

本文引文格式:贺佐分,田馨如,龚元勋,等. MEBT/MEBO 调控肌成纤维细胞促进糖尿病难愈合创面修复的机制研究[J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(2): 182-189.

【论著与临床报道】

MEBT/MEBO 调控肌成纤维细胞促进 糖尿病难愈合创面修复的机制研究

贺佐分¹, 田馨如¹, 龚元勋³, 黄金梅², 杨雅量¹, 葛星月¹, 岑丽君¹, 郭文闻¹, 唐乾利^{3,4}

1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;
2. 广西中医药大学研究生院, 广西 南宁 530023;
3. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;
4. 广西高校桂西地区高发病防治研究重点实验室, 广西 百色 533000

摘要:目的 探讨湿润暴露疗法/湿润烧伤膏(moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment, MEBT/MEBO)是否通过调控糖尿病难愈合创面肌成纤维细胞, 影响 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和I型胶原蛋白(collagen I, COL-1)的表达水平, 从而促进创面愈合。方法 90只SPF级成年雄性Wistar大鼠以随机数表法分为5组, 空白组、对照组、模型组、MEBO组、贝复新组, 每组18只, 适应性喂养7d后构建糖尿病模型, 成模后统一制备创面。创面形成后第0天、第3天、第7天、第14天拍照记录创面愈合情况, 每组随机取6只大鼠创面组织, 进行HE、Masson染色以观察各组创面组织病理形态变化, 免疫荧光观察创面组织 α -SMA、COL-1的分布及表达情况, Western Blot检测创面组织 α -SMA、COL-1的蛋白表达水平。结果 ①同一时间点组织学观察各组病理形态改善均优于模型组, 治疗后期创面愈合率MEBO组、贝复新组优于模型组。②WB:与对照组比较, 创面发生第3天、第7天、第14天过程中, 模型组创面组织 α -SMA、COL-1蛋白表达均明显下降($P < 0.05$);与模型组比较, 创面第7天、第14天, MEBO组、贝复新组创面组织 α -SMA、COL-1表达显著升高($P < 0.05$)。③免疫荧光:与对照组比较, 第3天、第7天、第14天的模型组 α -SMA蛋白表达均较低, 其中第7天时具有显著性差异($P < 0.05$);模型组COL-1蛋白表达均显著偏低($P < 0.05$)。与模型组比较, 第7天、第14天MEBO组、贝复新组 α -SMA表达均较高($P < 0.05$), 两用药组COL-1表达也较高, 而贝复新组与模型组的比较差异有统计学意义($P < 0.05$), MEBO组COL-1表达介于模型组与对照组之间, 但与模型组的比较差异不明显($P > 0.05$)。结论 MEBT/MEBO可能通过提高 α -SMA和COL-1的蛋白表达水平, 促进肌成纤维细胞转化及细胞外基质的沉积, 从而加速糖尿病难愈合创面修复。

关键词:湿润暴露疗法/湿润烧伤膏;糖尿病难愈合创面; α -平滑肌肌动蛋白;I型胶原蛋白;肌成纤维细胞

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)02-0182-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.003

Mechanism study of MEBT/MEBO regulating myofibroblasts to promote healing of diabetic refractory wounds

He Zuofen¹, Tian Xinru¹, Gong Yuanxun³, Huang Jinmei², Yang Yaliang¹,
Ge Xingyue¹, Cen Lijun¹, Guo Wenwen¹, Tang Qianli^{3,4}

1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi, China;

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774327);广西医学高层次骨干人才培养“139”计划项目资助(桂卫科教发[2018]22号);右江民族医学院研究生教育创新计划(桂学位[2021]5号)(YCSW20211334)

第一作者简介:贺佐分(1995-),男,在读硕士研究生,研究方向:创面修复的基础与临床研究, E-mail:1129107230@qq.com.

通讯作者简介:唐乾利(1961-),男,医学博士,二级教授、主任医师,博士、硕士生导师,研究方向:中西医结合外科学、创面修复的基础与临床研究, E-mail:htmgx@163.com

3. *The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*; 4. *Guangxi University Key Laboratory of High Incidence Prevention and Control Research in Western Guangxi, Baise 533000, Guangxi, China*)

Abstract: **Objective** To explore whether moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment (MEBT/MEBO) regulates myofibroblasts in diabetic refractory wounds and affects the expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen (COL-1), thus promoting wound healing. **Methods** Ninety SPF-grade adult male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: the blank group, the control group, the model group, MEBO group, and rb-bFGF group, with 18 rats in each group. After 7 days of adaptive feeding, diabetic models were established and wounds were created uniformly. The wound healing status was photographed and recorded on days 0, 3, 7 and 14 after wound formation. Six rats from each group were randomly selected for HE and Masson staining to observe the pathological morphological changes of wound tissues in each group. Immunofluorescence was used to observe the distribution and expression of α -SMA and COL-1 in wound tissues. Western Blot was used to detect the protein expression levels of α -SMA and COL-1 in wound tissues.

Results ① Histological observations at the same time point showed that the pathological morphological changes in all groups were better than those in the model group, and the wound healing rate in the later stage of treatment was higher in the MEBO group and rb-bFGF group than in the model group. ② WB: compared with the control group, the protein expression of α -SMA and COL-1 in wound tissues of the model group significantly decreased on day 3, 7, and 14 after wound formation ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of α -SMA and COL-1 in wound tissues of the MEBO group and rb-bFGF group significantly increased on day 7 and 14 ($P < 0.05$). ③ Immunofluorescence: compared with the control group, the protein expression of α -SMA in the model group was lower on day 3, 7, and 14, with significant differences on day 7 ($P < 0.05$). The expression of COL-1 in the model group was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of α -SMA in the MEBO group and rb-bFGF groups was higher on day 7 and 14 ($P < 0.05$), and the expression of COL-1 was also higher in both groups, with significant differences between the rb-bFGF group and the model group ($P < 0.05$). The expression of COL-1 in the MEBO group was found to be intermediate between that of the model group and the control group, although the difference between the MEBO group and the model group was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** MEBT/MEBO may facilitate the transformation of myofibroblasts and deposition of extracellular matrix by up-regulating the protein expression levels of α -SMA and COL-1, thereby accelerating the repair of refractory diabetic wounds.

Key words: MEBT/MEBO; diabetic refractory wounds; α -smooth muscle actin; type I collagen; myofibroblasts

糖尿病难愈合创面是由糖尿病因素导致的常规治疗 1 个月未见愈合及愈合倾向的创面,属于慢性难愈合创面的主要类型^[1]。创面的及时愈合依赖于伤口快速止血、适度的炎症反应、修复细胞增殖与分化及组织重塑这 4 个阶段的有序运行,若发生紊乱将导致创面愈合延迟^[2]。成纤维细胞是重要的修复细胞,在创面增殖阶段可分泌大量以 COL-1 为主的细胞外基质,覆盖创面的同时也为后续的细胞活动提供必要的细胞外微环境^[3-4]。有研究发现^[5],肌成纤维细胞兼具收缩能力和分泌能力,主要由成纤维细胞转化而来,是分泌胶原蛋白最主要的执行者。探讨湿润暴露疗法/湿润烧伤膏 (moist exposed burn therapy/moist exposed

burn ointment, MEBT/MEBO) 是以湿润烧伤膏为主要药物并结合湿润暴露疗法治疗慢性创面的有效手段。前期大量基础实验及临床研究证明,MEBT/MEBO 可通过减轻创面炎症反应^[6]、调节细胞外基质胶原蛋白比例^[3]、促进血管新生^[7]等途径加速创面愈合。为进一步明确 MEBT/MEBO 修复创面的分子机制,笔者构建了大鼠糖尿病难愈合创面模型,探讨了 MEBT/MEBO 可能通过提高 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 I 型胶原蛋白 (collagen I, COL-1) 的蛋白表达水平,促进肌成纤维细胞转化及细胞外基质的沉积,从而加速糖尿病难愈合创面修复。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠 90 只,12 周龄,体重(235±15) g,购于长沙天勤生物技术有限公司,实验动物使用许可证号:SYXK(桂)2017-004。实验过程严格遵守动物伦理标准,伦理批准文件编号:2021030901。

1.1.2 主要试剂与仪器 鱼跃血糖仪及血糖试纸(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司,货号:SZ-98);美宝湿润烧伤膏(60 克/支,汕头市美宝制药有限公司,国药准字 Z20000004);贝复新(重组牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶,21 000 IU:5g*1 支/盒,珠海亿胜生物制药有限公司,国药准字 S20040001);链脉佐菌素(北京索莱宝科技有限公司,货号:S8050-1g);改良 Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:G1346);4%多聚甲醛组织固定液(Biosharp 公司,货号:BL539A9);98%呋喃西林(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号:N114269-25g);苏木素伊红(HE)染色试剂盒(飞净生物科技有限公司,货号:PH0516);兔源性 α -SMA 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:14395-1-AP);兔源性 COL-1 多克隆抗体(abcam 公司,货号:ab138492);蛋白 marker(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:G2083-250UL);山羊抗兔二抗(碧云天生物技术有限公司,货号:SA00001-2),山羊抗鼠二抗(碧云天生物技术有限公司,货号:SA00001-2);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,货号:IPVH00010);电泳仪电源、WB 成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司,Gel Doc EZ)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物造模 综合郝颖等^[8]改良链脉佐菌素(streptozocin, STZ)大鼠糖尿病模型诱导法及陈枫等^[9]大鼠品系与药物剂量研究,建立糖尿病动物模型。Wistar 大鼠经 7 d 适应性喂养后,禁食不禁水 12 h,腹腔快速注射 50 mg/kg 剂量的 1% STZ 溶液(溶剂:pH 4.2 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液),注射 3 d 后以剪尾法采血测随机血糖,血糖值>16.7 mmol/L 认为造模成功;血糖值未达标大鼠待血糖恢复正常值后以前法再次造模。糖尿病模型建立完成后,参照赵京禹等^[10]全层皮肤缺损法,结合沈道修等^[11]改良塑料环肉芽肿定量法,经改良后对成模大鼠进行创面制备,建立糖尿病大鼠难愈合创面模型。固定大鼠并暴露其背部,剃去大鼠创面制备区域毛发,再涂抹适量脱毛膏脱净残余毛发后生理盐水洗净。待大鼠恢复 24 h 后,腹腔注射 5%水合氯醛(剂量:250 mg/kg)进行麻醉,以直径 1.5 cm 圆形印章标记造模面积,无菌条件下沿脊椎方向用外科方法作两个深达筋膜层的全层皮肤缺损

开放性创面,加盖两层消毒干纱布,用胶布“工”字形固定。

1.2.2 分组及用药 90 只 SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠[12 周龄,体重(235±15) g]适应性喂养 7 d 后,以随机数表法分为空白组(18 只)、对照组(18 只)与糖尿病组(54 只)。糖尿病组大鼠注射 50 mg/kg STZ 溶液造糖尿病模型;对照组大鼠注射等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。糖尿病造模完成后,统一制备创面,并随机分为模型组、MEBO 组、贝复新组(各组均为 18 只)。对照组大鼠制备创面同糖尿病组大鼠。空白组大鼠仅剃毛脱毛处理。各组创面制备完毕后立即用药治疗,换药前均以 1/5000 呋喃西林液清洁创面,每日早晚各换药 1 次。空白组:脱毛处备皮,覆盖创面大小生理盐水纱布,加盖双层干纱布,胶布固定;对照组和模型组:创面外敷两层创面大小生理盐水纱布,加盖两层消毒干纱布,胶布固定;MEBO 组:创面外敷两层创面大小 MEBO 纱条(0.2 g/cm²),加盖两层消毒干纱布,胶布固定;贝复新组:创面外敷两层创面大小贝复新浸透纱布(60 IU/cm²),加盖两层消毒干纱布,胶布固定。

1.2.3 取材 以创面制备完成当天为第 0 天,于第 3 天、第 7 天、第 14 天每组随机处死 6 只大鼠,小心揭去表面痂皮,剪取距离创缘 0.5 cm 内深至深筋膜的创面肉芽组织,部分放入冻存管保存于-80℃冰箱,用于检测蛋白表达水平;剩余部分浸没于 4%多聚甲醛组织固定液内,固定 24~48 h 后转移至 70%酒精,用于制作病理切片行病理学检测。

1.3 检测指标

1.3.1 创面愈合情况 创面第 0 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天各组随机选取 6 只大鼠,麻醉状态下以同等焦距垂直拍摄创面,ImageJ 软件测量创面面积并计算创面愈合率。计算公式:创面愈合率=(起始创面面积-取材时创面面积)/起始创面面积×100%。

1.3.2 HE 染色及 Masson 染色 创面肉芽组织固定 24~48 h 后转移至 70%酒精并保存在 4℃冰箱,取出后流水冲洗 0.5 h,经脱水透明后包埋,统一制作成 4 μ m 石蜡切片,最后分别行常规 HE 染色及 Masson 染色流程,光学显微镜下观察各组创面肉芽组织病理形态变化并拍照记录。

1.3.3 免疫荧光 取已制备的石蜡切片脱蜡至水,以微波热修复法修复抗原,随后行封闭、一抗及二抗孵育等免疫荧光常规流程,荧光显微镜下观察荧光染色情况并拍照记录。

1.3.4 免疫印迹 剪取部分保存在-80℃冰箱的创面肉芽组织,低温匀浆后提取总蛋白,随后 BCA 法蛋白定量并制作蛋白质标准曲线,计算各组蛋白上样量;

已提取的蛋白变性后上样,进行凝胶电泳、转膜、封闭后以 α -SMA(1:2000)、COL-1(1:500)一抗 4℃ 孵育过夜,第 2 天孵育二抗并显影,ImageJ 软件分析条带。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,Graphpad Prism 9.0 软件制图。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两样本间比较用 LSD-*t* 检验,多个样本间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 创面愈合率 创面第 3 天,各组间创面愈合率无明显差异 ($P > 0.05$)。创面第 7 天、第 14 天,与对照组比较,模型组大鼠创面愈合率明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,MEBO 组与贝复新组大鼠创面愈合率均明显升高 ($P < 0.05$)。提示 MEBO 能够显著提高糖尿病大鼠创面愈合率,见表 1。

表 1 不同时间点各组大鼠创面愈合率比较

组别	n	愈合率/%		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	6	0.37±0.07	0.83±0.04	0.91±0.02
模型组	6	0.31±0.03	0.59±0.08 ^a	0.77±0.04 ^a
MEBO 组	6	0.32±0.07	0.66±0.03 ^b	0.88±0.03 ^b
贝复新组	6	0.35±0.07	0.63±0.06 ^b	0.85±0.04 ^b
F		1.173	21.861	23.973
P		0.345	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示;②各组间同一时间点创面愈合率两两比较,与对照组相比,a: $P < 0.05$,与模型组相比,b: $P < 0.05$ 。

2.2 创面大体形态观 各组大鼠创面随治疗进行而逐渐愈合,其中空白组皆为正常皮肤组织,不随治疗时间变化。创面第 3 天,模型组创面暗淡无泽、肉芽较少;对照组、MEBO 组、贝复新组创面均呈现红润,部分肉芽组织新生。创面第 7 天,模型组创面晦暗干瘪、存在黑色坏死组织,肉芽组织新生较少,创面床基底较单薄。对照组、MEBO 组、贝复新组创面红润,存在大量肉芽组织,创面边缘清晰。创面第 14 天,模型组创面色泽、肉芽新生较前有所改善,但创面较深且边缘不清晰,创面表面干瘪、凹凸不平,颜色不鲜红,少量血痂存留。对照组创面几乎被粉嫩的表皮完全覆盖,并有毛发新生。MEBO 组、贝复新组创面肉芽已将创面填平,肉芽边缘覆盖粉嫩表皮,未被表皮覆盖的肉芽面积细小、色泽红润,见图 1。

2.3 创面组织学观察

2.3.1 HE 染色 空白组为正常皮肤结构。创面第 3 天,各组均表现为明显的炎性细胞浸润,以模型组最

甚,对照组和 MEBO 组可见少量新生毛细血管;创面第 7 天时,模型组仍存在明显的炎性坏死带,其余组炎症较前明显减轻,并有大量新生毛细血管及成纤维细胞;创面第 14 天,模型组有大量成纤维细胞生成伴少量炎症细胞浸润,其余各组上皮化均已完成,可见毛囊等正常皮肤结构,见图 2。

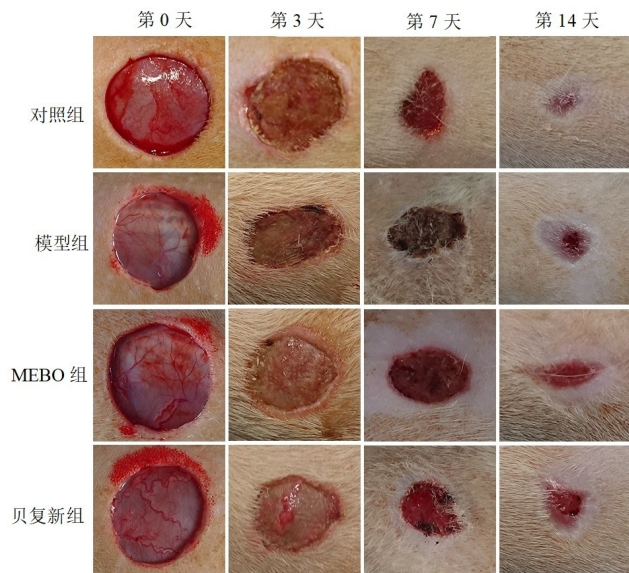


图 1 各组创面愈合情况比较

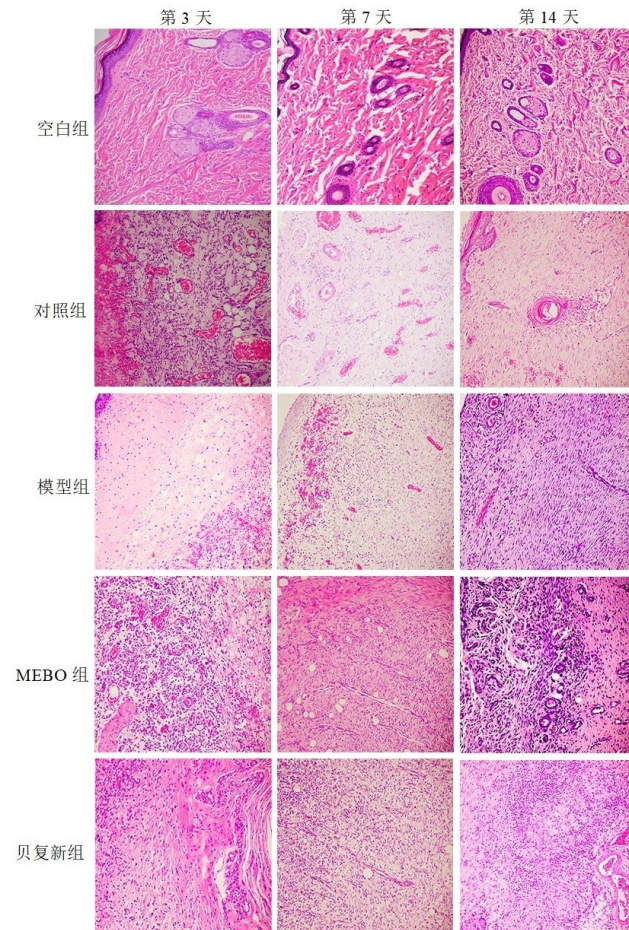


图 2 各组创面组织 HE 染色($\times 200$)

2.3.2 Masson 染色 空白组为正常皮肤,可见明显毛囊及皮脂腺结构和大量粗大且分布整齐的胶原纤维。创面第 3 天,除模型组外均可见少量细小胶原纤维生成、分布稀疏;创面第 7 天,模型组胶原纤维含量较少、分布不均匀,且存在炎症带;其余各组胶原纤维数量增多,且逐渐变粗大,分布均匀。创面第 14 天,模型组仅可见少量且分布不均的胶原纤维;其余各组胶原纤维变粗、数量丰富,且分布紧密,走向愈加齐整,有表皮和毛囊新生,见图 3。

2.4 创面组织 α -SMA、COL-1 蛋白印迹检测 与空白组比较,对照组创面组织 α -SMA 蛋白表达降低, COL-1 蛋白第 7 天、第 14 天表达升高 ($P < 0.05$),创面发生第 7 天、第 14 天过程中,对照组创面组织中 α -SMA、COL-1 蛋白均呈缓慢升高趋势,提示正常皮肤发生创面后,修复过程中 α -SMA、COL-1 蛋白发挥调控作用。与对照组比较,创面发生第 7 天、第 14 天过程中,模型组创面组织 α -SMA、COL-1 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$),且随着创面发生时间变化,模型组创面组织中 α -SMA、COL-1 蛋白未见升高,甚至呈缓慢下降趋势,提示糖尿病创面修复过程中,创面组织中 α -SMA、COL-1 蛋白表达异常,影响创面愈合。与模型组比较,创面第 7 天、第 14 天,MEBO 组创面组

织 α -SMA、COL-1 表达显著升高 ($P < 0.05$)。提示 MEBO 能够提高糖尿病创面修复过程中 α -SMA、COL-1 蛋白表达,见图 4、表 2。

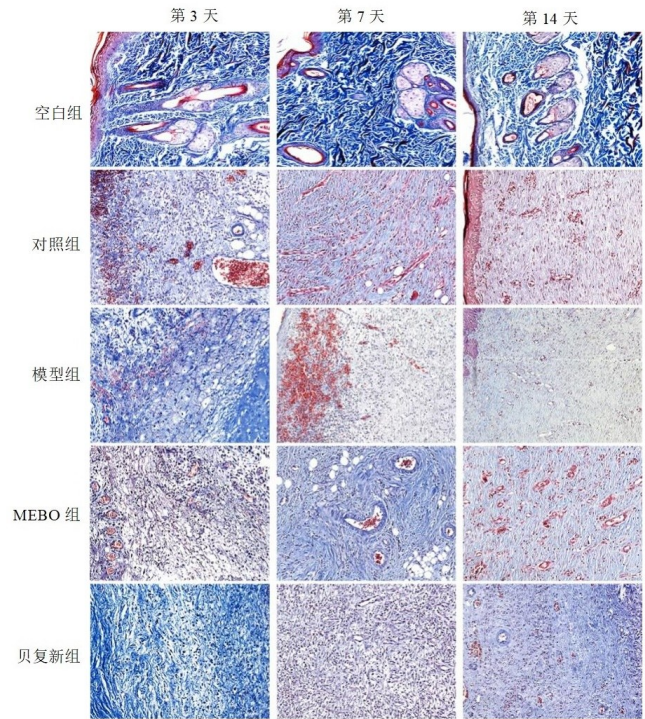


图 3 各组创面组织 Masson 染色 ($\times 200$)

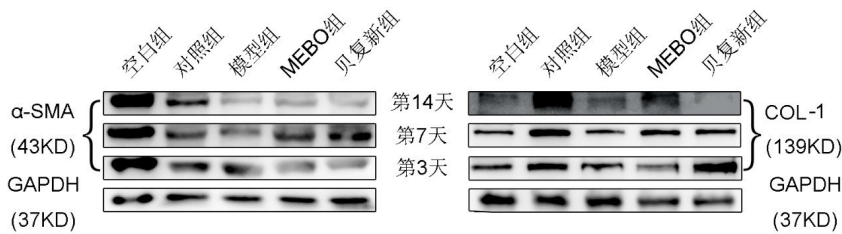


图 4 不同时间点各组大鼠 α -SMA、COL-1 蛋白表达比较

表 2 不同时间点各组大鼠 α -SMA、COL-1 蛋白表达比较

组别	n	α -SMA			COL-1		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白组	6	1.34 \pm 0.82	1.29 \pm 0.11	1.34 \pm 0.08	0.80 \pm 0.06	0.98 \pm 0.09	0.61 \pm 0.06
对照组	6	0.94 \pm 0.04 ^a	1.08 \pm 0.09 ^a	1.19 \pm 0.05 ^a	0.70 \pm 0.06 ^a	1.05 \pm 0.10 ^a	1.14 \pm 0.12 ^a
模型组	6	0.98 \pm 0.08 ^b	0.87 \pm 0.04 ^b	0.74 \pm 0.06 ^b	0.64 \pm 0.07 ^b	0.72 \pm 0.08 ^b	0.48 \pm 0.05 ^b
MEBO 组	6	0.92 \pm 0.06	1.24 \pm 0.08 ^c	1.00 \pm 0.06	0.61 \pm 0.04	0.85 \pm 0.06 ^c	0.83 \pm 0.06 ^c
贝复新组	6	0.88 \pm 0.09	1.24 \pm 0.13 ^d	0.56 \pm 0.06 ^d	1.06 \pm 0.12	0.82 \pm 0.09 ^d	0.72 \pm 0.08 ^d
F		40.696	16.058	148.562	34.957	14.587	63.830
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示;②各组间同一时间点创面愈合率两两比较,与空白组相比,a: $P < 0.05$;与对照组相比,b: $P < 0.05$;与模型组相比,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.05$ 。

2.5 创面肉芽组织 α -SMA、COL-1 免疫荧光检测

与对照组比较,创面发生第 3 天、第 7 天、第 14 天过程中,模型组 α -SMA 蛋白表达均较低,其中第 7 天时具有差异显著性 ($P < 0.05$);同时,模型组 COL-1 蛋白表达均显著偏低 ($P < 0.05$)。而 MEBO 组、贝复新组的蛋白表达与对照组较接近,高于模型组,与模型组比较,创面第 3 天 MEBO 组 α -SMA 表达与之尚未出现差别 ($P > 0.05$),贝复新组 α -SMA 表达稍低 ($P < 0.05$),而 MEBO 组、贝复新组的 COL-1 表达均较高 ($P < 0.05$);创面第 7 天、第 14 天,MEBO 组、贝复新组创面肉芽组织 α -SMA 表达均显著偏高 ($P < 0.05$),两用药组 COL-1 表达也较高,而贝复新组与模型组之间的比较差异显著 ($P < 0.05$),MEBO 组 COL-1 表达介于模型组与对照组之间,但与模型组的比较尚未存在统计学差异 ($P > 0.05$)。提示 MEBO 能够提高糖尿病创面修复过程中 α -SMA、COL-1 的表达,见图 5~图 8。

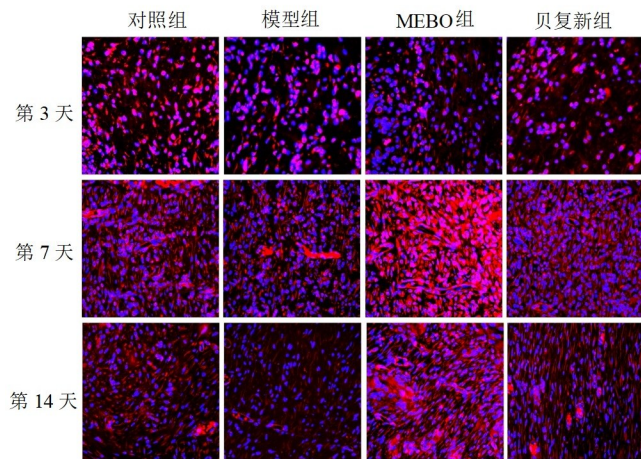
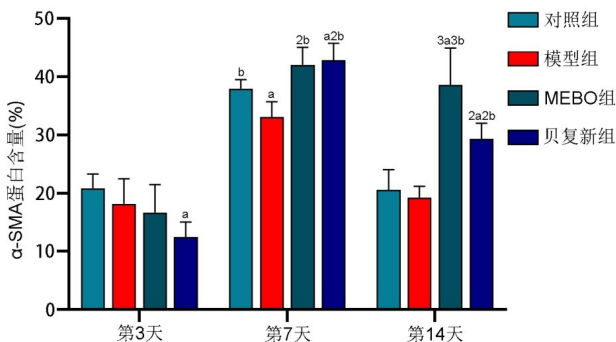


图 5 各组创面组织 α -SMA 表达情况($\times 400$, 红光为 α -SMA 蛋白,蓝光为细胞核)



注:与同一时间点对照组相比,a: $P < 0.05$,2a: $P < 0.01$,3a: $P < 0.001$;与同时间点模型组相比,b: $P < 0.05$,2b: $P < 0.01$,3b: $P < 0.001$ 。

图 6 各组创面组织 α -SMA 蛋白含量

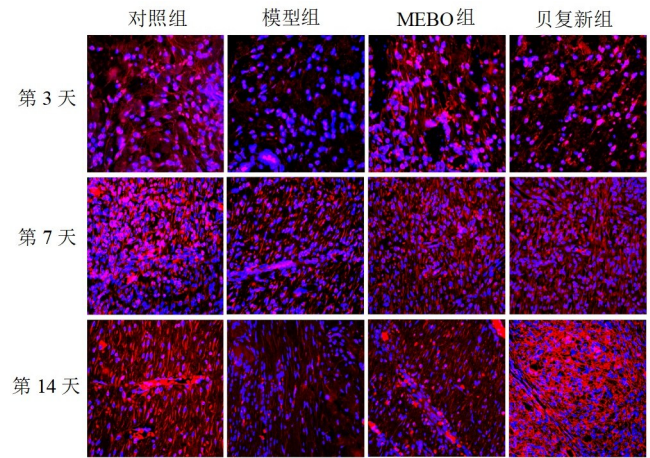
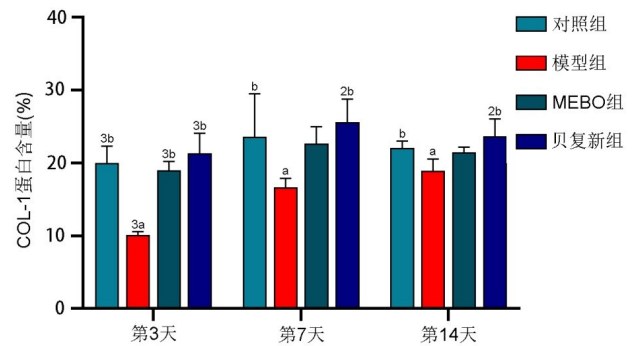


图 7 各组创面组织 COL-1 表达情况($\times 400$, 红光为 COL-1 蛋白,蓝光为细胞核)



注:与同一时间点对照组相比,a: $P < 0.05$,2a: $P < 0.01$,3a: $P < 0.001$;与同时间点模型组相比,b: $P < 0.05$,2b: $P < 0.01$,3b: $P < 0.001$ 。

图 8 各组创面组织 COL-1 蛋白含量

3 讨论

修复细胞缺失及功能障碍是糖尿病难愈合创面发生的重要机制,而成纤维细胞是重要的修复细胞,在创面愈合过程中发挥了重要作用。国内外多项实验研究显示糖尿病难愈合创面修复障碍与成纤维细胞向肌成纤维细胞转化不足、肌成纤维细胞活性减弱、细胞外基质分泌水平低下以及伤口收缩能力下降密切相关^[17-19]。故本研究通过观察 MEBO/MEBO 对糖尿病难愈合创面中 α -SMA、COL-1 表达水平的影响,以此反映肌成纤维细胞转化程度及细胞外基质沉积水平,进一步探讨 MEBO/MEBO 促进创面愈合的机制。

α -SMA 是一种肌动蛋白亚型,在血管平滑肌细胞和肌成纤维细胞等细胞中均可表达。研究显示,在创面修复过程中,创面面积减小主要依靠基质成纤维细胞向缺损处迁移、增殖、分化(肌成纤维细胞),逐渐与新生血管形成肉芽组织、结缔组织等,以将缺损部位填补完整,促进表皮完成再上皮化。 α -SMA 蛋白是参与成纤维细胞迁移环节的关键因子,是肌成纤维细胞的

典型骨架蛋白,能够使肌成纤维细胞的收缩力增加,使肉芽组织纤维化,促进结缔组织形成。创面愈合过程中,创面组织 α -SMA 的表达越高,说明创面细胞分化为肌成纤维细胞越显著,肌成纤维细胞的活性越高,细胞向创面中心迁移增殖、收缩伤口面积越快^[12]。但若肌成纤维细胞在修复后期过度活跃导致修复失衡,可能参与瘢痕形成^[13]。

COL-1 是一种纤维状胶原蛋白,占人体胶原蛋白的 90%,是细胞外基质的主要成分,为皮肤、结缔组织等的主要结构,参与创面愈合。创面肌成纤维细胞可分泌 COL-1 为主的细胞外基质,为创面愈合提供适宜的微环境,通过 COL-1 纤维“轨迹”又可促进细胞迁移、相互作用,并促进再上皮化。因此,以 COL-1 为主的细胞外基质与表达 α -SMA 的肌成纤维细胞在创面愈合中相辅相成,共同参与创面收缩过程^[13]。有研究发现^[14],即使在胶原蛋白等细胞外基质充足的情况下,如果缺乏活化的肌成纤维细胞,会导致细胞外基质重塑受阻,肉芽组织收缩不足,从而引发再上皮化延迟和新生血管难以出芽并成熟的不良后果。因此,创面组织中 α -SMA、COL-1 表达的水平,反映了创面肌成纤维细胞转化程度及细胞外基质沉积水平,对创面修复机制的研究至关重要。

糖尿病创面由于长期处于高血糖状态下,高血糖环境会干扰各种细胞因子的表达,导致氧化应激水平失调,放大低氧诱导的损伤,出现创面修复障碍^[16]。研究发现^[17-19],糖尿病创面修复过程中,肌成纤维细胞的活性下降,从多个阶段导致创面愈合过程受损。创面修复障碍与成纤维细胞向肌成纤维细胞转化不足、肌成纤维细胞活性减弱、细胞外基质分泌水平低下以及伤口收缩能力下降密切相关。本研究结果亦显示,对照组正常皮肤创面组织修复过程中, α -SMA、COL-1 蛋白表达缓慢上升,创面愈合稳步进行;而与对照组比较,糖尿病创面模型组创面组织中 α -SMA、COL-1 蛋白表达均明显下降,且随着创面发生时间变化,模型组创面组织中 α -SMA、COL-1 蛋白未见升高,甚至呈缓慢下降趋势,提示糖尿病创面修复过程中,创面组织中 α -SMA、COL-1 蛋白表达异常,影响创面愈合。以上结果与文献表述相同^[17-19]。

MEBT/MEBO 是以湿润烧伤膏为主要药物并结合湿润暴露疗法治疗糖尿病创面的有效手段,可液化排出创面坏死组织,为创面持续营造生理性湿润环境,改善创面局部微环境,加快创面组织再生修复。本研究结果显示,糖尿病难愈合创面经 MEBT/MEBO 治疗后,相较于模型组,创面肉芽组织病理形态明显改善,创面愈合率显著升高,表明 MEBT/MEBO 能有效促进糖尿病难愈合创面的修复,这与本课题组前期相

关研究结果一致。根据蛋白免疫印迹和荧光检测结果综合观察,与模型组相比,MEBO 组治疗第 7 天、第 14 天创面组织 α -SMA 表达显著升高;治疗第 7 天、第 14 天创面组织 COL-1 表达也较高,提示 MEBO 能够显著提高糖尿病创面修复过程中 α -SMA、COL-1 蛋白表达,促进肌成纤维细胞转化及细胞外基质胶原分泌,加速创面愈合。

综上所述,糖尿病创面修复过程中,创面组织 α -SMA、COL-1 蛋白表达异常导致创面愈合障碍,MEBT/MEBO 可能通过提高 α -SMA 和 COL-1 的蛋白表达水平,促进肌成纤维细胞转化及细胞外基质的沉积,从而加速糖尿病难愈合创面修复。

参考文献:

- [1] 李杰辉,唐乾利. MEBT/MEBO 在慢性难愈合创面治疗中的基础与临床研究进展[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2021, 33(2):77-81.
- [2] 唐乾利,唐强,龚元勋. 慢性难愈合创面的基础研究及临床应用进展[J]. 右江医学, 2020, 48(11):801-806.
- [3] 包崇婵. MEBT/MEBO 对慢性难愈合创面中 Collagen I 和 Collagen III 表达水平影响的研究[D]. 百色:右江民族医学院, 2022.
- [4] ARIF S, ATTIOGBE E, MOULIN V J. Granulation tissue myofibroblasts during normal and pathological skin healing: the interaction between their secretome and the microenvironment[J]. Wound Repair Regen, 2021, 29(4): 563-572.
- [5] CHEN C J, KAJITA H, TAKAYA K, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals cellular functional heterogeneity in dermis between fibrotic and regenerative wound healing fates[J]. Front Immunol, 2022, 13:875407.
- [6] 姜艳,巩奇明,韦骋,等. 湿润烧伤膏对脂多糖致大鼠皮肤成纤维细胞损伤的改善作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(6):702-708.
- [7] 李利青,唐乾利,姜艳,等. 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏调控 PI3K/Akt/eNOS 信号通路促进创面修复的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5):1054-1058.
- [8] 郝颖,柴瑞华,于世家. 改良链脉佐菌素(STZ)诱导大鼠糖尿病模型及其饲养方法[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4):784-785.
- [9] 陈枫,程锦楠,唐小平,等. 大鼠品系及药物剂量对糖尿病大鼠模型的影响[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(2):156-158.
- [10] 赵京禹,付小兵,雷永红,等. 大鼠小面积全层皮肤缺损创面模型的制备[J]. 感染、炎症、修复, 2008, 9(1):63-64.
- [11] 沈道修,顾月芳,任晓英. 一种研究中西药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J]. 中西医结合杂志, 1983, 3(1):49-50,67,5.

- [12] HUANG J W, HENG S J, ZHANG W L, et al. Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 128:137-144.
- [13] HAHN J M, MCFARLAND K L, COMBS K A, et al. Myofibroblasts are not characteristic features of keloid lesions [J]. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2022, 10(11):e4680.
- [14] WANG X T, MCKEEVER C C, VONU P, et al. Dynamic histological events and molecular changes in excisional wound healing of diabetic DB/DB mice [J]. *J Surg Res*, 2019, 238:186-197.
- [15] MCANDREWS K M, MIYAKE T, EHSANIPOUR E A, et al. Dermal α SMA⁺ myofibroblasts orchestrate skin wound repair via β 1 integrin and independent of type I collagen production [J]. *EMBO J*, 2022, 41(7):e109470.
- [16] SHOOK B A, WASKO R R, MANO O, et al. Dermal adipocyte lipolysis and myofibroblast conversion are required for efficient skin repair [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(6):880-895.
- [17] YANG J R, LIU X Q, WANG W P, et al. Bioelectric fields coordinate wound contraction and re-epithelialization process to accelerate wound healing via promoting myofibroblast transformation [J]. *Bioelectrochemistry*, 2022, 148:108247.
- [18] GUO L, MI J W, ZHANG H C, et al. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during wound healing and scarring [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2023, 22(2):661-668.
- [19] SCHUSTER R, YOUNESI F, EZZO M, et al. The role of myofibroblasts in physiological and pathological tissue repair [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2023, 15(1):a041231.

收稿日期:2023-01-23;修回日期:2023-02-28

(上接第 181 页)

- [9] 万京华,章晓联,辛善禄.鸭跖草的抑菌作用研究 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2005, 16(1):25-27.
- [10] 廖丽娟,黄已桃,戴园园,等.山黄皮不同部位水提取物抗菌和降糖作用分析 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(6):705-709.
- [11] 余昕,朱焯,欧丽兰,等.鸭跖草抗炎活性部位筛选及抗炎机制 [J]. *中成药*, 2015, 37(8):1824-1827.
- [12] 杨燕妮,曹景文,王毅,等.炎宁糖浆体内外抗菌实验研究 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(11):1356-1362.
- [13] LAM W W L, WOO E J, KOTAKA M, et al. Molecular interaction of flagellar export chaperone FliS and cochaperone HP1076 in *Helicobacter pylori* [J]. *FASEB J*, 2010, 24(10):4020-4032.
- [14] GU H Y. Role of flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* [J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(7):863-869.
- [15] ITOH M, WADA K R, TAN S, et al. Antibacterial action of bile acids against *Helicobacter pylori* and changes in its ultrastructural morphology: effect of unconjugated dihydroxy bile acid [J]. *J Gastroenterol*, 1999, 34(5):571-576.
- [16] JOSEPHANS C, LABIGNE A, SUERBAUM S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(11):3010-3020.
- [17] HATHROUBI S, ZEREBINSKI J, OTTEMANN K M. *Helicobacter pylori* biofilm involves a multigene stress-biased response, including a structural role for flagella [J]. *mBio*, 2018, 9(5):e01973-e01918.
- [18] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9):623-633.
- [19] HATHROUBI S, MEKNI M A, DOMENICO P, et al. Biofilms: microbial shelters against antibiotics [J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(2):147-156.
- [20] YONEZAWA H, OSAKI T, HANAWA T, et al. Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e73301.
- [21] LI R J, QIN C, HUANG G R, et al. Phillygenin inhibits *Helicobacter pylori* by preventing biofilm formation and inducing ATP leakage [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13:863624.

收稿日期:2023-01-28;修回日期:2023-03-02