doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2020.09.005 ◇药学研究◇

表没食子儿茶素没食子酸酯促进2型糖尿病伤口愈合的实验研究

张彦[1],汪天赐[2],蔡婧[2],李亚娟[1]

作者单位:[1]空军军医大学第一附属医院肾脏内科,陕西 西安710032;
[2]空军军医大学军事生物医学工程学系,陕西 西安710032

通信作者:李亚娟,女,副主任护师,研究方向为重症和老年护理,E-mail:liyajuanabc@163.com

基金项目:陕西省自然科学基金项目(2018JQ8056)

摘要:目的 系统评价表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对于2型糖尿病db/db小鼠伤口愈合的治疗效果。**方法** 3月龄雄性无特定病原体(SPF)级db/db小鼠共32只以及同背景的野生型雄性小鼠共16只用于本实验,共等分为野生小鼠组(Control)、db/db小鼠组(db/db)和db/db小鼠EGCG治疗组(db/db+EGCG),每组16只。所有小鼠均构建背部圆形创口(直径1 cm),db/db+EGCG组小鼠在伤口模型构建后立即施以每日的EGCG(10 mg/kg)灌胃处理。术后第5、12、19天处死每组4只小鼠,分析伤口愈合速率、抗张强度、局部皮肤血流速率、细胞因子表达情况。**结果** db/db+EGCG组小鼠在伤口模型建立的第5、12、19天伤口愈合率分别为(19.4±3.2)%、(55.2±4.8)%和(79.7±5.2)%,db/db组小鼠各时间点伤口愈合率分别为(10.1±2.0)%、(39.1±5.2)%和(59.2±6.2)%,db/db+EGCG组均显著高于db/db组($P<0.05$),同时EGCG也显著降低了db/db小鼠伤口愈合时间($P<0.05$);并且EGCG在术后第5、12、19天均显著增加了db/db小鼠伤口组织的生物力学抗张强度($P<0.05$),改善了伤口位置局部血流速率($P<0.05$),并显著抑制了炎性因子白细胞介素1β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)表达($P<0.05$),促进了血管内皮生长因子(VEGF)表达($P<0.05$)。**结论** EGCG能够显著改善2型糖尿病db/db小鼠的伤口愈合能力,具有可观的临床应用前景。

关键词:儿茶素; 伤口愈合; 糖尿病,2型; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 炎症反应; 小鼠,基因敲除

The experimental study for the promotion of would healing in type 2 diabetese by epigallocatechin gallate

ZHANG Yan[1],WANG Tianci[2],CAI Jing [2],LI Yajuan[1]

Author Affiliations:[1]Department of Urology,The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an,Shaanxi 710032,*China;[2]Department of Military Biomedical Engineering of Air Force Military Medical University,Xi'an,Shaanxi* 710032,*China*

Abstract: Objective To systematically evaluate the therapeutic effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on wound healing in type 2 diabetic db/db mice.**Methods** Thirty-two 3-month-old male specified-pathogens free (SPF) db/db mice and 16 wild-type mice with the same background were used in this experiment.The mice were equally divided into three groups,including the wild-type mice (Control),db/db mice (db/db) and EGCG-treated db/db mice (db/db+EGCG),with 16 mice in each group.A round wound with a diameter of 1 cm was established on the dorsa of all mice.The mice in the db/db+EGCG group were gavaged with daily EGCG (10 mg/kg) treatment immediately after the establishment of the wound model.Four mice in each group were sacrificed at the 5th,12th and 19th day after surgery.The wound healing rate,tensile strength,local blood flow rate and cytokine expression were analyzed.**Results** The wound healing rate in the db/db+EGCG group at the 5th,12th and 19th day post the wound model establishment was (19.4±3.2) %,(55.2±4.8) % and (79.7±5.2) %,respectively.The wound healing rate in the db/db group at each time point was (10.1±2.0) %,(39.1±5.2) % and (59.2±6.2) %,respectively.The wound healing rate in the db/db+EGCG group was significantly higher than that in the db/db group ($P<0.05$).Moreover,EGCG also significantly reduced the overall wound healing time in db/db mice ($P<0.05$),increased the biomechanical tensile strength of the wound tissues ($P<0.05$) at the 5th,12th and 19th day post surgery,and improved local blood flow rate at the wound location ($P<0.05$).EGCG also significantly inhibited the interleukin-1β (IL-1β),interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) inflammatory factor expression ($P<0.05$),and enhanced the expression of vascular regeneration cytokine VEGF ($P<0.05$).**Conclusion** EGCG can significantly improve the wound healing ability of type 2 diabetic db/db mice,and may have promising clinical application prospects.

Key words:Catechin; Wound healing; Diabetes mellitus,Type 2; Epigalocatechin gallate; Inflammatory response; Mice, knockout

2型糖尿病是最常见的慢性老年性疾病之一,占糖尿病病人总人口的九成以上。随着全世界老龄化问题的日益严峻,2型糖尿病病人数量也在逐年上升[1-2]。2型糖尿病会累积机体的多个系统产生慢性并发症,而其自身的创伤修复困难问题也是长期困扰医务人员的一个重要难题,严重威胁着病人的生理和心理健康[3]。机体系统代谢紊乱、自身免疫力下降、创伤部位细菌繁殖、加剧的炎症反应等都是诱发2型糖尿病创伤愈合困难的关键因素[4-5]。目前临床上应对2型糖尿病创伤愈合问题仍以控制血糖为主要手段,但是仍缺乏有效且安全的治疗方法。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶茶多酚中的核心化学成分,其抗菌、抗氧化、抗肿瘤等功效已得到大量的动物和临床研究证实[6-9]。近年来的研究也发现,EGCG能够凭借其显著的抗炎症反应功效,在促进正常和1型糖尿病软组织创伤愈合中发挥重要作用[10-12]。但是,EGCG能否显著改善发病人群更广泛的糖尿病类型——2型糖尿病的创伤修复困难问题,迄今仍未有研究记载。本实验于2015年1月至2016年1月通过应用瘦素受体缺陷的2型糖尿病db/db小鼠作为动物模型,系统评价EGCG对于2型糖尿病伤口愈合的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物、实验试剂及仪器设备 2型糖尿病db/db小鼠32只[BKS.Cg-*m* +/+ *Lepr*^{db}/J,3月龄,雄性,无特定病原体(SPF)级,体质量(41.50±7.95)g],以及与它们相同背景的雄性野生型小鼠16只,体质量(19.72±2.85)g,全部购于南京生物医药研究院(协议许可编号:NBRI[2014]314),医学实验动物生产许可证号:SCXK(苏)20120001;EGCG,购于美国Sigma公司;麻醉药戊巴比妥钠缓冲液,购于美国Sigma-Aldrich公司;血糖测试仪,购于美国Johnson & Johnson公司;3M Tegaderm透明薄膜敷贴,购于美国3M Healthcare公司;伺服式生物力学万能材料测试机,购于东莞市昆仑检测仪器公司;用于拍摄伤口图像的照相机,购于日本Canon公司;小鼠软组织酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,购于武汉华美生物公司;激光多普勒血流测量系统以及与其配套的皮肤接触探头,购于英国Moor Instruments公司。

1.2 背部软组织创伤模型构建及EGCG治疗 本研究获空军军医大学实验动物伦理学委员会批准(许可编号:20140209),所有涉及动物实验的操作步骤与实验流程均按照协议规定严格执行。所有小鼠抵达本实验室后,适应1周后开始正式实验。1周后,于上午(8~10时)对全部小鼠进行尾部提取静脉血,使用血糖测试仪测量随机血糖水平,血糖水平 > 16.7 mmol/L的实验动物认定模型达到标准,即被纳入实验。本研究被划分为野生型小鼠组(Control)、db/db小鼠组(db/db)及db/db施以EGCG治疗组(db/db+EGCG)共三组,每组动物样本量 $n = 16$。在全部48只小鼠的背部手术创建一处皮肤损伤模型,主要操作流程包括:以戊巴比妥钠腹腔注射的形式对各组动物进行麻醉,通过应用皮肤活检针在所有小鼠的背部构建1个直径为1 cm的圆形伤口,确保与皮肤、真皮和肌膜充分剥离,并覆盖以3M薄膜敷贴。随后皮下注射青/链霉素预防潜在的创伤感染。分别在术后第5、12、19天对每组4只动物施以过量戊巴比妥钠安乐死,对于每组余下4只动物用于定量评价伤口完全愈合所花费的时长。db/db+EGCG组实验动物在组织损伤模型建立后立即予以每日的EGCG(10 mg/kg)灌胃处理。

1.3 小鼠伤口组织局部血流速率的测试分析 于软组织创伤模型构建的第5、12、19天,通过应用激光多普勒血流测量系统对小鼠背部伤口位置的局部血流速率进行定量测试分析。主要测量步骤为:将激光多普勒测量仪的探头放置于小鼠伤口的正中央位置,探头由激光发射器经发生纤维将激光束(780 nm波长)照射至伤口位置,通过探头内的接收纤维阵列将光信号以40 Hz的采样速率采集传递至多普勒的信号处理系统中,最后经自动的数据处理获得小鼠伤口位置的最终局部血流速数值。

1.4 小鼠软组织伤口愈合率的测试评估 于软组织创伤建立的术后0、5、12、19天进行背部软组织创伤的图像采集。主要步骤包括:将戊巴比妥钠麻醉的动物固定在解剖手术台上,确保动物无任何微移动,数码相机通过三脚架精确固定在小鼠背部伤口位置正上20 cm,待视野充分稳定后进行图像采集。使用自行编写的Matlab软件程序对图像中的创伤区域进行图像处理与分析(包括颜色阈值分割算法、局部自适应边缘提取算法等)。待软件分析完毕后,获得创伤位置的面积数值,通过公式计算伤口愈合率,作为评价软组织愈合进度的标尺:伤口愈合率 = (第0天伤口面积 − 第 n 天伤口面积)/第0天伤口面积×100%。

1.5 小鼠创伤组织生物力学抗张强度的测试评估 待伤口愈合率测试完毕后,对各时间点的小鼠背部软组织进行取材分离,使用手术剪将皮肤软组织生物标本修剪为8 mm^2×8 mm^2的正方形状,随后迅速浸泡于0.9%氯化钠溶液平衡缓冲液中以避免组织干燥。使用伺服式生物力学万能材料测试机对软组织进行力学拉伸测试,主要步骤为:力学测试机的两个预制夹具将软组织标本夹紧,确保伤口与夹具水平对称,施加1 N的力预加载将样本拉紧,待稳定后以20 mm/min的位移速度反向移动两个夹具,从而在组织标本产生轴向拉神应力载荷,系统自动记录应力与位移的时间变化关系,获取组织标本发生完全破裂时的断裂载荷作为实验指标。

1.6 小鼠伤口组织的ELISA测试评估 力学试验结束后,取各组小鼠创伤位置余下的组织样本用作ELISA测试。使用武汉华美生物公司的小鼠ELISA检测试剂盒对软组织中白细胞介素1β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达进行测试(货号分别为CSB-E08054m、CSB-E04639m、CSB-E04741m和CSB-E04756m)。所有实验操作步骤均按照试剂盒的说明执行。ELISA检测基于双抗体夹心法原理,整个过程包括酶标板包被、血清样本上样、加入酶标抗体、加入底物液显色、终止反应以及酶标仪吸光度检测,每个样本设置3个复孔,取测量平均值。

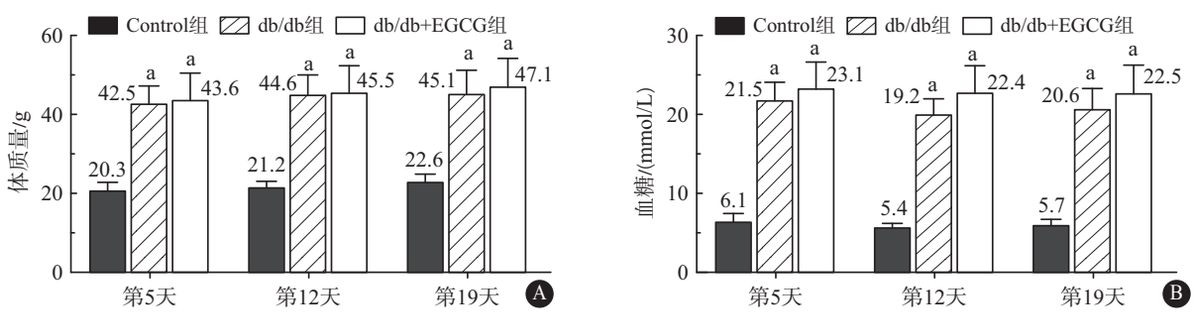
1.7 统计学方法 实验数据均以$\bar{x} \pm s$表达,统计学检测应用SPSS 22.0软件。使用单因素方差分析结合Bonferroni校正法分析来进行三组实验数据的每两组之间的比较。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG对于2型糖尿病db/db小鼠血糖和体质量的影响 如图1A所示,三组小鼠体质量比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为78.677、55.069和23.499,P值均小于0.001。db/db小鼠在软组织伤口模型构建的第5、12、19天的体质量值分别为(42.5±4.7)g、(44.6±5.5)g及(45.1±6.1)g,而Control组小鼠体质量在各时间点分别为(20.3±2.5)g、(21.2±1.9)g及(22.6±2.3)g,db/db组显著高于Control组小鼠($P<0.01$),而db/db+EGCG组小鼠的体质量值在第5、12、19天分别为(43.6±7.1)g、(45.5±6.9)g及(47.1±7.2)g,均显著高于Control组($P<0.01$),但是与db/db小鼠的体质量值在各时间点差异无统计学意义($P>0.05$)。

如图1B所示,三组小鼠血糖比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为80.251、59.812和29.918,P值均小于0.001。db/db小鼠在软组织伤口模型构建的第5、12、19天的随机血糖值分别为(21.5±2.6)mmol/L、(19.8±2.1)mmol/L及(20.6±2.7)mmol/L,而Control组小鼠体质量在各时间点分别为(6.1±0.9)mmol/L、(5.4±0.7)mmol/L及(5.7±0.9)mmol/L,db/db组显著高于Control组小鼠($P<0.01$)。db/db+EGCG组小鼠的体质量值在第5、12、19天分别为(23.1±3.5)mmol/L、(22.4±3.9)mmol/L及(22.5±3.8)mmol/L,均显著高于Control组($P<0.01$)。但是db/db组与db/db+EGCG组在术后各时间点的血糖值差异无统计学意义($P>0.05$)。而Control、db/db、db/db+EGCG三组小鼠组内在术后第5、12、19天的体质量和血糖均未发生显著性变化($P>0.05$),表明各组小鼠的体质量和血糖因素在术后19天内并未发生明显改变。

2.2 EGCG对于2型糖尿病db/db小鼠伤口愈合率和总愈合时间的影响 三组小鼠在伤口模型构建的第5、12、19天的伤口愈合率的比较结果如图2A所示。三组间伤口愈合率比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为20.953、20.788和22.543,P值均小于0.001。db/db小鼠在术后的第5、12、19天的伤口愈合率分别为(10.1±2.0)%、(39.1±5.2)%及(59.2±6.2)%,均显著低于Control组在各时间点的伤口愈合率,分别为(22.1±3.0)%、(60.3±4.5)%及(85.4±5.9)%,三个时间点的统计P

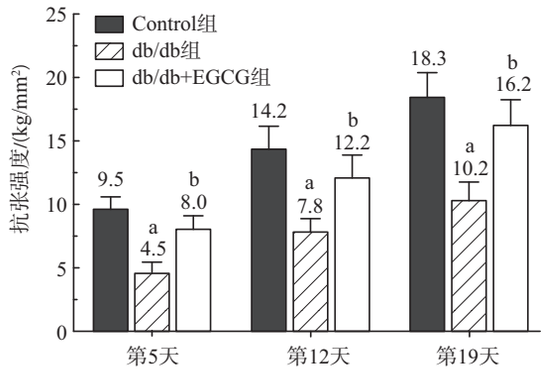


注:Control为野生型小鼠组(空白对照),db/db为db/db小鼠组,db/db+EGCG为db/db小鼠施以EGCG治疗组。与Control组比较,$^aP<0.05$

图1 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对于2型糖尿病db/db小鼠体质量(A)和血糖(B)的影响

值均小于0.001；而db/db+EGCG组小鼠在术后的第5、12、19天的伤口愈合率均显著高于对应时间点的db/db小鼠[(19.4±3.2)%比(10.1±2.0)%，$P=0.003$；(55.2±4.8)%比(39.1±5.2)%，$P=0.003$；(79.7±5.2)%比(59.2±6.2)%，$P=0.002$]。本研究也发现，db/db+EGCG组小鼠在术后各时间点的伤口愈合率与Control组差异无统计学意义(P值分别为0.583、0.523和0.603)。三组小鼠总愈合时间的对比结果如图2B所示。三组间伤口愈合时间比较的单因素方差分析的F值为14.153、P值为0.002。与Control组小鼠相比，db/db组小鼠的伤口总愈合时间显著延长，(39.9±5.4)d比(22.9±4.3)d，$P=0.003$；而db/db+EGCG组小鼠的伤口愈合时间显著低于db/db组小鼠，(25.1±4.9)d比(39.9±5.4)d，$P=0.006$。本研究也发现，db/db+EGCG组小鼠的伤口愈合时间与Control组差异无统计学意义($P=0.999$)。

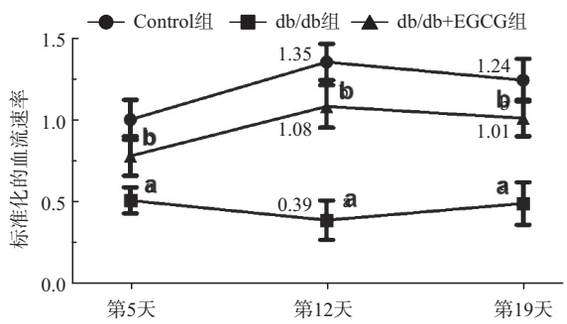
2.3 EGCG对于2型糖尿病db/db小鼠伤口组织生物力学抗张强度的影响 Control、db/db、db/db+EGCG三组小鼠在伤口模型构建的第5、12、19天的伤口组织生物力学抗张强度的比较结果如图3所示。三组间伤口组织生物力学抗张强度比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为25.885、16.801和20.322，P值均小于0.001。db/db小鼠的伤口组织生物力学抗张强度在术后的第5、12、19天均显著低于空白对照的Control组，分别为(4.5±0.9)kg/mm²比(9.5±1.1)kg/mm²；(7.8±1.0)kg/mm²比(12.2±2.0)kg/mm²；(10.2±1.5)kg/mm²比(18.3±2.1)kg/mm²，三个时间点的统计P值均小于0.001；但是，db/db+EGCG组小鼠在伤口模型构建的第5、12、19天的伤口组织生物力学抗张强度均显著高于db/db组小鼠，分别为(8.0±1.0)kg/mm²比(4.5±0.9)kg/mm²，$P=0.003$；(12.2±1.7)kg/mm²比(7.8±1.0)kg/mm²，$P=0.009$；(16.2±2.0)kg/mm²比(10.2±1.5)kg/mm²，$P=0.004$。本研究也发现，db/db+EGCG组小鼠在术后各时间点的伤口组织生物力学抗张强度与Control组差异无统计学意义(P值分别为0.179、0.300和0.458)。



注：Control为野生型小鼠组(空白对照)，db/db为db/db小鼠组，db/db+EGCG为db/db小鼠施以EGCG治疗组。与Control组比较，$^aP<0.05$；与db/db组比较，$^bP<0.05$

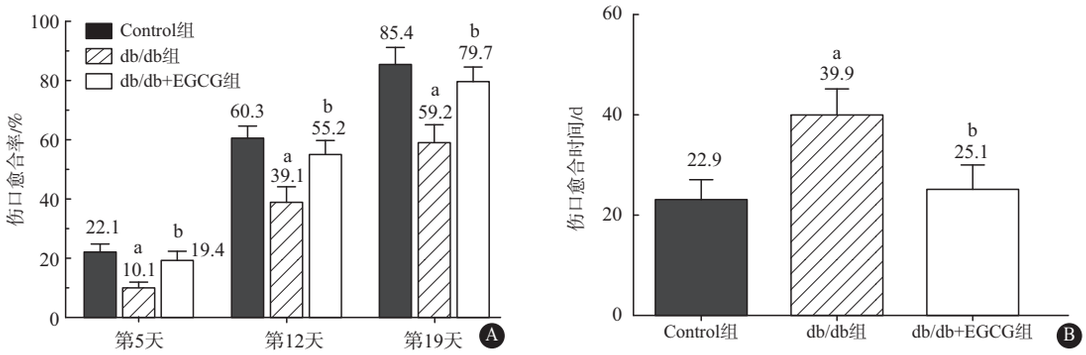
图3 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对于2型糖尿病db/db小鼠伤口组织生物力学抗张强度的影响

2.4 EGCG对于2型糖尿病db/db小鼠伤口组织位置局部血流速率的影响 Control、db/db、db/db+EGCG三组小鼠在伤口模型构建的第5、12、19天的伤口组织位置局部血流速率的比较结果如图4所示。三组间伤口组织局部血流速率比较的单因素



注：Control为野生型小鼠组(空白对照)，db/db为db/db小鼠组，db/db+EGCG为db/db小鼠施以EGCG治疗组。与Control组比较，$^aP<0.05$；与db/db组比较，$^bP<0.05$

图4 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)治疗对于2型糖尿病db/db小鼠伤口组织位置局部血流速度的影响



注：Control为野生型小鼠组(空白对照)，db/db为db/db小鼠组，db/db+EGCG为db/db小鼠施以EGCG治疗组。与Control组比较，$^aP<0.05$；与db/db组比较，$^bP<0.05$

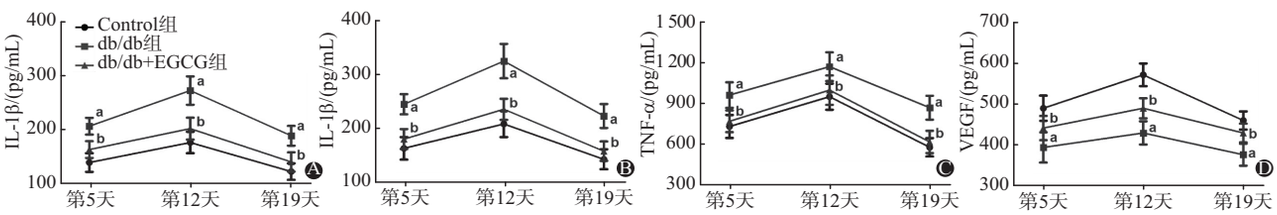
图2 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)治疗对于2型糖尿病db/db小鼠伤口愈合速率(A)和总愈合时间(B)的影响

方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为19.786、69.561和38.748，P值均小于0.001。db/db小鼠在术后第5、12、19天的伤口组织位置局部血流速率分别为(0.51±0.08)、(0.39±0.12)和(0.49±0.13)，而Control组在术后各时间点的伤口组织位置局部血流速率分别为(1.00±0.12)、(1.35±0.11)和(1.24±0.13)，db/db组均显著低于Control组，三个时间点的统计P值均小于0.001；而db/db+EGCG组小鼠在术后的第5、12、19天的伤口组织位置局部血流速率均显著高于db/db组小鼠[(0.78±0.12)比(0.51±0.08)，$P=0.020$；(1.08±0.13)比(0.39±0.12)，$P=0.001$；(1.01±0.11)比(0.49±0.13)，$P=0.001$]。本研究也发现，db/db+EGCG组小鼠在术后各时间点的伤口组织位置局部血流速率也显著低于Control组(P值分别为0.047、0.036和0.048)。

2.5　EGCG对于db/db小鼠伤口组织中重要细胞因子蛋白表达的影响　三组小鼠在伤口模型构建的第5、12、19天的伤口组织中重要细胞因子表达的比较结果如图5所示。三组间IL-1β比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为21.145、59.281和23.162，P值均小于0.001。db/db小鼠在术后第5、12、19天的伤口组织IL-1β表达量分别为(205.4±15.4)pg/mL、(271.4±26.3)pg/mL和(187.5±18.2)pg/mL，而db/db+EGCG组在术后各时间点IL-1β表达量分别为(162.1±15.5)pg/mL、(200.8±20.2)pg/mL和(139.2±17.8)pg/mL，均显著低于db/db组($P<0.01$)。三组间IL-6比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为23.295、66.094和26.108，P值均小于0.001。db/db小鼠在术后第5、12、19天的伤口组织IL-6表达量分别为(244.4±18.3)pg/mL、(322.9±31.3)pg/mL和(233.2±21.7)pg/mL，而db/db+EGCG组在术后各时间点IL-6表达量分别为(181.2±18.2)pg/mL、(235.3±19.2)pg/mL和(159.2±17.5)pg/mL，均显著低于db/db组($P<0.01$)。三组间TNF-α比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为18.055、30.762和35.471，P值均小于0.001。db/db小鼠在术后第5、12、19天的伤口组织TNF-α表达量分别为(962.7±92.9)pg/mL、(1169.2±104.6)pg/mL和(870.8±87.1)pg/mL，而db/db+EGCG组TNF-α表达量分别为(771.2±79.2)pg/mL、(998.4±107.4)pg/mL和(621.5±81.2)pg/mL，均显著低于db/db组($P<0.01$)。三组间VEGF比较的单因素方差分析在术后的第5、12、19天的F值分别为22.098、50.117和30.005，P值均小于0.001。db/db小鼠在术后第5、12、19天的伤口组织VEGF表达量分别为(395.1±36.7)pg/mL、(430.2±28.2)pg/mL和(377.5±26.8)pg/mL，而db/db+EGCG组VEGF表达量分别为(442.1±29.2)pg/mL、(490.2±24.3)pg/mL和(430.2±22.6)pg/mL，均显著高于db/db组($P<0.01$)。

3　讨论

EGCG作为从绿茶中提取的一种成分，是绿茶中最主要的活性和水溶性成分。大量研究证实，EGCG具有非常强的抗氧化和抗炎抑菌功效，并被发现在抗肿瘤及治疗心血管疾病中发挥了积极作用[6-8]。虽然近年来的研究也发现EGCG能够加速正常和1型糖尿病软组织的创伤愈合[9-12]，但是EGCG是否能够对于更为棘手且发生率更高的2型糖尿病的伤口愈合修复产生积极效果尚未见研究报道。本实验中使用了db/db小鼠动物模型作为2型糖尿病研究的实验工具。db/db小鼠是瘦素受体特异性缺陷的基因修饰小鼠，瘦素作为脂肪组织分泌的激素分子，能够作用于下丘脑的代谢调节中枢，发挥抑制食欲，减少能量摄取，抑制脂肪合成的作用。而瘦素受体缺陷的db/db小鼠则表现出肥胖、高血糖、多饮、多尿、多食等与临床2型糖尿病相似的体征，而该模型小鼠也是目前实验室中对于2型糖尿病及其并发症研究的最常用的动物模型之一[13-15]。



注：Control为野生型小鼠组(空白对照)，db/db为db/db小鼠组，db/db+EGCG为db/db小鼠施以EGCG治疗组。与Control组比较，$^aP<0.05$；与db/db组比较，$^bP<0.05$

图5　表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)治疗对于2型糖尿病db/db小鼠伤口组织中重要细胞因子表达的影响：A为白细胞介素1β(IL-1β)；B为白细胞介素6(IL-6)；C为肿瘤坏死因子α(TNF-α)；D为血管内皮生长因子(VEGF)

本研究发现,db/db小鼠在术后的各时间点的伤口愈合速率均显著低于空白对照组小鼠,同时db/db小鼠的创伤总愈合时间显著高于空白对照小鼠,提示2型糖尿病的db/db小鼠的伤口愈合进程显著延迟,这与临床上2型糖尿病的伤口愈合特征类似[16]。本研究使用EGCG(10 mg/kg)对db/db小鼠的创伤进行治疗,该剂量已被诸多先前研究证实能够显著加速伤口的愈合和修复[11,17]。本研究结果发现,EGCG(10 mg/kg)在术后的各时间点均能够显著提升db/db小鼠的伤口愈合速率,并能够显著缩短db/db小鼠伤口愈合的总时长。本研究结果提示,EGCG具有改善2型糖尿病db/db小鼠软组织创伤愈合障碍,加速伤口愈合修复的作用功效。

本研究生物力学测试结果表明,db/db小鼠的伤口外周组织的抗张强度显著低于空白对照的Control组小鼠,提示2型糖尿病的db/db小鼠伤口组织硬度和韧性显著降低。而软组织的抗张强度大小主要由胶原纤维的数量和排列所决定的[18],因此本研究结果表明db/db小鼠伤口愈合速率降低与伤口位置胶原纤维的破坏部分相关。而本研究进一步揭示,EGCG(10 mg/kg)在术后的各时间点均显著提升了db/db小鼠伤口组织的生物力学抗张强度,提示EGCG能够显著抑制2型糖尿病伤口及其外周组织的胶原蛋白破坏进程。

创伤发生后,其局部微环境的血流供应在整个伤口的修复进程中发挥重要作用。而大量研究也提示,2型糖尿病的伤口修复功能障碍也与其高糖环境所诱发的局部微循环障碍具有密切关联[19]。本研究通过激光多普勒血流测量发现,db/db小鼠伤口位置的局部血流速率在术后的各时间点均显著低于空白对照的Control组小鼠,提示2型糖尿病的db/db小鼠在伤口发生后的修复进程中会全程伴随着局部的微循环障碍这一问题。同时,本研究ELISA结果也揭示,对于血管新生起重要作用的细胞因子VEGF的表达,db/db小鼠在各时间点均显著低于Control组小鼠,进一步揭示了2型糖尿病小鼠会发生血管新生能力的显著降低。而本研究也发现,EGCG(10 mg/kg)治疗在术后各时间点均能够显著提高db/db小鼠伤口位置的局部血流速度;同时,EGCG治疗也在术后各时间点显著提升了db/db小鼠伤口位置VEGF的表达。本研究结果提示,EGCG能够显著改善2型糖尿病创伤部位的局部微循环状态,促进伤口处的血管新生。

炎症反应是软组织的创伤发生过程的一个关键环节,而诸多先前的研究表明2型糖尿病伤口愈合修复中长期处于高炎症反应状态,这会显著降低其伤口的修复速率[20]。本研究发现db/db小鼠伤口位置的炎性因子IL-1β、IL-6和TNF-α的表达水平在术后各时间点均显著高于Control组小鼠,提示2型糖尿病的db/db小鼠在创伤发生后长期处于局部高炎症反应状态。而EGCG(10 mg/kg)治疗在术后的各时间点均显著降低了db/db小鼠伤口处IL-1β、IL-6和TNF-α水平。本研究结果提示,EGCG的促2型糖尿病伤口愈合效应与其显著的抗炎症反应密切相关。

综上所述,本研究通过形态学、组织学、生物力学等角度系统揭示了EGCG能够有效改善2型糖尿病db/db小鼠的伤口愈合能力,而这一积极效应与EGCG显著的抗炎症反应、促血管新生、加速胶原沉积密切相关。本研究提示EGCG作为一种经济易得的中药成分,具有可观的治疗2型糖尿病伤口愈合障碍的临床应用前景。

参考文献

[1] CHATTERJEE S, KHUNTI K, DAVIES MJ.Type 2 diabetes[J].Lancet,2017,389(10085):2239-2251.

[2] 张春霞.2型糖尿病病人同型半胱氨酸水平与靶器官功能损伤的关联性研究[J].安徽医药,2019,23(5):932-935.

[3] OKONKWO UA, DIPIETRO LA.Diabetes and wound angiogenesis[J].Int J Mol Sci,2017,18(7):1419.

[4] SALAZAR JJ, ENNIS WJ, KOH TJ.Diabetes medications: impact on inflammation and wound healing[J].J Diabetes Complications,2016,30(4):746-752.

[5] PALMER AK, TCHKONIA T, LEBRASSEUR NK, et al.Cellular senescence in type 2 diabetes: a therapeutic opportunity[J].Diabetes,2015,64(7):2289-2298.

[6] GAN RY, LI HB, SUI ZQ, et al.Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): an updated review[J].Crit Rev Food Sci Nutr,2018,58(6):924-941.

[7] RASHEED NO, AHMED LA, ABDALLAH DM, et al.Nephro-toxic effects of intraperitoneally injected EGCG in diabetic mice: involvement of oxidative stress, inflammation and apoptosis[J].Sci Rep,2017,7:40617.

[8] JHANG JJ, LU CC, YEN GC. Epigallocatechin gallate inhibits urate crystals-induced peritoneal inflammation in C57BL/6 mice[J].Mol Nutr Food Res,2016,60(10):2297-2303.

[9] CARNEIRO BM, BATISTA MN, BRAGA A, et al.The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry[J].Virology,2016,496(9):215-218.

[10] LIN YH, LIN JH, LI TS, et al.Dressing with epigallocatechin gallate nanoparticles for wound regeneration[J].Wound Repair Regen,2016,24(2):287-301.

[11] HUANG YW, ZHU QQ, YANG XY, et al.Wound healing can be improved by (-)-epigallocatechin gallate through targeting Notch

in streptozotocin-induced diabetic mice[J].FASEB J,2019,33(1):953-964.

[12] SHIN YC,SHIN DM,LEE EJ,et al.Hyaluronic acid/PLGA core/shell fiber matrices loaded with EGCG beneficial to diabetic wound healing[J].Adv Healthc Mater,2016,5(23):3035-3045.

[13] ABDURRACHIM D,MANDERS E,NICOLAY K,et al.Single dose of empagliflozin increases in vivo cardiac energy status in diabetic db/db mice[J].Cardiovasc Res,2018,114(14):1843-1844.

[14] FUKUI T,KAWAGUCHI AT,TAKEKOSHI S,et al.Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates skin wound healing in diabetic dB/dB mice[J].Artif Organs,2017,41(4):319-326.

[15] GAO H,AJR M,MIYATA K,et al.Overactivity of liver-related neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus:electrophysiological findings in db/db mice[J].J Neurosci,2017,37(46):11140-11150.

[16] DANGWAL S,STRATMANN B,BANG C,et al.Impairment of wound healing in patients with type 2 diabetes mellitus influences circulating microRNA patterns via inflammatory cytokines[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2015,35(6):1480-1488.

[17] LI M,XU J,SHI T,et al.Epigallocatechin-3-gallate augments therapeutic effects of mesenchymal stem cells in skin wound healing[J].Clin Exp Pharmacol Physiol,2016,43(11):1115-1124.

[18] GRIFFIN M,PREMAKUMAR Y,SEIFALIAN A,et al.Biomechanical characterization of human soft tissues using indentation and tensile testing[J/OL].J Vis Exp,2016(118):54872.DOI:10.3791/54872.

[19] YU CO,LEUNG KS,FUNG KP,et al.The characterization of a full-thickness excision open foot wound model in n5-streptozotocin(STZ)-induced type 2 diabetic rats that mimics diabetic foot ulcer in terms of reduced blood circulation,higher C-reactive protein,elevated inflammation,and reduced cell proliferation[J].Exp Anim,2017,66(3):259-269.

[20] GALLAGHER KA,JOSHI A,CARSON WF,et al.Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes[J].Diabetes,2015,64(4):1420-1430.

(收稿日期:2019-09-12,修回日期:2019-10-07)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2020.09.006 ◇药学研究◇

葛根素调控miR-7抗小鼠肝细胞缺氧-复氧存活和细胞凋亡的作用机制

张威,王帅,王喜梅,张帆

作者单位:洛阳东方医院消化科,河南 洛阳471003

基金项目:洛阳市科技计划资助项目(1603003A-6);洛阳市科技计划项目(1812002A)

摘要:目的 探讨葛根素对缺氧-复氧(H-R)诱导小鼠肝细胞损伤的影响及其分子机制。**方法** 将小鼠肝细胞采用随机数字表法分为对照组、H-R组、不同浓度(70 μmol/L、140 μmol/L、280 μmol/L、560 μmol/L)葛根素组、H-R+葛根素组、H-R+miR-7组、H-R+miR-7阴性对照(miR-con)组、H-R+葛根素+anti-miR-7组、H-R+葛根素+anti-miR-7阴性对照(anti-miR-con)组、H-R+葛根素+佛波酯(PMA)组。实时荧光定量PCR(qPCR)检测miR-7水平,四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞活性,流式细胞仪检测细胞凋亡,蛋白质印迹法(Western Blot)检测细胞中细胞核相关抗原Ki-67(Ki-67)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、核因子-κB(NF-κB) p65蛋白表达。**结果** 葛根素预处理后,H-R小鼠肝细胞活性明显增强($P<0.05$),Ki-67蛋白表达量、miR-7表达量显著增加($P<0.05$)。与H-R组比较,280 μmol/L葛根素预处理后,H-R小鼠肝细胞凋亡率[(14.72±1.20)%比(25.85±1.58)%]、Bax、NF-κB p65表达量降低,Bcl-2蛋白表达量增加(均$P<0.05$)。与H-R+miR-con组相比,过表达miR-7显著提高H-R小鼠肝细胞miR-7水平、细胞活性[(81.29±7.56)比(0.28±0.04)]、Ki-67、Bcl-2蛋白水平,降低细胞凋亡率[(15.65±1.56)%比(26.65±1.25)%]、Bax蛋白水平(均$P<0.05$)。干扰miR-7表达部分逆转葛根素对小鼠肝细胞H-R后细胞凋亡、Bax和NF-κB p65表达的抑制作用,以及部分逆转葛根素对小鼠肝细胞H-R后细胞活性、miR-7、Ki-67、Bcl-2表达的促进作用。**结论** 葛根素显著促进H-R诱导的小鼠肝细胞增殖并抑制细胞凋亡,可能是通过调控miR-7表达,抑制NF-κB信号通路活性发挥作用。

关键词:葛根素; 再灌注损伤; 细胞低氧; 小鼠肝细胞; 细胞凋亡; miR-7; 核因子-κB

Mechanism of puerarin regulating miR-7 against hypoxia-reoxygenation survival and apoptosis in mouse hepatocytes

ZHANG Wei,WANG Shuai,WANG Ximei,ZHANG Fan

Author Affiliation:Department of Digestive Science,Luoyang Oriental Hospital,Luoyang,Henan 471003,*China*