糖尿病足

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001179

MEBT/MEBO对大鼠糖尿病足创面组织 TGF-β1、Smad3、P-smad3 表达及形态学结构的影响

唐乾利[1],李利青[2],李 辉[3],曾鸿孟[4],王 澍[1],刘 明[4],郭 满[4],赵 曦[4]

(1. 右江民族医学院桂西高发病防治重点实验室,百色 533000;2. 湖南中医药大学研究生院,长沙 410208;
3. 广西中医药大学第一附属医院烧伤与周围血管病科,南宁 530023;4. 广西中医药大学研究生学院,南宁 530001)

【摘 要】目的:观察皮肤原位再生医疗技术(moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment,MEBT/MEBO)对大鼠糖尿病足创面组织转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、Smad3、磷酸化 smad3(P-smad3)表达及形态学结构的影响。**方法**:将 80 只健康雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、贝复济组和 MEBT/MEBO 组,每组各 20 只。模型组、MEBT/MEBO 组和贝复济组大鼠参照糖尿病模型制备法,采用腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素,建立糖尿病动物模型;空白对照组大鼠则腹腔注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。分别于干预治疗后第 5、14 天各取相同部位创面组织,采用 Western blot 法检测 TGF-β1、Smad3 和 P-smad3 蛋白表达水平,常规病理技术观察溃疡创面组织形态学结构,各组间差异比较采用方差分析和秩和检验。**结果**:治疗后 5 d,各组大鼠 Smad3 蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义(F=1.036,P=0.388);MEBT/MEBO 组、贝复济组的大鼠 TGF-β1 和 P-smad3 蛋白表达水平则均明显低于空白对照组(P=0.005、P=0.026,P=0.001、P=0.005);而且,上述 2 组大鼠的 TGF-β1 和 P-smad3 蛋白表达水平亦明显高于模型组(P=0.000);此外,与第 5 天结果相比,第 14 天 MEBT/MEBO 组与贝复济组的 TGF-β1、P-smad3 表达水平明显下降,差异均具有统计学意义(P=0.000)。治疗后第 5 天,MEBT/MEBO 组、贝复济组及空白对照组溃疡创面肉芽组织中成纤维细胞形态、毛细血管新生情况优于模型组,但空白对照组成纤维细胞排列紊乱;第 14 天,MEBO 组、贝复济组创面组织成纤维细胞及胶原纤维排列致密成形;空白对照组胶原纤维增生明显但排列紊乱,模型组胶原纤维呈团状增生。**结论**:MEBT/MEBO 在创面愈合早期可激活 TGF-β1/Smad3 信号通路,促进创面损伤修复,而在愈合晚期则抑制该信号通路的活化,控制创面组织过度增生。

【关键词】糖尿病足;皮肤原位再生医疗技术;转化生长因子-β1;Smad3;磷酸化 smad3

【中图分类号】R578.1 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-09-19

Effects of MEBT/MEBO on the expression of TGF-β1, Smad3 and P-smad3 and morphological structure in diabetic foot wound of rats

Tang Qianli[1], Li Liqing[2], Li Hui[3], Zeng Hongmeng[4], Wang Shu[1], Liu Ming[4], Guo Man[4], Zhao Xi[4]

*(1. Key Lab of Western Guangxi High Incident Disease of Youjiang Medical University for Nationalities;
2. Graduate School, Hunan University of Traditional Chinese Medicine; 3. Department of Burns and Peripheral Vascular Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine;
4. Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine)*

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment(MEBT/MEBO) on the expressions of transforming growth factor-β1(TGF-β1), Smad3 and phosphorylation Smad(P-smad3) and morphological structure in diabetic foot wound of rat. ***Methods***: Eighty healthy male SD rats were randomly divided into blank control group, treated model group, recombinant bovine basic fibroblast growth factor(rb-bFGF) group and MEBT/MEBO group, each group had 20 rats. Rats in treated model group, rb-bFGF group and MEBT/MEBO group were enrolled to establish diabetic animal model by intraperitoneal injection of streptozotocin each 60 mg/kg; and rats in the blank control group were injected with the same volume of buffer solution of citric acid and sodium citrate. The wound tissues were separately collected on 5 d and 14 d after the medication, and the protein expressions of TGF-β1, Smad3 and P-smad3 were

作者介绍:唐乾利,Email:htmgx@163.com,
研究方向:中西医结合外科学、创面修复。

基金项目:2015 年国家自然科学基金资助项目(编号:81560776);
2014 年广西自然科学基金面上资助项目(编号:2014GXNSFAA118135)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1123.072.html (2017-03-13)

detected by Western blot and ulcer morphological structure was observed by regular pathological technique. Comparisons among different groups were analyzed by using single factor analysis of variance and rank sum test. ***Results***: After 5 d treatment, there was no significant differences in the protein expression of Smad3 among four groups (F=1.036, P=0.388). The protein expression of TGF-β1 and P-smad3 in both MEBT/MEBO and rb-bFGF group were significantly lower than those of control group (P=0.005, P=0.026; P=0.001, P=0.005). The protein expressions of TGF-β1 and P-smad3 of both MEBT/MEBO and rb-bFGF group were also higher than those of treated model group (P=0.000). In addition, compared with the results of 5 d time point, the protein expressions of TGF-β1 and P-smad3 in MEBT/MEBO and rb-bFGF group were decreased significantly (P=0.000). After 5 d treatment, fibroblasts and capillary growth in MEBT/MEBO group, blank control group and bFGF group were better than that in the model group, while fibroblasts were not well aligned in blank control group. On the 14 d, fibroblasts and collagen fibers in MEBT/MEBO group, bFGF group and blank control group formed a dense arrangement. Collagen fibers in MEBT/MEBO group were proliferated obviously but arrangement was disordered. Collagen fibers in the model group also showed slug hyperplasia. ***Conclusion***: MEBT/MEBO can activate TGF-β1/Smad3 signaling pathway at the early stage of wound healing, and thus promoting wound healing. However, at the later stage of healing, it can inhibit the excessive activation of this signaling pathway and therefore reducing excessive tissue proliferation.

【Key words】diabetic foot; moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment; transforming growth factor-β1; Smad3; P-smad3

足溃疡是糖尿病的严重并发症之一。在美国，有 2 910 万人患有糖尿病，占总人口的 9.3%，每年有 2%~3%的糖尿病患者将会并发糖尿病足溃疡，糖尿病足溃疡是糖尿病的常见和严重并发症，而且是糖尿病治疗中最费钱的部分之一[1]。国内最新研究表明，糖尿病足占糖尿病门诊患者总人数的3.67%，截肢率高于 1%[2]。近年糖尿病足溃疡发病率呈上升趋势，对患者心理及经济上造成了巨大的负担。由于其成因极为复杂，临床治疗难度大，因此足溃疡也是造成糖尿病患者致残或致死的重要原因。因此，发掘行之有效的治疗糖尿病足溃疡的方法显得尤为重要。中医药治疗皮肤慢性难愈合溃疡历史悠久且效果显著。在众多中医药治疗策略中，皮肤原位再生医疗技术（moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment，MEBT/MEBO）根植于中医理论体系，经过 20 余年的临床研究与应用，已被逐步证实为治疗皮肤慢性难愈合创面的优良方法之一，在糖尿病足的治疗中取得了良好的效果[3]。本课题组在前期动物实验研究中已发现，在创面修复的各个时间点，MEBT/MEBO 组大鼠糖尿病足创面肉芽性质、肉芽生长速度、上皮爬行速度及最终的创面愈合时间均明显优于模型组，并且创面表面坏死组织及脓性分泌物明显少于模型组，充分表明 MEBT/MEBO 能够促进大鼠糖尿病足溃疡创面愈合[4]。然而，MEBT/MEBO 治疗糖尿病足溃疡的具体机制目前仍未明确。已有研究证实，转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）/Smad 信号通路在创面愈合中发挥重要调控作用[5]，但 MEBT/MEBO 促进糖尿病足创面愈合的作用靶点是否在 TGF-β/Smad 信号通路目前尚不清楚。据此，本研究拟通过观察糖尿病足溃疡创面愈合过程中，TGF-β/Smad 信号通路关键蛋白 TGF-β1、Smad3、磷酸化 smad3（P-smad3）蛋白的表达变化，以期探讨 MEBT/MEBO 促进糖尿病足溃疡创面愈合的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

MEBT/MEBO（汕头经济特区美宝制药公司）；贝复济（珠海亿胜生物制药公司）；链脲佐菌素（北京索莱宝科技公司）；兔源性 TGF-β1 一抗、Smad3 一抗、磷酸化 phospho-S425-Smad3 一抗（Biorbyt 公司）；辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG（Biorbyt 公司）；兔源性 β-actin 内参一抗体（武汉博士德公司）；病理图文分析系统（HPIAS-1000P）；紫外可见分光光度计（Agilent 公司，型号 Cary 60 UV-Vis）；垂直电泳槽（Bio-Rad 公司）；显微摄像系统（Olympus 公司，型号 BX50）。

1.2 实验动物

选取 80 只 7~8 周龄，体质量 200~250 g，SPF 级 SD 雄性大鼠为受试对象，动物许可证号：SCXK（苏）2010-0001，购于南京大学模式动物研究所。动物饲养于右江民族医学院实验动物中心，动物房温度 24 ℃~26 ℃，相对湿度 40%~60%，12 h/12 h 光/暗周期，动物自由进食、饮水，适应环境 7 d 后开始实验。研究方案经右江民族医学院动物伦理委员会批准，符合

动物实验的伦理学要求。

1.3 实验分组与模型建立

以随机数字表法将所有大鼠分为空白对照组、模型组、MEBT/MEBO 组、贝复济组，每组各 20 只。其中，模型组、MEBT/MEBO 组和贝复济组大鼠参照糖尿病模型制备法，采用腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素，建立糖尿病动物模型，1 周后复测大鼠血糖，若血糖值大于 16.7 mmol/L 时，则判定模型成功制备[6]。空白对照组大鼠则腹腔注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。此外，模型组、MEBT/MEBO 组和贝复济组大鼠均参照相关文献[7]，用图章在足背部印出 3 mm × 7 mm 大小的矩形标记，并以标记为范围用剪刀剪除其全层皮肤，深至筋膜，制备成足溃疡创面模型。

1.4 换药方法

制备糖尿病足溃疡创面造模成功当天，即分别给各组大鼠换药，每天 2 次；各组大鼠均用浓度为 0.5%碘伏溶液对大鼠足溃疡创面进行消毒灭菌；MEBT/MEBO 组大鼠换药时将药膏直接外涂于溃疡创面上，厚度约 1 mm，再外敷 2 层 MEBT/MEBO 纱布（0.2 g/cm²），清洁敷料覆盖，外用胶布固定；贝复济组大鼠足溃疡创面外涂贝复济凝胶，剂量为 262.5 U/cm²，再外敷 2 层贝复济药纱（60 U/cm²），清洁敷料覆盖，外用胶布固定；模型组、空白对照组则分别用生理盐水浸湿纺纱外敷大鼠创面，清洁敷料覆盖，外用胶布固定。

1.5 血糖值结果测定

模型制备 1 周后，测定各组大鼠血糖水平，以判定模型制备是否成功。

1.6 动物及创面观察

肉眼观察且记录每次换药时大鼠生命体征、创面情况：大鼠进食饮水、活动的情况，创面的色泽及质地、是否有渗液、有无感染及水肿、肉芽组织生长情况等。造模首次给药后，第 5、14 天，创面上覆盖以涤纶投影膜，描计好创面的大小、比对标尺，在计算机中输入创面的图像资料，图像分析软件 MIAS2000 予以分析，得出面积数据，同时参照公式：创面愈合率=（原始创面面积-残余创面面积）/原始创面面积×100%，计算创面的愈合率。

1.7 组织病理学检测

分别于治疗后第 5、14 天，从各组随机取 10 只大鼠，麻醉后取大鼠溃疡创面新生肉芽组织，将肉芽组织一部分迅速投入液氮罐，后转移到-80 ℃冰箱保存待检。剩余部分用 10%福尔马林固定，接着脱水、透明，再浸蜡、石蜡包埋及切片，完成上述操作后行常规 HE 染色。使用光学显微镜观察新鲜肉芽组织毛细血管生长分布、成纤维细胞形态数量及炎症细胞浸润等情况。

1.8 创面组织 TGF-β1、Smad3、P-smad3 蛋白表达水平检测

将上述转移到-80 ℃冰箱保存的待检肉芽组织取出，将组织研磨后，提取蛋白样品，BCA 法测定蛋白含量，制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺胶（5%浓缩胶/12%分离胶），恒压 80~100 V 电泳，恒流 350 mA 转膜 1.5 h，室温摇床封闭 2 h，再加入按比例稀释的一抗（TGF-β1，1:500；Smad3，1:500；P-smad3，1:250，β-Actin，1:500），4 ℃摇床孵育过夜。次日，利用 TBST 洗膜，加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h，经洗膜后加入 ECL 化学发光液，置于凝胶成像系统观察，拍照。利用 Image J 软件进行蛋白灰度值分析，以目的条带与 β-actin 条带的灰度值比值表示样本蛋白相对表达量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件包进行数据处理，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间比较，方差齐时采用单因素方差分析，方差不齐时则采用秩和检验，并采用 SNK-q 法进行组间两两比较，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 各组大鼠血糖测定结果比较

造模后 7 d，模型组、MEBT/MEBO 组、贝复济组血糖值分别为（18.39 ± 0.78）、（18.01 ± 0.84）、（18.65 ± 1.37）mmol/L，3 组间比较差异均无统计学意义（q=1.905，P=0.158），且 3 组血糖测定值均高于空白对照组（P=0.000），见表 1。

表 1 各组大鼠血糖值

Tab.1 Blood glucose level of rats in each group

组别	例数	血糖值（mmol/L）
空白对照组	20	5.05 ± 0.58
模型组	20	18.39 ± 0.78[a]
MEBT/MEBO组	20	18.01 ± 0.84[a]
贝复济组	20	18.65 ± 1.37[a]
F 值		1 005.531
P 值		0.000

注：a，与空白对照组相比，P=0.000

2.2 创面观察结果

各大鼠造模后，全身情况良好，后肢运动有所欠佳，进食饮水及活动均正常，无腹泻等不良反应。造模后各大鼠创面均无明显感染，但均有少许出血、渗液及周围组织水肿。

整个实验过程中，各组大鼠创面均随时间推移而逐步愈合。空白对照组创面已基本愈合，且有毛发生长；模型组溃疡创面愈合情况较前好转，创面较深，部分创面仍有少量脓性分泌物，基底部见少量肉芽颗粒生长，创面基底苍白；MEBO 组溃疡创面已很小，上皮生长较快，部分创面接近愈合；贝复济溃疡组创面明显缩小，上皮生长较慢。

治疗后第 5 天，各创面愈合率差异均具有统计学意义（F=6.065，P<0.05），模型组、MEBO 组、贝复济组的创面愈合率，两两之间均无明显差异（P>0.05）；治疗后第 14 天，空白对照组创面愈合率明显大于其余 3 组（F=145.836，P=0.000），差异具有统计学意义；MEBO 组、贝复济组创面愈合率无统计学差异（P=0.064）；但此 2 组创面愈合率均明显大于模型组，差异有统计学意义（P=0.000），见表 2。

表 2　各组各时间点创面愈合率比较（%）

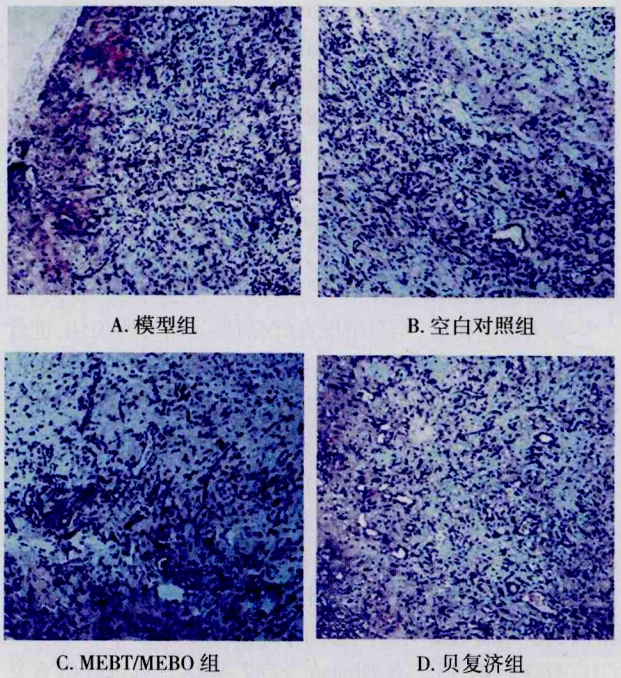
Tab.2　Wound healing rate at each time point（%）

分组	例数（n）	第 5 天	第 14 天
空白对照组	20	11.39 ± 2.05	94.53 ± 3.22
模型组	20	9.32 ± 1.31[a]	66.32 ± 4.37[a]
MEBT/MEBO组	20	9.97 ± 1.53[a]	88.90 ± 5.03[ab]
贝复济组	20	9.82 ± 1.45[a]	86.19 ± 5.28[ab]
F 值		6.065	145.836
P 值		0.001	0.000

注：a，与空白对照组比较，$P<0.05$；b；与模型组比较，$P<0.05$

2.3　组织病理学结果

治疗后第 5 天，光镜下发现模型组大鼠溃疡面肉芽组织大量炎症细胞浸润，可见坏死带，出血明显，成纤维细胞稀疏，团状排列，大部分细胞体较小，可见少许血管，管腔狭窄（图 1A）。空白对照组溃疡面炎性细胞浸润较模型组轻，成纤维细胞丰富，走形紊乱，不够致密，肉芽组织中新生毛细血管明显（图 1B）。MEBT/ MEBO 组溃疡面肉芽组织中成纤维细胞增殖，细胞体大，可见大量新生小、圆毛细血管，部分与皮肤垂直生长，少量炎症细胞浸润（图 1C）。贝复济组溃疡面肉芽组织见少量的炎性细胞浸润，淋巴细胞为主，可见较多成纤维细胞，密集的新生毛细血管，表面少许坏死组织及出血带（图 1D）。



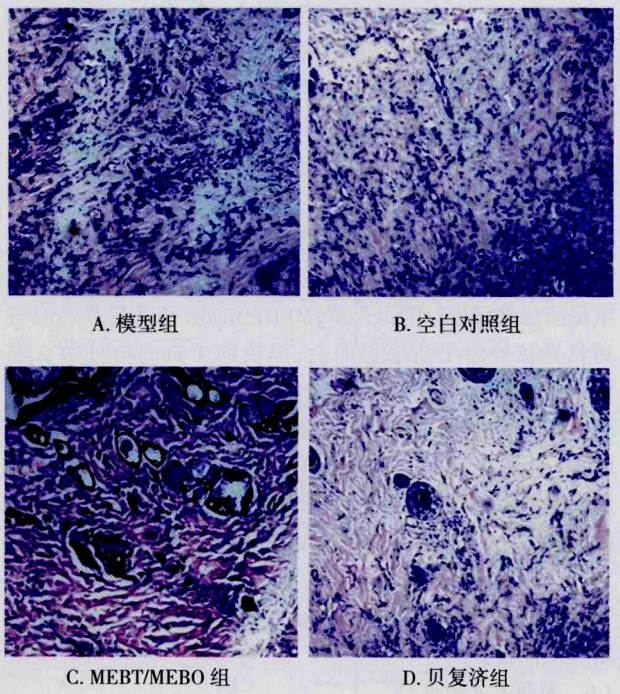
A. 模型组　　B. 空白对照组

C. MEBT/MEBO 组　　D. 贝复济组

图 1　各组治疗后第 5 天组织病理学结果（HE，200×）

Fig.1　Pathological results of each group after 5 d treatment（HE，200×）

治疗后第 14 天，模型组溃疡面肉芽组织中成纤维细胞排列紊乱，可见大量胶原纤维团状增生，仍可看到部分毛细血管（图 2A）；空白对照组成纤维细胞排列不齐，胶原纤维大量增生，呈团状，毛细血管萎缩（图 2B）；MEBT/MEBO 组溃疡面可见新生毛囊及其他皮肤附属器，成纤维细胞肥大，胶原纤维排列致密成形（图 2C）；贝复济组溃疡面肉芽组织成纤维细胞、胶原纤维也排列整齐，新生毛囊及其他皮肤附属器较 MEBO 组少，毛细血管网萎缩（图 2D）。



A. 模型组　　B. 空白对照组

C. MEBT/MEBO 组　　D. 贝复济组

图 2　治疗后第 14 天各级组织病理学结果（HE，200×）

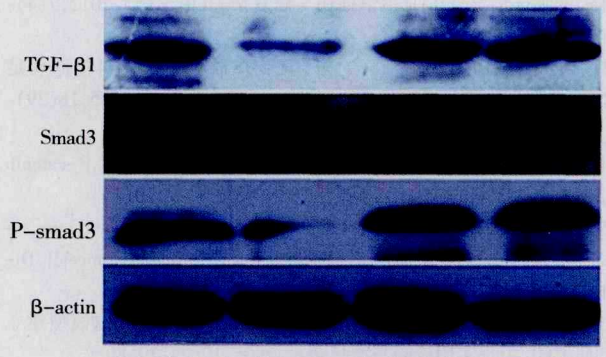
Fig. 2　Pathological results of each group after 14 d treatment（HE，200×）

2.4　Western blot 检测结果

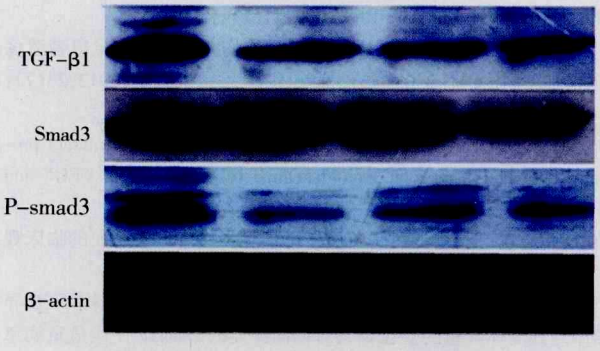
2.4.1　治疗后 5 d 各组大鼠创面组织 TGF-β1、Smad3 和 P-smad3 蛋白表达比较　如表 3 和图 3 所示，治疗后 5 d，各组大鼠 Smad3 蛋白表达水平比较，差异均无统计学意义（$F=1.036$，$P=0.388$）；MEBT/MEBO 组大鼠与贝复济组 TGF-β1（$P=0.558$）、P-smad3（$P=0.548$）蛋白表达无差异；MEBT/MEBO 组大鼠 TGF-β1（$P=0.005$）、P-smad3（$P=0.026$）蛋白表达水平明显低于空白对照组，但均明显高于模型组（$P=0.000$）；贝复济组大鼠 TGF-β1（$P=0.001$）、P-smad3（$P=0.005$）蛋白表达水平明显低于空白对照组，但均明显高于模型组（$P=0.000$）。

2.4.2　治疗后 14 d 各组大鼠创面组织 TGF-β1、Smad3 和 P-smad3 蛋白表达比较　如表 4 和图 3 所示，各组大鼠Smad3 蛋白表达水平比较，差异均无统计学意义（$F=0.178$，$P=0.910$）；MEBT/MEBO 组大鼠与贝复济组 TGF-β1（$P=0.598$）、P-smad3（$P=0.127$）蛋白表达无差异；MEBT/MEBO 组大鼠 TGF-β1（$P=0.009$）、P-smad3（$P=0.000$）蛋白表达水平明显低于空白对照组，但均明显高于模型组（$P=0.000$，$P=0.001$）；贝复济组

大鼠 TGF-β1（P=0.002）、P-smad3（P=0.000）蛋白表达水平明显低于空白对照组，但均明显高于模型组（P=0.000）；此外，与第 5 天结果相比，第 14 天 MEBT/MEBO 组 TGF-β1、P-smad3 表达水平明显下降，差异均具有统计学意义（P=0.000、P=0.000）；贝复济组的 TGF-β1、P-smad3 表达水平明显下降，差异均具有统计学意义（P=0.000、P=0.000）。



A. 治疗后第 5 天



B. 治疗后第 14 天

图 3　治疗后第 5、14 天各组大鼠创面组织 TGF-β1、Smad3 和 P-smad3 蛋白表达印迹图

Fig.3　Western blot of TGF-β1, Smad3 and P-smad3 in wound tissues of rats on 5 d and 14 d after treatment

表 3　治疗后 5 d 各组大鼠创面组织 TGF-β1、Smad3 及 P-smad3蛋白表达

Tab.3　Expression of TGF-β1, Smad3 and P-smad3 protein in wound tissues of rats on 5 d after treatment

分组	例数（n）	TGF-β1/β-actin	Smad3/β-actin	P-smad3/β-actin
空白对照组	10	1.62 ± 0.10	1.11 ± 0.09	0.83 ± 0.09
模型组	10	0.56 ± 0.03[a]	1.03 ± 0.11	0.35 ± 0.04[a]
MEBT/MEBO组	10	1.44 ± 0.15[ab]	1.07 ± 0.13	0.74 ± 0.09[ab]
贝复济组	10	1.41 ± 0.16[ab]	1.03 ± 0.14	0.72 ± 0.08[ab]
F 值		158.260	1.036	73.329
P 值		0.000	0.388	0.000

注：a，与空白对照组比较，P<0.05；b：与模型组比较，P<0.05

表 4　治疗后 14 d 各组大鼠创面组织 TGF-β1、Smad3 和 P-smad3 蛋白表达比较

Tab.4　Expression of TGF-β1, Smad3 and P-smad3 protein in wound tissues of rats on 14 d after treatment

分组	例数（n）	TGF-β1/β-actin	Smad3/β-actin	P-smad3/β-actin
空白对照组	10	1.35 ± 0.43	0.96 ± 0.06	0.68 ± 0.05
模型组	10	0.81 ± 0.04[a]	0.97 ± 0.10	0.30 ± 0.03[a]
MEBT/MEBO组	10	1.03 ± 0.11[ab]	0.98 ± 0.09	0.43 ± 0.03[ab]
贝复济组	10	0.98 ± 0.11[ab]	0.99 ± 0.12	0.40 ± 0.05[ab]
F 值		9.947	0.178	157.808
P 值		0.000	0.910	0.000

注：a，与空白对照组比较，P<0.05；b：与模型组比较，P<0.05

3　讨　论

糖尿病足溃疡属慢性难愈合创面，修复过程极其复杂而困难，是炎症反应期、增殖期、重塑期 3 个阶段相互交叉而又循序渐进的生理过程。已有研究表明，MEBT/MEBO 可作用于慢性难愈合创面，引起成纤维细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子释放增加，加快成纤维细胞与新生毛细血管的增殖速度和数量，改善创面血液循环状况，从而促进创面肉芽组织的生长及填充，缩短创面愈合时间，改善创面愈合质量[8-9]。病理性瘢痕目前认为主要是因为创面成纤维细胞的大量增殖及胶原纤维的细胞外基质的过度沉积引起。正常表皮组织中成纤维细胞与上皮细胞的数量大约为 4:1，创面修复过程中大于此标准，创面会难以完成生理性再生愈合，甚至会留瘢痕[10]。

在众多细胞生长与调控因子中，TGF-β 超家族作为 TGF-β/Smad 信号通路主要组成部分，与创面修复的关系最为密切[11]。其中，TGF-β 亚型 TGF-β1 介导的 Smad 信号传导通路被认为是创面愈合与修复的关键途径[12]。作为公认的“修复相关基因”，Smad3 蛋白能与 Smad4 形成复合物，并转入胞核内，促进创面修复相关靶基因的表达。磷酸化 Smad3（P-smad3）是 Smad3 的活化形式，在该信号传导过程中，只有当 Smad3 发生磷酸化后，才能将 TGF-β1 刺激信号从细胞质传入细胞核中，发挥生物学效应，而未磷酸化的 Smad3 则以非活化形式存在于细胞质内。因此，P-smad3 表达水平才可真正反映 TGF-β1/Smad3 信号传导通路的激活水平与强度[13-14]。在创伤修复中，TGF-β1 作为化学趋化因子及组织修复细胞的促分裂因子，参与调节炎性反应、激活单核巨噬细胞、影响血管内皮细胞以及刺激成纤维细胞

分泌细胞外基质等修复的全过程[15]。研究表明激活溃疡创面 TGF-β1/Smad2,3 信号通路，提高 TGF-β1 及磷酸化 Smad2、Smad3 表达水平，促进胶原蛋白的合成，可加速伤口的愈合[16]。创面肉芽组织中TGF-β1 因子含量的下降，引起血液供应不足、肉芽组织生长缓慢，这可能是引起创面修复延缓的原因[17]。

本研究显示，连续创面药物干预后，不论是在创面愈合初期（第 5 天）还是晚期（第 14 天），MEBT/MEBO 组、贝复济组的 TGF-β1 和 P-smad3 蛋白表达均明显低于空白对照组，且显著高于模型组。病理结果显示，在创面愈合初期，空白对照组、MEBT/MEBO 组及贝复济组创面肉芽组织中成纤维细胞、新生毛细血管增生明显，成纤维细胞体积大，且炎症细胞少；而模型组创面肉芽组织中成纤维细胞稀疏，体较小，血管少且管腔狭窄，炎症细胞多。根据结果推测，糖尿病足溃疡创面的形成可能与 TGF-β1/Smad3 信号通路受到抑制有关，而 MEBO/MEBT 有助于激活 TGF-β1/Smad3 信号通路，促进成纤维细胞迁移、增殖，影响血管内皮细胞生长，调节炎症反应，进而促进糖尿病足溃疡创面修复。此外，研究结果还发现，随着药物干预治疗时间的延长，TGF-β1、P-smad3 蛋白表达水平呈现逐渐下降趋势。创面愈合晚期病理结果提示模型组、空白对照组溃疡面肉芽组织中成纤维细胞仍大量增殖，大量胶原纤维沉积且排列不规则；相反，MEBT/MEBO 成纤维细胞、胶原纤维排列致密成形，说明在创面愈合的晚期，MEBT/MEBO 可能通过对 TGF-β1/Smad3 信号通路的抑制作用，避免成纤维细胞的大量增殖及胶原等细胞外基质的过度沉积，控制创面组织过度增生。已有研究发现，瘢痕组织中 TGF-β1、Smad3 基因表达量高于正常皮肤，而胎儿组织中两者的表达水平却远低于健康成人[18]。由此可见，TGF-β1/Smad3 信号通路过度活化对创面愈合可产生不利影响。对照药物选用贝复济（外用重组牛碱性成纤维细胞生长因子）为外源性生长因子，可补充内源性生长因子不足，促进成纤维细胞、血管内皮细胞增殖，促进创面修复，目前广泛用于各类创面的治疗。

综上所述，本研究结果显示 MEBT/MEBO 可动态调节 TGF-β1/Smad3 信号通路，在创面愈合早期激活该信号通路，而愈合晚期则产生一定程度的抑制作用，避免 TGF-β1/Smad3 信号通路过度激活，这种动态调节作用可能是 MEBT/MEBO 促进糖尿病足溃疡创面愈合的潜在机制，本实验作了有宜探索。但本研究尚缺乏对整个创面愈合过程的动态观察，且对实验治疗过程中 TGF-β/Smad 信号通路抑制性 Smads 蛋白（Smad6、Smad7 等）的研究缺乏，有待下一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Maydick DR, Acee AM. Comorbid depression and diabetic foot ulcers[J]. Home Healthc Now, 2016, 34(2): 62-67.

[2] 关小宏，李宝军，肖 黎，等.糖尿病足流行病学及糖尿病足截肢（趾）的临床情况分析[J].中华损伤与修复杂志（电子版），2012，7(4)：406-408.

[3] 吴标良，唐乾利，覃晓洁，等. 烧伤皮肤再生医疗对糖尿病足 ERK1/2 和 p38 信号通路分子的调控[J]. 中国全科医学，2015，18(29)：3592-3595.

[4] 李利青. MEBT/MEBO 对糖尿病足溃疡愈合中 Smad3、β-catenin mRNA 表达影响的研究[D]. 南宁：广西中医药大学，2014.

[5] Huang C, Shen S, Ma Q, et al. Blockade of KCa3.1 ameliorates renal fibrosis through the TGF-β1/Smad pathway in diabetic mice[J]. Diabetes, 2013, 62(8): 2923-2934.

[6] 沈亚非，徐焱成. 链脲佐菌素诱导实验性糖尿病大鼠模型建立的研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2005，19(2)：79-80.

[7] Lau TW, Sahota DS, Lau CH, et al. An in vivo investigat ion on the wound-healing effect of two medicinal herbs using an animal model with foot ulcer[J]. Eur Surg Res, 2008, 41(1): 15-23.

[8] 李杰辉，王 丽，杜娟娇，等. 湿润烧伤膏对糖尿病足患者溃疡创面凋亡基因 Bc1-2 和 Bax 的影响[J]. 时珍国医国药，2012，23(7)：1616-1617.

[9] Tang QL, Han SS, Feng J, et al. Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1277-1282.

[10] 荣志东，王凌峰. 封闭负压技术治疗慢性难愈性创面的临床观察[J]. 中华全科医学，2013，11(1)：29-31.

[11] 陈 伟，付小兵，孙同柱，等. 溃疡组织中转化生长因子-β 异构体与其受体含量的变化及其对创面修复的影响[J]. 中国危重病急救医学，2002，14(2)：93-95.

[12] Massagué J. Wounding smad[J]. Nat Cell Biol, 1999, 1(5): E117-119.

[13] Bennett J, Cassidy H, Slattery C, et al. Tacrolimus modulates TGF-β signaling to induce epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells[J]. J Clin Med, 2016, 5(5): E50.

[14] Da C, Liu Y, Zhan Y, et al. Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF-β1/Smad3 signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 35(5): 2767-2774.

[15] 傅小兵，杨银辉，孙同柱，等. 转化生长因子 β1 与白细胞介素-6 mRNA 在糖尿病溃疡创面组织中的表达[J]. 中国修复重建外科杂志，1999，13(5)：259-262.

[16] Hozzein WN, Badr G, Al Ghamdi AA, et al. Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF-beta/Smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(3): 940-954.

[17] Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, et al. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta [J]. J Pediatr Surg, 1995, 30(2): 198-202.

[18] 陈 伟，付小兵，孙同柱，等. 增生瘢痕中转化生长因子基因的表达[J]. 中华外科杂志，2002，40(1)：17-19.

（责任编辑：唐秋姗）