.2 ± 9.0 ^{③④}

与 OCPs 组比较, ① *P* < 0.05; 与 RANKL/OCPs 组比较, ② *P* < 0.05; 与 TNF/OCPs 组比较, ③ *P* < 0.05; 与 TPL/RANKL/OCPs 组比较, ④ *P* < 0.05

2.2 各组 OCPs c-IAP1/2 蛋白表达结果比较 见图 2。与 OCPs 组比较, RANKL/OCPs 组中 c-IAP1/2 蛋白水平显著升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); TNF/OCPs 组中 c-IAP1/2 蛋白水平差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。与 RANKL/OCPs 组比较, TPL/RANKL/OCPs 组中 c-IAP1/2 蛋白水平显著降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 与 TNF/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组中 c-IAP1/2 蛋白水平显著降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。



与 OCPs 组比较, ① *P* < 0.05; 与 RANKL/OCPs 组比较, ② *P* < 0.05; 与 TNF/OCPs 组比较, ③ *P* < 0.05

图 2 各组 OCPs c-IAP1/2 蛋白表达结果比较

2.3 各组 OCPs Caspase3/7 结果比较 见表 2。与 OCPs 组比较, RANKL/OCPs 组、TNF/OCPs 组中 Caspase3/7 水平显著升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 与 RANKL/OCPs 组比较, TPL/RANKL/OCPs 组中 Caspase3/7 水平显著升高, 差异有统计学意义

($P < 0.05$); 与 TNF/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组中 Caspase3/7 水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 TPL/RANKL/OCPs 组比较, TPL/TNF/OCPs 组中 Caspase3/7 水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组 OCPs Caspase3/7 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OCPs 组	RANKL/OCPs 组	TNF/OCPs 组	TPL/RANKL/OCPs 组	TPL/TNF/OCPs 组
Caspase3/7	12 231 ± 455	17 877 ± 564 ^①	21 332 ± 765 ^②	40 981 ± 1 067 ^③	38 756 ± 1 228 ^④

与 OCPs 组比较, ① $P < 0.05$; 与 RANKL/OCPs 组比较, ② $P < 0.05$; 与 TNF/OCPs 组比较, ③ $P < 0.05$; 与 TPL/RANKL/OCPs 组比较, ④ $P < 0.05$

3 讨论

作为关节炎动物模型, TNF/tg 小鼠同胶原诱导的关节炎(Collagen induced arthritis, CIA)或佐剂诱导的关节炎(Adjuvant-induced arthritis, AA)动物模型不同的是, 其 RA 症状的表现更符合人类的临床症状, 因此具有重要的研究价值。Li P 等^[2]和 Yao Z 等^[4]分别证明, TNF/tg 小鼠脾脏中 CD11b⁺OCPs 和外周血系统中 CD11b⁺Gr-1⁻ 和 CD11b⁺Gr-1^{lo} 的 OCPs 含量明显增加, 并且与 TNF 水平呈正相关关系, 这些特征也为 OCPs 的分离提取提供了有利条件。

TPL 作为破骨细胞成熟、分化的诱导分子, 还具有促进单核巨噬细胞凋亡的作用, 可能是通过转化生长因子激酶(TAK1)激活核转录因子 B(NF- κ B)实现的^[5]。本研究中, 当加入 TPL 时, 可见细胞的凋亡增加, 再一次证实了 TPL 也具有促进 OCPs 凋亡的作用。另外, Kohara H^[6]研究表明虽然 TNF 可诱导 OCPs 分化, 但 TNF 也可以通过上调 FasL mRNA 水平, 造成 OCPs 细胞核断裂和细胞凋亡, 这同本研究中 TNF 诱导 OCPs 的凋亡升高的结果一致, 证实了 TNF 同时具有促进 OCPs 凋亡的机制。可见, RANKL 和 TNF 即具有促进破骨细胞分化的作用, 也具有促进 OCPs 凋亡的功能。

c-IAP 属于细胞凋亡抑制蛋白家族成员, 可直接抑制半胱氨酸蛋白酶(Caspase)或作用于 TNF 受体介导的信号转导通路。由于 RANKL 和 TNF 既影响下游众多的信号通路, 也具有促 OCPs 凋亡的功能, 而 c-IAP 是否参与了 RANKL 和 TNF 诱导的 OCPs 凋亡, 这方面的报道目前较少。仅 Reuter S^[7]研究结果表明 c-IAP1/2 同家族成员 X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)的抑制剂 Embelin,

具有阻碍 TPL 诱导的破骨细胞形成作用, 间接证明了 XIAP 参与了破骨细胞的形成, 提示 c-IAP 可能参与了破骨细胞的形成。本研究中, TPL 处理 OCPs 的过程中, c-IAP 水平明显增加, 证明了 c-IAP 参与了 TPL 诱导 OCPs 分化或参与 OCPs 凋亡。同时, 本研究证实 TPL 可抑制 RANKL 诱导的破骨细胞生成, 也可抑制 TNF 诱导的破骨细胞生成, 当加入 1 μ mol/L 的 TPL 时, OCPs 凋亡细胞比例大幅度上升, 且 Caspase3/7 也明显上升, 反映了 TPL 能显著促进 OCPs 的凋亡。而这种凋亡作用同 c-IAP1/2 相关, 经 TPL 处理后, c-IAP1/2 明显降低, 提示 c-IAP1/2 参与了 TPL 诱导关节炎 TNF/tg 小鼠 OCPs 的凋亡过程。

综上, 本研究首次应用 TNF 转基因关节炎小鼠模型, 采集其骨髓 OCPs, 用 RANKL 和 TNF 诱导破骨细胞生成, 并用 TPL 诱导 OCPs 凋亡, 发现 RANKL 和 TNF 同时具有促 OCPs 凋亡的作用, 而 TPL 具有显著的促凋亡作用, c-IAP1/2 参与该凋亡过程, 引起 Caspase3/7 的变化, 但由于 RANKL、TNF 和 c-IAP1/2 相关的信号通路众多, 因此, 具体调节机制及参与程度尚需更多的研究来证实。

【参考文献】

- [1] 杨群智, 张舸, 和晶. 类风湿关节炎患者肿瘤坏死因子- α -308(G/A)基因多态性与依那西普疗效相关性分析[J]. 河北医学, 2018, 24(5): 774-777.
- [2] Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. RANK signaling is not required for TNF α -mediated increase in CD11 (hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF α -mediated inflammatory arthritis[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(2): 207-213.
- [3] 李颖, 陈向东. 雷公藤甲素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组织中核转录因子- κ B 和诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(2): 351-353.
- [4] Yao Z, Li P, Zhang Q, et al. Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281(17): 11846-11855.
- [5] Lamothe B, Lai Y, Xie M, et al. TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(3): 582-595.
- [6] Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, et al. IFN- γ directly

inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions[J]. Immunol Lett, 2011, 137(1-2): 53-61.

[7] Reuter S, Prasad S, Phromnoi K, et al. Embelin suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B

ligand and tumor cells in vitro through inhibition of the NF- κ B cell signaling pathway[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(10): 1425-1436.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)

益气活血通阳法对糖尿病足大鼠 HIF-1 α /SDF-1 通路作用的调节

凌含鹏¹, 方水林²

1. 嘉善县中医医院, 浙江 嘉善 314100; 2. 嘉兴市中医医院, 浙江 嘉兴 314100

[摘要] 目的: 从细胞和基因水平探讨自拟糖尿病足1号方通过影响缺氧诱导因子-1 α /细胞衍生因子1 (Hypoxia inducing factor-1 α /Cell derived factor-1, HIF-1 α /SDF-1) 通路改善血管氧供状态, 修复血管内皮, 防治早期糖尿病足, 促进血管新生的作用机理。方法: SD 雄性大鼠 64 只, 随机抽取 10 只大鼠作为空白组 (A 组), 予普通饲料喂养, 剩余 54 只予高脂饲料喂养, 建立糖尿病足模型。将符合条件的早期糖尿病足大鼠随机分为模型组 (B 组)、糖尿病足1号方低剂量组 (C 组)、糖尿病足1号方高剂量组 (D 组), B 组 10 只、C 组 11 只, D 组 11 只。A、B 组给予生理盐水灌胃, C、D 组以不同剂量糖尿病足1号方灌胃, 连续 8 周, 观察各组大鼠行为表现、体质量等一般情况, 实验结束后腹主动脉取血, ELISA 法检测大鼠空腹血糖 (Fasting blood-glucose, FBG)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC) 水平, 分离腓肠肌组织用 RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 及 SDF-1 mRNA 的表达。结果: 与 A 组比较, B 组大鼠 FBG、TG、TC、HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA 的表达升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 B 组比较, C、D 组大鼠 FBG、TG、TC、HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA 的表达降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 C 组比较, D 组 TG、TC、HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA 的表达降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), FBG 差异无统计学意义。结论: 益气活血通阳法通过调节血糖, 改善组织缺氧、应激状态, 调控 SDF-1 mRNA 及 HIF-1 α 表达, 修复已损伤的血管内皮, 促进血管新生。

[关键词] 益气活血通阳法; 糖尿病足; HIF-1 α /SDF-1 通路; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 01-0005-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.01.002

Qi-supplementing, Blood-invigorating and Yang-activating Method Has Regulatory Effect on HIF-1 α /SDF-1 Pathway in Rats with Diabetic Foot

LING Hanpeng, FANG Shuilin

Abstract: **Objective:** To explore the mechanism of NO.1 Self-made Prescription for Diabetic Foot by affecting HIF-1 α /SDF-1 pathway to improve vascular oxygen supply, repair vascular endothelium, prevent early diabetic foot and promote angiogenesis from the perspective of cell and gene levels. **Methods:** A total of 64 male SD rats were randomly selected, among which 10 rats were included in the blank group (Group A) to be fed with ordinary feed, and the remaining 54 to be fed with high-fat feed to establish the diabetic foot models. Eligible rats with early-stage diabetic foot were randomly divided into model-group (Group B), low-dose NO.1 Prescription for Diabetic Foot group (Group C), high-dose NO.1 Prescription for Diabetic Foot group (Group D), with 10 rats in Group B, 11 in Group C and 11 in Group D. Group A and B

[收稿日期] 2018-05-17

[基金项目] 2016 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (中国中医药人教发 [2016] 42 号)

[作者简介] 凌含鹏 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治内分泌代谢疾病。

[通信作者] 方水林, E-mail: 374441892@qq.com。