

四妙勇安汤对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响

赵亚男¹ 刘 明¹ 张 玥¹ 王 彬¹ 张玉冬¹ 郝清智¹ 魏建梁²

摘要 目的 观察糖尿病溃疡模型大鼠中 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的变化及四妙勇安汤对该通路的影响。**方法** 雌性 Wistar 大鼠按随机数字表随机分为正常对照组(对照组, 17 只)和糖尿病组(DM 组, 34 只)。对照组给予普通饲料继续饲养, 糖尿病组采用高脂高糖饲料联合小剂量链脲佐菌素腹腔注射法制备糖尿病模型。随后将造模成功大鼠分为糖尿病溃疡组(DU 组)、糖尿病溃疡-四妙勇安汤组(DU-四妙组), 每组各 15 只。于对照组选取 15 只, 作为溃疡对照组(CU 组)。DU-四妙组采用四妙勇安汤灌胃, CU 组及 DU 组采用生理盐水灌胃。观察创面造模后第 3、7、14 日各组创面愈合情况的变化, 并采用 HE 染色法检测创面组织形态结构的变化, 采用 ELISA 法、RT-PCR 法检测创面组织中 β -连环素(β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、R-脊椎蛋白 3(R-spondin 3, Rspo-3)蛋白及 mRNA 的变化。**结果** 创面造模后第 3、7、14 日, 各组大鼠创面愈合率均为 CU 组 > DU-四妙组 > DU 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。创面造模后第 3、7、14 日, 与 CU 组比较, DU 组创面组织中 β -catenin 及 Rspo-3 蛋白含量及 mRNA 表达降低, GSK-3 β 蛋白含量及 mRNA 表达升高($P < 0.05$); 与 DU 组比较, DU-四妙组 β -catenin 蛋白含量及 mRNA 表达升高, GSK-3 β 蛋白含量及 mRNA 表达降低($P < 0.05$), DU 组与 DU-四妙组间 Rspo-3 蛋白含量及 mRNA 表达比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** Wnt/ β -catenin 通路的下调有可能导致了糖尿病溃疡的难愈, 而四妙勇安汤也可能通过对 Wnt/ β -catenin 信号通路进行调节而促进了糖尿病溃疡的愈合。

关键词 糖尿病溃疡; 四妙勇安汤; Wnt 信号通路; β -连环素; 糖原合成激酶-3 β ; R-脊椎蛋白

Effect of Simiao Yong'an Decoction on the Expression of Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Diabetic Ulcer Model Rats ZHAO Ya-nan¹, LIU Ming¹, ZHANG Yue¹, WANG Bin¹, ZHANG Yu-dong¹, HAO Qing-zhi¹, and Wei Jian-liang² 1 Department of Peripheral Vascular Surgery, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014); 2 Base of Hypertension, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014)

ABSTRACT Objective To observe the changes of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic ulcer (DU) model rats and to study the effect of Simiao Yong'an Decoction (SYD) on it. **Methods** Totally 51 female Wistar rats were divided into the normal control group ($n = 17$) and the diabetes mellitus (DM) group ($n = 34$) according to random digit table. Rats in the normal control group were fed with common forage. Those in the DM group were prepared for DM model by high fat high glucose forage + intraperitoneal injection of low-dose Streptozotocin (STZ). Successfully modeled rats were then randomly divided into the DU group and the DU-SYD group, 15 in each group. Fifteen rats were randomly selected from the normal control group, and then divided into the ulcer control group (CU). Rats in the DU-SYD group were administered with SYD by gastrogavage. Rats in the CU group and the DU group were administered with normal saline by gastrogavage. The conditions of wound healing were observed, histomorphological changes of the wound tissues were observed by HE staining at day 3, 7, and 14, respectively. Protein and mRNA expressions of β -catenin, GSK-3 β , and Rspo-3 in wound tissues were detected by ELISA and

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2012HL14)

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院周围血管病科 (济南 250014); 2. 山东中医药大学附属医院高血压基地 (济南 250014)

通讯作者: 刘 明, Tel: 13515416013, E-mail: liuming404@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.01.0079

RT-PCR. Results The wound healing rate was sequenced from high to low as Group CU, Group DU-SYD, Group DU at day 3, 7, and 14, respectively ($P < 0.05$). Compared with CU group, protein contents and mRNA expressions of β -catenin and Rspo-3 in wound tissues decreased, protein contents and mRNA expressions of GSK-3 β increased in the DU group at day 3, 7, and 14, respectively ($P < 0.05$). Compared with the DU group, protein contents and mRNA expressions of β -catenin in wound tissues increased, protein contents and mRNA expressions of GSK-3 β decreased in the DU-SYD group at day 3, 7, and 14, respectively ($P < 0.05$). There was no significant difference in protein contents or mRNA expressions of Rspo-3 between the DU group and the DU-SYD group ($P > 0.05$). **Conclusions** Down-regulation of Wnt/ β -catenin pathway might result in difficult healing of UC. SYD could promote the healing of DU possibly by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS diabetic ulcer; Simiao Yong'an Decoction; Wnt signaling pathway; β -catenin; glycogen synthase kinase-3 β ; R-spondin 3

糖尿病溃疡(dabetic ulcer, DU)是极具代表性的难愈性溃疡。据统计,30%的糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者会发生皮肤溃疡,且反复发作,经久不愈,严重者会导致截肢或引发脓毒血症而危及生命^[1]。

四妙勇安汤首见于《华佗神医秘传》,是临床治疗糖尿病溃疡的经典方剂。为研究四妙勇安汤对糖尿病溃疡的促愈机制,本实验以 Wnt/ β -catenin 信号通路为切入点,通过制作糖尿病溃疡大鼠模型,并给予四妙勇安汤灌胃进行干预,观察溃疡组织形态结构的变化,及检测溃疡组织中 Wnt 信号通路相关的 β -连环素(β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、R-脊椎蛋白 3(R-spondin 3, Rspo-3)蛋白及 mRNA 的表达水平,以探讨四妙勇安汤对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响。

材料与方法

1 动物 雌性 Wistar 大鼠 51 只,体重 160 ~ 180 g,清洁级,购自山东大学动物实验中心(动物许可证号:SCXK(鲁)20130009)。

2 药物 四妙勇安汤水煎剂组成:金银花 90 g 玄参 90 g 当归 60 g 甘草 30 g,饮片购自山东中医药大学第一附属医院,汤液经过悬蒸仪浓缩至 5.625 g/mL。

3 试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma)(临用前用 0.1 mol/L、pH4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制成 STZ 液),大鼠 ELISA 试剂盒(R&D),T 重复寡核苷酸(Oligo(dT))、RNA 酶抑制剂(ribonuclease inhibitor)、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)(Bio Basic INC),逆转录酶(reverse transcriptase)、Taq DNA 聚合酶(Taq

DNA polymerase)、DNA 标准品(Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder)(Fermentas),dNTP 混合物(dNTP Mix)、琼脂糖(Agarose Type I-B)(上海生工生物工程有限公司),引物(上海博尚生物技术有限公司合成),氯仿(北京索宝生物科技有限公司),无水乙醇(上海生工生物工程有限公司),异丙醇(上海生工生物工程有限公司),柠檬酸(北京索莱宝科技有限公司),柠檬酸钠(北京索莱宝科技有限公司),戊巴比妥钠(上海榕柏生物技术有限公司)。

4 仪器 酶标仪(352 型, Labsystems Multiskan MS),洗板机(AC8 型, Thermo Lab-Systems),微量高速离心机(TG16-W 型,湖南湘仪离心机有限公司),隔水式恒温培养箱(GNP-9080 型,上海精宏实验设备有限公司),罗氏血糖仪(罗康全活力 II 型,罗氏诊断产品有限公司),高速低温离心机(T1, Sorvall Super),紫外分光光度计(ND1000, Nanodrop),梯度 PCR 扩增仪(T-Gradient, Biometra),凝胶成像系统(Alpha Imager™ 2200, Alpha Innotech),超低温冰柜(725, Thermo Forma),电泳仪(PowerPac™, Bio-Rad),石蜡切片机(RM2235, Lecia),光学显微镜照相系统(M420, Lecia),普通光学显微镜(CX40, Olympus),电热恒温干燥箱(GZX-DH. 500-BS-II, 上海跃进医疗器械厂)。

5 模型建立、分组及给药方法

5.1 糖尿病大鼠模型的建立及分组 大鼠按随机数字表随机分为正常对照组(对照组, 17 只)和糖尿病组(DM 组, 34 只)。适应性饲养 1 周后,分别记录两组大鼠的体重、进食量、饮水量、排泄量。对照组给予普通饲料继续饲养,DM 组给予高脂高糖饲料(59% 基础饲料 + 20% 蔗糖 + 18% 猪油 + 3% 蛋黄,由北京科澳协力饲料有限公司加工制作)饲养。饲养 4 周后,

分别记录两组大鼠的体重、进食量、饮水量、排泄量,并采用断尾取血法测定大鼠的随机血糖。此后,两组大鼠均禁食 12 h,DM 组给予 30 mg/kg、1% 的 STZ 溶液单次腹腔注射,对照组注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射后第 3 天采用断尾取血法测血糖,随机血糖 ≥ 16.67 mmol/L 为糖尿病造模成功;造模不成功者再次空腹 12 h 后注射 10 mg/kg、1% STZ 溶液。维持高血糖状态 4 周后,进行创面造模。

5.2 糖尿病溃疡大鼠模型的建立及药物干预方法 维持高血糖状态 4 周后,将两组大鼠以 3% 的戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射进行麻醉,麻醉成功后,背部脱毛,常规消毒,在背部制作直径约为 2.5 cm 的圆形创面,深至皮下。溃疡造模时,两组大鼠各死亡 1 只。溃疡造模后,于 DM 组选取 30 只,并采用随机数字表法随机分为 DU 组及 DU-四妙组,每组 15 只;于对照组选取 15 只,作为溃疡对照(control ulcer, CU)组。于造模后第 2 日给予药物干预,CU 组及 DU 组给予生理盐水灌胃,DU-四妙组给予四妙勇安汤水煎剂灌胃,灌胃剂量为 1 mL/100 g。

6 观察指标及方法

6.1 一般情况监测 记录对照组及 DM 组大鼠一般情况。

6.2 体重、进食量、饮水量、排泄量及血糖监测 于造模前、STZ 注射前及创面造模前记录对照组及 DM 组大鼠的体重、进食量、饮水量、排泄量及血糖。

6.3 创面愈合情况观察 溃疡造模后第 3、7、14 日对 CU 组、DU 组及 DU-四妙组创面进行大体观察,主要包括创面颜色、肿胀程度、渗液量等,并用数码相机拍照,通过 Photoshop 软件,记录创面面积^[2]。然后分别计算各组大鼠给药后第 3、7、14 日的创面愈合率,计算方法为:(创面初始面积-给药后第 n 天创面面积)/创面初始面积 $\times 100\%$ 。

6.4 创面组织病理观察 分别于溃疡造模后第 3、7、14 日,采用抽签法于 CU 组、DU 组及 DU-四妙组各随机抽取 5 只大鼠,戊巴比妥钠麻醉后,采集创面及创周 2 mm 的组织,4% 多聚甲醛固定后,经冲洗-取材-脱水-透明-浸蜡-包埋-切片-贴片等步骤后制成组织切片,再将石蜡切片脱蜡、水化后,进行组织切片的苏木精-伊红染色(HE 染色),以观察创面的组织学变化,包括毛细血管、胶原蛋白、成纤维细胞等的变化。

6.5 创面组织 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白的 ELISA 检测 分别于溃疡造模后 3、7、14 日,采用抽签法于 CU 组、DU 组及 DU-四妙组各随机抽取

5 只大鼠,戊巴比妥钠麻醉后,采集创面及创周 2 mm 的组织,应用 ELISA 法检测其中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白的含量。

6.6 创面组织 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 的 RT-PCR 检测 分别于溃疡造模后 3、7、14 日,采用抽签法于 CU 组、DU 组及 DU-四妙组各随机抽取 5 只大鼠,戊巴比妥钠麻醉后,采集创面及创周 2 mm 的组织,应用 RT-PCR 法检测其中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 的含量。检测时将组织剪碎,采用 Trizol 法提取总 RNA,建立 30 μ L 的 RT-PCR 体系(Olig dT 1 μ L + RNA 17 μ L + 5 $\times$ buffer 6 μ L + dNTP 3 μ L + Rnase 1.5 μ L + M-MLV 1.5 μ L)。产物进行 PCR,建立 25 μ L 体系(Template DNA 4 μ L + 2 $\times$ Taq MasterMix 12.5 μ L + P1/P2 10 μ M 2 μ L + RNase-Free Water 6.5 μ L)。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。 β -catenin 引物序列:上游:5-CTGACCAAACCTGCTAAATGACG-3,下游:5-GTGGTGATGGCGTAGAACAGTA-3;GSK-3 β 引物序列:上游:GGACCTCGGAGCAAGTTTCA,下游:AGGCTCCCTCCAAGATC-CAT;Rspo3 引物序列:上游:GTACACTGTGAGGCCAGTGAA,下游:ATGGCTAGAACACCTGTCCTG。

7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠一般情况的变化 糖尿病造模后,DM 组大鼠毛色逐渐灰暗、枯黄、杂乱,皮肤及皮下脂肪变薄,多饮、多食、多尿明显。而对照组大鼠毛发细密、光亮,皮下脂肪丰满,体重逐渐增加。

2 两组大鼠体重、进食量、饮水量、排泄量及血糖结果比较(表 1) 适应性饲养 1 周后及注射 STZ 前,两组大鼠的体重、进食量、饮水量、排泄量及随机血糖比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而创面造模前,与对照组比较,DM 组大鼠平均每日进食量、饮水量、排泄量均增加,体重增长缓慢,随机血糖明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组大鼠创面愈合情况比较(图 1) CU 组:创面造模后第 3 日,创面色红润,轻度水肿,少量渗出,可见少量肉芽组织;第 7 日,创面缩小明显,肉芽色红润,无明显渗出,表面有痂皮覆盖,创缘可见淡红色新生上皮;第 14 日,创面缩小明显,创周可见淡红色新生上

皮。DU 组:创面造模后第 3 日,创面组织轻度水肿,色暗红,渗出较多,可见少量黄白色分泌物;第 7 日,肉芽水肿,色暗红、无光泽,渗出多;第 14 日,创面缩小,渗出减少,创周可见淡红色上皮爬行。DU-四妙组:创面造

模后第 3 日,创面组织轻度水肿,色暗红,少量渗出,可见少量肉芽组织及黄白色分泌物;第 7 日,肉芽组织轻度水肿,渗出不明显,创周可见上皮爬行;第 14 日,创面缩小,色淡红,创周可见淡红色新生上皮。

表 1 两组大鼠体重、进食量、饮水量、排泄量及血糖结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	体重(g)	进食量(g)	饮水量(g)	排泄量(g)	血糖(mmol/L)
对照	17	造模前	165.76 ± 5.04	16.29 ± 0.67	30.06 ± 2.28	12.82 ± 1.44	6.06 ± 0.30
		STZ 注射前	237.24 ± 4.78	16.75 ± 0.61	26.87 ± 2.85	13.22 ± 1.77	6.09 ± 0.29
		创面造模前	301.12 ± 5.49	16.81 ± 0.67	26.31 ± 2.47	13.60 ± 1.95	5.99 ± 0.15
DM	34	造模前	166.88 ± 4.72	16.18 ± 0.92	29.87 ± 2.54	12.05 ± 1.49	6.11 ± 0.30
		STZ 注射前	238.56 ± 5.23	16.70 ± 0.68	30.72 ± 2.13	14.33 ± 1.91	6.08 ± 0.27
		创面造模前	249.91 ± 5.34 *	26.64 ± 0.78 *	89.69 ± 3.06 *	87.12 ± 6.42 *	26.26 ± 2.98 *

注:与对照组同期比较, *P<0.05



注:A 为 CU 组第 3 日;B 为 CU 组第 7 日;C 为 CU 组第 14 日;D 为 DU 组第 3 日;E 为 DU 组第 7 日;F 为 DU 组第 14 日;G 为 DU-四妙组第 3 日;H 为 DU-四妙组第 7 日;I 为 DU-四妙组第 14 日

图 1 各组大鼠创面愈合情况比较

4 各组大鼠创面愈合率比较(表 3) 创面造模后第 3、7、14 日,各组大鼠创面愈合率均为 CU 组 > DU-四妙组 > DU 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠创面愈合率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 3 日	第 7 日	第 14 日
CU	15	20.87 ± 1.39	49.99 ± 1.58	91.60 ± 1.58
DU	15	5.21 ± 0.94 *	31.70 ± 1.21 *	62.20 ± 1.37 *
DU-四妙	15	10.30 ± 0.92 * [△]	35.13 ± 1.01 * [△]	65.94 ± 1.33 * [△]

注:与 CU 组比较, * $P < 0.05$;与 DU 组比较, [△] $P < 0.05$

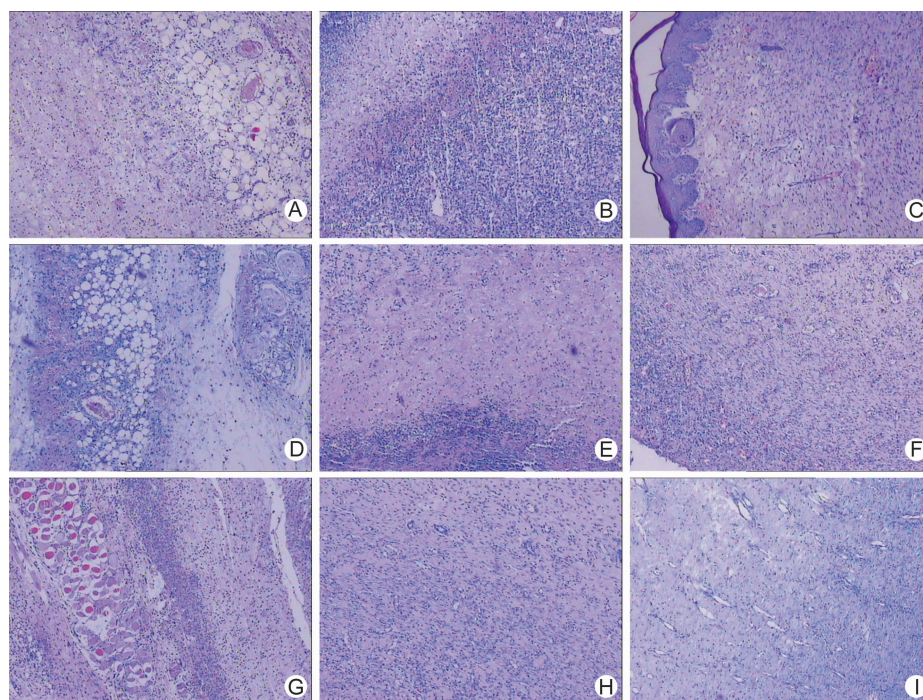
5 各组大鼠创面组织病理结果比较(图 2)

CU 组:创面造模后第 3 日,炎症细胞浸润明显,有少量纤维母细胞及新生毛细血管;第 7 日,可见肉芽组织,纤维母细胞生长活跃,新生毛细血管数量增加,有较多炎症细胞及少量胶原纤维;第 14 日,可见新生表皮及肉芽组织,有少量炎症细胞、纤维母细胞及毛细血管,可见较多胶原纤维。DU 组:创面造模后第 3 日,有少量炎症细胞、纤维母细胞及新生毛细血管;第 7 日,可见炎症细胞浸润,有少量纤维母细胞、新生毛细血管及胶原纤维;第 14 日,可见新生表皮及肉芽组织,有少量炎症细胞、纤维母细胞及毛细血管,可见胶原纤维。DU-四妙组:创面造模后第 3 日,有较多炎症细

胞浸润,有少量纤维母细胞及新生毛细血管;创伤后第 7 日,纤维母细胞及新生毛细血管数量增加,有较多炎症细胞及少量胶原纤维;创伤后第 14 日,可见较多的毛细血管及胶原纤维,少量炎症细胞及纤维母细胞。

6 各组大鼠创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo3 蛋白表达比较(表 4) 创面造模后第 3、7、14 日,与 CU 组比较,DU 组创面组织中 β -catenin 及 Rspo-3 蛋白含量降低, GSK-3 β 蛋白含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 DU 组比较,DU-四妙组 β -catenin 蛋白含量升高, GSK-3 β 蛋白含量降低($P < 0.05$),DU 组与 DU-四妙组间 Rspo-3 蛋白含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

7 各组大鼠创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 表达比较(表 5,图 3) 创面造模后第 3、7、14 日,与 CU 组比较,DU 组创面组织中 β -catenin 及 Rspo-3 mRNA 表达降低, GSK-3 β mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 DU 组比较,DU-四妙组 β -catenin mRNA 表达升高, GSK-3 β mRNA 表达降低($P < 0.05$),DU 组与 DU-四妙组间 Rspo-3 mRNA 表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为 CU 组第 3 日;B 为 CU 组第 7 日;C 为 CU 组第 14 日;D 为 DU 组第 3 日;E 为 DU 组第 7 日;F 为 DU 组第 14 日;G 为 DU-四妙组第 3 日;H 为 DU-四妙组第 7 日;I 为 DU-四妙组第 14 日

图 2 各组大鼠创面组织病理结果比较(HE 染色, ×40)

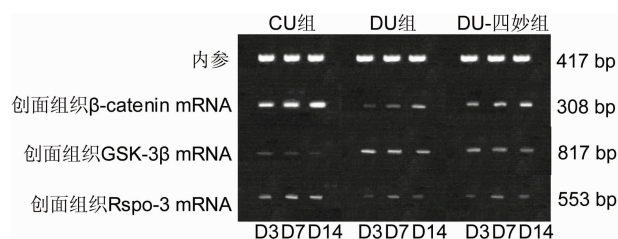


图3 各组大鼠创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 表达电泳图

讨 论

DU 是糖尿病的常见并发症之一,具有发病原因复杂、病程长、治疗困难、预后较差的特点,严重者可导致脓毒血症或截肢。Dohmen A 等^[3]报道,在德国每年有 40 000 例截肢患者中 70% 为糖尿病患者。四妙勇安汤是临床治疗糖尿病溃疡的常用方剂,其内容最早见于《华佗神医秘传》,原文载:“此疾发于手指或足趾之端,先痒而后痛,甲现黑色,久则溃败,节节脱落。内服药金银花 3 两、玄参 3 两、当归 2 两、甘草 1 两,水煎服。”方中金银花清热解毒,玄参滋阴凉血清热,共为君药;当归养血活血为臣;甘草为使,清热解毒、调和诸药;全方共奏清热解毒、活血通脉之功。

研究证实,四妙勇安汤可降低糖尿病足患者血清炎症因子的水平,保护糖尿病患者血管内皮细胞^[4,5]。

在本实验中,DU 组大鼠溃疡愈合较 CU 组减慢,肉芽生长不良,创面组织的 HE 染色证实 DU 组炎症细胞、纤维母细胞、新生毛细血管等均较 CU 组减少,证明本实验成功模拟了糖尿病难愈性溃疡。而采用四妙勇安汤干预后,创面愈合率及创面的组织学变化均得到改善,说明四妙勇安汤促进了糖尿病溃疡的愈合。

Wnt 信号通路是一条高度保守的信号传导通路,主要有 3 条途径,其中经典途径即 Wnt/ β -catenin 通路。在正常成熟细胞中,Wnt 通路处于关闭状态,胞浆中几乎没有游离的 β -catenin^[6]。当 Wnt 信号通路被激活时,Wnt 蛋白与受体结合,抑制 GSK-3 β 的活性,使 β -catenin 不能被磷酸化而降解,进而在胞质内大量积累并入核,以启动下游靶基因的表达^[7]。Wnt 信号通路具有调控皮肤发育、促进创面血管新生及上皮重塑等功能,成为皮肤伤口愈合相关通路之一^[8]。 β -catenin 是该通路的重要蛋白质之一,研究显示 Wnt 信号通路的刺激是使 β -catenin 稳定性增强的唯一机制^[9]。GSK-3 β 是决定 β -catenin 磷酸化的重要激酶,成为该通路的负性调控因子^[10]。Rspo (R-spondin) 蛋白家族包括 4 个成员 (Rspo1~4),研究证

表4 各组大鼠创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	β -catenin	GSK-3 β	Rspo-3
CU	15	第3日	9.04 $\pm$ 0.65	7.04 $\pm$ 0.53	4.83 $\pm$ 0.28
	10	第7日	10.08 $\pm$ 0.35	6.05 $\pm$ 0.23	6.76 $\pm$ 0.31
	5	第14日	12.77 $\pm$ 0.30	4.49 $\pm$ 0.37	5.75 $\pm$ 0.30
DU	15	第3日	5.14 $\pm$ 0.56 *	15.52 $\pm$ 1.00 *	3.47 $\pm$ 0.28 *
	10	第7日	5.83 $\pm$ 0.43 *	14.58 $\pm$ 0.45 *	4.69 $\pm$ 0.30 *
	5	第14日	6.55 $\pm$ 0.58 *	13.37 $\pm$ 0.62 *	3.96 $\pm$ 0.25 *
DU-四妙	15	第3日	6.99 $\pm$ 0.52 * Δ	13.33 $\pm$ 0.45 * Δ	3.50 $\pm$ 0.28 *
	10	第7日	8.10 $\pm$ 0.56 * Δ	12.56 $\pm$ 0.62 * Δ	4.74 $\pm$ 0.27 *
	5	第14日	8.92 $\pm$ 0.62 * Δ	11.13 $\pm$ 0.69 * Δ	4.00 $\pm$ 0.25 *

注:与 CU 组比较, * P < 0.05; 与 DU 组比较, ΔP < 0.05。

表5 各组大鼠创面组织中 β -catenin、GSK-3 β 、Rspo-3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	β -catenin mRNA	GSK-3 β mRNA	Rspo-3 mRNA
CU	15	第3日	6.92 $\pm$ 0.16	3.55 $\pm$ 0.32	3.93 $\pm$ 0.27
	10	第7日	7.12 $\pm$ 0.48	3.00 $\pm$ 0.28	5.32 $\pm$ 0.32
	5	第14日	9.24 $\pm$ 0.55	1.98 $\pm$ 0.19	4.43 $\pm$ 0.23
DU	15	第3日	4.40 $\pm$ 0.35 *	7.07 $\pm$ 0.29 *	2.40 $\pm$ 0.30 *
	10	第7日	5.20 $\pm$ 0.49 *	6.64 $\pm$ 0.47 *	3.19 $\pm$ 0.27 *
	5	第14日	6.06 $\pm$ 0.47 *	5.68 $\pm$ 0.46 *	2.73 $\pm$ 0.29 *
DU-四妙	15	第3日	5.76 $\pm$ 0.47 * Δ	5.43 $\pm$ 0.44 * Δ	2.56 $\pm$ 0.28 * Δ
	10	第7日	6.11 $\pm$ 0.48 * Δ	5.20 $\pm$ 0.49 * Δ	3.22 $\pm$ 0.32 * Δ
	5	第14日	6.87 $\pm$ 0.62 * Δ	4.50 $\pm$ 0.29 * Δ	2.82 $\pm$ 0.25 *

注:与 CU 组比较, * P < 0.05; 与 DU 组比较, ΔP < 0.05。

实 Rspo 蛋白能在受体水平激活经典 Wnt 信号通路,且 Rspo3 和 Rspo2 比 Rspo1 更有效,而 Rspo4 不是很活跃^[11,12]。

本实验发现,DU 组大鼠创面组织中 β -catenin 的表达低于 CU 组,这与研究发现的高浓度葡萄糖作用下细胞中 β -catenin 蛋白表达下降的结果相一致^[13]。有研究显示, β -catenin 信号通路与皮肤发育、创伤愈合关系密切,其表达增强可促进皮肤表皮细胞、角质细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞增殖、分化^[14]。本实验中,糖尿病溃疡大鼠创面组织中呈现出较少的纤维母细胞及毛细血管与其较低水平的 β -catenin 表达相一致。该实验检测大鼠创面组织中 GSK-3 β 表达,糖尿病组高于对照组,这与 GSK-3 β 作为 Wnt 信号通路负性调控因子的生理作用是相符的。Rspo 蛋白作为 Wnt 信号通路的激活因子,在本实验中发现其在糖尿病溃疡大鼠创面组织中呈现低表达,据此推测糖尿病溃疡中 Wnt 信号通路的下调有可能源自其对 Rspo 蛋白的调降作用。

本研究尚发现,应用四妙勇安汤干预后,大鼠创面组织中 β -catenin、Rspo 蛋白及 mRNA 水平均有所提高,GSK-3 β 蛋白及 mRNA 水平均有所下降,说明四妙勇安汤有可能通过对 Wnt/ β -catenin 通路进行干预而实现了对创面的促愈作用。但由于 DU-四妙组与 DU 组比较,Rspo 蛋白及 mRNA 的变化差异无统计学意义($P > 0.05$),故四妙勇安汤是否通过对 Rspo 蛋白进行调节进而干预 Wnt/ β -catenin 信号通路还有待进一步研究。

综上所述,笔者发现 Wnt/ β -catenin 通路的下调有可能导致了糖尿病溃疡的难愈,而四妙勇安汤也可能通过对 Wnt/ β -catenin 信号通路进行调节而促进了糖尿病溃疡的愈合,但其具体机制仍需进一步探索。

参 考 文 献

[1] Shakil S, Khan AU. Infected foot ulcers in male and female diabetic patients: a clinico-bioinforma-

tive study [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2010, 14(9): 2.

- [2] 余舰,程华刚,李航. 临床法医学损伤面积测量的图像处理方法[J]. 遵义医学院学报, 2007, 30(3): 422-424.
- [3] Dohmen A, Eder S, Euringer W, et al. Chronic critical limb ischemia [J]. Dtsch Arztebl Int, 2012, 109(6): 95-101.
- [4] 崔炎,吴建萍,李晓绿,等. 四妙勇安汤对糖尿病足坏疽患者 VEC、ET 和致炎细胞因子水平的影响[J]. 河南中医, 2009, 29(2): 151-152.
- [5] 黄金玮,常柏. 四妙勇安汤对 2 型糖尿病大鼠血管内皮细胞功能的影响[J]. 天津中医药, 2010, 27(6): 499-500.
- [6] 谢碧琛,李国利. Wnt 基因/Wnt 信号通路与乳腺癌[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(2): 125-129.
- [7] 孙晓磊,施森,何延政. 糖尿病创面难愈机制的研究进展[J]. 西南军医, 2008, 16(5): 92.
- [8] 韩昌鹏,姜文成,厉复伦. Wnt 信号通路与创面愈合[J]. 中国美容医学, 2012, 21(7): 1257.
- [9] 林常敏,李宇. β -连环蛋白在毛囊形态发生及毛囊干细胞增生分化的作用[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(4): 358-360.
- [10] 蒋忠军. 奥曲肽抑制 SW480 细胞 Wnt/ β -catenin 通路的关键靶点: GSK-3 β [D]. 湖南:南华大学, 2012.
- [11] Wei Q, Yokota C, Semenov MV, et al. R-spondin proteins a novel link to β -catenin activation [J]. Cell Cycle, 2006, 5(1): 23-26.
- [12] Kim KA, Wagle M, Tran K, et al. R-spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(6): 2588-2596.
- [13] 主父中印. 高葡萄糖高游离脂肪酸对皮肤成纤维细胞 β -catenin 表达影响的实验研究 [D]. 南京:南京医科大学, 2013.
- [14] Chen CH, Dixon RA, Ke LY, et al. Vascular progenitor cells in diabetes mellitus: roles of Wnt signaling and negatively charged low-density lipoprotein [J]. Cir Res, 2009, 104(9): 1038-1040.

(收稿:2015-05-23 修回:2016-10-09)