

下丘脑垂体与创面修复疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003324

# 内皮高表达脂多糖相关因子 1 通过影响 NF- $\kappa$ B 信号通路促进糖尿病小鼠皮肤创面愈合的研究

张 星, 冷蔚玲, 雷小添, 何 雨, 梁自文  
(陆军军医大学第一附属医院内分泌科, 重庆 400038)

**【摘要】目的:**探讨内皮高表达脂多糖相关因子 1 (endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1) 对 2 型糖尿病小鼠皮肤创面愈合效果及机制。**方法:**选取 SPF 级 6 周龄 db/db 糖尿病小鼠, 构建全层皮肤创面模型, 在创口周边注射 EOLA1 高表达慢病毒。小鼠分为正常对照组、空载体慢病毒组、EOLA1 慢病毒组。除正常对照组外, 拍照记录不同时期小鼠创口愈合情况, 造模第 15 天取创口及周边皮肤, HE 染色观察创面肉芽组织及炎性浸润, Masson 染色观察创面胶原纤维沉积, 免疫荧光检测 ARG1、iNOS 观察巨噬细胞分型, Western blot 及 Real-time PCR 检测 NF- $\kappa$ B 信号通路 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ 、p65 蛋白表达和 EOLA1、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  基因表达水平。**结果:**与空载体慢病毒组相比, EOLA1 慢病毒组小鼠皮肤伤口愈合速度加快, 肉芽组织及胶原纤维形成增多。EOLA1 慢病毒组 M2 型巨噬细胞标志物 ARG1 表达升高, M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 表达降低。EOLA1 慢病毒组 I $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白表达升高, p-I $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白表达降低, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  基因表达水平下调。**结论:**EOLA1 可抑制糖尿病小鼠皮肤创面局部炎症, 加速创面愈合, 其机制可能为通过上调巨噬细胞内 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达, 封闭 p65 活性, 从而抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的释放, 巨噬细胞的表型也表现为从促炎症的 M1 型向促愈合的 M2 型转变。提示 EOLA1 在糖尿病创面具有抗炎促愈的潜力。

**【关键词】**内皮高表达脂多糖相关因子 1; NF- $\kappa$ B; 糖尿病; 皮肤创面愈合; 炎症

**【中图分类号】**R364.5

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2023-05-30

## Endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 promotes skin wound healing in diabetic mice by affecting the nuclear factor-kappa B signaling pathway

Zhang Xing, Leng Weiling, Lei Xiaotian, He Yu, Liang Ziwen

(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Army Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) on skin wound healing in mice with type 2 diabetes and the related mechanisms. **Methods:** Specific pathogen-free db/db diabetic mice, aged 6 weeks, were used to establish a model of full-thickness skin wound, and the lentivirus with high EOLA1 expression was injected around the wound. The mice were divided into normal control group, empty vector lentivirus group, and EOLA1 lentivirus group. For all mice except those in the normal control group, photos were taken at different time points to observe wound healing; after the samples of the wound and the skin around the wound were collected on day 15 of modeling, HE staining was used to observe wound granulation tissue and inflammatory infiltration, Masson staining was used to observe collagen fiber deposition at the wound, immunofluorescence assay was used to measure ARG1 and iNOS for macrophage typing, and Western blot and real-time PCR were used to measure the protein expression levels of the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways proteins I $\kappa$ B- $\alpha$ , p-I $\kappa$ B- $\alpha$ , and p65 and the gene expression levels of EOLA1, Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). **Results:** Compared with the empty vector lentivirus group, the EOLA1 lentivirus group had a significantly higher speed of skin wound healing and significant increases in the formation of granulation tissue and collagen fibers. The EOLA1 lentivirus group had an increase in the expression of the M2 macrophage marker ARG1 and a reduction in the expression of the M1 macrophage marker iNOS, as well as an increase in the protein expression of I $\kappa$ B- $\alpha$ , a reduction in the protein expression of p-I $\kappa$ B- $\alpha$ , and downregulation of the gene expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . **Conclusion:** EOLA1 can inhibit local skin wound inflammation and accelerate wound healing in diabetic mice, possibly by upregulating the expression of I $\kappa$ B- $\alpha$  in macrophages, blocking the activity of p65, and then inhibiting the release of the inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and the phenotype of macrophages changes from M1 type for promot-

作者介绍: 张 星, Email: axing03@outlook.com,

研究方向: 内皮高表达脂多糖相关因子 1 在糖尿病创面中的作用及其机制研究。

通信作者: 梁自文, Email: ziwengliang99@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81670711、82000792)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20230927.1720.014>

(2023-10-07)

ing inflammation to M2 type for promoting healing, suggesting that EOLA1 has the potential to protect diabetic wound from inflammation and promote wound healing.

**[Key words]** endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1; nuclear factor- $\kappa$ B; diabetes; skin wound healing; inflammation

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是最严重的糖尿病慢性并发症之一。DFU 主要表现为皮肤慢性难愈性损伤,常伴组织结构破坏和感染<sup>[1]</sup>。临床治疗效果差,复发率较高,常导致部分患者截肢甚至死亡<sup>[2-3]</sup>。DFU 发病机制主要为高糖环境下机体氧化应激水平升高<sup>[4]</sup>,巨噬细胞 M1/M2 表型转变异常所致持续炎症状态<sup>[5]</sup>,以及血管新生障碍延缓伤口愈合<sup>[6]</sup>。目前 DFU 主要治疗策略为局部清创、负压引流、血运重建、外用敷料、干细胞疗法、细胞生长因子使用、感染控制等<sup>[7-8]</sup>。然而 DFU 发生发展过程受诸多因素影响,发病机制复杂且尚未完全阐释清楚,即便采用以上标准的治疗方式和尽早干预治疗,治愈率仍然差强人意,且花费巨大,严重影响患者生存质量。因此,亟需深入研究 DFU 发病机理及调控机制。

内皮高表达脂多糖相关因子 1(endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1, EOLA1)是经脂多糖刺激人脐静脉内皮细胞上调表达的基因,功能未完全阐明<sup>[9]</sup>。EOLA1 蛋白质结构中包含类似激活信号辅整合素-1 同源(activating signal cointegrator-1 homology, ASCH)结构域,ASCH 具有辅助转录调控的作用,EOLA1 的结构特征赋予其参与基因转录调控的功能<sup>[10]</sup>。EOLA1 静息状态下微弱表达,脂多糖刺激后表达上调,并抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)等炎症因子释放,促进细胞增殖和抑制凋亡<sup>[11-14]</sup>。为了观察 EOLA1 在组织炎症反应中的调控作用,在肝移植鼠模型中沉默 EOLA1 的表达,鼠移植排斥反应明显加重<sup>[15]</sup>。此外,有研究发现相较于早期人 DFU,在晚期 DFU 创面中,EOLA1 的表达显著下调,核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、IL-6 的表达增加<sup>[16]</sup>。表明 EOLA1 参与了 DFU 创面整个修复过程,晚期 DFU 局部 EOLA1 的表达下调致使 DFU 局部炎症持续,创面难以愈合。众所周知适度的炎症反应有利于创口愈合,而 DFU 创面常呈过度的炎症状态,原因

为高血糖诱导巨噬细胞 M1 型极化的同时抑制巨噬细胞 M1 型向 M2 型的转化,导致 DFU 伤口由炎症反应期进入增殖期时间延长<sup>[15,17]</sup>。实验研究发现脂多糖刺激过表达 EOLA1 的巨噬细胞,检测 M2 型巨噬细胞标志物 CD86 表达升高,M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 表达降低<sup>[18]</sup>。表明 EOLA1 参与了巨噬细胞极化,其表达改变可能是慢性炎症反应迁延的影响因素。

本研究旨在选用 db/db 自发 2 型糖尿病小鼠构建皮肤创面,以模拟糖尿病慢性创面模型。在小鼠皮肤创面周围注射 EOLA1 高表达慢病毒,观察 EOLA1 基因在创面局部炎症反应和创面愈合的干预效果,探索 EOLA1 在糖尿病慢性创面中潜在的抗炎促愈作用及其调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与细胞

雄性 db/db 糖尿病小鼠,6 周龄,体质量 30~35 g,购自重庆恩斯维尔生物技术有限公司,小鼠饲养在无特定病原体的条件下,光照为阴暗交替 12 h,饲养温度 20℃~26℃,相对湿度 30%~70%,动物实验经陆军军医大学动物保护与伦理委员会批准(伦理号 AMUWEC20226034)。

用于生产慢病毒的人胚胎肾 293 T 细胞生长条件为 37℃、5%CO<sub>2</sub>,在 Dulbecco's 改良 Eagle 培养液(DMEM, Thermo)中加入 10% 胎牛血清(FBS, HyClone)、1% 青霉素和链霉素培养细胞。

### 1.2 慢病毒制备

根据 GenBank 数据库公布的小鼠 EOLA1 cDNA 模板设计的聚合酶链式反应扩增引物如下:forward 5'-TCTACTAGAGGATCTATTTCCGGTGAATTCGCCACCATGAAGTTTCCT-3',reverse 5'-ACTTAAGCTTGCTACCGAGGATCCTTGCTTTC TCCAGTGGGATCAAGT-3',通过 PCR 扩增 EOLA1 基因,并经测序验证目的基因序列。EOLA1 基因产物通过 EcoRI、BamHI 进行双酶切,将其连接到慢病毒载体 PLVX-IRES-ZsGreen1 的相同酶切位点上。

人胚胎肾 293T 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中,24 h 后达到 70%~80% 融合,将携带目的基因的慢病毒工具载体 pLVX-EOLA1-IRES-ZsGreen1 与两种包装辅助载体(pLV-Helper1.0、pLV-Helper2.0)通过 Lentifusion Max 转基因试剂(博艾迈迪森生物)共转染入细胞。分别于 48 h 和 72 h 收集

上清液,离心丢弃细胞及杂质,使用0.45 $\mu$ m聚偏氟乙烯过滤器去除细胞碎片,用PEG-8000(Sigma)浓缩法浓缩与纯化慢病毒,集中分装浓缩后的病毒悬液,储存在-80 $^{\circ}$ C。以暗礁珊瑚荧光蛋白(zoanthus green fluorescent protein, Zsgreen)为观察指标,采用梯度稀释法进行病毒滴度检测,以每毫升含有生物活性的病毒颗粒数(TU/mL)进行计数。

### 1.3 动物糖尿病皮肤溃疡模型构建及慢病毒注射

动物高脂饲料喂养两周,测小鼠尾静脉血糖,两次随机血糖>16.7 mmol/L后进入实验。将小鼠随机分为3组( $n=9$ ):正常对照组、空载体慢病毒对照组、EOLA1 过表达慢病毒组。除正常对照组外,腹腔注射 70 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉小鼠,脱毛,固定小鼠背中线两侧皮肤,使用直径为 6 mm 打孔器制备 2 个圆形全层皮肤创口模型。造模成功后在小鼠背部创面周边取 5 个注射点经皮内注射慢病毒,每注射点 20  $\mu$ L,共 100  $\mu$ L,  $2 \times 10^6$  TU 病毒量,空载慢病毒组注射只表达 Zsgreen 的空载慢病毒, EOLA1 慢病毒组注射可表达 EOLA1 和 Zsgreen 的慢病毒。

### 1.4 创面观察与取材

小鼠造模成功后,分别于第 0、3、6、9、12、15 天拍照记录创面图像,采用 ImageJ 软件记录不同时间点创面面积,计算两组小鼠创面愈合速率。造模第 15 天,称取小鼠重量,全身麻醉后剪取创面及边缘皮肤组织,4% 多聚甲醛中固定 24 h,逐级乙醇脱水,按石蜡包埋切片技术制成 5  $\mu$ m 厚的薄片并烘干保存。剪取创面及周边皮肤组织,使用 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,使用苯酚-氯仿法提取组织总 RNA,组织蛋白及 RNA 样品储存于-80 $^{\circ}$ C。

### 1.5 染色和免疫荧光

石蜡包埋组织切片脱蜡复水,分别进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)或者马松染色(masson's trichrome stain, Masson),中性树胶封片。使用光学显微镜获取图像,分析创面组织结构、肉芽组织及胶原沉积情况。取石蜡包埋组织切片脱蜡复水,放入枸橼酸盐缓冲液煮沸 10 min 进行抗原修复,1 $\times$ PBS 清洗,山羊血清室温封闭 60 min,每张切片组织滴加足够量一抗 ARG1(1:100)、iNOS(1:500)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日,室温复温 30 min,1 $\times$ PBS 清洗,滴加荧光二抗 CY3(1:800)室温孵育 60 min,1 $\times$ PBS 清洗,DAPI 对标本进行染核,避光孵育 15 min,1 $\times$ PBS 清洗,含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察并采集图像。

### 1.6 实时荧光定量 PCR

小鼠创口组织(50 mg/管)加入 TRIzol 试剂(Invitgen),用 QIAGEN Tissue Ruptor 进行匀浆,按试剂说明书提取总 RNA,使用 Nano Drop(Thermo Fisher Science)测量样品 RNA 浓度,PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047A, Takara)将样品 RNA 逆转录成 cDNA, TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (RR820A, Takara)进行实时荧光定量聚合酶链式反应,实验数据用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法分析基因的相对表达水平。所有实验进行 3 次生物学重复。小鼠 GAPDH 作为内参基因。引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

引物名称	序列 5'-3'
GAPDH	GAPDH-F AACTTTGGCATTGTGGAAGG
	GAPDH-R ACACATTGGGGGTAGGAACA
EOLA1	EOLA1-F CCATCCACATTGCTCACAAG
	EOLA1-R TGCAGATTGGTTAGCACAGC
TNF $\alpha$	TNF $\alpha$ -F GAACTGGCAGAAGAGGCACT
	TNF $\alpha$ -R AGGGTCTGGGCCATAGAAGT
IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$ -F GCCCATCTCTGTGACTCAT
	IL-1 $\beta$ -R AGGCCACAGGTATTTTGTCTG
TLR4	TLR4-F ACCTGGCTGGTTTACACGTC
	TLR4-R CTGCCAGAGACATTGCAGAA

### 1.7 Western blot

小鼠创口组织(50 mg/管)加入含有蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液(Beyotime),用 QIAGEN Tissue Ruptor 使样品破碎并匀浆化,于冰上裂解 20 min, 12 000 g 离心 5 min,收集上清液。BCA 试剂盒(Thermo Fisher Science)测定蛋白浓度,加入 Loading buffer 煮沸 5 min 使蛋白裂解变性, SDS-PAGE 分离蛋白裂解产物,并将其转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 2 h,然后加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,最后与偶联 HRP 的二抗室温孵育 2 h。I $\kappa$ B- $\alpha$  抗体(4814, CST)、p-I $\kappa$ B- $\alpha$  抗体(9242, CST)、NF- $\kappa$ B p65 抗体(8242, CST)为一抗,羊抗兔/鼠 IgG(Sigma)为二抗。所有条带使用 Tannon-4200 凝胶成像系统进行曝光,以  $\beta$ -actin 作为内参对照。

### 1.8 统计学处理

使用 GraphPad Prism 9 进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用非配对  $t$  检验,三组及以上的多组样本间两两比较采用方差分析和多重比较。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

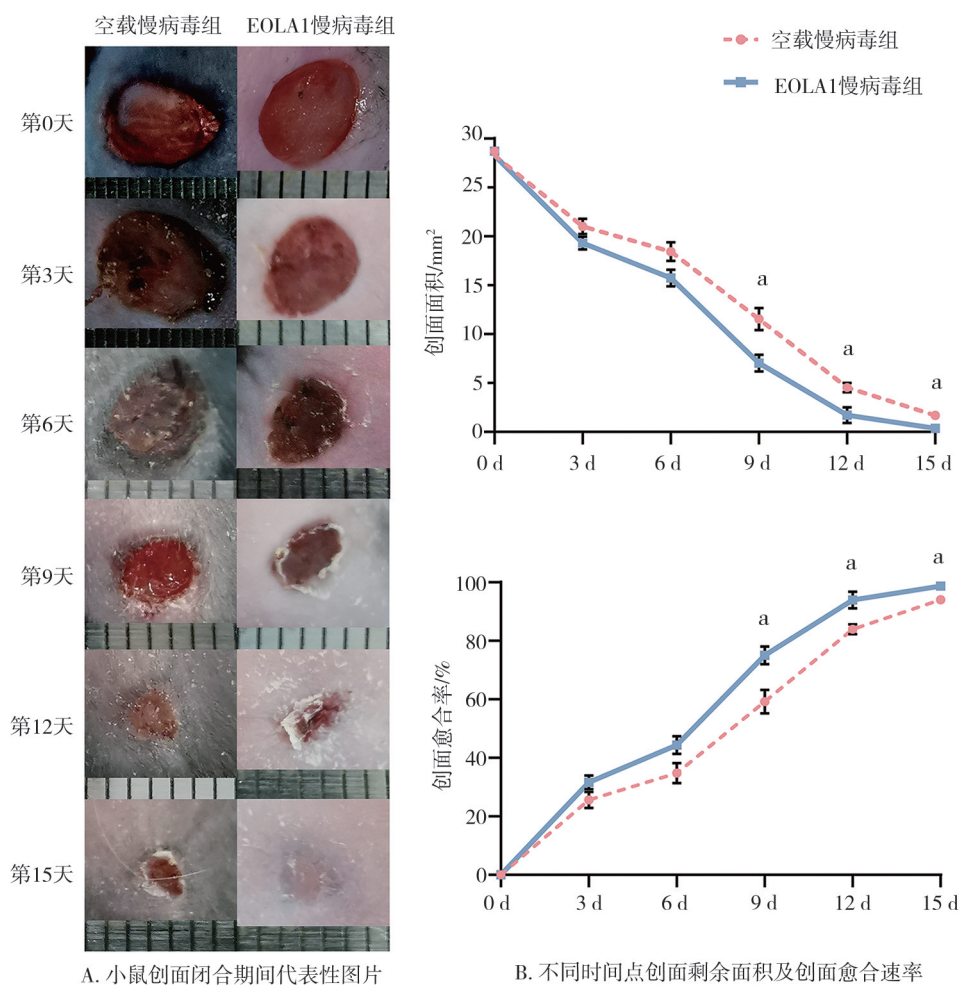
### 2.1 EOLA1 促进糖尿病皮肤溃疡愈合

观察两组小鼠创面愈合情况,如图 1A 所示,与空载慢病毒组相比,EOLA1 慢病毒组小鼠创面在第 9 天明显缩小,第 15 天完全愈合。进一步测量小鼠创面面积,与空载慢病毒组( $11.53 \pm 2.53$ ) mm<sup>2</sup>, ( $4.54 \pm 1.07$ ) mm<sup>2</sup>, ( $1.68 \pm 0.86$ ) mm<sup>2</sup> 相比,EOLA1 慢病毒组小鼠在第 9、12、15 天创面明显缩小,分别为( $7.04 \pm 1.93$ ) mm<sup>2</sup>, ( $1.7 \pm 1.8$ ) mm<sup>2</sup>, ( $0.36 \pm 0.58$ ) mm<sup>2</sup>。差异有显著性意义( $P<0.05$ ),见图 1B。

### 2.2 EOLA1 对皮肤创面肉芽组织及胶原沉积的影响

观察各组小鼠皮肤组织 HE 染色,见图 2A。与对照组比较,EOLA1 慢病毒组和空载慢病毒组小鼠创面呈炎症病理改变。与空载慢病毒组比较,EOLA1 慢病毒组小鼠创口炎性细胞浸润减少,大量新生血管及成纤维细胞形成。Masson 染色结果显示 EOLA1 慢病毒组创口处胶原沉积明显,可见毛囊结构皮肤附属器官形成,见图 2B。





注:  $n=3$ ; a: 与空载慢病毒组比较,  $P < 0.05$

图1 小鼠创面愈合情况

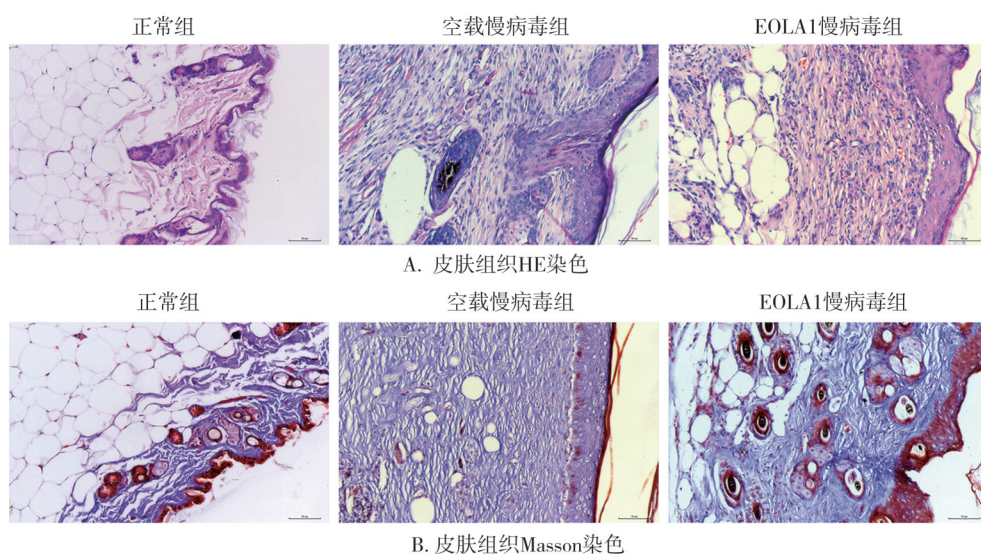
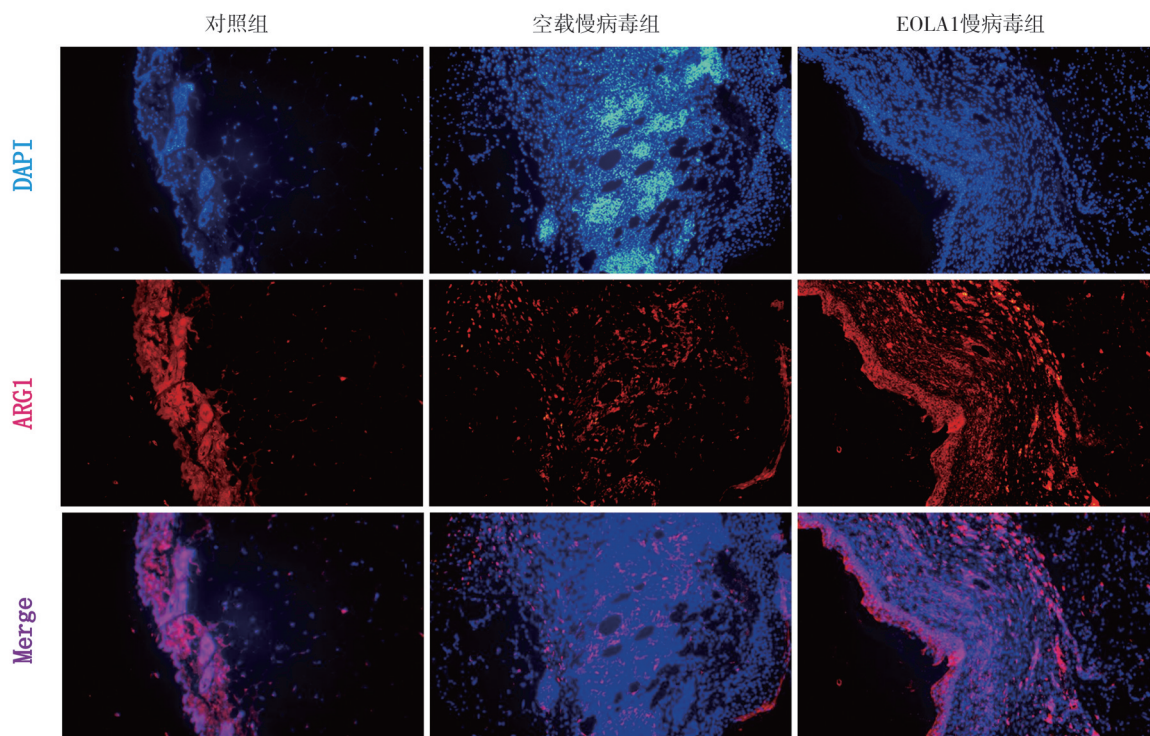


图2 第15天各组小鼠皮肤创面组织学观察

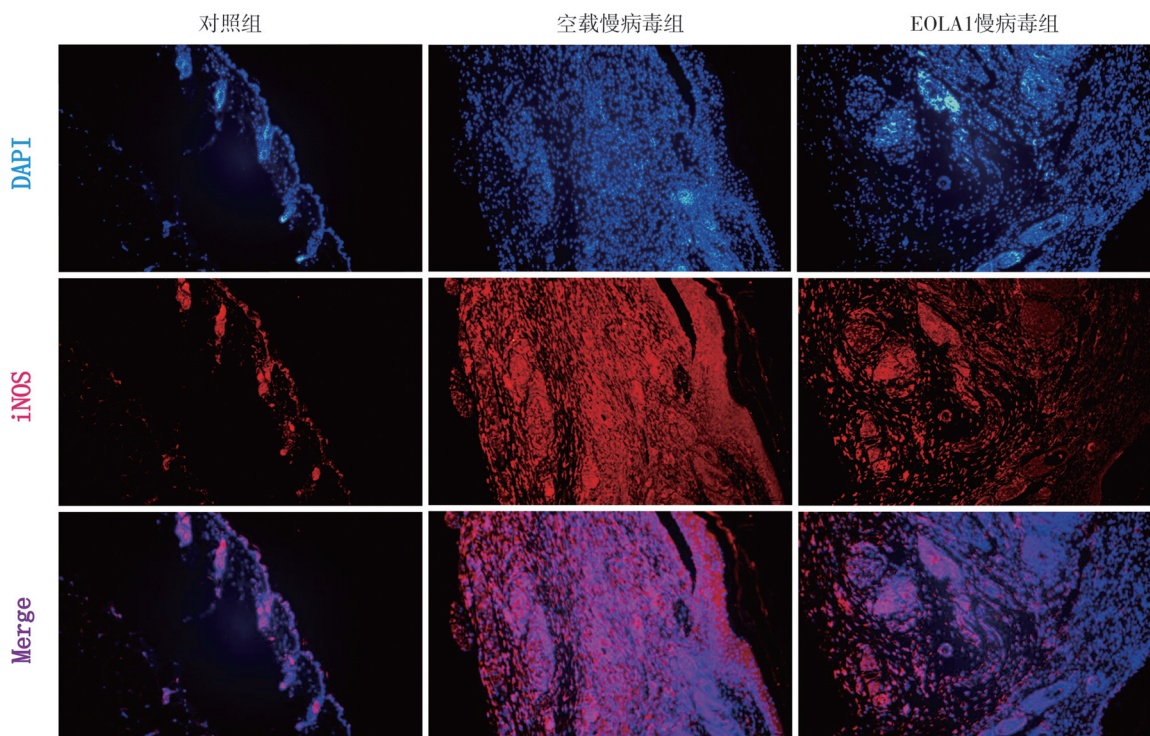
### 2.3 皮肤创面巨噬细胞免疫荧光检测结果

如图3所示,观察各组小鼠组织免疫荧光结果,与空载

慢病毒组比较, EOLA1 慢病毒组 M2 型巨噬细胞标志物 ARG1 显著升高, M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 明显下降。



A. 各组ARG1表达代表性图片



B. 各组iNOS表达代表性图片

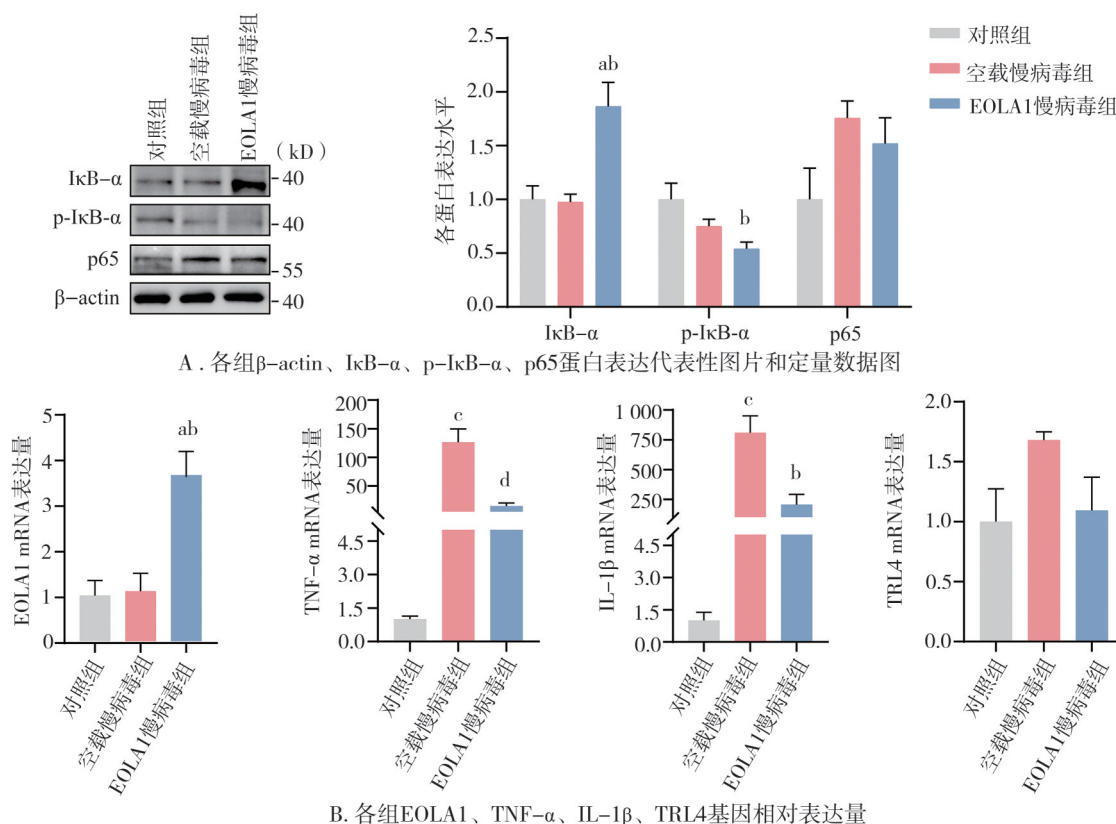
图3 第15天各组皮肤创面组织免疫荧光图

#### 2.4 EOLA1影响NF- $\kappa$ B炎症信号通道相关分子表达

如图4所示,各组蛋白免疫印迹杂交显示,EOLA1慢病毒组 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达增加,p-I $\kappa$ B- $\alpha$  表达降低。各组 RT-qPCR 显示,EOLA1 慢病毒组 EOLA1 基因表达上调,

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  基因表达下调。以上数据说明,EOLA1 可通过上调 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达,影响 p65 活化,进而抑制下游炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  释放从而改善局部慢性炎症反应。





注:  $n=3$ ; a, 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b, 与空载慢病毒组比较,  $P < 0.05$ ; c, 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; d, 空载慢病毒组比较,  $P < 0.01$

图4 第15天各组皮肤创面组织NF-κB炎症信号通道相关分子表达图

### 3 讨论

皮肤创面愈合是一个复杂的生理过程,包括各种组织再生、肉芽组织增生以及瘢痕形成。愈合过程由前期炎症反应阶段过渡到后期组织重塑阶段,各阶段由多种细胞和组织因子按照一定顺利相互协调分工完成,任一阶段阻滞都可能会使局部缺血及再灌注损伤,影响皮肤伤口再上皮化修复<sup>[19]</sup>。DUF由于高血糖刺激,机体氧化应激水平升高,影响伤口愈合的各阶段。高糖微环境可促进炎症介质释放,诱导巨噬细胞向其他免疫细胞浸润,巨噬细胞聚集及吞噬功能减弱<sup>[19]</sup>。高血糖也可诱导巨噬细胞向M1型巨噬细胞持续极化,致使创面长期处于炎症高反应状态<sup>[5]</sup>。此外,糖尿病患者成纤维细胞及血管内皮细胞再生功能下调,使肉芽组织再生受阻以及局部新生血管障碍导致创面愈合缓慢<sup>[6]</sup>。这表明治疗DUF创面是一个非常棘手的临床问题。目前针对DUF有许多治疗策略,包括基础血糖控制、全身抗感染、改善血供、创面干预治疗等。然而,由于DUF发病机制复杂,即使采用多学科综合治疗,创面仍然难以愈合。因此,迫切需要深入研

究糖尿病足溃疡发生发展的分子机制,寻找抑制炎症反应的关键节点,为治疗DUF提供新思路。

本研究选用db/db自发2型糖尿病小鼠构建皮肤创面模型,制备EOLA1过表达慢病毒,在小鼠创面周围注射EOLA1高表达慢病毒,探索EOLA1是否可促进糖尿病小鼠创面愈合及其调控机制。与对照组相比,造模第15天时,EOLA1慢病毒组小鼠HE染色显示创面肉芽组织新生血管数量明显,Masson染色显示创面的胶原蛋白沉积也明显增加。此外,记录创面愈合全过程发现实验组小鼠伤口愈合速率加快,表明EOLA1可促进创面修复。进一步观察创面组织巨噬细胞分型情况,相较于对照组,EOLA1慢病毒组M2型巨噬细胞ARG1表达升高,而M1型巨噬细胞ARG1表达降低。巨噬细胞参与创面愈合,M1巨噬细胞释放炎症因子促进创面炎症反应,而M2巨噬细胞释放抗炎因子及生长因子加速创面愈合<sup>[20]</sup>。因此,实验组创面组织M2型巨噬细胞浸润增加是加速伤口愈合的原因之一。核因子NF-κB调节免疫细胞的激活和成熟<sup>[21]</sup>。DFU发病原因之一为细胞内活化NF-κB炎症信号通路不能及时终止<sup>[22]</sup>。目前关于NF-κB活化信号如何关闭不完全清楚,有研究表明上调IκB-α表达,可

将 NF- $\kappa$ B 从胞核中移除并送回胞质以重新封闭 NF- $\kappa$ B 的活化功能<sup>[23]</sup>。一些在体实验通过靶向 IKK $\beta$ /I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 途径,推动巨噬细胞向 M2 抗炎表型转变,改善了缺血再灌注损伤诱导的小鼠心肌纤维化和细胞凋亡<sup>[24]</sup>;通过干预 NF- $\kappa$ B/MAPK 通路,抑制巨噬细胞内 I $\kappa$ B- $\alpha$  等细胞因子的磷酸化,减轻了小鼠骨关节炎的炎症浸润和关节软骨退变<sup>[25]</sup>。本研究取创面组织进行了 WB 及 RT-qPCR 实验,与对照组糖尿病小鼠皮肤相比,EOLA1 慢病毒组创面组织 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达明显增加,p-I $\kappa$ B- $\alpha$  表达降低,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达明显降低。这表明 EOLA1 可促进细胞 I $\kappa$ B- $\alpha$  表达,抑制 I $\kappa$ B- $\alpha$  磷酸化,封闭了 NF- $\kappa$ B 活性,下调炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的转录表达。

综上,本研究在糖尿病小鼠皮肤创面模型中验证了 EOLA1 参与了调控糖尿病小鼠的创面修复。可能的分子机制为 EOLA1 调控了细胞核内 I $\kappa$ B- $\alpha$  转录和表达,并抑制 I $\kappa$ B- $\alpha$  磷酸化修饰,将 NF- $\kappa$ B 限定在胞浆抑制其转位入核,从而下调 NF- $\kappa$ B 信号通路炎症因子的释放。此外,EOLA1 可能作为抑炎信号分子诱导巨噬细胞由 M1 型向 M2 型巨噬细胞转型,其分子调控机制需更多基础实验进一步探索。

## 参 考 文 献

- [1] Prompers L, Huijberts M, Apelqvist J, et al. High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(1): 18–25.
- [2] Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes[J]. *JAMA*, 2005, 293(2): 217–228.
- [3] Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(24): 2367–2375.
- [4] Patel S, Srivastava S, Singh MR, et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108615.
- [5] Boniakowski AE, Kimball AS, Jacobs BN, et al. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing[J]. *J Immunol*, 2017, 199(1): 17–24.
- [6] Liu D, Yang P, Gao M, et al. NLRP3 activation induced by neutrophil extracellular traps sustains inflammatory response in the diabetic wound[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(4): 565–582.
- [7] 谷涌泉. 中国糖尿病足诊治指南[J]. *中国临床医生杂志*, 2020, 48(1): 19–27.
- [8] Gu Y. Guideline on the diagnosis and treatment of diabetic foot in China[J]. *Chinese Journal of Clinicians*, 2020, 48(1): 19–27.
- [9] Lim JZ, Ng NS, Thomas C. Prevention and treatment of diabetic foot ulcers[J]. *J R Soc Med*, 2017, 110(3): 104–109.
- [10] Liang Z, Yang Z. Identification and characterization of a novel gene EOLA1 stimulating ECV304 cell proliferation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(3): 798–802.
- [11] 刘月明, 刘战立, 刘瀚池, 等. 人新基因 EOLA1 生物信息学分析[J]. *成都医学院学报*, 2010, 5(1): 1–7.
- [12] Liu Y, Liu Z, Liu Y, et al. Bioinformatics analysis of human novel gene EOLA1[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2010, 5(1): 1–7.
- [13] Leng W, Lei X, Meng H, et al. EOLA1 inhibits lipopolysaccharide-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression by association with MT2A in ECV304 Cells[J]. *Int J Inflam*, 2015, 2015: 301562.
- [14] Liu Y, Liu H, Chen W, et al. EOLA1 protects lipopolysaccharide induced IL-6 production and apoptosis by regulation of MT2A in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 395(1–2): 45–51.
- [15] 陈 渝, 梁自文, 刘月明, 等. 人内皮高表达脂多糖相关因子 1 强制表达模型的建立及对 ECV304 细胞增殖的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2005(4): 278–281.
- [16] Chen Y, Liang Z, Liu Y, et al. Establishment of human endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 compelling expression model and its effects on the proliferation of ECV304 cells[J]. *Chain J Burns*, 2005(4): 278–281.
- [17] 梁自文, 杨宗城, 陈建, 等. 抑制 ECV304 细胞内 EOLA1 基因表达后效应观察[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24(3): 293–297.
- [18] Liang Z, Yang Z, Chen J, et al. The effect of inhibiting EOLA1 expression in ECV304 cells [J]. *Chain J Med Genet*, 2007, 24(3): 293–297.
- [19] Ran CF, Dou K, Liang Z, et al. Changes in the expression of endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 in grafts during acute rejection following liver transplantation in rats[J]. *J Int Med Res*, 2008, 36(3): 460–466.
- [20] Wu M, Leng W, Pan H, et al. The Reduced Expression of EOLA1 may be related to refractory diabetic foot ulcer[J]. *Mediators Inflamm*, 2019(2019): 6705424.
- [21] Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot [J]. *Lancet*, 2005, 366(9498): 1736–1743.
- [22] 冷蔚玲, 雷小添, 张 星, 等. 内皮高表达脂多糖相关因子 1 抑制巨噬细胞炎症反应[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(6): 530–534.
- [23] Leng W, Lei X, Zhang X, et al. Endothelial overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 inhibits inflammatory response of macrophages[J]. *Immunological Journal*, 2022, 38(6): 530–534.
- [24] Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing[J]. *Br J Dermatol*, 2015, 173(2): 370–378.
- [25] Kim H, Wang SY, Kwak G, et al. Exosome-guided phenotypic switch of M1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(20): 1900513.
- [26] Dorrington MG, Fraser IDC. NF- $\kappa$ B Signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 705.
- [27] Tayanloo-Beik A, Roudsari PP, Rezaei-Tavirani M, et al. Diabetes and heart failure: multi-access approaches[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 705424.
- [28] Pan Y, Huang J, Xing R, et al. Metallothionein 2A inhibits NF- $\kappa$ B pathway activation and predicts clinical outcome segregated with TNM stage in gastric cancer patients following radical resection[J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 173.
- [29] Dong X, Jiang J, Lin Z, et al. Nuanxinkang protects against ischemia/reperfusion-induced heart failure through regulating IKK $\beta$ /I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B-mediated macrophage polarization[J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154093.
- [30] Zhou F, Mei J, Han X, et al. Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF- $\kappa$ B/MAPK signaling and protecting chondrocytes[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(5): 973–985.

(责任编辑:唐秋娜)