

· 基础研究 ·

薯蓣丸联合龙血竭胶囊对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠创面愈合的影响

米 婷^{1,2} 喻 嵘¹ 苏丽清¹ 邹晓玲¹ 刘 秀¹ 吴勇军¹

摘要 目的 通过薯蓣丸联合龙血竭胶囊对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠创面进行干预,探讨薯蓣丸联合龙血竭胶囊对糖尿病创面愈合的影响。**方法** 选取 8 周龄 MKR 小鼠 80 只,雌雄各半,按照小鼠的空腹血糖情况及体重随机分为 5 组:模型组、薯蓣丸 + 龙血竭组[薯蓣丸提取液(37.2 g/kg·d)]、薯蓣丸组、龙血竭组、二甲双胍组,每组 16 只小鼠。另设 16 只 C57/BL6 小鼠作为正常组。制造全层皮肤缺损的创面模型后分别给药 14 天,观察空腹血糖、创面愈合率、病理形态结构、晚期糖基化终末产物(AGE)及 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)含量。**结果** 与模型组比较,给药 14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组空腹血糖降低($P < 0.01$);给药 3、7、10、14 天时各给药组创面愈合率升高($P < 0.01$)。与二甲双胍组比较,给药 3、7、10、14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组创面愈合率升高($P < 0.01$)。给药 7 天后,薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组、龙血竭组 HE 染色可见成纤维细胞,与模型组比较炎性细胞浸润减少;给药 14 天后,薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组、龙血竭组无明显炎性增生,炎症细胞较用药 7 天时明显减少。与模型组比较,给药 7 天时二甲双胍组、薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组、薯蓣丸组 CD3⁺、CD4⁺ 百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),CD8⁺ 百分比降低($P < 0.01$);给药 14 天时,薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组及二甲双胍组 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高,薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 百分比降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 薯蓣丸联合龙血竭胶囊能促进糖尿病创面愈合,其机制可能与降低血糖、AGE,提高机体细胞免疫以及改善炎症反应有关。

关键词 薯蓣丸;龙血竭胶囊;MKR 小鼠;创面愈合

Effect of Shuyu Pill Combined Longxuejie Capsules on Wound Healing in MKR Type 2 Diabetic Mice MI Ting^{1,2}, YU Rong¹, SU Li-qing¹, ZOU Xiao-ling¹, LIU Xiu¹, and WU Yong-jun¹ 1 College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha(410007); 2 Endocrinology Department, Shenzhen Luohu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen(518000)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Shuyu Pill and Longxuejie Capsules on wound healing in MKR type 2 diabetic mice. **Methods** Eighty MKR mice, including 40 males and 40 females, were recruited at 8 weeks of age. These mice were divided into 5 groups, i.e. the diabetic control group, Shuyu Pill + Longxuejie Capsules group, Shuyu Pill group, Longxuejie Capsules group, and Metformin group-by fasting blood sugar and weight, 16 in each group. Another 16 C57/BL6 mice were recruited as the normal healing group. After building wound models of full-thickness skin loss, all mice were administered for 14 days to observe their fasting blood sugar, wound healing rate, pathological structure, advanced glycation end (AGE) products, and T-cell subsets (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺). **Results**

Compared to the diabetic control group, the Shuyu Pill + Longxuejie Capsules group, Shuyu Pill group, and Metformin group exhibited a significant decrease in fasting blood sugar after 14 days of intervention ($P < 0.01$); on the 3rd, 7th, 10th, and 14th days, the 4 groups on medication showed improvement in their wound healing rates ($P < 0.01$). On the 3rd, 7th, 10th, and 14th days, the Shuyu Pill + Longxuejie

基金项目: 湖南省大学生研究性学习和创新性实验项目(No. 2014-204); 湖南省教育厅项目(No. 16CJ231)

作者单位: 1.湖南中医药大学中医学院(长沙 410007); 2.深圳市罗湖区中医院内分泌科(深圳 518000)

通讯作者: 吴勇军, Tel: 0731-88458219, E-mail: yuron@21cn.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190729.084

Capsules group revealed a wound healing rate higher than the Metformin group ($P < 0.01$). After 7 days of administration, hematoxylin-eosin stained fibroblasts were seen in the Shuyu Pill + Longxuejie Capsules group, Shuyu Pill group, Metformin group, and Longxuejie Capsules group, and these four groups had a smaller scale of inflammatory cell infiltration compared to the diabetic control group; when receiving medication for 14 days, no obvious inflammatory hyperplasia was detected in the Shuyu Pill + Longxuejie Capsules group, Shuyu Pill group, Metformin group, and Longxuejie Capsules group, and inflammatory cells were significantly reduced compared to the level on the 7th day of intervention. When the Metformin group, Shuyu Pill + Longxuejie Capsules group, Longxuejie Capsules group, and Shuyu Pill group had been given medication for 7 days, the $CD3^+$ and $CD4^+$ proportions and the $CD4^+/CD8^+$ ratio of the Shuyu Pill group were higher than those of the diabetic model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and yet, the Shuyu Pill group had a lower proportion of $CD8^+$ ($P < 0.01$); after 14 days of medication, the $CD4^+/CD8^+$ ratios of the Shuyu Pill + Longxuejie Capsules group, Longxuejie Capsules group, Shuyu Pill group, and Metformin group were increased at varied degrees while their $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ proportions were reduced significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion As a combined medication, Shuyu Pill and Longxuejie Capsules effectively promote wound healing in mouse models of type 2 diabetes, and the underlying mechanism is probably associated with the decline and fall of blood sugar and AGEs and the improvement in cell immunity and inflammatory reaction.

KEYWORDS Shuyu Pill; Longxuejie Capsules; MKR mice; wound healing

近年以来因创面因素入院的患者中糖尿病患者占据首位,已达 36%^[1],创面愈合延迟甚至不愈合是导致糖尿病患者致残或者截肢的主要原因。目前关于糖尿病创面的治疗是国内外创面研究的难题。薯蓣丸出自张仲景的《金匮要略·血痹虚劳病脉证并治第六》,以扶正祛邪、益卫实表为治法,可提高机体的非特异性免疫功能和细胞免疫功能^[2-5]。现代研究表明,薯蓣丸组方药物有降糖降脂作用,并可影响糖尿病发生发展过程中的多种病理机制^[6]。龙血竭具有散瘀止痛,止血生肌等作用,主治跌打扭损、内伤瘀痛;外伤出血不止,具有促进角质形成细胞的游走作用,促进表皮修复^[7,8]。本研究通过薯蓣丸联合龙血竭胶囊对创面进行干预,探讨薯蓣丸联合龙血竭对糖尿病创面愈合的影响。

材料与方法

1 动物 实验组为骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1 和胰岛素双受体功能缺失鼠(MKR 鼠)80 只,雌雄各半,18~20 g。MKR 鼠由美国国立卫生研究院(Dr.D.LeRoith)提供的 MKR 鼠(纯合子)经自然交配后繁殖的子代用于实验观察。对照组为 C57/BL6 小鼠 16 只,雌雄各半,18~20 g。MKR 鼠及 C57/BL6 鼠提供及饲养场地均为湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心。许可证号:SYXK(湘)2009-0001,动物伦理批准编号(No. 20160309)。饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按 SPF 级实验动物的要求进行制备与消毒。

2 试剂及仪器 末端全血葡萄糖试剂条(美国强生公司,批号:3376577);Anti-Mouse CD4 PE (eBioscience,批号:E01008-1638,美国);Anti-Mouse CD3 FITC (eBioscience,批号:E16591-104,美国);Anti-Mouse CD8a APC (eBioscience,批号:E07055-1636,美国);AGE (Abcam,批号:GR35536-1,英国);10%水合氯醛溶液,4%多聚甲醛(购自布兰哲生物公司)等。强生稳豪倍易血糖测试仪(美国强生公司);BD 流式仪(BD ARIA 2,美国);光学显微镜(BX43,日本 Olympus);Nikon 数码相机(Nikon D60,日本)。

3 药物 薯蓣丸方由薯蓣 30 g 当归 10 g 桂枝 10 g 神曲(麸炒)10 g 生地黄 10 g 大豆黄卷 10 g 甘草 28 g 人参 7 g 川芎 6 g 白芍 6 g 白术(麸炒)6 g 麦冬 6 g 杏仁(去皮、炒)6 g 阿胶 7 g 白薇 2 g 防风 6 g 干姜 3 g 桔梗 5 g 柴胡 5 g 茯苓 5 g,大枣 80 g 组成(汤剂制备:所有药物均购自于湖南中医药大学第一附属医院药房。中药汤剂制备:经水煎煮 2 次,混合过滤后,浓缩制备成含药浓度为 2 g 生药/mL 的药液,经灭菌后置于冰箱中 4℃ 保存备用)。龙血竭胶囊,0.3 g/粒,云南云河药业股份有限公司,批号:150305;盐酸二甲双胍片,0.25 g/片,浙江亚太药业股份有限公司,批号:1160961(药物均购自湖南中医院大学第一附属医院药房)。

4 分组、造模及干预方法 根据本次实验要求,选取 8 周龄 MKR 小鼠 80 只,雌雄各半,按照小鼠的

空腹血糖情况及体重分为 5 组:模型组、薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、龙血竭组、二甲双胍组,每组 16 只。另设 16 只 C57/BL6 小鼠作为正常组。MKR 小鼠组与 C57/BL6 小鼠组以普通饲料喂养。手术模型制备:用 10% 的水合氯醛麻醉剂,以 0.04 mL/10 g 的剂量给小鼠腹腔注射麻醉剂,待小鼠完全麻醉后,剔除小鼠背部周围的毛并消毒,在超净工作台中给小鼠施以创面制备:利用 1 cm × 1 cm 模板在小鼠背部标一记创面大小,无菌手术剪剪除背部正中全层皮肤,制造全层皮肤缺损的创面模型^[9]。术后予无菌纱布包裹好小鼠并放置独立笼中,造模过程中小鼠无死亡。造模后次日根据临床用量予以药物剂量换算,薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组予以薯蓣丸提取液[37.2 g/(kg · d)]灌胃,二甲双胍组予[0.18 g/(kg · d)]灌胃^[10],正常组、模型组和龙血竭组每日灌服等量生理盐水,小鼠灌胃容积为 0.4 mL/20 g。同时,薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组用生理盐水棉球清洁创面,碘酒消毒后给予龙血竭胶囊内容物加生理盐水配成 20% 的混悬液外用于创面(用药剂量参照《现代中药药理学》^[12]),每天换药 1 次;薯蓣丸组、二甲双胍组、正常组和模型组用生理盐水棉球清洁创面,碘酒消毒,每天换药 1 次。疗程共为 14 天。

5 动物处理方法 于创面制备后第 7、14 天,于灌胃 0.5 h 后每组根据随机数字表法取 8 只以心脏采血处死小鼠留取血样 0.7 ~ 1 mL,并在距离创缘 5 mm 的范围内切取标本,分别置 Ep 管中,于多聚甲醛中保存备用。

6 检测指标及方法

6.1 血糖检测 给药前及给药后 7、14 天测量小鼠空腹血糖。禁食不禁水 8 h 后,尾静脉采血,电化学法血糖仪检测。

6.2 创面愈合率 计算给药后 3、7、10、14 天创面愈合率,创面愈合过程中,因皮肤收缩,创面为不规则形,采用 Photoshop CC 2015 软件计算创面面积,创面愈合率(%) = (初始创面面积 - 未愈合创面面积)/初始创面面积 × 100%。

6.3 病理形态学检测 标本经甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,行 HE 染色及免疫组化,光镜下观察。

6.4 免疫功能检测 采用流式细胞法检测血中 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)含量。采用免疫组化法检测创面标本中晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)

件处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个总体均值比较,数据满足正态性,采用单因素方差分析及单因素重复测量方差分析;多个样本均数的两两比较,数据满足方差齐性检验采用 LSD 检验;若不满足方差齐性检验采用 Dunnett T3 检验。数据不满足正态性,采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠血糖水平比较(表 1) 与正常组比较,模型组给药前、给药 7、14 天血糖明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组血糖降低给药 7、14 天后血糖降低($P < 0.01$);与本组给药前比较,给药 7 天时正常对照组、模型组及龙血竭组血糖升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),给药 14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组血糖降低($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠血糖的水平比较 (mmol/L)

组别	n	给药前	给药 7 天	给药 14 天
正常	8	4.17 ± 0.50	5.38 ± 0.48 ^{▲▲}	4.17 ± 0.51
模型	8	9.13 ± 0.95 [*]	10.06 ± 0.79 ^{*▲}	9.09 ± 0.66 [*]
薯蓣丸 + 龙血竭	8	9.00 ± 0.64	9.15 ± 0.31 [△]	8.07 ± 0.37 ^{△▲▲}
龙血竭	8	9.06 ± 0.50	9.65 ± 0.29 ^{▲▲}	9.14 ± 0.32
薯蓣丸	8	9.03 ± 0.64	9.16 ± 0.40 [△]	8.15 ± 0.59 ^{△▲▲}
二甲双胍	8	9.01 ± 0.61	8.49 ± 0.44 [△]	6.84 ± 0.53 ^{△▲▲}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与同组给药前比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

2 各组小鼠创面愈合率比较(表 2,图 1) 与正常组比较,模型组给药 3、7、10、14 天创面愈合率明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组给药 3、7、10、14 天创面愈合率明显升高($P < 0.01$)。与二甲双胍组比较,薯蓣丸 + 龙血竭组给药 3 天、薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组及龙血竭组给药 7、10、14 天创面愈合率明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);同时给药 3、7 天时薯蓣丸 + 龙血竭组创面愈合率高于薯蓣丸组及龙血竭组($P < 0.01$)。

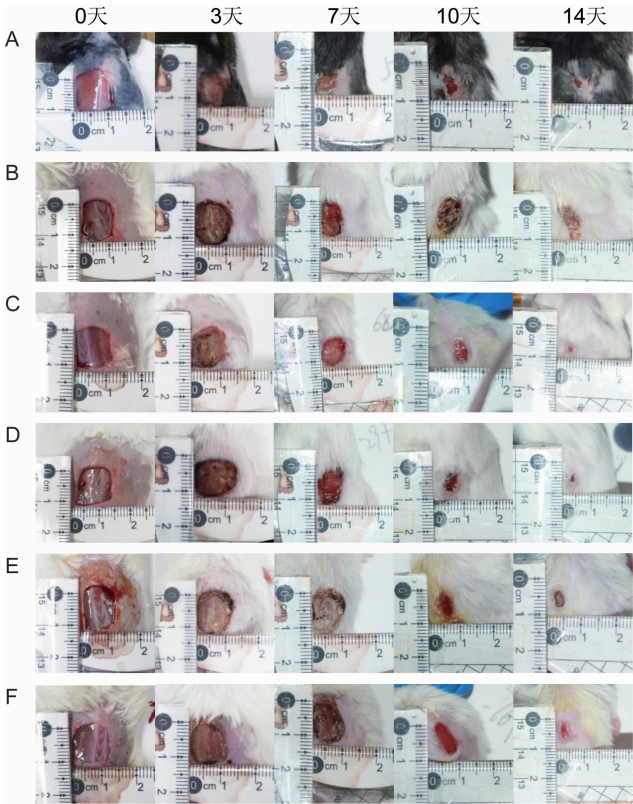
3 各组小鼠病理形态结构比较(图 2、3) 给药 7 天后各组均可见上皮炎性增生,血痂形成,炎性细胞浸润。模型组有大量的炎性细胞浸润;正常组可见较多成纤维细胞;与模型组比较其余各组炎性细胞浸润较少。用药 14 天后模型组部分上皮可见炎性增生,炎性细胞堆积,纤维排列紊乱;正常组上皮无明显变薄,纤维排列可;薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组、龙血竭组无明显炎性增生,炎症细胞较用药 7 天时明显减少;与薯蓣丸 + 龙血竭组比较,薯蓣丸组、龙血竭组炎症细胞较多。

7 统计学方法 数据采用 SPSS 22.0 统计软

表 2 各组小鼠不同时间创面愈合率的比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

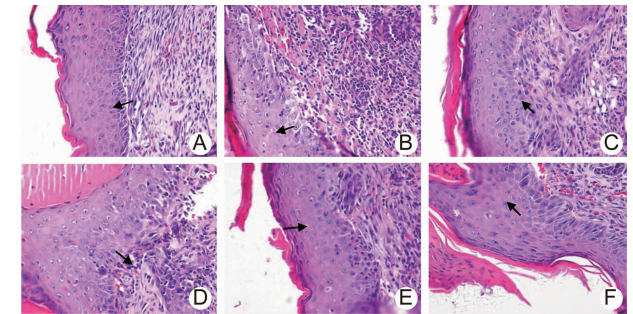
组别	n	给药 3 天	给药 7 天	给药 10 天	给药 14 天
正常	8	49.31 ± 4.84	67.43 ± 5.63	91.51 ± 6.30	97.85 ± 1.91
模型	8	4.38 ± 0.98 *	23.38 ± 3.61 *	57.08 ± 4.61 *	66.02 ± 5.15 *
薯蓣丸 + 龙血竭	8	18.23 ± 4.80 $\Delta\Delta\Delta$	57.26 ± 5.13 $\Delta\Delta\Delta$	85.86 ± 4.45 $\Delta\Delta\Delta$	97.26 ± 2.90 $\Delta\Delta\Delta$
龙血竭	8	11.26 ± 3.18 $\Delta\circ$	46.97 ± 5.58 $\Delta\Delta\Delta\circ$	82.37 ± 4.89 $\Delta\Delta$	96.42 ± 1.60 $\Delta\Delta\Delta$
薯蓣丸	8	10.20 ± 1.71 $\Delta\circ$	44.25 ± 3.98 $\Delta\Delta\Delta\circ$	83.06 ± 3.73 $\Delta\Delta\Delta$	94.60 ± 2.04 $\Delta\Delta\Delta$
二甲双胍	8	9.57 ± 2.49 Δ	36.05 ± 5.18 Δ	75.56 ± 6.43 Δ	89.42 ± 1.60 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与薯蓣丸 + 龙血竭组比较, $\circ P < 0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为薯蓣丸 + 龙血竭组;D 为龙血竭组;E 为薯蓣丸组;F 为二甲双胍组

图 1 各组小鼠不同时间创面图



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为薯蓣丸 + 龙血竭组;D 为龙血竭组;E 为薯蓣丸组;F 为二甲双胍组;箭头所指为典型变化处;下图同

图 2 各组小鼠给药 7 天时创面组织病理 (HE 染色, $\times 400$)

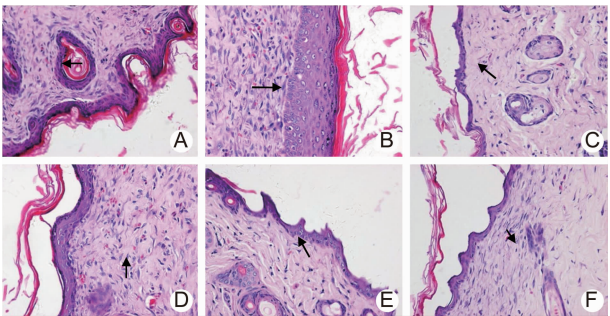


图 3 各组小鼠给药 14 天时创面组织病理 (HE 染色, $\times 400$)

4 各组创面 AGE 结果比较(表 3) 与正常组比较, 给药 7、14 天模型组创面 AGE 增多($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药 7、14 天薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组创面 AGE 减少($P < 0.01$)。与薯蓣丸 + 龙血竭组比较, 给药后第 14 天龙血竭组及薯蓣丸组创面 AGE 增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与给药 7 天比较, 模型组及各给药组创面 AGE 增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 各组创面 AGE 免疫组化图像分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药 7 天	给药 14 天
正常	6	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.04
模型	6	0.22 ± 0.02 *	0.39 ± 0.06 *●●
薯蓣丸 + 龙血竭	6	0.17 ± 0.03 Δ	0.24 ± 0.05 $\Delta\bullet$
龙血竭	6	0.21 ± 0.01 $\Delta\Delta\Delta\circ$	0.34 ± 0.04 $\Delta\Delta\Delta\circ\bullet\bullet$
薯蓣丸	6	0.18 ± 0.01 Δ	0.30 ± 0.03 $\Delta\Delta\Delta\circ\bullet\bullet$
二甲双胍	6	0.17 ± 0.02 Δ	0.23 ± 0.03 $\Delta\bullet\bullet$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与薯蓣丸 + 龙血竭组比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$;与本组给药 7 天比较, $\bullet P < 0.05$, $\bullet\bullet P < 0.01$

5 各组小鼠 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)含量比较(表 4) 与正常组比较, 给药 7、14 天时模型组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显升高($P < 0.01$);与模型组比较, 给药 7 天时, 二甲双胍组、薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血

表 4 各组小鼠不同时间 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺百分比及 CD4⁺/CD8⁺比值的比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	6	7 天	24.87 ± 2.81	14.66 ± 1.05	8.56 ± 2.01	1.77 ± 0.33
		14 天	22.83 ± 4.53	13.75 ± 2.69	7.88 ± 2.32	1.77 ± 0.17
模型	6	7 天	60.57 ± 1.53 [*]	47.41 ± 1.77 [*]	12.96 ± 0.18 [*]	3.66 ± 0.14 [*]
		14 天	73.63 ± 1.68 [*]	59.55 ± 2.07 [*]	11.37 ± 0.70 [*]	5.26 ± 0.37 [*]
薯蓣丸 + 龙血竭	6	7 天	71.91 ± 3.65 ^{△△}	61.50 ± 4.23 ^{△△▲▲}	9.92 ± 0.72 ^{△△▲▲}	6.24 ± 0.70 ^{△△▲▲}
		14 天	42.92 ± 6.71 ^{△△▲▲●●}	35.66 ± 5.84 ^{△△▲▲●●}	4.92 ± 0.97 ^{△△▲▲●●}	7.29 ± 0.36 ^{△△▲▲●●}
龙血竭	6	7 天	69.30 ± 4.18 ^{△△}	60.35 ± 3.38 ^{△△▲▲}	9.94 ± 0.59 ^{△△▲▲}	6.09 ± 0.63 ^{△△▲▲}
		14 天	63.23 ± 2.71 ^{△△○●}	52.09 ± 2.19 ^{△△○●●}	9.03 ± 0.81 ^{△△○}	5.80 ± 0.48 ^{△△○}
薯蓣丸	6	7 天	73.02 ± 6.39 ^{△△}	63.66 ± 3.69 ^{△△▲▲}	10.44 ± 0.46 ^{△△▲▲}	6.10 ± 0.31 ^{△△▲▲}
		14 天	40.73 ± 7.10 ^{△△●●}	31.50 ± 5.77 ^{△△●}	7.03 ± 1.48 ^{△△○●●}	4.50 ± 0.18 ^{△△▲▲○●●}
二甲双胍	6	7 天	68.91 ± 0.89 ^{△△}	54.24 ± 2.23 ^{△△}	11.92 ± 1.12	4.58 ± 0.50 ^{△△}
		14 天	58.13 ± 5.79 ^{△△}	48.67 ± 5.37 ^{△△}	8.37 ± 0.50 ^{△△●}	5.83 ± 0.68 [△]

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与二甲双胍组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与薯蓣丸 + 龙血竭组比较,[○] $P < 0.01$;与本组给药 7 天时比较,[●] $P < 0.05$,^{●●} $P < 0.01$

竭组、薯蓣丸组 CD3⁺、CD4⁺百分比及 CD4⁺/CD8⁺比值升高($P < 0.01$, $P < 0.05$), CD8⁺百分比降低($P < 0.01$);给药 14 天时,薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组及二甲双胍组 CD4⁺/CD8⁺比值升高,薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺百分比降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与二甲双胍组比较,给药 7 天时薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组、薯蓣丸组 CD4⁺百分比及 CD4⁺/CD8⁺比值升高,CD8⁺百分比下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);给药 14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺百分比下降,CD4⁺/CD8⁺比值升高($P < 0.01$)。与薯蓣丸 + 龙血竭组比较,给药 14 天时龙血竭组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺百分比升高,CD4⁺/CD8⁺比值降低($P < 0.01$),薯蓣丸组 CD8⁺百分比升高,CD4⁺/CD8⁺比值降低($P < 0.01$)。与本组给药 7 天时比较,给药 14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组、龙血竭组、薯蓣丸组 CD3⁺、CD4⁺百分比下降,薯蓣丸 + 龙血竭组 CD8⁺百分比下降,CD4⁺/CD8⁺比值升高,薯蓣丸组 CD8⁺百分比及 CD4⁺/CD8⁺比值下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

MKR 小鼠是骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1 和胰岛素双受体功能缺失鼠,利用组织特异性基因敲除技术敲除 2 型糖尿病的候选基因的转基因 2 型糖尿病小鼠模型,该小鼠由喻嵘教授的国外合作者 Dr.Derek LeRoith 与 Dr.Jun-Li Liu 提供。MKR 小鼠在出生后 5 周左右即可表现为明显的肝脏、肌肉、脂肪组织的胰岛素抵抗,胰岛 β 细胞功能紊乱,高血糖以及甘油三酯、游离脂肪酸的脂代谢紊乱等,且 MKR 小鼠具有成模快、存活率高、应用简单的特点,是研究 2 型糖

尿病及其并发症的良好模型^[12]。模型组与正常组比较创面愈合率低,血糖高($P < 0.01$),提示糖尿病创面模型造模成功。

慢性皮肤溃疡主要病机为久病正虚,气血瘀滞,营卫不畅,肌肤失养,复染邪毒所致。本虚标实,内先虚,瘀为本,腐为标,后外溃。阙华发^[13]认为正虚则无力推动血行,使气血运行稽迟,瘀血内生,或停留于局部而为瘀;而气血瘀阻经络,可妨碍气血的运行,阻碍气血生化之机,以致新血不生,正气无由恢复,则正气耗损益剧。虚、瘀二者两者互为因果,使疮面难以得到精气津血的濡养滋润,修复不能进行,如此,脓腐不尽,新肌不生,疮面久不愈合。总之,糖尿病溃疡病因比较复杂,先天禀赋不足、饮食不节,嗜食肥甘厚味、情志失调、外伤等均可导致,本病的基本病机为本虚标实,本虚以气血阴阳五脏之虚为主,标实则为瘀血、湿热、气滞、浊毒等。薯蓣丸以扶正祛邪、益卫实表为治法;龙血竭具有散瘀止痛,止血生肌等作用,主治跌打扭损、内伤瘀痛;外伤出血不止,二药合用可补虚祛邪。薯蓣丸具有降糖降脂的作用,对胰岛素抵抗、氧化应激、慢性炎症、细胞凋亡等与糖尿病及并发症相关的多种病理机制有影响^[6]。山药多糖、茯苓多糖具有有效调节糖尿病小鼠糖脂代谢紊乱的作用,其中茯苓多糖具有促进淋巴细胞增殖,调节细胞因子分泌,增强巨噬细胞吞噬功能,从而增强免疫功能的作用^[6,14,15]。龙血竭能降低 C 反应蛋白水平,有效减轻糖尿病足溃疡疼痛,促进破溃皮肤生长及创面愈合^[16]。

创面愈合包括炎症期、增殖期、塑型期,是一个复杂的过程。炎症反应是创面愈合的起始环节。糖尿病创面愈合过程中早期炎症反应低下,炎症持续时间较

久^[13]。糖尿病大鼠与正常大鼠比较,糖尿病大鼠创面内以中性粒细胞为主,巨噬细胞出现晚、数量少;降低血糖、改善局部组织高糖环境可促进糖尿病创面愈合^[17]。AGE 可抑制表皮角质形成细胞增殖,诱导皮肤成纤维细胞凋亡,是导致创面难以愈合的重要机制之一^[18]。付小兵^[19]认为糖尿病并发的免疫防御缺陷造成细胞免疫反应和单核细胞功能下降导致糖尿病创面易并发感染,是造成创面愈合迟缓重要原因。2 型糖尿病患者高血糖状态时,CD8⁺ 细胞升高,CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值下降,机体免疫功能下降^[20]。CD8⁺ 相对增多,对 CD4⁺ 细胞的抑制作用增强,抑制机体的免疫功能,导致机体容易并发感染。本实验中,模型组与各用药组比较创面愈合率降低,用药 10 天后正常组创面基本愈合,给药 14 天后薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、龙血竭组与二甲双胍组比较创面愈合率高。模型组 7 天时 HE 染色可见较多炎性细胞浸润,14 天时仍有较多炎症细胞,纤维排列紊乱。药物干预后,在 14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、龙血竭组无明显炎性增生,炎症细胞较用药 7 天时明显减少。给药 7、14 天时薯蓣丸 + 龙血竭组、薯蓣丸组、二甲双胍组 AGE 较模型组降低。给药 14 天时与二甲双胍组比较,薯蓣丸 + 龙血竭组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 百分比降低;与薯蓣丸 + 龙血竭组比较,龙血竭组、薯蓣丸组 CD8⁺ 百分比升高,CD4/CD8 比值降低。实验结果提示薯蓣丸 + 龙血竭可提高糖尿病小鼠的细胞免疫,减轻创面愈合后期持续的炎症反应,减少创面 AGE 堆积。薯蓣丸 + 龙血竭组与龙血竭组、薯蓣丸组比较,其创面愈合率高,提示二药联用,更能促进糖尿病创面愈合。

本研究发现薯蓣丸联合龙血竭胶囊能促进糖尿病创面愈合,其机制可能与降低血糖、减少创面 AGE 堆积、提高机体细胞免疫以及改善炎症反应有关。

利益冲突:无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Jiang Y, Huang S, Fu X, et al. Epidemiology of chronic cutaneous wounds in China[J]. Wound Repair Regen, 2011, 19(2): 181-188.
- [2] 王秉隆, 陈涛, 张佩玲. 薯蓣丸的临床研究与应用概述[J]. 社区医学杂志, 2015, 13(11): 32-34.

- [3] 冯莎, 李慧明. 薯蓣丸的临床应用与研究概述[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(9): 699-701.
- [4] 黄腾炜, 洪蕾. 薯蓣丸抗 I 型变态反应作用及其机理研究[J]. 实用中医药杂志, 2016, 32(9): 852-854.
- [5] 向阳, 王寅, 李宁. 经方薯蓣丸对变应性鼻炎大鼠模型的干预作用[J]. 吉林中医药, 2014, 34(6): 620-623.
- [6] 苏丽清, 喻嵘, 吴勇军, 等. 薯蓣丸在糖尿病治疗中的应用思考[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 10-12.
- [7] 杨晓宇, 姚琳. 龙血竭的药理作用及临床应用[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(2): 265-266.
- [8] 王晓丹, 滕玉芳, 郝吉福, 等. 不同来源血竭的研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1752-1756.
- [9] 彭程. 小鼠角质细胞生长因子缺失对创面愈合的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [10] 贺石林主编. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2013: 48-49.
- [11] 王本祥主编. 现代中药药理学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1997: 930-931.
- [12] 喻嵘, 成细华, 胡伟, 等. MKR 转基因小鼠糖尿病发病特点的初步探讨[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(5): 333-337.
- [13] 阙华发. 慢性下肢溃疡的中医诊治[J]. 世界中医药, 2013, 8(2): 148-151.
- [14] 李新萍, 周书琦, 徐丽丽, 等. 山药多糖的提取及其对糖尿病小鼠的影响研究[J]. 黑龙江医药, 2018, 31(1): 20-22.
- [15] 吴科锐, 韩凌. 羧甲基茯苓多糖药理作用研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(3): 744-747.
- [16] 孙家均. 中药龙血竭外用对糖尿病足溃疡的疗效与 C 反应蛋白的关系[J]. 糖尿病新世界, 2016, 19(20): 28-29.
- [17] 刘博, 于春江, 孟祥宝, 等. 芪蛭降糖胶囊对 2 型糖尿病大鼠皮肤创面愈合的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 118-123.
- [18] 劳国娟, 任萌, 黄燕瑞, 等. 糖尿病足伤口皮肤细胞凋亡情况及 AGE 对人皮肤成纤维细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1351-1356.
- [19] 付小兵主编. 糖尿病病足及其相关慢性难愈合创面的处理[M]. 第 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2013: 33-42.
- [20] 曾维伟, 胡玲. 2 型糖尿病与 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的相关性研究[J]. 实用临床医学, 2014, 15(9): 136-138.

(收稿: 2017-11-28 在线: 2019-09-06)

责任编辑: 汤 静