

· 基础研究 ·

祛瘀生肌方含药血清对人真皮微血管内皮细胞
迁移和 PGT 相关因子的影响卢 怡¹ 丁晓杰¹ 祁 菲² 陈 曦¹ 蒯 仿¹ 周 蜜¹
李 苏¹ 杨滢瑶¹ 茹 意¹ 李福伦¹ 连 侃¹

摘要 **目的** 探讨祛瘀生肌方对人真皮微血管内皮细胞(HDMECs)迁移能力影响和前列腺素转运蛋白(PGT)相关因子的作用机制。**方法** 将 HDMECs 细胞分为 5 组。低糖空白组(A 组):细胞中加 5mmol/L 葡萄糖+10%空白血清;高糖空白组(B 组):细胞中加 25mmol/L 葡萄糖+10%空白血清;生肌药组(C 组):细胞中加 25mmol/L 葡萄糖+10%生肌药含药血清;化瘀药组(D 组):细胞中加 25mmol/L 葡萄糖+10%化瘀药含药血清;生肌化瘀药组(E 组):细胞中加 25mmol/L 葡萄糖+10%生肌化瘀药含药血清。采用 Transwell、划痕实验、ELISA、Western Blot 检测含药血清干预后 HDMECs 的迁移能力和 PGT 相关因子的表达。**结果** Transwell 结果示:与 B 组比较,C、D、E 组的细胞迁移能力明显升高($P<0.05$)。划痕实验 0、12、24 h 显示,D 组未愈合面积进一步缩小($P<0.05$)。ELISA 结果示 C、D、E 组的前列腺素 E_2 (PGE_2)含量均有所增加,其中 D 组的 PGE_2 含量最接近低 A 组。Western Blot 结果示:与 B 组比较,给药后 C、D、E 组 PGT 含量均显著降低($P<0.05$),细胞内皮生长因子(VEGF)分泌量均显著增加($P<0.05$),D 组增加量最为显著($P<0.01$)。**结论** 祛瘀生肌方含药血清可提高 HDMECs 迁移能力,促进 HDMECs 分泌 PGE_2 、VEGF,并降低 PGT 含量。

关键词 祛瘀生肌方;糖尿病性溃疡;人真皮微血管内皮细胞;前列腺素转运蛋白;前列腺素 E_2 ;血管内皮生长因子;迁移能力

Effects of Quyu Shengji Formula Containing Serum on the Migration of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells and Expressions of PGT-related Factors LU Yi¹, DING Xiao-jie¹, QI Fei², CHEN Xi¹, KUAI Le¹, ZHOU Mi¹, LI Su¹, YANG Ying-yao¹, RU Yi¹, LI Fu-lun¹, and ZE Kan¹ 1 Department of Dermatology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine; Institute of Dermatology, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200437); 2 Department of Vascular, Shanghai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200082)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects and the mechanism of Quyu Shengji Formula (QYSJF) on the migration of human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) and expressions of prostaglandin transporter (PGT)-related factors. **Methods** HDMECs were divided into 5 groups: low glucose blank group (A) [by adding 5 mmol/L glucose+10% vehicle serum], high glucose blank group (B) [by adding 25 mmol/L glucose+10% vehicle serum], Shengji Formula group (C) [by adding 25 mmol/L glucose+10% Shengji Formula containing serum], Quyu Formula group (D) [by adding 25 mmol/L

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No.81704085;No.81904214;No.81673886);国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2018YFC1705301);上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(No.ZY(2018-2020)-FWTX-4010);2019 上海中医药大学研究生“研究生创新培养”专项科研项目(No.Y2019027)

作者单位:1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院皮肤科 上海市中医药研究院皮肤病研究所(上海 200437);2.上海中医药大学附属中西医结合医院脉管科(上海 200082)

通讯作者:连 侃, Tel: 021-65161782, E-mail: zekan1@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20200325.134

L glucose+10% Quyu Formula containing serum], QYSJF group [by adding 25 mmol/L glucose+10% QYSJF containing serum]. Effects of serum containing QYSJF on the migration ability of HDMECs and the expressions of PGT-related factors were detected by Transwell experiment, scratch test, ELISA, and Western Blot. **Results** Transwell results showed that compared with Group B, the cell migration ability significantly increased in Group C, D, and E ($P<0.05$). The scratch test at 0, 12, and 24 h showed that the unhealed area in Group D was further reduced ($P<0.05$). ELISA results showed that the content of PGE_2 increased in Group C, D, and E. Of them, PGE_2 content in Group D was the closest to Group A. Western Blot results showed that the PGT content was significantly lower after administration in Group C, D, and E, as compared with Group B ($P<0.05$). Compared with Group B, the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) increased significantly after administration in Group C, D, and E ($P<0.05$), and the increase was the most significant in Group D ($P<0.01$). **Conclusion** QYSJF containing serum improved the migration ability of HDMECs, promoted its secretions of PGE_2 and VEGF, and decreased the content of PGT.

KEYWORDS Quyu Shengji Formula; diabetic ulcer; human dermal microvascular endothelial cell; prostaglandin transporter; prostaglandin E_2 ; vascular endothelial growth factor; migration ability

糖尿病足部溃疡,是糖尿病后期的严重并发症,具有迁延难愈、易感染、易导致截肢的特点^[1],严重影响患者生活质量。笔者总结导师多年临床经验,在传统中医学理论“祛腐生肌”上,提出“祛瘀生肌”的观点,作为延伸和补充^[2],基于“祛瘀生肌”指导下归纳、总结出治疗糖尿病溃疡的组方“祛瘀生肌方”。前期已经对“祛瘀生肌方”进行了一系列的研究^[3-6],但多局限于生肌范畴。祛瘀在糖尿病性溃疡中为何利于生肌是进一步需思考的问题。

前列腺素(prostaglandin,PG)是一类广泛参与炎症、肿瘤、多种心血管疾病病理过程的不饱和脂肪酸,糖尿病创面难愈的重要原因可能与其含量降低有关^[7-9],研究显示,前列腺素 E_2 (PGE_2) 的减少能导致血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的下降。创面组织葡萄糖含量的增高会引起前列腺素转运蛋白(prostaglandin transporter,PGT)表达增高,其介导的 PGE_2 含量降低,从而导致局部组织毛细血管闭塞、局部组织缺氧等一系列病理改变^[10]。本实验以人真皮微血管内皮细胞(human dermal microvascular endothelial cells, HDMECs)为研究对象,从 HDMECs 迁移和 PGT 相关因子方面,探讨祛瘀生肌方治疗糖尿病溃疡的可能作用机制。

材料与方法

1 动物及分组 动物来源清洁级 SD 大鼠 20 只,雄性,体重(250 ± 20)g,由上海中国科学院实验动物中心提供[合格证:20170012003480;许可证:SCXK(沪)2017-0012],本研究涉及的动物实验均经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中

心伦理委员会批准(No. 19984)。实验将大鼠随机分为:空白组、生肌药组、祛瘀药组和祛瘀生肌药组 4 组,每组 5 只。

2 药物 生肌药(组成:黄芪 30 g 太子参 9 g 白术 9 g 生地 12 g);祛瘀药(组成:丹参 30 g 水蛭 6 g 桃仁 9 g 川芎 9 g);祛瘀生肌药(组成:生肌药:祛瘀药=1:1)。制备方法:将所有药材煎煮 2 次,重复过滤后将药液浓缩成 10 g/mL,然后用 70%乙醇沉淀过夜。回收乙醇后用适量水稀释制成合剂,其中生肌方含生药 6 g/mL,祛瘀方含生药 3 g/mL。由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药物制剂室制备^[7]。

3 主要试剂及仪器 无水乙醇(货号:10009218)、甲醇(货号:10014108)、二甲苯(货号:10023418),均购自上海国药集团化学试剂有限公司;苏木素-伊红溶液(货号:I032-1-1),购自南京建成科技有限公司;羊抗兔 HRP 标记二抗(货号:A0208),购自上海碧云天生物科技有限公司;中性树脂(货号:G8590),购自北京索莱宝有限公司;DAB 浓缩型试剂盒(货号:DA1010),购自上海基尔顿生物科技有限公司。离心机(TDZ4-WS,上海卢湘仪离心机仪器有限公司);移液枪(P10、P20、P100、P200、P1000,吉尔森 P 型移液器公司);显微镜(XDS-500C,上海蔡康光学仪器有限公司产品);细胞培养耗材(TR4001、TR4002、TR5000, TRUELINE 公司);生物安全柜(BHC-1300IIB2,苏州金净净化设备公司); CO_2 恒温培养箱 Transwell 小室(3422, COSTAR 公司);电泳仪(Mini-PROTEAN, Bio-Rad 公司);电转仪(PS-9, 大连竞迈科技有限公司);酶标仪(MK3, 芬兰雷勃酶标仪);水浴锅(HI1210, 德国 Leica 公司)。

4 方法

4.1 细胞及培养 HDMECs (BNCC337677, 购自北京北纳生物技术有限公司) 采用 10 mL 含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青链霉素混合液) 配制的细胞培养基重悬细胞, 将重悬后的细胞种植在 T 25 cm² 的培养瓶中, 然后置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。显微镜下观察细胞呈不规则形, 为贴壁细胞, 台盼蓝染色活细胞率达 95% 以上。将处于对数生长期的 HDMECs 经胰蛋白酶消化, 计数后按照每孔 20 万的密度铺入 6 孔培养板中, 每孔中加入 2 mL 培养基, 放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养^[11]。

4.2 含药血清制备 根据实验前期研究探索^[10], 根据体重为 70 kg 人和动物体表面积 SD 大鼠给药剂量进行换算, 大鼠的等效剂量相当于人的 3 倍, 其中生肌方含生药 6 g/mL、祛瘀方含生药 3 g/mL, 每日称量大鼠体重后, 根据每只大鼠体重计算灌胃体积。连续灌胃 7 天后经水合氯醛深度麻醉后, 采用无菌采血针方法从心脏取血, 室温静置 3~4 h 自然凝固, 3 000r/min 离心 10 min, 取上清液, 同组血清收集一起。56 ℃ 水浴灭活 30 min, 超净台中将血清过 22 μm 滤膜抽滤除菌, 分装到高压灭菌离心管中, 标记含药血清名称, 置于 -20 ℃ 冰箱保存备用^[12]。

4.3 实验方法 将 HDMECs 细胞分为 5 组。低糖空白组 (A 组): 细胞中加 5 mmol/L 葡萄糖 + 10% 空白血清; 高糖空白组 (B 组): 细胞中加 25 mmol/L 葡萄糖 + 10% 空白血清; 生肌药组 (C 组): 细胞中加 25 mmol/L 葡萄糖 + 10% 生肌药含药血清; 化瘀药组 (D 组): 细胞中加 25 mmol/L 葡萄糖 + 10% 化瘀药含药血清; 生肌化瘀药组 (E 组): 细胞中加 25 mmol/L 葡萄糖 + 10% 生肌化瘀药含药血清。每组 37 ℃ 培养 3 天, 加入含药血清培养 12 h 后用胰酶消化, 收集细胞进行以下实验。

5 检测指标及方法

5.1 细胞在不同组分含药血清培养基微环境下的生长能力 细胞复苏后, 进行细胞体外侵袭实验。即: 紫外灯照射灭菌, 提前将 Transwell 小室和 24 孔板用 1×PBS 浸泡 5 min 用来湿润小室; 先将细胞消化收集后计数, 再稀释调整细胞密度到 2.5×10⁵/mL, 分别接种 0.2 mL, 5×10⁴ 个细胞细胞悬液到 Transwell 小室内, 在下层的 24 孔板中加入含 10% FBS 的 1640 培养基 0.7 mL, 每组做 4 个复孔, 置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h 后终止培养进行实验操作。将上述细胞培养板中每孔加入 4% 甲醛溶液 1 mL 用于固定, 室温 10 min 后吸去固定液, 然后用 1×PBS 洗涤

1 次, 再每孔加入 0.5% 结晶紫溶液 1 mL, 染色 30 min 后用 1×PBS 洗 3 次, 晾干后置于 200×显微镜下观察: 用棉签轻柔擦去 Transwell 小室内没有迁移的细胞, 观察计数每个视野中的细胞数^[13,14]。

5.2 HDMECs 的细胞迁移运动能力 采用细胞划痕实验。即: 紫外灯照射灭菌后, 将需要试验的细胞消化收集后计数, 稀释调整细胞密度后取 8×10⁵ 个置于 35 mm² 培养皿中培养, 每组 4 复孔; 为了区分实验对象, 需提前在在培养皿盘底用记号笔画线作出标记; 细胞培养 24 h 后吸去培养液, 用 10 μL 枪头垂直于标记线划出一道痕迹, 用 1×PBS 冲洗去除划下的细胞, 然后加入无血清培养液 37 ℃、5% CO₂ 继续培养; 分别在 0、12、24 h 同一位置拍照, 选取记号笔画的线和细胞划痕的交点作为观察点, 定点观察。每幅照片放大 200 倍, 固定为 3 072×1 782 像素大小, 使用 Image J (National Institutes of USA) 测量细胞间的距离^[15]。

5.3 PGE₂ 细胞因子分泌情况 采用 ELISA 实验。即: 按相应检测试剂盒说明书进行。用碳酸盐缓冲液包被抗体包被酶标板, 封口膜覆盖酶标板置于 4 ℃ 孵育过夜制成固相抗体; 用 PBS 洗版后每孔加入 100 μL 样品, 37 ℃ 孵育 90 min; 洗板后每孔加入稀释后 PGE₂ 兔抗鼠一抗, 封口膜覆盖室温孵育 2 h, PBS 洗板后每孔加入 100 μL 标记羊抗兔 HRP 标记的二抗, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物显色。用酶标仪在相应波长下测定吸光度 (OD 值), 颜色的深浅和样品中的目标蛋白浓度呈正相关, 通过计算出标准曲线来推算样品中的目标蛋白浓度^[16]。

5.4 PGT、VEGF 蛋白表达水平 采用 Western Blot 检测。即: 将待检测的细胞从细胞培养箱中取出, 除去培养基后用 1×PBS 洗涤 2 次, 加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液, 置于 4 ℃ 冰箱充分裂解细胞, 将细胞转移到 1.5 mL 离心管中, 95 ℃ 加热 5 min 后置于 4 ℃ 预冷离心机 16 000×g 离心 20 min, 将上清液吸出转移到新离心管中置于冰上。电泳: 取每种样品 20 μL 于 Bio-Rad 电泳系统电泳, 先在 80 V 电压下电泳 30 min 后再转到 120 V 电压下电泳 100 min。转膜: 用 Bio-Rad 转移系统, 将蛋白从 PAGE 凝胶转至硝酸纤维素薄 PVDF 膜上, 塑料夹制备过程中每一层均需赶尽气泡, 转膜电流大小根据目的蛋白的分子量大小决定。封闭: 取出电泳后的 PVDF 膜, 按分子量大小裁剪目标蛋白所在条带, 将膜置于 30 mL 加入 5%~7% 脱脂奶粉的封闭缓冲液中, 室温摇床震荡 30 min。按试剂盒推荐稀释比 (1:1 000) 加入相应 PGT 和 VEGF 兔抗鼠一抗, 将膜置

于抗体中室温摇床孵育 2 h, 1×TBST 洗涤缓冲液充分洗膜 4 次, 每次 10 min。按试剂盒推荐稀释比 (1:5 000) 加入 1 mL 荧光标记的羊抗兔广谱二抗, 室温摇床避光孵育 1 h, 1×TBST 洗涤缓冲液充分洗膜 4 次, 每次 10 min。扫膜: 膜上蛋白面朝下置于仪器内显影曝光。扫描结果采用 Image J 软件进行定量分析, 确定目的条带的相对吸光度值。

6 统计学方法 采用 Excel 2017 和 Graphpad 8.0 软件进行数据处理。在本实验中多组计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布且方差齐性采用方差分析; 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 5 组 HDMECs 细胞形态及核细胞计数比较 (图 1, 表 1) B 组模拟糖尿病状态下的细胞微环境后观察到细胞生长受限, 细胞计数明显低于 A 组 ($P < 0.05$)。经过不用药物组分的含药血清刺激后, 高糖环境下的 C、D、E 组均可引起细胞数量的增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

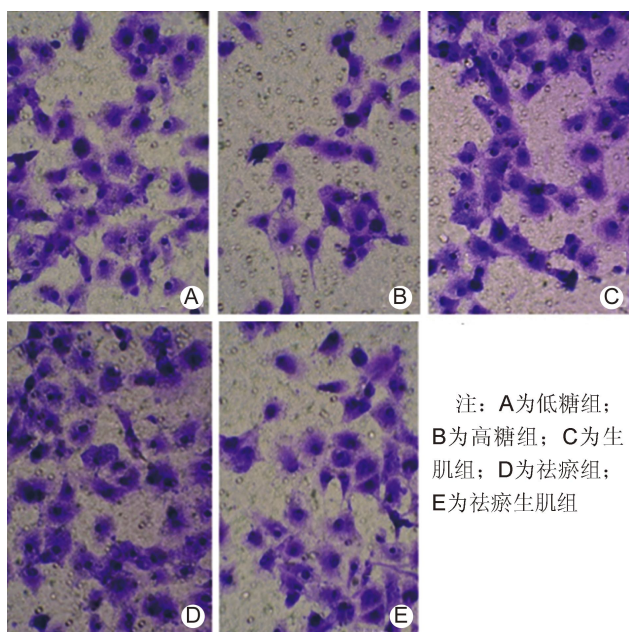


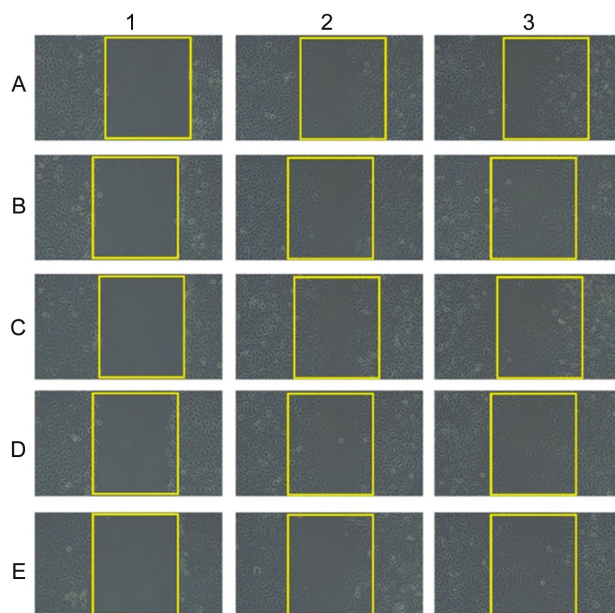
图 1 5 组 HDMECs 细胞形态 (HE 染色, ×200)

表 1 5 组 HDMECs 相同视野下细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	相同视野下细胞计数 (个)
A	6	50.00±2.16
B	6	40.75±3.00*
C	6	58.50±1.29 [△]
D	6	66.25±2.06 ^{△△}
E	6	65.00±0.82 ^{△△}

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

2 5 组 HDMECs 细胞迁移速率及未愈合面积比较 (图 2, 表 2) 各组划痕 12 h 后较 0 h 未愈合面积明显缩小 ($P < 0.05$); 划痕后 24 h, 5 组 HDMECs 未愈合面积进一步缩小, 其中 D 组未愈合面积最小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注: A 为低糖组; B 为高糖组; C 为生肌组; D 为祛瘀组; E 为祛瘀生肌组; 其中 1、2、3 分别为 0、12、24 h

图 2 划痕实验细胞镜下图 (×200)

表 2 5 组 HDMECs 未愈合面积比较 (mm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	未愈合面积		
		0 h	12 h	24 h
A	6	243.52±10.31	110.16±6.77*	33.89±3.68**
B	6	243.51±10.30	134.96±10.99*	81.58±9.39*
C	6	242.24±7.16	138.79±13.15*	56.75±5.57*
D	6	242.54±9.58	119.30±6.66*	28.35±3.05**
E	6	243.98±7.88	124.22±4.48*	35.27±4.13**

注: 与本组 0 h 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 5 组 PGE₂ 水平比较 (表 3) 与 A 组比较, B 组 PGE₂ 水平均显著下降 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, D、E 组的变化显著 ($P < 0.05$)。

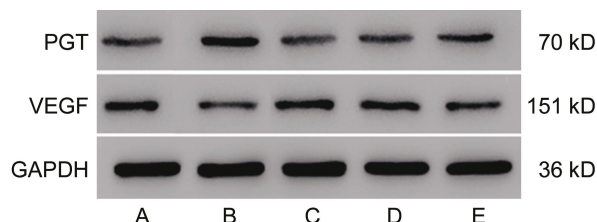
表 3 5 组 PGE₂ 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	PGE ₂
A	6	18.25±0.35
B	6	14.71±1.35*
C	6	14.72±0.91
D	6	17.95±1.26 [△]
E	6	17.75±1.00 [△]

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, [△] $P < 0.01$

4 5 组 HDMECs 分泌 PGT、VEGF 蛋白表达水平比较 (图 3, 表 4) 在 PGT/GAPDH 中, 与 A 组比

较, B 组的 PGT 表达水平上升 ($P < 0.01$)。与 B 组比较, C、D、E 组的 PGT 表达水平均下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在 VEGF/GAPDH 中, 与 A 组比较, B 组的 VEGF 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 与 B 组比较, C、D、E 组的 VEGF 表达水平增加显著 ($P < 0.01$)。



注: A 为低糖组; B 为高糖组; C 为生肌组; D 为祛瘀组; E 为祛瘀生肌组

图 3 5 组 PGT、VEGF 蛋白表达电泳图

表 4 5 组 HDMECs 分泌 PGT、VEGF 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PGT/GAPDH	VEGF/GAPDH
A	6	0.460±0.010	0.580±0.010
B	6	0.680±0.010*	0.410±0.010*
C	6	0.530±0.010 [△]	0.610±0.006 ^{△△}
D	6	0.440±0.003 ^{△△}	0.630±0.006 ^{△△}
E	6	0.440±0.005 ^{△△}	0.580±0.004 ^{△△}

注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

讨 论

HDMECs 是一种附着于皮肤微血管内皮的细胞^[17], 构成组织与血液之间的屏障^[18]。而局部创面新生血管形成是创面修复的重要阶段, 高糖环境可使血管内皮细胞功能受损, 从而抑制血管新生, 延迟创面愈合。研究发现, PGE_2 存在于许多炎症过程中, 有报道称其与肠道损伤存在正相关联系^[19]; 更有直接报道, 血管内皮受损和 PGE_2 减少密切相关^[20]。在糖尿病的有关研究中表明, 高糖环境使得 PGT 表达大幅提高, 使得 PGE_2 转入胞内降解, 使得组织中 PGE_2 含量大大降低, 从而抑制了血管新生, 形成创面难愈^[21,22]。VEGF 是一类关于血管新生常见的特异性生长因子, 角质形成细胞和上皮细胞可以在缺氧环境下诱导分泌^[23]。高糖环境下不利于 VEGF 的合成分泌, 因而不利于糖尿病患者的创面愈合。

祛瘀生肌方是在总结“祛腐生肌”理论上, 经过多年临床实践, 提出“祛瘀生肌”法治疗糖尿病性溃疡的基础上形成的自拟方, 由黄芪、太子参、白术、生地、丹参、水蛭、桃仁、川芎组成。方中黄芪、太子参补气升提, 使气旺则血自生, 气盛则化血之力强, 故采用黄芪托毒生肌^[24], 太子参补益元气^[25], 且尤善补益脾肺之

气, 以资化源; 白术、生地清热燥湿, 健脾生肌; 四药合用, 有补气生肌之效。方中丹参、桃仁活血祛瘀^[26]; 川芎行血活血^[27]; 水蛭走窜^[28], 祛瘀活络以助药力, 四药起到活血祛瘀之效。方中重用黄芪、丹参, 气血共调, 使气旺则血行, 血行则瘀自散, 标本兼治。

本实验模拟糖尿病血管微环境的状态, 研究发现 HMECs 在高糖环境下的迁移能力相对于低糖环境有明显的降低, 而祛瘀生肌方及其拆方含药血清能够显著提高 HMECs 的迁移能力, 其中祛瘀生肌方含药血清组和祛瘀方含药血清组优于生肌方含药血清组。通过 ELISA 和 Western Blot 实验的结果表明, HMECs 在高糖环境下 PGE_2 、VEGF 的表达降低, PGT 表达升高。而祛瘀生肌方及其拆方含药血清能够显著提高 HMECs 的 PGE_2 、VEGF 的表达, 降低 PGT 的表达。其中提高 PGE_2 中, 祛瘀生肌方含药血清和祛瘀方含药血清优于生肌方含药血清。在提高 VEGF 表达方面, 祛瘀生肌方含药血清、祛瘀方含药血清和生肌方含药血清差异无统计学意义。通过以往笔者临床上对创面愈合的观察过程, 发现配伍不同组分祛瘀生肌方药后, 相关细胞因子的变化可以促进局部毛细血管扩张, 改善血管通透性, 提高了组织中 PGE_2 表达进而调节组织缺血缺氧状态, 缺氧环境的改善也刺激了 VEGF 的分泌, 更加促进新生血管的合成, 从而达到改善组织局部血流、促进创面愈合的目的^[29]。

在临床诊疗过程中, 祛瘀生肌方及其拆方对糖尿病患者创面愈合的改善得到患者的充分肯定, 但是细胞水平的实验, 相较于复杂的人体环境来讲还存在很多不足之处。中药对创面的修复也是多途径多靶点共同改善的结果, 为了进一步完善祛瘀有利于生肌的理论思想, 还需要做更细致的细胞通路的探索。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 王军, 徐阳. 糖尿病足溃疡中医循证临床实践指南[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21(5): 540-543.
- [2] 李斌. 祛瘀生肌法促进创面祛瘀生肌法促进创面愈合作用的实验研究和临床观察[J]. 上海中医药大学学报, 1999, 13(2): 34-37.
- [3] 向延卫, 李欣, 肖青青, 等. 祛瘀生肌法对 SD 大鼠糖尿病溃疡创面修复 MAPK 信号通路相关基因的调控作用[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(1): 56-60.
- [4] 王一飞, 王守梅, 曹筱筱, 等. 祛瘀生肌法对糖尿病大鼠皮肤溃疡创面组织中 MMP-8 和 MMP-13 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11): 3354-3358.

- [5] 王振宜, 李斌, 唐汉钧, 等. 祛瘀生肌法对 SD 大鼠创面模型新生肉芽组织中转化生长因子- β 的动态影响[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(5): 48-51.
- [6] 李斌, 李福伦, 王振宜, 等. 祛瘀生肌中药对糖尿病模型创面转化生长因子 TGF- β 1、TGF- β 3 水平的动态影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2007, 13(2): 149-152.
- [7] 钱丽雅. 前列腺素 E₁ 不同剂量持续治疗外周动脉病变糖尿病足患者创面愈合的效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(23): 24-25.
- [8] Heidegger H, Dietlmeier S, Ye Y, et al. The prostaglandin EP3 receptor is an independent negative prognostic factor for cervical cancer patients[J]. Int J Molec Sci, 2017, 18(7): 1571.
- [9] Hsu HH, Lin YM, Shen CY, et al. Prostaglandin E₂-induced COX-2 expressions via EP2 and EP4 signaling pathways in human LoVo colon cancer cells[J]. Int J Molec Sci, 2017, 18(6): 1132.
- [10] 连侃, 陈曦, 杨滢瑶, 等. 祛瘀生肌方对大鼠糖尿病皮肤溃疡创面愈合和组织中 PGT、PGE₂ 和 VEGF 含量的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(4): 860-862, 900.
- [11] 王广宇, 王雨, 朱艳萍, 等. 人皮肤微血管内皮细胞的分离、培养及鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(51): 7678-7683.
- [12] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 31-34.
- [13] 张华, 曹玉梅, 陈玉茹, 等. 阿帕替尼对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的抑制作用及机制研究[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2019, 31(2): 1-5+51.
- [14] 李双娣. 基于 Notch-Dell4 信号通路探讨宣痹通瘀胶囊保护心肌损伤及干预血管新生作用机制的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- [15] 周小军, 林葆睿, 蓝倩. 鼻咽解毒颗粒及其增强剂对鼻咽癌细胞 HNE1 增殖、侵袭及凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(7): 816-821.
- [16] 王一飞, 李欣, 徐蓉, 等. 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[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(2): 218-223.
- [17] Syeda MM, Jing X, Mirza RH, et al. Prostaglandin transporter modulates wound healing in diabetes by regulating prostaglandin-induced angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2010, 181(1): 334-346.
- [18] Castiglioni S, Cazzaniga A, Maier Jeanette AM. Potential interplay between NF κ B and PPAR γ in human dermal microvascular endothelial cells cultured in low magnesium[J]. Magnesium Res, 2014, 27(2): 86-93.
- [19] 李梅, 高艳景, 李争, 等. Toll 样受体 4、环氧化酶-2 和前列腺素受体 EP2 在溃疡性结肠炎结肠上皮中的表达[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2013, 3(2): 34-38.
- [20] 尹群, 薛育政. PGT 在溃疡性结肠炎中的表达及其与疾病活动的关系[J]. 南通大学学报(医学版), 2017, 37(3): 219-220+275.
- [21] Clark Paul R, Jensen Todd J, Kluger Martin S, et al. MEK5 is activated by shear stress, activates ERK5 and induces KLF4 to modulate TNF responses in human dermal microvascular endothelial cells[J]. Microcirculation, 2010, 18(2): 102-107.
- [22] Jiang YF, Huang S, Fu XB, et al. Epidemiology of chronic cutaneous wounds in China[J]. Wound Repair Regen, 2011, 19(2): 181-188.
- [23] 王敏华, 李海坤, 宋久于, 等. 生长因子在糖尿病足难愈性溃疡中的研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(6): 618-621.
- [24] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 954-960.
- [25] 韩松雪, 孙语男. 浅谈国医大师金世元对补气药“参”类的认识[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(90): 101.
- [26] 周玉, 刘国涛, 卢增珍, 等. 桃仁对糖尿病大血管纤维化大鼠蛋白激酶 B 信号通路的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25(1): 61-67.
- [27] 华芳, 赵玉玲, 李莞, 等. 川芎及其中成药抗凝血作用测定方法的研究[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1698-1702.
- [28] 沈仕伟, 邸莎, 韦宇, 等. 水蛭临床应用及其用量[J]. 吉林中医药, 2019, 39(3): 313-316.
- [29] 周舫, 张恺, 翟若南, 等. NF- κ B 对 A549 细胞上皮间质转化进程的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(6): 819-823.

(收稿: 2020-01-10 在线: 2020-04-16)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶