

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research金丝桃苷抑制 NF- κ B 和 NLRP3 促进糖尿病
足溃疡大鼠创面愈合的研究Research of hyperoside inhibits NF- κ B and NLRP3 to promote wound healing in
diabetic foot ulcer rats朱秋霄, 刘子渤, 树林一,
郝志华, 郝慧瑶(河北医科大学 第二医院 内分泌科, 河北 石家
庄 050000)ZHU Qiu-xiao, LIU Zi-bo,
SHU Lin-yi, HAO Zhi-hua,
HAO Hui-yao(Department of Endocrinology, the
Second Hospital of Hebei Medical
University, Shijiazhuang 050000, Hebei
Province, China)基金项目: 河北省 2021 年度医学科学研究课题
基金资助项目 (20210516)作者简介: 朱秋霄 (1987-), 男, 主治医师, 主
要从事糖尿病足、糖尿病周围血管病
变相关的临床工作和研究通信作者: 郝慧瑶, 副主任医师, 硕士生导师
MP: 15097387143
E-mail: k8y38rf@163.com

摘要:目的 探讨金丝桃苷(Hyp)通过抑制核因子 κ B(NF- κ B)通路和Nod样受体家族Pyrin结构域3(NLRP3)炎性小体对糖尿病足溃疡大鼠创面愈合的促进作用及其机制。方法 将50只SD大鼠按照随机数表法分成空白组、模型组、二甲双胍组、低剂量实验组和高剂量实验组,每组10只。用血糖仪测定各组大鼠的空腹血糖(FBG)、伤口愈合率和创面周围组织经皮氧分压(TcpO₂),用苏木精-伊红(HE)染色法观察创面病理组织变化,用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测血清白细胞介素(IL)-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)以及C反应蛋白(CRP)含量,用蛋白质印迹法检测基质金属蛋白酶9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)、NF- κ B p65、磷酸化(p)-NF- κ B p65和NLRP3蛋白相对表达水平。结果 干预28天后,空白组、模型组、二甲双胍组和低、高剂量实验组的FBG分别为(5.31 $\pm$ 0.91)、(22.52 $\pm$ 3.18)、(11.27 $\pm$ 2.35)、(13.11 $\pm$ 2.67)和(8.76 $\pm$ 1.15)mmol $\cdot$ L⁻¹;伤口愈合率分别为(76.91 $\pm$ 12.30)%、(9.53 $\pm$ 1.01)%、(45.26 $\pm$ 6.15)%、(39.94 $\pm$ 5.47)%和(57.10 $\pm$ 9.26)%;TcpO₂分别为(41.09 $\pm$ 8.51)、(24.35 $\pm$ 4.97)、(33.27 $\pm$ 5.68)、(30.84 $\pm$ 3.26)和(37.92 $\pm$ 4.14)mmHg;IL-8水平为(15.34 $\pm$ 0.39)、(41.92 $\pm$ 3.12)、(26.68 $\pm$ 2.28)、(30.55 $\pm$ 3.27)和(17.95 $\pm$ 2.70)ng $\cdot$ L⁻¹;IL-1 β 水平为(31.05 $\pm$ 4.62)、(64.39 $\pm$ 7.14)、(46.62 $\pm$ 5.07)、(50.21 $\pm$ 3.92)和(39.54 $\pm$ 4.25)ng $\cdot$ L⁻¹;TNF- α 水平为(26.95 $\pm$ 4.15)、(69.74 $\pm$ 7.43)、(39.85 $\pm$ 4.29)、(45.08 $\pm$ 4.36)和(35.52 $\pm$ 2.95)ng $\cdot$ L⁻¹;CRP水平分别为(0.69 $\pm$ 0.08)、(5.11 $\pm$ 0.60)、(3.23 $\pm$ 0.58)、(3.68 $\pm$ 0.71)和(1.95 $\pm$ 0.30)ng $\cdot$ L⁻¹;MMP-9蛋白相对表达水平分别为0.23 $\pm$ 0.03、0.99 $\pm$ 0.11、0.62 $\pm$ 0.05、0.74 $\pm$ 0.06和0.39 $\pm$ 0.04;MMP-9/TIMP-1比例分别为(22.56 $\pm$ 1.23)%、(97.07 $\pm$ 5.67)%、(60.18 $\pm$ 5.01)%、(70.49 $\pm$ 5.98)%和(38.39 $\pm$ 4.15)%;p-NF- κ B p65/NF- κ B p65蛋白相对表达水平分别为0.21 $\pm$ 0.02、1.23 $\pm$ 0.10、0.51 $\pm$ 0.04、0.57 $\pm$ 0.06和0.33 $\pm$ 0.04;NLRP3蛋白相对表达水平分别为0.25 $\pm$ 0.01、0.93 $\pm$ 0.07、0.72 $\pm$ 0.08、0.80 $\pm$ 0.06和0.35 $\pm$ 0.04。模型组的上述指标与空白组比较,低、高剂量实验组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 P <0.05)。结论 Hyp通过抑制NF- κ B和NLRP3通路,减轻炎症并降低MMP-9表达,从而促进DFU大鼠创面愈合。

关键词: 金丝桃苷;糖尿病足溃疡;核因子 κ B;Nod样受体家族Pyrin结构域3;基质金属蛋白酶9;创面愈合

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.23.007

中图分类号:R587.1

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)23-3343-07

Abstract: Objective To investigate the promoting effect and

mechanism of hyperoside (Hyp) on wound healing in diabetic foot ulcer (DFU) rats by inhibiting the nuclear factor - κ B (NF - κ B) pathway and the Nod - like receptor family Pyrin domain - containing 3 (NLRP3) inflammasome.

Methods A total of 50 SD rats were randomly divided into blank group, model group, metformin group, low - dose experimental group and high - dose experimental group, with 10 rats in each group. Fasting blood glucose (FBG), wound healing rate and transcutaneous oxygen partial pressure (TcPO₂) in the tissues surrounding the wounds were measured using a blood glucose meter. Pathological changes in the wound tissues were observed using hematoxylin - eosin (HE) staining. Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of interleukin (IL) - 8, IL - 1 β , tumor necrosis factor - alpha (TNF - α) and C - reactive protein (CRP). Western blotting was employed to assess the relative expression levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP - 9), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP - 1), NF - κ B p65, phosphorylated (p) - NF - κ B p65 and NLRP3 proteins. **Results** The FBG levels in blank, model, metformin, low - dose experimental and high - dose experimental groups were (5.31 $\pm$ 0.91), (22.52 $\pm$ 3.18), (11.27 $\pm$ 2.35), (13.11 $\pm$ 2.67) and (8.76 $\pm$ 1.15) mmol $\cdot$ L⁻¹, respectively; the wound healing rates were (76.91 $\pm$ 12.30)%, (9.53 $\pm$ 1.01)%, (45.26 $\pm$ 6.15)%, (39.94 $\pm$ 5.47)% and (57.10 $\pm$ 9.26)%, respectively; the TcPO₂ values were (41.09 $\pm$ 8.51), (24.35 $\pm$ 4.97), (33.27 $\pm$ 5.68), (30.84 $\pm$ 3.26), and (37.92 $\pm$ 4.14) mmHg, respectively; the serum levels of IL - 8 were (15.34 $\pm$ 0.39), (41.92 $\pm$ 3.12), (26.68 $\pm$ 2.28), (30.55 $\pm$ 3.27) and (17.95 $\pm$ 2.70) ng $\cdot$ L⁻¹, respectively; IL - 1 β levels were (31.05 $\pm$ 4.62), (64.39 $\pm$ 7.14), (46.62 $\pm$ 5.07), (50.21 $\pm$ 3.92) and (39.54 $\pm$ 4.25) ng $\cdot$ L⁻¹, respectively; TNF - α levels were (26.95 $\pm$ 4.15), (69.74 $\pm$ 7.43), (39.85 $\pm$ 4.29), (45.08 $\pm$ 4.36) and (35.52 $\pm$ 2.95) ng $\cdot$ L⁻¹, respectively; and CRP levels were (0.69 $\pm$ 0.08), (5.11 $\pm$ 0.60), (3.23 $\pm$ 0.58), (3.68 $\pm$ 0.71) and (1.95 $\pm$ 0.30) ng $\cdot$ L⁻¹, respectively; the protein relative expression levels of MMP - 9 were 0.23 $\pm$ 0.03, 0.99 $\pm$ 0.11, 0.62 $\pm$ 0.05, 0.74 $\pm$ 0.06 and 0.39 $\pm$ 0.04, respectively; the MMP - 9/TIMP - 1 ratios were (22.56 $\pm$ 1.23)%, (97.07 $\pm$ 5.67)%, (60.18 $\pm$ 5.01)%, (70.49 $\pm$ 5.98)% and (38.39 $\pm$ 4.15)%, respectively; the p - NF - κ B p65/NF - κ B p65 protein relative expression levels were 0.21 $\pm$ 0.02, 1.23 $\pm$ 0.10, 0.51 $\pm$ 0.04, 0.57 $\pm$ 0.06 and 0.33 $\pm$ 0.04, respectively; and the NLRP3 protein relative expression levels were 0.25 $\pm$ 0.01, 0.93 $\pm$ 0.07, 0.72 $\pm$ 0.08, 0.80 $\pm$ 0.06 and 0.35 $\pm$ 0.04, respectively. Statistically significant differences were observed when comparing the model group with the blank group and the low - and high - dose experimental groups with the model group (all P < 0.05). **Conclusion** Hyp promotes wound healing in DFU rats by inhibiting NF - κ B and NLRP3 pathways, reducing inflammation and reducing MMP - 9 expression.

Key words: hyperoside; diabetic foot ulcer; nuclear factor - κ B; Nod - like receptor family pyrin domain 3; matrix metalloproteinase 9; wound healing

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是糖尿病的严重并发症,与患者长期高血糖状态密切相关。DFU不仅给患者带来极大的身体痛苦,还显著增加了截肢和死亡的风险^[1]。尽管现有治疗手段如清创、抗生素治疗及促进愈合措施能减缓病情,但治疗效果仍不理想,预后未明显改善^[2]。DFU的显著特征是异常且持续的炎症反应,主要由巨噬细胞先天免疫信号异常激活引起,涉及核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF - κ B)和Nod样受体家族Pyrin结构域3(Nod - like receptor family pyrin domaincontaining 3, NLRP3)等炎症途径的激活^[3]。金丝桃苷(hyperoside, Hyp)是一种存在于山楂、毛蒿、贯叶连翘等中草药中的黄酮醇苷,具有多种药理作用,包括保护血管、抗氧化和抗

炎等^[4]。据报道, Hyp可以通过干预NF - κ B和NLRP3途径,对高糖诱导的肾及视网膜周细胞损伤发挥保护作用。有研究显示, Hyp对DFU具有一定的治疗作用^[5],但其具体分子机制尚未完全阐明。因此,本研究旨在通过构建DFU大鼠模型,初步探讨Hyp通过调控NF - κ B通路和NLRP3炎性小体促进创面修复的机制,为DFU治疗提供新策略。

材料与方法

1 材料

实验动物 本研究选用50只雄性SD大鼠,体质量200~240 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司

公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2024-0003,实验动物使用许可证号为 SYXK(京)2024-0015。本研究经河北医科大学第二医院伦理委员会批准(伦理批号:2023-AE108)。所有大鼠均被置于光照可控的环境中,维持 12 h 的光照与黑暗交替周期,室温保持在 22~26℃之间,相对湿度控制在 45%~60%内,且大鼠可以自由摄取食物及水分。

试剂与仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),纯度:99.20%,批号:HY-13753、金丝桃苷,纯度:99.50%,批号:HY-N0452,均由美国 MedChem Express 公司生产;二甲双胍片(metformin, Met),规格:每片 0.25 g,批号:SPH00022700,批准文号:国药准字 H44024853,深圳中联制药有限公司生产;苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒,昆山远慕生物科技有限公司生产;酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,深圳纽邦生物技术有限公司生产;兔源基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)抗体、兔源金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1)抗体、兔源 NF- κ B p65 抗体、兔源磷酸化(phosphorylation, p-)NF- κ B p65 抗体、兔源 NLRP3 抗体、兔源凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a card, ASC)抗体、兔源半胱天冬酶 1(cysteine-aspartic acid protease 1, caspase-1)抗体和兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体,均由美国 Abcam 公司生产。

仪器 Biosen C 小动物血糖仪,上海奥陆生物科技有限公司产品; iMark680 酶标仪,天津科德生物技术有限公司产品。

2 实验方法

2.1 大鼠糖尿病模型构建^[5]

大鼠给予特制高热量饲料(配方组成:标准饲料 66.5%、猪油 10%、蔗糖 20%、胆固醇 2.5%、胆酸钠 1%)进行代谢诱导,持续饲喂 4 周后,通过单次腹腔注射 STZ 溶液($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,注射前实施 12 h 禁食处理)构建糖尿病模型。注射 72 h 后,通过尾静脉采血测定空腹血糖浓度,筛选标准为血糖值持续高于 $16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,并观察到大鼠出现了食欲亢进、饮水增多及排尿频繁等典型的糖尿病症状。腹腔注射麻醉糖尿病模型大鼠,切除大鼠足背部全层皮肤组织,制作出 1 个尺寸为 $5\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 的矩形全层皮肤缺损创,建立 DFU 模型^[6]。

2.2 动物分组与处理方法

将 50 只 SD 大鼠按照随机数表法分成正常组、模型组、二甲双胍组、低剂量实验组和高剂量实验组,每组 10 只。建模完成后,二甲双胍组大鼠灌胃 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 二甲双胍;低剂量实验组和高剂量实验组大鼠分别灌胃予 100、200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 金丝桃苷,其余组均灌胃等量生理盐水,每天 1 次,连续给药 28 d。

2.3 血糖仪测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)并计算伤口愈合率^[5]

在第 14、28 天给药后,各组大鼠尾静脉取血,用小动物血糖仪测定血糖水平。同时,拍照并记录皮肤损伤修复进程,并分析计算溃疡表面积变化值。创面愈合率(%) = $[(1 - \text{给药后溃疡面积} / \text{给药前溃疡面积}) / \text{给药前溃疡面积}] \times 100\%$ 。

2.4 经皮氧分压传感器测定创面周围组织经皮氧分压(transcutaneous oxygen pressure, TcpO_2)

在第 14、28 d 给药后,实施氧代谢动态监测。大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠溶液($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)实施全身麻醉后,使用电动剃毛器清除创周 5 mm 范围内毛发,生理盐水清洁术区。将经皮氧分压传感器精确贴附于创周区域,通过负压密封环确保探头与皮肤界面压力维持在 40~50 mmHg。监测系统预热 30 min 后,在恒温(25 ± 1)℃、恒湿(50 ± 5)% 环境下连续采集 15 min 氧分压数据,取最后 5 min 稳定期测量值的算术平均数作为有效记录值。

2.5 HE 染色法进行组织学染色

完成末次血液样本采集后,实验动物经深度麻醉后实施安乐死。解剖获取创面全层组织样本(包含距创缘 3 mm 环形区域),将样本分为 2 份进行差异处理:1 份立即置于液氮速冻后转移至 -80°C 超低温冰箱长期冻存;另 1 份经 4% 多聚甲醛溶液(pH 7.4)固定 24 h 后,依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明及石蜡浸渍包埋。用轮转式切片机制备 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚连续切片,选取代表性切片进行 HE 染色,在光学显微镜($\times 400$)下定量评估表皮再生厚度、胶原沉积密度及中性粒细胞浸润程度等组织病理学指标。

2.6 ELISA 法测定小鼠血清 IL-8、IL-1 β 、TNF- α 以及 CRP 水平

在末次给药后的 24 h,通过腹主动脉采集血液样本 3 mL。样本静置一段时间后,以 $4\text{ }700\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心处理 17 min,随后分离并收集上清液。根据 ELISA 试剂盒的操作说明书,对上清液中的 IL-8、IL-1 β 、TNF- α 以及 CRP 的浓度进行检测与分析。

2.7 蛋白质印迹法测定 MMP - 9、TIMP - 1、NF - κ B p65、p - NF - κ B p65 和 NLRP3 蛋白表达水平

从 -80 ℃ 保存条件下取出大鼠创面组织样本,经过解冻处理后,进行研磨并制备成匀浆。随后,用蛋白裂解液对匀浆进行裂解处理,并通过 BCA 法测定蛋白质浓度。接着,选取等量的蛋白质样品(每份 30 μ g)进行凝胶电泳分离。在电泳分离后,用湿转法将蛋白质转移至膜上。随后,将膜在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。封闭结束后,于 4 ℃ 条件下将膜与兔源一抗(稀释比例 1:1 450)共同孵育过夜。次日洗膜,加入稀释比例为 1:2 200 的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h。用 ECL 显色技术检测并分析膜上目标蛋白的表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间多重比较行 SNK - q 检验。

结 果

1 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠血糖及创面愈合的影响

与空白组比较,模型组大鼠的 FBG 显著升高,创面愈合率显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组大鼠的 FBG 下降创面愈合率显著升高(均 $P < 0.05$),低、高剂量实验组大鼠的 FBG 均显著下降,创面愈合率显著升高(均 $P < 0.05$),见表 1。

2 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠创面 $TcpO_2$ 的影响

模型组大鼠的 $TcpO_2$ 水平显著低于空白组($P < 0.05$)。干预后,与模型组比较,二甲双胍组和低、高剂量实验组大鼠的 $TcpO_2$ 均显著升高($P < 0.05$),且与金丝桃苷的剂量呈正比,见表 2。

表 1 各组大鼠空腹血糖(FBG)的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of fasting blood glucose(FBG) levels in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	FBG(mmol · L ⁻¹)		Wound healing rate(%)	
		14 d	28 d	14 d	28 d
Blank	10	5.43 $\pm$ 0.85	5.31 $\pm$ 0.91	49.95 $\pm$ 9.06	76.91 $\pm$ 12.30
Model	10	24.78 $\pm$ 3.92 *	22.52 $\pm$ 3.18 *	5.33 $\pm$ 0.61 *	9.53 $\pm$ 1.01 *
Metformin	10	14.04 $\pm$ 2.77 #	11.27 $\pm$ 2.35 #	26.68 $\pm$ 4.62 #	45.26 $\pm$ 6.15 #
Experimental - L	10	17.62 $\pm$ 3.15 #	13.11 $\pm$ 2.67 #	21.09 $\pm$ 5.35 #	39.94 $\pm$ 5.47 #
Experimental - H	10	13.65 $\pm$ 2.63 # Δ	8.76 $\pm$ 1.15 # Δ	33.94 $\pm$ 4.29 # Δ	57.10 $\pm$ 9.26 # Δ

Blank group;0.5% NaCl;Model group;Modeled + 0.5% NaCl;Metformin group;Modeled + 200 mg · kg⁻¹ metformin;Experimental - L group;Modeled + 100 mg · kg⁻¹ hyperoside;Experimental - H group;Modeled + 200 mg · kg⁻¹ hyperoside;Compared with blank group, * $P < 0.05$;Compared with model group, # $P < 0.05$;Compared with metformin group, Δ $P < 0.05$;Compared with experimental - L group, Δ $P < 0.05$.

3 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠创面病理组织的影响

空白组大鼠的创面组织炎症反应程度较低,微血管密度显著增加,肉芽组织中可见成纤维细胞呈有序排列,且富含胶原基质。DFU 模型组大鼠的创面组织呈现出显著病理特征:局部区域出现大量炎性细胞浸润,伴随明显的组织坏死与渗出现象,同时新生血管生成数量显著降低,成纤维细胞增殖亦明显不足。在治疗干预后,二甲双胍组、低剂量实验组和高剂量实验组大鼠的创面修复情况均有所改善。相较于模型组,各治疗组创面组织中的炎性细胞浸润程度显著降低,同时肉芽组织深层区域的新生血管密度显著升高。值得注意的是,高剂量 Hyp 干预组在减轻炎症反应和促进血管新生方面展现出最突出的改善效应,见图 1。

4 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠血清炎症因子的影响

模型组大鼠血清中 IL - 8、IL - 1 β 、TNF - α 及 CRP 含量均显著高于空白组(均 $P < 0.05$)。二甲双胍组和低、高剂量实验组大鼠的上述炎症因子水平较模型组均显著下降(均 $P < 0.05$),且与金丝桃苷的剂量呈正相关,见表 3。

表 2 各组大鼠创面经皮氧分压($TcpO_2$)的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of transcutaneous oxygen partial pressure ($TcpO_2$) in wound of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	$TcpO_2$ (mmHg)	
		14 d	28 d
Blank	10	36.77 $\pm$ 8.26	41.09 $\pm$ 8.51
Model	10	21.65 $\pm$ 3.95 *	24.35 $\pm$ 4.97 *
Metformin	10	28.01 $\pm$ 4.02 #	33.27 $\pm$ 5.68 #
Experimental - L	10	27.29 $\pm$ 3.29 #	30.84 $\pm$ 3.26 #
Experimental - H	10	33.34 $\pm$ 3.51 # Δ	37.92 $\pm$ 4.14 # Δ

Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with metformin group, Δ $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, Δ $P < 0.05$.

5 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠 MMP - 9 和 TIMP - 1表达的影响

模型组大鼠组织中 MMP - 9 蛋白相对表达水平及 MMP - 9/TIMP - 1 比值均显著高于空白组(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组和低、高剂量实验组大鼠的上述指标均显著下降(均 $P < 0.05$),且与金丝桃苷的剂量呈正相关,见表 4。

6 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠 NF - κ B 通路和 NLRP3 炎性小体的影响

模型组大鼠组织中的 p - NF - κ B p65/NF - κ B

表 4 各组大鼠基质金属蛋白酶 9(MMP - 9)和金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP - 1)相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative expression levels of matrix metalloproteinase 9(MMP - 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP - 1) in each group of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	MMP - 9	TIMP - 1	MMP - 9/TIMP - 1 (%)
Blank	0. 23 $\pm$ 0. 03	1. 02 $\pm$ 0. 06	22. 56 $\pm$ 1. 23
Model	0. 99 $\pm$ 0. 11 *	1. 02 $\pm$ 0. 05	97. 07 $\pm$ 5. 67 *
Metformin	0. 62 $\pm$ 0. 05 #	1. 03 $\pm$ 0. 05	60. 18 $\pm$ 5. 01 #
Experimental - L	0. 74 $\pm$ 0. 06 #	1. 05 $\pm$ 0. 06	70. 49 $\pm$ 5. 98 #
Experimental - H	0. 39 $\pm$ 0. 04 # $\blacktriangle$	1. 02 $\pm$ 0. 03	38. 39 $\pm$ 4. 15 # $\blacktriangle$

Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with metformin group, $\blacktriangle P < 0.05$; Compared with experimental - L group, $\triangle P < 0.05$.

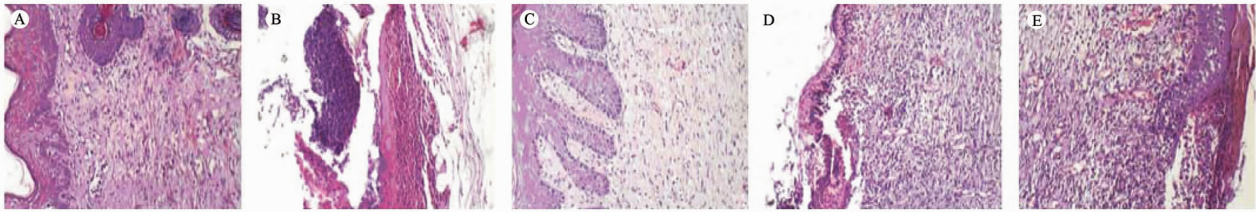


图 1 苏木精 - 伊红(HE)染色法检测各组大鼠创面组织病理学变化($\times 200$)

Figure 1 Histopathological changes of wounds in rats of each group detected by hematoxylin - eosin(HE) staining ($\times 200$)

A: Blank group; B : Model group; C: Metformin group; D: Experimental - L group; E : Experimental - H group.

表 3 各组大鼠血清炎症因子水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum inflammatory factor levels in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	IL - 8 (ng $\cdot$ L ⁻¹)	IL - 1 β (ng $\cdot$ L ⁻¹)	TNF - α (ng $\cdot$ L ⁻¹)	CRP (μ g $\cdot$ L ⁻¹)
Blank	15. 34 $\pm$ 0. 39	31. 05 $\pm$ 4. 62	26. 95 $\pm$ 4. 15	0. 69 $\pm$ 0. 08
Model	41. 92 $\pm$ 3. 12 *	64. 39 $\pm$ 7. 14 *	69. 74 $\pm$ 7. 43 *	5. 11 $\pm$ 0. 60 *
Metformin	26. 68 $\pm$ 2. 28 #	46. 62 $\pm$ 5. 07 #	39. 85 $\pm$ 4. 29 #	3. 23 $\pm$ 0. 58 #
Experimental - L	30. 55 $\pm$ 3. 27 #	50. 21 $\pm$ 3. 92 #	45. 08 $\pm$ 4. 36 #	3. 68 $\pm$ 0. 71 #
Experimental - H	17. 95 $\pm$ 2. 70 # $\blacktriangle$	39. 54 $\pm$ 4. 25 # $\blacktriangle$	35. 52 $\pm$ 2. 95 # $\blacktriangle$	1. 95 $\pm$ 0. 36 # $\blacktriangle$

Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with metformin group, $\blacktriangle P < 0.05$; Compared with experimental - L group, $\triangle P < 0.05$.

p65 比值、NLRP3、ASC 及 caspase - 1 蛋白相对表达水平均显著高于空白组(均 $P < 0.05$)。二甲双胍组和低、高剂量实验组大鼠的上述指标较模型组均显著降低(均 $P < 0.05$),且与金丝桃苷的剂量呈正相关,见表 5 和图 2。

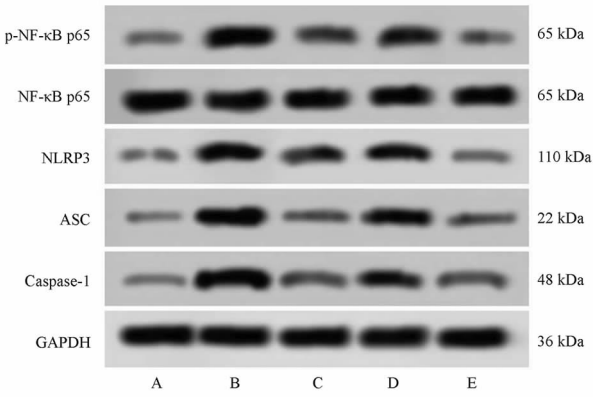


图 2 免疫印迹法检测各组大鼠核因子 κ B p65 亚基(NF - κ B p65)和 Nod 样受体家族 Pyrin 结构域 3(NLRP3)蛋白相对表达水平的比较

Figure 2 Comparison of nuclear factor kappa - b p65 subunit(NF - κ B p65) and Nod - like receptor family pyrin domain - containing 3 (NLRP3) protein relative expression levels in each group of rats detected by Western blot

A: Blank group; B : Model group; C: Metformin group; D: Experimental - L group; E : Experimental - H group.

表5 各组大鼠 NF- κ B p65 和 NLRP3 相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of the relative expression levels of NF- κ B p65 and NLRP3 in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	p - NF - κ B p65/NF - κ B p65	NLRP3	ASC	caspase - 1
Blank	0.21 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.02
Model	1.23 $\pm$ 0.10 *	0.93 $\pm$ 0.07 *	1.00 $\pm$ 0.06 *	1.14 $\pm$ 0.09 *
Metformin	0.51 $\pm$ 0.04 #	0.72 $\pm$ 0.08 #	0.39 $\pm$ 0.04 #	0.53 $\pm$ 0.05 #
Experimental - L	0.57 $\pm$ 0.06 #	0.80 $\pm$ 0.06 #	0.78 $\pm$ 0.07 #	0.71 $\pm$ 0.06 #
Experimental - H	0.33 $\pm$ 0.04 # Δ	0.35 $\pm$ 0.04 # Δ	0.34 $\pm$ 0.02 # Δ	0.49 $\pm$ 0.03 # Δ

ASC: Apoptosis - associated speck - like protein containing a card; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with metformin group, Δ $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, Δ $P < 0.05$.

讨 论

DFUs 的病理生理机制极为复杂,涉及血流量减少、感染、氧化应激及慢性炎症等多个方面,这些因素共同阻碍了伤口的正常愈合过程。近年来,天然植物化合物因其多靶点、多效应的治疗潜力而备受关注。例如姜黄素可以发挥抗炎、抗氧化作用。Hyp 作为一种具有抗炎和调节脂质代谢功能的黄酮醇苷,在 2 型糖尿病及其并发症的治疗中展现出重要价值。实验证据表明,Hyp 可以通过调控 PPAR γ /AMPK 信号通路改善胰岛素抵抗^[7],同时抑制 Ras/Raf/MEK/ERK1/2 通路活化,延缓糖尿病肾病的发生和发展^[8]。更值得注意的是,Hyp 还能激活 AMPK/SIRT1 信号通路,减轻 DFU 大鼠的炎症反应,加速溃疡创面愈合^[9]。在本研究中,模型组大鼠创面组织呈现出明显的病理损害,其创面愈合率与 TcPO₂ 均显著降低,同时 FBG 水平显著升高,这些结果共同表明 DFU 模型已成功构建。随后,对大鼠进行 Hyp 治疗,结果显示出积极效果:随着治疗周期的推进,实验大鼠的整体健康状态显著改善,创面组织的病理损伤程度明显减轻,同时创面愈合率与 TcPO₂ 均呈现显著上升趋势,而 FBG 水平则显著下降,且上述指标变化均表现出明显的剂量依赖性效应。这些实验结果提示,Hyp 在 DFU 治疗中兼具降低血糖水平与促进创面修复的双重作用。

适度的炎症反应对启动伤口愈合至关重要,但慢性炎症却会阻碍这一过程^[10]。在 DFU 中,促炎细胞因子如 IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 的过度表达,以及 CRP 的持续高表达,均与创面愈合不良密切相关^[11-13]。本研究发现,Hyp 能显著降低 DFU 大鼠的这些炎症因子水平,表明其可以通过抑制炎症反应来加快创面愈合。这一作用可能通过介导巨噬细胞由促炎型 M1 向抗炎型 M2 表型转化实现,从而下调促

炎细胞因子表达,上调抗炎细胞因子水平。此外,肉芽组织的形成是伤口愈合的关键步骤,涉及胶原合成的增加和瘢痕收缩^[14]。在糖尿病创面中,MMPs 水平升高而 TIMPs 水平降低导致的细胞外基质过度降解,是阻碍愈合的重要因素^[15]。本研究显示,Hyp 可以显著下调 DFU 大鼠模型中 MMP-9 的表达水平,并降低 MMP-9/TIMP-1 比值。这一效应可能与 Hyp 降低 TNF 和 IL-1 β 表达有关,因为这 2 种细胞因子能显著上调 MMP-9 并抑制 TIMP-1 的表达。

高血糖状态下伤口愈合不良涉及多个分子通路,其中 NF- κ B 和 NLRP3 炎症小体通路尤为关键。NF- κ B 作为可诱导转录因子,在调节细胞生长、发育及炎症反应中起核心作用,其过度激活会放大炎症反应,阻碍伤口愈合^[16]。NLRP3 炎症小体则通过响应无菌性危险信号或微生物产物,触发炎症级联反应,其功能异常与糖尿病创面愈合障碍密切相关^[17-18]。而使用 NLRP3 阻断剂治疗可以促进小鼠皮肤愈合^[3]。由于 NLRP3 炎症小体的激活需要来自 NF- κ B 的启动信号,因此,在炎症小体信号通路中同时针对 NF- κ B 和 NLRP3 进行治疗是可行的^[19]。靶向 NF- κ B 和 NLRP3 通路有望成为治疗包括 DFU 在内的炎症相关疾病的有效策略。据报道,Hyp 能够有效激活 SIRT1 基因,并抑制 NF- κ B 基因的表达,从而对高糖诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤起到保护作用^[9]。另一项研究则显示,Hyp 可以通过逆转 NLRP3 炎症小体的激活,阻止多柔比星诱导的心脏毒性^[20]。本研究显示,Hyp 显著降低 DFU 大鼠创面 p - NF - κ B p65、NLRP3、ASC 和 caspase - 1 的蛋白表达水平,提示其可能通过抑制 NF- κ B 和 NLRP3 活化,促进 DFU 大鼠创面愈合。推测,Hyp 可以借助 NF- κ B/NLRP3 通过多途径调控 MMP-9/TIMP-1 平衡。具体而言,NF- κ B 过度激活会促进 MMP-9 转录表达,而 Hyp 或许能激活 SIRT1。SIRT1 可以使 NF- κ B 的 p65 亚基去乙酰化,降低 NF- κ B 转录活性,进而减少

MMP-9表达,同时可能上调TIMP-1。另一方面,NLRP3炎症小体激活后会产生促炎因子,这些因子会上调MMP-9、抑制TIMP-1,Hyp则可逆转NLRP3炎症小体的激活。此外,AMPK激活能抑制NF- κ B通路,Hyp可能借此途径减少MMP-9表达,促进MMP-9/TIMP-1平衡,利于DFU创面愈合。

本研究提示:Hyp通过抑制NF- κ B和NLRP3通路,有效减轻炎症并降低MMP-9表达,从而促进DFU大鼠创面愈合。然而,本研究存在一定局限性:未开展基因敲除实验或激动剂实验,导致无法直接有力验证这两条通路在糖尿病创面愈合中的必要性,研究结论的深度与可靠性受到影响。此外,对这两条通路与其他通路的精细相互作用机制尚未深入探讨。未来需进一步研究,为DFU治疗提供更坚实的科学依据。

参考文献:

- [1] ARMSTRONG D G, TAN T W, BOULTON A J M, *et al.* Diabetic Foot Ulcers: A Review [J]. *Jama*, 2023, 330(1): 62—75.
- [2] LINDHOLM E, LÖNDAHL M, FAGHER K, *et al.* Strong association between vibration perception thresholds at low frequencies (4 and 8 Hz), neuropathic symptoms and diabetic foot ulcers [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0212921.
- [3] SUN X, WANG X, ZHAO Z, *et al.* Paeoniflorin inhibited Nod-like receptor protein-3 inflammasome and NF- κ B-mediated inflammatory reactions in diabetic foot ulcer by inhibiting the chemokine receptor CXCR2 [J]. *Drug Dev Res*, 2021, 82(3): 404—411.
- [4] XU S, CHEN S, XIA W, *et al.* Hyperoside: A review of its structure, synthesis, pharmacology, pharmacokinetics and toxicity [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 3009.
- [5] 雷慧, 鲍亚玲, 鲍喜静, 等. 金丝桃苷对糖尿病足溃疡大鼠炎症反应、创面愈合及AMPK/SIRT1信号通路的影响 [J]. *天津医药*, 2023, 51(11): 1205—1210.
- [6] 张春玲, 陈露, 赵伟, 等. 基于转换生长因子- β 1/Smad3信号通路观察丹黄散在糖尿病大鼠足溃疡创面愈合中的作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(21): 3473—3476, 3480.
- [7] REHMAN Z U, KHAN J, NOORDIN S. Diabetic foot ulcers: Contemporary assessment and management [J]. *J Pak Med Assoc*, 2023, 73(7): 1480—1487.
- [8] 孙翠鸽, 袁宇, 闵冬雨, 等. 基于网络药理学与实验验证探究金丝桃苷干预糖尿病肾病的作用机制 [J]. *中医药信息*, 2025, 42(2): 34—41.
- [9] 刘兆祥, 袁宇, 赵文婷, 等. 金丝桃苷对糖尿病心肌损伤保护作用研究 [J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(10): 25—28.
- [10] SAWAYA A P, STONE R C, BROOKS S R, *et al.* Deregulated immune cell recruitment orchestrated by FOXM1 impairs human diabetic wound healing [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4678.
- [11] AMINI M R, SHEIKH HOSSEINI M, FATOLLAH S, *et al.* Beneficial effects of cold atmospheric plasma on inflammatory phase of diabetic foot ulcers: A randomized clinical trial [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2020, 19(2): 895—905.
- [12] 戴西力, 邓曦东, 牛伯晖, 等. 三七总皂苷复合纳米囊泡对糖尿病足溃疡大鼠皮肤创面愈合及血管生成的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(1): 51—57.
- [13] BASIRI R, SPICER M, LEVENSON C, *et al.* Improving dietary intake of essential nutrients can ameliorate inflammation in patients with diabetic foot ulcers [J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 2393.
- [14] ROY S, SANTRA S, DAS A, *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilm infection compromises wound healing by causing deficiencies in granulation tissue collagen [J]. *Ann Surg*, 2020, 271(6): 1174—1185.
- [15] RAJIĆ J, GRDOVIĆ N, MARKOVIĆ A, *et al.* Plasma-activated water improve wound healing in diabetic rats by influencing the inflammatory and remodelling phase [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1265.
- [16] MA Q, HAO S, HONG W, *et al.* Versatile function of NF- κ B in inflammation and cancer [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2024, 13(1): 68.
- [17] CHANG M, NGUYEN T T. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(5): 1080—1093.
- [18] LV D, CAO X, ZHONG L, *et al.* Targeting phenylpyruvate restrains excessive NLRP3 inflammasome activation and pathological inflammation in diabetic wound healing [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(8): 101129.
- [19] DAI J, JIANG C, CHEN H, *et al.* Rapamycin attenuates high glucose-induced inflammation through modulation of mTOR/NF- κ B pathways in macrophages [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1292. 2019-10-30 [2025-08-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31736762/>.
- [20] WEI S, MA W, JIANG C, *et al.* Hyperoside prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting NOXs/ROS/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(9): 4196—4209.

(收稿日期 2025-05-14)