

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.12.010

全蝎软膏对大鼠糖尿病皮肤溃疡创面愈合的效果评价*

王 景 回雪颖 郭伟光[△] 张海丽 于 洋 滕 林

(黑龙江中医药大学附属第二医院周围血管病科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨全蝎软膏治疗糖尿病皮肤创面愈合的作用及其机制。**方法:**采用 SPF 级 SD 大鼠构建糖尿病皮肤溃疡模型,将其随机平均分为对照组、模型组、全蝎软膏组和湿润烧伤膏组。造模后,分别在创面处涂抹全蝎软膏或湿润烧伤膏处理,空白组和模型组用 PBS 处理,观察和比较各组创面的愈合情况,并收集用药后 3 d、7 d、10 d 和 14 d 的创面肉芽组织进行 HE 染色,通过 ELISA 及荧光定量 PCR 检测肉芽组织内碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管性假血友病因子(vWF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 与 Smad 4 基因的表达。**结果:**成功构建大鼠糖尿病皮肤溃疡模型,成模率为 96.15%。创伤后第 3 d、7 d、10 d 和 14 d,各治疗组创面愈合率均显著高于模型组($P<0.05$),给药 14 d 时,全蝎软膏组创面愈合率已接近对照组水平。HE 染色结果显示与模型组相比,全蝎软膏组中肉芽组织生长较快、毛细血管数量增多且组织纤维化程度较低。ELISA 和荧光定量 PCR 检测结果显示与模型组和湿润烧伤膏组相比,全蝎软膏组肉芽组织内 bFGF、vWF 含量上调更显著($P<0.05$),而 TNF- α 含量与 Smad 4 mRNA 显著降低($P<0.05$)。**结论:**全蝎软膏可促进糖尿病皮肤溃疡创面肉芽组织的生长,可能与其抑制炎症反应并改善血管功能有关。

关键词:全蝎软膏;湿润烧伤膏;糖尿病皮肤溃疡;创面愈合

中图分类号:R587.2;R246.7;R244.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)12-2252-06

Effect of Scorpion Ointment on the Wound Healing of Diabetic Cutaneous Ulcer in Rats*

WANG Jing, HUI Xue-ying, GUO Wei-guang[△], ZHANG Hai-li, YU Yang, TENG Lin

(Department of Peripheral Vascular Diseases, The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and mechanism of scorpion ointment in the treatment of diabetic cutaneous ulcer. **Methods:** The diabetic cutaneous ulcers model was established with SPF grade SD rats and divided into control group, model group, scorpion ointment group and MEBO group, respectively. After modeling, the scorpion ointment or MEBO were applied to the wound surface, while the control group and model group were treated with PBS. Observation and comparison of wound healing in each group, and the granulation tissue of wound was collected for H.E staining. ELISA and real-time PCR detection for the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular pseudoheophilia factor (VWF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Smad-4 in granulation tissue on the 3 d, 7 d, 10 d and 14 d after treatment. **Results:** The model of diabetic cutaneous ulcer in rats was established successfully and the model rate was 96.15%. On the 3 d, 7 d, 10 d and 14 d after trauma, the wound healing rate of each treatment group was higher than that of the model group ($P<0.05$). The wound healing rate of scorpion ointment group was close to that of the control group at the 14 d of administration. The results of H.E staining showed that the granulation tissue grew faster, the number of capillaries increased and the degree of tissue fibrosis was lower in the scorpion ointment group than in the model group. The results of ELISA and qPCR showed that bFGF and vWF in granulation tissue of the scorpion ointment group were significantly higher than those of the model group and MEBO group($P<0.05$), while the TNF- α and Smad 4 gene decreased significantly ($P<0.05$). However, the therapeutic effect of scorpion ointment is more significant. **Conclusion:** The scorpion ointment can promote the growth of granulation tissue in diabetic cutaneous ulcer, which may be related to its inhibition of inflammation and improvement of vascular function.

Key words: Scorpion ointment, Moist exposed burn ointment; Diabetic cutaneous ulcers; Wound healing

Chinese Library Classification (CLC): R587.2; R246.7; R244.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)12-2252-06

前言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是全球范围内常见的全身慢性代谢性疾病之一,根据世界卫生组织(World Health

* 基金项目:黑龙江省中医药学会青年中医药科技创新计划项目(ZHY19-052);黑龙江省自然科学基金项目(H2017067; H201477);

黑龙江中医药大学校基金项目(201812)

作者简介:王景(1980-),男,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向:中西医结合治疗周围血管病, E-mail: wangjing19800610@126.com

[△] 通讯作者:郭伟光,男,博士、主任医师、硕士生导师;主要从事中西医结合治疗周围血管病, E-mail: 13936419977@163.com

(收稿日期:2019-11-23 接受日期:2019-12-18)

Organization, WHO) 最新统计显示,2017 年全世界约有 5.1 亿成年人被诊断为 DM 患者且该数量正以每年 0.5 个百分点逐年上升^[1-3]。随着人们生活方式与饮食习惯不断发生改变,DM 并发症的发病率大幅上升,如心血管疾病、眼底病及肾脏疾病等,糖尿病皮肤溃疡(diabetic cutaneous ulcers, DCU)已成为诸多并发症中发病率较高的疾病之一,DM 患者并发皮肤溃疡风险高达 25%且复发率极高^[4-6]。血液循环不畅、神经病变及局部感染被认为是引起 DCU 发病的重要因素,当 DCU 患者皮肤创面形成导致微血管功能障碍,创面长期不愈、反复发作增加了局部感染风险,使得创面愈合能力降低并形成顽固性溃疡,严重时需进行截肢手术,常给患者的身体及家庭造成双重影响^[7,8]。

目前,因糖尿病皮肤溃疡的病情呈复杂化和多样化,临床上对 DCU 的治疗方法尚不统一,现代医学对 DCU 疾病一般采取保守药物结合手术治疗以改善血液循环,达到清创和控制感染的目的,但治疗费用昂贵且溃疡创面易反复发作^[9,10]。近年来,以往治疗手段为基础结合我国传统医学方法已在临床上被用于治疗早期 DCU 疾病上取得了重大突破,副作用小、治疗费用低且不易反复发作。李玉珠^[11]等选取托里消毒散精简方对糖尿病皮肤溃疡进行治疗,该方可通过上调 Ang-1 蛋白表达水平以促进肉芽组织生长,舒张血管活性并促进伤口愈合等作用;张丹丹等^[12]人应用不同剂量的积雪草提取物对大鼠糖尿病皮肤溃疡创面进行修复,发现中剂量的软膏在创面愈合过程中能够促进成纤维细胞增殖,帮助新生血管形成。

全蝎软膏因具有清热解毒、抗菌消炎、活血化瘀、促进伤口愈合之功效,被认为是积雪苷霜、三七总甙等之外又一可用于临床治疗 DCU 的潜在用药,并在褥疮、下肢静脉溃疡、单纯性肛瘘和干燥性鼻炎等疾病的治疗上取得了良好的应用效果^[13-15]。截至目前,少有全蝎软膏治疗 DCU 疾病的报道。本研究通过构建大鼠糖尿病皮肤溃疡模型,观察了全蝎软膏治疗后 DCU 创面的愈合情况、血管性假血友病因子(von Willebrand Factor, vWF)、Smad 4 等基因的表达,以期临床早期治疗 DCU 疾病寻找新的解决方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 全蝎软膏为黑龙江中医药大学附属二院提供;湿润烧伤膏购自汕头市美宝制药有限公司(国药准字 Z20000004);苏木精-伊红染色(H.E)试剂盒、多聚甲醛、链

脉佐菌素(STZ, S0130)购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自 TAKARA 生物(大连)有限公司;人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)试剂盒、血管性假血友病因子(vWF)试剂盒购自上海恪敏生物科技有限公司;荧光定量 PCR 仪(Tanon 25000)购自上海天能科技有限公司;倒置显微镜(DM 2000)购自 Olympus 株式会社;罗氏卓越纤巧型血糖仪及试纸购自罗氏诊断产品(上海)有限公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重为 80 g~100 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司(许可证编号:SCXK 辽 2015-0001)。饲养于黑中医附属二院的动物中心内,购买后适应性喂养 7~10 天,环境条件为 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%~60%、光照 12 h/天、饮食及进水均自由。

1.2 方法

1.2.1 大鼠糖尿病皮肤溃疡模型的制备 将上述 40 只 SD 大鼠平均分成 4 组(空白组、模型组、湿润烧伤膏组、全蝎软膏组),每组 10 只,除空白组外的其他组均以高脂饲料连续饲喂 1 月,随后,对 DM 组大鼠腹腔注射以柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 4.6)制成的 1%的 STZ(注射剂量:50 mg/kg)制备糖尿病模型,3 天后大鼠尾静脉采血,以空腹血糖值 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 即为糖尿病模型诱导成功,造模完成后对 DM 大鼠进行监测并做好记录。常规饲料喂养 3 d 后的各组大鼠尾静脉注射 3.5%水合氯醛进行麻醉,剃剪大鼠背部长毛并用龙胆紫在脱毛去标记面积约为 $4 \times 4 \text{ cm}$ 大小的造模面积,于无菌条件下剪去造模区皮肤并深达筋膜,六层医用纱布覆盖创面后用医用纸胶带包扎固定作为大鼠糖尿病皮肤溃疡模型。

1.2.2 给药及取材 按照血糖和体重对造模未成功或死亡大鼠予以剔除,各组给药方式及用量如表 1 所示,正常组和模型组皮肤创面用 PBS 缓冲液连续处理 14 天,1 次/d;湿润烧伤膏组创面连续外敷湿润烧伤膏 14 天,1 次/d;全蝎软膏组创面连续外用全蝎软膏 14 天,1 次/d,分别于治疗后的 3、7、10 和 14 d 观察创面愈合状态,Image-Pro® Plus 6.0 图像分析软件测定创面面积并计算愈合率^[16]。同时,分别取上述对应天数的创面肉芽组织,一部分固定于 10%的甲醛溶液中,石蜡包埋切片进行 H.E 染色;另一部分组织样本经 PBS(0.01 M, pH=7.4)冲洗后保存至 -80℃冰箱中用于成纤维细胞生长因子、血管性假血友病因子、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及 Smad4 基因的检测。

表 1 大鼠糖尿病皮肤溃疡的治疗方案

Table 1 Therapeutic regimen for diabetic cutaneous ulcers in rats

Groups	Therapeutic modalities	Administered dose	Treatment time
Control	PBS	0.1 mL/cm ²	14 d
Model	PBS	0.1 mL/cm ²	14 d
Moist exposed burn ointment	Moist exposed burn ointment	100 mg/cm ²	14 d
Scorpion ointment	Scorpion ointment	100 mg/cm ²	14 d

1.2.3 组织病理学检查 将上述经石蜡包埋的病理肉芽组织和正常组织切成厚度约为 4 μm 的切片,置于载玻片上 63℃作用 4 小时;按照苏木素-伊红(H.E)染色液说明书进行操作,分

别经苏木精染液、反蓝液蓝化、伊红染色液作用并风干,于 200 倍显微镜下观察并记录结果。

1.2.4 ELISA 检测 将各组皮肤组织用 PBS 缓冲液(0.01 M,

pH=7.4)冲洗三次,弃残留液后晾干;剪碎组织并与一定体积的 PBS 置于玻璃匀浆器中于低温下充分研磨,将匀浆于 12 000× r/min 离心 5 min 取上清液,经测定浓度后备用。按照碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管性假血友病因子(vWF)试剂盒的说明书进行 ELISA 检测,分别设置标准孔和样本孔的 ELISA 检测,反应终止后在 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值并记录。

1.2.5 Real-time PCR 检测 分别取各组大鼠溃疡处肉芽组织约 0.1 g 放入 EP 管中,应用 Trizol 匀浆提取组织内 RNA,取 1 μL 提取液于蛋白分析仪测定含量及纯度;按照逆转录荧光定量 PCR 试剂盒说明书所述配置总反应体系 50 μL:2× qRT-PCR Mix 25 μL,上游/下游引物各 1 μL,Enzyme Mix 1 μL,TRUEscriptRTase 1 μL,RNA 模板 2 μL,RNase free 水补齐反应体系。随后,将 PCR 仪预热至 42 °C,反应管置于荧光定量 PCR 仪中,按 42 °C 30 min,94 °C 3 min,94 °C 20 s、55 °C 20 s、68 °C 20 s,共 40 个循环进行反应,程序结束后可得扩增曲线和溶解曲线,目的基因与内参基因之间比值即代表 Smad4 的表达水平。

1.3 统计学分析

使用 Spss 17.0 软件进行数据分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析加两两多重比较,以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 DCU 造模情况

实验购买的 SD 大鼠在饲养调整后精神状态饱满、饮食及排尿情况正常,30 只用以造模的 SD 大鼠在饲喂高脂饲料及腹腔注射 1%的 STZ 后,有 1 只鼠注射后死亡,3 只大鼠血糖值检测未达到 DM 造模标准(≤ 16.7 mmol/L),造模率达 86.67%。进一步监测 DCU 大鼠可见饮水量、进食量和排尿量较对照组均明显增多,但体重呈下降趋势,出现典型的“三多一少”。与对照组相比,模型组从造模第三天起体重均呈下降趋势且差异性显著($P < 0.05$),而自第 7 天开始差异性更为显著($P < 0.01$),糖尿病组间血糖水平无差异性($P > 0.05$),表明可用于下一步实验分组。DCU 造模时由于麻醉剂量过大或动物个体差异等原因引起死亡 1 只,造模成功率达 96.15%,见表 2。

表 2 DCU 大鼠造模后不同时间点血糖值及体重变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Level of blood glucose and body weight in DCU rats at different time points($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Blood glucose (mmol/L)				Body weight (g)			
		3 d	7 d	10 d	14 d	3 d	7 d	10 d	14 d
Control	10	4.1±0.7	4.3±0.8	4.5±0.6	4.7±0.7	223±11	256±8	273±12	286±14
Model [△]	9	22.7±1.2	24.5±0.6	27.1±0.7	35±0.9	208±9	224±12	235±13	249±15
Moist exposed burn ointment [△]	8	23.5±0.8	25.5±0.7	28.3±1.2	27.2±0.9	215±15	230±16	241±14	259±11
Scorpion ointment [△]	8	22.9±1.1	24.8±0.8	26.2±0.9	28.2±1.2	218±9	235±14	248±12	265±16

Note: [△] $P < 0.01$, vs control group.

2.2 创面愈合情况

按照表 1 中所述方式对 DCU 造模后的各组进行药物或 PBS 处理,创面形态学检测显示经药物 3 d、7 d、10 d 和 14 d 治疗后的各糖尿病组愈合率均低于对照组($P < 0.01$),后者创面肉芽组织随治疗时间推移创面恢复速度碎块,在治疗后的 14 d 愈合率为 95.36%;模型组创面肉芽组织呈鲜红色且伴有少量稠液出现,在四组中愈合率最低。给药 3 d 时,湿润烧伤膏组、

全蝎软膏组与模型组相比无统计学意义($P > 0.05$),于给药第 7 d 开始各给药组创面愈合率高于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),此时创面呈向心生长趋势,愈合速度较快;创伤后第 10 d 开始,全蝎软膏组愈合率明显高于湿润烧伤膏组,且具有统计学意义($P < 0.05$),全蝎软膏组新生肉芽组织逐渐覆盖创面,至第 14 d 时创面大小逐渐缩至并接近对照组水平。结果见表 3。

表 3 各组创面愈合率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the wound healing rate between different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	wound healing rates (%)			
		3 d	7 d	10 d	14 d
Control	10	28.23±2.52	46.86±3.53	73.59±2.14	95.36±0.59
Model	9	7.23±1.25 [△]	12.24±2.21 [△]	20.25±2.52 [△]	46.52±1.53 [△]
Moist exposed burn ointment	8	9.25±0.95 [△]	23.52±1.63 [△]	45.36±1.83 [△]	73.25±1.46 [△]
Scorpion ointment	8	8.32±1.21 [△]	35.28±2.56 [△]	54.67±1.56 [△]	89.21±1.13 [△]

Note: [△] $P < 0.01$, vs control group; [△] $P < 0.05$, vs model group; ^{△△} $P < 0.01$, vs model group.

2.3 创面肉芽组织病理学观察

分别对给药 3 d、7 d、10 d 和 14 d 创面肉芽组织进行病理

切片进行 HE 染色,结果如图 1 所示;对照组中胶原纤维分布均匀、几乎无中性粒细胞浸润,仅有少量胶原沉积且毛细血管

含量丰富。模型组真皮中有大量中性粒细胞,成纤维细胞、胶原蛋白和毛细血管分布减少。给药 7 d 开始,湿润烧伤膏组和全蝎软膏组中均可见少量中性粒细胞,胶原纤维开始增多,

但全蝎软膏组中毛细血管数量较湿润烧伤膏组增多且管腔较大,胶原纤维较多较粗,表明全蝎软膏治疗 DCU 效果高于湿润烧伤膏。

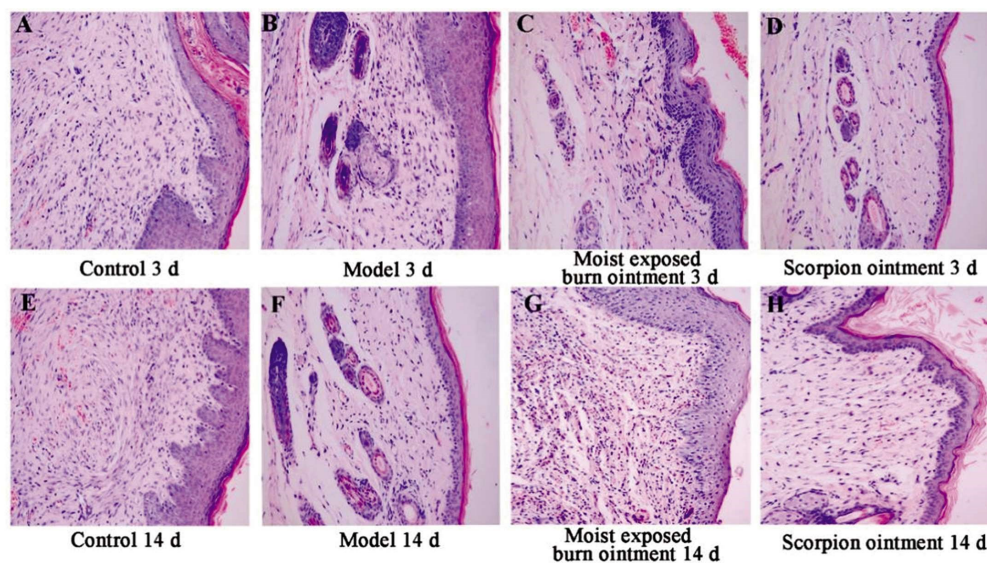


图 1 HE 染色结果(× 200)

Fig.1 The result of HE staining(× 200)

2.4 各组肉芽组织 bFGF、vWF 及 TNF- α 表达的比较

如图 2 所示,与对照组相比,模型组创面肉芽组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管性假血友病因子(vWF)表达量均显著降低,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达量显著升高;经全

蝎软膏组和湿润烧伤膏连续治疗 DCU 后,bFGF 和 vWF 表达量均有所上升,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达量降低,全蝎软膏组治疗效果较湿润烧伤膏组治疗效果显著($P<0.05$)。

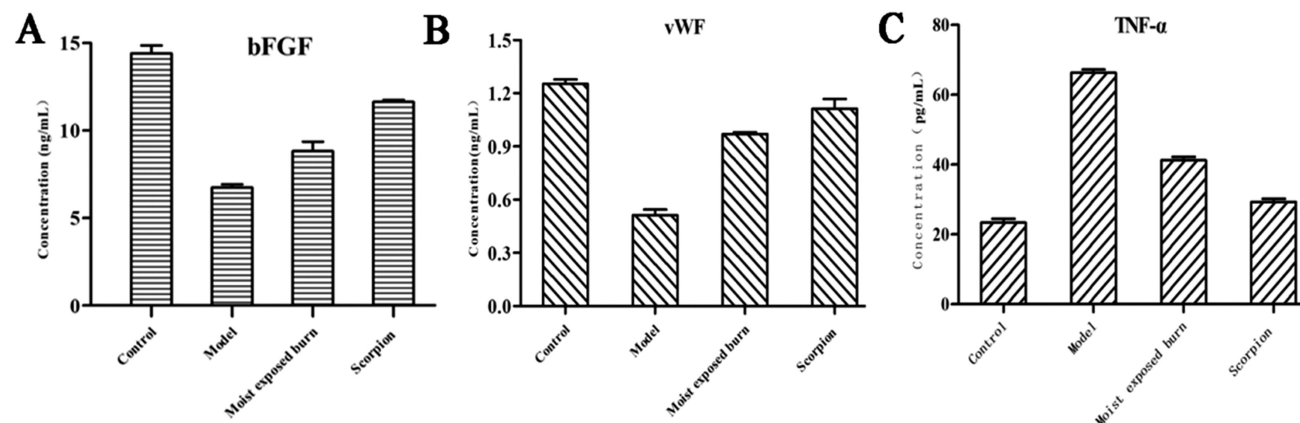


图 2 各组肉芽组织 bFGF、vWF 和 TNF 的表达比较

Fig. 2 Comparison of bFGF, vWF and TNF expression in granulation tissues of each group

2.5 各组创面肉芽组织 Smad4 mRNA 表达的比较

如图 3 所示,在 DCU 造模后各组创面组织内的 Smad4 基因 mRNA 含量均不同程度升高,但经连续用药处理后,自第 3 d 起全蝎软膏组和湿润烧伤膏组组织内 Smad4 基因 mRNA 表达水平较模型组相比开始呈下降趋势,且存在显著性差异($P<0.05$);于治疗后第 7 d 开始全蝎软膏组组织内 Smad4 基因 mRNA 表达水平较湿润烧伤膏组降低且差异性显著($P<0.05$),结果表明全蝎软膏可抑制肉芽组织内 Smad4 基因 mRNA 表达水平来调节创面愈合。

3 讨论

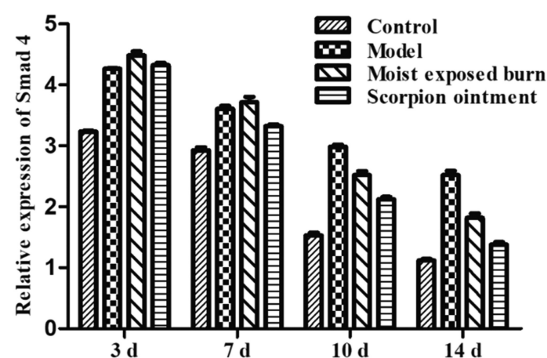


图 3 各组肉芽组织 Smad4 基因 mRNA 表达

Fig. 3 Expression of Smad4 gene mRNA in granulation tissues of each group

糖尿病皮肤溃疡(DCU)作为糖尿病最严重的并发症之一,高复发率和致残率给患者及家庭带来极大的身心痛苦和经济负担,在 DCU 发病早期对该病有针对性治疗,能够在一定程度上减轻患者痛苦并降低治疗费用^[17-19]。近年来,中西医结合治疗 DCU 疾病已取得较大进展,不仅具有明显促进创面愈合、缩短治疗周期和抑制皮肤瘢痕形成等功效,还可明显提高治愈率。合理地选择费用低、副作用小的中药制剂治疗早期 DCU 疾病仍是学者们关注的热点之一^[20,21]。

全蝎软膏由独特的组份制成,包括全蝎、蜈蚣、冰片等,具有清热解毒、活血化瘀、祛腐生肌、抑菌消炎等功效,被认为是用于治疗糖尿病皮肤溃疡的潜在用药。本研究选择 SPF 级 SD 大鼠为实验对象构建 DCU 疾病实验模型,与其他实验动物相比创面制作较为方便,且大鼠自身皮肤愈合能力较强可以缩短实验周期及便于结果观察^[22]。此外,在造模过程中,选择连续喂养高脂饲料结合 STZ 注射方法构建 DCU,可降低在模型复制过程中因动物个体差异或耐受性差而导致的动物死亡率,而造模结果显示本研究大鼠 DCU 的成模率高达 96.15%,证实该造模法能够更好用于 DCU 模型的制备。

皮肤创伤愈合是一个复杂而有序的生物动态过程,但在糖尿病状态下,组织内的炎症反应加剧、肉芽组织形成缓慢、新血管生成受阻等因素均会阻碍 DCU 恢复进程^[23-25]。本研究分别应用全蝎软膏和湿润烧伤膏对 DCU 进行治疗,结果显示全蝎软膏和湿润烧伤膏均能在不同程度上治疗 DCU 疾病,促进肉芽组织再生和修复血管功能,但前者的疗效更显著。经 14 d 的连续用药,两个治疗组均能够促进创面皮肤新的肉芽组织生长,创面面积缩小速度快于模型组。

研究表明在创面修复过程中,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)能够促进成纤维细胞的合成和胶原纤维的合成^[26,27],血管性假血友病因子(vWF)作为血管内皮损伤的分子标志物与新生血管形成关系密切^[28],肿瘤坏死因子 α (TNF- α)是炎症损伤强有力诱导剂可加速炎症反应进程^[29,30]。本研究结果表明全蝎软膏可以通过上调 bFGF 和 vWF 的表达促进皮肤肉芽组织和新生血管的生成,同时抑制 TNF- α 的表达以缓解炎症进程起到保护组织的作用。Smad4 基因突变或表达异常导致 TGF- β 信号蛋白转导异常,当 TGF- β 信号转导受体与 Smads 形成 Smad2/3/4 复合体时 Smad4 起瓶颈作用,通过抑制组织中 Smad4 基因的表达能够降低组织内 Smad4 蛋白的表达以达到阻断成纤维细胞内 TGF- β 信号通路传导的目的,从而达到抑制疾病的发展的目的。荧光定量 PCR 结果显示经全蝎软膏连续治疗后,肉芽组织内 Smad4 基因表达量显著降低而致使 Smad4 蛋白转录与合成水平降低,有利于新生肉芽组织的形成。提示全蝎软膏在抗 DCU 疾病进程中可能与调控 TGF- β /Smad4 通路相关,但具体机制尚需进一步研究证实。综上所述,全蝎软膏在治疗 DCU 进程中能够促进创面新生肉芽组织的形成,抑制炎症反应并重塑新生血管系统来促使创面快速愈合,但全蝎软膏促进 DCU 创面愈合具体的分子机制及相关通路尚需进一步试验探究。

参考文献(References)

- [1] Lai J C, Lai H Y, Nalamolu K R, et al. Treatment for diabetic ulcer wounds using a fern tannin optimized hydrogel formulation with antibacterial and antioxidative properties[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 277-289
- [2] Basri N I, Mahdy Z A, Ahmad S, et al. The World Health Organization (WHO) versus The International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IADPSG) diagnostic criteria of gestational diabetes mellitus (GDM) and their associated maternal and neonatal outcomes[J]. Horm Mol Biol Clin Investing, 2018, 34(1): 132-139
- [3] de Souza B, Moreira A R, Silva O A, et al. Bauhinia forficata in the treatment of diabetes mellitus: a patent review [J]. Expert Opin Ther Pat, 2018, 28(2): 129-138
- [4] Zhang H, Nie X, Shi X, et al. Regulatory Mechanisms of the Wnt/beta-Catenin Pathway in Diabetic Cutaneous Ulcers [J]. Front Pharmacol, 2018, 9(4): 1114-1121
- [5] Yuan N, Ran X. Application of autologous platelet-rich gel to refractory chronic diabetic cutaneous ulcers [J]. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2007, 21(4): 426-429
- [6] Margolis D J, Jeffcoate W. Epidemiology of foot ulceration and amputation: can global variation be explained [J]. Med Clin North Am, 2013, 97(5): 791-805
- [7] Yang Hai-na, Li Da-yong. Research progress of traditional Chinese medicine external therapy in treating diabetes ulcers [J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 29(05): 613-616
- [8] Yu Xin, Dong Hua-Jiang, Shan Na-na, et al. Influence of panax notoginsenoside on tumor necrosis factor- α in rats with diabetic skin ulceration [J]. Journal of Xinxiang Medical College, 2012, 29(12): 893-895
- [9] Al-Kaabi J M, Al Maskari F, Cragg P, et al. Illiteracy and diabetic foot complications[J]. Prim Care Diabetes, 2015, 9(6): 465-472
- [10] Bowling F L, Rashid S T, Boulton A J. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(10): 606-616
- [11] Li Yu-zhu, Zhang Xiao-na, Wang Ying, et al. Effects of Tuoli Xiaodu Powder on healing of wound in diabetic rats with skin ulcer and its mechanism [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(09): 1560-1566
- [12] Zhang Dan-dan, Zhang Han, Zhao Jiu-feng, et al. Treatment of Chronic Ulcer in Diabetic Rats with Asiaticosides [J]. Chin Pharm J, 2017, 52(08): 643-648
- [13] Wang-Jing, Guo Guang-wei, Teng Lin, et al. The 32 cases of diabetic foot treated with scorpion ointment and MEBO [J]. Chinese Traditional Medicine, 2014, 12(17): 33-34
- [14] Xia Kun-peng, Pang Jing, Zhang Miao, et al. Clinical Observation on Pressure Ulcer Treated by Bangci Electro-acupuncture with Quanxie Ruangao [J]. World Latest Medicine Information, 2018, 18(55): 163-164
- [15] Ma Li, Lai Guang-bi, Wang Jing-yi, et al. Clinical Observation of Self-made Chinese Medicine Decoction Combined with Scorpion Ointment in the Treatment of Dry Rhinitis[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2017, 13(3): 147-148
- [16] Zhao Guang-ming, Dong Jian-xun, Li Yuan, et al. Influence of Huiyang Shengji Formula on Wound Healing in Rats with Diabetic Skin Ulcer [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 37(7): 495-499

[1] Lai J C, Lai H Y, Nalamolu K R, et al. Treatment for diabetic ulcer wounds using a fern tannin optimized hydrogel formulation with

- [17] Paschou S A, Stamou M, Vuagnat H, et al. Pain management of chronic wounds: Diabetic ulcers and beyond[J]. *Maturitas*, 2018, 117 (3): 17-21
- [18] Game F. Treatment strategies for neuroischaemic diabetic foot ulcers [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(3): 159-160
- [19] Hicks C W, Canner J K, Karagozlu H, et al. The Society for Vascular Surgery Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI) classification system correlates with cost of care for diabetic foot ulcers treated in a multidisciplinary setting[J]. *J Vasc Surg*, 2018, 67(5): 1455-1462
- [20] Gao Y, Liang Y, Ran X. Research progress of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors on healing of chronic diabetic foot ulcers[J]. *ZhongguoXiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2018, 32(5): 630-633
- [21] Gomes A, Teixeira C, Ferraz R, et al. Wound-Healing Peptides for Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers and Other Infected Skin Injuries[J]. *Molecules*, 2017, 22(10): 1743-1749
- [22] Wu Hong-xia. Chronic diabetic rat model of wound healing [D]. Shandong Normal University, 2010
- [23] Lee Y H, Chang J J, Chien C T, et al. Antioxidant Sol-Gel Improves Cutaneous Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 504693.doi: 10.1155/2012/504693
- [24] Heppt M V, Breuninger H, Reinholz M, et al. Current Strategies in the Treatment of Scars and Keloids[J]. *Facial Plast Surg*, 2015, 31(4): 386-395
- [25] Hayes P D, Alzuhr N, Curran G, et al. Topical oxygen therapy promotes the healing of chronic diabetic foot ulcers: a pilot study[J]. *J Wound Care*, 2017, 26(11): 652-660
- [26] Liu M, Wu Y, Liu Y, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Protects Astrocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury by Upregulating the Caveolin-1/VEGF Signaling Pathway [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 64(2): 1-13
- [27] Zuo Q, Gao F, Song H, et al. Application of Ilizarov transverse tibial bone transport and microcirculation reconstruction in the treatment of chronic ischemic diseases in lower limbs[J]. 2018,16(2): 1355-1359
- [28] Scharf RE. Von Willebrand factor, hemostasis and inflammation[J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35(3): 209-215
- [29] Yu Xin, Dong Hua-jiang, Shan Na-na, et al. Influence of panax notoginsenoside on tumor necrosis factor- α in rats with diabetic skin ulceration [J]. *Journal of Xinxiang Medical College*, 2012, 29(12): 893-895
- [30] Zongguo Sun, Qi Xie, Jie Pan, et al. Cadmium regulates von Willebrand factor and occludin expression in glomerular endothelial cells of mice in a TNF- α -dependent manner [J]. *Renal Failure*, 2019, 41(1): 354-362

(上接第 2213 页)

- [29] Gentry PR, Kokubo M, Bridges TM, et al. Discovery, Synthesis and Characterization of a Highly Muscarinic Acetylcholine Receptor (mAChR)-Selective M5-Orthosteric Antagonist, VU0488130 (ML381): A Novel Molecular Probe[J]. *Chemmedchem*, 2014, 9(8): 1677-1682
- [30] Bender AM, Garrison AT, Lindsley CW. The Muscarinic Acetylcholine Receptor M5: Therapeutic Implications and Allosteric Modulation[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(3): 1025-1034
- [31] Gentry PR, Kokubo M, Bridges TM, et al. Discovery of the First M5 Selective and CNS Penetrant Negative Allosteric Modulator (NAM) of a Muscarinic Acetylcholine Receptor: (S)-9b-(4-Chlorophenyl)-1-(3,4-difluorobenzoyl)-2,3-dihydro-1H-imidazo [2,1-a]isoindol-5(9bH)one (ML375)[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(22): 9351-9355
- [32] Gould RW, Gunter BW, Bubser M, et al. Acute Negative Allosteric Modulation of M5 Muscarinic Acetylcholine Receptors Inhibits Oxycodone Self-Administration and Cue-Induced Reactivity with No Effect on Antinociception[J]. *ACS Chem. Neurosci*, 2019, 10(8): 3740-3750