

基于皮肤“微环境污染”的人参皂苷 Rg3 修复糖尿病皮肤损伤的作用机理研究*

尚 瑾, 秦盼月, 杨兴鑫, 俞 捷**, 李静平**

(云南中医药大学中药学院 昆明 650500)

摘要:目的 探究人参皂苷 Rg3(Ginsenoside Rg3, Rg3)修复糖尿病(diabetes mellitus, DM)皮肤损伤的作用及分子机理。方法 雄性 SD(Sprague Dawley, SD)大鼠建立 DM 模型, 随机分为正常组、模型组、氨基胍(amino guanidirig, AG)组、人参皂苷 Rg3 高、低剂组。上述大鼠灌胃 4 周后背部皮肤等面积全层切除, 手术后第 21 天皮肤创面取材。检测大鼠皮肤中晚期糖基化终末产物(Advanced glycation end products, AGEs)和创面中 P 物质(Substance P, SP)的表达量; 观察皮肤真皮层内胶原分布及相对胶原含量; 检测碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)的含量并观察其被糖基化的程度; 观察人参皂苷 Rg3 对 AGEs 干预后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的生长情况; 同时检测血清中过氧化氢(H_2O_2)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)的水平。结果 与模型组比较, 给予人参皂苷 Rg3 治疗后: AGEs 在皮肤组织中的蓄积较少; SP 的含量增加($P < 0.05$); 胶原增多且交织成网; bFGF 的表达高于模型组($P < 0.01$), 糖基化程度不明显; HUVEC 细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 血清中 H_2O_2 、MDA 含量显著下降($P < 0.05$), GSH 含量上升($P < 0.05$)。结论 人参皂苷 Rg3 对 DM 大鼠皮肤损伤具有明显修复作用, 与临床观察研究结果一致。阐明了人参皂苷 Rg3 改善 DM 皮肤“微环境污染”、调节皮肤组织功能异常的“隐形损害”的分子作用机理, 可多靶点修复 DM 皮肤损伤。

关键词:糖尿病 皮肤损伤 人参皂苷 Rg3 晚期糖基化终末产物 P 物质

doi: 10.11842/wst.20210323019 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是全球增长最快的疾病之一, 预计到 2045 年将影响 6.93 亿成年人^[1]。DM 患者并发症的治疗尤为重要, 如糖尿病引起的肾病、视网膜病变、神经病变和创面难愈等, 导致 DM 患者总体生活质量下降。皮肤作为人体最大的器官, 必然会受到 DM 代谢障碍的影响而发生相应多重损伤, 如果仅考虑微循环代谢障碍及其对皮肤胶原蛋白的影响, DM 患者皮肤受累近 100%^[2]。DM 自发性皮肤损伤或外源性创伤所导致的创面难愈, 其特点为病程长、病情复杂且易反复、发病率日渐升高、治疗棘手, 是临床

常见且严重的并发症之一^[3]。因此, 研发多靶点、多途径的治疗药物, 有助于有效地解决 DM 难愈创面的治疗药物匮乏的现状。

研究表明, DM 患者由于糖代谢障碍, 导致皮肤组织中局部含糖量增高, 并诱发非酶促化学反应产生不可逆的异质化合物——AGEs, 皮肤组织神经末梢合成和分泌的创面中 P 物质减少。AGEs 为 DM 代谢重构的直接产物, 在血液、皮肤和各个脏器中蓄积, 与晚期糖基化终产物受体相互结合后引起氧化应激反应, 同时可诱导炎性因子高表达使创面长期处在炎症反应

收稿日期: 2021-03-23

修回日期: 2022-01-10

* 国家自然科学基金委员会地区科学基金项目(81960740): 具有“益气养阴、去腐生肌”功效的滇黄精修复糖尿病难愈创面的机理研究, 负责人: 李静平; 云南省科学技术厅中医联合专项面上项目(2017FF116-024): 基于皮肤“微环境污染”的人参皂苷 Rg3 修复糖尿病难愈创面的作用机理研究, 负责人: 李静平。

** 通讯作者: 李静平, 博士, 副教授, 主要研究方向: 临床中药学; 俞捷, 博士, 教授, 主要研究方向: 代谢综合征的中医药防治及相关机制

阶段,并裂解细胞外基质胶原,延缓创面愈合^[4-5]。同时,在创伤修复的过程中,局部代谢产物蓄积会不断刺激创面皮肤所处的微环境,多方面来影响DM创面的愈合。

皮肤组织自身细胞或基质功能不良是由于局部糖含量增高和AGEs蓄积所致,引发皮肤“微环境污染”继而介导了DM皮肤的“隐形损害”,导致创面愈合延迟或不愈。DM皮肤“隐形损害”包括表皮和真皮变薄、层次减少;胶原排列紊乱或变性、肿胀;局部炎症介质异常增多;角质形成细胞生物学行为改变;成纤维细胞形态异常且增殖活动减弱。创面P物质可促进成纤维细胞迁移,促进肉芽组织形成,从而改善DM皮肤“隐形损害”^[7]。相较于皮肤可见性的缺损或断裂,皮肤的“隐性损害”是内在的,已存在组织学和细胞生物学行为的改变,导致皮肤组织更易受到外源性的损害^[5-6]。因此在治疗上如何修复DM创面是一个亟需解决的难题。

天然药物人参中含有一种四环三萜类皂苷——Rg3,具有多种药理活性,如抗肿瘤、抗病毒、舒张血管、调节免疫力等^[8]。研究证实其对肺癌、肝癌、胃癌、肠癌、乳腺癌等肿瘤细胞均有明显的多靶点抑制作用^[9]。但在人参皂苷Rg3修复皮肤损伤方面,从未有相关文献报道。

在前期实验中,我们发现人参皂苷Rg3能良好地修复DM大鼠的皮肤损伤,缩短愈合时间,促进肉芽组织形成,改善创面炎症细胞浸润,增加皮肤表皮及真皮厚度,促进创面血管新生,提高创面愈合率^[10-11]。本研究以“微环境污染”导致过度的氧化应激反应,进而造成皮肤组织及自身细胞的内源性损害,为DM皮损的关键病机提供理论依据,综合分析“微环境污染”引起的氧化应激反应增强、皮肤组织“隐形损害”在DM创面中的动态变化,在前期药效实验基础上,深入探索人参皂苷Rg3修复DM皮肤损伤的分子作用机理,为该物质多靶点修复DM皮肤损伤的药物深入研发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量 $180 \pm 20\text{ g}$,动物生产许可证号:SCXK(川)2017-024,动物合格证编号:

51203500004561,由成都达硕实验动物有限公司提供。

1.1.2 药物与试剂

人参皂苷Rg3,由中国科学院昆明植物研究所提供;AG,购自昆明泉港生物科技有限公司。链脲佐菌素(Streptozocin,STZ),美国Sigma公司;SP抗体(货号:AB1566),美国Millipore公司;AGE抗体(货号:Ab23722),美国Abcam公司;DAB试剂盒(货号:ZLI-9018),中杉金桥生物公司;Dispase II分散酶(货号:4010ES60),美国Sigma公司;Masson三色染色试剂盒(货号:G1340),索莱宝公司;胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS),美国Gibco公司;DMEM培养基,美国Hyclone公司;双抗孵育试剂盒,美国Millipore公司;双抗EDTA-胰酶,美国Millipore公司;CCK试剂盒,日本同仁研究所;FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit,美国BD公司;Detection Kit,美国BD公司;磷酸盐缓冲液(PBS),索莱宝公司;中性树胶(货号:G8590),索莱宝公司;戊巴比妥钠,德国Merck公司。

1.1.3 仪器

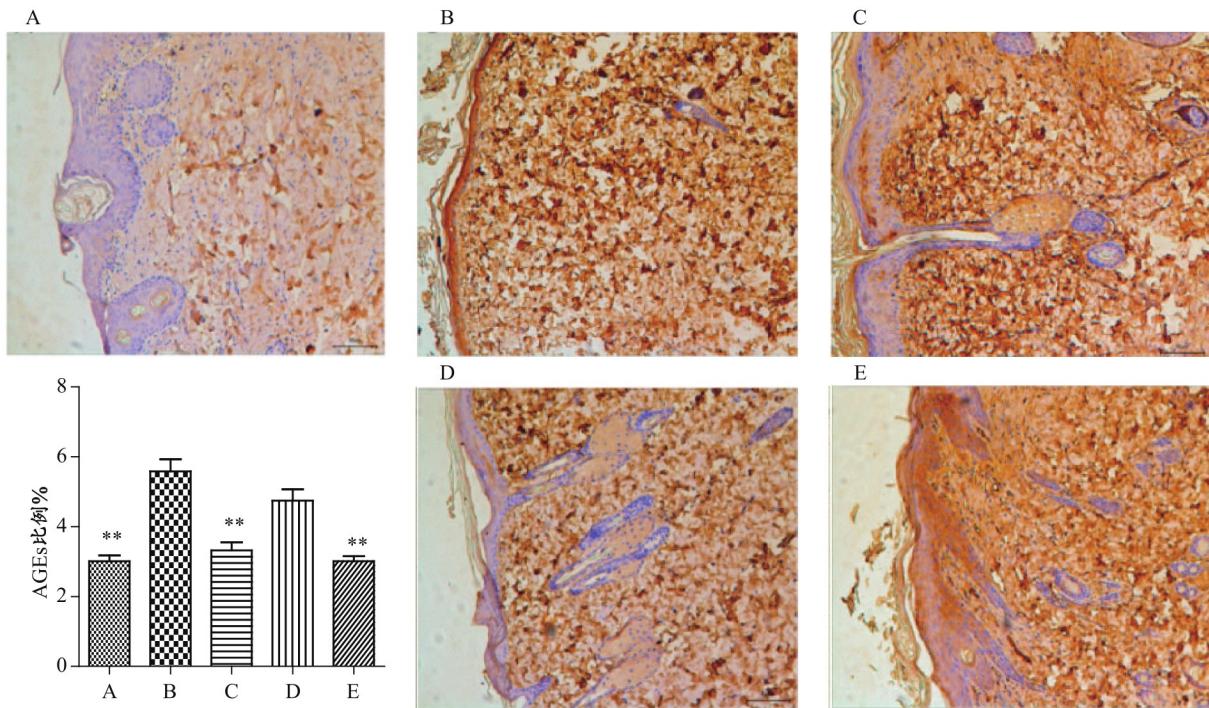
RM2016切片机,德国Leica公司;ACCU-CHEK Performa血糖仪,罗氏诊断产品(上海)有限公司;GHP-9050N隔水式培养箱,美国Thermo公司;倒置显微镜,Motic公司;BS224S电子天平,德国Sartorius公司;高速冷冻离心机,美国Thermo公司;酶标仪,美国Bioteck公司;FACSCantoII流式细胞仪,美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组

建立Ⅱ型DM模型^[12-13]:除正常组外,剩余4组给予高脂饲料4周后禁食(不禁水)12 h,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液配制低剂量STZ,采用腹腔注射的方式,一次性注射STZ $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;正常组注射等体积的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液。三天后检测大鼠空腹血糖及胰岛素,空腹血糖高于 $16.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及胰岛素高于正常组大鼠均值为造模成功,准备建立皮肤创面模型。

建立皮肤损伤模型^[10-11]:灌胃4周后,等面积切除各组大鼠的背部皮肤全层,建立皮肤损伤模型。腹腔注射 $45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的戊巴比妥钠用于麻醉上述各组大鼠,将大鼠背部毛发清除,用面积为 4 cm^2 的圆形纸片在背部同一部位作标记,小心剪去大鼠背部所标记的皮肤层,如伤口出血立即用无菌棉棒轻压止血,术后注意保暖,单笼饲养每只大鼠,保持充足的水和饲料,

图1 DM大鼠皮肤中AGEs蛋白表达情况($n=8$)

注:A:正常组,B:模型组,C:AG组,D:Rg3低剂组,E:Rg3高剂组。

垫料一日一换,温度保持在18–22°C。各组大鼠造模期间不间断给药直至取材。

按随机数字表法,将上述DM大鼠分为正常组、模型组、AG组、人参皂苷Rg3高、低剂组。建模成功后,正常组和模型组灌胃等体积的生理盐水;人参皂苷Rg3低、高剂组分别灌胃5、15 mg·kg⁻¹的人参皂苷Rg3;AG组灌胃10 mg·kg⁻¹的氨基胍;每日给药一次。

AG为一种小分子亲核性肼类化合物,是目前研究最多的一种AGEs抑制剂。大量实验研究表明,AG可通过与AGEs前体物质酮胺类化合物中的还原性羰基互相反应,消除羰基,使AGEs降解并阻断AGEs与其受体结合,抑制AGEs的合成,改善AGEs介导的皮肤损害^[14]。因本实验拟研究人参皂苷Rg3减少DM皮损大鼠皮肤糖基化代谢产物积累及皮肤的“隐形损伤”,为探索人参皂苷Rg3修复DM皮肤损伤的机制,故选择AG作为阳性对照药。

1.2.2 动物处理及标本采集

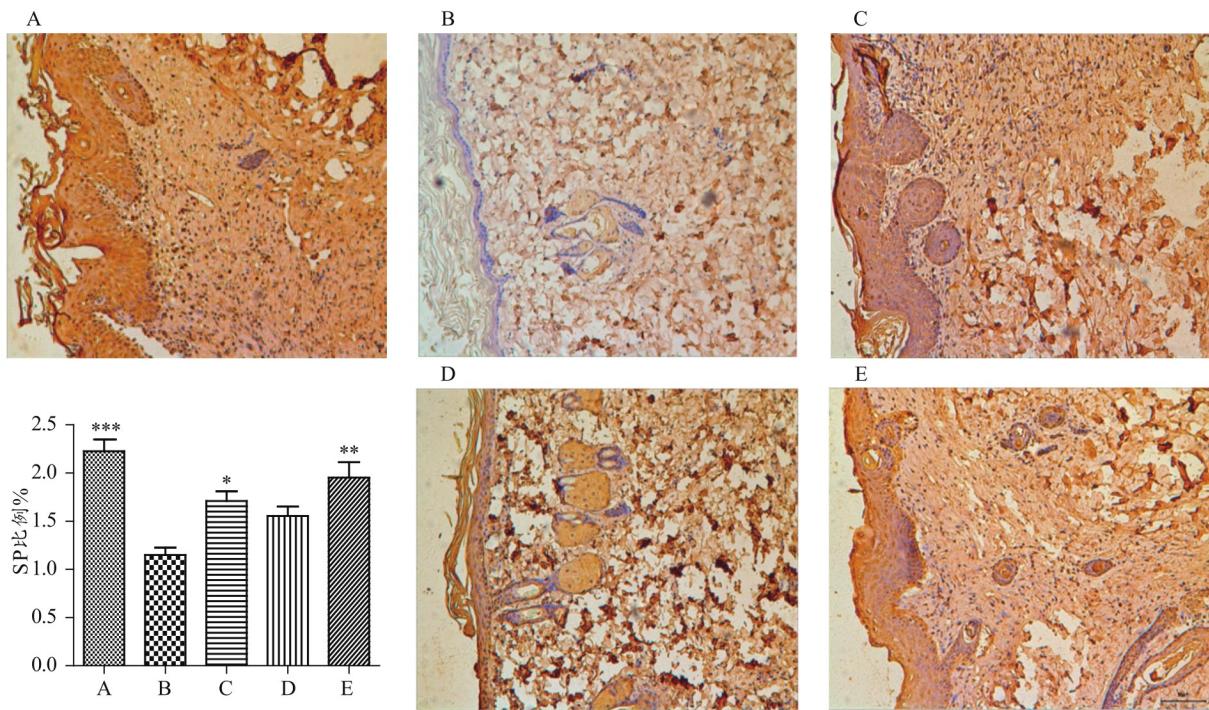
手术后第21天,各组大鼠提前禁食,给药后1 h麻醉各组大鼠,采用腹主动脉取血,将所收集血液于4°C下,3500 rpm·min⁻¹离心15 min分离血清,分装于0.5 mL离心管中;取创面皮肤组织,立即放-80°C保存待测。

1.2.3 皮肤组织AGEs蛋白表达检测

皮肤组织经脱水、浸蜡、包埋制成组织石蜡标本,切片后常规脱蜡,将组织片用酒精水化后,再置于柠檬酸缓冲液(0.01 mol·L⁻¹,PH 6.0)中进行抗原修复,加AGEs抗体(一抗)4°C过夜,漂洗后滴加反应增强液,37°C孵育20 min,漂洗后滴加二抗,37°C孵育20 min,漂洗后滴加DAB染液染色,染色明显后用PBS将染液冲洗干净,再放入苏木素中复染4 min,漂洗后放入酒精盐酸溶液中分化10 s,放入自来水中返蓝,返蓝20 min后,中性树胶封片后镜检。利用抗AGEs单克隆抗体,采用免疫组化法观察DM大鼠创面皮肤通过AG和Rg3干预后AGEs蛋白表达情况。

1.2.4 皮肤组织SP蛋白表达检测

皮肤组织经脱水、浸蜡、包埋制成组织石蜡标本,切片后常规脱蜡,用不同浓度的酒精将组织片水化后,再置于柠檬酸缓冲液(0.01 mol·L⁻¹,pH 6.0)中进行抗原修复,加SP抗体(一抗)4°C过夜,漂洗后滴加反应增强液,37°C孵育20 min,漂洗后滴加二抗,37°C孵育20 min,漂洗后滴加DAB染液染色,染色明显后用PBS将染液冲洗干净,再放入苏木素中复染4 min,漂洗后放入酒精盐酸溶液中分化10 s,自来水中返蓝20 min后,中性树胶封片后镜检。采用免疫组化法观察DM

图2 DM大鼠皮肤中SP蛋白表达情况($n=8$)

注:A:正常组,B:模型组,C:AG组,D:Rg3低剂组,E:Rg3高剂组。

大鼠创面皮肤通过AG和Rg3干预后SP蛋白表达情况。

1.2.5 真皮内胶原分布情况

皮肤组织经脱水、浸蜡、包埋后,制成组织石蜡标本,切片后脱蜡,Weigert铁苏木素染色液染色10min,用酸性乙醇分化、水洗后,Masson蓝化液返蓝、水洗后,中性树胶封片后镜检。相对胶原的含量:以正常大鼠真皮层的相对胶原含量作为基线,计算模型大鼠及人参皂苷Rg3组大鼠真皮层的相对胶原含量。

1.2.6 bFGF的表达及其被糖基化程度的免疫荧光双标检测

皮肤组织标本冰冻切片,用TBS漂洗后3%牛白蛋白进行封闭,加入兔源抗bFGF单抗后4℃过夜,漂洗后再滴加鼠源抗AGEs单抗,在37℃孵育1h后,与抗兔源二抗-抗鼠源二抗-Rhod于体积分数0.1% Triton X-100的TBS孵育1h,DAPI试剂对细胞核进行染色,用体积分数0.1% Triton X-100的TBS洗3遍,体积分数9.5%甘油封片后用免疫荧光显微镜检测。

1.2.7 血清H₂O₂、GSH和MDA含量检测

血清中H₂O₂、MDA和GSH分别用南京建成公司提供的试剂盒进行检测,具体操作参照说明书进行。

1.2.8 人参皂苷Rg3对AGEs干预后HUVEC细胞生长的影响

HUVEC细胞的培养:将HUVEC细胞接种于10%的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂培养箱中,选用对数生长期细胞。流式细胞仪定量测定凋亡或死亡细胞;在6孔板接种HUVEC细胞,待细胞贴壁饥饿处理24 h后,加入不同浓度的AGE-HSA和人参皂苷Rg3后继续培养6 h和24 h,消化收集细胞。分组:正常HUVEC细胞组;经饥饿处理HUVEC细胞组;AGE-HSA干预6 h组(分别加入AGE-HSA 12.5、50、100 μg);AGE-HSA干预24 h组;人参皂苷Rg3干预6 h组(AGE-HSA低、中、高剂量中分别加入100 umol的人参皂苷Rg3);人参皂苷Rg3干预24 h组。用AnnexinV Fitc凋亡试剂盒检测,流式细胞仪测定,每孔检测3次。

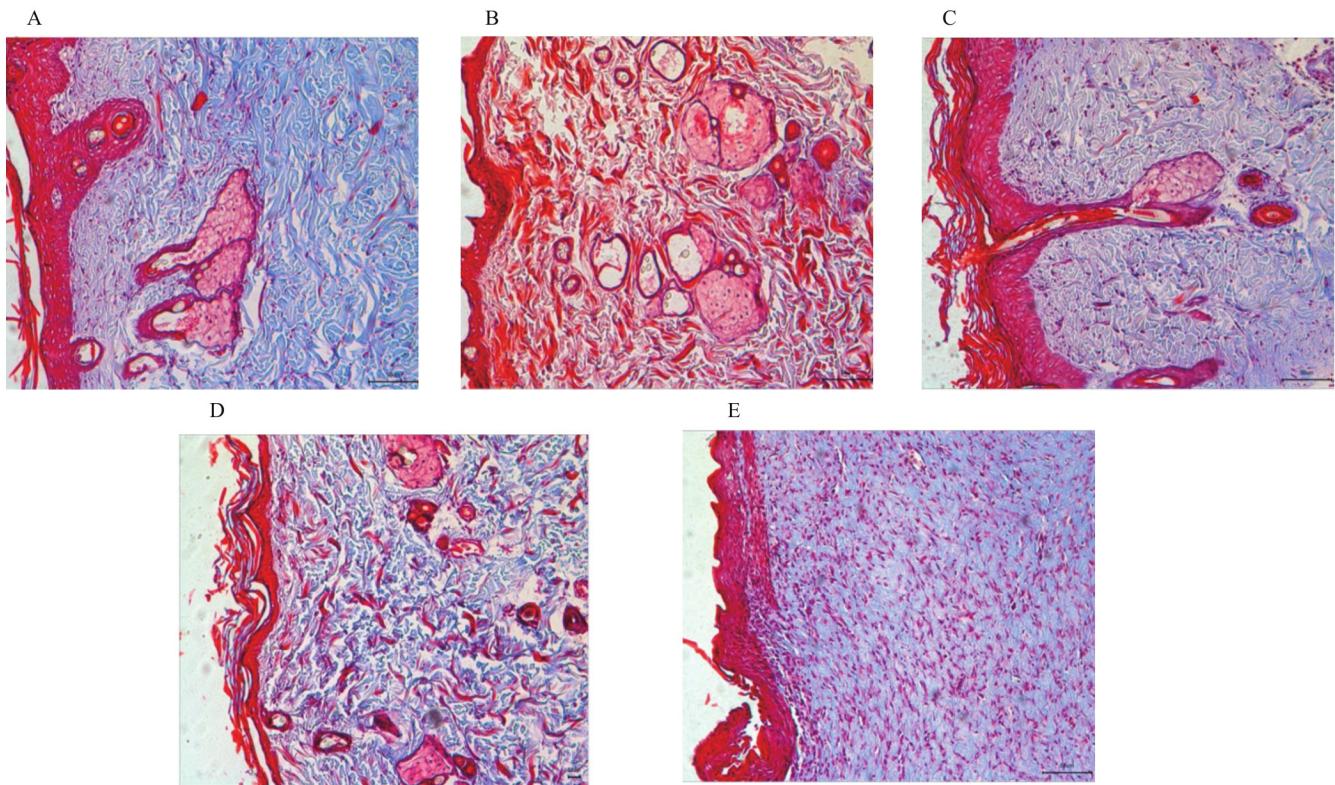
1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析、t检验比较各组间差异。

2 结果

2.1 皮肤组织AGEs蛋白表达检测

模型组创面AGEs蛋白表达高于正常组,差异有

图3 DM大鼠皮肤层胶原纤维染色情况($n=8$)

注:A:正常组,B:模型组,C:AG组,D:Rg3低剂组,E:Rg3高剂组。

表1 真皮内胶原含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	真皮内相对胶原含量
正常对照组	8	1.00±0.21
模型对照组	8	0.42±0.13 ^{**}
氨基脲组	8	0.49±0.15
Rg3低剂组	8	0.67±0.18 [*]
Rg3高剂组	8	0.78±0.12 [*]

注:与正常对照组比较,模型对照组^{**P<0.01};与模型对照组比较,GinsengRg3组^{*P<0.05}。

统计学意义($P<0.01$);AG组和人参皂苷Rg3高、低剂组创面AGEs蛋白表达均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)(图1)。与模型组比较,^{***P<0.001},^{**P<0.01},^{*} $P<0.05$ 。

2.2 皮肤组织SP蛋白表达检测

模型组SP蛋白表达显著低于正常组,差异有统计学意义($P<0.001$);AG组和人参皂苷Rg3高、低剂组SP蛋白表达量均高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图2)。与模型组比较,^{***P<0.001},^{**P<0.01},^{*} $P<0.05$ 。

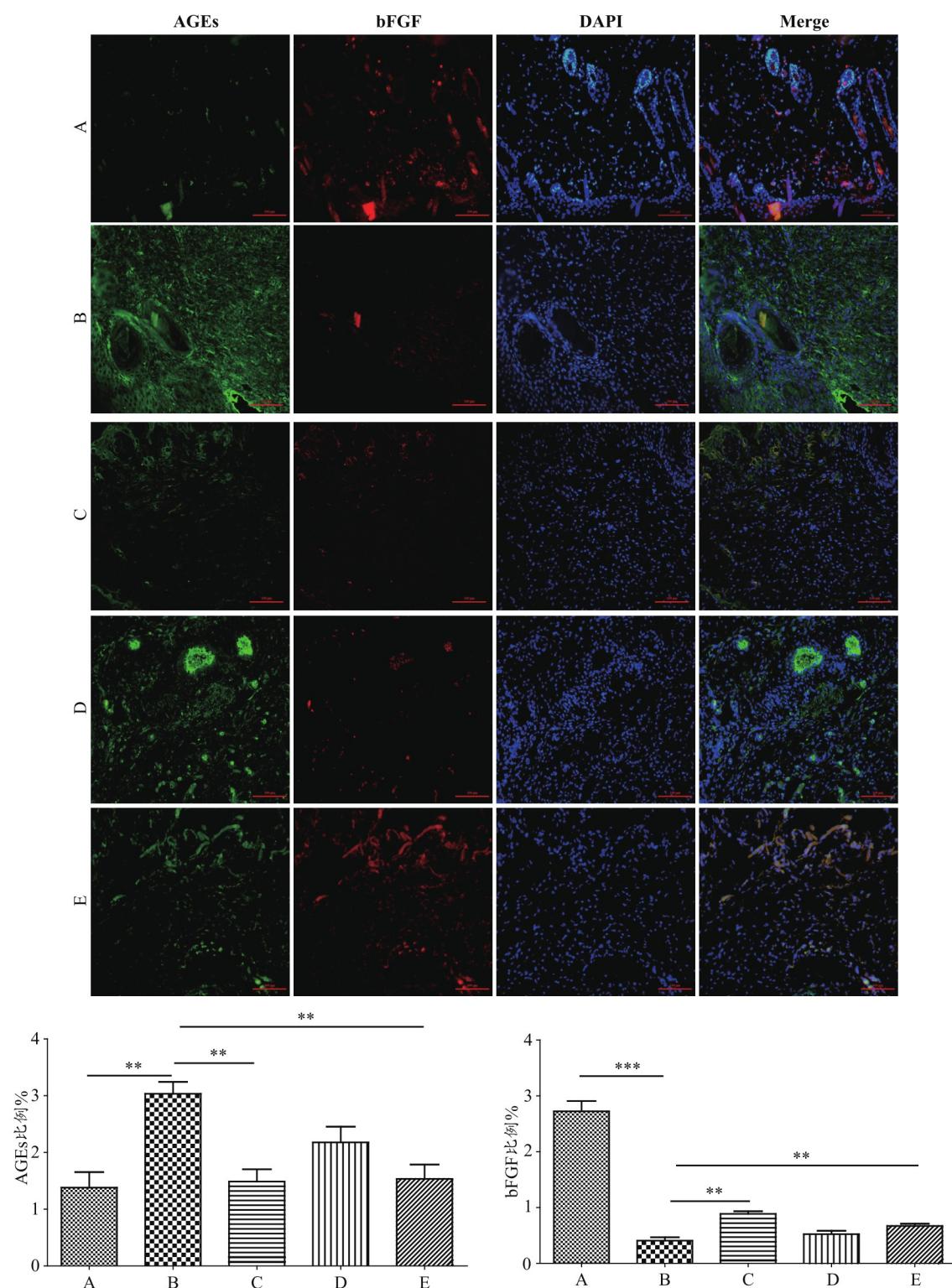
2.3 真皮内胶原分布情况

Masson染色结果显示,正常组大鼠皮肤真皮层胶原分布密集,胶原纤维致密且有序的排列成网状;而模型组大鼠皮肤层纤维素增多,胶原稀疏排列,胶原纤维大量减少且不连续;与模型组相比,AG组、人参皂苷Rg3高剂组大鼠创缘真皮层胶原组织显著增多,分布密集,交织成网;Rg3低剂组大鼠皮肤胶原组织有一定增多,但较高剂组不明显。

模型组大鼠真皮层相对胶原含量低于正常组,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,人参皂苷Rg3高、低剂组真皮层相对胶原含量明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)(表1、图3)。

2.4 bFGF表达及其被糖基化的免疫荧光双标检测

模型组AGEs表达量高于正常组($P<0.01$)、bFGF表达量低于正常组($P<0.001$);且模型组AGEs的表达与bFGF表达在同一部位,故模型组的bFGF被糖基化,而正常组bFGF被糖基化的双重表达不明显;AG组和人参皂苷Rg3高、低剂组较模型组相比,AGEs表达量降低($P<0.01$),bFGF表达量升高($P<0.01$),AG组

图4 bFGF表达及其被糖基化的免疫荧光双标检测($n=8$)

注:A:正常组,B:模型组,C:AG组,D:Rg3低剂组,E:Rg3高剂组。

同一部位bFGF和AGEs的表达无明显重合,糖基化不明显;人参皂苷Rg3高、低剂组同一部位bFGF和AGEs

的表达重合不明显,但低剂组效果更好(图4)。与模型组比较, $***P<0.001$, $**P<0.01$ 。

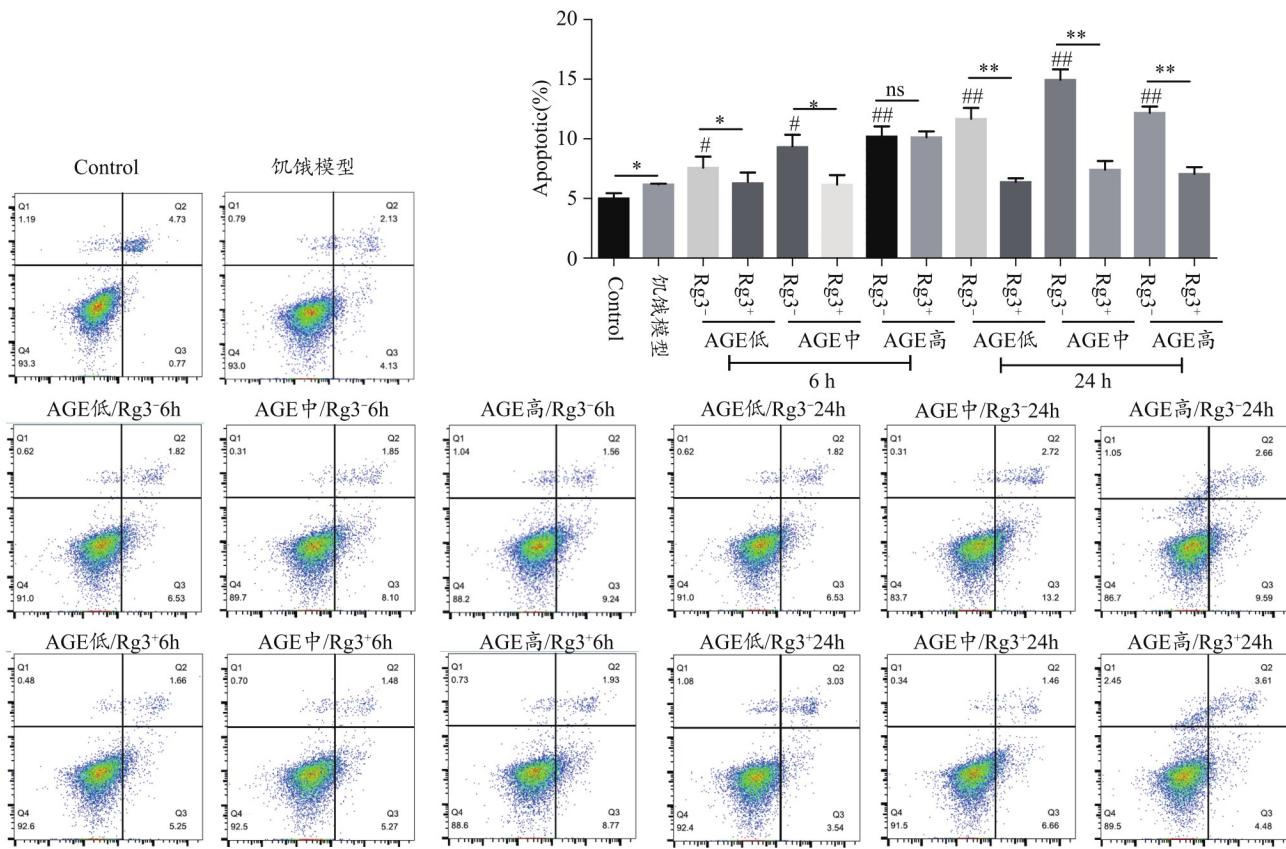


图5 Rg3干预不同浓度AGE-HSA对血管内皮细胞凋亡的抑制情况及流式细胞图

注:给药组与AGE干预组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;AGE干预组与饥饿模型组比较, $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$ 。

2.5 血清 H_2O_2 、GSH 和 MDA 含量检测

大鼠血清中,DM 皮损模型组较正常组 H_2O_2 含量显著升高($P<0.01$);AG 组及人参皂苷 Rg3 高、低剂组较模型组均显著降低($P<0.01$);模型组较正常组 MDA 含量升高($P<0.05$);AG 组及人参皂苷 Rg3 低剂组较模型组明显下降($P<0.05$),人参皂苷 Rg3 高剂组有下降趋势;模型组较正常组 GSH 显著下降($P<0.01$),AG 组及人参皂苷 AG 组及人参皂苷 Rg3 高、低剂组较模型组均有明显升高($P<0.05$)(表2)。

2.6 人参皂苷 Rg3 对 AGEs 干预后 HUVEC 细胞生长的影响

所有组 HUVEC 细胞经饥饿处理后,饥饿模型组较正常组细胞凋亡率上升,差异有统计学意义($P<0.05$);HUVEC 细胞经 AGE-HSA 干预 6 h、24 h 后,未给药各组细胞凋亡率显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),给予人参皂苷 Rg3 培养 6 h 后,AGE 低、中剂组 HUVEC 细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),但高剂组下降不明显;给予人参皂苷 Rg3 培养 24 h 后,AGE

表2 氧化应激反应指标检测($mmol \cdot L^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	H_2O_2	MDA	GSH
正常对照组	0.123±0.018	3.6±0.7	0.167±0.054
模型对照组	0.859±0.016**	5.7±1.1*	0.115±0.029**
氨基脲组	0.425±0.192**	4.1±0.4*	0.131±0.026*
Rg3 低剂组	0.482±0.021**	5.3±0.5	0.127±0.033*
Rg3 高剂组	0.563±0.017**	4.2±0.6*	0.130±0.026*

注:与正常对照组比较,模型对照组 ** $P<0.01$, * $P<0.05$;与模型对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

低、中、高剂组 HUVEC 细胞凋亡率均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)(图5)。

3 讨论

本实验检测了大鼠皮肤中 AGEs 的含量,模型组大鼠 AGEs 水平升高,人参皂苷 Rg3 组 AGEs 水平均降低,说明给药后减少了 DM 大鼠局部皮肤 AGEs 的蓄积,缓解了由 AGEs 引起的局部供血不足。研究表明,SP 可促进参与创面修复的相关细胞 DNA 的合成,并

促进细胞增殖和迁移,促进新生血管的形成,同时影响外周神经的发育和修复,维持皮肤组织的完整性^[15]。结果表明,人参皂苷Rg3组大鼠皮肤创面SP蛋白表达均高于模型组,且人参皂苷Rg3高剂量组效果更好,提示其能提高大鼠局部皮肤SP蛋白表达,促进创面修复细胞的合成,从而促进创面的愈合。用药后大鼠皮层胶原组织显著增多,说明人参皂苷Rg3可相对逆转皮肤病理性改变并缓解DM的皮肤损伤。

糖基化的bFGF会抑制内皮细胞的增殖且影响血管的形成,而正常的bFGF既能促进内皮细胞的分裂、增殖及创面组织血管的形成,又能刺激成纤维细胞的生长,促进胶原生成,进而促进创面愈合^[16]。本实验结果表明,模型组bFGF与AGEs进行免疫荧光双标拟合后,发现在同一部位bFGF和AGEs有双重表达,说明bFGF和AGEs之间互相结合,模型组bFGF被糖基化。药物干预后发现同一部位的bFGF与AGEs之间的拟合重合不明显,减少了bFGF被糖基化,提高了bFGF的促增殖能力,有利于创面的愈合。

内皮细胞作为血管形成的关键部分,对促进皮损的愈合至关重要。内皮细胞能否具有高效的分裂增殖及血管新生的能力,与细胞相关信号分子的调控有关,而DM代谢紊乱使机体长期处于高血糖水平并增强氧化应激反应,导致细胞所在微环境氧气不足,进

而内皮细胞的生长增殖受到抑制,加快内皮细胞的损伤,进而延缓了创面愈合。结果表明,HUVEC细胞经AGE-HSA干预后,生长增殖受抑,并发生凋亡。给予人参皂苷Rg3后培养6 h、24 h,AGE低、中、高剂组血管内皮细胞凋亡率均显著下降。提示给药后能减少内皮细胞凋亡,减缓由细胞微环境中高糖和AGEs等毒性物质的蓄积而引发相应的细胞毒性。

研究发现,DM慢性创面中AGEs的蓄积,使得机体内存在氧化应激增强的现象,而后者参与了DM创面愈合延迟或不愈的发生。本实验检测了大鼠血清中H₂O₂、MDA、GSH的含量,模型组大鼠H₂O₂、MDA水平升高,GSH水平降低;说明在DM状态下,氧化应激增强,活性氧不能正常消除,延缓了创面愈合。人参皂苷Rg3组大鼠H₂O₂、MDA水平降低,GSH水平升高,提示其能缓解氧化应激反应,使机体抗氧化能力增强,促进皮肤损伤的愈合。

本实验中证实人参皂苷Rg3可调节皮肤损伤造成的病理变化,减少AGEs的蓄积,缓解氧化应激反应,提高SP蛋白表达和胶原纤维组织,改善bFGF与AGEs之间的交联,提高了bFGF的促增殖能力,阐明了人参皂苷Rg3在改善DM皮肤“微环境污染”和“隐形损害”的分子作用机理,为该药修复DM皮肤损伤的深入药物研发提供实验依据。

参考文献

- Cole J B, Florez J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(7):377–390.
- Todd D O B. Impaired dermal microvascular reactivity and implications for diabetic wound formation and healing: an evidence review. *J Wound Care*, 2020, 29(Sup9):S21–S28.
- Park N Y, Lim Y. Short term supplementation of dietary antioxidants selectively regulates the inflammatory responses during early cutaneous wound healing in diabetic mice. *Nutr Metabo (Lond)*, 2011, 8(1):80.
- 徐杰男, 阙华发, 李星子, 等. 益气化瘀方促进糖尿病难愈创面修复愈合的AGEs/RAGE/KCs调控机制研究. *时珍国医国药*, 2020, 31(9):2074–2078.
- 秦盼月, 尚瑾, 杨兴鑫, 等. 糖尿病难愈创面的发病机制及治疗研究进展. *重庆医科大学学报*, 2020, 1–6.
- 陆树良, 青春, 谢挺, 等. 糖尿病皮肤“隐形损害”的机制研究. *中华创伤杂志*, 2004, 20(8):22–27.
- 姚佐超, 李明, 倪涛. P物质对成纤维细胞Rac-1/JNK通路及糖尿病创面愈合的影响. *解剖学研究*, 2021, 43(1):54–58, 70.
- 王蔚, 王旭, 余苏云, 等. 人参皂苷Rg3调节免疫检查点PD-L1抑制肺癌Lewis细胞增殖的作用及机制研究. *中草药*, 2019, 50(1):166–171.
- 段林瑞, 谢艳华. 人参皂苷Rg3药代动力学及抗肿瘤作用的研究进展. *现代生物医学进展*, 2012, 10(4):770–772.
- 李静平, 顾雯, 倪艺榕, 等. 人参皂苷Rg3对糖尿病大鼠难愈创面表皮细胞及血管新生的影响. *中国药理学通报*, 2019, 35(4):551–556.
- 李静平, 郑永仁, 张燕, 等. 人参皂苷Rg3对糖尿病大鼠创面修复作用的实验研究. *云南中医中药杂志*, 2016, 37(1):25–28.
- 张颖, 邢伟, 黄宏, 等. 2型糖尿病非收缩性难愈伤口模型的建立. *中国组织工程研究*, 2012, 16(24):4432–4436.
- 杨选鑫, 惠琦, 曹高忠, 等. rh-aFGF卡波姆940凝胶对1型糖尿病大鼠皮肤创伤的修复作用. *中国药理学通报*, 2018, 34(4):557–562.
- 张仁宇, 任超, 秦兴华, 等. 晚期糖基化终末产物对心血管损伤的机制及防治策略. *心脏杂志*, 2017, 29(2):241–245.
- 刘鹏, 徐阳, 李云平. 外周P物质参与糖尿病足创面愈合及中药干预研究进展. *中国中西医结合外科杂志*, 2020, 26(6):1206–1208.
- 曹晓赞, 谢挺, 陆树良. 糖化碱性成纤维细胞生长因子影响人真皮

Study on the Mechanism of Ginsenoside Rg3 in Repairing Diabetic Skin Damage Based on Skin "Micro-environmental Pollution"

Shang Jin, Qin Panyue, Yang Xingxin, Yu Jie, Li Jingping

(School of Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of ginsenoside Rg3 in repairing diabetic skin injury. Methods Male SD rats were established DM model and randomly divided into normal group, model group, aminoguanidine group, high and low dose Ginsenoside Rg3 groups. After 4 weeks of intragastric administration, the skin of the back was resected with equal area, and the skin samples of the wound were taken on the 21st day after injury. The skin samples were taken to detect the stratification of AGEs and SP in the wound; The distribution of collagen in the dermis was observed and its relative content was detected; The content of bFGF was detected and the degree of glycosylation was observed; the apoptosis rate of HUVEC cells treated with AGEs by Ginsenoside Rg3 was calculated; the levels of H₂O₂, MDA and GSH were detected in serum. Results Compared with the model group, after Ginsenoside Rg3 treatment, the accumulation of AGEs in the skin tissue was less; the content of SP increased ($P<0.05$); collagen increased significantly and interwoven into a network and the relative content increased; the expression of bFGF was higher than that in the model group ($P<0.01$); The degree of glycosylation was not obvious; the apoptosis rate of HUVEC cells was significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the contents of H₂O₂ and MDA in serum were significantly decreased ($P<0.05$), and the content of GSH was increased ($P<0.05$). Conclusion Ginsenoside Rg3 has obvious repairing effect on skin damage in DM rats, which is consistent with the clinical observation and research results. The molecular mechanism of ginsenoside Rg3 to improve the "microenvironmental pollution" of DM skin and regulate the "invisible damage" of abnormal skin tissue function is elucidated, and it can repair DM skin damage with multiple targets.

Keywords: Diabetes mellitus, Skin injury, Ginsenoside Rg3, AGEs, Substance P

(责任编辑: 周阿剑、郭思宇, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)