

维生素D调控糖尿病创面促愈合机制的研究

卢爱俊¹, 岳小燕¹, 陈宇航², 高钰青¹, 张书评¹, 吴晨葳¹

(1. 内蒙古自治区人民医院 内分泌科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059)

【摘要】目的 探讨维生素D治疗促进糖尿病全层皮肤缺损小鼠创面愈合的机制。方法 采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病模型, 30只小鼠造模成功后分别记录基线资料并按照随机数表法分为对照组(NVD组)、低剂量维生素D治疗组I(VDI组)和高剂量维生素D治疗组II(VDII组)各10只。分别在治疗1、3、7、14 d后以NIH ImageJ图像分析软件测量创面面积、计算创面愈合率; 光镜下观察创面肉芽组织生长情况; 双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)对创面组织中炎症因子(TNF- α 、IL-6)行定量分析; 聚合酶链反应(PCR)检测创面MMP9、TIMP1 mRNA水平。结果 总体来看, 三组小鼠创面愈合率随着时间的延长而增加, 其中VD II组在14 d时创面愈合率最高(80.86 \pm 18.77), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。VD II组较VDI组及对照组肉芽组织生长更为明显, 表现为较多成纤维细胞和大量新生血管生成、炎性细胞减少。VD II组、VDI组与对照组相比, 25(OH)₂VitD、TIMP1 mRNA水平升高, TNF- α 、IL-6、MMP 9mRNA水平下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 其中VDII组较VDI组25(OH)₂VitD、TIMP1 mRNA升高更明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$)且TNF- α 、IL-6、MMP 9mRNA水平降低更明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 维生素D对糖尿病全层皮肤缺损小鼠具有较好的皮肤伤口愈合作用、且呈剂量依赖性; 维生素D可以通过抑制创面炎症因子TNF- α 、IL-6的表达, 降低MMP 9mRNA表达、提高TIMP1 mRNA水平促进创面愈合。

【关键词】 维生素D; 糖尿病创面; TNF- α ; IL-6; MMP9mRNA; TIMP1mRNA

中图分类号: R375

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)03-0272-04

糖尿病是目前除心血管疾病、肿瘤外的第三大严重影响人类健康与寿命的疾病。随着糖尿病病程延长, 糖尿病各种并发症亦逐渐出现, 而最严重的并发症之一就是糖尿病足^[1]。糖尿病足创面难愈合且发病机制非常复杂, 目前认为各种原因导致炎症因子产生异常增多、造成创面炎症反应期延长是其创面难愈合的重要原因^[2]。所以, 进一步探讨糖尿病足创面难愈合机制并寻找有效、可行的干预创面难愈合的方法是促进创面愈合的关键。近年来的研究表明细胞免疫异常是造成糖尿病足创面难愈合的重要原因, 而维生素D对免疫功能尤其是对细胞免疫具有调节作用, 维生素D浓度的降低是糖尿病足创面难愈合甚至感染的预测因子, 维生素D对糖尿病足的愈合具有保护作用^[3]。但目前在这方面研究较少。

本课题通过构建STZ造模糖尿病小鼠, 成功后在小鼠后背形成全层皮肤缺损的创面模型, 比较对

对照组及活性维生素D干预组小鼠局部创面愈合率、创面肉芽组织生长情况, 测定创面组织中炎症因子(TNF- α 、IL-6)以及创面组织中MMP9 mRNA、TIMP1 mRNA水平。进一步探究维生素D治疗对创面愈合以及对上述炎症因子表达的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 小鼠 选用40只4周龄雄性ICR小鼠(斯贝福)、体重20~25 g, 采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病模型, 选取建模成功小鼠30只。实验小鼠由上海肽谷生物技术有限公司提供。

1.1.2 主要试剂及材料 含15%猪油的高脂鼠粮(科澳协力)、1, 25-二羟基维生素D3(sigma)、Mouse TNF- α ELISA Kit(Elabscience)、Mouse IL-6 ELISA Kit(Elabscience)、HE染色(Leica)、Super-

收稿日期: 2022-03-05; 修回日期: 2022-05-12

基金项目: 内蒙古自治区科技厅联合项目(2019LH08005); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202201026); 内蒙古自治区人民医院院内课题项目(2020YN05)

第一作者: 卢爱俊(1981-), 男, 硕士, 副主任医师。研究方向: 糖尿病及其慢性并发症、尤其是糖尿病足的诊治。

E-mail: 278253117@qq.com

Script III RT 逆转录 kit (ABI-invitrogen)、荧光定量 PCR 仪 (Applied biosystems、USA)。

1.2 方法

40 只链脲佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病小鼠模型, 选取 30 只造模成功的小鼠单笼喂养, 并形成小鼠糖尿病全层皮肤缺损, 具体方法参考文献^[4,5]。继续给予高脂强化鼠粮, 自由饮水。分为对照组、低剂量维生素 D 治疗组 (VD I) 和高剂量维生素 D 治疗组 (VD II) 各 10 只, 每隔 1 日早晨 8 时, 低剂量维生素 D 治疗组 (VD I) 小鼠 1,25-(OH)₂VitD₃ 1 μg·kg+0.6 mL 花生油灌胃; 高剂量维生素 D 治疗组 (VD II) 小鼠给予 1,25-(OH)₂VitD₃ 4 μg·kg+0.6 mL 花生油灌胃; 对照组 0.6 mL 花生油灌胃, 灌服时间为 14 d。3 组创面给予常规换药治疗, 1 次/d。

1.3 观察指标

1.3.1 创面愈合效果评价 3 组小鼠分别于治疗第 1、3、7、14 d 以指定的图像分析软件 (NIH ImageJ) 测量创面的面积。计算 3 组小鼠上述时间节点的创面愈合率。创面愈合率 (%) = (治疗前创面面积 - 治疗后创面面积) / 治疗前创面面积 × 100%。

1.3.2 创面愈合组织学评价: 3 组小鼠分别于创面治疗第 1、3、7、14 d, 取创面肉芽组织按照标准病理切片制备要求制作成功, 分别在低倍 (100 ×) 及高倍 (400 ×) 光镜下观察创面肉芽组织生长情况。

1.3.3 创面组织炎性因子的评价 三组小鼠分别于伤后 1 d、3 d、7 d、14 d 取创面肉芽组织 2 份: 其中一份行双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA) 对组织中炎症因子 (TNF-α、IL-6) 行定量分析; 另一份行聚合酶链反应 (PCR) 检测创面 MMP 9、TIMP1 mRNA 水平。

2 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数的比较采用独立样本 *t* 检验 (方差不齐时为 *t'*), 检验水准为 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 3 组小鼠的一般表现

造模成功小鼠 30 只, 在治疗过程中对照组小鼠死亡 1 只, VDI 组死亡 2 只, VD II 组死亡 2 只。

3.2 VitD 可提高创面愈合率, 加快创面肉芽组织生长 (见表 1、图 1)。

表 1 三组治疗第 1、3、7、14 d 的创面愈合率 (%)

时间	第 1 d	第 3 d	第 7 d	第 14 d
对照组	1.94 ± 1.02	6.53 ± 2.72	16.69 ± 11.20	30.98 ± 28.94
VD I	2.14 ± 0.78	17.43 ± 13.26	50.46 ± 28.12	69.36 ± 15.84
VD II	3.83 ± 1.15	8.85 ± 1.51	22.78 ± 10.57	80.86 ± 18.77

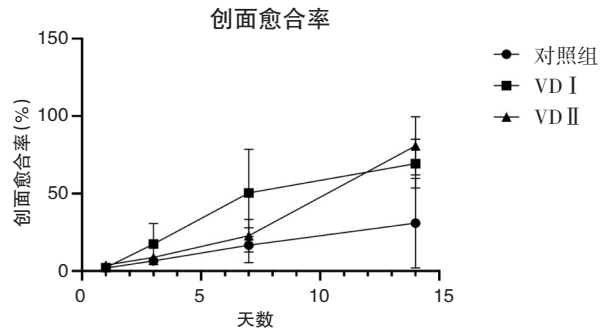


图 1 三组治疗第 1、3、7、14 d 的创面愈合率 (%)

总体来看, 3 组处理创面愈合率随时间的增加而增加, VD II 组在 14 d 时创面愈合率最高 (80.86 ± 18.77), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但其 1~7 d 内的增长较 VD I 缓慢。

3.3 HE 染色检测结果 (见图 2)

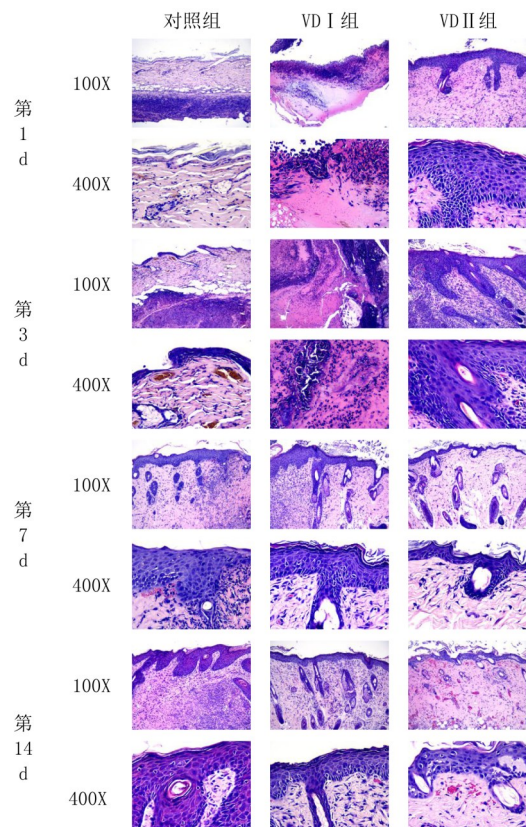


图 2 三组创面在第 1、3、7、14 d 创面肉芽组织生长情况

总体来看,随着时间的增加,肉芽组织逐渐增多。对照组肉芽组织生长缓慢,颜色为白色或淡红色,表面较光滑,含血管少;VD I组肉芽组织呈淡红色,血管含量较对照组多,较硬;VD II组肉芽组织呈鲜红色,表面有小颗粒样凸起,小血管较多,可见较多成纤维细胞和大量新生血管生成、炎性细胞减少。

3.4 VitD降低创面炎症因子TNF- α 、IL-6水平(图3)

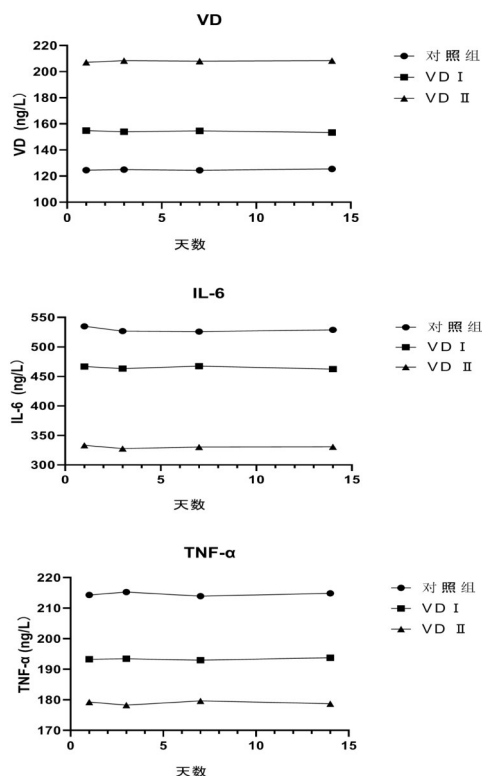


图3 三组创面治疗第14 d创面组织中VitD、TNF- α 、IL-6的表达

由以上实验结果可知,从VitD来看,对照组、VD I、VD II之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。从IL-6来看,对照组、VD I、VD II之间差异有统计学意义($P < 0.05$);从TNF- α 来看,对照组、VD I、VD II之间差异有统计学意义($P < 0.05$);维生素D治疗可以增加VitD含量、降低IL-6和TNF- α 的表达。

3.5 VitD降低创面MMP 9mRNA表达、升高TIMP1 mRNA的表达,与剂量呈正相关(见图4)

从MMP 9mRNA的相对表达量来看,VD I组与对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),且VD II组对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),VD I组与VD II组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);从TIMP1 mRNA的相对表达量来看,对照组与VD I组、VD II组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),而VD I组与VD II组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

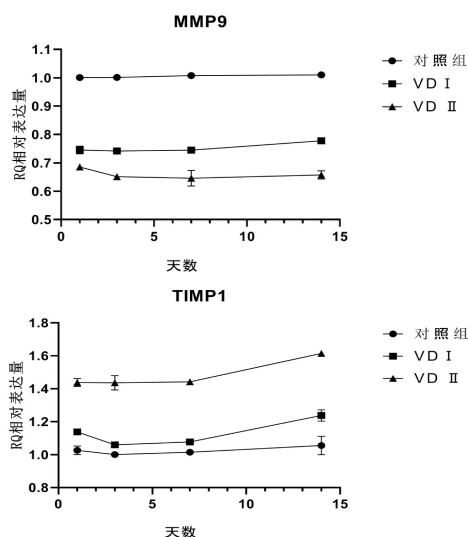


图4 三组创面治疗第14 d创面组织中MMP9 mRNA、TIMP1 mRNA的表达

4 讨论

糖尿病创面难愈合的机制非常复杂,其中大量证据表明糖尿病创面中存在免疫及炎症异常,体外实验发现糖尿病创面患者外周血的中性粒细胞黏附、吞噬、趋化、杀菌功能受损^[6]。而糖尿病足创面炎症反应期延长、炎症细胞因子产生增加,上述结局可通过多种通路持续诱导成纤维细胞及淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞产生的基质金属蛋白酶(MMPs)增加,与此同时创面中金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)减少,而MMP/TIMPs比值的失衡也是创面难愈合的重要原因^[7,8]。

既往有研究提示维生素D缺乏是糖尿病足创面不愈合、甚至创面发生感染的独立危险因素,适当补充维生素D可能会促进创面的愈合^[7]。本研究结果提示维生素D治疗组较对照组创面愈合率高,且高剂量维生素D治疗组较低剂量维生素D治疗组在14 d时创面愈合率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HE染色可见维生素D治疗组较对照组肉芽组织生长更为明显、可见较多成纤维细胞形成和大量新生血管生成、炎性细胞减少,且呈现剂量依赖性。本研究证实维生素D治疗可以加快创面愈合,促进创面肉芽组织生长。

目前已有针对维生素D对创面促愈合机制的研究认为,维生素D对免疫功能尤其是对细胞免疫具有调节作用,对免疫系统、免疫细胞、细胞因子均有不同程度的影响^[8]。对于炎症因子如IFN- γ 、TNF- β 、IL-12和IL-6等,维生素D在体内的活性成分有下调上述炎症因子的作用;而对于抗炎症因子

如TGF- β 、IL-10和IL-4等,维生素D在体内的活性成分有上调抗炎因子的作用;从而达到免疫平衡调节作用^[9]。TNF- α 也是创面难愈合的重要炎症因子^[10,11]。本研究结果提示维生素D治疗组较常规治疗组可以降低MMP 9、TNF- α 、IL-6水平、提升创面组织中TIMP1水平,上述变化与维生素D剂量呈正相关($P < 0.05$),提示维生素D可以通过抑制创面炎症因子TNF- α 、IL-6的表达,降低MMP 9 mRNA、提高TIMP1 mRNA水平达到促进创面愈合,从而阐明维生素D促进创面愈合的可能机制。

总之,本研究证实维生素D能加快创面的愈合,下调创面炎症因子表达,降低创面炎症反应,从而为糖尿病足创面愈合提供了一种潜在的有益的治疗方法。本研究存在一定局限性,如每组动物例数较少、没有进一步阐明TNF- α 及IL-6对TIMP、MMP表达的影响,期待后续更多的关于维生素D与创面炎症通路的研究。

参考文献

- [1]许樟荣.糖尿病足病防治的关键——解读2019国内外糖尿病足防治指南[J].中国临床新医学,2019,12(12):1259-1262
- [2]Hart J. Inflammation 2: its role in the healing of chronic wounds [J]. Wound Care, 2017, 11(5): 245-249
- [3]Morales E, Romieu I, Guerra S, et al. Maternal vitamin D status in pregnancy and risk of lower respiratory tract infections,

wheezing, and asthma in offspring[J]. Epidemiology, 2018, 23(1):64-71

- [4]倪程佩,周正宇.1,25(OH)2D3对2型糖尿病小鼠自噬与炎症反应的干预及其分子机制研究[D].苏州:苏州大学,2016
- [5]曹大勇,牛希华,夏成德,等.小鼠糖尿病全层皮肤缺损模型的建立[J/CD].中华损伤与修复杂志:电子版,2017,10(6):490-494
- [6]洪秀韬,陈凤玲,刘卉芳,等.2型糖尿病患者血清维生素D水平与单核巨噬细胞系统极化的相关性研究[J].中华诊断学电子杂志,2021,9(4):259-263
- [7]陶瑜,逢曙光.维生素D在2型糖尿病足溃疡治疗中的作用[J].医学综述,2018,24(22):4528-4532
- [8]Altieri B, Grant WB, Della CS, et al. Vitamin D and pancreas: the role of sunshine vitamin in the pathogenesis of diabetes mellitus and pancreatic cancer[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(16):3472-3488
- [9]Razzaghi R, Pourbagheri H, Momen HM, et al. The effects of vitamin D supplementation on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Diabetes Complications, 2019, 31(4):766-772
- [10]杨梅,钟晓卫.血清1,25(OH)2D3水平在糖尿病足创面愈合中的作用研究[J].糖尿病新世界,2020,23(8):176-178
- [11]纪永佳,陈彦香.维生素D免疫调节作用与抗菌肽作用的研究进展[J].当代医学,2018,24(6):166-169

(上接第264页)

参考文献

- [1]Deng Q, Liu W. The effect of social norms on physicians' intentions to use liver cancer screening: a cross-sectional study using extended theory of planned behavior[J]. Risk Manag Healthc Policy, 2022, 15(6):179-191
- [2]Rinninella E, Cerrito L, Spinelli I, et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current evidence and future perspectives[J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(3): 235-248
- [3]吴敏超,杨晨,韩乐,等.蒙药古日古木-13的研究进展[J].疾病监测与控制,2019,13(3):226-228
- [4]锡林其木格,吴玉小.古日古木-13味丸在蒙医临床中的应用[J].中国民族医药杂志,2020,26(7):72-73
- [5]吴敏超,李璇,段伟娜,等.蒙药古日古木-13含药血清对过氧化氢诱导的人Huh-7细胞损伤的保护作用[J].内蒙古医科大学学报,2021,43(2):147-151
- [6]Xu H, Zhang Y, Wang P, et al. A comprehensive review of integrative pharmacology-based investigation: a paradigm shift in traditional chinese medicine[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1379-1399
- [7]Barshir R, Fishilevich S, Iny ST, et al. GeneCaRNA: a comprehensive gene-centric database of human non-coding RNAs in the genecards suite[J]. J Mol Biol, 2021, 433(11): e166913

- [8]Szklaarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): 605-612
- [9]单成彬,薛佳,马超美.蒙药复方古日古木-7治疗肝脏疾病的网络药理学研究[J].内蒙古大学学报:自然科学版,2021,52(2):162-175
- [10]Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Biomedicines, 2021, 9(11):1639-1640
- [11]Popova NV, Jucker M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1743-1744
- [12]Nogales C, Mamdouh ZM, List M, et al. Network pharmacology: curing causal mechanisms instead of treating symptoms [J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(2): 136-150
- [13]Jiao X, Jin X, Ma Y, et al. A comprehensive application: molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine[J]. Comput Biol Chem, 2021, 90(11): e107402