

inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions[J]. Immunol Lett, 2011, 137(1-2): 53-61.

- [7] Reuter S, Prasad S, Phromnoi K, et al. Embelin suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B

ligand and tumor cells in vitro through inhibition of the NF- κ B cell signaling pathway[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(10): 1425-1436.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)

益气活血通阳法对糖尿病足大鼠 HIF-1 α /SDF-1 通路作用的调节

凌含鹏¹, 方水林²

1. 嘉善县中医医院, 浙江 嘉善 314100; 2. 嘉兴市中医医院, 浙江 嘉兴 314100

[摘要] 目的: 从细胞和基因水平探讨自拟糖尿病足1号方通过影响缺氧诱导因子-1 α /细胞衍生因子1 (Hypoxia inducing factor-1 α /Cell derived factor-1, HIF-1 α /SDF-1) 通路改善血管氧供状态, 修复血管内皮, 防治早期糖尿病足, 促进血管新生的作用机理。方法: SD 雄性大鼠 64 只, 随机抽取 10 只大鼠作为空白组 (A 组), 予普通饲料喂养, 剩余 54 只予高脂饲料喂养, 建立糖尿病足模型。将符合条件的早期糖尿病足大鼠随机分为模型组 (B 组)、糖尿病足1号方低剂量组 (C 组)、糖尿病足1号方高剂量组 (D 组), B 组 10 只、C 组 11 只, D 组 11 只。A、B 组给予生理盐水灌胃, C、D 组以不同剂量糖尿病足1号方灌胃, 连续 8 周, 观察各组大鼠行为表现、体质量等一般情况, 实验结束后腹主动脉取血, ELISA 法检测大鼠空腹血糖 (Fasting blood-glucose, FBG)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC) 水平, 分离腓肠肌组织用 RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 及 SDF-1 mRNA 的表达。结果: 与 A 组比较, B 组大鼠 FBG、TG、TC、HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA 的表达升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 B 组比较, C、D 组大鼠 FBG、TG、TC、HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA 的表达降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 C 组比较, D 组 TG、TC、HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA 的表达降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), FBG 差异无统计学意义。结论: 益气活血通阳法通过调节血糖, 改善组织缺氧、应激状态, 调控 SDF-1 mRNA 及 HIF-1 α 表达, 修复已损伤的血管内皮, 促进血管新生。

[关键词] 益气活血通阳法; 糖尿病足; HIF-1 α /SDF-1 通路; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 01-0005-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.01.002

Qi-supplementing, Blood-invigorating and Yang-activating Method Has Regulatory Effect on HIF-1 α /SDF-1 Pathway in Rats with Diabetic Foot

LING Hanpeng, FANG Shuilin

Abstract: **Objective:** To explore the mechanism of NO.1 Self-made Prescription for Diabetic Foot by affecting HIF-1 α /SDF-1 pathway to improve vascular oxygen supply, repair vascular endothelium, prevent early diabetic foot and promote angiogenesis from the perspective of cell and gene levels. **Methods:** A total of 64 male SD rats were randomly selected, among which 10 rats were included in the blank group (Group A) to be fed with ordinary feed, and the remaining 54 to be fed with high-fat feed to establish the diabetic foot models. Eligible rats with early-stage diabetic foot were randomly divided into model-group (Group B), low-dose NO.1 Prescription for Diabetic Foot group (Group C), high-dose NO.1 Prescription for Diabetic Foot group (Group D), with 10 rats in Group B, 11 in Group C and 11 in Group D. Group A and B

[收稿日期] 2018-05-17

[基金项目] 2016 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (中国中医药人教发 [2016] 42 号)

[作者简介] 凌含鹏 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治内分泌代谢疾病。

[通信作者] 方水林, E-mail: 374441892@qq.com。

were given saline by gavage; Group C and D were treated with different doses of NO.1 Prescription for Diabetic Foot by gavage. All groups were fed for eight weeks. The general situation like behavior and body quality of rats in each group was observed; blood was taken from the abdominal aorta after the experiment to detect levels of the fasting blood-glucose(FBG), Triglyceride(TG) and total cholesterol(TC) by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and the expression of HIF-1 α mRNA and SDF-1 mRNA was detected by RT-PCR in isolated gastrocnemius tissue. **Results:** Compared with Group A, the expression of FBG, TG, TC, HIF-1 α mRNA and SDF-1 mRNA in Group B, C and D was increased, differences being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with Group B, the expression of FBG, TG, TC, HIF-1 α mRNA and SDF-1 mRNA in Group B, C and D was decreased, differences being significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with Group C, the expression of TG, TC, HIF-1 α mRNA and SDF-1 mRNA in Group C was decreased, differences being significant ($P < 0.05$), and there was no significant difference being found in the comparison of FBG. **Conclusion:** NO.1 Self-made Prescription for Diabetic Foot can regulate blood glucose, improve tissue hypoxia and stress, regulate the expression of HIF-1 α mRNA and SDF-1 mRNA, repair the damaged vascular endothelium and promote angiogenesis.

Keywords: Qi-supplementing; blood-invigorating and yang-activating method; Diabetic foot; HIF-1 α /SDF-1 pathway; Animal experiment; Rats

糖尿病足(Diabetes Foot, DF)是糖尿病常见的严重并发症之一,是下肢远端神经异常和不同程度的周围血管病变共同导致的足部感染、溃疡和(或)深层组织破坏,以肢端麻木、疼痛、蚁行感、溃疡为主要临床表现^[1],严重增加患者医疗费用,降低生活质量。

长期高血糖和代谢紊乱的一致作用,常引起机体氧化应激反应,造成血管内皮损伤、炎症反应,导致糖尿病大血管或微血管病变的发生。由于糖尿病患者持续处于高血糖与蛋白质的非酶糖基化状态,机体内产生大量晚期糖基化终产物(Advanced glycation end-products, AGEs)影响多元醇通路、二酯酰甘油合成、蛋白激酶C及磷酸戊糖通路,引起血管壁结构变化,促进细胞的增殖、迁移和管样结构的形成^[2],影响增殖期血管新生和侧支循环的建立。基质细胞衍生因子-1(Cell derived factor-1, SDF-1)与其受体CXCR4二者相互作用,特异性结合后构成SDF-1/CXCR4反应调节通路,参与机体血管的新生。SDF-1活化和诱导细胞或炎症因子进入血管壁内,导致动脉粥样硬化的发生发展,在血管狭窄与新生方面起重要作用。高血糖时,多元醇代谢途径导致组织细胞发生缺氧,而低氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducing factor-1 α , HIF-1 α)是一种在低氧状态下发挥活性的特异核转录因子,通过调控低氧反应基因的表达介导细胞对低氧的应答,使组织细胞对缺血、缺氧作出适应性反应^[3]。本研究拟用动物实验探讨有益气活血作用的自拟糖尿病足1号方通过影响HIF-1 α /SDF-1

通路改善血管氧供状态,修复血管内皮,防治早期糖尿病足,促进血管新生的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4周龄雄性SD大鼠64只,体质量(210 \pm 10)g,由北京利华实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(京)2014-0001。室温18~22 $^{\circ}$ C,湿度40%~70%,每笼5只,自由摄食、饮水。所有动物实验均在安徽中医药大学动物实验中心完成。

1.2 实验药物 糖尿病足1号方浓缩煎剂:黄芪、威灵仙各30g,川牛膝、丹参、太子参各15g,川芎、生地黄各12g,附子9g。取上药加适量蒸馏水浸泡20min,然后煮沸20min,滤出煎液。药渣虑出后,同法煎汁,把2次药汁混匀,浓缩至含生药量2g/mL和4g/mL的中药饮剂。

1.3 动物分组及模型建立 SD雄性大鼠64只,适应性喂养7天后,随机抽取10只大鼠作为空白组(A组),予普通饲料喂养,剩余54只予高脂饲料喂养。高脂饲料喂养4周后,大鼠禁食不禁水12h,称重,测血糖。按35mg/kg腹腔注射柠檬酸钠(STZ)缓冲液,注射后72h,大鼠空腹血糖 \geq 16.7mmol/L,为糖尿病模型建立成功。造模不成功大鼠,按上述方法追加STZ缓解液。剔除造模不成功和造模过程中大鼠的死亡数量9只,将符合条件的45只大鼠建立DF模型时,死亡8只,剔除左侧肢体有溃烂大鼠5只,将剩下的32只大鼠随机分为模型组(B组)10只、糖尿病足1号方低剂量组(C组)11只、糖尿病足1号方高剂

量组(D组)11只。

1.4 给药方法 B组以0.9% NaCl以10 mL/(kg·d)灌胃给药, C组给予含生药浓度2 g/mL糖尿病足1号方10 mL/(kg·d)灌胃, D组予含生药浓度4 g/mL糖尿病足1号方10 mL/(kg·d)灌胃, A组予等体积蒸馏水灌胃, 每天1次, 连续8周。

1.5 观察指标及检测方法 观察各组实验大鼠死亡情况、行为情况、毛色、体质量、饮食等变化。保存后的血清用自动生化分析仪测定空腹血糖(Fasting blood-glucose, FBG)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC); 取各组大鼠左下肢腓肠肌, 制备样品, 聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜、封闭、DAB染色。应用Bio-Rad系统测定吸光度, 平均吸光度的比值表示蛋白表达水平, 进行半定量分析。

1.6 统计学方法 采用SPSS19.0统计分析软件对实验所得数据进行统计分析, 实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用两样本 t 检验, 或单因素方法分析, 总体方差齐者采用LSD检验, 方差不齐者采用Dunnett- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 A组大鼠一般情况良好, 毛发光泽, 行动敏捷, 精神状态较好; 糖尿病模型大鼠毛发灰暗, 无光泽, 精神萎靡, 活动减少, 有多饮多尿现象。给药8周后, 与B组大鼠比较, C、D组大鼠一般情况有不同程度的改善。实验结束时, 因大鼠血糖过高、灌胃过程中操作不当、大鼠自身打斗等原因, A组大鼠死亡2只, B组死亡4只, C组死亡1只, D组死亡1只。

2.2 各组大鼠FBG检测结果比较 见表1。治疗前, 与A组比较, B组、C组、D组血糖较高($P < 0.05$), B、C、D组3组大鼠之间血糖差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后, 与B组比较, C、D组大鼠血糖降低($P < 0.05$); C、D2组大鼠血糖间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠TG和TC检测结果比较 见表2。与A组比较, B组TG、TC均升高; 与B组比较, C、D组TG、TC均降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与C组比较, D组TG、TC均降低($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA表达结果比较 见表3。与A组比较, B组大鼠HIF-1 α

mRNA及SDF-1 mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$); 与B组比较, C、D组HIF-1 α mRNA及SDF-1 mRNA表达水平降低($P < 0.01$); 与C组比较, D组大鼠HIF-1 α mRNA及SDF-1 mRNA表达水平降低($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠FBG检测结果比较($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	n	治疗前	治疗后
A组	8	6.99 ± 1.09	7.24 ± 1.12
B组	6	23.72 ± 1.92 ^①	24.96 ± 1.94
C组	10	24.82 ± 1.10 ^{①②}	22.48 ± 1.29 ^③
D组	10	24.36 ± 1.61 ^{①②}	21.26 ± 1.85 ^{③④}

与A组比较, ① $P < 0.05$; 与B组比较, ② $P > 0.05$, ③ $P < 0.05$; 与C组比较, ④ $P > 0.05$ 。

表2 各组大鼠TG和TC检测结果比较($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	n	TG	TC
A组	8	0.72 ± 0.10	1.54 ± 0.11
B组	6	1.55 ± 0.11 ^①	2.49 ± 0.13 ^①
C组	10	1.41 ± 0.09 ^②	2.24 ± 0.16 ^②
D组	10	1.28 ± 0.09 ^{②③}	2.05 ± 0.16 ^{②③}

与A组比较, ① $P < 0.01$; 与B组比较, ② $P < 0.01$; 与C组比较, ③ $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠HIF-1 α mRNA、SDF-1 mRNA表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α mRNA	SDF-1 mRNA
A组	8	0.491 ± 0.006	0.466 ± 0.008
B组	6	1.182 ± 0.005 ^①	1.113 ± 0.037 ^①
C组	10	0.841 ± 0.017 ^②	0.865 ± 0.007 ^②
D组	10	0.607 ± 0.021 ^{②③}	0.605 ± 0.014 ^{②③}

与A组比较, ① $P < 0.05$; 与B组比较, ② $P < 0.01$; 与C组比较, ③ $P < 0.05$ 。

3 讨论

DF是糖尿病常见的慢性并发症之一, 对DF进行早期治疗、早期干预, 可以有效防止疾病发展, 提高患者生存质量。DF 0期为早期病变, 又称糖尿病高危足, 常以肢端缺血, 颜色发白或紫绀, 肢体皮温下降, 肢端感觉迟钝, 患者自觉麻木、疼痛、蚁行感或有间歇性跛行。DF 0期属于中医学消渴脱疽脉痹等范畴, 《素问》曰: “足受血而能步者也”, 说明气血运行畅通是下肢功能正常发挥的重要因素。

“气为血之帅”气行则能推动血行, 血行脉中, 具有滋润、濡养脏腑、四肢百骸的作用, 气虚无力则运血无力, 血流瘀滞脉络, 形成瘀血。治疗上采用具

有益气活血通阳之用的中药加入温水浸泡,通过温热之力促进药物吸收,同时起到扩张血管、温煦肌肉的作用,从而促进血液运行,加快血液循环,改善局部营养状况。通过温热作用还可以增强组织新陈代谢,提高机体自身免疫力,减轻炎症反应,促进组织修复^[4]。

糖尿病足1号方由黄芪、牛膝、威灵仙、川芎、桂枝、丹参、生地黄、太子参构成。全方益气行血和血而不伤正,兼以温阳散寒通络,行气血而营阴阳,标本同固,祛除瘀血,经脉畅通,达到濡筋骨,利关节之功效。其中黄芪多糖通过PI3K/Akt/eNOS途径,促进内皮祖细胞增殖、改善内皮细胞再生功能^[5-6]。牛膝多糖,能够增强脂多糖诱导的B淋巴细胞的增殖,提高NK细胞活性,激活巨噬细胞系统对细胞的吞噬作用,增强杀伤细胞活性^[7],通过神经和内分泌调节作用,提高机体免疫力,促进炎症物质的吸收;川芎中所含的川芎嗪成分可以调节血管张力,提高SOD活性,抑制过氧化脂质反应^[8],减少血浆内皮素含量,清除血管自由基,保护血管内皮细胞;地黄中所含的地黄低聚糖可明显降低四氧嘧啶糖尿病大鼠高血糖水平,增加肝糖原含量,减低肝葡萄糖-6-磷酸酶活性,梓醇能明显降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠的高血糖水平^[9]。

综上,益气活血通阳法可改善2型糖尿病机体血

管内皮细胞功能,干预血管病变,通过影响HIF-1 α /SDF-1通路,调节血糖,改善组织缺氧、应激状态,调控SDF-1 mRNA及HIF-1 α 表达,修复已损伤的血管内皮,促进血管新生。

[参考文献]

- [1] 国际血管联盟中国分会糖尿病足专业委员会. 糖尿病足诊治指南[J]. 介入医学杂志, 2013, 22(9): 705-708.
- [2] 栗妍晖, 李飞, 王冬娟. AGEs通过SDF-1/CXCR4轴信号通路对心肌微血管内皮细胞血管新生的影响及机制[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(7): 1270-1272.
- [3] 徐敏, 聂时南. 低氧诱导因子-1在缺氧性疾病中的作用研究[J]. 临床急诊杂志, 2014, 15(9): 564-567.
- [4] 吴勉华, 王新月. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 308.
- [5] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3): 232-234.
- [6] 柏冬志, 东方, 唐文婷, 等. 黄芪多糖药理作用的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1): 103-105.
- [7] 夏海燕, 吴晓萍, 王兴中. 牛膝多糖的化学组成和药理作用概述[J]. 山西中医, 2010, 26(5): 44-45.
- [8] 杨雪梅. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3): 215-217.
- [9] 李莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(8): 670-672.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)