

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.04.006

全蝎软膏对糖尿病皮肤溃疡大鼠模型 EGF、PDGF 及其受体表达的影响 *

回雪颖 郭伟光 王景[△] 张海丽 刘颖 马铭堃

(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:探讨全蝎软膏对糖尿病皮肤溃疡大鼠模型 EGF、PDGF 及其受体表达的影响及创面愈合的机理。**方法:**60 只大鼠随机分为对照组、模型组、湿润烧伤膏组和全蝎软膏组,每组 15 只。建立糖尿病皮肤溃疡大鼠模型,干预后 7 天及 14 天,观察并比较大鼠创面愈合率和血清中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及其受体水平。**结果:**全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与模型组 7 d、14 d 同时间点比较创面愈合率,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);全蝎软膏组、湿润烧伤膏组 7 d、14 d 同时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组化结果显示,EGF 的表达水平,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与模型组比较,7 d 差异有统计学意义($P < 0.05$);14 d 差异无统计学意义($P > 0.05$)。EGFR 的表达水平,全蝎软膏组与湿润烧伤膏组、模型组、空白组 7 d、14 d 同时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。PDGFB 的表达水平,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与模型组 7 d、14 d 同时间点比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PDGFRB 的表达水平,7 d 全蝎软膏组与湿润烧伤膏组、模型组、空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);14 d 全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**全蝎软膏可影响糖尿病皮肤溃疡大鼠模型 EGF、PDGF 及其受体的表达,促进糖尿病创面愈合。

关键词:全蝎软膏;糖尿病皮肤溃疡;表皮生长因子;血小板衍生生长因子

中图分类号:R587.2;R244.9;R243 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)04-630-06

Effects of Scorpion Ointment on EGF, PDGF and their Receptors Expression in Diabetic Skin Ulcer Rat Model*

HUI Xue-ying, GUO Wei-guang, WANG Jing[△], ZHANG Hai-li, LIU Ying, MA Ming-kun

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

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and the mechanism of wound healing of Scorpion ointment on the expression of EGF, PDGF and their receptors in diabetic skin ulcer rat model. **Methods:** Sixty rats were randomly divided into control group, model group, MEBO group and scorpion ointment group, with 15 rats in each group. Diabetic skin ulcer rat model was established, 7 and 14 days after intervention, wound healing rate and Levels of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and their receptors in serum were observed and compared. **Results:** The wound healing rates of scorpion ointment group, MEBO group and model group were compared at the same time point at 7 d and 14 d, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); there was no significant difference between scorpion ointment group and MEBO group at 7 d and 14 d at the same time point ($P > 0.05$). Immunohistochemical results showed that there were statistically significant differences in the expression levels of EGF between scorpion ointment group, MEBO group and model group at 7 d ($P < 0.05$), but there was no statistically significant difference at 14 d ($P > 0.05$). There was no significant difference in the expression level of EGFR between scorpion ointment group and MEBO group, model group and blank group at 7 d and 14 d at the same time point ($P > 0.05$). The expression level of PDGFB in scorpion ointment group, MEBO group and model group was statistically significant at the same time point on day 7 and day 14 ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression level of PDGFRB between scorpion ointment group and MEBO group, model group, blank group ($P > 0.05$), but there was statistical significance at 14 d scorpion ointment group and MEBO group compared with model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions:** Scorpion ointment can affect the expression of EGF, PDGF and their receptors in diabetic skin ulcer rat model, and promote the healing of diabetic wound.

Key words: Scorpion ointment; Diabetic skin ulcer; Epidermal growth factor; Platelet-derived growth factor

Chinese Library Classification(CLC): R587.2; R244.9; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)04-630-06

* 基金项目:黑龙江省卫健委项目(20210404130180);黑龙江省中医药管理局项目(ZHY2020-142);

黑龙江中医药大学附属第二医院孙申田青年人才基金项目(2020KY-02)

作者简介:回雪颖(1983-),女,博士研究生,主要研究方向:中西医结合治疗周围血管疾病,E-mail: huixueying@126.com

[△] 通讯作者:王景(1980-),男,硕士研究生,主要研究方向:中西医结合治疗周围血管疾病,E-mail: wangjing19800610@126.com

(收稿日期:2023-06-29 接受日期:2023-07-31)

前言

糖尿病皮肤溃疡(Diabetic cutaneous ulcers, DCU)是指因糖尿病患者长期血糖控制不佳引起神经以及不同程度的末梢血管病变,从而导致感染、溃疡形成和(或)深部组织的破坏,是糖尿病患者致死致残的严重并发症之一,严重影响患者生活质量^[1-3]。目前,世界上有高达 20%的糖尿病患者出现糖尿病皮肤溃疡^[4]。预防糖尿病足的发生和促进糖尿病足溃疡的愈合,是糖尿病足的关注重点。目前,临床治疗糖尿病足的主要外治方法有药物外用、各种敷料外敷、手术植皮、负压封闭引流等,其中负压封闭引流以及银离子凝胶等新型敷料的价格昂贵^[5,6],而具有去腐生肌作用的外用中成药安全有效且价格低廉,因此,关于自制药物、古方药物等的应用及研究越来越多^[7-12]。创面愈合是一个复杂生理学过程,创面组织中相关生长因子及其受体相对或绝对缺乏是导致创面肉芽组织难以形成的关键因素^[13]。表皮生长因子在创伤修复过程中与受体结合,通过作用于细胞生长调节基因,促进 DNA、RNA 的修复和蛋白质的合成,改善创面微循环和组织营养状态,促进创面的再上皮化。血小板衍生生长因子是人体血小板中含有的一种多肽,可刺激成纤维细胞、神经胶质细胞和其他多种细胞分裂增殖,在伤口愈合、动脉粥样硬化等多种生理及病理过程中起重要作用^[14,15]。全蝎软膏为我院院内制剂,我课题组针对本药促进创面愈合机制进行了系列研究,本次研究探讨了 EGF、PDGF 及其受体水平对创面愈合的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 80-120 g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,动物生产许可证号为 SYXK(黑)2018-007,所有涉及实验动物使用的程序均符合伦理要求。室内通风良好,室温:24℃,相对湿度:35%。适应性喂养 1 周后进行实验。

1.1.2 药物与试剂 全蝎软膏(黑龙江中医药大学附属第二医院制剂室,批号 20220101);湿润烧伤膏(汕头市美宝制药有限公司,批号 2101303N);链脲佐菌素(STZ,Meilunbio,批号 MD1227);重组 Anti-EGF 抗体[EPR19173](Abcam,ab184265);EGFR Antibody (Affinity,AF6043);PDGFB Rabbit pAb (AB-clonal,A1195);PDGFRB Rabbit pAb (ABclonal,A2180);Goat Anti-Rabbit IgG Antibody(Millipore,Ap132p)。

1.1.3 主要仪器 BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);HistoCore MULTICUT 轮转式切片机(德国 Leica 公司);KD-BM II 生物组织包埋机、KD-TI 生物组织摊烤烘片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);ME104E 电子天平(METTLER TOLED);血糖仪、血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及建立糖尿病大鼠模型 待大鼠长至约 200 g,将 60 只大鼠随机分为空白组、模型组、全蝎软膏组和湿润烧伤组。模型组、全蝎软膏组和湿润烧伤组的大鼠腹腔注射 STZ 造急性糖尿病大鼠模型。STZ 剂量:40 mg/kg。72 小时后检测血糖情况,血糖值达到 16.7 mmol/L 则建模成功。

1.2.2 建立大鼠皮肤溃疡模型 糖尿病大鼠模型建成后,将大鼠麻醉,用电动剃须刀除去大鼠背部长毛,面积约 3×3 cm,龙胆紫在脱毛区标记造模面积,在无菌条件下,将造模区皮肤剪去,深达筋膜。六层医用纱布覆盖创面,用医用纸胶带包扎固定,糖尿病皮肤溃疡大鼠模型建立。

1.2.3 用药 模型组大鼠创面予生理盐水涂抹,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组创面外用相应药物,六层医用小纱布(4×4 cm)覆盖创面,予医用纸胶带包扎固定,每天换药 1 次。

1.2.4 创面愈合测定 在第 7 d 和 14 d 在垂直于创面的固定高度使用相机拍照记录创面面积,使用 Image J 软件描画创面轮廓,计算创面愈合率。创面愈合率(%)=(初始创面面积-治疗后创面面积)/初始创面面积×100%。

1.2.5 标本采集与制备 在第 7 d、14 d 两个时间点,每次随机选取 6 只大鼠,使用异氟烷对大鼠进行呼吸麻醉后,剪取溃疡创面(包括创面边缘、中心及周围 3-4 mm 正常皮肤组织)使用 4%多聚甲醛固定,然后脱水、包埋、切片,分别做 HE 染色和免疫组织化学检测。

1.2.6 HE 染色观察创面肉芽组织病理变化 取各组 2 个时间点的创面肉芽组织石蜡块,常规烤箱烤片,切片,常规二甲苯、乙醇脱蜡水化,纯水洗浸泡,苏木素染色,温水(50℃)浸泡,伊红染色,经脱水、透明、中性树胶封片。光镜下观察创面肉芽组织中毛细血管生长分布、成纤维细胞形态数量及炎症细胞浸润等情况。

1.2.7 免疫组化法检测 EGF、EGFR、PDGFB 及 PDGFRB 的表达 免疫组化检测严格按照说明书操作,进行脱蜡至水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,封闭,加入一抗、二抗,DAB 显色(阳性为棕黄色),脱水,中性树胶封片等,制片后采用光学显微镜进行观察分析。图片使用 Image J 软件分析,测定单位面积阳性细胞表达的光密度值,并计算平均光密度值作为每张切片该蛋白的表达情况。平均光密度值由图片上各点的光密度值累加起来得到的值(IOD)与相应的目标区域内的面积(Area)的比值。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计分析软件进行数据处理,实验数据用 " $\bar{x} \pm s$ " 表示,先进行正态分布检验:符合正态分布者,两组间比较采用成组 t 检验,多组组间,比较采用单因素方差分析;不符合正态分布者采用非参数检验。均以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 创面愈合情况

创面形态学表明,随着时间的推移,各组大鼠创面逐渐缩小,呈向心性生长,有黑色血痂覆盖,14 d 创面未完全愈合。全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与模型组 7 d、14 d 同时间点比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);全蝎软膏组、湿润烧伤膏组 7 d、14 d 同时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。每组间 7 d、14 d 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1、图 2。

2.2 创面肉芽组织的病理变化

HE 染色结果显示,全蝎软膏组和湿润烧伤膏组与模型组相比,可见成纤维细胞和毛细血管数量较多,炎症细胞浸润较少。见图 3。

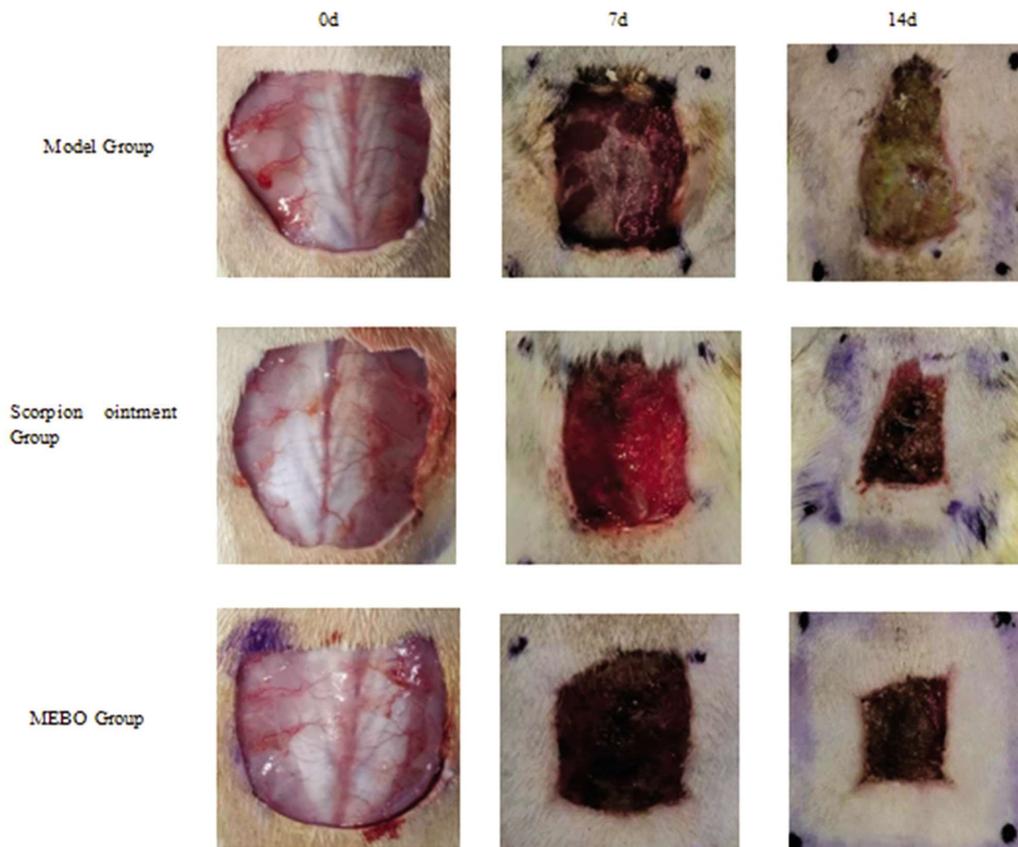


图 1 各组大鼠不同时间点皮肤溃疡愈合情况

Fig.1 Skin ulcer healing in rats at different time points in various groups

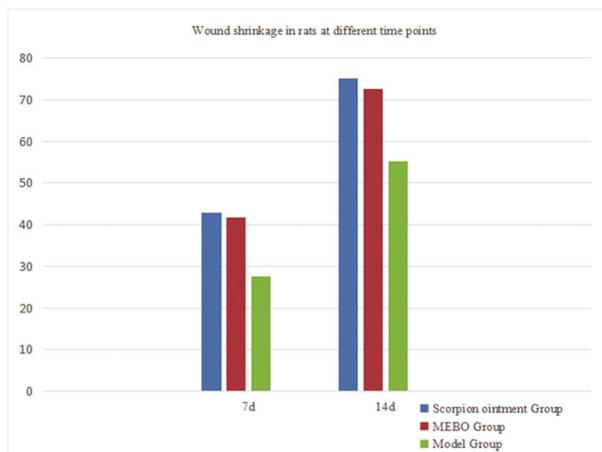


图 2 各组大鼠不同时间点的创面收缩率比较

Fig.2 Comparison of wound shrinkage rates in rats at different time points in various groups

2.3 创面肉芽组织 EGF、EGFR 的表达情况

免疫组化结果显示,EGF 的表达水平,第 7 天,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组、空白组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与空白组比较、全蝎软膏组与湿润烧伤膏组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 14 天,全蝎软膏组与湿润烧伤膏组、模型组比较、湿润烧伤膏组与模型组、空白组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);全蝎软膏组、模型组与空白组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。每组间第 7 天与第 14 天比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4、图 6。

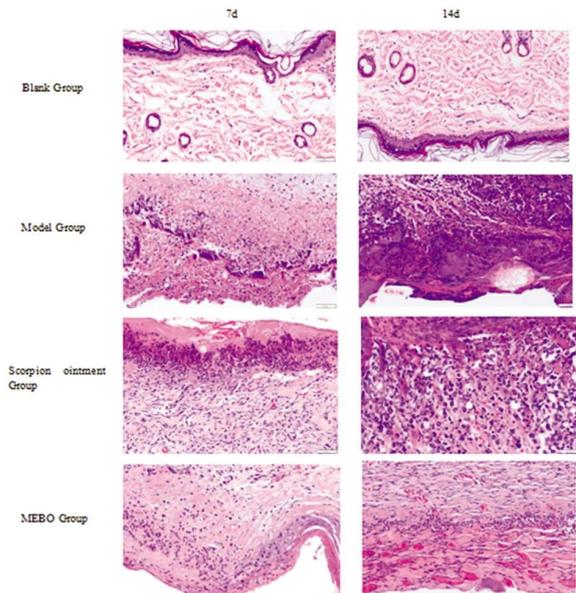


图 3 各组大鼠不同时间点创面肉芽组织病理变化的比较(HE,× 200)

Fig.3 Comparison of histopathological changes of granulation in rats at different time points in various groups(HE,× 200)

EGFR 的表达水平,第 7 天,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组、模型组和空白组四组每两组间比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 14 天,湿润烧伤膏组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),余每两组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。每组间第 7 天与第 14 天比较,除全蝎软膏组外,其他三组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5、图 6。

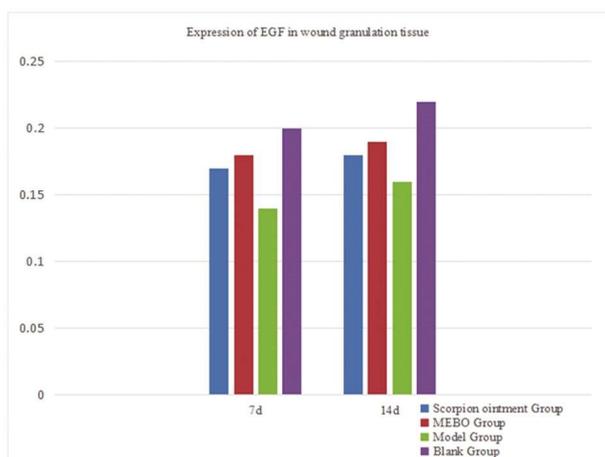


图4 各组大鼠不同时间点创面组织 EGF 平均光密度值的比较
Fig.4 Comparison of average optical density values of EGF in wound tissues of rats at different time points in various groups

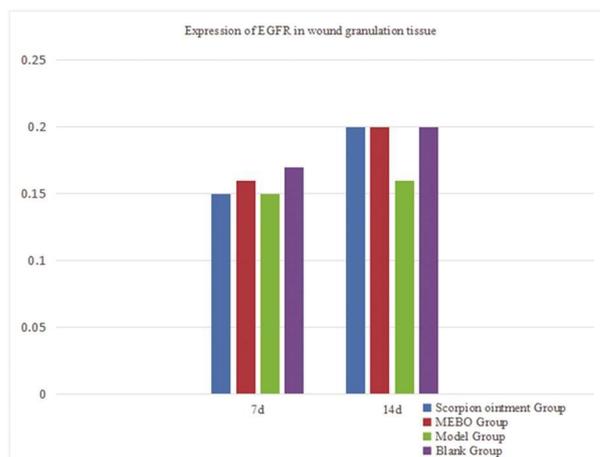


图5 各组大鼠不同时间点创面组织 EGFR 平均光密度值的比较
Fig.5 Comparison of average optical density values of EGFR in wound tissues of rats at different time points in various groups

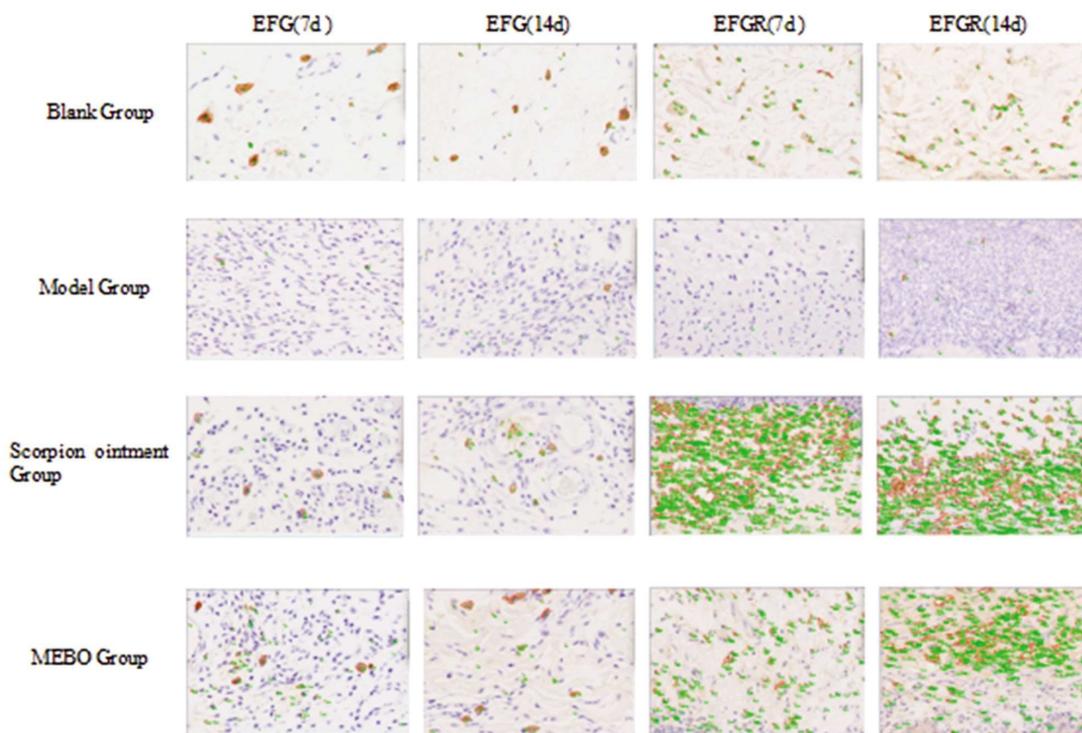


图6 各组大鼠不同时间点创面 EGF、EGFR 表达的比较(HE, × 200)
Fig.6 Comparison of EGF and EGFR expression in wound tissues of rats at different time points in various groups(HE, × 200)

2.4 创面肉芽组织 PDGFB、PDGFRB 的表达情况

PDGFB 的表达水平,第 7、14 天同时间点,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组、空白组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与空白组比较、全蝎软膏组与湿润烧伤膏组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。每组间第 7 天与第 14 天比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 7,图 9。

PDGFRB 的表达水平,第 7 天,湿润烧伤膏组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),余每两组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第 14 天,全蝎软膏组、湿润烧伤膏组、空白组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);全蝎软膏组、湿润烧伤膏组与空白组比较、全蝎软膏组与湿润烧伤膏组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。每组间第 7 天与第 14 天比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 8,图 9。

3 讨论

糖尿病皮肤溃疡病程长,病情严重者甚至需要截肢,严重影响患者的生活质量及心理健康,如何快速高效修复其创面一直是医学领域亟待解决的难题。创面修复是一个复杂的过程,糖尿病皮肤溃疡的愈合机制更是复杂。现代研究发现皮肤溃疡创面的愈合主要经过炎症消退、肉芽组织填充和瘢痕愈合三个主要步骤^[16],而血管新生是皮肤溃疡愈合全过程的关键因素之一^[17]。PDGF 通过与 PDGF 受体结合影响细胞内一系列的信号通路从而发挥其在创面愈合中的作用^[18]。而 EGF 是通过与胞膜上的 EGFR 结合,促使与组织修复密切相关的内皮细胞和成纤维细胞等细胞的分裂、增殖,进而加速溃疡创面的愈合^[19]。PDGF、EGF 等生长因子的表达,直接影响了新生血管的形成,

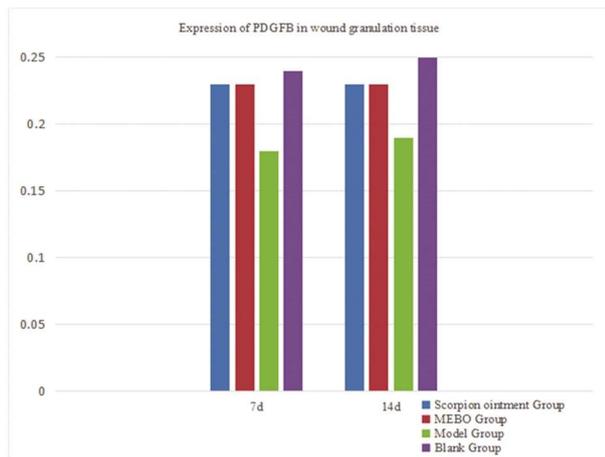


图7 各组大鼠不同时间点创面组织 PDGFB 平均光密度值的比较

Fig.7 Comparison of average optical density values of PDGFB in wound tissues of rats at different time points in various groups

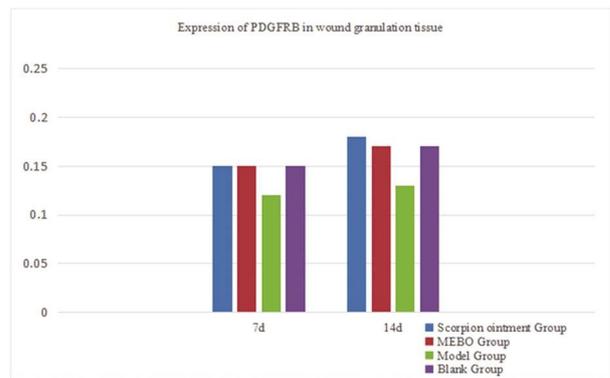


图8 各组大鼠不同时间点创面组织 PDGFRB 平均光密度值的比较
Fig.8 Comparison of average optical density values of PDGFRB in wound tissues of rats at different time points in various groups

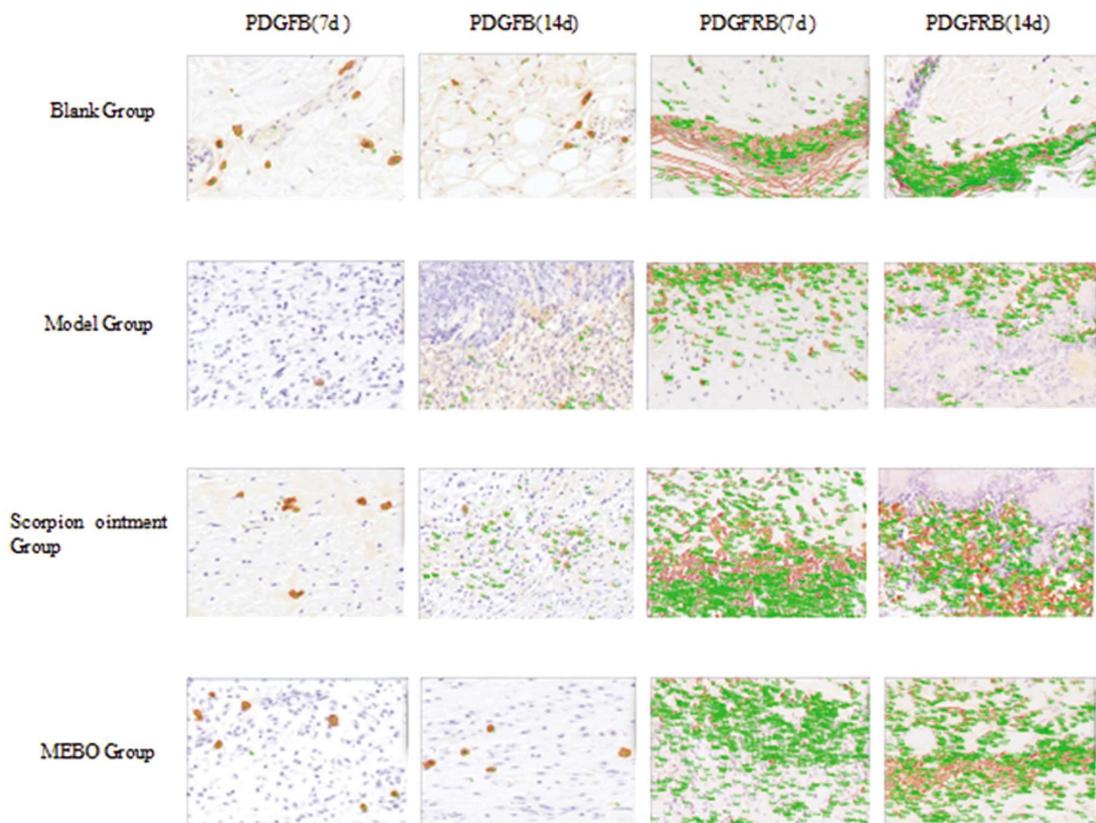


图9 各组大鼠不同时间点创面 PDGFB、PDGFRB 表达的比较(HE, × 200)

Fig.9 Comparison of PDGFB and PDGFRB expression in wound tissues of rats at different time points in various groups(HE, × 200)

从而直接决定了组织愈合的速度^[10,20]。

糖尿病皮肤溃疡属中医“脱疽”范畴,故属外科疾病。《医学源流论》云:“外科之法,最重外治。”《疡科纲要》云:“疮疡为病,发见于外,外治药尤为重要。凡轻浅之证,专恃外治,可收全功;而危险大疡,尤必赖外治得宜,交互为用,此疡医之学。”另外,吴尚先在《理渝骈文》中提到:“外治之理,即内治之理,外治之药,亦即内治之药,所异者法尔。”可见外治法与内治法都是以中医理论为指导,通过药物来达到治病的目的,只是用药途径不同^[21]。全蝎软膏是我院院内制剂,由全蝎、蜈蚣、冰片等组成,具有抗菌消炎、活血化瘀、祛腐生肌等功效。“煨脓长肉”是中医外科创面换药的经典指导理论,与现代医学创面湿性愈合

理论是一致的,全蝎软膏属于油膏,故有保持创面湿润的特点,且膏剂外敷疗效确切、安全性高、药物易于存储、药效持久、操作简便等^[17]。

本研究表明,全蝎软膏可促进 EGF、PDGFB 及其受体的表达,诱导血管新生,进而为皮肤溃疡愈合提供良好的条件。但本研究的不足之处一是样本量少,可等我课题组完成全蝎软膏对生长因子、炎症因子等影响的相关研究后,扩大样本量,再次进行试验;二是造模方法有待提高,本研究采用注射 STZ 结合皮肤缺损的方式成功复制大鼠 DSU 模型,对于注射 STZ 建立糖尿病大鼠模型,有诸多因素影响成功造模。另外,据报道,本研究的成模率较低,推测可能因动物处于糖尿病状态下而引起

的机体免疫力下降等原因所致^[22]。

我课题组已完成了多项关于全蝎软膏对创面愈合影响的课题,从 AGES 等角度证实全蝎软膏的生肌作用。我们进一步需要做的就是扩大样本量,并在此基础上进行信号通路、DNA 等研究,完善全蝎软膏对于促进创面愈合的作用机制。

参考文献(References)

- [1] 杨选鑫,惠琦,曹高忠,等.rh-aFGF 卡波姆 940 凝胶对 1 型糖尿病大鼠皮肤创伤的修复作用[J].中国药理学通报,2018,34(4): 557-562.
- [2] Gong F, Zhao F, Cheng SL, et al. Effect of insulin-like growth factor-1 on promoting healing of skin ulcers in diabetic rats [J]. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 2019, 33 (3): 687-694.
- [3] 马红伟,刘攀云,张雅琼.人参皂苷诱导骨髓间充质干细胞干预糖尿病大鼠皮肤溃疡的愈合及 Wnt/ β -catenin 信号表达[J].中国组织工程研究,2019,23(33): 5300-5306.
- [4] PATEL S, SRIVASTAVA S, SINGH M R, et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing [J]. Biomedecine& Pharmacotherapie, 2019, 112: 108615.
- [5] Ni ZM, Sun JC, Qi SL. Therapeutic effect of topical negative pressure therapy/vacuum-associated closure therapy on cephalic facial skin abscess [J]. Observational Study, 2020, 21(8): 722-725.
- [6] Ni ZM, Sun JC, Qi SL. Application of easy wet healing therapy for chronic noninfectious wounds in limbs[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2022, 21(1): 87-91.
- [7] 张宏,张宇,曹钰玲,等.复方足病平促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合及对 RAGE/NF- κ Bp65/VEGF 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志,2021,41 (14): 1405-1409.
- [8] 李玉珠.托里消毒散对糖尿病创面血管生成的影响及机制研究[D].天津医科大学,2016.
- [9] 李洁花,廖晨希,杨盾,等.基于古汉愈疡方的不同剂型对糖尿病大鼠溃疡创面愈合疗效的比较研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42 (04): 548-556.
- [10] 李友山,杨博华." 蚓黄散 " 干预糖尿病足溃疡愈合过程中 AGEs 与促愈合因子相关性研究[J].世界科学技术 - 中医药现代化,2015, 17(2): 350-355.
- [11] 王念武,高云,石厚银,等.溃愈灵膏对愈合大鼠创伤性皮肤溃疡的促进作用[J].中成药,2018,40(06): 1259-1265.
- [12] 王景,回雪颖,郭伟光,等.全蝎软膏对大鼠糖尿病皮肤溃疡创面愈合的效果评价[J].现代生物医学进展,2020,20(12): 2252-2257.
- [13] 蔡俊刚,刘芳,韩书明,等.消肿祛斑汤合复方黄柏液治疗下肢瘀血性溃疡 58 例[J].中国中西医结合外科杂志,2017,23(1): 91-93.
- [14] 邱铁涛,张春玲.细胞生长因子影响糖尿病足溃疡愈合及治疗研究进展[J].贵州医药,2017,41(01): 94-96.
- [15] 钱丁丁. PDGF-BB 通过 PDGFR β 调节 EndMT 促进动脉粥样硬化进程研究[D].宁波大学,2020.
- [16] 贾连城,吕培文.吕培文应用回阳生肌法治疗慢性难愈性皮肤溃疡经验总结[J].中国医药导报,2015,12(28): 85-88.
- [17] 王念武. 溃愈灵膏促进大鼠创伤性皮肤溃疡愈合机制的探究[D].西南医科大学,2018.
- [18] 刘洋.PDGFR- α 在糖尿病足创面肉芽组织中的表达研究[D].河北医科大学,2017.
- [19] 宋珊珊.一效膏促进皮肤溃疡愈合的实验研究[D].辽宁中医药大学,2011.
- [20] 李荟元.国外美容医学最新研究与进展(八)-- 生长因子与创伤修复的研究[J].中国美容医学,2016,25(8): 116-117.
- [21] 回雪颖,郭伟光,王景,等.中医外治法在糖尿病皮肤溃疡治疗中的应用[J].医学研究杂志,2023,52(01): 175-178.
- [22] 张海丽,王景,滕林,等.半导体激光联合全蝎软膏对大鼠糖尿病性皮肤溃疡修复的研究 [J]. 现代生物医学进展,2020,20(13): 2452-2457.