

解毒生肌膏调控 GSK-3β/β-catenin 减轻炎症反应促糖尿病 SD 大鼠慢性创面修复的影响

袁忠行¹, 陈丽², 丁雅容², 王巍¹, 王宇萌², 郑时旭², 洪恺祺², 周忠志³

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学医学院, 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学第一附属医院烧伤疮疡整形科, 长沙 410007)

【摘要】目的:从 GSK-3β/β-catenin 角度探讨炎症反应对糖尿病 SD 大鼠慢性创面修复的影响。**方法:**使用高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲霉素(Streptozocin, STZ)及手术制备全层皮肤缺损的方法建立糖尿病 SD 大鼠创面模型, 成模后随机分为模型组($n=15$), 碘胺嘧啶银组($n=15$)及解毒生肌膏组($n=15$), 并设立正常创面组($n=15$)。碘胺嘧啶银组创面和解毒生肌膏组创面予以碘胺嘧啶银软膏和解毒生肌膏外敷, 每日 1 次, 模型组与正常创面组不予干预。给药后第 3 天、7 天和 14 天肉眼观察各组大鼠的创面愈合情况, 计算创面愈合率; HE 观察组织基本形态; Masson 检测胶原生成情况; 超微电镜观察内质网结构差异; 免疫组织化学法检测肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)表达; 蛋白质免疫印迹法检测糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)蛋白和 β-连环蛋白(β-catenin)蛋白表达。**结果:**给药后 3 天解毒生肌膏组创面愈合率高于模型组($P<0.05$); 给药后 14 天解毒生肌膏组创面愈合率高于碘胺嘧啶银组($P<0.05$)。HE 结果: 给药后 3、7 天解毒生肌膏组创面较其他组肿胀程度较小, 毛细血管数量丰富; 14 天, 解毒生肌膏组和正常创面组出现皮肤附属器新生, 组织结构完整度好。Masson 结果: 解毒生肌膏组较其他各组胶原纤维分布均匀, 排列结构较为整齐, 新生胶原纤维更为粗壮, 分布均匀, 排列整齐。电镜结果: 解毒生肌膏组内质网丰富, 数量较多, 形态结构趋于正常。免疫组织化学法结果: 与模型组相比, 各组 TNF-α、IL-6 表达水平明显降低; 解毒生肌膏组 TNF-α 表达水平低于正常创面组; 解毒生肌膏组 TNF-α、IL-6 表达低于碘胺嘧啶银组。Western blot 法结果显示: 与正常创面组相比, 各组 β-catenin 表达量均上调($P<0.05$), 解毒生肌膏组上调表达量最少; 与正常创面组相比, 各组 GSK-3β 蛋白表达含量明显下调($P<0.05$); 给药后 7 天, 碘胺嘧啶银组和解毒生肌膏组 GSK-3β 蛋白表达含量上调($P<0.05$), 但仍低于正常创面组。**结论:**解毒生肌膏作用糖尿病大鼠创面修复机制通过调控 GSK-3β 和 β-catenin 表达, 使炎症因子 IL-6 和 TNF-α 表达下调, 最终达到糖尿病大鼠慢性创面愈合。

【关键词】糖尿病慢性创面; 解毒生肌膏; 糖原合成酶激酶-3β; β-连环蛋白; 炎症因子

【中图分类号】R2-031

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-05-14

Jiedu-Shengji ointment regulates GSK-3β/β-catenin to reduce inflammatory response to promote chronic wound healing in diabetic SD rats

Yuan Zhongheng¹, Chen Li², Ding Yarong², Wang Wei¹, Wang Yumeng², Zheng Shixu², Hong Kaiqi², Zhou Zhongzhi³

(1. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine; 2. Medical College, Hunan University of Chinese Medicine; 3. Department of Burn & Skin Ulcer Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine)

【Abstract】**Objective:** To investigate the effects of inflammatory response on the repair of chronic wounds in Sprague-Dawley (SD) rats with diabetes from the perspective of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β)/β-catenin. **Methods:** A wound model in diabetic SD rats was established by high-fat feeding combined with intraperitoneal injection of streptozocin and surgical preparation of full-thickness skin defects. The model rats were randomly divided into model group ($n=15$), silver sulfadiazine group ($n=15$), and Jiedu-Shengji ointment group ($n=15$), with normal wound group ($n=15$) set as a control. The wounds in the silver sulfadiazine group and Jiedu-Shengji ointment group were externally treated with silver sulfadiazine ointment and Jiedu-Shengji ointment, respectively, once daily, with no intervention in the model group and normal wound group. On the 3rd, 7th, and 14th days after ointment administration, the wound healing status of each group was examined to calculate the wound

作者介绍:袁忠行, Email: 2532870278@qq.com,

研究方向:中西医结合创面修复与组织再生。

通信作者:周忠志, Email: 3z_cl@163.com,

研究方向:中西医结合临床创面修复与再生。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81973862);湖南省卫生健康委科研资助项目(编号:D202304039371,D202304039377);湖南省研究生科研创新资助项目(编号:CX20210722、CX20220811)。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20230927.1829.042>
(2023-10-07)

healing rate. The basic tissue morphology was examined with hematoxylin-eosin (HE) staining. Collagen production was detected by Masson. The structure of endoplasmic reticulum was observed using a transmission electron microscope. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) was measured by immunohistochemistry. The protein expression of GSK-3 β and β -catenin was determined by Western blot. **Results:** On day 3, the wound healing rate of the Jiedu-Shengji ointment group was significantly higher than that of the model group ($P<0.05$). On day 14, the wound healing rate of the Jiedu-Shengji ointment group was significantly higher than that of the silver sulfadiazine group ($P<0.05$). HE staining revealed less swelling and more abundant capillaries in the wounds of the Jiedu-Shengji ointment group as compared with the other groups on days 3 and 7 and new skin appendages and intact tissue structure in the wounds of the Jiedu-Shengji ointment group and normal wound group on day 14. Masson staining revealed evenly distributed and orderly organized collagen fibers as well as stronger, evenly distributed, and orderly arranged new collagen fibers in the Jiedu-Shengji ointment group, as compared with the other groups. Under the electron microscope, the Jiedu-Shengji ointment group had abundant endoplasmic reticulum with nearly normal morphological structure. Immunohistochemical results showed that the expression levels of TNF- α and IL-6 were significantly higher in the model group than in the other groups; the Jiedu-Shengji ointment group had a significantly lower TNF- α level than the normal wound group and significantly lower TNF- α and IL-6 levels than the silver sulfadiazine group. Western blot results showed that compared with that in the normal wound group, the expression of β -catenin was significantly up-regulated in the other groups ($P<0.05$), to the least extent in the Jiedu-Shengji ointment group; compared with the normal wound group, the other groups had significantly down-regulated GSK-3 β protein expression ($P<0.05$); on day 7, GSK-3 β expression was significantly increased in the silver sulfadiazine group and Jiedu-Shengji ointment group ($P<0.05$), but still lower than that in the normal wound group. **Conclusion:** Jiedu-Shengji ointment can regulate the expression of GSK-3 β and β -catenin to down-regulate the expression of the inflammatory factors IL-6 and TNF- α , eventually achieving the healing of chronic wounds in diabetic rats.

[Key words] chronic diabetic wound; Jiedu-Shengji ointment; glycogen synthase kinase-3 β ; β -catenin; inflammatory factor

流行病学显示,全球糖尿病患者中糖尿病足的患病率为5%~10%,而在我国,这一疾病的发病率约为4.1%,已成为糖尿病最常见的住院原因^[1]。糖尿病慢性难愈合创面严重者可合并坏疽,累及下肢则可能导致截肢,而由于持续高血糖和相关的糖尿病并发症,糖尿病慢性创面的发病机制异常复杂,包括:①皮肤屏障破坏及感染;②持续氧化应激;③神经病变;④微血管并发症;⑤慢性炎症反应,治疗难度较大。近年来,国际糖尿病联合会(International Diabetes Federation, IDF)对糖尿病患者数量和疾病结构进行统计分析^[2],预测糖尿病慢性创面的患者数量将不断上升,这不仅对家庭造成严重困扰,还给社会和医疗系统带来了较大负担。因此,阐释糖尿病慢性创面的发病机制,并寻找更加高效、廉价的治疗方法是我们目前面临的重要挑战。

中医认为,糖尿病慢性创面属于“疮疡”、“臁疮”、“溃疡”、“顽疮”等范畴,其主要病机是“因虚感邪(多以湿、热和毒为主),邪气致瘀,瘀阻伤正,化腐致损”。机体邪毒过盛,毒瘀久滞,遂易损伤血脉,毒瘀阻脉,溢于肌肤,发而为疮,加之毒瘀肌肤,使气血运行不畅,导致疮疡易发,毒蕴成腐,而致腐肉难去,邪无出路,最终形成慢性不愈的溃疡。其治疗原则为清热解毒、祛腐生肌。本研究使用的解毒生肌膏由蜈蚣、全蝎、乳香、没药、紫草、石灰华、

冰片7味经典中药,按君臣佐使原则精密配伍后制成,该药临床运用时观察发现,在炎症控制方面,糖尿病慢性创面患者创面的进展得到有效控制,创面愈合较快,疗效较佳^[3]。

研究表明,过度炎症是糖尿病慢性创面难愈的重要原因,在体内高糖环境和炎症等多种生物学因素共同影响下,Wnt/ β -catenin信号通路异常激活^[4],可加剧过度炎症^[5]。而GSK-3 β 是Wnt/ β -catenin信号通路中一个重要的调节因子。调控GSK-3 β / β -catenin可减轻高糖状态下过度的炎症反应^[6-7],从而促进糖尿病慢性创面修复。但是解毒生肌膏减轻炎症、促进创面修复的机制是否通过GSK-3 β / β -catenin来达到尚不明确,故本研究通过制备糖尿病慢性创面动物模型,采用解毒生肌膏对其进行干预,观察解毒生肌膏对糖尿病大鼠慢性创面愈合、GSK-3 β / β -catenin通路及炎症反应的影响,从而探讨解毒生肌膏对糖尿病大鼠慢性创面修复的作用及机制。

1 材 料

1.1 动物

选用SPF级雄性SD大鼠,60只,年龄:8周龄,体质量:(180 ± 20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司供给,动物合格证明(SYXK(湘)2019-0009)。饲养环境为SPF级,温

度维持在(22±3)℃。动物分笼饲养,每笼3只,普通饲料和高脂饲料喂养,动物实验中心饲养条件及环境均符合动物福利标准。本次研究所有动物实验及其行为操作全程在湖南中医药大学动物实验中心完成,本研究实验方案已经通过湖南中医药大学动物实验伦理委员会审核(LL2021-020301)。

1.2 试剂

解毒生肌膏由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供,由蜈蚣、全蝎、乳香、没药等药物组成。磺胺嘧啶银(广东恒健制药有限公司,货号:211011)。氢化可的松(天津金耀药业有限公司,货号:H12020887),链脲佐菌素(STZ)(Solarbio,货号:No.S8050),TNF- α (proteintech,货号:No:60291-1-Ig),IL-6(proteintech,货号:62075),GSK-3 β (abcam,货号:GR3453936-1), β -catenin(abcam,货号:GR184212-97),GAPDH(proteintech,货号:10494-1-AP),Eponate 12 Resin(TED PELLA,货号:18005),DDSA(TED PELLA,货号:18022),NMA(TED PELLA,货号:18032),DMP-30(TED PELLA,货号:18042)。

1.3 仪器

数字扫片机(3DHISTECH,型号:PANNORAMIC),显影仪(BIO-RAD,型号:ChemiDocTM XRS+),超薄切片机(Leica,型号:EM UC7),电镜(HITACHI,型号:HT-7800)。

2 方 法

2.1 造模

STZ药物构建糖尿病SD大鼠模型:45只SD雄性大鼠,连续喂养4周高脂饲料,连续测量3d血糖后,次日给予SD大鼠腹腔注射STZ(50 mg/kg),随机血糖达标≥16.7 mol/L,则视为糖尿病SD大鼠模型构建成功。SD大鼠背部全层皮肤创面造模:各组60只SD大鼠腹腔注射2%(2 g/100 mL)戊巴比妥钠按照40 mg/kg计量进行麻醉,在背部两侧对称部位,大鼠肋骨与股骨之间区域,进行剃毛,形成2个4 cm×4 cm大小的正方形裸皮区域,剪去该区域全层皮肤,深达筋膜,设2个直径为1 cm的对称圆形全层皮肤缺损。随后每只大鼠连续3d于股部肌肉注射氢化可的松注射液(20 mg/kg,1次/d)。

2.2 创面给药干预及相应处理

造模当日开始给药,正常创面组和模型组不予干预,磺胺嘧啶银乳膏组、解毒生肌膏组(均涂抹于创面0.5 g/次/d),每日予以换药,包扎固定。于给药后3、7、14 d先对活体的创面肉芽组织观察和检测。对大鼠用异戊烷吸入麻醉和2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后进行相应处理。取创面组织,用相应的方法检测各个指标。

2.3 创面愈合情况及创面愈合率计算

Image J计算出创面面积所占百分比(A%)。A%=(观察时间点创面面积/原始创面面积)×100%。

2.4 组织形态学评估

将四组大鼠分别于给药后3、7、14 d处死后取材,并用4%多聚甲醛浸泡大鼠皮肤创面组织,避光保存,使其充分固定,随后进行大鼠石蜡切片前处理,皮肤组织脱水,石蜡包埋,组织切片(4 μ m)用HE染色和Masson染色做形态学评估;电镜组织戊二醛避光保存至电镜前处理。

2.5 透射电镜检测皮肤超微结构改变

将浸泡在戊二醛中皮肤样本洗净,1%锇酸固定液固定50 min,避光,室温;皮肤样本进行梯度脱水,脱水步骤如下:50%丙酮、70%丙酮、90%丙酮、100%丙酮Ⅰ和100%丙酮Ⅱ各15 min;组织浸透:100%丙酮+电镜树脂包埋液(由Eponate 12 Resin、DDSA、NMA和DMP-30混合配置而成)1:1混合配置,37℃,12 h;树脂包埋后,放入恒温烘箱37℃,12 h;电镜组织树脂固化,60℃恒温烘箱内48 h。皮肤组织样本进行修整并切片(厚度为50 nm);3%醋酸铀和硝酸铅双重染色;日立HT7800透射电镜观察。

2.6 免疫组化法检测创面组织中炎症因子TNF- α 和IL-6表达情况

抗原修复,热修复,使用EDTA(pH=9)(1800℃,2 min);3% H₂O₂溶液30 min;3%BSA封闭30 min;抗体孵育4℃过夜;DAB染色镜下显色;苏木素染色3 min;1%盐酸乙醇分化液1 min;无水乙醇脱水;二甲苯透明2次,每次5 min,树脂封片。

2.7 Western blot测定 β -catenin和GSK-3 β 蛋白表达情况

将皮肤创面组织于RIPA裂解液研磨,离心取上清,二喹啉甲酸(BCA)试剂盒测蛋白浓度,制胶,根据蛋白浓度调整上样量,电泳:恒压80 V,marker跑出红线转恒压120 V,溴酚蓝即将跑出胶板,转膜:恒电流200 mA,100 min,封闭:5%脱脂奶粉37℃孵育2 h,一抗4℃过夜,洗膜孵育HRP标记的二抗,用BeyoECL Plus发光液在DM4000B图像信号采集分析系统中检测信号强度大小,再用Image J 1.8软件分析条带光密度值,并与GAPDH内参吸光度的比值进行相对表达量的计算。

2.8 统计学处理

所有数据采用SPSS 22.0进行分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用t检验;多组间比较,选用单因素方差分析(one-way ANOVA)和选用Wruskal-Wallis H检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结 果

3.1 各组大鼠创面愈合情况及创面愈合率比较

实验观察期间各组大鼠创面逐渐愈合,创面表面逐渐覆盖大小不等的痴壳,痴下间隙及创面周围有不同程度肿胀、渗出,但均无感染、化脓现象。创面给药后第3天,各组开始出现渗出物,皮肤轻微红肿,创面逐渐萌生出幼嫩的肉芽组织。第7天,各组大鼠创面基本被痴壳覆盖,创面已无渗出,红肿基本消失,创面面积已经缩小明显。第14天,除模型组外,其余各组创面愈合较好,创面面积缩小显著,尤其以解毒生肌膏组创面愈合情况较好,见图1。

结果显示:给药后第3天,与模型组相比,解毒生肌膏组创面愈合率高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。给药后第14天,与磺胺嘧啶银组相比,解毒生肌膏组创面愈合率高于磺胺嘧啶银组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与正常组相比,磺胺嘧啶银组创面愈合率高于正常组,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,正常组创面愈合率高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图2。

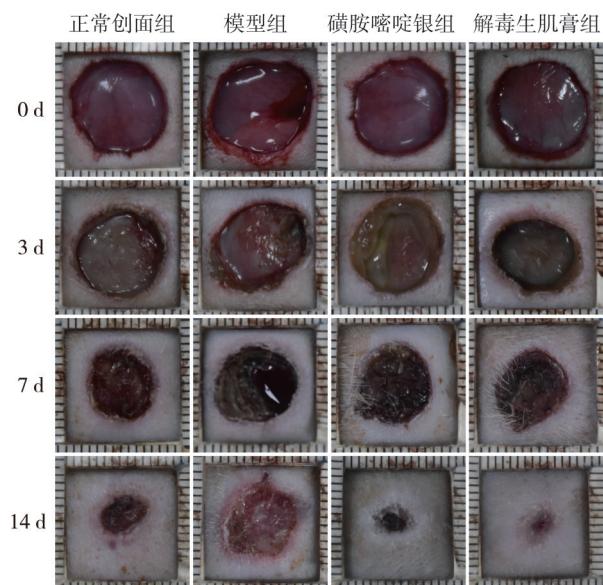
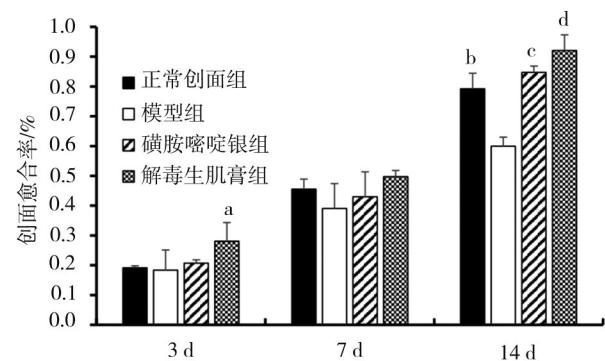


图1 大鼠创面直观图



注: a: 与 3 d 正常组相比; b: 与 14 d 碘胺嘧啶银组相比; c: 与 14 d 正常创面组相比; d: 与 14 d 模型组相比

图2 各组大鼠创面愈合率结果

3.2 创面病理形态学检测结果

3.2.1 HE 染色

结果显示: 给药后第 3 天, 皮肤组织 HE 染

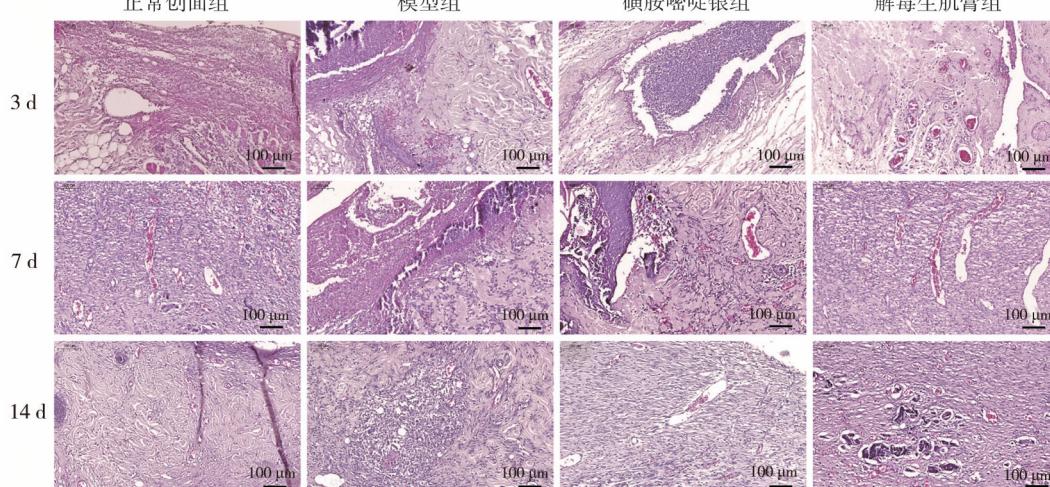


图3 各组大鼠创面HE染色结果

色, 各组皮肤真皮层和皮下组织断端明显, 真皮下层纤维断裂明显, 创面细胞明显水肿, 组织间隙变宽, 有少量炎细胞浸润以及红细胞渗出; 解毒生肌膏组创面较其他组相比肿胀程度较小。给药后第 7 天, 此时各组创面及其周围可见炎细胞浸润, 创面缺损处已覆盖肉芽组织, 其中可见多处新生毛细血管的分布。与模型组相比, 正常创面组和解毒生肌膏组创面中毛细血管数量丰富, 生长成熟, 管腔内红细胞数量较多, 炎细胞浸润逐渐消退。给药后第 14 天, 创面缺损逐渐由创周上皮细胞和组织爬行填充, 并修复表皮层的连续性。此时, 模型组仍存在炎性细胞浸润、组织结构完整度较差、上皮细胞分化生长不佳等情况。与模型组相比, 解毒生肌膏组和正常创面组的皮肤修复区域炎性细胞基本消退; 毛细血管闭塞、数目减少, 代以交织成网的胶原纤维; 并出现新生皮肤附属器(毛囊), 组织结构完整度好(图 3)。

3.2.2 Masson 染色 结果显示: 给药后第 3 天, 创周胶原纤维断裂明显, 排列紊乱, 其中模型组较其他组相比, 创面着色较浅, 胶原生成较少, 而解毒生肌膏组创面蓝色絮状物着色较多, 胶原生成较多。

给药后第 7 天, 各组创面肉芽组织填补创面缺损, 其中含有丰富的胶原纤维, 模型组相对其他各组创面着色较浅。正常创面组、碘胺嘧啶银组和解毒生肌膏组肉芽组织生成的胶原纤维稚嫩, 数量丰富且较致密; 解毒生肌膏组相对于其他各组胶原纤维分布均匀, 排列结构更为整齐、更为粗壮。

给药后第 14 天, 除模型组外, 各组创面缺损愈合较为完整。碘胺嘧啶银组产生的皮肤组织胶原纤维稚嫩, 着色较浅, 解毒生肌膏组新生胶原纤维更为粗壮, 分布均匀, 排列整齐, 创面明显优于其他各组(图 4)。

3.3 超微电镜内质网

结果显示: 正常创面组皮肤超微电镜显示内质网分布密度适中, 膜囊口径大小正常, 未见其扩张和囊泡化; 模型组内质网可见密度增加, 膜囊口径增大、部分扩张; 碘胺嘧啶银组可见肿胀、空泡化样内质网; 解毒生肌膏组内质网密度适中, 内质网形态趋于正常, 未见肿胀、空泡化和脱颗粒内质网(图 5)。

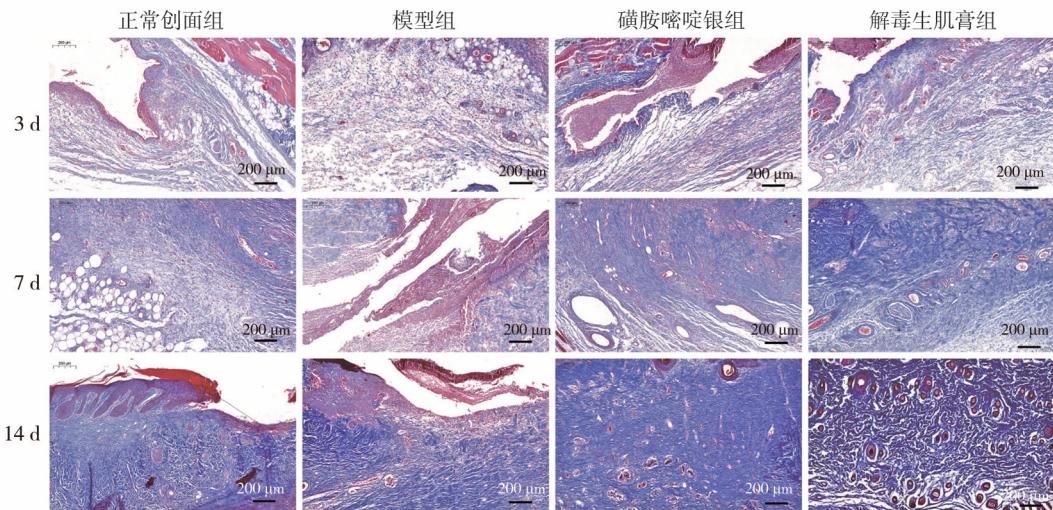


图4 各组大鼠创面 Masson染色结果

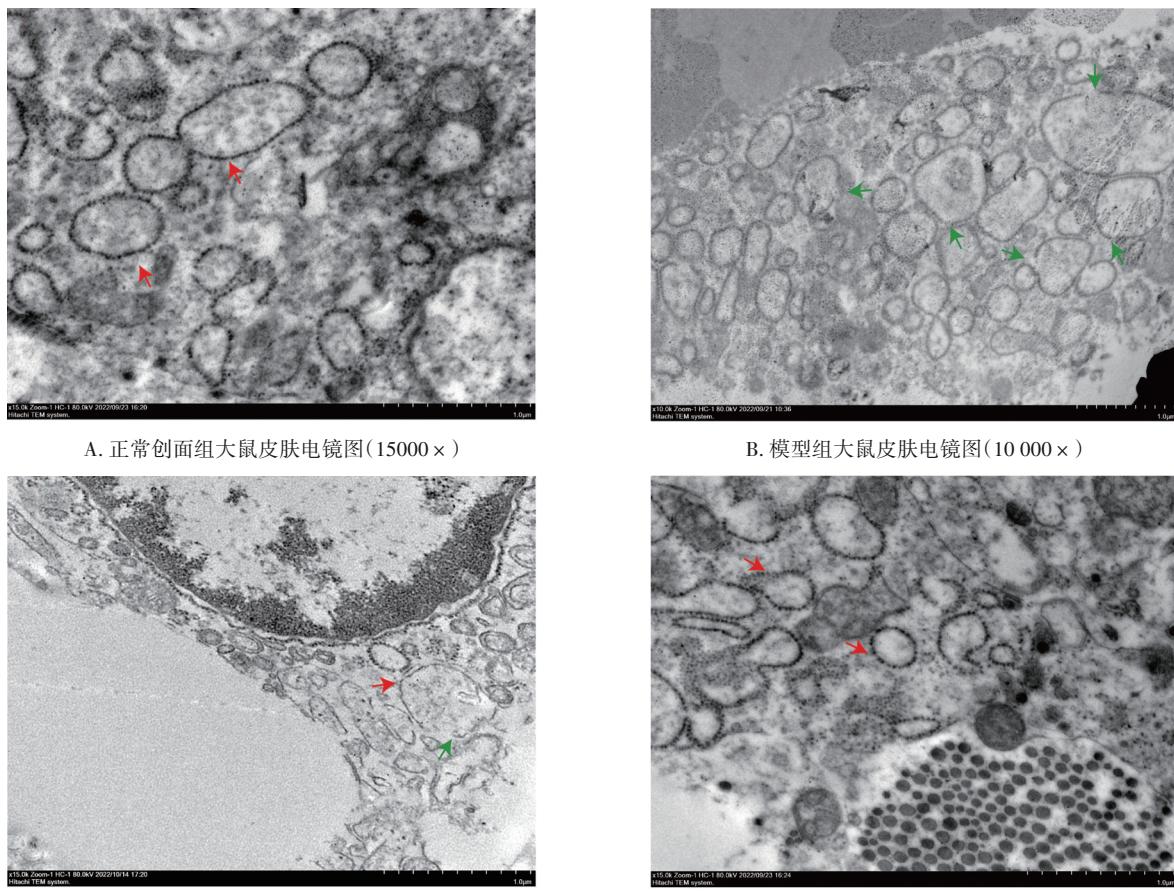


图5 各组皮肤组织中内质网形态及分布

3.4 创面组织中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达情况

3.4.1 各组创面切片总 TNF- α 表达情况 结果显示:给药后第 3、7 天,正常创面组 TNF- α 表达水平较低,与正常创面组相比,模型组创面组织中 TNF- α 表达量明显高于正常创面组;与模型组相比,磺胺嘧啶银组及解毒生肌膏组创面

组织中 TNF- α 表达量低于模型组;与磺胺嘧啶银组相比,解毒生肌膏组创面组织中 TNF- α 表达量低于磺胺嘧啶银组。给药后第 14 天,正常创面组、磺胺嘧啶银组及解毒生肌膏组 TNF- α 表达下降,模型组 TNF- α 表达仍呈现较高水平(表 1)。

表 1 创面(40×)TNF- α 表达(个)

组别	3 d	7 d	14 d
正常创面组 ^a	5.25 ± 1.26	5.00 ± 1.41	1.50 ± 1.29
模型组 ^b	8.00 ± 0.82 ^c	11.00 ± 2.16 ^c	9.25 ± 1.71 ^c
磺胺嘧啶银组 ^d	6.75 ± 1.26 ^c	6.75 ± 1.26 ^c	3.75 ± 0.96 ^c
解毒生肌膏组 ^f	4.25 ± 1.89 ^g	4.00 ± 1.03 ^g	2.00 ± 0.82 ^g

注:给药后第3天, $F=5.876$, $P=0.01 < 0.05$, a:与正常创面组之间差异有统计学意义($P=0.014 < 0.05$), c:与正常创面组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);给药后第7天, $F=18.106$, $P=0.000 < 0.01$, b:与模型组之间差异有统计学意义($P < 0.05$), e:与模型组之间差异有显著统计学意义($P < 0.05$);给药后第14天, $F=40.486$, $P=0.000 < 0.01$, f:与磺胺嘧啶银组之间差异有统计学意义($F=8.472$, $P < 0.05$), g:与磺胺嘧啶银组之间差异具有统计学意义($P=0.00 < 0.01$)

3.4.2 各组创面切片总 IL-6 表达情况 结果显示:与模型组相比,正常创面组、磺胺嘧啶银组和解毒生肌膏组创面组织中 IL-6 表达水平低于模型组。与磺胺嘧啶银组相比,解

毒生肌膏组创面组织中 IL-6 表达水平低于磺胺嘧啶银组(表2)。

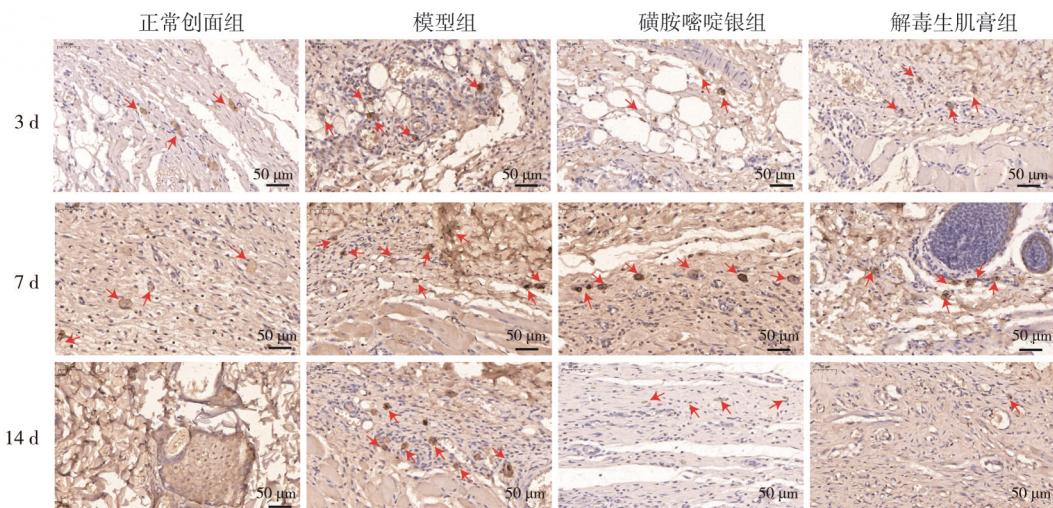
表 2 创面(40×)IL-6 的表达(个)

组别	3 d	7 d	14 d
正常创面组	6.75 ± 1.50	6.00 ± 0.82	0.75 ± 0.09
模型组	8.00 ± 1.63	13.25 ± 0.96	12.75 ± 2.22
磺胺嘧啶银组	7.25 ± 1.71	10.75 ± 3.59 ^a	5.25 ± 2.50 ^a
解毒生肌膏组	5.00 ± 0.82 ^a	4.00 ± 0.82 ^a	4.25 ± 1.89 ^a

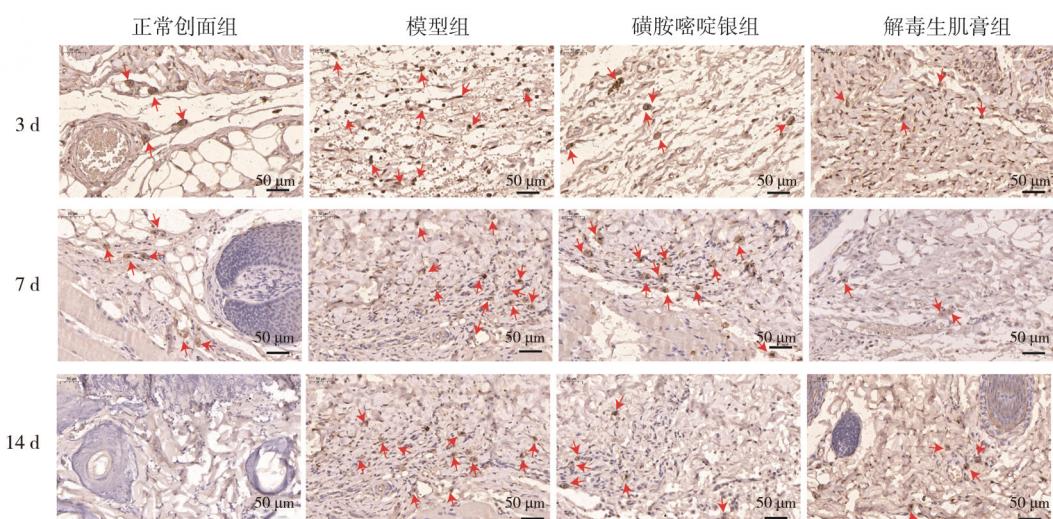
注:3 d, $F=0.549$, $P > 0.05$, 解毒生肌膏组与模型组之间的差异有统计学意义;7 d 和 14 d 时间点, 经 Kruskal-Wallis H 检验(a, $P=0.005 < 0.05$), 各组之间差异有统计学意义

3.5 GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达情况

结果显示:给药后第3天,与正常创面组相比,模型组、磺胺嘧啶银组和解毒生肌膏组 GSK-3 β 蛋白表达含量低于正常创面组。与磺胺嘧啶银组相比,解毒生肌膏组 GSK-3 β



注:红色箭头所示为 TNF- α 阳性表达

图 6 各组 TNF- α 的表达情况

注:红色箭头所示为 IL-6 阳性表达

图 7 各组 IL-6 的表达情况

蛋白表达含量低于磺胺嘧啶银组。

正常创面组 β -catenin 蛋白表达量较少。与正常创面组相比,模型组 β -catenin 表达量明显高于正常创面组;与模型组相比,磺胺嘧啶银组 β -catenin 表达量低于模型组;与磺胺嘧啶银组相比,解毒生肌膏组 β -catenin 表达量低于磺胺嘧啶银组(图 8)。

结果显示:与正常创面组相比,模型组、磺胺嘧啶银组和解毒生肌膏组 GSK-3 β 蛋白表达含量低于正常创面组。与模型组相比,解毒生肌膏组 GSK-3 β 蛋白表达含量高于模型组;与解毒生肌膏组相比,磺胺嘧啶银组 GSK-3 β 蛋白表达含量低于解毒生肌膏组。

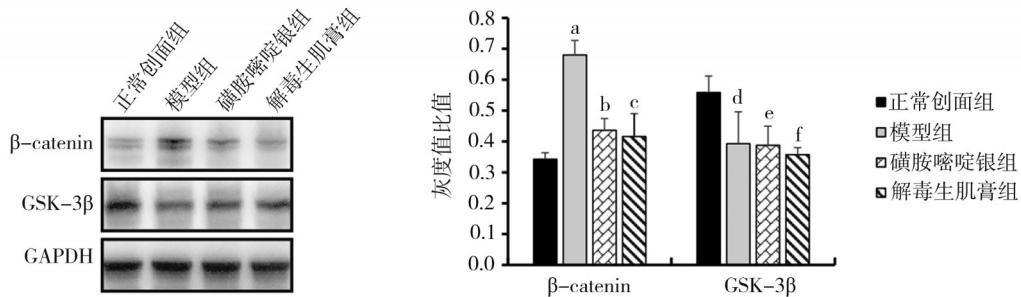
给药后第 7 天,正常创面组 β -catenin 蛋白表达量较少。与正常创面组相比,模型组、磺胺嘧啶银组和解毒生肌膏组 β -catenin 蛋白表达量显著降低。与模型组相比,磺胺嘧啶银组 β -catenin 蛋白表达量低于模型组,同样的,磺胺嘧啶银组 β -catenin 蛋白表达量低于模型组(图 9)。

4 讨 论

据 IDF 调查统计,全球 5.366 亿糖尿病患者中,每 100 个人中就有约 5~6 人糖尿病患者受到糖尿病慢性创面困扰,并且严重影响其生活,这个疾病也

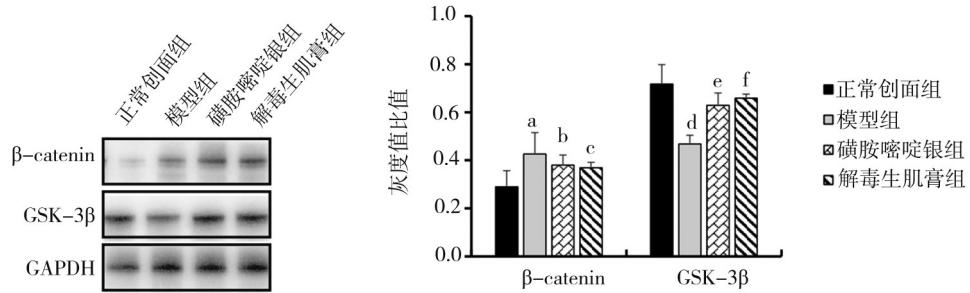
已成为糖尿病最常见的住院原因^[2]。人体在受伤之后,皮肤开始进行程序性的修复,而皮肤创面愈合的过程具有高度的有序性、完整性和网络性,包括出血止血(止血期)、炎症反应(炎症反应期)、细胞增殖(增殖期)和组织成熟、重建(组织重建期)^[8]。其中,炎症反应几乎贯穿于糖尿病创面愈合的整个过程,研究显示糖尿病慢性创面修复之所以艰难,原因与糖尿病慢性创面所带来的过度炎症反应有着密切的关系^[7],因此,减轻创面修复过程中过度的炎症反应,重建正常的修复秩序和创造良好的修复环境对糖尿病慢性创面的治疗具有重要意义。

解毒生肌膏是由全蝎(Scorpion)、蜈蚣(Centipede)、乳香(Boswelliacarteri)、没药(Myrrh)、紫草(Lithospermum)、石灰华(Travertine)、冰片(Borneol)7 味药,按照君臣佐使原则精密配伍而成,化学性质稳定持续,质量可控,数药合用,行使着解毒祛瘀,化腐生肌之功效。前期研究发现,其可有效调控创面组织中的炎症因子,减轻过度炎症反应^[9],是治疗糖尿病慢性创面早中期感染的有效经验方。为证实解毒生肌膏的修复效果,我们在组织病理学方面进行了检测。为证实进一步解毒生肌膏的修复效



注: β -catenin:a,与正常创面组相比具有统计学意义($P < 0.05$),b,与模型组相比,具有统计学意义($P < 0.05$),c,与磺胺嘧啶银组相比较具有统计学意义($P < 0.05$);GSK-3 β :d,与正常创面组相比具有统计学意义($P < 0.05$),e,与正常创面组相比,具有统计学意义($P < 0.05$),f,与磺胺嘧啶银组相比较具有统计学意义($P < 0.05$)

图 8 给药后 3 d,各组皮肤创面组织中的 GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达情况



注: β -catenin:a,与正常创面组相比具有统计学意义($P < 0.05$),b,与解毒生肌膏组差异不显著,c,与模型组相比较具有统计学意义($P < 0.05$)。GSK-3 β :d,与正常创面组相比具有统计学意义($P < 0.01$),e,与解毒生肌膏组相比具有统计学意义($P < 0.05$),f,与模型组相比较具有统计学意义($P < 0.05$)

图 9 给药后 7 d,各组皮肤创面组织中的 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达情况

果,我们在组织病理学方面进行了检测。HE 染色结果提示(图3),在第3天时,各组创面多处于止血期和炎症期的早期,创面表现多为早期的创面肿胀,红细胞浸润较为明显,而解毒生肌膏干预创面较其他组肿胀较轻。第7天,除模型组外,各组肉芽组织生成明显,反观模型组却创面看到大面积的炎细胞浸润,肉芽组织生成不及其他各组,而解毒生肌膏组创面清晰地看到大量胶原纤维生成和毛细血管的生成,炎症浸润明显消散。由于创面修复的各个时期是交织在整个修复过程的阶段的,通过本次研究实验过程中,我们发现了模型组修复的特点,因此我们可以认为,糖尿病SD大鼠创面的修复过程中,普通糖尿病创面的炎症期往往比正常创面的炎症长,尤其在第7天这种炎症期比较明显的阶段,过长的炎症期或者炎症反应,不利于创面修复时期的正常推进,耽误糖尿病创面修复的时间,从而使糖尿病慢性创面难以愈合。第14天,除模型组外,各组创面组织爬行和再上皮化正在有条不紊地进行。在这3个时间点,解毒生肌膏均能促进糖尿病SD大鼠慢性创面修复中的肉芽组织形成和稳定、减轻炎症反应等等。作为细胞外基质中重要的组成成分,胶原纤维生成可以有效评价创面修复的效果。Masson结果显示(图4)解毒生肌膏组创面胶原纤维生成、分布较其他各组更加稳定。胶原纤维生成致密、粗壮,甚至早于其他组新生出皮肤附属器(毛囊)等。正常内质网是圆形或类圆形的膜结构,膜上附着密集的核糖体,大小适中,排列均匀整齐。在错误折叠的胰岛素原在β细胞内蓄积,导致内质网(ERS)应激诱导的功能障碍,并且自噬通过清除错误折叠的蛋白质和受损的细胞器来帮助细胞适应应激^[10-13],因此,受到一些刺激时,内质网膜内表现肿胀,破裂,内质网之间间距增大,如电镜结果(图5)(B)图所示。(C)图和(D)图所示,内质网轻微的肿胀,正常形态内质网数量还是占据大多数,由此可以推测,解毒生肌膏药物干预可以减缓内质网对外部环境的应激状态。

皮肤损伤早期,通常以中性粒细胞介导的炎细胞浸润为主要特征,48小时后逐渐转为单核巨噬细胞为主。不少炎症因子和细胞参与或者影响炎症反应的进行,其中表现突出和重要的细胞是巨噬细胞介导炎症反应。巨噬细胞M1表型常常通过分泌TNF-α、IL-1、趋化因子等炎症介质,来启动炎症反应并使炎症蔓延^[14];但是巨噬细胞并不是只有介导炎症反应的一面;巨噬细胞M2表型则通过大量地释放细胞因子、快速招募内皮细胞和成纤维细胞,进而活化组织中的细胞因子、细胞种类和细胞外基质等,启动组织修复,并且可以促进血管生成,同时

参与胶原沉积和瘢痕形成等特殊修复方式,推动创面修复进入增殖期和重塑期^[15],缩短创面修复的进程。炎症反应方面,从给药后第三天炎症因子TNF-α的表达结果可以看出,磺胺嘧啶银组和解毒生肌膏组的表达量较其他组是下调的,而IL-6表达水平也是相同的,由此可以推理认为,磺胺嘧啶银组和解毒生肌膏组有降低炎症反应的效果。后期修复过程中,解毒生肌膏组表达的TNF-α和IL-6水平均较正常创面组的低,试图缩短炎症期时间来加速糖尿病慢性创面的修复进程,也证明了解毒生肌膏可以通过减少TNF-α和IL-6达到促进糖尿病SD大鼠慢性创面的愈合。

Wnt/β-catenin信号通路的激活在创伤愈合早期具有重要意义,GSK-3β与β-catenin作为该通路中的关键因子,在细胞和炎症因子调控中发挥重要作用。生理状态下,GSK-3β与β-catenin以蛋白质复合物的形式呈现并行使其作用,这个复合体的组成含有Wnt通路相关蛋白,这个复合体聚集在一起后,行使催化功能,可以快速磷酸化β-catenin的N端丝氨酸和苏氨酸,使其容易被识别并泛素化标记,最终被蛋白酶体水解。而当机体处于高糖环境下,Wnt/β-catenin信号通路往往是被过量的晚期糖基化终末产物和活性氧异常激活^[4],在糖尿病状态等理化因素的刺激下,使得GSK-3β和β-catenin蛋白表达水平出现异常。很快的GSK-3β和β-catenin蛋白表达异常将在胞浆中稳定积累的β-catenin蛋白,并加速了β-catenin蛋白进入细胞核,是其结合LEF/TCF转录因子家族,开始启动下游靶基因(c-myc、Cyclin D1等)的转录^[16],进而影响IL-6、TNF-α等炎症因子表达水平,发挥炎症调控作用,影响创面修复进程。为证实进一步解毒生肌膏修复创面的作用机制,我们在分子生物学方面进行了检测。Western blot实验发现,第3天时,与正常组相比,β-catenin在蛋白水平在模型组大鼠皮肤组织中均表达显著上调,而解毒生肌膏β-catenin蛋白表达量少于模型组和磺胺嘧啶银组,这提示解毒生肌膏组干预可逆转糖尿病大鼠创面组织中β-catenin蛋白表达增加,从而降低炎症因子水平,缩短炎症期时间进而加速创面修复进程。与正常组相比,GSK-3β蛋白在模型组中均显著降低,而解毒生肌膏干预可增加皮肤组织GSK-3β蛋白表达,进而发挥对β-catenin的负向调控作用,减轻炎症反应,缩短炎症期长度。第7天时,β-catenin和GSK-3β表达均同3d时间点趋势一致。由此得出,解毒生肌膏干预可通过降低糖尿病慢性创面中β-catenin激活水平并增加GSK-3β表达水平从而进一步负向调控β-catenin,进而降低创面炎症水平加速炎症期进

展,从而加速糖尿病慢性创面的愈合。

糖尿病慢性创面修复呈现炎症过渡障碍(慢性,长期的炎症反应)、肉芽形成不良和上皮化迟滞等病理表现,治疗难度大。糖尿病慢性创面难愈合的病理生理具体机制尚不清楚,慢性缺氧^[17-19]、过度炎症^[20]和糖尿病高糖状态等等,近年来,创面修复和慢性创面愈合障碍方面研究取得了相当大的进展,包括皮肤干细胞治疗、MSC 产生外泌体治疗(细胞治疗标准化的一种方法)、新型敷料应用(如基于生长因子治疗、水凝胶、脱细胞细胞外基质、含细胞皮肤替代物、壳聚糖等)旨在为临床患者解决疾病之苦。先天和适应性免疫细胞的异常、持续的炎症^[21]、血管生成的改变、基质沉积失调、神经病变和神经肽信号受损以及细胞衰老^[22],这些都将影响创面愈合。在炎症反应方面,我们所关注的巨噬细胞也被同行所提出在对抗过度炎症反应有很大优势^[20,23-24],平衡 M1/M2 巨噬细胞表型的正常转化有利于创面的正常愈合^[21]。可以说,巨噬细胞特异性促愈合策略的发展只是开始。许多问题仍有待探索,包括巨噬细胞活化和炎症消退的调节,修复过程中巨噬细胞的异质性和新亚群的发现,更重要的是,能够修复或恢复功能失调的巨噬细胞和过度炎症反应需要深入研究。新的技术手段和有效的传统临床方案有望解决这些问题并找到可能的答案,而解毒生肌膏等中药应用及中医治疗的方法不断推进,为糖尿病慢性创面的治疗提供了中西并重的尝试和探索,丰富了临幊上创面修复的治疗方法,解决了棘手问题。

参 考 文 献

- Zhang P, Lu J, Jing Y, et al. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Med, 2017, 49(2):106-116.
- Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183:109119.
- 杨旭龙,丁雅容,王巍,等.解毒生肌膏治疗糖尿病难愈合创面的有效性分析[J].亚太传统医药,2022,18(10):112-115.
- Yang XL, Ding YR, Wang W, et al. Efficacy of Jiedu Shengji ointment in the treatment of diabetic refractory wounds [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2022, 18(10):112-115.
- Aamir K, Khan HU, Sethi G, et al. Wnt signaling mediates TLR pathway and promote unrestrained adipogenesis and metaflammation: Therapeutic targets for obesity and type 2 diabetes[J]. Pharmacol Res, 2020, 152:104602.
- Khalid M, Petroianu G, Adem A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives[J]. Biomolecules, 2022, 12(4):542.
- Zhang Z, Lv Z, Zhang W, et al. A novel β -catenin from *Apostichopus japonicus* mediates *Vibrio splendidus*-induced inflammatory-like response[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 156:730-739.
- Rana AK, Sharma S, Patial V, et al. Lithium therapy subdues neuroinflammation to maintain pyramidal cells arborization and rescues neurobehavioural impairments in ovariectomized rats[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(3):1706-1723.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: a cellular perspective[J]. Physiol Rev, 2019, 99(1):665-706.
- 黄洁雅,陈丽,周忠志,等.解毒生肌膏对糖尿病溃疡大鼠创面局部 IL-6、TNF- α 表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2021, 27(10):1567-1571.
- Huang YL, Chen L, Zhou ZZ, et al. Effect of Jiedu-Shengji ointment on the expression of IL-6 and TNF- α in the wound of diabetic ulcer rats [J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2021, 27(10):1567-1571.
- Bachar-Wikstrom E, Wikstrom JD, Ariav Y, et al. Stimulation of autophagy improves endoplasmic reticulum stress-induced diabetes[J]. Diabetes, 2013, 62(4):1227-1237.
- Chanaday NL, Nosyreva E, Shin OH, et al. Presynaptic store-operated Ca^{2+} entry drives excitatory spontaneous neurotransmission and augments endoplasmic reticulum stress[J]. Neuron, 2021, 109(8):1314-1332.
- Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(8):421-438.
- Zheng Q, Chen Y, Chen D, et al. Calcium transients on the ER surface trigger liquid-liquid phase separation of FIP200 to specify autophagosome initiation sites[J]. Cell, 2022, 185(22):4082-4098.
- Tsai CF, Chen GW, Chen YC, et al. Regulatory Effects of Quercetin on M1/M2 Macrophage Polarization and Oxidative/Antioxidative Balance[J]. Nutrients, 2021, 14(1):67.
- Theocharidis G, Thomas BE, Sarkar D, et al. Single cell transcriptomic landscape of diabetic foot ulcers[J]. Nat Commun, 2022, 13(1):181.
- He S, Tang S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132:110851.
- Gupta A, Raghbir R. Energy metabolism in the granulation tissue of diabetic rats during cutaneous wound healing[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 270(1/2):71-77.
- Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: a review of current management and treatments[J]. Adv Ther, 2017, 34(3):599-610.
- Chen H, Cheng Y, Tian J, et al. Dissolved oxygen from microalgae-gel patch promotes chronic wound healing in diabetes[J]. Sci Adv, 2020, 6(20):eaba4311.
- Krzyszczuk P, Schloss R, Palmer A, et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes[J]. Front Physiol, 2018, 9:419.
- Li M, Hou Q, Zhong L, et al. Macrophage related chronic inflammation in non-healing wounds[J]. Front Immunol, 2021, 12:681710.
- Gushiken L, Beserra FP, Bastos JK, et al. Cutaneous wound healing: an update from physiopathology to current therapies[J]. Life (Basel), 2021, 11(7):665.
- Cucak H, Grunnet LG, Rosendahl A. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization[J]. J Leukoc Biol, 2014, 95(1):149-160.
- Sica A, Erreni M, Allavena P, et al. Macrophage polarization in pathology[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(21):4111-4126.

(责任编辑:唐秋姗)