



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119139411 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 17

(21) 申请号 202411367233.5

(22) 申请日 2024.09.29

(71) 申请人 海南大学

地址 570100 海南省海口市人民大道58号

(72) 发明人 林坚 李雪卉

(74) 专利代理机构 苏州中合知识产权代理事务

所(普通合伙) 32266

专利代理师 刘召民

(51) Int. Cl.

A61K 36/8888 (2006.01)

A61K 36/355 (2006.01)

A61K 36/756 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

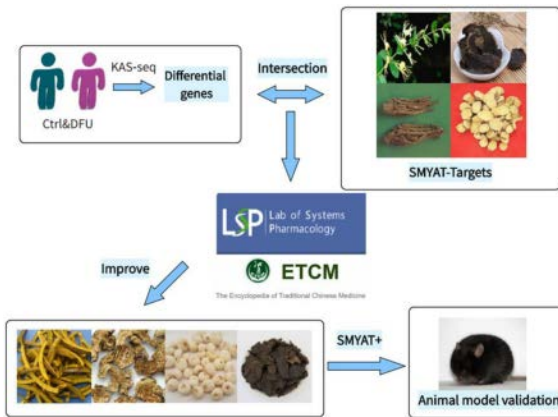
权利要求书1页 说明书9页 附图10页

(54) 发明名称

一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明提出一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物及其制备方法,所述中药组合物由下述重量份配比的原料组成:金银花15-60g,黄柏15-60g,玄参15-60g,苍术15-60g,当归10-40g,生地10-40g,半夏10-40g,甘草5-20g。本发明基于中医理论及临床样本的转录组学测序结果对四妙勇安汤进行加味,产生新处方的改良复方中药组合物方,能够有效提高糖尿病足动物模型的伤口愈合率,降低血清炎症因子水平,改良方中药靶点较原方相比更多靶向到了与神经系统、缺氧和血液循环调节相关的通路,在调节炎症、改善周围神经病变和促进创面愈合等方面更具优势。



1. 一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物,由下述重量份配比的原料组成:
金银花15-60g,黄柏15-60g,玄参15-60g,苍术15-60g,当归10-40g,生地10-40g,半夏10-40g,甘草5-20g。
2. 根据权利要求1所述的中药组合物,其特征在于,所述中药组合物由下述重量份配比的原料组成:
金银花30g,黄柏30g,玄参30g,苍术30g,当归20g,生地20g,半夏20g,甘草10g。
3. 一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药口服制剂,使用权利要求1或2所述的中药组合物及包含所述中药组合物活性成分的原料药制备。
4. 根据权利要求3所述的中药口服制剂,所述中药口服制剂为中药煎剂。
5. 一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药口服制剂的制备方法,使用权利要求1或2所述的中药组合物及包含所述中药组合物活性成分的原料药制备。
6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述中药口服制剂为中药煎剂。
7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述中药煎剂的制备方法包括:
S1、将所述中药组合物加纯水形成混合原料,浸泡后加热提取,过滤后得到初始药液;
S2、对所述初始药液进行常压浓缩操作,生成中药煎剂。
8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述混合原料中的中药组合物与纯水的重量比为1:6至1:10。
9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述步骤S1包括将混合原料浸泡2小时以上,加热煮沸后转小火继续维持加热提取40min,过滤后保留初始药液和药渣。
10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于,所述步骤S2包括:向步骤S1一煎后的药渣中再次加入6-10倍体积的纯水,加热煮沸后转小火继续煎煮40min,过滤,并合并两次煎煮所得药液后大火煎煮进行药液浓缩。

一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及中药学与中药组合物技术领域,尤其涉及一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 糖尿病足溃疡(Diabetic foot ulcer,DFU)是糖尿病最常见且最严重的并发症之一,也是患者致残致死的主要原因之一。研究表明,全球每年约有1860万人患有糖尿病足溃疡,其中约20%会导致截肢。DFU患者的5年死亡率在30%左右,而截肢患者的5年死亡率在70%以上,严重影响了患者的生活质量,也给社会医疗带来了很大的负担。

[0003] 目前临床治疗主要以基础治疗为主,如降血糖、降血压、调血脂、营养支持等;手术治疗包括伤口修复和血管重塑,但术后长期通畅率低,血管再狭窄风险高,如果患者有血管钙化病变也可能影响药物渗透;此外,一些常用的药物,如血管活性药物,广谱抗生素,三环抗抑郁药和抗焦虑药等,虽能改善血管病变、抗感染和周围神经病变,但也可能增加出血风险,诱发耐药菌株,引起心血管系统、中枢神经系统和内分泌系统的不良反应。

[0004] 与西医治疗相比,中药在治疗DFU方面更具优势,具有治疗方法多样、治疗效果好、不良反应少、个体化治疗等优点。研究表明,多种中药及活性成分可通过Wnt、Nrf2/ARE、MAPK、NF- κ B等信号通路来调节炎症、抑制氧化应激,调节葡萄糖代谢等,从而促进糖尿病创面愈合;中药综合治疗后,与常规治疗相比,DFU患者创面愈合加快,创面组织炎症因子水平明显降低。

[0005] 四妙勇安汤出自《验方新编》,由金银花(*Lonicera japonica* Thunb)、玄参(*Scrophularia Ningpoensis* Hemsl)、当归(*Angelicae Sinensis* Radix)、甘草(*Radix Glycyrrhizae Uralensis*)组成,具有清热解毒、活血化瘀、止痛的功效。目前常用于治疗心血管疾病、调节血脂代谢、抗炎和促进皮肤创面愈合等。虽然四妙勇安汤的治疗效果毋庸置疑,但其原方剂量过大,且目前临床上根据不同患者的症状和体质来添加或修改中药复方时,仍然缺乏现代科学原理和理论支持,阻碍了从现代生物医学角度对中医药的认识。

发明内容

[0006] 为解决现有技术的不足,本发明提出一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物及其制备方法,基于中医理论及转录组学测序技术对四妙勇安汤进行加味,产生新处方的改良复方中药组合物方,与原方相比可有效促进糖尿病足慢性伤口愈合并降低血清炎症因子水平,且药材剂量也相对减少。

[0007] 为实现以上目的,本发明所采用的技术方案包括:

[0008] 本发明提供了一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药组合物,由下述重量份配比的原料组成:

[0009] 金银花15-60g,黄柏15-60g,玄参15-60g,苍术15-60g,当归10-40g,生地10-40g,半夏10-40g,甘草5-20g。

[0010] 优选地,所述中药组合物由下述重量份配比的原料组成:

[0011] 金银花30g,黄柏30g,玄参30g,苍术30g,当归20g,生地20g,半夏20g,甘草10g。

[0012] 本发明还提供了一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药口服制剂,使用如上所述的中药组合物及包含所述中药组合物活性成分的原料药制备。

[0013] 进一步地,所述中药口服制剂为中药煎剂。

[0014] 本发明另提供了一种促进糖尿病足慢性伤口愈合的中药口服制剂的制备方法,使用如上所述的中药组合物及包含所述中药组合物活性成分的原料药制备。

[0015] 进一步地,所述中药口服制剂为中药煎剂。

[0016] 进一步地,所述中药煎剂的制备方法包括:

[0017] S1、将所述中药组合物加纯水形成混合原料,浸泡后加热提取,过滤后得到初始药液;

[0018] S2、对所述初始药液进行常压浓缩操作,生成中药煎剂。

[0019] 进一步地,所述混合原料中的中药组合物与纯水的重量比为1:6至1:10。

[0020] 进一步地,所述步骤S1包括将混合原料浸泡2小时以上,加热煮沸后转小火继续维持加热提取40min,过滤后保留初始药液和药渣。

[0021] 更进一步地,所述步骤S2包括:向步骤S1一煎后的药渣中再次加入6-10倍体积的纯水,加热煮沸后转小火继续煎煮40min,过滤,并合并两次煎煮所得药液后大火煎煮进行药液浓缩。

[0022] 本发明的有益效果为:

[0023] 本方证(糖尿病足溃疡)因热毒内蕴,气血瘀滞,阴血亏损所致,而三者之中尤以热毒炽盛为主,治宜清热解毒,活血养血,通络止痛。本发明基于中医理论及转录组学测序对四妙勇安汤进行加味,产生新处方的改良复方中药组合物方,其中:方中重用金银花、黄柏为君药,金银花甘寒清凉、性偏散,清中有透散之力,清热透达,引邪外出,既能泄脏腑之热毒,又能清解经脉之郁热,芳香透达而不蕴邪;黄柏苦寒,入肾、膀胱、大肠经,既能清湿热,泄火毒,湿热毒邪均清,又能入阴分退虚热;黄柏与金银花二药相伍,一散一降,直达病邪,使热毒得以清透;玄参为臣药,助金银花清热解毒,两药合用,既清气分邪热,又解血分热毒,且玄参尚有养阴散结之效;臣药以苦温之苍术助黄柏燥湿运脾,健运而无克伐肠胃之苦,苦温而无动火之虞;两药配伍,阴阳相济,寒热协调,标本兼顾,使得热去湿除。当归温润,活血祛瘀,流通血脉,补养阴血以濡四末,为佐药;生地黄苦寒,入营血分,甘凉而润,专于清热凉血养阴;半夏味辛温而燥,作为佐药调其寒热,降逆和胃,散结除痞,可以防止胃寒所致的胃气上逆,有升有降,以复脾胃升降之常;甘草为佐使,一则助金银花清热解毒,二则和当归、玄参养阴生津,三则调和诸药。全方寒热互用以和其阴阳,苦辛并进以调其升降,药味虽大,量大力专,共奏清热解毒,活血止痛之功。

[0024] 本发明一方面继承了传统中医药辨证组方用药的优势,又发挥了现代分子诊断及治疗精准的特点,临床应用方便,疗效确切,相较原有四妙勇安汤具有更高的治疗效率且能够显著降低血清炎症因子水平。另一方面,本发明的改良四妙勇安汤中药组合物采用常见药材作为原料,成本低廉、药源易寻,有效减轻患者的经济负担,可以适用于制备多种不同剂型,制备工艺简单,适合大规模工业化生产。

附图说明

[0025] 图1为糖尿病足溃疡患者 (DFU) 和正常对照组 (Ctrl) 足部伤口组织样本基因组DNA中KAS-seq信号分布特征。

[0026] 图2为DFU和Ctrl组差异基因分析,其中A图为Ctrl和DFU组Top100差异基因的无监督聚类热图 (heatmap) 分析,B图为两组差异表达基因的火山图分析 (up为在DFU组上调,down为在DFU组下调)。

[0027] 图3为Ctrl和DFU组上下调基因的功能分析,其中A图为上调基因的GO富集分析点图,图B为下调基因的GO富集分析点图。

[0028] 图4为原四妙勇安汤的中药-有效成分-靶点调控网络图。

[0029] 图5为用于四妙勇安汤改良的关键基因筛选示意图。A图为KAS-seq、原四妙勇安汤中药靶点和Genecards数据库中与糖尿病足溃疡相关的基因集取交集的Venn图,B图为存在于KAS-seq数据和外部数据集中,但未包含在原方中药靶点中的534个基因的功能分析点图。

[0030] 图6为与糖尿病足密切相关的通路中富集到的110个差异基因的PPI网络图。

[0031] 图7为从110个基因中通过机器学习筛选得到的关键基因,A图为8个关键基因对DFU和Ctrl组区分准确性的ROC图,B图为8个关键基因的名称、位点、差异倍数和P值。

[0032] 图8为四妙勇安汤改良方的中药-有效成分-靶点调控网络图。

[0033] 图9为原方和改良方中药靶点的功能分析,A图为四妙勇安汤原方中药靶点功能分析点图,B图为四妙勇安汤改良方中药靶点的功能分析点图。

[0034] 图10为测试例1中通过动物实验验证原方和改良方在高中低剂量时促进DFU伤口愈合效果的示意图。

[0035] 图11为测试例1中各组小鼠在给药第0、3、7、12天时的伤口愈合率。

[0036] 图12为测试例2中通过动物实验验证改良方治疗效果的示意图,A图为各组小鼠不同时间点的伤口愈合情况;B图为第7天时各组的伤口愈合率;C图为第12天时各组小鼠的伤口愈合率。

[0037] 图13为测试例2中药物干预后四组实验动物血清炎症因子水平的示意图,A图为TNF- α 水平,B图为IL-6水平,C图为IL-1 β 水平。

[0038] 图14为本发明的整体技术路线图。

具体实施方式

[0039] 为了更清楚地说明本发明,下面结合实施例并对照附图对本发明作进一步详细说明。本领域技术人员应当理解,下面所具体描述的内容是说明性的而非限制性的,不应以此限制本发明的保护范围。

[0040] 实施例

[0041] 结合图14,本发明的主要包括以下几个方面:

[0042] 一、样本收集

[0043] 6例糖尿病足溃疡患者足部伤口肉芽组织样本采集自北京大学第三医院从2021年1月至2021年12月期间收治的患者,作为DFU组;对照组采集自同期3位健康志愿者足部伤口肉芽组织,作为对照组 (Ctrl)。核对患者床位信息,整理样本信息单,取足部伤口处的新鲜

肉芽组织,放于液氮,运输至实验室,接收后核对样本信息,样本在-80℃保存。

[0044] 样本收集程序均符合患者知情同意和医学伦理批准要求。

[0045] 二、抽提伤口组织N₃标记和DNA提取

[0046] 取25mg组织样品加入500μL的1×PBS,在4℃下尽量剪碎,吸取组织细胞悬浮液,1500g离心5min,弃掉上清,收集组织细胞。在组织细胞中加入1mL DMEM培养基和5mM N₃-酮醇(2.75mM,1.82mL),在5%CO₂的37℃培养箱中孵育10min。将培养后的细胞悬液1500rpm离心3min,去除培养基,加入1mLPBS重悬,1500rpm离心3min,去除PBS。使用PureLinkPM Genomic DNA Mini Kit试剂盒提取基因组DNA(Genomic DNA,gDNA)。

[0047] 三、KAS-seq文库构建

[0048] 将1μg的基因组DNA悬浮于95μL的DNA洗脱缓冲液中,添加5μL 20mM DBCO-PEG4-biotin(DMSO solution,Sigma,760749),25mM K₃BO₃,37℃孵育1.5h,轻轻摇匀。然后将5μL的RNase A(Thermo,12091039)加入到反应混合物中,37℃孵育5min。然后用DNA Clean&Concentrator-5试剂盒(Zymo,D4013)回收生物素化的DNA。将gDNA悬浮在100μL的无酶水中,用Bioruptor Pico在30-on/30s-off设置30个循环,将其破碎成150-350bp的大小;保存5%的DNA片段作为输入,剩余的95%用10μL预洗Dynabeads MyOne Streptavidin C1(Thermo,65001)在室温下孵育15min,以富集生物素标记的DNA。洗涤磁珠,在15μL无酶水中95℃加热10min,洗脱DNA。利用Accel-NGS甲基序列DNA文库试剂盒(Swift,30024)将洗脱的DNA及其相应的输入物用于文库构建。文库在Illumina Novaseq6000平台上进行测序,采用双端150bp模式,目标是每个文库获得3000万reads。

[0049] 四、原始数据处理

[0050] 构建出的文库使用Fast QC(版本0.11.5)进行质量控制。得到的原始测序数据通过bowtie2(版本2.2.9)与人类基因组(版本hg19)进行比对注释,并使用SAMtools(版本1.3.1)对不符合条件的数据进行过滤。使用MACS2(版本2.1.1)识别每个样本可能的KAS-seq富集区域,通过CHIP seeker Package(version1.20.0)包对KAS-seq富集区域进行基因注释,将最符合标记区域的基因用于后续的功能分析。

[0051] 五、差异分析

[0052] Ctrl组和DFU组间的差异基因通过RStudio软件中的DEseq2包进行分析,cutoff值设置为P<0.05和|log₂ Fold Change|>0.5,差异基因火山图通过ggPlot2包进行绘制。

[0053] 六、差异基因功能分析

[0054] 两组间的差异基因通过Metscape网站(<https://metascape.org/>)和Cytoscape中的ClueGO(版本2.5.5)and CluePedia(版本1.5.5)插件来进行功能富集分析。

[0055] 七、统计学分析

[0056] 使用RStudio软件、Sangerbox网站(<http://www.sangerbox.com/login.html>)和GraphPad Prism 8软件对两组数据进行差异分析,p<0.05证明具有统计学意义。临床样本信息中计量数据用平均值±标准差($\bar{X} \pm S$)表示。

[0057] 八、基于靶点与网络药理学的改良四妙勇安汤构建

[0058] 基于临床队列筛选出关键靶点及中医药理论,结合网络药理学技术对四妙勇安汤进行加味。基于TCMSP及ETCM数据库,检索并添加作用于糖尿病足关键位点的中药。

[0059] 首先通过TCMSP数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)对四妙勇安汤中

的中药进行检索,下载得到每味药材的有效成分 (Ingredients) 和有效成分作用到的靶点 (Target); 筛选有效成分时阈值设置为生物利用度 (OB%) 大于30%, 类药性 (DL) 大于0.18; 之后筛选得到的Target name通过UniProt数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 和Perl语言转化为基因名形式以进行后续分析; 此外也还通过ETCM数据库进一步补充了中药的有效成分和作用靶点。

[0060] 九、改良四妙勇安汤基于网络药理学的有效性验证

[0061] 基于KAS-seq测序筛选出关键靶点构成的改良四妙勇安汤, 运用Cytoscape3.7.2软件, 得到四妙勇安汤改良方的“中药-活性成分-作用靶点”调控网络, 以验证新方的有效性。

[0062] 1. 糖尿病足患者测序数据分析

[0063] 采用KAS-seq测序技术, 检测DFU患者和Ctrl组的足部伤口组织。结果显示Ctrl组的KAS-seq信号强度普遍高于DFU患者 (图1), 且两组信号主要分布在基因组的转录活跃区域, 如转录起始位点 (TSS) 和转录终止位点 (TTS)。Ctrl和DFU两组分析后共得到2545个差异基因, 通过无监督聚类分析发现这些差异基因能够很好地对两组样本进行区分 (图2A)。在这些差异基因中, 有1049个基因在DFU患者中显著上调, 1496个基在DFU患者中显著下调 (图2B)。分别对上调和下调的差异基因进行了功能富集, 上调基因富集在了轴突发育 (Axon development)、糖蛋白生物合成与代谢相关过程 (Glycoprotein biosynthetic process、glycosylation、Glycoprotein metabolic process等过程) 和免疫细胞分化与凋亡相关通路 (Regulation of leukocyte apoptotic process、leukocyte apoptotic process、CD8-positive, α - β T cell differentiation等过程) (图3A), 而下调基因除了也富集到轴突发育、神经系统发育 (Regulation of nervous system development) 和突触信号传递与调节等神经系统相关通路之外, 还主要富集到了Wnt、细胞对缺氧的反应 (Cellular response to decreased oxygen levels)、造血细胞分化 (Hematopoietic progenitor cell differentiation)、和细胞生长分化 (Cell growth、Columnar/cuboidal epithelial cell differentiation) 等疾病相关通路上 (图3B)。

[0064] 2. 四妙勇安汤原方中药组合物药理说明

[0065] 四妙勇安汤原方具有清热解毒, 活血止痛之功效。主治热毒炽盛之脱疽。患肢暗红微肿灼热, 溃烂腐臭, 疼痛剧烈, 或见发热口渴, 舌红脉数。临床常用于治疗血栓闭塞性脉管炎、静脉炎、下肢溃疡、坐骨神经痛、下肢深静脉栓塞等。金银花甘寒入心, 善于清热解毒, 故重用为主药, 当归活血散瘀, 玄参泻火解毒, 甘草清解百毒, 配金银花以加强清热解毒之力, 用量亦不轻, 共为辅佐。四药合用, 既能清热解毒, 又能活血散瘀, 是治疗脱疽的良方。

[0066] 本申请对四妙勇安汤原方进行了网络药理学解析, 结果显示金银花、玄参、当归和甘草四种药材共含有112个有效成分, 并靶向到118个基因靶点。对其进行中药-有效成分-作用靶点的调控网络构建 (图4)。

[0067] 3. 四妙勇安汤改良方中药组合物的网络药理学研究及药理说明

[0068] 将KAS-seq测序得到的差异表达基因、Genecards数据库中疾病相关基因和四妙勇安汤中药靶点取交集, 为了在原方的基础上进行改良, 选择包含在KAS-seq数据和外部数据集, 但未包含在原方中药靶点中的这534个基因进行后续筛选 (图5A)。对这部分基因进行了功能富集分析 (图5B), 结果显示其富集到了RAP1、MAPK、PI3K-Akt、炎症、血小板活化、胰岛

素分泌和脂质分解等与疾病密切相关的信号通路上,证明了这部分基因包含有改良四妙勇安汤的潜在靶点。

[0069] 用这534个基因在TCMSP和ETCM数据库反向检索,共有110个基因在数据库中能够靶向到中药(图6)。进一步通过机器学习筛选得到8个标志物能够以AUC值为0.987的准确性对DFU和Ctrl进行区分(图7A),其中CREB1、GRID2、PIKERE、DRD2、ADORA1、TNFSF11、EDNRB的表达在糖尿病足患者中显著下调,HTR1B的表达在糖尿病足患者中显著上调(图7B)。

[0070] 在此基础上,基于TCMSP数据库的网络药理学研究结果,在四妙勇安汤原方中添加靶向到关键靶点的中药黄柏、苍术、地黄和半夏,制备改良四妙勇安汤中药组合物(以下简称改良方),并进行药效验证。

[0071] 改良方的方剂配伍解析如下:本方证(糖尿病足溃疡)因热毒内蕴,气血瘀滞,阴血亏损所致,而三者之中尤以热毒炽盛为主,治宜清热解毒,活血养血,通络止痛。方中重用金银花、黄柏为君药,金银花甘寒清凉、性偏散,清中有透散之力,清热透达,引邪外出,既能泄脏腑之热毒,又能清解经脉之郁热,芳香透达而不蕴邪。黄柏苦寒,入肾、膀胱、大肠经,既能清湿热,泄火毒,湿热毒邪均清,又能入阴分退虚热。黄柏与金银花二药相伍,一散一降,直达病邪,使热毒得以清透。玄参为臣药,助金银花清热解毒,两药合用,既清气分邪热,又解血分热毒,且玄参尚有养阴散结之效。臣药以苦温之苍术助黄柏燥湿运脾,健运而无克伐肠胃之苦,苦温而无动火之虞。两药配伍,阴阳相济,寒热协调,标本兼顾,使得热去湿除。当归温润,活血祛瘀,流通血脉,补养阴血以濡四末,为佐药。生地黄苦寒,入营血分,甘凉而润,专于清热凉血养阴。半夏味辛温而燥,作为佐药调其寒热,降逆和胃,散结除痞,可以防止胃寒所致的胃气上逆,有升有降,以复脾胃升降之常。甘草为佐使,一则助金银花清热解毒,二则和当归、玄参养阴生津,三则调和诸药。全方寒热互用以和其阴阳,苦辛并进以调其升降,药味虽大,量大力专,共奏清热解毒,活血止痛之功。

[0072] 申请人对改良方进行了网络药理学解析,结果显示黄柏、苍术、地黄和半夏四种药材共含有111个有效成分,并在原方的基础上新靶向到456个基因靶点,对其进行了中药-有效成分-作用靶点的调控网络构建(图8)。

[0073] 分别对四妙勇安汤原方和改良方的中药靶点进行功能分析,结果显示原方的靶点主要富集到了脂肪酸代谢、脂质分解代谢、不饱和脂肪酸代谢等与糖尿病足溃疡的发生发展密切相关的多种脂质代谢相关通路(图9A);而与原方相比,改良方的靶点除了富集到脂质代谢相关的通路外,更多的富集到了一些与神经系统相关的通路种,如突触化学传递、突触后信号转导、神经递质水平调节等;此外,与缺氧和血液循环调节相关的一些通路也得到了富集(图9B),提示其可能通过上述相关的生物学过程,在调节炎症、改善周围神经病变和促进创面愈合等方面发挥作用。

[0074] 下面使用本发明的中药组合物应用于促进糖尿病足的伤口愈合,并对该中药组合物的药效进行了动物模型上的随机对照实验验证。

[0075] 测试例1

[0076] 一、动物模型的分组、造模及给药

[0077] 研究采用6周龄雄性SPF C57BKS-DB(-/-)小鼠(db/db)建立DFU创面模型。所有动物置于标准12小时光照/12小时黑暗周期条件下,喂食标准饮食。适应性饲养1周后,随机血糖 $>16.7\text{mmol/L}$ 的db/db小鼠符合要求。备皮后,在各组小鼠肩胛骨下方背部正中做一个直

径1cm的圆形标记,沿标记剪开皮肤,深至筋膜,常规消毒后用医用绷带包扎,防止小鼠抓咬伤口。

[0078] 将21只db/db小鼠随机均分为7组,对照组灌胃生理盐水、四高组灌胃原方(24g/kg,0.1mL/10g)、四中组灌胃原方中剂量(12g/kg,0.1mL/10g)、四低组灌胃原方低剂量(6g/kg,0.1mL/10g)、四+高组灌胃改良方高剂量(49.4g/kg,0.1mL/10g)、四+中组灌胃改良方中剂量(24.7g/kg,0.1mL/10g)、四+低组灌胃改良方低剂量(12.3g/kg,0.1mL/10g)。在干预后第0、3、7、12天测量创面面积,计算创面愈合率(计算公式为:(初始面积-不同时间点测量面积)/初始面积*100%)。

[0079] 二、中药汤剂制备

[0080] 以重量计,由以下原料组成:

[0081] 四高组:金银花60g,玄参60g,当归40g,甘草20g;

[0082] 四中组:金银花30g,玄参30g,当归20g,甘草10g;

[0083] 四低组:金银花15g,玄参15g,当归10g,甘草5g;

[0084] 四+高组:金银花60g,黄柏60g,玄参60g,苍术60g,当归40g,生地40g,半夏40g,甘草20g;

[0085] 四+中组:金银花30g,黄柏30g,玄参30g,苍术30g,当归20g,生地20g,半夏20g,甘草10g;

[0086] 四+低组:金银花15g,黄柏15g,玄参15g,苍术15g,当归10g,生地10g,半夏10g,甘草5g。

[0087] 按成人每日剂量的9.1倍换算成小鼠的剂量作为中剂量,煎煮前加入6-10倍纯水浸泡2h,大火煮开后转小火煎40min,过滤出滤液备用;向药渣中再次加入6-10倍体积的纯水,大火烧开后转小火煎煮40min,滤出滤液。将两次滤液混合,高温浓缩至所需的浓度体积,使用前可短期储存在4℃条件保存。

[0088] 三、统计学方法

[0089] 各组数据比较采用单因素方差分析,动物实验相关数据通过GraphPad Prism8软件进行可视化。

[0090] 四、实验结果

[0091] 通过(初始面积-不同时间点测量面积)/初始面积*100%来计算各组小鼠不同药物干预时间点的伤口愈合率(图10)。从结果来看,第3天时四高组、四+中和四+高组的伤口愈合率明显高于对照组,四高组和四+中组的伤口愈合率明显高于对照组(表1);第7天时四中组、四高组、四+中和四+高组的伤口愈合率明显高于对照组,四高组的伤口愈合率明显高于四低组(表2);在第12天时四高组、四+低、四+中和四+高组的伤口愈合率明显高于对照组,四+中组的伤口愈合率明显高于四低组(表3)。

[0092] 表1:第3天时各组小鼠伤口愈合率存在显著差异的情况(*:p<0.05,**:p<0.01)

[0093]	Day 3	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant	Summary
--------	-------	------------	--------------------	-------------	---------

	对照组 vs. 四高	-0.3555	-0.6022 to -0.1088	Yes	**
	对照组 vs. 四+中	-0.3173	-0.5640 to -0.07059	Yes	**
[0094]	对照组 vs. 四+高	-0.2778	-0.5245 to -0.03106	Yes	*
	四低 vs. 四高	-0.3099	-0.5566 to -0.06318	Yes	*
	四低 vs. 四+中	-0.2717	-0.5184 to -0.02498	Yes	*

[0095] 表2:第7天时各组小鼠伤口愈合率存在显著差异的情况(*:p<0.05,**:p<0.01)

	Day 7	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant	Summary
	对照组 vs. 四中	-0.2239	-0.4335 to -0.01426	Yes	*
	对照组 vs. 四高	-0.3504	-0.5847 to -0.1160	Yes	**
[0096]	对照组 vs. 四+中	-0.2254	-0.4350 to -0.01575	Yes	*
	对照组 vs. 四+高	-0.2312	-0.4408 to -0.02157	Yes	*
	四低 vs. 四高	-0.2747	-0.5091 to -0.04037	Yes	*

[0097] 表3:第12天时各组小鼠伤口愈合率存在显著差异的情况(*:p<0.05,**:p<0.01)

	Day 12	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant	Summary
	对照组 vs. 四高	-0.1732	-0.3305 to -0.01592	Yes	*
	对照组 vs. 四+低	-0.1706	-0.3113 to -0.02989	Yes	*
[0098]	对照组 vs. 四+中	-0.216	-0.3567 to -0.07535	Yes	**
	对照组 vs. 四+高	-0.2015	-0.3422 to -0.06085	Yes	**
	四低 vs. 四+中	-0.1671	-0.3078 to -0.02644	Yes	*

[0099] 结果表明改良方的高中低剂量组均可显著促进DFU动物模型的伤口愈合,且综合分析后改良方在中剂量时的治疗效果最佳。

[0100] 测试例2

[0101] 一、动物模型的分组、造模及给药

[0102] 研究采用6周龄雄性SPF C57BKS-DB(-/-)小鼠(db/db)建立DFU创面模型,6周龄雄性SPF C57BKS-DB(+/-)小鼠(db/m)作为健康组。所有动物置于标准12小时光照/12小时黑暗周期条件下,喂食标准饮食。适应性饲养1周后,随机血糖>16.7mmol/L的db/db小鼠符合要求。备皮后,在各组小鼠肩胛骨下方背部正中做一个直径1cm的圆形标记,沿标记剪开皮

肤,深至筋膜,常规消毒后用医用绷带包扎,防止小鼠抓咬伤口。

[0103] 将15只db/db小鼠随机均分为3组,Ctrl组灌胃生理盐水、SMYAT组灌胃原方(11.7g/kg,0.1mL/10g)、SMYAT+组灌胃改良方(24.7g/kg,0.1mL/10g),db/m小鼠作为Healthy组(n=5)灌胃生理盐水。在干预后第0、3、7、12测量创面面积,计算创面愈合率(计算公式为:(初始面积-不同时间点测量面积)/初始面积*100%)。

[0104] 二、中药汤剂制备:同实施例1。

[0105] 三、统计学方法:同实施例1。

[0106] 四、实验结果

[0107] 通过(初始面积-不同时间点测量面积)/初始面积*100%来计算各组小鼠不同药物干预时间点的伤口愈合率(图12A)。从结果来看,第7天时四妙勇安汤改良方组的伤口愈合率明显高于Ctrl组($P<0.01$) (图12B);在第12天时四妙勇安汤改良方组伤口愈合率显著高于四妙勇安汤原方组($P<0.05$) (图12C),表明与原方相比,改良方可显著促进DFU动物模型的伤口愈合。

[0108] 通过ELISA检测4组小鼠血清炎症因子水平。首先根据标准品孔的浓度和吸光度值绘制标准曲线,TNF- α 的曲线方程和 r^2 值分别为 $y=2.53215/[1+(x/867.50466)^{-1.36523}]+0.02319$ 和0.99982;IL-6的曲线方程和 r^2 值分别为 $y=9.95329/[1+(x/1361.63947)^{-1.09666}]+0.03334$ 和0.99992;IL-1 β 的曲线方程和 r^2 值分别为 $y=2.04456/[1+(x/736.55342)^{-1.51532}]+0.04861$ 和0.99952。将各孔的吸光度值带入曲线方程中,乘以系数倍数来计算炎症因子水平,结果显示改良方组TNF- α (图13A)和IL-6 (图13B)的水平显著低于原方组($P<0.05$);改良方组IL-1 β (图13C)水平略低于原方组,但差异不具有统计学意义($P=0.0664$)。

[0109] 结果显示改良四妙勇安汤较原方相比对糖尿病足模型小鼠的伤口愈合具有显著的促进作用,并能够降低血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的水平;功能分析显示,改良方的中药靶点更多富集到神经和突触相关信号通路、血液循环、血管形态和血管功能维持相关的通路,以及对氧水平下降的响应和对氧水平的反应途径,这可能是改良方治疗糖尿病足溃疡的主要机制,与原处方相比,改进后的处方在改善周围神经病变方面可能更具优势。

[0110] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为更清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方法予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

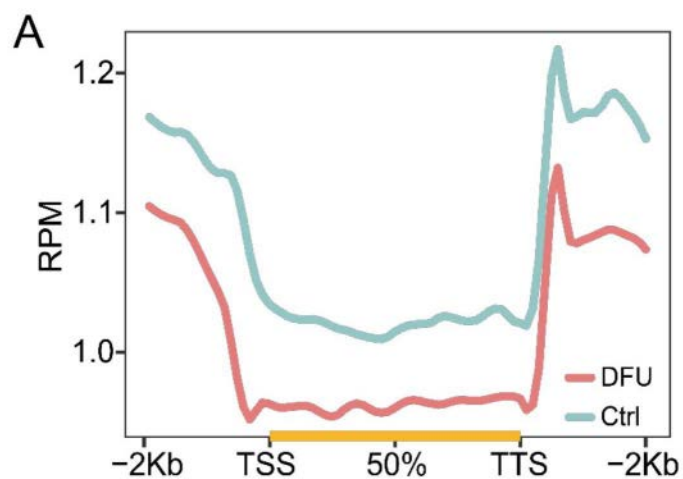


图1

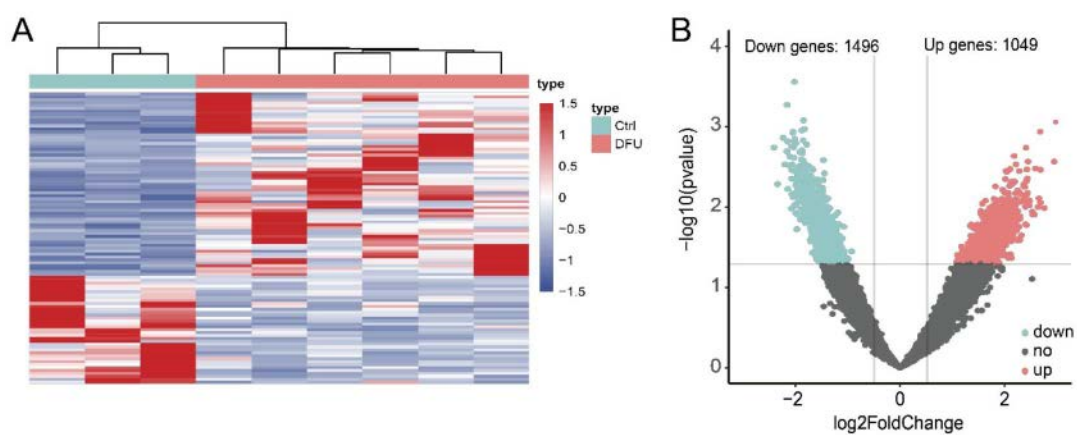


图2

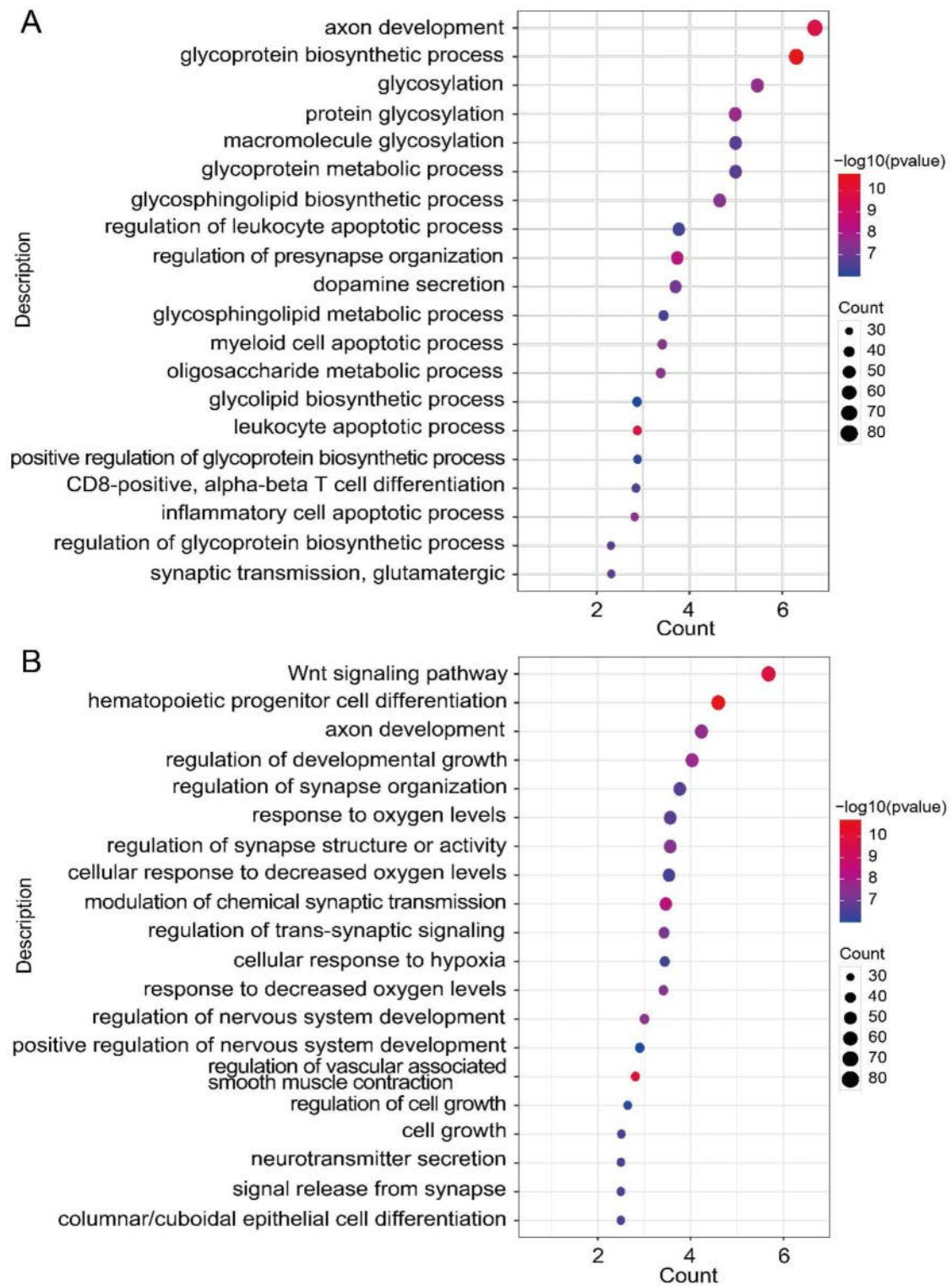


图3

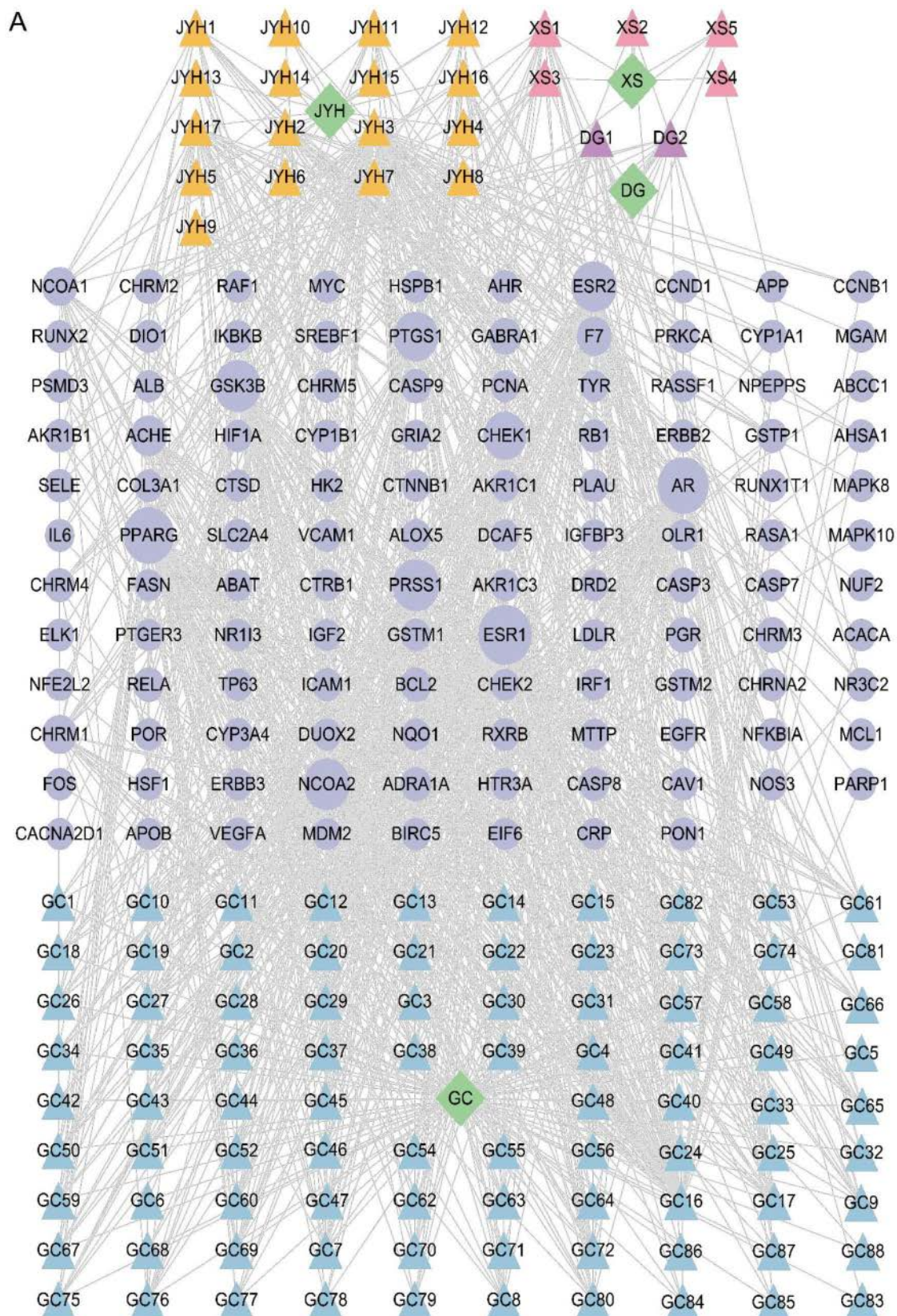


图4

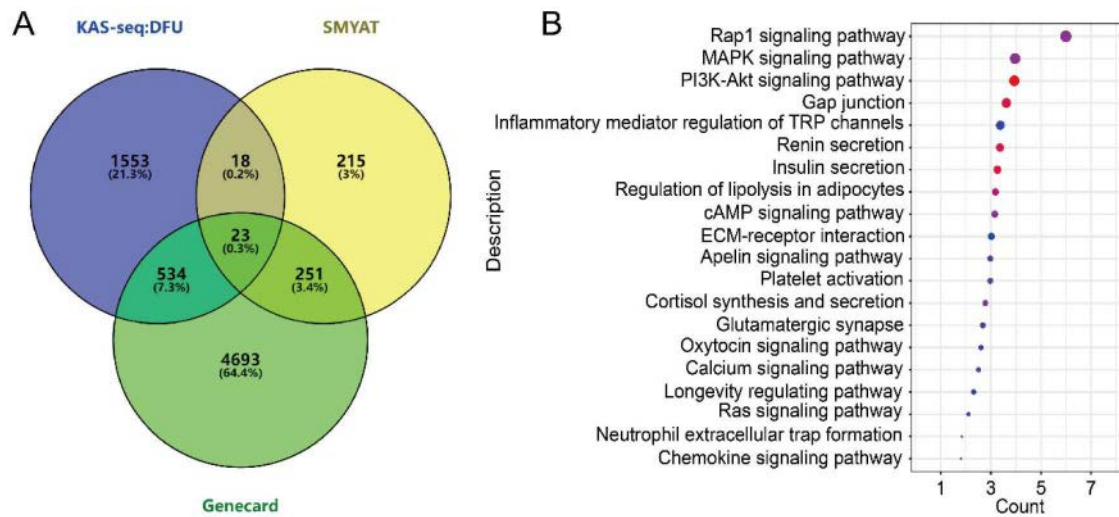


图5

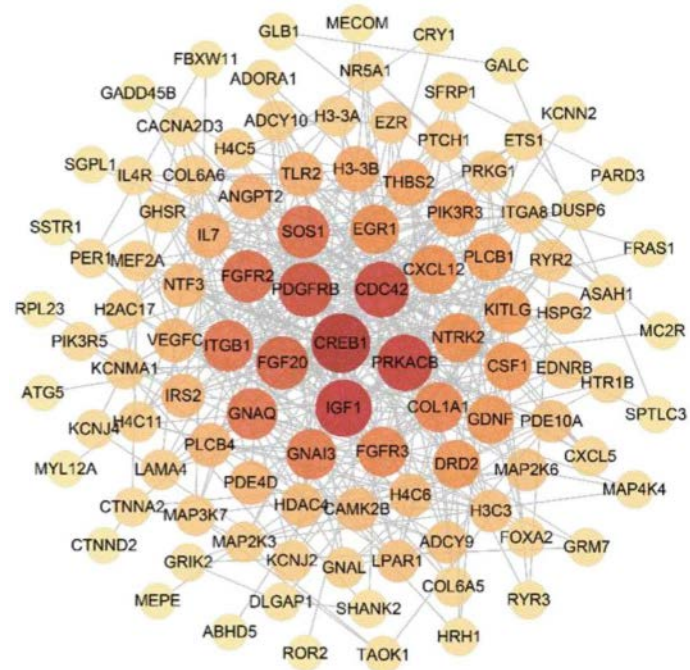


图6

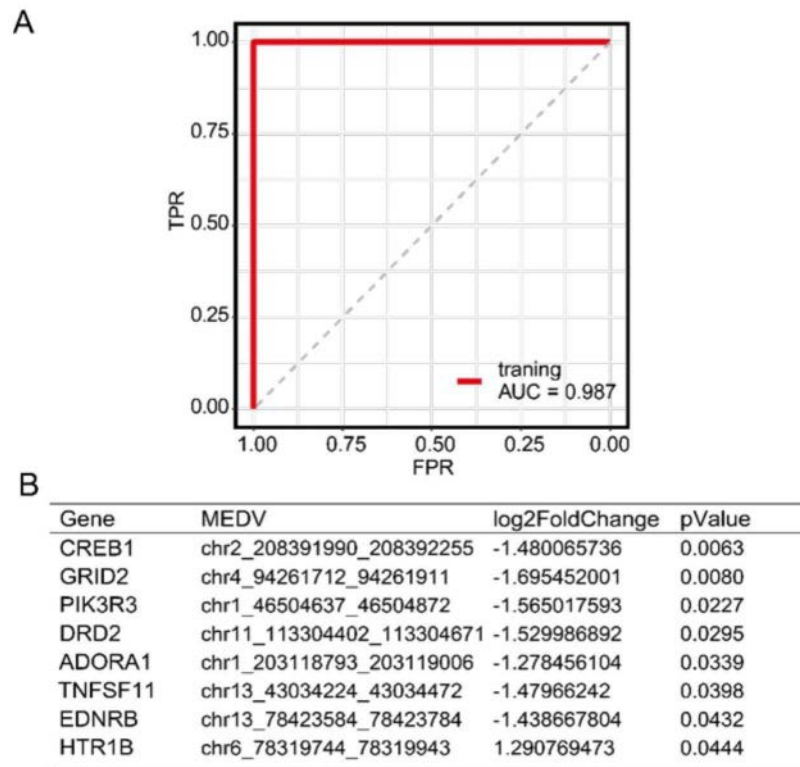


图7

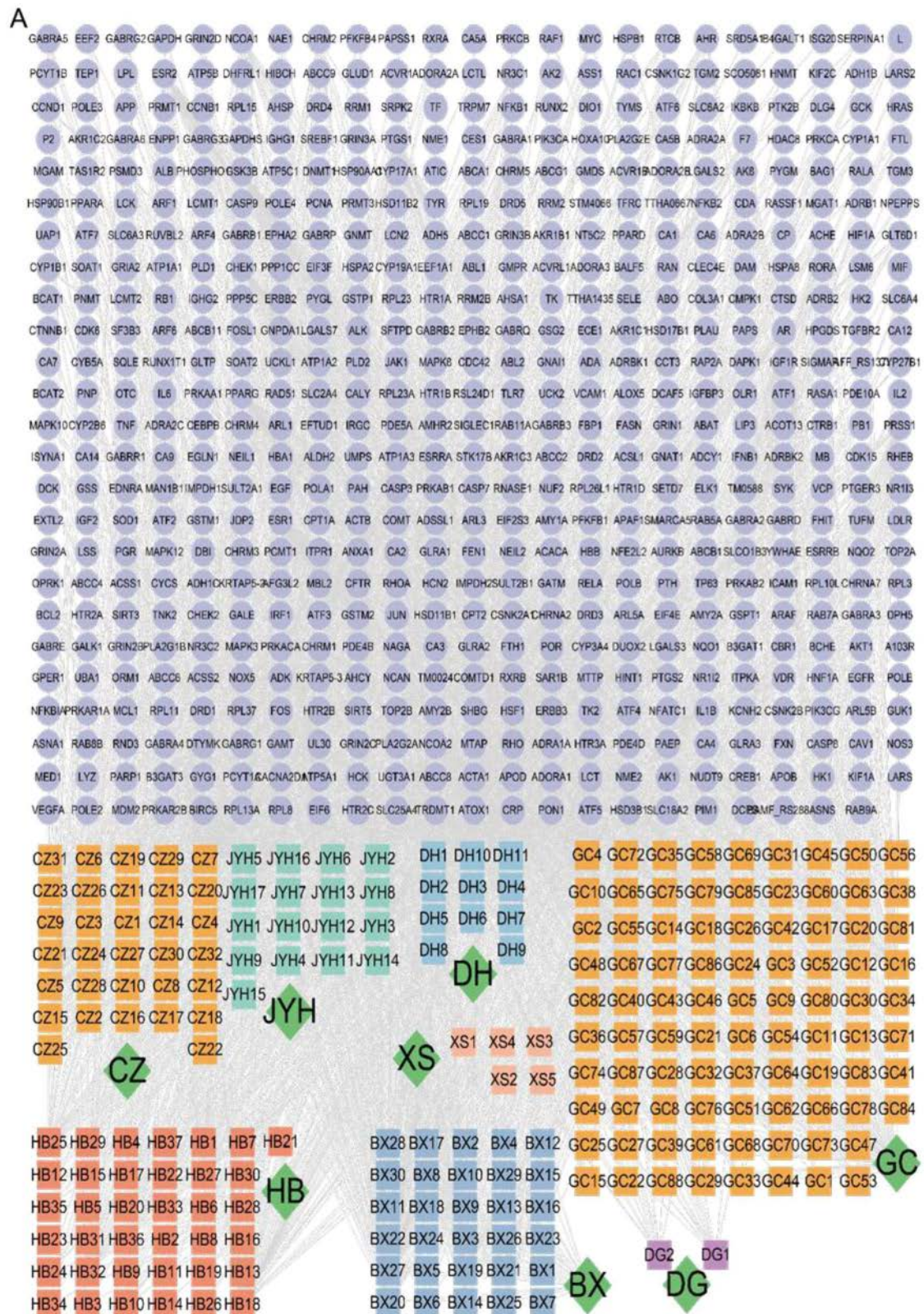


图8

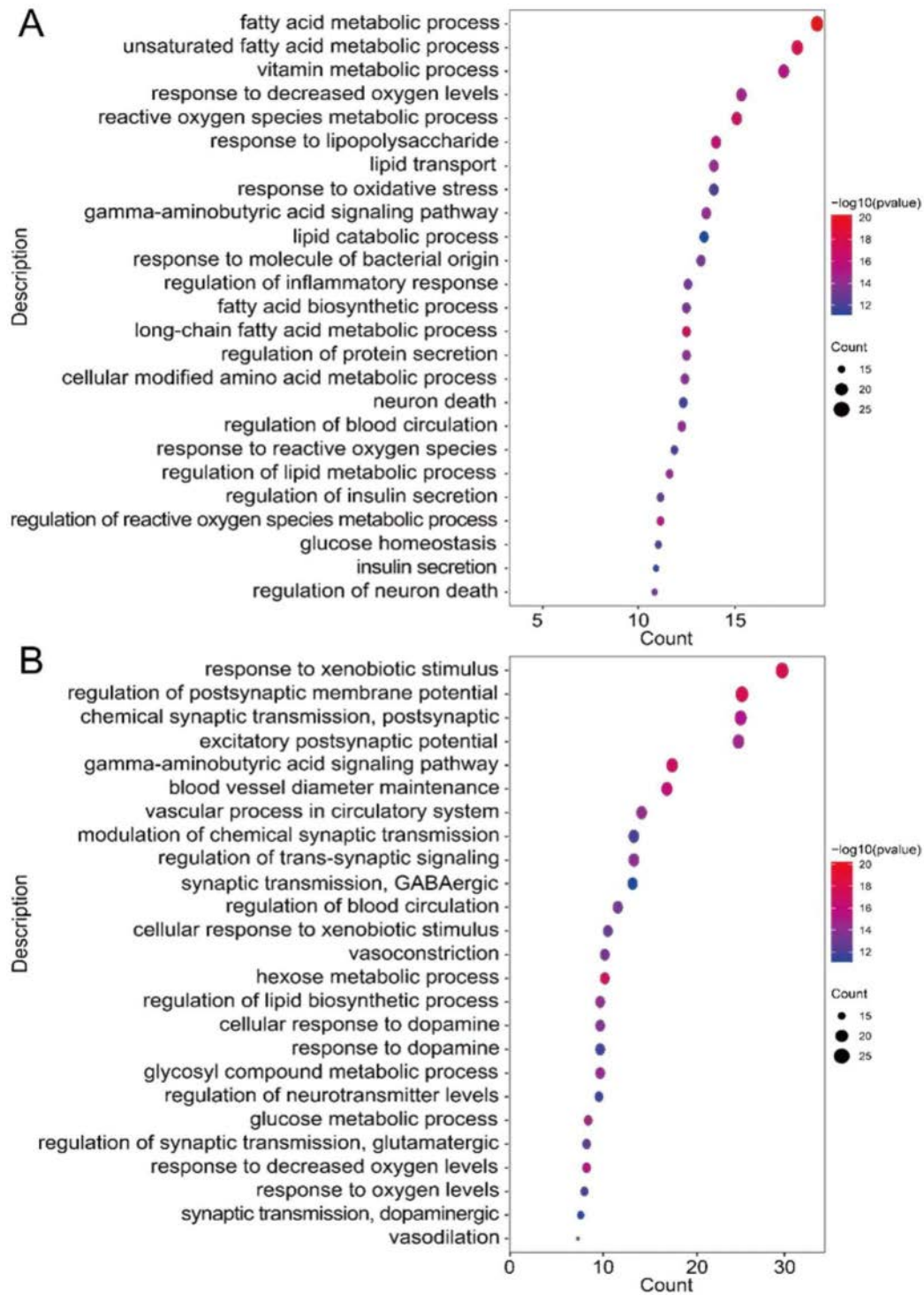


图9

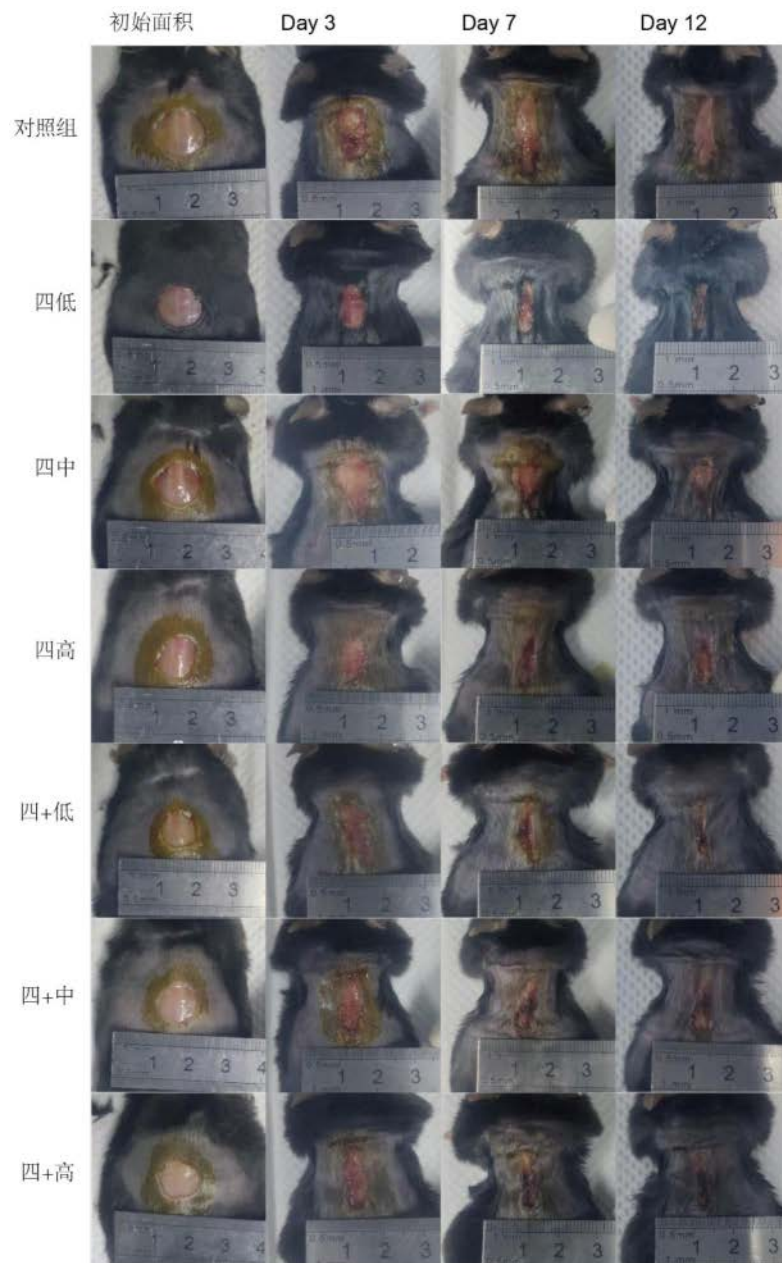


图10

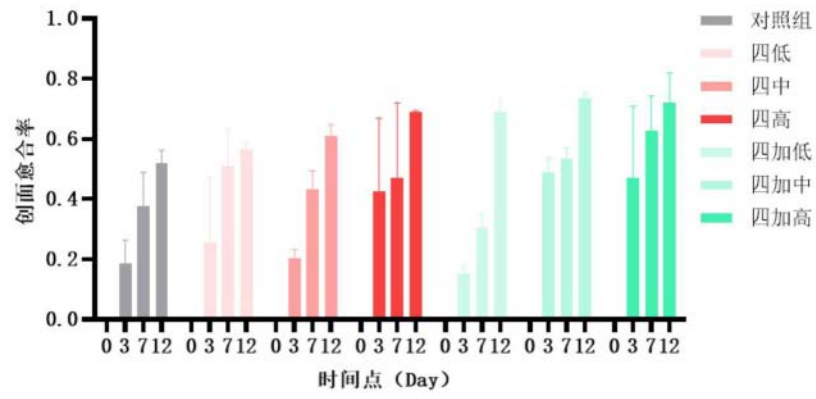


图11

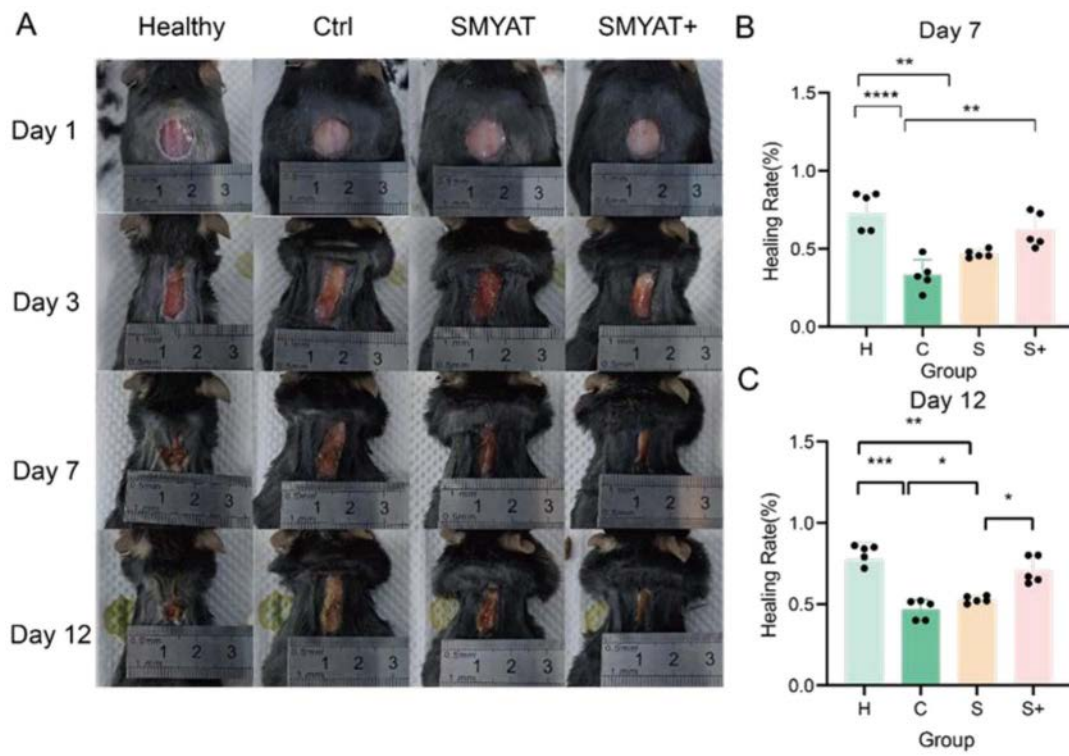


图12

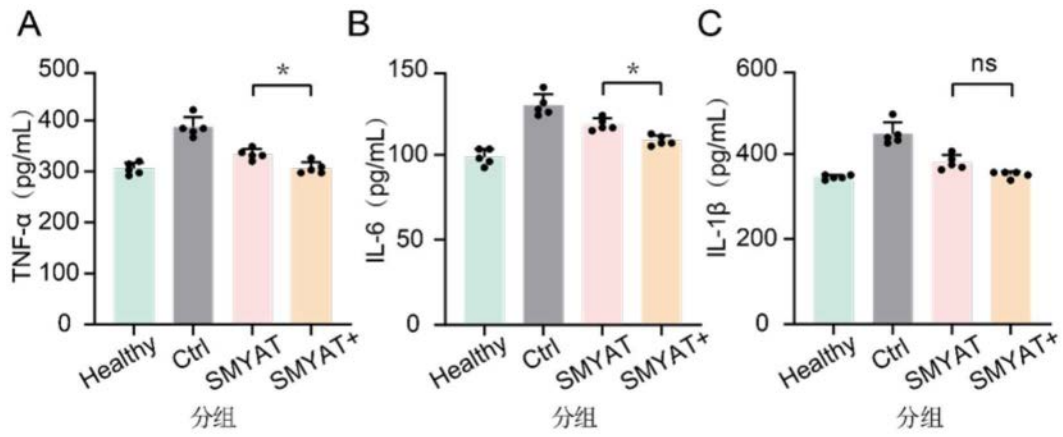


图13

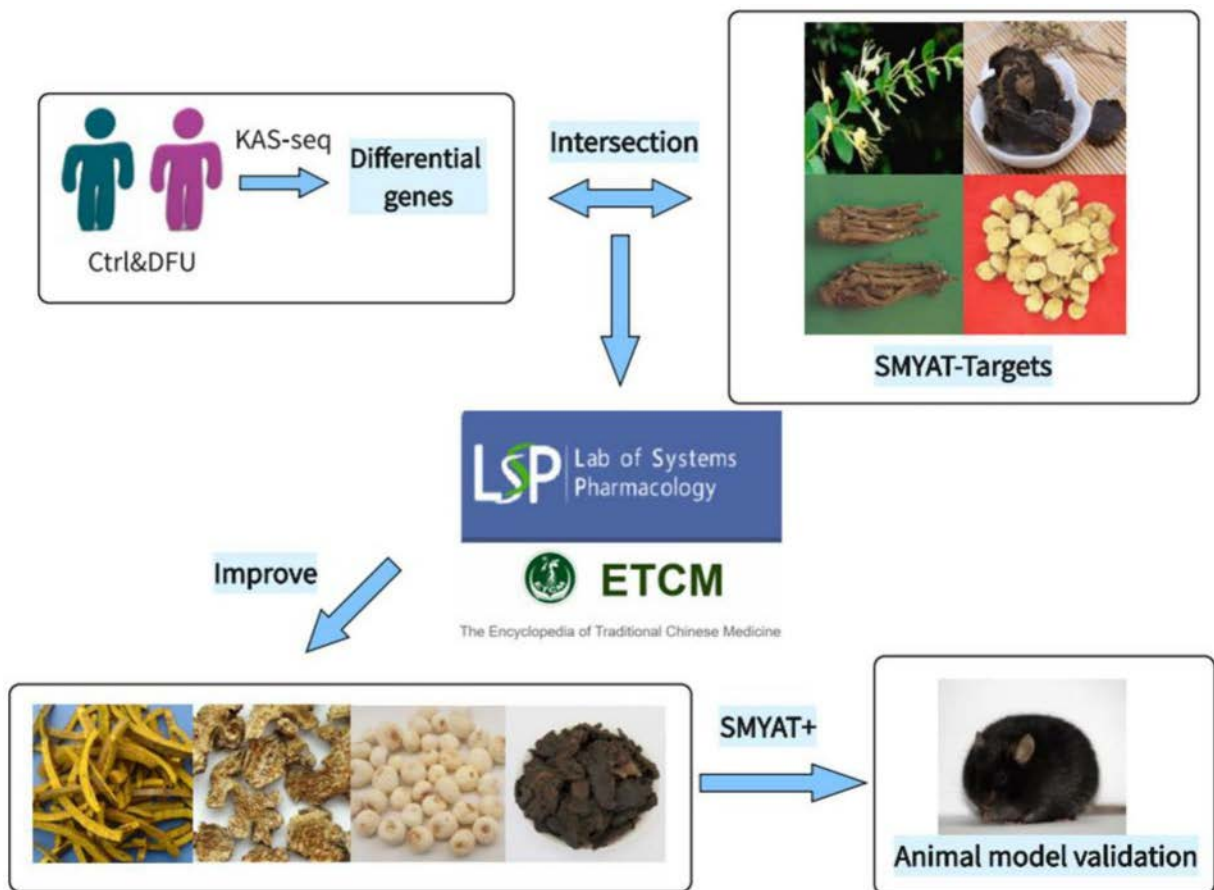


图14