

## 糖尿病皮肤缺损愈合进程中单核细胞趋化蛋白-1 表达的研究

王少云<sup>1)</sup>, 马翔<sup>1)</sup>, 张丽<sup>2)</sup>, 肖砚斌<sup>1)</sup>, 张祥<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学第三附属医院骨科, 云南昆明 650108; 2) 昆明医科大学基础医学实验教学中心, 云南昆明 650500)

**[摘要]** 目的 研究单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 在兔糖尿病皮肤缺损模型愈合进程中的表达水平, 探讨其在糖尿病皮肤愈合中的作用. 方法 制作兔糖尿病模型, 通过免疫组化和 ELISA 的方法研究 MCP-1 在兔糖尿病皮肤缺损模型愈合进程中的局部表达及血清中水平. 结果 免疫组化染色提示 MCP-1 在糖尿病组中各时间点位表达均高于空白对照组. 外周血中造模后 3 d 和 1 周时 MCP-1 含量糖尿病组与空白组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 2 周和 4 周时无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 结论 MCP-1 可能在糖尿病皮肤缺损修复愈合紊乱的炎症反应中发挥作用, 最终干扰愈合.

**[关键词]** MCP-1; 糖尿病皮肤; 愈合

**[中图分类号]** R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 09-0051-04

## The Expression of MCP-1 in the Diabetes Mellitus Skin Defect Healing

WANG Shao-yun<sup>1)</sup>, MA Xiang<sup>1)</sup>, ZHANG Li<sup>2)</sup>, XIAO Yan-bin<sup>1)</sup>, ZHANG Xiang<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Orthopedics, The 3rd Affiliated Hospital, Kunming Medical University; 2) Basic Uedical Experiment Teaching Centre, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression of MCP-1 in the diabetes mellitus skin defect healing, then discuss its effect. **Methods** The diabetes mellitus models were established, and the expression of MCP-1 was detected by immunohistochemical staining and Elisa. **Results** The immunohistochemistry stain showed that the expression of MCP-1 in DM group was higher than that in control group at all time. And the serum value of MCP-1 in DM group had statistical significance ( $P < 0.05$ ) at 3 days or 1 week, but that in 2 weeks and 4 weeks was no statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The MCP-1 might play a role in the healing of diabetes mellitus skin defect through mediate abnormal inflammatory response.

**[Key words]** MCP-1; The diabetes mellitus skin; Healing

糖尿病皮肤缺损、溃疡是糖尿病血管病变、神经病变和感染共同引起的糖尿病严重并发症, 在临床上有很强的致残性和致死性, 给患者和社会带来沉重的医疗和社会负担. 如治疗不及时会向深部发展, 最后导致截肢. 据统计美国非创伤性截肢中有 50% 以上由糖尿病溃疡所致, 而澳大利亚则为 66.8%, 每年有 3%~6% 糖尿病患者发生足部溃疡, 而且这类患者截肢后也容易出现伤口难愈的情况, 部分患者可能需要再次甚至多次截肢<sup>[1]</sup>. 有研究显示糖尿病创面难愈涉及创面细胞、

细胞外基质、细胞因子及其受体以及信号转导等诸多因素、多环节作用“失控”, 使创面愈合过程不能以可预见的生物学步骤, 按时相规律有序地进行组织学修复, 从而引起创面经久不愈、创面加深<sup>[2]</sup>. MCP-1 属于趋化性细胞因子超家族 CC 亚家族中的一员, 通过与相应的受体结合后发挥多种生物学功能, 促进嗜碱粒细胞和肥大细胞释放组织胺趋化因子, 调节单核细胞的多种功能, 在炎症性疾病和新生血管形成及其损伤修复中发挥重要作用<sup>[3]</sup>. 本研究拟通过免疫组化和 ELISA 的方

**[作者简介]** 王少云 (1982~), 男, 云南昆明市人, 白族, 医学博士, 住院医师, 主要从事骨科创伤及骨肿瘤的临床及科研工作.

**[通讯作者]** 肖砚斌. E-mail: xiaoybbt@163.com

法研究 MCP-1 在兔糖尿病皮肤缺损模型愈合进程中的局部表达及血清中水平, 探讨其在糖尿病皮肤愈合中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 兔糖尿病模型的制作

糖尿病组以高糖高脂饲料喂养 8 周以饮食诱导胰岛素抵抗, 自由摄食与饮水, 8 周后, 一次性以 STZ 50 mg/kg 耳缘静脉注射, 于注射药物后 12 h、24 h、48 h、72 h 分别在兔耳缘末梢取血, 血糖仪检测禁食 4 h 后的血糖浓度并称量体重, 此后每 3 d 测量血糖浓度 1 次。当血糖  $\geq 12.0$  mmol/L 且持续 2 周维持在此高血糖水平时判断为建模成功<sup>[4]</sup>。

### 1.2 动物分组

糖尿病动物组: 选用糖尿病兔 24 只, 在糖尿病成功造模的基础上, 于胸背部脊柱两侧制作直径约 3 cm 的全层皮肤缺损, 术后予以凡士林纱布覆盖, 术后 3 d、1 周、2 周、4 周监测血糖情况, 并肉眼观察缺损皮肤修复的情况, 包括周围有无炎症、瘢痕面积的大小及形状、修复后皮肤的物理特性等; 并取材进行 HE 染色, 在光镜下观察修复后的组织变化; 取石蜡切片行免疫组织化学 SP 法检测 MCP-1 表达, 阳性信号为棕黄色颗粒, 定位于胞浆和 (或) 胞膜。染色强度无色、淡黄色、棕黄色、棕褐色依次以 ( $\pm$ ), (+), (++) (+++ ) 表示。空白对照组: 选取正常大耳兔, 实验方法及指标同糖尿病组。

### 1.3 血清中 MCP-1、检测

糖尿病组、正常对照组兔于造模后 3 d 及 4 周时各由耳缘静脉抽取全血 5 mL, 不抗凝, 室温凝固 30 min, 析出血清, 1 500 r/min 离心 10 min, 取血清分装后置  $-80$  °C 冰箱冻存待测。检测时用自动酶标仪测定 OD 值及待测 MCP-1 在样本中的浓度。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 统计软件, 采用方差分析, 进行统计学分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大体观察及 HE 染色

**2.1.1 造模后 3 d** 2 组缺损表面均未见明显淤血, 表面形成较薄的一层透明膜, 但未形成明显痂皮, 2 组缺损皮缘均未出现明显坏死及发黑, 2 组缺损未见明显修复组织; 空白对照组缺损表面干燥、

渗出少, 糖尿病组皮肤缺损组渗出稍多。HE 染色空白组可见皮损边缘表皮缺失, 明显痂皮覆盖, 皮肤全层可见炎症反应, 可深达肌层, 真皮浅层明显, 脂肪层浅, 无限界, 未见明显肉芽组织生长。糖尿病组缺损处可见血浆纤维素渗出, 肉芽组织炎性反应明显, 无表皮增生, 纤维组织增生不明显。

**2.1.2 造模后 1 周** 空白组缺损表面出现明显痂皮, 创面面积明显缩小, 创面干燥; 糖尿病皮肤缺损组痂皮形成不明显, 创面面积缩小不明显, 缺损表面由透明膜覆盖, 触之可见有较活跃出血; 去除痂皮后, 空白组缺损皮缘周围开始出现明显组织增生, 轮廓光整; 糖尿病皮肤缺损组中, 痂皮下缺损皮缘周围组织增生轮廓不整齐; 2 组痂皮下均无积脓及出血。HE 染色空白组可见表皮缺失, 未见鳞状上皮覆盖, 真皮浅层血痂附着, 真皮全层炎性反应, 可见新生血管生成, 密集, 出现早期肉芽组织。糖尿病组可见真皮为血痂覆盖, 表皮缺失, 真皮全层可见炎症反应, 浅层炎反应显著, 深层有纤维组织增生, 肉芽组织少。

**2.1.3 造模后 2 周** 2 组痂皮的面积均小于 1 周时的面积, 空白组创面缩小明显, 痂皮颜色较一周时变深; 糖尿病皮肤缺损组出现明显的痂皮。创面面积较 1 周时减小, 创面干燥。去除痂皮后, 空白组愈合组织外形为圆形, 质软, 触之有弹性; 糖尿病皮肤缺损组愈合组织不规则, 质较硬, 无弹性。HE 染色空白组可见真皮浅层仍可见血痂附着炎反应明显, 真皮浅层炎反应下方明显肉芽组织形成, 胶原纤维增生明显。糖尿病组可见缺损区表皮缺失, 未见鳞上皮覆盖, 缺损区上方仍可见血痂覆盖, 血痂下方纤维素生成出现, 真皮深层有肉芽组织形成, 真皮下方梭形细胞密集, 纤维增生活跃。

**2.1.4 造模后 4 周** 空白对照组皮损已基本愈合, 痂皮已脱落, 创面处颜色与周围正常组织相似, 但无毛发生长; 糖尿病皮肤缺损组仍可见痂皮, 但面积明显小于 2 周时, 解开痂皮可见少量炎性分泌物, 有明显肉芽组织生长。1~4 周, 空白对照修复皮肤缺损的时间明显快于糖尿病皮肤缺损, 面积小于糖尿病皮肤缺损, 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。HE 染色空白组可见血痂消失, 未见鳞状上皮覆盖, 未见明显皮肤附件结构, 有明显胶原纤维增生填充皮肤缺损区, 少量炎性反应存留, 纤维组织增生明显, 新生毛细血管长入。糖尿病组可见血痂已形成纤维素渗出, 附着于皮肤缺损部, 近皮损处可见鳞上皮变性, 缺损内可见异常角化, 真皮层内出现退变坏死, 有严重炎性反应。

### 2.2 MCP-1 免疫组化染色

单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)在糖尿病与非糖尿病皮肤及其创面组织中的表达(表1)。糖尿病皮肤缺损组3 d, MCP-1 免疫组化染色, 阳性(图1)。糖尿病皮肤缺损组1周, 免疫组化染色提示, MCP-1 免疫组化染色(图2)。糖尿病皮肤缺损组2周,

MCP-1 免疫组化染色, 阳性(图3)。糖尿病皮肤缺损组4周, MCP-1 免疫组化染色, 阳性, 痂皮下及坏死灶边缘反应明显(图4)。外周血MCP-1 表达(表2)。

表1 单核细胞趋化蛋白-1 在糖尿病与非糖尿病皮肤及其创面组织中的表达

Tab. 1 The expressions of MCP-1 in the defect of the DM and control groups

组别	造模3 d	造模1周	造模2周	造模4周
空白对照组	+++	+++/**	++	±/+
糖尿病缺损组	+++	+++	+++/**	++

表2 造模后DM组与空白对照组外周血MCP-1水平比较  
[( $\bar{x} \pm s$ ), pg/mL]

Tab. 2 The content of MCP-1 of blood in each groups at 3 days [( $\bar{x} \pm s$ ), pg/mL]

趋化因子	DM组	空白对照组	P
MCP-1			
3 d	760.34 ± 56.11	430.55 ± 62.63	< 0.001
1周	545.34 ± 56.11	489.55 ± 62.63	< 0.001
2周	449.73 ± 31.76	454.36 ± 127.21	> 0.001
4周	282.73 ± 131.76	459.36 ± 127.21	> 0.001

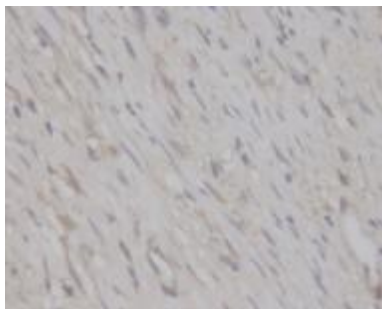


图1 糖尿病皮肤缺损组3 d, MCP1 阳性, 400×  
Fig. 1 The immunohistochemistry stain of MCP-1 in the DM group (3 days, positive, in juncture of the defect, 400 ×)



图2 糖尿病皮肤缺损组1周, MCP1 阳性, 100×  
Fig. 2 The immunohistochemistry stain of MCP-1 in the DM group (1 week, positive, 100 ×)



图3 糖尿病皮肤缺损组1周, MCP1 阳性, 100×  
Fig. 3 The immunohistochemistry stain of MCP-1 in the DM group (2 weeks, positive, 100 ×)

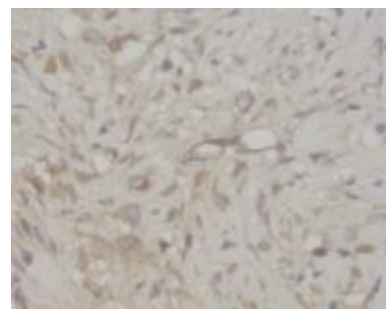


图4 糖尿病皮肤缺损组4周, MCP-1 阳性, 400×  
Fig. 4 The immunohistochemistry stain of MCP-1 in the DM group (4 weeks, positive, 400 ×)

### 3 讨论

MCP-1 属于趋化性细胞因子超家族CC 亚家族中的一员, MCP-1 主要由单核细胞、T淋巴细胞、成纤维细胞和内皮细胞产生, 其受体CCR2 属于G 蛋白偶联的受体超家族, 对单核细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞具有趋化和激活其活性的作用, 是

特异性趋化单核细胞到组织的有效介质,同时参与炎症反应、免疫调节,通过与相应的受体结合后发挥多种生物学功能,在炎症性疾病和新生血管形成及其损伤修复中发挥重要作用。

血管病变是糖尿病患者致残致死的主要原因。英国前瞻性糖尿病研究(UKPDS)经过研究证明,血糖控制良好的情况下并不能明显减少糖尿病血管并发症特别是大血管病变的发生率,该研究证实尚有血糖之外的其他因素在糖尿病大血管并发症的发生发展中起着重要作用<sup>[9]</sup>。糖尿病发生动脉粥样硬化特点是发生早、进展快、预后差。糖尿病动脉粥样硬化发展中炎症起着重要作用<sup>[9]</sup>。MCP-1 致动脉粥样硬化的机制有:(1) MCP-1 是一种特异的单核细胞趋化蛋白,它通过和 CCR2 受体结合使单核细胞进入血管内膜,活化成巨噬细胞并摄取发生修饰的脂蛋白构成单核细胞源泡沫细胞,导致动脉粥样硬化的形成;(2) MCP-1 可促使巨噬细胞、中性粒细胞聚集在动脉壁引起炎症反应,巨噬细胞吞噬脂质构成泡沫细胞,血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和移动,引起动脉粥样斑块;(3) MCP-1 促使 VSMC 向内膜下迁移并增殖,这是动脉粥样硬化的早期病理过程;(4) MCP-1 可促使内皮上黏附的单核细胞进入血管内膜,进一步形成泡沫细胞。同时,长期的高血糖导致血管内皮损伤、细胞黏附分子活化、白细胞聚集和一系列细胞因子活化,随后缺氧调节的生长因子表达和细胞因子产生增加,导致微循环发生障碍<sup>[7-8]</sup>。有研究认为 MCP-1 同时诱导单核细胞、血管内皮细胞表达黏附因子,增加白细胞的黏附,导致内皮细胞损伤与坏死,血原屏障破坏,血管通透性增加,组织缺血、缺氧加重,过度表达的黏附分子与白细胞共同作用,黏附于血管内皮细胞表面,形成小栓子,堵塞小血管,导致血管闭塞,发生进一步血管损伤<sup>[9]</sup>。高糖还可抑制 EPCs 的增殖、迁移和黏附,其机制可能包括:(1) 高糖可显著促进细胞的凋亡,加速其衰老<sup>[10]</sup>;(2) 高糖通过自由基攻击膜蛋白及胞内的核酸和酶系统,使细胞增殖率下降<sup>[11]</sup>。同时高血糖还促进 MCP-1 及 IL-8 的释放。这可能是导致糖尿病患者易发生血管病变及伤口不易愈合的重要原因之一<sup>[12]</sup>。

在本实验中,笔者发现:在观察的各时间点位中,空白对照修复皮肤缺损的时间明显快于糖尿病皮肤缺损,创面面积小于糖尿病皮肤缺损,两组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),这与临床资料是相符的。而各时相点中 MCP-1 表达与正常对照组比较均存在显著差异( $P < 0.05$ )。外周血中造模后 3 d 和 1 周时尿病组 MCP-1 含量糖高于空白组,有统

计学意义( $P < 0.05$ );2 周和 4 周时两组无统计学意义( $P > 0.05$ ),结合 HE 及免疫组化分析可能与晚期含量已降至较低值,无法准确检测有关。笔者的研究提示提示糖尿病皮肤缺损愈合过程中炎症反应持续时间长且反应重,而 MCP-1 可能在其中发挥较为重要的作用,对其进行深入研究可能会对糖尿病伤口不易愈合诊断及治疗产生积极作用。

### [参考文献]

- [1] 楚同彬,贾树华,姜潮. 糖尿病足坏疽截肢患者的社会心理及生活质量的研究现状[J]. 中国临床康复, 2004,8(17):3 342-3 344.
- [2] 陆树良主编. 烧伤创面愈合机制与新技术[M]. 北京:人民军医出版社,2003:10.
- [3] BILGIC H, YTTTERBERG S R, AMIN S, et al. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis[J]. Arthritis Rheum, 2009, 6(11):3 436-3 446.
- [4] 余臣祖,张朝宁,刘国安. 实验性2型糖尿病动物模型研究进展[J]. 医学综述,2006,12(1):41-42.
- [5] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS33)[J]. Lancet, 1998,352(9131):837-853.
- [6] 吕海莉,王彦辉,刘宽芝. 炎症因子与2型糖尿病粥样硬化[J]. 中国实用内科杂志,2005,25(4):370-372.
- [7] KERN T S. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy[J]. Exp Diabetes Res, 2007,2007:95-103.
- [8] CHIBBER R, BEN2MAHMUD B M, CHIBBER S, et al. Leukocytes in diabetic retinopathy [J]. Curr Diabetes Rev, 2007,3(1):3-14.
- [9] 陈慷,胡世兴. 单核细胞趋化蛋白-1 在早期糖尿病大鼠视网膜中的表达及意义 [J]. 眼科研究,2005,23(1):23-25.
- [10] KUKI S, IMANISHI T, KOBAYASHI K, et al. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. Cir J, 2006,70(8):1 076-1 081.
- [11] GRAIER W F, GRUBENTHAL I, DITTRICH P, et al. Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation [J]. Eur J Pharmacol, 1995,294(1):221-229.
- [12] 李岩,唐可欣,李宏高,等. 糖对大鼠晚期内皮祖细胞增殖、迁移、黏附及分泌功能的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(12):2 296-2 301.

(2013-07-12 收稿)