

消毒愈肌膏对糖尿病足患者创面肉芽组织 VEGF/SDF-1a/CXCR4 蛋白表达的影响

李 旗¹ 田福玲¹ 张文丽¹ 马慧芳² 关胜男³

摘要 **目的** 探讨消毒愈肌膏对糖尿病足患者创面肉芽组织血管内皮生长因子(VEGF)/基质细胞衍生因子 1a(SDF-1a)/趋化因子受体 4(CXCR4)蛋白表达的影响。**方法** 将 56 例糖尿病足患者依据 Wagner 分级法患者足部病变的范围及程度进行评价分为治疗组和对照组,治疗组 27 例,对照组 29 例。对照组采用进行基础治疗抗感染、控制血糖、抗凝、清创术、引流术等治疗;治疗组在对照组治疗的基础上外用消毒愈肌膏治疗,在治疗 8 周后观察创面愈合情况和应用免疫组织化学(S-P 法)与 Western blot 检测创面肉芽组织 VEGF/SDF-1a/CXCR4 含量和蛋白表达变化。**结果** 治疗后 2、4、8 周治疗组创面愈合率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后 8 周创面肉芽组织 VEGF/SDF-1a / CXCR4 含量(IOD 值)比较,及创面肉芽组织 VEGF/SDF-1a / CXCR4 蛋白表达比值比较,对照组均明显低于治疗组($P < 0.05$)。**结论** 消毒愈肌膏治疗作用可能与促进 VEGF、SDF-1a 及 CXCR4 蛋白表达有关,从而促进新血管生成,加快创面愈合。

关键词 消毒愈肌膏;糖尿病足;血管内皮生长因子/基质细胞衍生因子 1a/趋化因子受体 4

Effects of Xiaodu Yuji Paste on Protein Expressions of VEGF/SDF-1a/CXCR4 in Granulation Tissue of Diabetic Foot Patients LI Qi¹, TIAN Fu-ling¹, ZHANG Wen-li¹, MA Hui-fang², and GUAN Sheng-nan³ 1 North China University of Science and Technology, Hebei Provincial Key Pharmacological Analysis Lab for TCM Preventing and Treating Diabetes, Hebei (063000); 2 People's Hospital of Qianxi County, Hebei (064300); 3 Maternal and Child Health Care of Qianxi County, Hebei (064300)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Xiaodu Yuji Paste (XYP) on protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF)/stromal cell derived factor 1a (SDF-1a)/chemokine receptor 4 (CXCR4) in granulation tissue of diabetic foot patients. **Methods** Totally 56 patients with diabetic foot were assigned to the control group (29 cases) and the treatment group (27 cases) according to Wagner grading method (the range and the degree of foot lesion). Patients in the control group received basic treatment (anti-inflammation, blood glucose control, anti-coagulation, debridement, drainage, and so on) for 8 weeks. Patients in the treatment group additionally received XYP for 8 weeks. The wound healing was observed. Contents and protein expressions of VEGF/SDF-1a/CXCR4 were detected using SP method and Western blot. **Results** The wound healing rates after 2, 4, 8 weeks of treatment were significantly higher in the treatment group than in the control group (all $P < 0.05$). Contents and protein expressions of VEGF/SDF-1a/CXCR4 protein expression at week 8 after treatment were all significantly higher in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The therapeutic effect of XYP might be associated with promoting expressions of VEGF/SDF-1a/CXCR4, thus promoting angiogenesis and facilitating wound healing.

KEYWORDS Xiaodu Yuji Paste; diabetic foot; vascular endothelial growth factor (VEGF)/stromal cell derived factor 1a (SDF-1a)/chemokine receptor 4 (CXCR4)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81303046);河北省中医药管理局科研计划项目(No. 2015163)

作者单位:1.华北理工大学 河北省中医药防治糖尿病病理分析重点实验室,唐山市中药药理重点实验室(河北 063000);2.河北省迁西县人民医院(河北 064300);3.河北省迁西县妇幼保健院(河北 064300)

通讯作者:田福玲, Tel: 15133969378, E-mail: liqi19801211@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2017. 02. 0165

糖尿病足是糖尿病并发症之一,其创面的难以愈合成为医学者关注的问题^[1,2]。周围血管的破坏,新生血管的再生困难是创面的难以愈合因素之一,本研究通过消毒愈肌膏对糖尿病足患者创面肉芽组织的干预,观察与周围血管重塑相关的血管内皮生长因子(VEGF)/基质细胞衍生因子 1a(SDF-1a)/趋化因子受体 4(CXCR4)蛋白表达变化,探讨消毒愈肌膏防治糖尿病足作用机制。

资料与方法

1 诊断标准 符合美国糖尿病协会糖尿病防治指南(2010 版)制定的糖尿病足(肢端坏疽)检查方法及诊断标准^[3]。

2 纳入标准 (1)符合诊断标准;(2)年龄 40~90 岁;(3)糖尿病病程 5~20 年,溃疡(坏疽)病程 1~10 年;(4)Wagner 分级 I~III 级^[4](I 级:肢端皮肤有开放性病灶。水泡、血泡、鸡眼或冻伤、烫伤级其他皮肤操作所引起的皮肤浅表溃疡,但病灶尚未波及深部组织。II 级:感染病灶以侵犯深部肌肉组织。常有蜂窝织炎、多发性脓灶及窦道形成或感染沿肌间隙扩大造成足底背贯通性溃疡,脓性分泌物较多,但肌腱韧带尚未破坏。III 级:肌腱韧带组织破坏,蜂窝织炎融合形成大脓腔,脓性分泌物及坏死组织增多,但骨质破坏尚不明显);(5)所有治疗措施和处理均告知患者及其家属并签署知情同意书。

3 排除标准 若入院后肢体完全坏死,需要截肢者或不能按规定治疗者。

4 一般资料 56 例均为 2012 年 7 月—2015 年 7 月华北理工大学附属医院内分泌科收治的糖尿病足患者,均符合纳入标准及 Wagner 分级^[4]法。依据 Wagner 分级将患者足部病变的范围及程度进行评价并分为治疗组和对照组。治疗组 27 例,男性 15 例,女性 12 例,年龄 45~85 岁,平均(65.15±18.94)岁,糖尿病病程 8~20 年,平均(14.35±6.74)年,溃疡(坏疽)病程 2~6 年,平均(4.66±2.25)年,Wagner 分级 I、II、III 级分别为 8、12、7 例;对照组 29 例,男性 15 例,女性 14 例,年龄 40~79 岁,平均(61.37±16.77)岁,糖尿病病程 10~18 年,平均(15.95±4.37)年,溃疡(坏疽)病程 2~7 年,平均(4.61±2.79)年,Wagner 分级 I、II、III 级分别为 9、14、6 例。

5 治疗方法 对照组:根据致敏特性选择抗生素治疗;依据临床症状给予清创术、引流术等治疗;胰岛

素强化治疗控制血糖;前列腺素 E1 扩血管,肝素抗凝和降脂治疗,观察 8 周。治疗组:除应用对照组治疗方法外,于患处外敷消毒愈肌膏[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 等按比例混合,分别制成浓度为 200 mg/mL 制备成药膏。制备内容详见消毒愈肌膏(发明专利号:201310535598.X)],无菌纱布包扎,每天换药 1 次。观察 8 周。

6 观察指标及检测方法

6.1 创面的愈合率 足背创面拍照,应用软件测算创面面积,计算创面愈合率。愈合率(%)=(1-当前测量面积)/原始创面面积×100%。并对治疗后 2、4、8 周创面的愈合率进行分析。

6.2 足背动脉彩超变化 足背动脉采用恩普彩超 EMP-3000 彩色多普勒超声,探头频率 10 MHz,患者取仰卧位,足背然伸直,声束与血流夹角<60°,观察足背动脉收缩期峰值流速(V_{max}),舒张末期流速(V_r),阻力指数(RI)等,血管内径测量选择双踝连线中点处,计算机分析显示各参数。

6.3 创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 含量检测 采用免疫组织化学(S-P 法)染色,石蜡包埋、切片、脱蜡、脱水、PBS 洗涂(1 min×3 次)、滴加 VEGF/SDF-1a / CXCR4-抗(浓度 1:25)过夜,孵育,PBS 洗涂等免疫组织化学(S-P 法)按照试剂盒说明书操作。光镜下棕黄色或棕褐色颗粒判定为阳性细胞。采用 Image-pro plus 6.0 软件进行测量、分析图中累积光密度值。

6.4 创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 蛋白表达 采用 Western blot 检测。将创面肉芽组织细胞裂解,离心提取组织总蛋白,取蛋白,上样到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳、电转,将硝酸纤维素膜(NC)孵育兔来源 VEGF、SDF-1a 及 CXCR4 第一抗体,4℃过夜。DBS 液清洗,孵育山羊抗兔第二抗体,CL 染色,胶片显影、定影。胶片扫描后,使用 Image J 软件处理条带灰度值。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本和配对样本 *t* 检验,计数资料采用例数表示, χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组创面愈合率比较(表 1) 治疗后 2、4、8 周治疗组创面愈合率明显高于对照组,均有差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 两组创面愈合率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	愈合率		
		2 周	4 周	8 周
对照	29	16.12 ± 2.45	28.30 ± 3.55	51.44 ± 2.57
治疗	27	22.33 ± 2.19*	38.42 ± 2.96*	63.51 ± 4.34*

注: 与对照组同期比较, *P < 0.05

2 两组足背动脉超声测量参数及血供变化比较 (表 2) 两组治疗后 Vmax 增加, RI 减少和血供增加, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 治疗后治疗组较对照组 Vmax 增加, RI 减少和血供增加更明显 (P < 0.05)。

3 两组创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 含量比较 (表 3) 对照组治疗后 8 周创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 含量 (IOD 值) 比较, 对照组明显低于治疗组 (P < 0.05)。

4 两组创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 蛋白表达比较 (表 4、图 1) 治疗后 8 周创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 蛋白表达比值比较, 对照组明显低于治疗组 (P < 0.05)。

表 4 两组创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4/β-actin 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF/ β-actin	SDF-1a/ β-actin	CXCR4/ β-actin
对照	29	0.702 ± 0.144	0.254 ± 0.089	0.864 ± 0.184
治疗	27	1.152 ± 0.210*	0.429 ± 0.133*	1.760 ± 0.294*

注: 与对照组比较, *P < 0.05

5 两组创面愈合率比较 治疗期后的第 1、2、3 个月治疗组创面愈合率分别为 (64.95 ± 5.74)%、(65.74 ± 4.29)%、(61.88 ± 3.41)%、对照组创面愈合率分别为 (56.84 ± 3.87)%、(52.33 ± 4.28)%、(48.79 ± 3.67)%、治疗组明显高于对照组,

表 2 两组治疗前后足背动脉超声测量参数及血供变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Vmax (cm/s)		Vr (cm/s)		RI		血供 (μL/S)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照	29	20.11 ± 5.35	25.47 ± 6.81*	8.67 ± 2.67	8.85 ± 3.67	0.98 ± 0.04	0.82 ± 0.03*	498 ± 52.68	725 ± 63.84*
治疗	27	21.87 ± 6.74	30.22 ± 4.63* ^Δ	9.02 ± 3.38	8.59 ± 4.01	0.94 ± 0.05	0.73 ± 0.03* ^Δ	509 ± 60.44	871 ± 59.41* ^Δ

注: 与本组治疗前比较, *P < 0.05; 与对照组治疗后比较, ^ΔP < 0.05

表 3 两组治疗 8 周后创面肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 含量比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF	SDF-1a	CXCR4
对照	29	4 205.84 ± 174.35	2 984.75 ± 245.37	8 394.27 ± 165.81
治疗	27	8 175.11 ± 230.17*	5 397.12 ± 187.66*	14 520.38 ± 304.94*

注: 与对照组比较, *P < 0.05

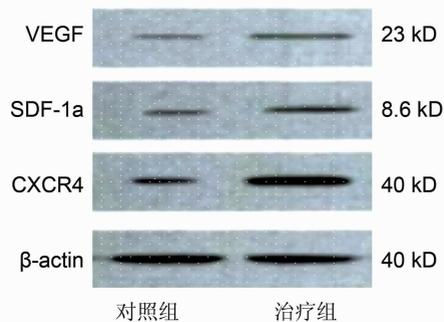


图 1 两组创面愈合过程中肉芽组织 VEGF、SDF-1a、CXCR4 蛋白表达

差异均有统计学意义 (P < 0.05); 在 3 个月的远期观察中, 前 2 个月两组患者创面愈合率保持相对的稳定性; 但第 3 个月, 对照组有 5 例, 治疗组有 1 例, 创面愈合率有所下降。

讨 论

据文献记载诸多因素可影响糖尿病足溃疡组织愈合^[5-7], 周围微血管病成为重要因素之一, 肌体富含高葡萄糖促成正常血管难度加大, 使得创面新生血管不足^[8], 而维持皮肤具有异二聚体复合物特性的 HIF-1 高表达, 可改善创面微环境, 促进新血管生成, 加快创面愈合^[9-11]。血管内皮生长因子/基质细胞衍生因子 1a/趋化因子受体 4 是 HIF-1 靶基因, 三者互相影响, 促进血管内皮细胞增生, 趋化内皮细胞和增加血管通透性, 促进内皮祖细胞 (EPCs) 动员、定向归巢到新生血管部位, 同时诱导 EPCs 分化为成熟内皮细胞, 形成血管网络结构。糖尿病小鼠创面愈合过程中 HIF-1a 及其靶基因 VEGF、VEGFR2、SDF-1a 及 CXCR4 总体表达水平降低, 导致血管形成不足, 可能是糖尿病创面愈合延迟的原因之一。

本研究中应用的消毒愈肌膏依据与糖尿病足病理

特点,由黄连、黄柏、白芷、甘草、当归等 10 余味药物组成,具有解毒消肿、生肌止痛作用。在以往的研究显示消毒愈肌膏通过对白介素家族中多成员(尤其是 IL-16、IL-18、IL-24)与 CNTF、IGF、GDFS 等基因表达上调,促进机体对免疫应答的辅助和调节作用增强,控制糖尿病足溃疡的感染,同时诱导成骨,促进骨胶原生成、骨痂的形成和再塑,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,促进肉芽组织增生以及溃疡创面愈合^[12-14]。本研究表明外用消毒愈肌膏可以提高糖尿病足溃疡创面愈合率,使足背动脉 Vmax 增加,RI 减少和血供增加,消毒愈肌膏治疗作用可能与促进 VEGF、SDF-1a 及 CXCR4 蛋白表达,从而促进新血管生成,加快创面愈合。但在防治糖尿病足过程中,中药消毒愈肌膏对糖尿病足创面肉芽组织的 HIF-1a 信号系统的调节作用仍需要相关实验来阐明。

参 考 文 献

- [1] 郭勇英,孙颖,位庚,等. 中西医结合干细胞移植治疗糖尿病足的临床研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1454-1457.
- [2] 张磊,王丽翔,闫少庆,等. 整体清法治疗糖尿病足筋疽溃疡的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(11): 3670-3672.
- [3] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2010 [J]. Diabetes Care, 2010, 33(3): 692.
- [4] New JP, Mcpowell E, Burns E, et al. Problem of amputations in patients with newly diagnosed diabetes[J]. Diabetic Med, 1998, 15(9): 760-764.
- [5] Bermudez DM, Herdrich BJ, Xu J, et al. Impaired biomechanical properties of diabetic skin implication in pathogenesis of diabetic skin [J]. Am J Pathol, 2011, 178(5): 2215-2223.
- [6] Deveci M, Gilmont RR, Dunham WR, et al. Glutathione enhances fibroblasts collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycemic culture [J]. Br J Dermatol, 2005, 152(2): 217-224.
- [7] Liu L, Marti GP, Wei X, et al. Age-dependent impairment of HIF-1alpha in diabetic mice; correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells [J]. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 319-327.
- [8] Teixeira AS, Andrade SR. Glucose-induced inhibition of angiogenesis in the rat sponge granuloma is prevented by amino guanidine [J]. Life Sci, 1999, 64(8): 655-662.
- [9] Sarkar K, Fox-Talbot K, Steenberg C, et al. Adenoviral transfer of HIF-1alpha enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(44): 18769-18774.
- [10] Patel TH, Kimura H, Weiss CR, et al. Constitutively active HIF-1alpha improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia [J]. Cardiovasc Res, 2005, 68(1): 144-154.
- [11] 景丽峰. PI3K/Akt-HIF-1 信号系统在糖尿病创面愈合过程中的表达及其意义[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [12] 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.
- [13] 郑德松,李旗,田福玲,等. 消毒愈肌膏对大鼠糖尿病足溃疡组织 BMP-9、TGF- β_1 表达的影响[J]. 环球中医药, 2013, 6(7): 485-487.
- [14] 李旗,田福玲,李继安. 消毒愈肌液对大鼠糖尿病足的抗菌活性[J]. 中医杂志, 2013, 54(17): 1501-1503.
(收稿:2016-05-17 修回:2016-11-15)