

利用基因芯片技术阐述中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡作用的分子机制

韩会民 郭琳 姜丽娟 蒋晓宇 吕雅丽 庞金奎
白忠民 车蔚娟 徐荣慧 于萍 李强

【摘要】 目的 采用基因芯片技术探讨中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡的作用机制。方法 腹腔注射链脲佐菌素复制糖尿病大鼠模型, 喂养到 6 个月时结扎腓动脉下端并切断, 7 个月时造成足底部皮肤深 I 度烫伤复制大鼠糖尿病足溃疡模型。将模型大鼠按随机数字表法分为中药组、表皮生长因子组、模型对照组, 每组 15 只。烫伤后分别给予中药解毒生肌膏、重组人表皮生长因子、生理盐水局部外用, 每 2 d 换药 1 次, 治疗 30 d 后观察大鼠治疗前后溃疡面积及愈合情况。提取各组溃疡区组织总 RNA, 应用大鼠细胞因子芯片进行组间基因比较。结果 与模型对照组比较, 表皮生长因子组有 25 个基因发生改变, 其中上调 23 个, 下调 2 个; 中药组有 30 个基因发生改变, 其中上调 29 个, 下调 1 个。与表皮生长因子组比较, 中药组有 16 个基因发生改变, 其中上调 11 个, 下调 5 个。这些基因涉及神经营养因子、趋化因子。结论 中药解毒生肌膏和表皮生长因子能够通过影响各种炎症反应过程中的细胞因子平衡, 促进糖尿病足溃疡的愈合, 其中以中药解毒生肌膏的效果更好。

【关键词】 中药; 解毒生肌膏; 糖尿病足; 基因芯片; 大鼠

A microarray study on the molecular mechanism for the therapeutic effect of Antidotal and Myogenic Ointment (解毒生肌膏) on the foot ulcer in diabetic rats HAN Hui-min*. GUO Lin, JIANG Li-juan, JIANG Xiao-yu, LU Ya-li, PANG Jin-kui, BAI Zhong-min, CHE Wei-juan, XU Rong-hui, YU Ping, LI Qiang. * Department of Endocrinology, the Fourth Hospital of Daqing City in Heilongjiang Province, Daqing 163712, Heilongjiang, China ;

Corresponding author; LI Qiang, Department of Endocrine and Metabolic Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 100049, Heilongjiang, China, Email: hrblq@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the underlying mechanism for the therapeutic effect of a traditional Chinese medicinal recipe, Antidotal and Myogenic Ointment (解毒生肌膏, AMO), on the foot ulcer in diabetic rat using cDNA microarray technology. **Methods** 45 rats were made diabetic by i. p. injection of streptozocin. The treated animals were then fed for 6 months, and subjected to the dissection of distal popliteal artery after ligation of the vessels. Another month later, grade I burn injury was produced on the bottom of their foot as a model of diabetic foot ulcer. The rats were then randomly divided into three groups (15 each) to receive AMO, epidermal growth factor (EGF) and saline for 30 days, with dressing change in every 2 days. The area of ulcer wound and their healing rate were recorded before and after the treatment. Total RNA was extracted from the tissue samples collected near the wound, and the expression profile of cytokine genes demonstrated using the microarray for rats. **Results** In comparison with the saline group, difference in the level of expression was found in 25 genes (23 of them were up-regulated and 2 down-regulated) in EGF group, and 30 genes in AMO groups (29 of them up-regulated and 1 down-regulated). In comparison with EGF group, difference in level of expression was found in 16 genes in AMO group, with 11 up-regulated and 5 down-regulated. Neurotrophic factors and chemotactic factors, etc were among the genes involved. **Conclusion** In comparison with EGF, AMO is more effective in the treatment of foot ulcer in diabetic rats. It is possible that AMO produces such effects through the regulation of balance in cytokine expression.

【Key words】 Herb; Antidotal and Myogenic Ointment; Diabetes foot ulcer; cDNA microarray; Rats

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.10.015

基金项目, 黑龙江省自然科学基金资助项目(D200832)

作者单位, 163712 黑龙江, 大庆市第四医院内分泌科(韩会民、姜丽娟、蒋晓宇、吕雅丽、庞金奎、白忠民、车蔚娟、徐荣慧), 哈尔滨医科大学附属第二医院内分泌代谢病科(郭琳、于萍、李强)

通信作者, 李强, Email: hrblq@yahoo.com.cn

糖尿病足进展慢、病程长、治疗复杂、疗效低、费用多、截肢率高, 已引起内分泌科、骨科、足病科、血管外科的普遍关注, 糖尿病患者一生中患糖尿病足溃疡的概率达到 15%~25%, 糖尿病足也是导致非创伤性截肢的主要原因, 严重影响患者的生活质量。

本课题组前期的研究显示,解毒生肌膏具有清热解毒、消肿止痛、祛腐生肌的作用,对大鼠糖尿病足溃疡具有明显的治疗作用,但其具体作用机制尚需进一步研究^[1-3]。本课题组现使用基因芯片技术研究中药解毒生肌膏治疗大鼠糖尿病足溃疡,观察足溃疡部肌肉组织中细胞因子基因表达量的改变,从而探讨中药解毒生肌膏治疗糖尿病足溃疡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 糖尿病足溃疡动物模型复制:雄性 Wistar 大鼠 45 只(购自黑龙江中医药大学实验动物科,动物合格证号:SCXK(黑)2008009),体重(180±20)g。经腹腔注射链脲佐菌素(STZ)55 mg/kg(美国 Sigma 公司,用 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液稀释,pH 值 4.2),48 h 后取尾静脉血用血糖仪测血糖,将 2 次血糖≥16.7 mmol/L 的大鼠定为糖尿病模型。在成模大鼠的长期饮用水中加一定比例 Na⁺、K⁺、Cl⁻、Mg²⁺,每日测定血糖以指导应用优泌林 70/30(美国礼来公司)控制血糖,每只最小量 2 U/d,最大量 12 U/d,平均量 3~4 U/d,将血糖控制在 20~25 mmol/L,以防急性并发症,使大鼠寿命延长到最大程度。在喂养 6 个月时,用裂隙灯检查大鼠已有明显的白内障及神经、血管病变,此时在显微镜下结扎并切断糖尿病大鼠的双后肢腓动脉下端^[1-3]。在喂养 7 个月时,用圆柱形铁杵(直径 9 mm)在沸水中煮 10 min 立即取出致大鼠足底部皮肤深 I 度烫伤(相当于 Wagner I 级)以复制糖尿病足溃疡动物模型。

1.2 动物分组及给药:将模型大鼠按随机数字表法分为模型对照组 15 只,表皮生长因子组 15 只,中药组 15 只。烫伤后中药组局部应用中药解毒生肌膏,无菌纱布条外敷,无菌纱布包扎;生长因子组应用重组人表皮生长因子外用液(深圳市华生元基因工程发展有限公司),无菌纱布包扎;模型对照组应用无菌生理盐水,无菌纱布包扎。3 组均每 2 d 换药 1 次,观察 30 d。

1.3 检测指标及方法:给药 30 d 后将大鼠处死,取溃疡区组织,分成黄豆粒大小,放入冻存管并标记后迅速投入液氮中。

1.3.1 TRIzol 法提取组织总 RNA:每 50~100 mg 组织样本中加入 1 ml TRIzol 试剂制备组织匀浆;加入 0.2 ml 氯仿,振荡后 15~30 °C 孵育 2~3 min。4 °C 下离心 15 min;取上层水相,加入 0.5 ml 异丙醇摇匀,15~30 °C 孵育 10 min 后 4 °C 离心 10 min;75%乙醇 1 ml 洗涤沉淀,4 °C 离心 5 min;弃乙醇,吸干净残余的微量乙醇,室温干燥 5~10 min;30 μl

焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解沉淀;甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 是否发生降解。

1.3.2 基因芯片分析:Oligo GEArray[®]芯片为双通道芯片,为保证结果的准确性重复进行 3 次。首先用 Oligo-dT 引物将总 RNA 中的 mRNA 反转录成 cDNA,再以 cDNA 第二链为模板体外合成 cRNA,然后以 cRNA 为模板进行反转录,再用荧光染料 Cy3-dCTP/Cy5-dCTP 进行 cDNA 标志,此过程为改良的 cRNA 线性放大标志方法。具体方法见康成生物工程有限公司晶芯[®]cRNA 扩增标志试剂盒说明书。将反应体系滴加到基因芯片上,盖上盖玻片,并保证无气泡,再将杂交盒放入 BioMixer[™] I 芯片杂交仪中,42 °C 杂交 12~14 h。将杂交后的芯片放入 LuxScan[™] 10K-A 双通道激光共聚焦扫描仪进行扫描,扫描得到的结果使用 BoaoAnalyzer 系列软件对芯片结果进行片间校正、片内归一化处理及信号可信度的标志等。

2 结果

本研究发现,将糖尿病模型大鼠饲养 6 个月,裂隙灯下检查已有较明显的白内障,神经和血管也已发生相应的病理改变,其病程相当于糖尿病患者晚期,已具备发生糖尿病足的内因条件,结扎大鼠腓动脉下端并切断造成下肢缺血,同时保留了腓动脉与股动脉、小腿各动脉之间的侧支循环,与糖尿病患者的下肢缺血相近;在喂养 7 个月后再造成大鼠后肢足底部皮肤深 I 度烫伤(相当于 Wagner I 级),又具备患糖尿病足的外因条件,说明该模型是合格的。经不同药物治疗后显示,中药组治疗总有效率明显高于表皮生长因子组,足溃疡面积减小。以模型对照组为基准,进行比较分析,挑出大于 2 倍差异的探针,判定为基因表达有显著性差异。在细胞因子基因中,与模型对照组比较,表皮生长因子组基因表达上调的有 23 个,下调的有 2 个(表 1);中药组基因表达上调的有 29 个,下调的有 1 个(表 2)。与表皮生长因子组比较,中药组基因表达上调的有 11 个,下调的有 5 个(表 3)。利用生物信息学分析平台分别对上调和下调的各项基因进行分析,对这些基因功能进行分类,主要涉及神经营养因子、趋化因子。

3 讨论

中药解毒生肌膏以黄连、黄柏为主要药物^[4],现代药理研究表明,其有较强的抗细菌、真菌、病毒等作用^[5]。中医具有整体观念,中药具有复方特点,如何让中医药在保留宏观、整体、复方优势的同时,采用现代医学方法研究其作用机制,是中医药治疗理

表 1 表皮生长因子组/模型对照组表达上调的 23 个基因和表达下调的 2 个基因

登陆号	基因名称	描述	登陆号	基因名称	描述	登陆号	基因名称	描述
上调基因			NM_024375	Gdf10	生长分化因子 10	NM_001001513	Tnfsf12	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 12
NM_012827	Bmp4	骨形态发生蛋白 4	NM_013129	Il15	白细胞介素 15			
NM_013166	Cntf	睫状神经营养因子	NM_031512	Il1b	白细胞介素 1β	NM_001009623	Tnfsf13	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 13
XM_340799	Csf2	集落刺激因子 2(粒 细胞-巨噬细胞)	NM_012590	Inha	抑制素 α			
NM_017104	Csf3	集落刺激因子 3(粒 细胞-巨噬细胞)	NM_080769	Lta	淋巴瘤素 A	NM_053552	Tnfsf4	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 4
XM_224733	Gdf1	类似 GDF-1 胚胎生长 因子-大鼠,mRNA	NM_212507	Ltb	淋巴瘤素 B	NM_017092	Tyro3	TYRO3 酪氨酸蛋白 激酶 3
NM_031511	Igf2	胰岛素样生长因子 2	NM_053595	Pgf	胎盘生长因子	XM_342006	Vegfb	血管内皮生长因子 B
XM_214579	Ik	类似 RIKEN cDNA 2410080P20	NM_031131	Tgfb1	转化生长因子 β1	下调基因		
			NM_013174	Tgfb2	转化生长因子 β2	NM_345201	Il21	白细胞介素 21
			NM_145681	Tnfsf10	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 10	NM_022196	Lif	白细胞抑制因子

表 2 解毒生肌膏中药组/模型对照组表达上调的 29 个基因和表达下调的 1 个基因

登陆号	基因名称	描述	登陆号	基因名称	描述	登陆号	基因名称	描述
上调基因			NM_024375	Gdf10	生长分化因子 10	NM_013174	Tgfb3	转化生长因子 β3
NM_017178	Bmp2	骨形态发生蛋白 2	NM_012854	Il10	白细胞介素 10	NM_145681	Tnfsf10	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 10
NM_012827	Bmp4	骨形态发生蛋白 4	NM_013129	Il15	白细胞介素 15			
XM_342591	Bmp7	骨形态发生蛋白 7	NM_019165	Il18	白细胞介素 18	NM_001001513	Tnfsf12	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 12
NM_013166	Cntf	睫状神经营养因子	NM_031512	Il1b	白细胞介素 1β			
NM_017104	Csf3	集落刺激因子 3(粒 细胞)	NM_133311	Il24	白细胞介素 24	NM_001009623	Tnfsf13	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 13
NM_017129	Ctf1	心肌营养素 1	NM_012589	Il6	白细胞介素 6			
XM_224733	Gdf1	类似 GDF-1 胚胎生长 因子-大鼠,mRNA	NM_012590	Inha	抑制素 α	NM_053552	Tnfsf4	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 4
NM_031511	Igf2	胰岛素样生长因 子 2	NM_080769	Lta	淋巴瘤素 A	NM_017092	Tyro3	TYRO3 酪氨酸蛋白 激酶 3
XM_214579	Ik	类似 RIKEN cDNA 2410080P20	NM_212507	Ltb	淋巴瘤素 B	下调基因		
			NM_053595	Pgf	胎盘生长因子	XM_214143	Oit1	类似癌基因蛋白转 录物 1
			NM_012629	Prl	催乳素			
			NM_021578	Tgfb1	转化生长因子 β1			
			NM_031131	Tgfb2	转化生长因子 β2			

表 3 解毒生肌膏中药组/表皮生长因子组表达上调的 11 个基因和表达下调的 5 个基因

登陆号	基因名称	描述	登陆号	基因名称	描述	登陆号	基因名称	描述
上调基因			XM_345201	Il21	白细胞介素 21	NM_080769	Lta	淋巴瘤素 A
XM_342591	Bmp7	骨形态发生蛋白 7	NM_133311	Il24	白细胞介素 24	NM_212507	Ltb	淋巴瘤素 B
NM_017129	Ctf1	心肌营养素 1	NM_012589	Il6	白细胞介素 6	XM_214143	Oit1	类似癌基因蛋白转 录物 1
NM_017113	Grn	颗粒体	XM_341487	Il9	白细胞介素 9			
NM_031511	Igf2	胰岛素样生长因子 2	NM_021578	Tgfb1	转化生长因子 β1	NM_053552	Tnfsf4	肿瘤坏死因子(配体) 超家族成员 4
NM_012854	Il10	白细胞介素 10	下调基因					
NM_019165	Il18	白细胞介素 18	NM_013166	Cntf	睫状神经营养因子			

论的创新,是突破中西医结合的关键。本课题利用基因芯片技术初步研究解毒生肌膏治疗糖尿病足溃疡的作用机制,为中药治疗糖尿病足探索一条新途径。

糖尿病足的发病机制复杂,目前认为与血管病变、神经病变、感染等多种因素相关^[6]。而皮肤的创面愈合是一个复杂却有序的生物过程,在每个时期都有许多组织、细胞外基质、细胞因子等参与,涉及一系列的生物学过程,如出血、血管反应、炎症反应、肉芽组织形成、再上皮化及修复后的重塑等。近年来认为,细胞因子和免疫反应在糖尿病足溃疡的发生

发展过程中具有重要作用^[7]。

在伤口愈合的不同阶段,促炎症反应和抗炎反应过程起着关键作用^[8]。其中趋化因子是伤口愈合的关键介质。在伤口愈合的不同阶段,趋化因子诱导白细胞向伤口处聚集,并指引其他细胞如角质形成细胞、内皮细胞及成纤维细胞的迁移。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及白细胞介素-1β(IL-1β)在炎症反应过程中释放出来,使破骨细胞分化因子(RANKL)表达增加,进而导致核转录因子-κB(NF-κB)的激活及破骨细胞的成熟。研究显示,表皮生长因子组及中

药组粒细胞集落刺激因子(G-CSF)基因及 ILs 家族基因明显上调。Csf3 能够增强成熟的中性粒细胞的趋化性、吞噬作用和细胞杀伤作用。在感染情况下, Csf3 能特异并显著刺激白细胞生成, 刺激造血干细胞增殖, 导致中性粒细胞数量增多并增强其功能活性。IL-10 又名细胞因子合成抑制因子, 其主要免疫调节作用是在 mRNA 水平上抑制激活的单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞发挥有效功能, IL-10 能下调活化的单核细胞和巨噬细胞转录分泌 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 G-CSF。IL-18 又名干扰素- γ 诱导因子, 主要由巨噬细胞样细胞产生, 具有促进 IL-1 和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)产生、诱导 Th1 细胞产生 γ -干扰素(IFN- γ)、诱导 TNF- α 和多种趋化因子的基因表达与蛋白质合成等多种生物学功能, 还作为前炎症细胞因子参与多种免疫性疾病的发生。所以中药组可能通过促进趋化因子的产生, 影响巨噬细胞的功能, 从而促进溃疡愈合。

表皮生长因子组及中药组, 骨形态发生蛋白(BMPs)、生长和分化因子(GDFs)、转化细胞生长因子- β (TGF- β)及 Cntf/IL-6 细胞因子家族基因均明显上调。BMPs、GDFs 及 TGF- β 均属于 TGF- β 超家族^[9]。Bmp2、Bmp4、Gdf10 都有骨诱导的功能。Bmp2 诱导鼠胚胎间充质干细胞C3H10T1/2成脂肪分化。Bmp4 能诱导成骨、促进骨胶原生成、骨痂的形成和再塑; 是维持神经健康和再生的神经营养因子, 能促进神经干细胞增殖分化, 使新生的神经元迁移到颗粒细胞层分化为成熟的颗粒神经元, 还刺激胶质细胞合成神经营养因子; Bmp4 还可调控多种组织的增殖分化, 在器官再生、修复、定向重构中起重要作用。Cntf 为睫状神经营养因子, 能促进其他神经元细胞类型的生存。周围神经损伤后, 其神经元的存活及轴突的再生有赖于多种神经营养因子。近年来的研究显示, 睫状神经节营养因子 Cntf 能刺激受损的轴突生长, 对神经损伤的修复起着重要作用。Ctf1 属于 Cntf/IL-6 细胞因子家族。Ctf1 存在于多种组织中, 是一种具有广谱生物学活性的细胞因子。作为一种多效性细胞因子, Ctf1 在神经系统具有类似于其他神经营养因子的生物学作用; 能维持运动神经元、多巴胺神经元和交感神经元长时间存活, 诱导培养交感神经元递质表型的连接; 但 Cntf 仅能保护交感神经元, 并不能诱导产生对多巴胺能神经存活的生物学效应, 因此 Ctf1 较 IL-6 家族其他成员具有更强的神经系统作用^[10]。说明在糖尿病足溃疡的治疗中, 中药解毒生肌膏可能通过这些细胞因子

促进神经细胞增殖、分化及组织再生、修复。胰岛素样生长因子 2(IGF2)通过自分泌和旁分泌机制对许多组织细胞的增殖、分化起调节作用, 如对骨组织的正常生长和成熟、肌母细胞的分化、皮肤组织的正常生长和分化都有重要的调节作用, IGF2 还是一种神经营养因子^[11]。

相对表皮生长因子组而言, 中药组作用于更多的细胞因子及炎症免疫反应过程, 对生长因子的促溃疡愈合作用起着放大的作用。

综上所述, 本研究结果虽然能在一定程度上提供较多的关于中药解毒生肌膏作用于细胞因子基因的信息, 探讨了中药解毒生肌膏对糖尿病足溃疡作用的分子机制, 但由于中药多成分、多途径、多靶点的作用特点, 基因的变化受到多种复杂因素的影响, 尚需在后续的转录、翻译环节, 蛋白、组织水平, 以及功能等方面进一步验证和探讨。本实验基因芯片结果已显示中药解毒生肌膏对糖尿病足溃疡治疗作用的有效性是有其生物学基础的。

参考文献

- [1] 吕雅丽, 梁龙彦, 刘阳, 等. 中药解毒生肌膏治疗大鼠糖尿病足的实验研究. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15, 233-235.
- [2] 刘阳, 韩会民, 徐荣慧, 等. 中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡肌肉中细胞因子影响的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16, 49-51.
- [3] 徐荣慧, 刘彦东, 韩会民, 等. 晚期糖尿病大鼠肺脏病理学改变及环孢素 A 保护作用的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16, 165-167.
- [4] 周凤梧. 实用方剂学. 山东, 山东科学技术出版社, 1989, 38-39.
- [5] 崔国辉, 黄秀兰, 周克元. 小柴碱临床应用研究的新进展. 广东医学院学报, 2008, 26, 202-204, 220.
- [6] Tuttolomondo A, La Placa S, Di Raimondo D, et al. Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity. Cardiovasc Diabetol, 2010, 9, 50.
- [7] Weigelt C, Rose B, Poschen U, et al. Immune mediators in patients with acute diabetic foot syndrome. Diabetes Care, 2009, 32, 1491-1496.
- [8] Liu ZJ, Velazquez OC. Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. Antioxid Redox Signal, 2008, 10, 1869-1882.
- [9] Zaulyanov L, Kirsner RS. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. Clin Interv Aging, 2007, 2, 93-98.
- [10] 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. Health Technol Assess, 2006, 10, iii-iv, ix-x, 1-221.
- [11] Acosta JB, del Barco DG, Vera DC. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. Int Wound J, 2008, 5, 530-539.