

生肌化腐方对糖尿病大鼠皮肤溃疡组织中 MMP-3 及 TIMP-1 表达的影响

王一飞 李 欣 徐 蓉 姜文成 李福伦 连 侃 李 斌

摘要 目的 探讨生肌化腐方对糖尿病大鼠皮肤溃疡创面组织中基质金属蛋白酶-3 (MMP-3) 和基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1) 表达的影响效应。**方法** 以糖尿病大鼠皮肤溃疡模型为研究对象, 采用不同配伍比例的生肌化腐方(生肌方与化腐方分别按 2:1、1:1 和 1:2 比例组合)进行干预, 采用 Western blot 法检测皮肤溃疡组织中 MMP-3 蛋白表达, 免疫组化法检测 TIMP-1 蛋白表达。**结果** 在成模各时间点, 各组糖尿病大鼠血糖水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 而与正常创面组比较显著升高($P < 0.01$)。创面面积处理前后差值方面, 生肌化腐 3 号方组、正常创面组均明显优于糖尿病溃疡模型组($P < 0.05$)。Western blot 法检测结果显示: 生肌化腐 2 号方组 MMP-3 蛋白表达高于生肌化腐 3 号方组($P < 0.05$)。免疫组化法检测结果显示: 生肌化腐 2 号方组 TIMP-1 蛋白的表达低于糖尿病溃疡模型组和生肌化腐 1 号方组($P < 0.05$), 生肌化腐 3 号方组的表达高于生肌化腐 2 号方组($P < 0.01$)。**结论** 在创面修复早期, 采用生肌化腐 3 号方生肌方有利于促进创面愈合; 在创面愈合晚期, 采用生肌化腐 2 号方可能有利于抑制病理性瘢痕的形成。

关键词 生肌化腐方; 创面修复; 糖尿病; 皮肤溃疡; 基质金属蛋白酶-3; 基质金属蛋白酶抑制剂-1

Effect of Shengji Huayu Recipe on the Expression of MMP-3 and TIMP-1 in Skin Ulcer Tissue of Diabetic Rats WANG Yi-fei, LI Xin, XU Rong, JIANG Wen-cheng, LI Fu-lun, ZE Kan, and LI Bin
Department of Dermatology, Yueyang Integrative Medical Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200437), China

ABSTRACT Objective To study the effect of Shengji Huayu Recipe (SHR) on the expression of MMP-3 and TIMP-1 in the skin ulcer tissue of diabetic rats. **Methods** The skin ulcer model was established in diabetic mice. Different compatibility proportions of SHR [the ratio of Shengji Recipe (SJR) to Huayu Recipe (HYR) = 2:1, 1:1, and 1:2, respectively] were used to intervene. The expression of MMP-3 protein in the skin ulcer of diabetic rats was detected by Western blot method, and TIMP-1 protein was detected by immunohistochemical assay. **Results** At each time point, there was no statistical difference in the blood glucose level among groups ($P > 0.05$). But all of them increased significantly, when compared with those of the normal wound group ($P < 0.01$). As for the difference between after wound area treatment and before wound area treatment, better effect was obtained in the SHR No. 3 group and the normal ulcer group than in the diabetic ulcer model group ($P < 0.05$). Results of Western blot showed that the MMP-3 protein expression was higher in the SHR No. 2 group than in the SHR No. 3 group ($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that TIMP-1 protein expression was lower in the SHR No. 2 group than in the SHR No. 3 group and the diabetic ulcer model group ($P < 0.05$). TIMP-1 protein expression was higher in the SHR No. 3 group than in the SHR No. 2 group ($P < 0.01$). **Conclusion** Using SHR No. 3 was conducive to the promotion of wound healing in early wound repair stage, and using SHR No. 2 might be

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30973751, No. 81102596, No. 81373648); 上海市优秀学术带头人资助项目 (No. 11XD1404700); 上海市教育委员会预算内科研项目 (No. 2010JW51); 上海市中医药事业发展三年行动计划重大项目 (No. ZYSNXC-CC-ZDYJ018); 上海市“杏林新星”计划项目 (No. ZYSNXC011-RC-XLXX-20130026)

作者单位: 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院皮肤科 (上海 200437)

通讯作者: 李 斌, Tel: 021-65161782 转 6058, E-mail: drlibin888@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.02.0218

conductive to inhibiting the formation of pathological scar.

KEYWORDS Shengji Huayu Recipe; wound healing; diabetes; skin ulcer; matrix metalloproteinase-3; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1

胶原分子特别是 I、Ⅲ 型胶原,在组织的损伤修复过程中起着极为重要的作用。作为具有降解细胞外基质(ECM)的各种蛋白成分尤其是各种胶原蛋白的基质金属蛋白酶(MMPs),与其特异性抑制剂基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)之间的动态平衡,决定着创面修复过程中胶原合成与分解代谢的动态平衡,关系到创面修复的结果。本实验以糖尿病大鼠皮肤溃疡模型模拟慢性难愈性皮肤溃疡,观察祛瘀生肌法对糖尿病溃疡模型组织中 MMP-3 和 TIMP-1 表达的影响效应,从而探讨其疗效机制,并进一步指导临床。

材料与方法

1 动物及饲料 清洁级 SD 大鼠共 30 只,雄性,体重(250 ± 20)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(沪)2008-0016。普通鼠繁殖饲料及高脂饲料饲喂,均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:沪饲审(2008)04002。

2 主要试剂、仪器及设备 链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司产品;0.1% 盐酸氯胺酮注射液,上海中西药业股份公司产品;MMP-3 试剂盒,EPITMICS 公司产品;TIMP-1 免疫组化试剂盒,美国 Stanta 公司产品;Cell Lysis Buffer,美国 Cell Signaling 公司产品;ECL 化学发光检测试剂盒,美国 Santa 公司产品;胰蛋白酶抗原修复液,上海杰美基因产品。罗氏 AC-CU-CHEK ACTIVE 血糖仪和血糖测试试纸,德国 Roche 公司产品;透射电镜 H-800,日本日立公司产品;小型蛋白电泳与转印槽 Tetra Protein,美国 Bio-Rad 公司产品;Bio-Tek 酶标仪 ELX-800,美国 Biotek 公司产品;IMS 细胞图像分析及医学图像分析软件,上海达为科生物科技有限公司产品;伤口愈合快示格胶贴,英国施乐辉公司产品;Olympus E-620 数码相机,日本 Olympus 公司;Odyssey 定量荧光扫描仪,美国 IL-COR 公司产品;Olympus BH2 正置显微镜,日本 Olympus 公司产品;DK-8D 型恒温水箱,上海精宏实验设备有限公司产品;ImageJ 1.42q 软件,美国国立卫生研究院。

3 药物 生肌方:黄芪 15 g 太子参 12 g 白术 12 g 生地 15 g;化瘀方:丹参 15 g 水蛭 9 g 桃仁 12 g 川芎 9 g。上述生肌方、化瘀方均将原药材水煎

2 次,滤液浓缩成 10 g/mL 药液,加入 70% 乙醇沉淀后放置 24 h,回收乙醇后用适量水稀释制成合剂,含生药分别为生肌方 6 g/mL,化瘀方 3 g/mL。其中,生肌化瘀 1 号方由生肌方、化瘀方按 2:1 剂量比例配伍组成;生肌化瘀 2 号方由生肌方、化瘀方按 1:1 剂量比例配伍组成;生肌化瘀 3 号方由生肌方、化瘀方按 1:2 剂量比例配伍组成。由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药物制剂室完成制备,存放于 4℃ 冰箱备用。

4 动物分组与造模 30 只 SD 大鼠,温度(23 ± 2)℃,相对湿度 40% $\pm$ 10%,自由饮水,普通鼠繁殖饲料喂养 1 周后,采用随机区组设计分为生肌化瘀 1 号方组、生肌化瘀 2 号方组、生肌化瘀 3 号方组、糖尿病溃疡模型组,每组 6 只,予高脂饲料喂养 4 周;另设正常创面组 6 只,继续普通鼠繁殖饲料喂养 4 周。参照文献[1,2]方法并加以改良,建立糖尿病溃疡模型。具体方法为除正常创面组外,其余 4 组大鼠禁食 12 h 后,以柠檬酸钠缓冲液(浓度:0.1 mol/L, pH 4.5)溶解 STZ,配成 2% 溶液,首次腹腔内注射 30 mg/kg,48 h 后重复注射 1 次。7 天后当 SD 大鼠血糖浓度 >11 mmol/L 时,认为糖尿病模型建立成功。所有大鼠(包括糖尿病大鼠和正常组)用 0.1% 盐酸氯胺酮注射液腹腔注射麻醉(100 mg/kg),造模区(脊椎两侧)剪毛,用直径 18 mm 的图章标记造模面积,在严格无菌操作技术下,沿脊椎方向用外科方法作 2 条深达皮下筋膜、直径为 1.8 cm 的全层皮肤缺损开放性创面,形成大鼠皮肤溃疡模型。

5 给药方法 自造模成功后第 2 天起,生肌化瘀 1 号方组、生肌化瘀 2 号方组、生肌化瘀 3 号方组分别予生肌化瘀 1 号方、生肌化瘀 2 号方、生肌化瘀 3 号方灌胃给药[根据成人日服用药量折算成大鼠灌胃剂量为 6 g/(kg·d)],糖尿病溃疡模型组和正常创面组灌服等量生理盐水,每天灌胃 1 次,连续灌胃 15 天。

6 大鼠血糖水平及皮肤溃疡创面面积测定 分别于成模 1、3、7、11、15 天时抽取 5 组大鼠尾静脉血,采用罗氏 ACCU-CHEK ACTIVE 血糖仪和血糖测试试纸测定其血糖水平。同时在上述时间点,分别测量各组大鼠实验性皮肤溃疡创面的面积,方法如下:将伤口愈合快示格胶贴贴敷于待测溃疡表面,采用记号笔沿溃疡创面边缘将其轮廓勾画于伤口愈合快示格胶贴上。取下勾画有其轮廓线的伤口愈合快示格胶贴,置于白色背景

A4 纸上,采用数码相机将其拍摄成数码相片。打开图像处理软件 ImageJ2x,导入所摄数码相片,选择 Tool Box 中 Freehand selections 按钮,勾勒出导入相片中马克笔所勾画的溃疡创面轮廓,然后在命令栏中选择“分析—测算”选项,在弹出的结果框中“Area”项下数值即为该溃疡的像素面积值,记为 A;同上述操作,测得相片中伤口愈合快示格胶贴中自带坐标网格中最小网格(0.1cm^2)的像素面积值,记为 B,按如下公式计算创面面积以及创面愈合率:溃疡创面面积(cm^2) = $A/B \times 0.1\text{cm}^2$;创面愈合率(%) = (初始面积 - 处理后面积)/初始面积 $\times 100\%$ 。

7 Western blot 检测 MMP-3 蛋白表达 于给药后第 15 天,将动物麻醉(氯胺酮)处死,用眼科手术剪分离新生创面肉芽组织,并成块取下,并即刻放入液氮,置于 -80°C 冰箱。称取每例组织样品 0.1g ,将组织块在冰上研磨(每例加入 $1 \times \text{PBS } 50\ \mu\text{L}$)成细胞匀浆。向每例匀浆中加入 $50\ \mu\text{L } 2 \times \text{cell lysis buffer}$,混匀后冰上孵育 30 min ,然后 4°C 、 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 15 min ,取上清备用。取每份上清 $50\ \mu\text{L}$,加入 $50\ \mu\text{L } 2 \times \text{SDS loading buffer}$, 100°C 水浴 10 min ,冷却后准备上样。每种样品上样 $20\ \mu\text{L}$,Bio-Rad 电泳系统电泳, $80\text{ V } 30\text{ min}$ 后再 $120\text{ V } 100\text{ min}$ 。用 Bio-Rad 转移系统,将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转至硝酸纤维素薄膜上,冰浴中转移 2 h ,电压为 100 V 。置于丽春红染色液中 $5 \sim 10\text{ min}$,清水洗去染料,按分子量大小裁剪目标蛋白所在的 PVDF 膜。将膜放置于 30 mL 封闭缓冲液中,室温下置于摇床震荡 1 h 。一抗反应:按推荐的稀释比(通常 $1:1\ 000$)加入相应目的蛋白的特异性抗体,将膜于室温下摇床孵育 2 h ;用洗涤缓冲液($1 \times \text{TBST}$)洗膜 4 次,每次 10 min 。二抗反应:按 $1:5\ 000$ 稀释比加入 HRP 耦联的对应二抗(Jackson, $1:2\ 000$),将膜于室温下摇床孵育 1 h ;用洗涤缓冲液($1 \times \text{TBST}$)洗膜 4 次,每次 10 min 。ECL 发光反应:把膜用 ECL 发光试剂处理,显影曝光。Odyssey 定量荧光扫描仪显影,可选择 700 (红色)或者 800 (绿色)定量。扫描结果采用 ImageJ 1.42q 软件进行定量分析,确定目的条带的相对吸光度值(每次蛋白印迹的对照组条带的吸光度值为相对值 1)。

8 免疫组化检测 TIMP-1 蛋白表达 按照 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行。组织样本石蜡切片常规脱蜡水化; $1 \times \text{PBS}$ 液($\text{pH } 7.2 \sim 7.4$)洗涤 $5\text{ min} \times 3$ 次; $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 灭活内源性过氧化物酶,室温避光浸泡 10 min ;切片经 PBS 液洗涤后,置于 $0.01\text{ mol/L pH } 6.0$ 的柠檬酸钠缓冲液中加热至

96°C ,保持 15 min ,进行抗原修复;切片自然冷却至室温,滴加胰酶修复液($1:3$ 混合, 37°C 预热), 37°C 恒温箱中孵育 8 min ,冷却至室温后, PBS 洗涤切片,滴加正常山羊非免疫血清,室温下保湿盒内孵育 60 min ;滴加抗 TIMP-1($1:100$)单克隆抗体, 4°C 冰箱过夜;次日 $1 \times \text{PBS}$ 再次洗涤 $5\text{ min } 3$ 次;滴加二抗生物素,室温孵化 30 min ;显微镜下 DAB 显色液显色,阳性反应为切片中出现黄褐色显影,以已知阳性切片为阳性对照,以 $1 \times \text{PBS}$ 代替血清为阴性对照。采用 Olympus BH2 正置显微镜拍摄,IMS 细胞图像分析系统、医学图像分析软件进行图像分析,每张切片选取代表性区域不小于 3 处,测算免疫组化图像中阳性区域面积和阳性比率以及光密度值(optical density, OD),以免疫组化指数(阳性面积乘以 OD 值)的高低代表阳性表达的强弱, 3 处均值代表该片。

9 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计。计数资料用率表示,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料如服从正态分布且方差齐,组间比较采用单因素方差分析,组内比较用 t 检验,方差不齐,先校正方差,然后进行方差分析;重复测量数据采用重复测量方差分析;不服从正态分布者,采用非参数检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠不同时间点血糖水平比较(表 1) 造模前 5 组大鼠组间血糖水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常创面组大鼠各时间点血糖水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。在成模各时间点,生肌化瘀 1 号方组、生肌化瘀 2 号方组、生肌化瘀 3 号方组与糖尿病溃疡模型组大鼠的血糖水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而糖尿病溃疡模型组较正常创面组,显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组大鼠不同时间点皮肤溃疡创面愈合情况比较(表 2) 成模 1、3 天时,5 组大鼠创面面积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。成模 7 天时生肌化瘀 3 号方组、正常创面组创面面积均明显小于糖尿病溃疡模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。成模 11、15 天时,糖尿病溃疡模型组创面面积明显大于其余 4 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);生肌化瘀 1 号方组、生肌化瘀 2 号方组创面面积均明显大于生肌化瘀 3 号方组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。面积差值方面,生肌化瘀 3 号方组明显优于糖尿病溃疡模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点血糖水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血糖					
		造模前	成模 1 天	成模 3 天	成模 7 天	成模 11 天	成模 15 天
生肌化癥 1 号方	6	5.35 ± 0.39	25.70 ± 2.75	25.40 ± 5.49	28.32 ± 2.91	26.72 ± 2.97	23.70 ± 6.36
生肌化癥 2 号方	6	5.47 ± 0.62	22.47 ± 1.92	26.52 ± 5.58	27.12 ± 5.98	25.73 ± 4.28	25.68 ± 2.49
生肌化癥 3 号方	6	5.22 ± 0.54	22.52 ± 1.95	22.58 ± 2.07	28.62 ± 3.65	27.95 ± 1.70	25.35 ± 2.38
糖尿病溃疡模型	6	5.42 ± 0.40	24.40 ± 3.21 *	24.37 ± 6.96 *	28.23 ± 2.94 *	26.98 ± 3.87 *	22.82 ± 7.18 *
正常创面	6	5.22 ± 0.56	5.13 ± 0.51	6.15 ± 1.37	5.07 ± 0.44	5.15 ± 0.73	6.87 ± 0.23
F		0.302	83.554	18.383	48.012	62.384	18.124
P		0.874	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常创面组比较,*P<0.01

表 2 各组大鼠不同时间点皮肤溃疡创面愈合情况比较 (cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	n	创面面积					
		造模前	成模 1 天	成模 3 天	成模 7 天	成模 11 天	成模 15 天
生肌化癥 1 号方	6	3.18 ± 0.54	2.49 ± 0.37	0.54 ± 0.17	0.39 ± 0.07 ^{△▲}	0.34 ± 0.16 ^{△▲}	2.84 ± 0.47
生肌化癥 2 号方	6	2.99 ± 0.66	2.13 ± 0.86	0.57 ± 0.20	0.40 ± 0.14 ^{△▲}	0.30 ± 0.13 ^{△▲}	2.69 ± 0.68
生肌化癥 3 号方	6	3.36 ± 0.75	2.68 ± 0.76	0.45 ± 0.18 [△]	0.19 ± 0.05 [△]	0.08 ± 0.07 [△]	3.28 ± 0.76 [△]
糖尿病溃疡模型	6	2.77 ± 0.37	2.57 ± 0.49	0.74 ± 0.42	0.63 ± 0.34	0.48 ± 0.10	2.29 ± 0.30
正常创面	6	3.33 ± 0.51	2.19 ± 0.80	0.26 ± 0.10 [△]	0.17 ± 0.08 [△]	0.06 ± 0.09 [△]	3.26 ± 0.48 [△]
F		1.102	0.749	3.172	5.360	14.675	3.290
P		0.378	0.568	0.031	0.003	0.000	0.027

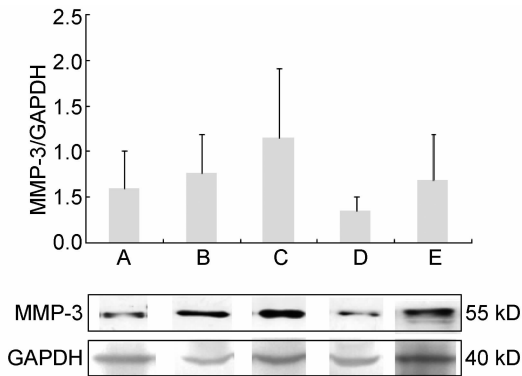
注:与正常创面组比较,*P<0.05;与糖尿病溃疡模型组比较,[△]P<0.05;与生肌化癥 3 号方组比较,[▲]P<0.05

3 各组大鼠创面组织中 MMP-3 蛋白表达比较 (表 3,图 1) 生肌化癥 2 号方组 MMP-3 蛋白表达高

表 3 各组大鼠创面组织中 MMP-3 蛋白和 TIMP-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-3 蛋白印迹 (灰度值)	TIMP-1 蛋白免疫组化指数
糖尿病溃疡模型	6	0.60 ± 0.41	2 064.83 ± 650.06 [△]
生肌化癥 1 方	6	0.77 ± 0.43	2 008.55 ± 956.14 [△]
生肌化癥 2 方	6	1.15 ± 0.76 *	1 114.17 ± 208.09 **
生肌化癥 3 方	6	0.36 ± 0.16	2 367.44 ± 824.22
正常创面	6	0.70 ± 0.51	1 562.22 ± 85.66

注:与生肌化癥 3 方号比较,*P<0.05,**P<0.01;与生肌化癥 2 方号比较,[△]P<0.05

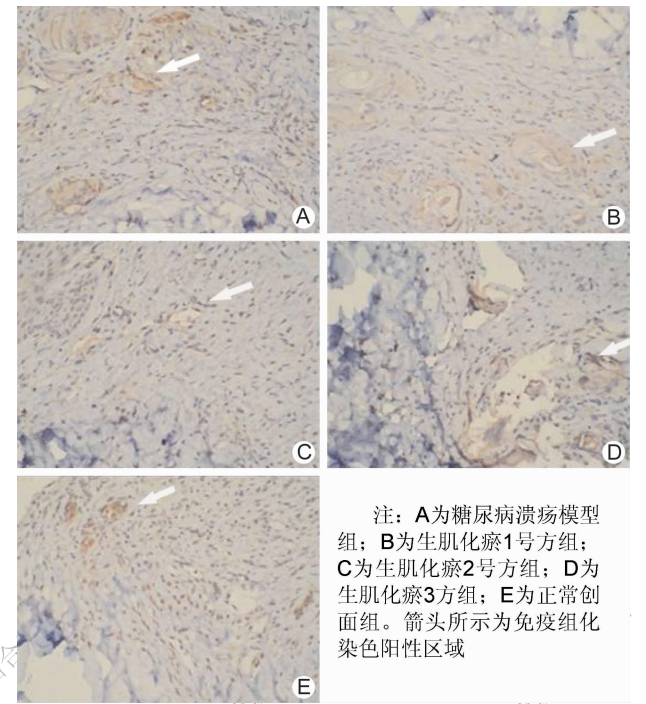


注:A 为糖尿病溃疡模型组;B 为生肌化癥 1 方组;C 为生肌化癥 2 方组;D 为生肌化癥 3 方组;E 为正常创面组

图 1 各组大鼠创面组织中 MMP-3 蛋白表达比较

于生肌化癥 3 号方组,差异有统计学意义(P<0.05);而与生肌化癥 1 号方组、糖尿病溃疡模型组及正常创面组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。

4 各组大鼠创面组织中 TIMP-1 蛋白表达比较 (表 3,图 2) TIMP-1 蛋白主要定位在表皮棘层鳞状



注: A 为糖尿病溃疡模型组; B 为生肌化癥 1 号方组; C 为生肌化癥 2 号方组; D 为生肌化癥 3 号方组; E 为正常创面组。箭头所示为免疫组化染色阳性区域

图 2 各组大鼠创面组织中 TIMP-1 蛋白表达比较 (×200)

上皮和创面组织增生的皮肤全层,棕黄色颗粒主要位于细胞核,即呈核表达,正常组织真皮、皮下组织未见表达。在创面组织中(真皮纤维),生肌化癥 2 号方组创面组织中 TIMP-1 蛋白表达低于糖尿病溃疡模型组和生肌化癥 1 号方组($P < 0.05$);生肌化癥 3 号方组中的表达高于生肌化癥 2 号方组($P < 0.01$)。

讨 论

慢性难愈性皮肤溃疡的修复是临床上常见的难题,由于原发疾病多样,病程迁延难愈或愈后易复发,临床疗效较差。基于长期的临床实践和前期研究的基础,慢性难愈性皮肤溃疡的发生、发展的过程中始终贯穿着“热”、“虚”、“癥”三大病理因素,其中“热”为标,“虚”、“癥”为本,且常常“因癥致虚,因虚致癥”,互为因果^[3]。笔者认为“虚”和“癥”是创面难以愈合的两大关键病机,因而提出了“祛癥生肌”的治则治法,拟订了协定处方——“生肌化癥方”,取得了良好的临床疗效。方中重用生黄芪、党参补气扶正、托毒生肌;丹参、桃仁、川芎化瘀行血;佐以白术、生地健脾养阴,水蛭搜剔络脉,共奏祛癥生肌之效。

糖尿病是慢性难愈性皮肤溃疡较为常见的难愈性因素。糖尿病性皮肤溃疡经久难愈,其原因可能与糖尿病导致的血管病变、神经病变、感染和炎症等因素有着密切关系。本实验显示,在成模各时间点,各组糖尿病大鼠血糖水平均明显高于正常创面组($P < 0.01$),而各组糖尿病大鼠间血糖水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),表明糖尿病模型造模成功。在皮肤溃疡模型成模 7、11、15 天时,糖尿病溃疡模型组大鼠创面面积明显大于正常创面组($P < 0.05$),表明糖尿病溃疡模型组呈现典型的“难愈性”创面特征。在溃疡创面修复过程中,应用不同比例的生肌化癥方(1、2、3 号方),与糖尿病模型组大鼠溃疡创面相比较,结果显示:成模 11、15 天时,糖尿病溃疡模型组创面面积明显大于其余 4 组($P < 0.05$);生肌化癥 1 号方组、生肌化癥 2 号方组创面面积均明显大于生肌化癥 3 号方组($P < 0.05$);面积差值方面,生肌化癥 3 号方组明显优于糖尿病溃疡模型组($P < 0.05$)。上述结果表明,祛癥生肌法,尤其是重用化瘀药物,能促进糖尿病性皮肤溃疡创面的愈合。

MMPs 是参与 ECM 降解的主要酶蛋白家族,而 TIMPs 能特异性地抑制 MMPs 家族的活性,从而抑制其降解 ECM 的作用。MMPs 活性增强或 TIMPs 活性降低都会破坏 ECM 的动态平衡,特别是对创面修复起着至关重要作用的胶原蛋白合成

与分解呈动态平衡,关系到创面修复的结局^[4]。MMP-3 也称基质溶素-1(stromelysin-1)或前明胶酶(progelatinase),是一种锌离子依赖的蛋白酶,够降解多种 ECM 成分,参与组织形态发生、创面修复、炎症反应等生理、病理过程,其水解底物包括Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅸ型胶原,蛋白聚糖、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白等,是一种重要的细胞外基质调节酶^[5]。MMP-3 还能通过水解各种 ECM 成分而激活其他的 MMPs(如 MMP-1、7、8、13 等)^[6,7],进而在创伤修复的基质重构中发挥重要功能。MMP-3 的表达可见于组织创伤后的不同时间段,有研究显示甚至在创伤后 28 天仍可检测到 MMP-3 的表达^[8],表明 MMP-3 不仅参与了 ECM 降解,而且也与创面修复、ECM 重塑和组织改建密切相关。本实验采用 Western blot 法检测了实验性创面组织中 MMP-3 蛋白表达,结果表明生肌化癥 2 号方组实验性创面组织中的 MMP-3 表达高于生肌化癥 3 号方组($P < 0.05$),糖尿病溃疡模型组实验数据虽高于生肌化癥 3 号方组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。项光芬等^[9]采用补阳还五汤(益气活血法)口服治疗脑梗死(气虚血瘀证)患者,检测发现患者血浆中 MMP-3 水平下降的幅度明显高于对照组,从而在不同疾病中验证了益气活血祛瘀法,特别是重用活血化癥类药物时具有下调 MMP-3 水平的作用。与此相呼应的是,本次实验中生肌化癥 3 号方组大鼠皮肤溃疡创面较其他各糖尿病大鼠组愈合快,更是从宏观层面印证了上述观点。

有研究发现,TIMP-1 几乎可抑制所有的 MMPs,它以共价键的形式与 MMPs 相结合成 1:1 的复合体,特异性、可逆性地抑制 MMPs 的活性^[10],并且在糖尿病足的溃疡组织中,TIMP-1 和 MMP-1 间比例发生了明显的变化^[11],渗液中 MMP-9/TIMP-1 比例明显高于对照组创面,而降低 MMP-9/TIMP-1 的比例可加速糖尿病足溃疡的愈合^[12]。本实验采用免疫组化法检测了实验性创面组织中 TIMP-1 蛋白表达,结果显示生肌化癥 2 号方组创面组织中 TIMP-1 蛋白的表达低于糖尿病溃疡模型组和生肌化癥 1 号方组($P < 0.05$),生肌化癥 3 号方组高于生肌化癥 2 号方组($P < 0.01$)。这与 MMP-3 在生肌化癥 3 号方组中呈现低表达相呼应。

上述结果表明,当祛癥生肌法中生肌方和化癥方按 1:1 的比例组方时,能上调 MMP-3 水平,下调 TIMP-1;而当祛癥生肌法中生肌方和化癥方按 1:2 的

比例即重用活血化瘀类药物组方时,能下调 MMP-3、上调 TIMP-1,两者基本表现为互为负调控。由此提示在创面修复早期,采用生肌方和化瘀方按 1:2 的比例组方,有利于减少胶原蛋白分解,促进创面中 ECM 的迅速沉积以加速愈合;至创面愈合晚期乃至愈合后,采用生肌方和化瘀方按 1:1 的比例组方,则有利于 ECM 过量沉积的胶原蛋白降解,对创面进行重塑,或有望抑制病理性瘢痕的形成,从而达到提高创面修复质量的效果。

参 考 文 献

- [1] 付小兵,王亚平,孙同柱,等.糖尿病慢性难愈合创面大鼠模型的制备[J].上海实验动物科学,1997,17(4): 217-219.
- [2] 郝颖,柴瑞华,于世家.改良链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠糖尿病模型及其饲养方法[J].中华中医药学刊,2008,26(4): 784-785.
- [3] 李斌,王一飞.慢性难愈性皮肤溃疡中医药干预策略及若干理论问题探讨[J].中医杂志,2011,52(23): 2002-2005.
- [4] Sampieri CL, Nuttall RK, Young DA, et al. Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes[J]. Matrix Biol, 2008, 27(2): 128-138.
- [5] Yong VW, Power C, Forsyth P, et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(7): 502-511.
- [6] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neuronegenerative diseases[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(2): 205-216.
- [7] Sood RR, Taheri S, Candelario-Jalil E, et al. Early beneficial effect of matrix metalloproteinase inhibition on blood brain barrier permeability as measured by magnetic resonance imaging countered by impaired long-term recovery after stroke in rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(2): 431-438.
- [8] Daniels JT, Geerling G, Alexander RA, et al. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue[J]. Exp Eye Res, 2003, 77(6): 653-664.
- [9] 项光芬,罗丽飞.补阳还五汤对脑梗死患者(气虚血瘀证)血浆白介素-6及基质金属蛋白酶-3的影响[J].中国中医急症,2012,21(10): 1686-1687.
- [10] Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(3): 178-193.
- [11] Muller M, Trocme C, Lardy B, et al. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing[J]. Diabetes Med, 2008, 25(4): 419-426.
- [12] Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing[J]. J Diabetes Complications, 2006, 20(5): 329-335.

(收稿:2013-03-02 修回:2013-11-06)

《Chinese Journal of Integrative Medicine》

(中国结合医学杂志,英文版)SCI 影响因子提升至 1.059

美国汤森路透公司公布 2012 年 SCI 影响因子。《Chinese Journal of Integrative Medicine》(中国结合医学杂志,英文版)SCI 影响因子提升至 1.059,为我国中医药类杂志影响因子之首,在国际替代医学类期刊中的学科排名由 2012 年的 16 名提升至 12 名。

国际替代医学类期刊目前共 20 本,总体影响因子偏低,最高为 4.857。因此,《Chinese Journal of Integrative Medicine》此次影响因子达到 1.059 显得更为不易。同时,它对中医药发展以及国内学者科研水平的提高也具有重要意义。

近年来,针对国内外同类期刊现状,本杂志定位由中医、中西医结合拓展到整个替代医学、结合医学领域,调整了栏目设置,增加了国际约稿比例,利用国际一流的 ScholarOne 在线投审稿系统,优化了审稿流程,提高了在线优先发表比例。网站也进行了全新改版,加大了宣传力度,使国际影响力不断提升。来稿方面,海外稿件比例达 29.7%,期刊的国际关注度明显增加。同时,2012 年对编委进行了改选和增补,其中国外编委比例达 46.39%,编委队伍的国际化为进一步提升杂志的国际影响力奠定了基础。