

· 临床报道 ·

消毒愈肌膏对糖尿病足溃疡 RNA 基因表达的影响

李 旗 田福玲 郑德松

糖尿病足是糖尿病常见的、严重的临床并发症之一,局部溃疡既是糖尿病足的一种临床主要表现形式,也是糖尿病足恢复的一大障碍。本研究应用消毒愈肌膏对糖尿病足溃疡进行干预,观察 RNA 基因表达的变化,报道如下。

资料与方法

1 诊断标准 糖尿病足诊断参照美国糖尿病协会(American Diabetes Association, ADA)糖尿病防治指南(2010 版)制定的糖尿病足(肢端坏疽)诊断标准^[1]。

2 纳入、排除及脱落标准 纳入标准:符合诊断标准;患者近期血糖相对平稳;创面处于黑期或黄期阶段,无明显肉芽组织生长;患者签署知情同意书。排除标准:糖尿病急性并发症、证候或合并症;其他疾病引起的局部溃疡;严重心、肝、肾损害影响药物代谢;已接受相关治疗并可能影响效应观测指标。脱落标准:未按规定实施干预措施;资料不全;严重不良反应、并发症,特殊生理变化等,难以继续治疗。

3 一般资料 40 例均为 2010 年 9 月—2012 年 9 月华北理工大学附属医院外科住院糖尿病足患者,其中男 19 例,女 21 例,年龄 38~68 岁,平均(53±3)岁;糖尿病病程 5~20 年,平均(8.3±2.0)年;空腹指端血糖 6.4~8.1 mmol/L,平均(6.9±1.8) mmol/L;溃疡(坏疽)病程 60~180 日,平均(106±40)日。按随机数字表法分为对照组和治疗组,每组各 20 例,两组一般资料比较(表 1),差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究通过华北理工大学附属医院伦理委员会批准。

4 治疗方法 两组患者维持日常使用降糖药物,给予基础治疗^[2,3]:丹参川芎嗪注射液(盐酸川芎嗪、丹参,辅料为甘油、注射用水,5 mL/支,贵州拜特制药有限公司,批号:130704A1) 10 mL 加生理盐水 250 mL,静脉滴注,每日 1 次;金纳多注射液(银杏叶提取物,5 mL/支,悦康药业集团有限公司,批号:HC120)10 mL 加生理盐水 250 mL,静脉滴注,每日 1 次。有创面感染时,根据药敏结果选择抗生素,治疗组在患处外敷消毒愈肌膏(组成:黄连 20 g 黄柏 30 g 白芷 25 g 甘草 60 g 当归 10 g 血竭 20 g 轻粉 20 g 虫白蜡 10 g 紫草 10 g 麻油 500 g,饮片购自山东三九药业有限公司,华北理工大学医学院实验室生产,生药含量 20.5%),无菌油纱条外敷,无菌纱布包扎,每 2 日换药 1 次。对照组患处应用无菌盐水,无菌纱布包扎,每 2 日换药 1 次。两组均连续治疗 30 日。

5 检测指标及方法 治疗 30 日后,取糖尿病足患者足背部溃疡区组织,放入冻存管内并标记迅速投入液氮中保存。

5.1 总 RNA 抽提及质量检测 每 100 mg 组织样品,加入 TRIzol 试剂 1 mL 提取总 RNA,应用 RNA 提取试剂盒纯化总 RNA。使用 NanoDrop (ND-1000 测定 RNA 在分光光度计 230、260、280 nm 的吸收值,计算浓度并评估纯度。另外,进行变性琼脂糖凝胶电泳,紫外透射光下观察并拍照,以检测 RNA 纯度及完整性。

5.2 RNA 的标记及芯片杂交 采用 RCURYT-MAr-ray Power 标记试剂盒,按照说明书用标记酶将 Hy3TM 荧光基团标记 RNA 得到用于与芯片杂交的荧光

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	男/女	年龄(岁)	糖尿病足病程(年)	血糖(mmol/L)	溃疡病程(日)
治疗	20	9/11	54±3	8.4±2.1	7.5±1.4	111±36
对照	20	10/10	52±2	9.5±3.7	6.9±2.1	103±42

基金项目:唐山市科技计划项目(No.121302118b);河北省中医药管理局科技计划项目(No. 2014188)

作者单位:华北理工大学医学院,河北省中医药防治糖尿病药理分析重点实验室,唐山市中药管理重点实验室(河北 063009)

通讯作者:李 旗, Tel:15133902870, E-mail:liqi19801211@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 11. 1397

探针。在标准条件下使用 Phalanx 的热收缩杂交袋将标记好的探针和 R-CURY 芯片进行杂交。采用 AxonGenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片的荧光强度,使用 GenePix pro V6.0 生物芯片扫描分析仪进行数据分析及统计处理,筛选出差异表达的 RNA。

5.3 各组织基因表达谱的差异芯片数据分析 选出表达最为明显的、有差异的基因(每个基因信号表达的灰度值经过看家基因校正后得出一个固定值,两组中相同基因固定值的比值 >2 或者 <0.5 为差异有统计学意义。

结 果

- 1 病例脱落情况 两组均无无病例脱落。
- 2 两组差异表达基因(表 2) 与对照组比较,治疗组 16 个基因(IL-16、IL-18、IL-24、TGFA、TGFB2、BMP2、BMP15、GDF1、GDF3、GDF11、IFNA1、IFNA13、IFNB1、IFNW1、IGF2、CNTF)表达上调,4 个基因(IL-21、IL-26、IK、INHA)表达下调。

讨 论

消毒愈肌膏是以《外科正宗》生肌玉红膏为主方,加黄连、黄柏,其功用具有解毒消肿、生肌止痛。其中黄连、黄柏富含有小檗碱,通过抑制细菌的核酸和蛋白质代谢等方式起到抑菌、杀菌作用,同时增强白细胞的吞噬作用,激活巨噬细胞网状内皮系统的吞噬作用,抑制癌细胞生成作用较强,对实验性高血糖症大鼠有降

糖作用(抑制肝脏糖原异生和促进葡萄糖酵解)^[4]。甘草含有甘草酸、甘草糖可激活淋巴细胞增殖,增加 IL-1,刺激 B 细胞增殖,诱导 IgG、IgM 的生成增强体液免疫,同时具有抗 DNA、RNA 病毒效应诱导干扰素 α、干扰素 γ,对金葡菌等有抑制作用,具有氢化可的松样的抗炎作用,协同白芷增强其抗炎作用^[5]。当归具有增强巨噬细胞的吞噬能力和 IL-2 生成,增强体液免疫,诱导干扰素活性,抑制血小板凝聚和抗血栓形成作用,有明显的抗氧化作用^[6]。血竭对溃疡所致的炎症能加速结痂,促进伤口的愈合,抗血栓形成作用,对多种病菌和真菌有较强的抑制作用^[7]。

在消毒愈肌膏干预后,白细胞介素家族中多成员表达上调,尤其是 IL-16、18、24。IL-16 能趋化 CD4⁺T 细胞、单核细胞和嗜酸性淋巴细胞,其在糖尿病组织中低表达,导致了机体对免疫应答的辅助和调节作用以加强,有利于溃疡愈合^[8]。而 IL-18 则通过增强巨噬细胞的吞噬能力,促进溃疡的愈合的。IL-24 是目前发现具有肿瘤抑制和免疫刺激作用的一种细胞因子^[9]。可以选择性引起细胞凋亡,从而抑制了肿瘤组织的增生^[10],在 B、NK 细胞中表达,刺激巨噬细胞分泌炎症因子^[11],产生免疫应答,皮肤软组织损伤,有大量免疫组织、细胞参与创面修复,表达上调加快了创面修复的正常进程。IL-21 表达下调,对 T、B、NK 细胞增殖活性抑制能力及诱导凋亡作用^[12]降低,有利于对糖尿病足溃疡中感染得以控制。TGF、BMP、GDF 等因子表达上调,诱导成骨,促进骨胶原生成、骨痂的

表 2 两组差异表达基因

基因文库	英文名称	简称	中文名称	比值
NM_004513	Interleukins-16	IL-16	白细胞介素 16	12.84356
NM_019165	Interleukins-18	IL-18	白细胞介素 18	7.74692
NM_006854	Interleukins-24	IL-24	白细胞介素 24	9.69541
NM_003236	Transforming growth factor-α	TGFA	转化生长因子 α	9.25674
NM_031131	Transforming growth factor-β2	TGFB2	转化生长因子 β2	13.56841
NM_017178	Morphology of bone protein2	BMP2	骨形态发生蛋白 2	8.2459
NM_005448	Morphology of bone protein15	BMP15	骨形态发生蛋白 15	3.25489
XM_224733	Growth differentiation factor-1	GDF1	生长分化因子 1	4.59730
NM_020634	Growth differentiation factor-3	GDF3	生长分化因子 3	6.25493
NM_005811	Growth differentiation factor-11	GDF11	生长分化因子 11	2.56942
NM_024013	Interferon-α1	IFNA1	干扰素 α1	5.69841
NM_006900	Interferon-α13	IFNA13	干扰素 α13	6.25419
NM_002176	Interferon-β ₁	IFNB1	干扰素 β ₁	4.59832
NM_002177	Interferon-w1	IFNW1	干扰素 W1	8.45190
NM_031511	Insulin-like growth factor-2	IGF2	胰岛素样生长因子 2	10.3658
NM_013166	Ciliary neurotrophic factor	CNTF	睫状神经营养因子	6.25490
NM_345201	Interleukins-21	IL-21	白细胞介素 21	0.23659
NM_018402	Interleukins-26	IL-26	白细胞介素 26	0.45972
XM_214579	-	IK	-	0.289430
NM_012590	Statin-α	INHA	抑制素 α	0.48652

形成和再塑,促进干细胞增殖分化,合成并维持神经营养因子,刺激蛋白合成及调控愈合进程^[13],促进肉芽组织增生以及溃疡创面愈合。IFNS 通过细胞表面受体作用使细胞产生抗病毒蛋白,从而抑制病毒的复制;同时还可增强 NK、T 淋巴细胞的活力,从而起到免疫调节作用,并增强抗病毒能力。IFNA1、IFNA13 等表达上调,加强了对糖尿病足溃疡中感染的控制。CNTF 能刺激受损的轴突生长,促进神经细胞增殖、分化及组织再生、修复起到重要的作用^[14]。而 IGF 可通过自分泌和旁分泌机制对骨、肌、皮肤等组织正常生长和分化有重要的调节作用^[15]。消毒愈肌膏使糖尿病足的 CNTF、IGF 因子表达上调,对多种组织正常生长和分化起到了良好的促进作用。本研究结果与前期研究结果^[16]一致,表现为相同的上调或下调基因。

在糖尿病足溃疡组织中,存在着数目巨大的差异表达基因,这决定了糖尿病足迁延难愈、反复发作的临床特点。在消毒愈肌膏干预下,众多基因表达发生积极的变化,对糖尿病足溃疡组织愈合提供生物基础。但消毒愈肌膏成分复杂、途径繁多、靶点多样的特点,基因的变化受到多种因素的影响,这些基因是始动因素还是下游产物,就基因谱表达本身尚难定论,需要在后续的研究中进一步的验证和探讨。

参 考 文 献

- [1] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2010 [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(Suppl 1): S11 - S61.
- [2] 张薇蘅. 川芎嗪与甲钴胺联合治疗糖尿病足的效果观察 [J]. *白求恩军医学院学报*, 2013, 11(6): 519 - 520.
- [3] 程瑶, 卢韬, 肖彩虹. 金纳多治疗糖尿病足疗效观察(附 59 例报告) [J]. *哈尔滨医药*, 2000, 20(1): 17.
- [4] 沈丕安主编. 中药药理与临床运用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 329 - 334.
- [5] 黄敬耀主编. 药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 304.

- [6] 欧明主编. 简明中药成分手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 194.
- [7] 贺选玲. 血竭合剂促进糖尿病皮肤溃疡愈合的实验及临床研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2010.
- [8] Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand [J]. *Immunol Today*, 1996, 17(10): 476 - 481.
- [9] Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cell [J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2048 - 2058.
- [10] Caudell EG, Mum JB, Poindexter N, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation associated gene7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [J]. *J Immunol*, 2001, 168(12): 6041 - 6046.
- [11] Sieger KA, Mhashilkar AM, Stewart A, et al. The tumor suppressor activity of MDA-7/IL-24 is mediated by intracellular protein expression in NSCLC cells [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(3): 355 - 367.
- [12] Jin H, Carrio R, Yu A, et al. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell co-stimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis [J]. *J Immunol*, 2004, 173(1): 657 - 665.
- [13] 铁璐, 伊利夏提·肖开提, 王宪, 等. 糖尿病伤口愈合的分子机制 [J]. *生理科学进展*, 2010, 41(6): 407 - 412.
- [14] Nelson EA, O'Meara S, Craig D, et al. A series of systematic reviews to inform a decision analysis for sampling and treating infected diabetic foot ulcers [J]. *Health Technol Assess*, 2006, 10(12): III - IV, IX - X, 1 - 221.
- [15] Acosta JB, del Barco DG, Vera DC. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds [J]. *Int Wound J*, 2008, 5(4): 530 - 539.
- [16] 李旗, 田福玲, 李继安. 生肌玉红膏对大鼠糖尿病足溃疡 RNA 基因表达的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2013, 27(4): 73 - 75.

(收稿: 2013 - 03 - 08 修回: 2016 - 01 - 30)