XXXX DOI:

基于内质网应激介导的GRP78/PERK/CHOP信号通路探讨MEBO促进糖尿病小鼠创面修复的机制研究

范琨悦[1],李杰辉[2],劳日玲[1],甘丽琰[3],王亚亚[1],倪宝灵[1],王 丽[3]
(1.广西中医药大学第一临床医学院,南宁 530021;2.广西中医药大学第一附属医院创面修复外科,南宁 530023;
3.广西壮族自治区中医药研究院,南宁 530023)

【摘 要】目的:探讨湿润烧伤膏(moist exposed burn ointment,MEBO)对糖尿病创面中葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78,GRP78)/蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase,PERK)/CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer binding protein homologous protein,CHOP)信号通路(即GRP78/PERK/CHOP信号通路)表达的影响。**方法:**选取27只自发性糖尿病db/db雄性小鼠随机分为模型组、MEBO组和重组牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶(recombinant bovine basic fibroblast growth factor,rb-bFGF)组,再选取9只同品系但不发病的杂合db/m雄性小鼠作为对照组,随后MEBO组和rb-bFGF组分别采用MEBO和rb-bFGF进行外用干预给药,对照组及模型组采取矿脂(凡士林)进行干预,每日观察并计算干预给药后3、6、12 d的创面愈合情况;应用Western blot法及免疫组化法观察3、6、12 d各组创面组织中GRP78、PERK和CHOP的蛋白表达情况。**结果:**①创面干预给药的3 d,对照组创面愈合率明显高于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);创面干预给药的6、12 d,对照组、MEBO组和rb-bFGF组创面愈合率明显高于模型组($P<0.01$)。②创面干预给药的3 d,各组创面组织中GRP78、PERK和CHOP蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);创面干预给药的6、12 d,模型组创面组织中GRP78、PERK和CHOP蛋白表达均明显高于对照组,MEBO组和rb-bFGF组创面组织中的GRP78、PERK和CHOP蛋白表达均明显低于模型组($P<0.05$)。**结论:**MEBO可能通过抑制GRP78/PERK/CHOP信号通路的表达从而抑制过度的内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS),促进糖尿病创面愈合。

【关键词】湿润烧伤膏;糖尿病创面;内质网应激;葡萄糖调节蛋白78;蛋白激酶R样内质网激酶;CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白
【中图分类号】R641 **【文献标志码】**A

Mechanism of moist exposed burn ointment promoting wound repair in diabetic mice based on the GRP78/PERK/CHOP signaling pathway mediated by endoplasmic reticulum stress

Fan Kunyue[1],Li Jiehui[2],Lao Riling[1],Gan Liyan[3],Wang Yaya[1],Ni Baoling[1],Wang Li[3]
(1.The First Clinical Medical College of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine;
2.Department of Wound Repair Surgery,The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine;
3.Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of moist exposed burn ointment (MEBO) on the expression of the glucose-regulated protein 78 (GRP78)/protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) signaling pathway in diabetic wounds. ***Methods*:** A total of 27 spontaneous diabetic db/db male mice were randomly divided into model group, MEBO group, and recombinant bovine basic fibroblast growth factor (rb-bFGF) gel group, and then 9 heterozygous db/m male mice of the same strain without disease were selected as control group. The mice in the MEBO group and the rb-bFGF group were given intervention with the external application of MEBO and rb-bFGF, respectively, and those in the control group and the model group were given Vaseline for intervention. The mice were observed daily, and wound healing was calculated on days 3, 6, and 12 of in-

作者介绍:范琨悦,Email:1319247327@qq.com,
研究方向:创面修复的基础研究。
通信作者:李杰辉,Email:182209537@qq.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:82360931);广西自然科学基金资助项目(编号:2024GXNSFAA010288);广西中医药大学硕士研究生科研创新资助项目(编号:YCSY2025031)。

tervention. Western blot and immunohistochemistry were used to measure the protein expression levels of GRP78, PERK and CHOP in the wound tissue of each group on days 3, 6, and 12. ***Results***: On day 3 of wound intervention, the control group had a significantly higher wound healing rate than the model group (P<0.01), and on days 6 and 12 of wound intervention, the control group, the MEBO group, and the rb-bFGF group had a significantly higher wound healing rate than the model group (P<0.01). On day 3 of wound intervention, there were no significant differences in the protein expression levels of GRP78, PERK, and CHOP in wound tissue between groups (P>0.05), and on days 6 and 12 of wound intervention, the model group had significantly higher protein expression levels of GRP78, PERK, and CHOP in wound tissue than the control group, and the MEBO group and the rb-bFGF group had significantly lower protein expression levels of GRP78, PERK, and CHOP than the model group (P<0.05). ***Conclusion***: MEBO may inhibit excessive endoplasmic reticulum stress and promote diabetic wound healing by inhibiting the expression of the GRP78/PERK/CHOP signaling pathway.

【Key words】moist exposed burn ointment; diabetic wound; endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein 78; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein

糖尿病是一种慢性代谢性疾病，其特征是胰岛素的生成和胰岛素作用的缺陷所导致糖代谢的异常。糖尿病已成为世界性公共卫生难题，且患病人数正在逐年增加[1]。糖尿病创面是糖尿病最严重的并发症之一，其具有高截肢率、高死亡率和高复发率的特点。据统计，糖尿病患者患足部溃疡的风险为30%，患者5年内的死亡率高达30%，大截肢后死亡率达到70%，在愈合后的1年内复发率为42%[2-3]。

内质网应激（endoplasmic reticulum stress，ERS）是细胞维持生理稳态的一种机制，当内质网的结构受到内外环境的刺激时则会启动未折叠蛋白反应来恢复细胞的稳态[4]。研究表明，细胞在高糖环境下会引发ERS时，内质网会释放葡萄糖调节蛋白78（glucose regulated protein 78，GRP78）并通过与肌醇需求酶1（inositol requiring enzyme 1，IRE1）、蛋白激酶R样内质网激酶（protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase，PERK）、转录因子6（activating transcription factor 6，ATF6）解离启动未折叠蛋白反应（unfolded protein response，UPR）改善ERS；然而，当UPR无法恢复内质网的稳态时IRE1、PERK、ATF6则启动他们的下游因子包括转录因子4（activating transcription factor 4，ATF4）、催化编码X盒结合蛋白1（X box binding protein-1，XBP-1）、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白（CCAAT/nhancer binding protein homologous protein，CHOP）等促进细胞凋亡[5-6]。

湿润烧伤膏（moist exposed burn ointment，MEBO）具有清热解毒，止痛生肌的功效，由黄连、黄柏、黄芩、地龙、罂粟壳制成。根据前期的研究表明，MEBO可改善糖尿病创面组织中内质网的肿胀扩张，进而维持细胞内环境促进糖尿病创面愈合[7]。但MEBO是否通过抑制ERS相关通路促进糖尿病创面愈合的机制尚未明确。有研究证实，通过干预GRP78/CHOP通路，抑制过度的ERS有利于糖尿病创面的愈合[8]。因此，本研究通过制备糖尿病创面模型，以GRP78/PERK/CHOP信号通路为切入点，探讨MEBO改善糖尿病创面中内质网应激的水平，以揭示糖尿病创面修复的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验组选取27只8周龄无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级自发性糖尿病db/db雄性小鼠，体质量在40~50 g，血糖达到16.7 mmol/L以上；选取9只同品系但不发病的杂合db/m雄性小鼠作为对照组，体质量在25~30 g。实验小鼠均购自常州卡文斯实验动物有限公司，动物许可证号为SCXK（苏）2021-0012。动物饲养和实验均SPF级实验动物饲养中心进行，饲养条件：温度（23±1）℃，湿度（60±3）%。本实验已通过广西中医药大学动物伦理委员会批准（批准号：DW20240319-022）。

1.2 实验主要药物和试剂

湿润烧伤膏（MEBO，汕头美宝制药，批号：2401403A）；牛碱性成纤维细胞生长因子凝胶（recombinant bovine basic fibroblast growth factor，rb-bFGF，珠海亿胜生物，批号：0013874318027）；医用级白矿脂（青岛锦麟生物，批号：240702）；苏木素-伊红染色（hematoxylin-eosin staining，HE，武汉赛维尔，批号：G1101）；二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）染液（中山金桥，批号：ZLI-9017）；PERK和CHOP抗体（武汉三鹰，批号分别为：24390-1-AP，15204-1-AP）；GRP78、β-actin和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）山羊抗兔二抗（华安生物，批号分别为：HA722202、

HA722023、HA1001）。

1.3 实验仪器

脱水机（型号：Donatello，意大利DIAPATH公司）；病理切片机（型号：RM2016，上海徕卡仪器有限公司）；智能型显微成像系统（型号：EVOS M5000，英潍捷基（上海）贸易有限公司）；研磨仪（型号：KZ-5F-3D，武汉赛维尔生物科技有限公司）；通用电泳仪（型号：SH-DDY10P，杭州申花科技有限公司）；多功能化学发光成像（型号：4600SF，上海天能科技有限公司）。

1.4 方法

1.4.1 动物分组 所有动物适应性喂养7 d后，选取27只8周龄SPF级db/db雄性小鼠作为糖尿病模型动物，根据血糖、体质量区间随机分为3组（每组9只）：模型组、MEBO组、rb-bFGF组；同时选取同源非糖尿病db/m小鼠（9只）作为健康对照组。

1.4.2 糖尿病创面模型构建 适应性喂养结束后，参照文献[9]方法制备标准化糖尿病性全皮层皮肤缺损模型：采用剃毛刀剔除小鼠背部毛发，用2%戊巴比妥钠麻醉，在小鼠脊柱正中线两侧距肩胛骨下缘水平位置用动物皮肤打孔器印出两个直径10 mm的圆形区域；碘伏消毒后用组织剪沿标记线剪除全皮层皮肤组织，深度须达筋膜。创面制备完成后单笼饲养并保证自由进食饮水，确保环境卫生。

1.4.3 给药方法 创面模型制备完成后各组创面使用无菌生理盐水进行冲洗，对照组和模型组均使用矿脂纱布覆盖创面；MEBO组外敷MEBO药膏（0.2 g/cm^2），rb-bFGF组外敷rb-bFGF凝胶（60 U/cm^2）。换药后使用胶带固定敷料，每日定时换药1次。

1.4.4 小鼠血糖 在建立糖尿病性全层皮肤缺损模型前后，每隔3 d对各组小鼠的随机血糖进行测量，血糖检测采用尾尖静脉采血法，以确保小鼠维持在高血糖状态。

1.4.5 标本采集 在创面干预的3、6、12 d每组分别随机取3只小鼠（6个创面）观察创面大体情况并进行拍照记录。随后使用戊巴比妥钠对小鼠进行过量麻醉并处死，取创面组织。其中一部分组织存放于-80 ℃冰箱中，用于Western blot实验；剩余部分组织置于4%多聚甲醛瓶中固定，用于HE染色和免疫组化检测。

1.4.6 创面愈合情况 在创面干预的3、6、12 d对各组创面进行观察并记录并利用Image J软件对创面面积进行计算，创面愈合计算公式=（初始创面面积-对应时间点创面面积）/初始创面面积×100%。

1.4.7 HE染色 在创面干预的3、6、12 d对各组小鼠创面进行取材，用4%多聚甲醛溶液对组织进行固定，随后进行脱水、包埋以及切片等，苏木素、伊红染色，树胶封片，镜下观察各个时间节点创面组织中的形态学变化，并进行拍照记录。

1.4.8 Western blot法检测创面组织GRP78、PERK和CHOP含量 取部分创面组织加入含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析（radioimmunoprecipitation assay lysis buffer，RIPA）裂解液进行研磨，采用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid assay，BCA）法进行蛋白浓度校正，样本加入5×上样缓冲液混合煮沸变性。取适量样本进行电泳，恒压80 V将溴酚蓝指示线跑至浓缩胶分离胶交界线后转120 V跑至胶板底部，恒电流进行转膜；5%脱脂奶粉室温封闭1 h，加入一抗4 ℃孵育过夜，洗膜后加入对应的二抗室温孵育1 h，洗膜后增强化学发光法（enhanced chemiluminescence，ECL）化学发光显影，Image J分析条带灰度值。

1.4.9 免疫组织化学法检测GRP78、PERK和CHOP表达 取各个时间节点的组织进行包埋、切片，随后进行脱蜡、复水、乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）热修复，加入3%H_2O_2为过氧化物酶阻断剂，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗片过后用组化笔画圈，滴加羊血清工作液常温避光封闭1 h，滴加一抗4 ℃避光孵育过夜，PBS洗片后滴加二抗常温避光孵育1 h；PBS清洗后进行DAB显色，苏木素进行复染后自来水洗至无颜色，中性树脂胶封片。显微镜下观察蛋白表达情况，随机选取5个视野进行拍照记录，使用Image J软件计算创面组织中目标蛋白的阳性染色表达。

1.5 统计学方法

使用SPSS 22.0、GraphPad Prism 10统计软件对实验所得数据进行统计学分析，正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）。若为2组数据进行比较时选用独立样本t检验进行分析，各组间多重比较使用单因素方差分析，2组间比较使用最小显著差异法（least significant difference，LSD）检验的方法作统计学分析，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 各组小鼠血糖情况

造模前数据分析显示，实验组小鼠血糖较对照组升高，且持续维持在糖尿病状态（>16.7 mmol/L），差异有统计学意义（P<0.01）。造模后，与对照组比较，实验组小鼠依旧保持高血糖水平（P<0.01），血糖浓度皆高于糖尿病的诊断值（>16.7 mmol/L），达到糖尿病模型判断标准，见表1。

表1 2组小鼠造模前后血糖水平比较（$\bar{x}\pm s$，mmol/L）

组别	n	造模前	造模后
对照组	9	7.63±1.06	8.84±0.43
实验组	27	23.81±3.95	26.30±2.98
t值		11.860	17.380
P值		<0.001	<0.001

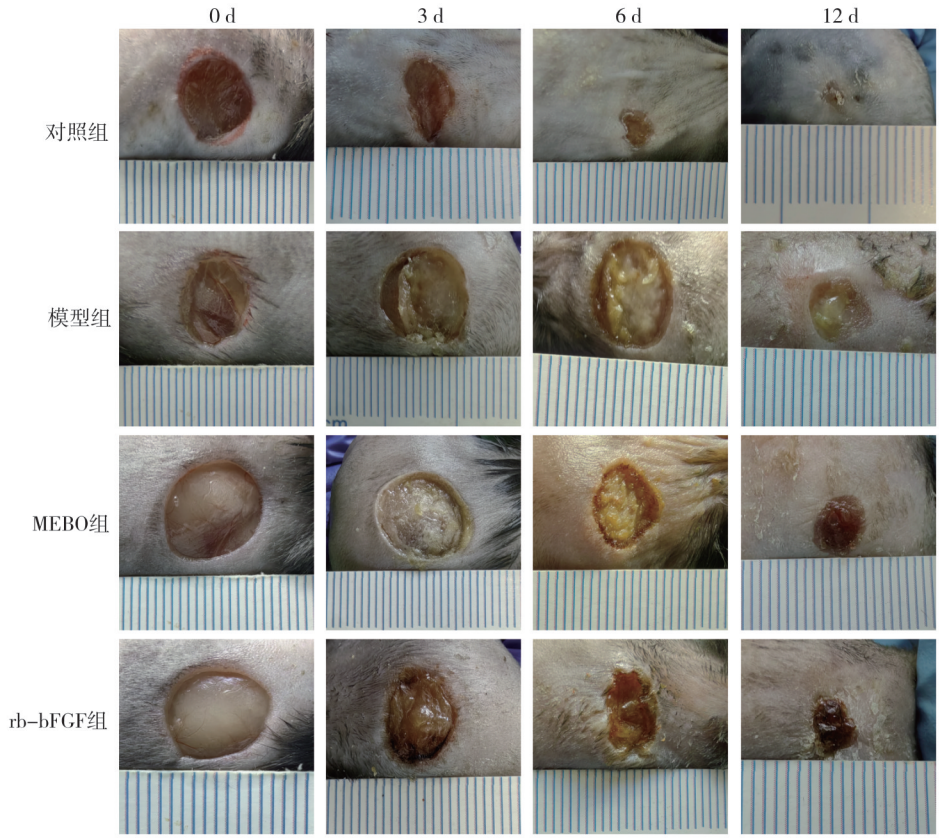
2.2 各组小鼠创面愈合情况

药物干预3 d后，各组创面可见大量的渗液和分泌物，创面周围有肿胀，对照组的创面愈合状况较为良好，对照组与模型组相比，组间创面面积的差异有统计学意义（对照组：27.640±8.708；模型组：10.740±5.401，t=3.688，P<0.01），其

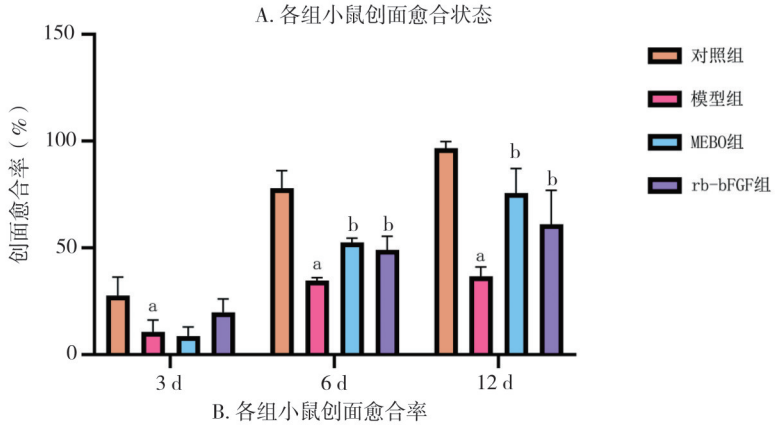
余各组差异无统计学意义。单因素方差分析显示，干预3 d后各组间差异有统计学意义（F=9.430，P<0.001）。

药物干预6 d后，对照组创面已基本结痂，创面未见分泌物，创周红肿已基本消退；模型组创面愈合状况较差，创面可见脓肿和坏死分泌物；MEBO组和rb-bFGF组创面较之前渗出减少、创周肿胀程度也有所减轻，但仍可见少许坏死分泌物。单因素方差分析显示，干预6 d后各组间差异有统计学意义（F=57.000，P<0.001）。

药物干预12 d后，对照组创面已基本愈合，创面已基本完成上皮化；模型组创面仍可见创面有少许脓肿和坏死分泌物，创口边缘较深，愈合不佳；MEBO组和rb-bFGF组创面已基本结痂，创口较前收敛较好，创面红肿程度也较前面减轻，创面愈合情况良好。在给药干预的6 d和12 d，模型组的创面愈合率均低于对照组（6 d，对照组：77.990 ± 8.215，模型组：34.720 ± 1.311，t=11.630，P<0.01；12 d，对照组：96.720 ± 3.131，模型组：36.710 ± 4.326，t=25.130，P<0.01），而MEBO组和rb-bFGF组的创面愈合率均高于模型组（6 d，MEBO组：52.580 ± 1.952，t=16.99,0，P<0.01；rb-bFGF组：49.050 ± 4.912，t=4.912，P<0.01；12 d，MEBO组：75.680 ± 11.520，t=7.081，P<0.01；rb-bFGF组：61.110 ± 15.780，t=3.335，P<0.01）。单因素方差分析显示，干预12 d后各组间差异有统计学意义（F=31.030，P<0.001），见图1。



A. 各组小鼠创面愈合状态



B. 各组小鼠创面愈合率

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01

图1 各组小鼠创面愈合情况（n=5，$\bar{x} \pm s$）

2.3 小鼠创面组织病理学观察

对创面干预后的3、6、12 d创面组织进行HE染色，结果显示：第3天各组创面中可见炎性细胞浸润，创面可见大量红细胞分布，胶原纤维排列紊乱。

干预6 d后对照组皮肤结构完整，表皮-真皮结构也较为完整，细胞形态正常，炎症细胞浸润较之前减少；与对照组相比，模型组的炎症细胞仍较多，肉芽组织开始出现但尚不完整，表皮再上皮化仍不明显，真皮层胶原纤维呈紊乱状态；与模型组相比，MEBO组的表皮层完整，真皮层肉芽组织丰富、胶原纤维致密，炎症细胞进一步减少，组织结构趋于正常；rb-bFGF组表皮层基本连续，真皮层肉芽组织增生明显，胶原纤维开始致密排列，仍存在少许炎症细胞。

干预12 d后对照组的组织形态与正常皮肤基本一致，表皮层厚度适中，真皮胶原纤维致密排列；而模型组仍可见残余炎性细胞浸润，真皮层胶原纤维仍较为松散、排列紊乱，表皮层虽已基本连贯但厚度仍偏薄；MEBO组与rb-bFGF组的组织表皮再上皮化基本完成，真皮层胶原纤维排列紧密，可观察到组织有丰富的血管，炎症基本消退，创面组织结构接近正常皮肤，见图2。

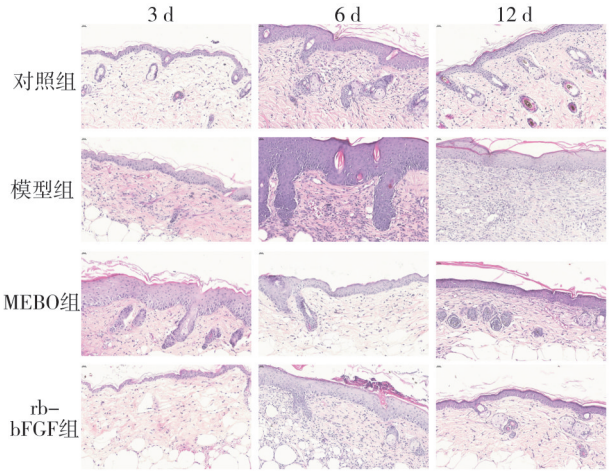


图2 各组小鼠创面病理学观察（×400，标尺=20 μm）

2.4 小鼠创面组织GRP78、PERK和CHOP蛋白表达变化

药物干预3 d后，与对照组相比模型组的PERK和CHOP蛋白水平均明显增高（PERK：t=5.510，P<0.01；CHOP：t=10.400，P<0.01），而GRP78的表达差异无统计学意义；与模型组相比，GRP78的MEBO组和rb-bFGF组的含量均明显减少（P<0.01），PERK和CHOP各组间的比较差异无统计学意义。单因素方差分析显示，干预3 d后各组间上述指标差异有统计学意义，见表2、图3。

药物干预的6 d后，与对照组相较，模型组的GRP78、PERK、CHOP蛋白含量均明显上升（GRP78：t=47.800，P<0.01；PERK：t=17.910，P<0.01；CHOP：t=6.875，P<0.01）；与模型组相较，MEBO组和rb-bFGF组的GRP78、PERK、CHOP蛋白含量均明显下降（GRP78，MEBO组：t=6.643，P<0.05；rb-bFGF组：t=6.950，P<0.01；PERK，MEBO组：t=12.960，P<0.01；rb-bFGF组：t=7.919，P<0.01；CHOP，MEBO组：t=6.574，

表2 3 d各组创面组织GRP78、PERK、CHOP蛋白表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78	PERK	CHOP
对照组	1.983 ± 0.055	1.067 ± 0.050	1.133 ± 0.056
模型组	1.897 ± 0.066	1.257 ± 0.032[a]	1.480 ± 0.010[a]
MEBO组	1.660 ± 0.043[b]	1.570 ± 0.020[b]	1.613 ± 0.015[c]
rb-bFGF组	1.557 ± 0.055[b]	1.327 ± 0.035	1.290 ± 0.055[b]
F值	38.420	99.870	80.030
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01；c，与模型组比较，P<0.05

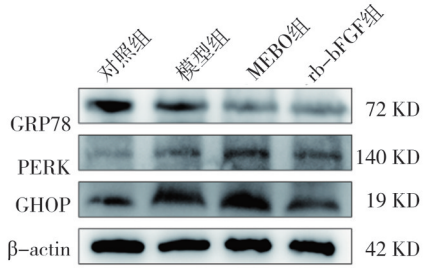


图3 3 d GRP78、PERK和CHOP蛋白表达的变化（n=3，$\bar{x}\pm s$）

P<0.01；rb-bFGF组：t=6.066，P<0.01）。单因素方差分析显示，干预6 d后各组间上述指标差异有统计学意义，见表3、图4。

表3 6 d各组创面组织GRP78、PERK、CHOP蛋白表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78	PERK	CHOP
对照组	1.437 ± 0.381	0.666 ± 0.055	1.000 ± 0.036
模型组	2.407 ± 0.164[a]	1.150 ± 0.036[a]	1.523 ± 0.208[a]
MEBO组	1.600 ± 0.131[c]	0.773 ± 0.035[b]	0.676 ± 0.080[b]
rb-bFGF组	1.523 ± 0.146[b]	0.790 ± 0.070[b]	0.740 ± 0.081[b]
F值	11.430	50.820	30.820
P值	0.0029	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01；c，与模型组比较，P<0.05

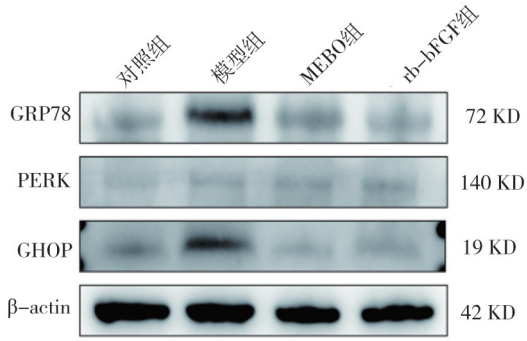


图4 6 d GRP78、PERK和CHOP蛋白表达的变化（n=3，$\bar{x}\pm s$）

药物干预的12 d后，与对照组相比，模型组的GRP78、PERK和CHOP蛋白含量均明显高于对照组（GRP78：t=

47.800，P<0.01；PERK：t=17.910，P<0.01；CHOP：t=6.875，P<0.01）；与模型组相较，MEBO组和rb-bFGF组的GRP78、PERK和CHOP蛋白表达均明显下降（GRP78，MEBO组：t=36.280，P<0.01；rb-bFGF组：t=25.060，P<0.01；PERK，MEBO组：t=16.930，P<0.01；rb-bFGF组：t=13.860，P<0.01；CHOP：MEBO组：t=5.809，P<0.01；rb-bFGF组：t=6.031，P<0.01）。单因素方差分析显示，干预12 d后各组间上述指标差异有统计学意义，见表4、图5。

表4 12 d各组创面组织GRP78、PERK、CHOP蛋白表达情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78	PERK	CHOP
对照组	1.047 ± 0.040	0.663 ± 0.058	0.410 ± 0.050
模型组	2.173 ± 0.005[a]	1.347 ± 0.030[a]	1.130 ± 0.174[a]
MEBO组	1.013 ± 0.055[b]	0.566 ± 0.073[b]	0.493 ± 0.075[b]
rb-bFGF组	0.906 ± 0.087[b]	0.693 ± 0.075[b]	0.510 ± 0.036[b]
F值	344.700	98.400	33.270
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01

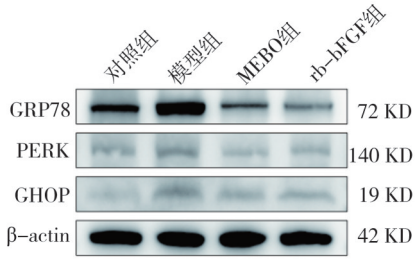


图5 12 d GRP78、PERK和CHOP蛋白表达的变化（n=3，$\bar{x}\pm s$）

2.5 小鼠创面免疫组织化学染色法结果比较

药物干预3 d后，与对照组相比，模型组PERK和CHOP的含量明显增加（PERK：t=4.698，P<0.01；CHOP：t=6.806，P<0.01），而GRP78差异无统计学意义；与模型组相比较，MEBO组和rb-bFGF组的GRP78和CHOP的表达均下降（GRP78，MEBO组：t=3.860，P<0.05；rb-bFGF组：t=2.281，P<0.05；CHOP，MEBO组：t=5.379，P<0.01；rb-bFGF组：t=10.26，P<0.01），PERK的蛋白表达没有统计学意义。单因素方差分析显示，3 d各组间上述指标差异有统计学意义，见表5、图6。

表5 3 d各组创面组织GRP78、PERK、CHOP蛋白阳性表达情况（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78	PERK	CHOP
对照组	0.243 ± 0.015	0.242 ± 0.017	0.242 ± 0.023
模型组	0.237 ± 0.020	0.345 ± 0.045[a]	0.321 ± 0.011[a]
MEBO组	0.198 ± 0.009[c]	0.355 ± 0.028	0.285 ± 0.009[b]
rb-bFGF组	0.197 ± 0.032[c]	0.320 ± 0.034	0.237 ± 0.014[b]
F值	6.638	11.800	32.070
P值	0.004	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01；c，与对照组比较，P<0.05

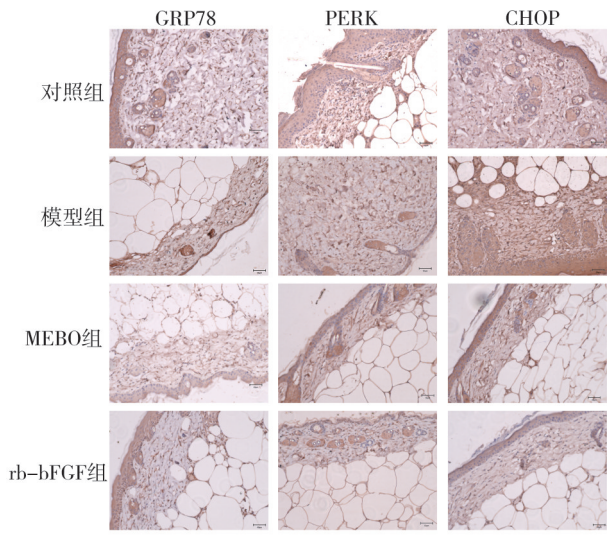


图6 3 d创面组织中GRP78、PERK和CHOP蛋白表达量免疫组化染色图（×200，标尺长度：50 μm，n=5，$\bar{x}\pm s$）

药物干预6 d后，与对照组相比，模型组中GRP78、PERK和CHOP的蛋白分布情况呈上升趋势（GRP78：t=7.512，P<0.01；PERK：t=40.030，P<0.01；CHOP：t=18.580，P<0.01）；与模型组相比，MEBO组和rb-bFGF组中GRP78、PERK和CHOP的分布情况减少（GRP78，MEBO组：t=4.766，P<0.01；rb-bFGF组：t=7.287，P<0.01；PERK，MEBO组：t=4.815，P<0.01；rb-bFGF组：t=6.114，P<0.01；CHOP，MEBO组：t=19.21，P<0.01；rb-bFGF组：t=17.370，P<0.01）。单因素方差分析显示，6 d各组间上述指标差异有统计学意义，见表6、图7。

表6 6 d各组创面组织GRP78、PERK、CHOP蛋白阳性表达情况（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78	PERK	CHOP
对照组	0.146 ± 0.010	0.153 ± 0.002	0.178 ± 0.005
模型组	0.196 ± 0.009[a]	0.271 ± 0.006[a]	0.297 ± 0.013[a]
MEBO组	0.170 ± 0.006[b]	0.204 ± 0.030[b]	0.156 ± 0.009[b]
rb-bFGF组	0.146 ± 0.011[b]	0.223 ± 0.016[b]	0.169 ± 0.009[b]
F值	28.010	37.640	210.800
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01

药物干预12 d后，与对照组相比，模型组中GRP78、PERK和CHOP的蛋白分布情况明显增加（GRP78：t=10.580，P<0.01；PERK：t=19.870，P<0.01；CHOP：t=14.410，P<0.01）；与模型组相比，MEBO组和rb-bFGF组中GRP78、PERK和CHOP的蛋白含量及分布情况较之前明显减少（GRP78：MEBO组：t=9.734，P<0.01；rb-bFGF组：t=7.962，P<0.01；PERK，MEBO组：t=26.230，P<0.01；rb-bFGF组：t=11.140，P<0.01；CHOP，MEBO组：t=11.020，P<0.01；rb-bFGF组：t=9.676，P<0.01）。单因素方差分析显示，12 d各组间上述指标差异有统计学意义，见表7、图8。

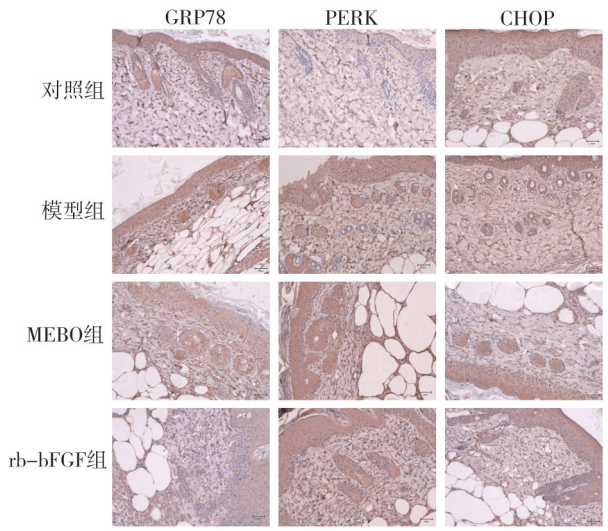


图7 6 d创面组织中GRP78、PERK和CHOP蛋白表达量免疫组化染色图（×200，标尺长度：50 μm，n=5，$\bar{x}\pm s$）

表7 12 d各组创面组织GRP78、PERK、CHOP蛋白阳性表达情况（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78	PERK	CHOP
对照组	0.124 ± 0.021	0.123 ± 0.006	0.175 ± 0.024
模型组	0.264 ± 0.020[a]	0.210 ± 0.007[a]	0.399 ± 0.024[a]
MEBO组	0.172 ± 0.004[b]	0.101 ± 0.005[b]	0.219 ± 0.027[b]
rb-bFGF组	0.160 ± 0.020[b]	0.137 ± 0.012[b]	0.212 ± 0.035[b]
F值	53.880	154.300	62.310
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与对照组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01

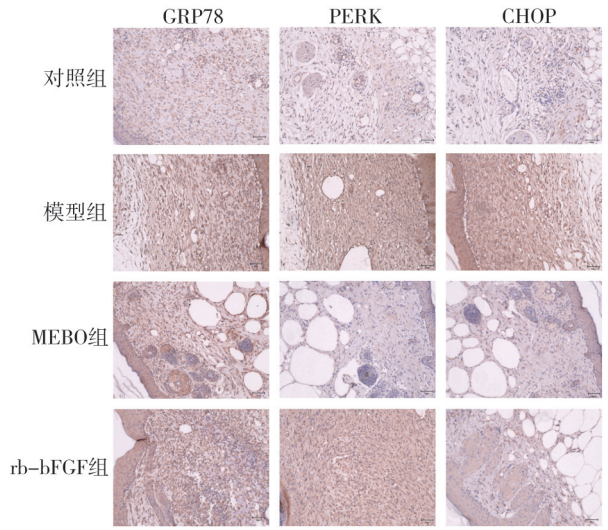


图8 12 d创面组织中GRP78、PERK和CHOP蛋白表达量免疫组化染色图（×200，标尺长度：50 μm，n=5，$\bar{x}\pm s$）

3 讨 论

糖尿病创面作为糖尿病最严重的并发症之一，是糖尿病患者致残、致死的主要原因。糖尿病创面的发病机制相当复杂，由于代谢的紊乱、高血糖、高脂血症等因素导致患处周围神经损伤和动脉粥样硬化，从而导致皮肤的破溃。同时，如长期压迫足部、皮肤外伤损伤、感染等因素也可导致糖尿病创面的发生。尽管临床上治疗糖尿病创面的方法种类多样，包括手术清创、负压吸引、外用敷料以及中医疗法等，虽在治疗上取得很大进步，但其具体的作用机制仍需要进一步完善，因此，研究糖尿病创面的治疗一直是难点和热点[10-11]。在近期的热点研究中发现[12]，由于高糖环境下引起的内质网应激不断增强，造成下游一系列的病理变化，是糖尿病皮肤创面难以愈合的关键。

内质网是真核细胞的细胞器，也是Ca^{2+}储库、蛋白质折叠的主要场所。内质网的功能和结构极易受到环境的刺激而遭到破坏，如缺血缺氧、营养物质缺乏及药物毒素等因素下皆可导致未折叠或折叠错误的蛋白积累引起ERS[4]。研究证实，GRP78作为内质网的特异伴侣，在内质网受到刺激时可迅速作出反应，尤其是在皮肤创伤后GRP78的表达可迅速增加[13]。在ERS状态下，未折叠蛋白反应被激活并通过PERK、ATF6和IRE1这3条途径来介导这一功能。Nowotny K等[14]发现，甲基乙二醛（methylglyoxal，MGO）产生于机体高血糖的环境下，它可以产生具有蛋白质以及脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）等的糖基化终产物（advanced glycation end products，AGE），而AGEs可触发皮肤成纤维细胞的ERS并激活PERK通路诱导细胞的凋亡。当ERS无法逆转时，那么细胞将产生CHOP进一步导致细胞的下一步死亡。UPR是ERS中细胞的一种自救方式，一定程度的UPR可以促进伤口愈合，而累积的ERS会阻碍伤口愈合[15-16]。因此，深入探究GRP78/PERK/CHOP通路对糖尿病创面的防治具有重要意义。

MEBO是中医外用药膏之一，课题组在前期的研究中发现其对糖尿病创面具有明显疗效[17]。然而，MEBO是否通过抑制过度的ERS促进糖尿病创面的修复机制尚未明确。本研究通过观察创面愈合率发现，MEBO组与rb-bFGF组创面愈合率均高于模型组，模型组创面仍可观察到部分坏死分泌物。HE结果显示，MEBO组和rb-bFGF组的创面愈合状况良好，与模型组相较，真皮层胶原纤维排列紧密，组织有丰富的血管且炎症基本消退，而模型组的炎症浸润明显并且纤维组织排列较为松散。上述结果表明，MEBO在一定程度上减轻糖尿病创面炎症，推动糖尿病创面的愈合，符合既往研究结果[18]。

有研究证实，在皮肤遭到创伤而产生ERS时，糖尿病小鼠皮肤创面愈合过程中UPR的激活与正常小鼠皮肤相比会延迟[19]。本研究通过Western blot法及免疫组化法的结果显示，在创面发生3 d时，GRP78、PERK和CHOP的各组间的表达印证了上述说法，但各组间的差异无统计学意义。在创面发生的6 d和12 d，与对照组相比较，模型组中GRP78、PERK、CHOP的蛋白表达量均呈上升趋势；而与模型组相比较，MEBO组和rb-bFGF中GRP78、PERK、CHOP的蛋白表达量均下降。这进一步证实MEBO可通过抑制GRP78、PERK和CHOP的表达从而抑制ERS促进糖尿病创面的愈合。

综上所述，MEBO可能通过调控GRP78/PERK/CHOP信号通路的表达，抑制过度的内质网应激，从而促进糖尿病创面修复，为临床推广应用MEBO防治糖尿病创面提供了可靠的理论依据。但本研究仅从观察GRP78、PERK和CHOP的表达水平得出结论，未设置抑制组及过表达组，有待进一步展开研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突关系

作者贡献声明 范琨悦：设计实验、文稿撰写；劳日玲、甘丽琰：实验操作和指标检测；王亚亚、倪宝灵：收集和整理数据；王丽：论文修订；李杰辉：文章质量控制与审查

参 考 文 献

[1] Liu JH, Guo BY, Liu QQ, et al. Cellular senescence: a bridge between diabetes and microangiopathy[J]. Biomolecules, 2024, 14(11): 1361.

[2] Zhang HH, Yan Z, Zhu JY, et al. Extracellular mitochondrial-derived vesicles affect the progression of diabetic foot ulcer by regulating oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. Adv Sci, 2025, 12(10): 2407574.

[3] Armstrong DG, Tan TW, Boulton AJM, et al. Diabetic foot ulcers: a review[J]. JAMA, 2023, 330(1): 62-75.

[4] Chen XY, Shi CR, He MH, et al. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 352.

[5] Zhang Y, Liu R, Ni M, et al. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP[J]. J Biol Chem, 2010, 285(20): 15065-15075.

[6] Kim G, Lee J, Ha J, et al. Endoplasmic reticulum stress and its impact on adipogenesis: molecular mechanisms implicated[J]. Nutrients, 2023, 15(24): 5082.

[7] 王 丽，李杰辉，张春霞，等. 湿润烧伤膏对糖尿病大鼠创面组织细胞间黏附分子1和血管细胞黏附分子1 mRNA表达水平及超微结构的影响研究[J]. 中国全科医学，2018，21(11)：1315-1320.

Wang L, Li JH, Zhang CX, et al. Effect of MEBO on ICAM-1 mRNA and VCAM-1 mRNA expression levels and ultrastructure in wound tissue of rats with diabetic ulcer[J]. Chin Gen Pract, 2018, 21(11): 1315-1320.

[8] 丁雅容，郑时旭，王 君，等. 温阳生肌膏调控GRP78/CHOP通路抑制过度内质网应激促糖尿病难愈合创面修复[J]. 中国病理生理杂志，2024，40(3)：493-501.

Ding YR, Zheng SX, Wang J, et al. Wenyang-Shengji ointment regulates GRP78/CHOP pathway to inhibit excessive endoplasmic reticulum stress for facilitating diabetic refractory wound repair[J]. Chin J Pathophysiol, 2024, 40(3): 493-501.

[9] Hong YH, Li J, Zhong YS, et al. Elabela inhibits TRAF1/NF-κB induced oxidative DNA damage to promote diabetic foot ulcer wound healing[J]. iScience, 2023, 26(9): 107601.

[10] 朱信霖，廖万清，张 超，等. 糖尿病足溃疡发病机制及治疗[J]. 中国皮肤性病学杂志，2023，37(4)：367-372.

Zhu XL, Liao WQ, Zhang C, et al. Pathogenesis and treatment of diabetic foot ulcer[J]. Chin J Dermatovenereology, 2023, 37(4): 367-372.

[11] Du YQ, Wang J, Fan WJ, et al. Preclinical study of diabetic foot ulcers: From pathogenesis to vivo/vitro models and clinical therapeutic transformation[J]. Int Wound J, 2023, 20(10): 4394-4409.

[12] Gao SY, Chen T, Deng CL, et al. An endoplasmic reticulum stress-responsive nanocomposite hydrogel for diabetic wound healing through a fibroblast-immune cell dual regulation hub[J]. J Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 689.

[13] Liu Z, Liu GL, Ha DP, et al. ER chaperone GRP78/BiP translocates to the nucleus under stress and acts as a transcriptional regulator [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(31): e2303448120.

[14] Nowotny K, Castro JP, Hugo M, et al. Oxidants produced by methylglyoxal-modified collagen trigger ER stress and apoptosis in skin fibroblasts[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 120: 102-113.

[15] Bachar-Wikstrom E, Manchanda M, Bansal R, et al. Endoplasmic reticulum stress in human chronic wound healing: Rescue by 4-phenylbutyrate[J]. Int Wound J, 2021, 18(1): 49-61.

[16] He WJ, Mu XR, Wu XQ, et al. The cGAS-STING pathway: a therapeutic target in diabetes and its complications[J]. Burns Trauma, 2024, 12: tkad050.

[17] 李杰辉，梁 彬，陈壮丽，等. MEBO对大鼠糖尿病性创面组织中miRNA-21及其靶标TGF-β1/Smads信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志，2024，44(18)：4448-4452.

Li JH, Liang B, Chen ZL, et al. Effects of MEBO on miRNA-21 and its target TGF-β1/Smads signaling pathway in diabetic wound tissues of rats[J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(18): 4448-4452.

[18] 姚明哲，竺仕林，李文武，等. MEBT/MEBO通过调控TXNIP/NLRP3/Caspase-1信号通路促进糖尿病创面愈合[J]. 海南医学院学报，2024，30(24)：1848-1858.

Yao MZ, Zhu SL, Li WW, et al. MEBT/MEBO promotes diabetic wound healing by regulating TXNIP/NLRP3/Caspase-1 pathway[J]. J Hainan Med Univ, 2024, 30(24): 1848-1858.

[19] Leal EC, Emanuelli T, Santos D, et al. Dysregulation of endoplasmic reticulum stress response in skin wounds in a streptozotocin-induced diabetes mouse model[J]. J Mol Endocrinol, 2023, 70(3): e220122.

（收稿：2025-12-11；修回：2026-01-06；录用：2026-01-20）

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：

范琨悦，李杰辉，劳日玲，等. 基于内质网应激介导的GRP78/PERK/CHOP信号通路探讨MEBO促进糖尿病小鼠创面修复的机制研究[J]. 重庆医科大学学报，XXXX，XX(XX)：1-8.