DOI:10.16016/j.2097-0927.202407016

Ⅰ型糖尿病小鼠背部皮肤生物力学性能退化和伤口愈合障碍的机制研究

范德江,贺伟峰 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院烧伤研究所,重庆市创面组织修复与再生重点实验室

[摘要] **目的** 探究由链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的Ⅰ型糖尿病(type Ⅰ diabetes mellitus,T1DM)小鼠,其背部皮肤生物力学性能减弱和伤口愈合障碍的机制。**方法** 40只8周龄且体质量为20~25 g的雄性C57BL/6小鼠,采用随机数字表法分为2组:野生型(wild type,WT)组($n=20$)和T1DM组($n=20$)。利用原子力显微镜和扫描电镜检测皮肤的杨氏模量、松弛率及胶原排布。将皮肤组织石蜡切片进行苏木精-伊红(HE)染色、马松染色、天狼星红染色、Gordon Sweet染色和维多利亚蓝染色,分别评估表皮与肉芽组织、总胶原含量、Ⅲ型胶原与Ⅰ型胶原比例、网状纤维含量和弹性纤维含量。免疫组织化学染色法和蛋白免疫印迹法定量检测Ⅰ型胶原与Ⅲ型胶原蛋白表达情况。流式细胞术和组织石蜡切片的免疫荧光染色检测创面组织内肌成纤维细胞转化情况。**结果** 与WT组相比,在造创后第21天T1DM组小鼠背部皮肤刚度、强度和回弹力均显著降低($P<0.05$);愈合过程中及愈合后T1DM组胶原蛋白、弹性纤维减少,Ⅲ型胶原蛋白与Ⅰ型胶原蛋白比例显著增加,网状纤维明显增多($P<0.05$);T1DM组创面愈合早期阶段肌成纤维细胞转化显著减少($P<0.05$)。**结论** T1DM抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,引起伤口愈合障碍,导致小鼠背部皮肤力学性能减弱。

[关键词] Ⅰ型糖尿病;伤口愈合;成纤维细胞;生物力学
[中图法分类号] R322.991; R587.1; R64 [文献标志码] A

Degradation of biomechanical properties and impaired wound healing in the back skin of mice with type 1 diabetes mellitus: a quantitative study

FAN Dejiang, HE Weifeng Institute of Burn Research, Chongqing Key Laboratory of Wound Tissue Repair and Regeneration, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanisms underlying the reduced biomechanical properties and impaired wound healing in the dorsal skin of streptozocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus (T1DM) mice. **Methods** Forty male C57BL/6 mice (8 weeks old, weighing 20~25 g) were randomly divided into wild-type (WT, $n=20$) and T1DM ($n=20$) groups. After the mice were inflicted with full-thickness skin resection (circular, 1 cm in diameter, in both sides of the back midline), atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) were employed to assess the Young's modulus, relaxation rate, and collagen arrangement of the skin, and HE, Masson's trichrome, Sirius red, Gordon-Sweet, and Victoria blue staining were all applied to evaluate the epidermis and granulation tissue, total collagen content, ratio of type Ⅲ to type Ⅰ collagen, reticular fiber content, and elastic fiber content. Immunohistochemical assay and Western blotting were conducted to quantify the expression of type Ⅰ and type Ⅲ collagen proteins. Flow cytometry and immunofluorescence staining of paraffin sections were performed to detect the transformation of myofibroblast in wound tissues. **Results** On day 21 post-wounding, the dorsal

[基金项目] 国家自然科学基金(82172232);重庆市自然科学基金(CSTB2024NSCQ-LZX0057)
[通信作者] 贺伟峰,E-mail: heweifeng@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

skin of T1DM mice exhibited significantly reduced stiffness, strength, and resilience compared to the conditions in the WT group ($P<0.05$). During and after healing, T1DM mice showed decreased collagen and elastic fibers, an increased ratio of type Ⅲ to type Ⅰ collagen, and increased reticular fibers, all with statistical significance ($P<0.05$). Additionally, there was a significant reduction in myofibroblast transformation during the early stages of wound healing in the T1DM group ($P<0.05$). **Conclusion** T1DM inhibits the transformation of fibroblasts into myofibroblasts, leading to impaired wound healing and reduced biomechanical properties in the dorsal skin of mice.

[**Key words**] type 1 diabetes mellitus; wound healing; fibroblasts; biomechanics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82172232) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2024NSCQ-LZX0057).
Corresponding author: HE Weifeng, E-mail: heweifeng@tmmu.edu.cn

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,全球患病人数不断增加,预计到 2045 年全球将有 7 亿 20~79 岁成人患糖尿病[1-2]。糖尿病会引发全身多个器官的并发症,其中皮肤并发症发生率较高,主要包括皮肤感染、皮肤瘙痒、糖尿病足等。这些皮肤并发症严重影响患者的生活质量,给医疗保健系统带来沉重负担。

糖尿病引起的高血糖会导致皮肤结构和功能的改变。研究表明,糖尿病患者皮肤胶原纤维排列紊乱,弹性纤维含量减少,真皮层变薄[3-4]。这些病理改变削弱了皮肤的机械强度和修复能力,使皮肤在受到外力作用时更容易发生撕裂和溃疡。此外,糖尿病还会引起微血管病变,血管内皮细胞功能受损,血管再生能力下降,加重组织缺血缺氧,延缓创面愈合[5]。目前临床上缺乏有效的手段来定量评估糖尿病患者皮肤的生物力学性能和微观结构改变,阻碍了针对性治疗方案的制定。

近年来,原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)和扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)等先进成像技术为定量分析皮肤力学特性和微观形态提供了新的途径。AFM 可以在纳米尺度上测量材料的杨氏模量、粘附力、松弛特性等力学参数。SEM 能够清晰观察皮肤胶原纤维的排列取向和孔隙率等超微结构,这为揭示糖尿病皮肤脆性的机制奠定了基础。

本研究拟建立Ⅰ型糖尿病小鼠皮肤全层缺损模型,运用 AFM 和 SEM 等技术手段,系统定量分析糖尿病皮肤在正常和创面愈合过程中的生物力学性能退化、微观结构紊乱以及成分比例失衡,并探讨其与伤口愈合障碍的关系,以期为糖尿病患者的皮肤健康管理提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

将 40 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(体质量为 20~25 g)采用随机数字表法分为 2 组:野生型(wild tyle, WT)组($n=20$)和 T1DM 组($n=20$),饲养在 12 h 光照/黑暗循环,温度为 18~25 ℃,湿度为 50%的环境中。小鼠可自由获得标准食物和过滤水。所有实验小鼠均来自陆军军医大学实验动物中心,饲养于陆军军医大学第一附属医院烧伤研究所洁净动物室。实验方案遵循陆军军医大学的指导方针进行,并均获得陆军军医大学动物实验伦理委员会审批(AMUWEC20237051)。

1.2 实验仪器及试剂

MTS 单轴材料拉伸试验仪(美国美特斯公司),JPK Nanowizard 4 原子力显微镜(德国 JPK 公司),MLCT 探针(美国布鲁克公司),扫描电子显微镜(德国蔡司公司),激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司),封闭用羊血清工作液(北京中杉金桥公司),凝胶制备试剂盒(上海雅酶公司),化学发光检测试剂盒(美国赛默飞公司),改良版 Masson 染色试剂盒(中国索莱宝公司),改良版 Gordon-Sweet 染色试剂盒(中国索莱宝公司),天狼星红染色试剂盒(美国 poly 公司),维多利亚蓝染色试剂盒(中国索莱宝公司),DAB 显色试剂(中国索莱宝公司),Ⅰ型胶原抗体(美国 Abcam 公司),Ⅲ型胶原抗体(美国 Abcam 公司),α-SMA FITC 抗体(美国 Sigma + Aldrich 公司),Vimentin 抗体(美国 Cell Signaling 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Ⅰ型糖尿病小鼠模型制备 为了建立Ⅰ型糖尿病模型,连续 3 d 对野生型小鼠进行腹腔注射链脲佐菌素(streptozocin, STZ),注射剂量为 0.1 mg/g。注射前小鼠禁食 6 h,注射后给予正常食物和清洁水。1 周后,采集小鼠尾部末梢血测量血糖值。为确保皮肤充分糖化,挑选血糖水平高于 16.6 mmol/L 的小鼠,在标准条件下饲养至注射 STZ 后 3 周,即 11 周龄。

1.3.2 全层皮肤缺损伤口模型建立 小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠,注射剂量 10 mg/g,麻醉生效后,小鼠背部脱毛并用 75%的乙醇清洗消毒。沿背部正中线提起小鼠皮肤,用圆形打孔器在背侧的两侧进行直

径为 1 cm 的全层皮肤切除。造创后分别在第 3、7、10 和 14 天拍摄伤口区域的照片。使用 Image J 软件测量伤口面积占 0 d 伤口面积的百分比。

1.3.3　宏观力学性能检测　　从小鼠背部切取待测试的皮肤,预留 3 mm×10 mm 大小的夹具固定区域,测试区域皮肤的尺寸为 10 mm×3 mm。为保证测量结果准确,在切取下待测皮肤 2 min 内使用 MTS 单轴材料测试设备对测试区域皮肤进行拉伸。测试区域皮肤分别拉伸到指定的长度和皮肤断裂为止(图 1)。使用 Origin 软件绘制皮肤的杨氏模量曲线。根据公式分析计算杨氏模量,用以表征皮肤刚度特性,数值越大代表其刚度越大,其中 $F_{初始}$ 代表拉伸前力值,$F_{终末}$ 为拉伸断裂前力值,$L_{初始}$ 代表拉伸前皮肤长度,$L_{终末}$ 代表拉伸断裂前皮肤长度,E 代表杨氏模量。公式如下。

$$E=\frac{(F_{终末}-F_{初始})/F_{初始}}{(L_{终末}-L_{初始})/L_{初始}}$$

皮肤拉伸至初始长度的 130%并保持 300 s,观察保持期间力值变化,分析计算松弛率,用以表征皮肤弹性和回弹力,数值越大代表其弹性与回弹力越弱。其中 F_{0s} 代表拉伸至 130%保持第 0 s 力值,$F_{300\,s}$ 代表拉伸至 130%保持第 300 s 力值,RR(relaxation rate)代表松弛率。公式如下。

$$RR=\frac{F_{0s}-F_{300\,s}}{300\ s}$$

1.3.4　微观力学性能与微观形貌检测　　全层切取 10 mm×10 mm 的包含愈合后皮肤样本,放置在-20 ℃下冷冻 30 min。使用冰冻切片机沿与皮肤平面平行的方向,从表皮到真皮网状层依次切 8 片冷冻切片,每片厚度 30 μm。弃去可能含有表皮的前 2 张切片,使用其余 6 片进行实验。使用 MLCT-C 探针对皮肤组织进行力学性能测试。在形态学研究中,使用 MLCT-E 探针测量高度图和形态图(图 1)。使用 JPK Data processing 数据处理软件生成图像并处理形态图像和力学曲线。

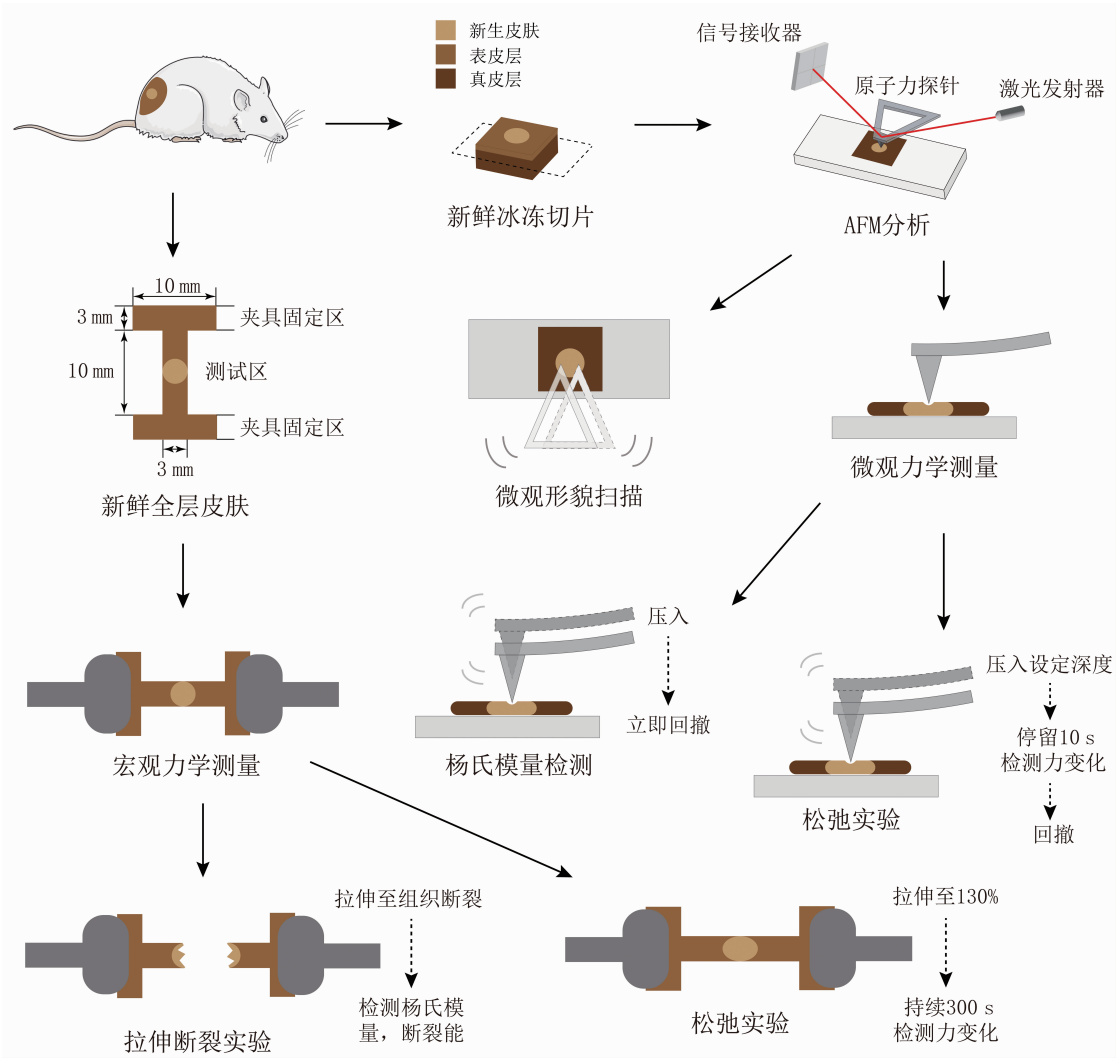


图 1　宏观力学与微观力学、形貌测量方法

切取待观察的皮肤并浸没在37 ℃的GNK溶液中4 h,用镊子剥除表皮组织。使用梯度乙醇和梯度叔丁醇对皮肤组织进行脱水,用导电胶将脱水后的皮肤组织粘附到金属样品台上,并在临界点干燥器中进行干燥。干燥后,以20 mA的电流大小对样品进行180 s的离子溅射,然后喷金。用扫描电子显微镜进行拍照。测量所有胶原原纤维与水平线的夹角,统计分析与水平线夹角的分布趋势,用以表征胶原排布紊乱程度,与水平线夹角分布集中代表胶原排布整齐。

1.3.5 苏木精-伊红染色 在全层缺损模型制备后的第3、7、10和14天分别切取伤口组织。在采集后立即进行石蜡包埋、固定、切片,切片厚度为8 μm。切片依次进行脱蜡、水化后,使用苏木精染料染色3 min,随后以自来水短暂冲洗去除浮色。接着使用分化液对染色进行精细调控,数秒后再次以自来水冲洗实现返蓝效果。最后迅速以伊红染液复染30 s左右,以增强色彩对比度。使用整片扫描显微镜检查切口周围的肉芽组织。

1.3.6 免疫组化染色法 将石蜡切片水化并梯度脱蜡。切片在室温下用内源性过氧化物酶阻断剂处理10 min。然后将一抗在切片上于4 ℃孵育1晚。第2天滴加反应增强液在切片上,置于37 ℃烘箱孵育20 min。然后滴加改良酶标记的羊抗兔IgG聚合物再置于37 ℃烘箱孵育20 min。最后,将切片置于室温,使用DAB显色试剂进行显色。最后将切片用苏木精染色,并使用全玻片扫描显微镜拍照。

1.3.7 马松、天狼星红、维多利亚蓝染色和Gordon-Sweets染色 使用马松染色试剂盒为胶原纤维着色,天狼星红染色试剂盒用于Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白染色,维多利亚蓝染色试剂盒用于弹性纤维染色,Gordon-Sweets染色试剂盒用于网状纤维染色。所有染色均按照试剂盒说明书进行操作。使用全切片扫描显微镜对切片进行拍摄。用平均光密度值(AOD)代表总胶原蛋白、Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白、弹性纤维以及网状纤维的表达水平。

1.3.8 免疫荧光测定 石蜡切片经脱蜡和水化后,与荧光直标抗体一起在4 ℃温育过夜。第2天用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂进行封存。最后使用激光共聚焦显微镜进行免疫荧光切片拍摄。

1.3.9 Western blot检测蛋白表达水平 将切取的创面组织剪碎置于含有RIPA裂解液的EP管中,加入蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和PMSF,在超声机中充分裂解后,以12 000 r/min离心5 min,去上清液进行BCA法测蛋白浓度,配平后煮沸10 min。按说明书制备SDS-PAGE凝胶,完全凝固后每孔加等量蛋白进行电泳,电泳完毕进行冰浴电转将蛋白转移到PVDF膜上。将PVDF膜与抗胶原Ⅰ(1∶1 000)和抗胶原Ⅲ一抗(1∶1 000)在4 ℃下孵育一整夜。用含有5%脱脂牛奶的TBS-T封闭PVDF膜,然后用与之匹配的辣根过氧化物酶偶联的二抗在室温下孵育1 h。在化学发光试剂中浸泡后检测化学信号。Image J分析条带灰度值。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 8统计软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间的数据差异采用单因素方差分析,两组数据之间的比较采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病皮肤对伤口愈合速度的影响

创面定期拍照结果显示,与WT组相比,T1DM组创面在愈合过程中闭合速度减慢,各时间点创面面积比例差异具有统计学意义($P<0.01$,图2A、B)。组织石蜡切片HE染色结果显示,T1DM组在造创后3 d和7 d时肉芽组织面积和厚度均减少,在14 d时WT组肉芽组织已消退,T1DM组肉芽组织才开始增多,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图2C~E)。

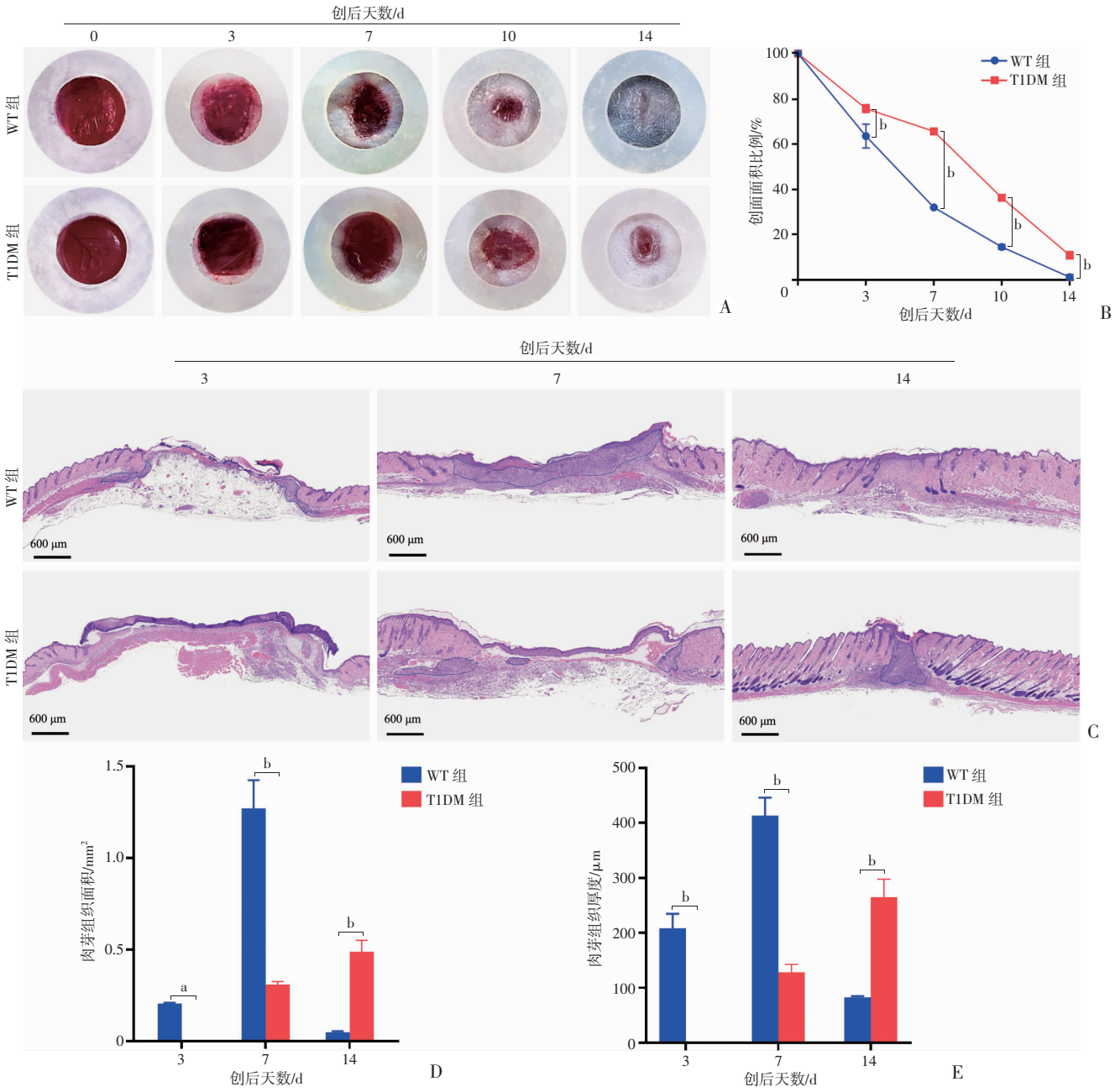
2.2 Ⅰ型糖尿病皮肤生物力学性能分析

宏观拉伸测试检测力学性能结果表明,在单轴负载下,与WT组相比,T1DM组正常皮肤和造创愈合后新生皮肤的杨氏模量和断裂能均降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图3A、B)。宏观拉伸应力松弛实验结果显示,T1DM组皮肤松弛率下降,差异具有统计学意义($P<0.01$,图3C、D)。

AFM测量组织杨氏模量结果同样显示,与WT组相比,T1DM组皮肤在正常和创伤愈合后状态下杨氏模量减弱(图3E、F)。AFM粘附力测定结果显示,与WT组相比,T1DM组皮肤在正常和创伤愈合后状态下粘附力下降(图3G、H)。AFM应力松弛检测显示,与WT组相比,T1DM组皮肤松弛率下降,差异具有统计学意义($P<0.01$,图3I、J)。

2.3 糖尿病皮肤组织中胶原纤维结构排布情况

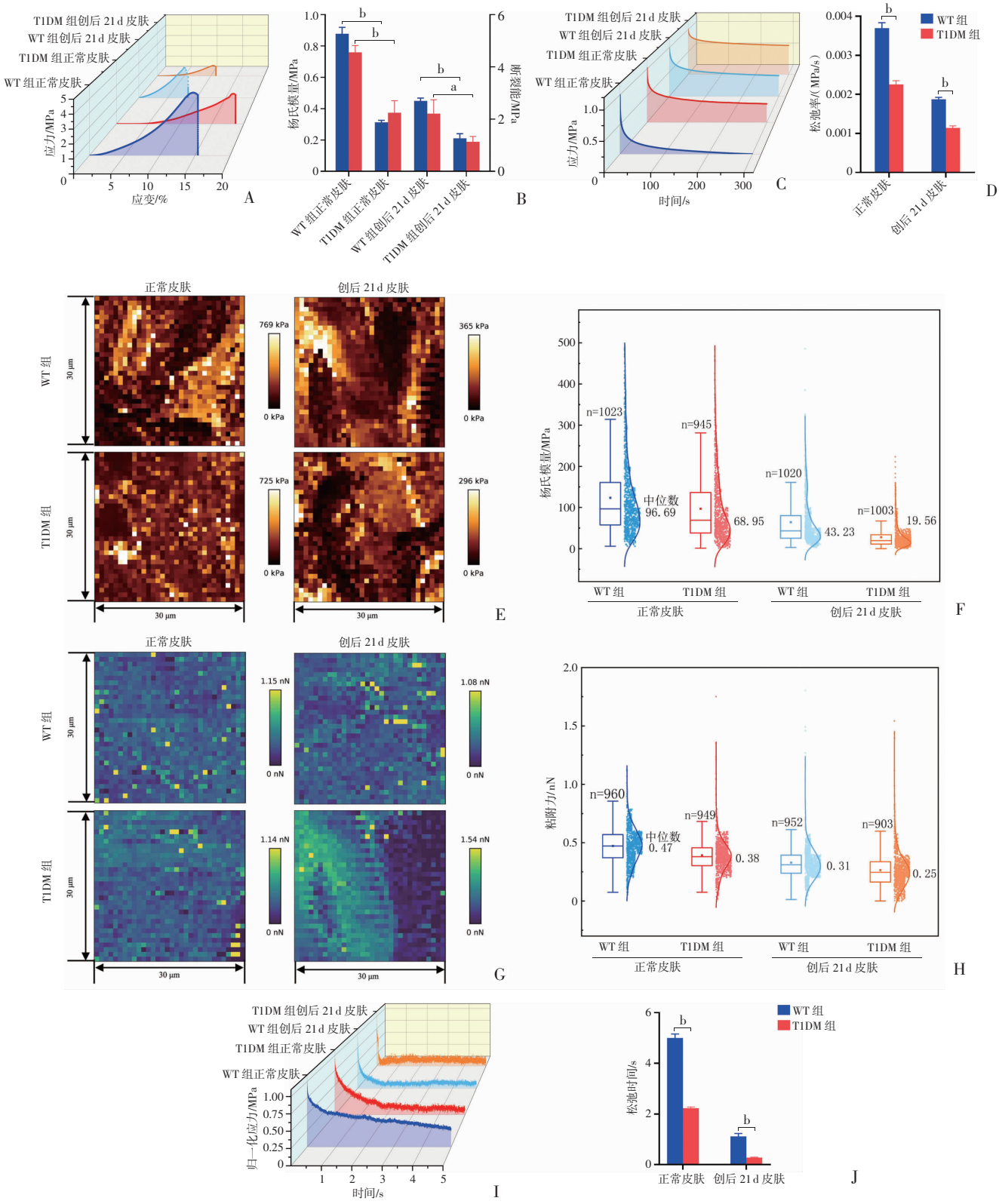
SEM对胶原结构扫描拍摄图像显示,与WT组比较,T1DM组正常皮肤和创后21 d皮肤胶原排布更加紊乱(图4A),胶原原纤维与水平线夹角增加(图4B)。AFM形貌扫描结果同样显示,T1DM组相对于WT组胶原纤维排布更加紊乱无序(图4C),胶原原纤维与水平线夹角增加(图4D)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:各时间点 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤伤口闭合情况;B:伤口闭合面积比例统计;C:HE 染色检测背部伤口皮肤组织石蜡切片肉芽组织生成情况;D:肉芽组织面积统计;E:肉芽组织厚度统计

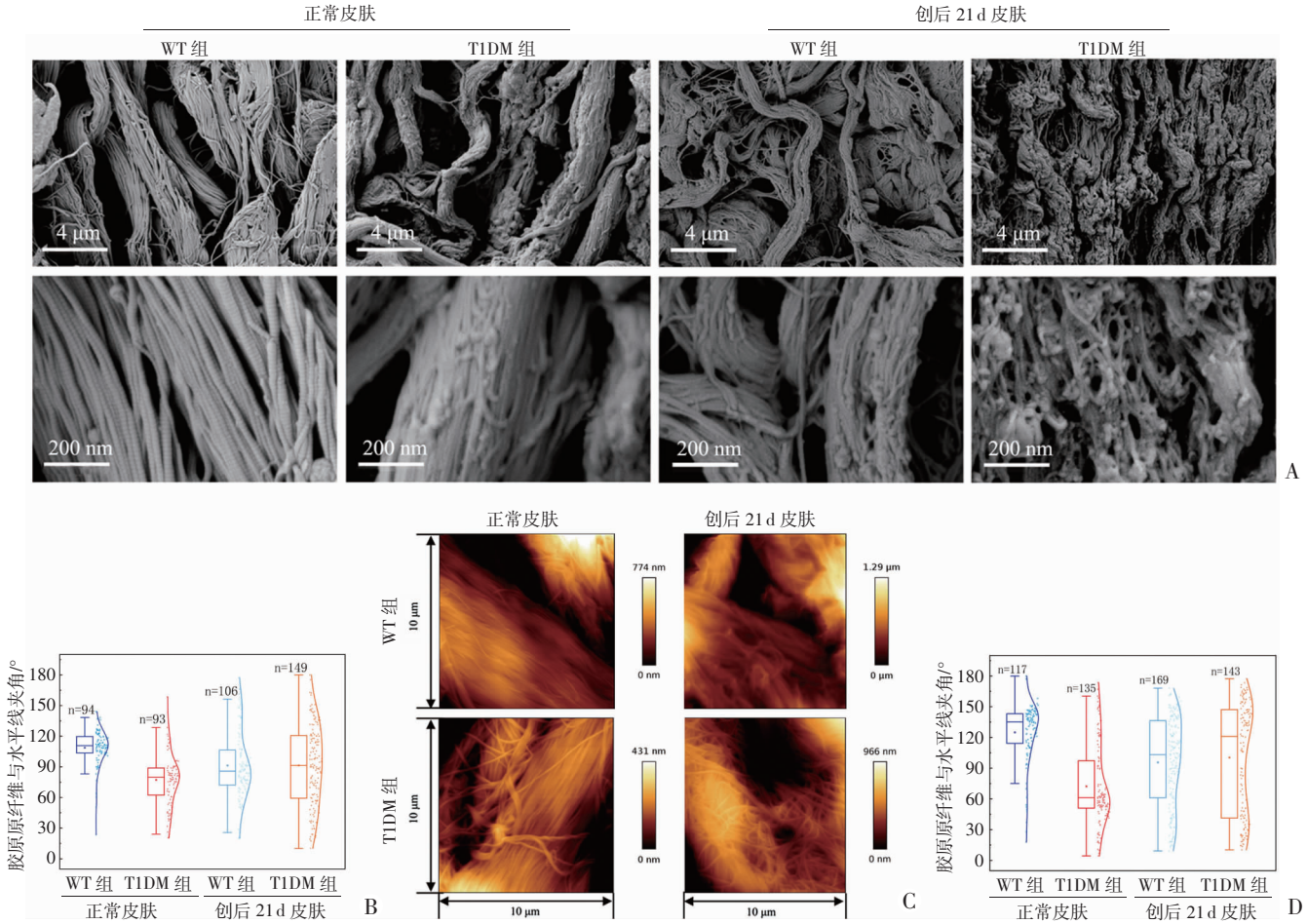
图 2　I 型糖尿病小鼠皮肤愈合情况



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:WT 组和 T1DM 组正常和愈合皮肤宏观拉伸检测杨氏模量曲线;B:杨氏模量与断裂能统计;C: WT 组和 T1DM 组正常和愈合皮肤宏观拉伸检测松弛曲线;D:松弛率差异统计;E:AFM 测得 WT 组和 T1DM 组正常和愈合皮肤杨氏模量空间分布;F:AFM 检测杨氏模量数值大小分布;G:AFM 检测 WT 组和 T1DM 组正常和愈合皮肤粘附力空间分布;H:AFM 测得粘附力数值大小分布;I:WT 组和 T1DM 组正常和愈合皮肤的 AFM 检测松弛曲线;J:松弛时间统计

图 3 I 型糖尿病小鼠背部皮肤力学性能情况



A:SEM 扫描 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤胶原纤维形貌;B:SEM 胶原纤维与水平线夹角分布;C:AFM 扫描 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤胶原纤维形貌;D:AFM 胶原与水平线夹角分布

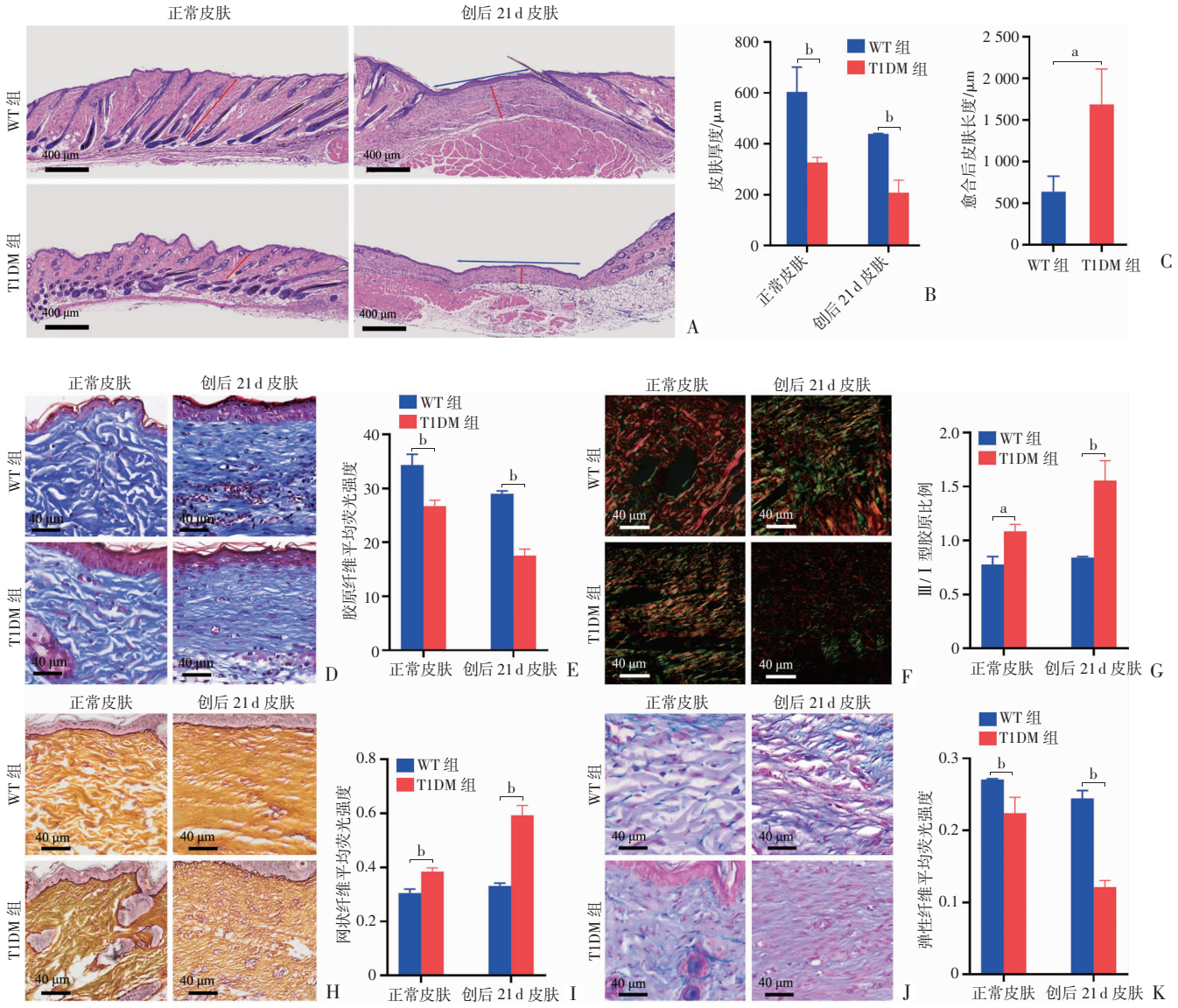
图 4 Ⅰ型糖尿病对小鼠正常和愈合后皮肤微观结构的影响

2.4 皮肤组织病理学的改变

HE 染色结果显示,与 WT 组比较,T1DM 组皮肤厚度在正常和愈合状态下均减小,同时 T1DM 组愈合后皮肤长度更长,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 5A~C)。马松染色结果发现,T1DM 组未愈合和愈合的皮肤胶原纤维含量较 WT 组相比均减少,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 5D、E)。天狼星红染色结果显示,T1DM 组皮肤在正常代谢和伤口愈合过程中Ⅲ型胶原蛋白/Ⅰ型胶原蛋白比例增加,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5F、G)。Gordon-Sweets 染色结果显示,T1DM 组皮肤网状纤维蛋白含量在正常和创伤后状态下均增多,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 5H、I)。通过维多利亚蓝检测法观察到,T1DM 组在正常和愈合后皮肤中弹力纤维含量均减少,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 5J、K)。

2.5 糖尿病皮肤愈合过程中细胞外基质改变

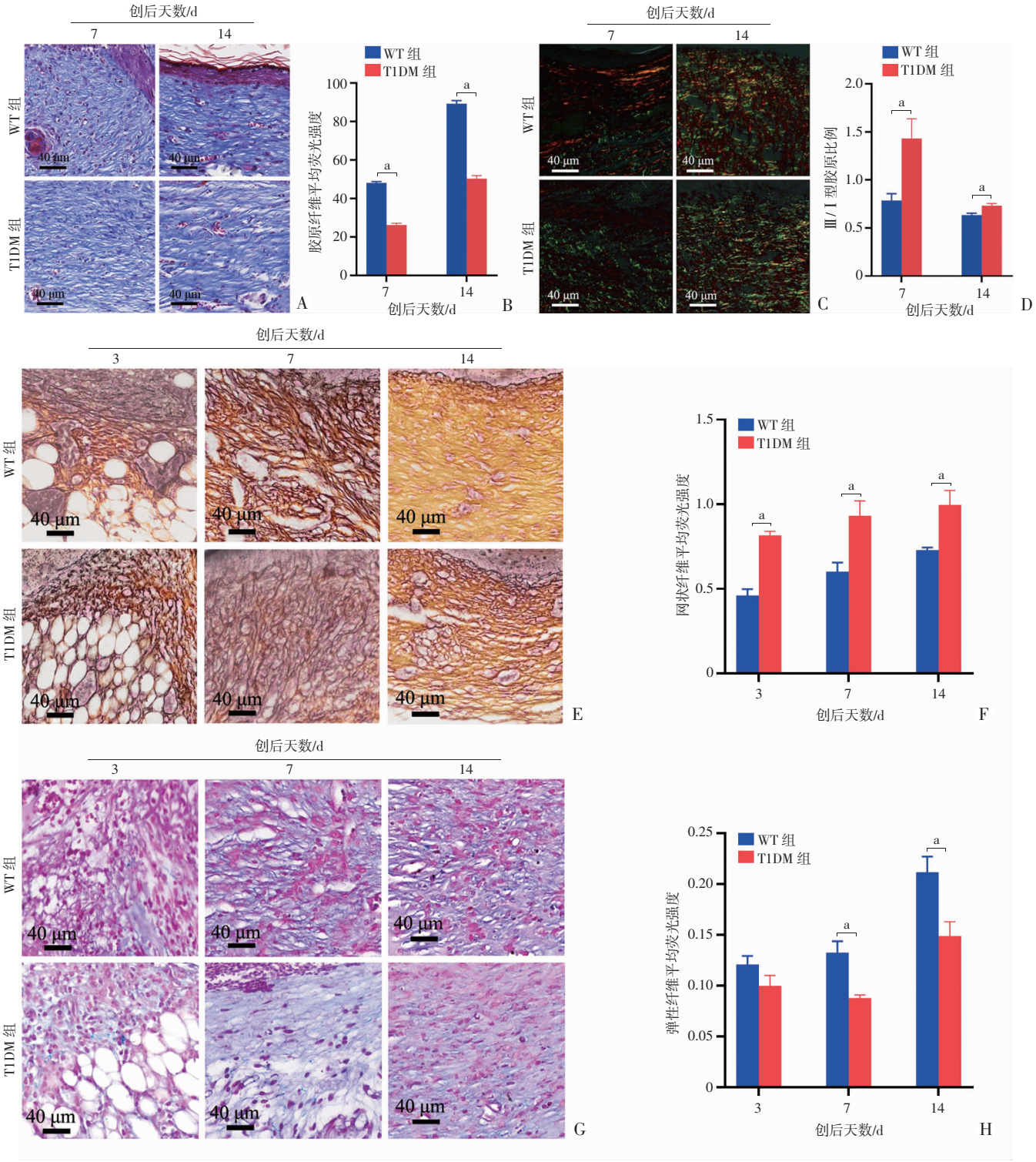
马松染色结果表明,在愈合过程中,T1DM 组胶原纤维生成减少,与 WT 组相比差异具有统计学意义(图 6A、B,$P<0.01$)。天狼星红染色结果显示,在创面修复过程中,与 WT 组相比,T1DM 组新生的Ⅲ型胶原蛋白/Ⅰ型胶原蛋白比例增加,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6C、D)。Gordon-Sweets 染色结果显示,T1DM 组网状纤维在愈合过程中出现异常增多,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6E、F)。维多利亚蓝染色发现,与 WT 组相比,T1DM 组弹性蛋白在造创后 3 d 时生成变化不大,在第 7 天和 14 天弹性蛋白含量显著减少,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6G、H)。



a:$P<0.05$;b:$P<0.01$

A:WT 组与 T1DM 组小鼠背部正常皮肤和愈合后皮肤切片 HE 染色情况;B:皮肤厚度统计;C:愈合后皮肤长度统计;D:WT 组与 T1DM 组小鼠背部正常皮肤和愈合后皮肤切片马松染色观察;E:胶原纤维含量统计;F:WT 组与 T1DM 组小鼠背部正常皮肤和愈合后皮肤切片天狼星红染色观察;G:Ⅲ型胶原与Ⅰ型胶原比例统计;H:WT 组与 T1DM 组小鼠背部正常皮肤和愈合后皮肤切片 Gordon-Sweets 染色观察;I:网状纤维统计;J:WT 组与 T1DM 组小鼠背部正常皮肤和愈合后皮肤切片维多利亚蓝染色观察;K:弹性纤维统计

图 5 Ⅰ型糖尿病小鼠正常和愈合后纤维比例变化情况



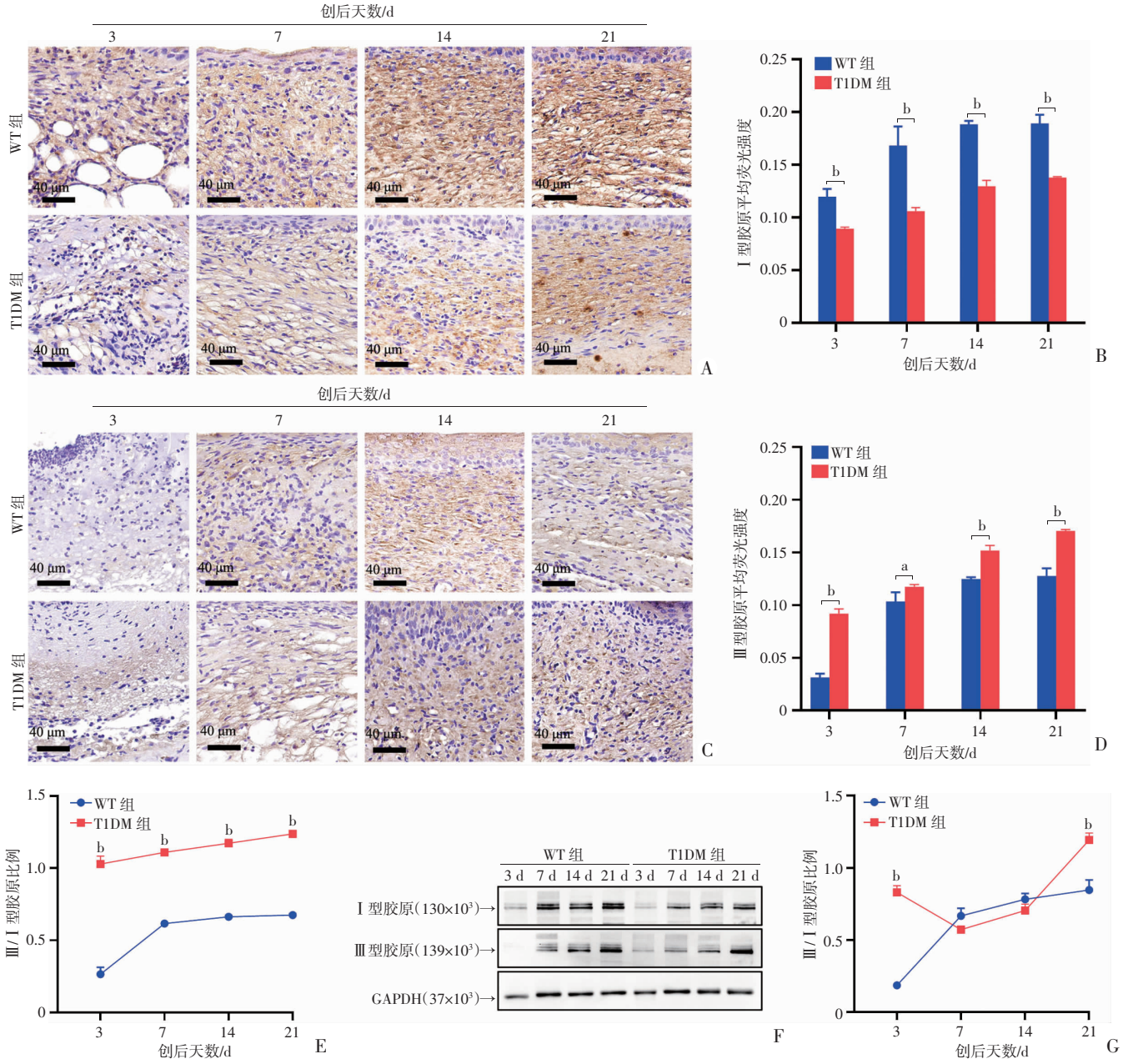
a:$P<0.01$

A:WT 组与 T1DM 组小鼠背部愈合过程中皮肤切片马松染色观察;B:胶原纤维含量统计;C:WT 组与 T1DM 组小鼠背部愈合过程中皮肤切片天狼星红染色观察;D:Ⅲ型胶原与Ⅰ型胶原比例统计;E:WT 组与 T1DM 组小鼠背部愈合过程中皮肤切片 Gordon-Sweets 染色观察;F:网状纤维统计;G:WT 组与 T1DM 组小鼠背部愈合过程中皮肤切片维多利亚蓝染色观察;H:弹性纤维统计

图 6 Ⅰ型糖尿病愈合过程中纤维比例改变

2.6　糖尿病对伤口胶原蛋白生成的影响

免疫组织化学染色结果显示,愈合过程中各时间点内 T1DM 组相较于 WT 组,其Ⅰ型胶原蛋白含量减少,Ⅲ型胶原蛋白含量增多,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 7A~E)。蛋白质免疫印迹检测结果显示,在造创后 3 d 和 21 d,T1DM 组Ⅲ型胶原蛋白/Ⅰ型胶原蛋白比例增加,造创后 7 d 和 14 d Ⅲ型胶原蛋白/Ⅰ型胶原蛋白比例差异无统计学意义,造创后 3 d 和 21 d Ⅲ型胶原蛋白/Ⅰ型胶原蛋白比例差异具有统计学意义($P<0.01$,图 7F、G)。



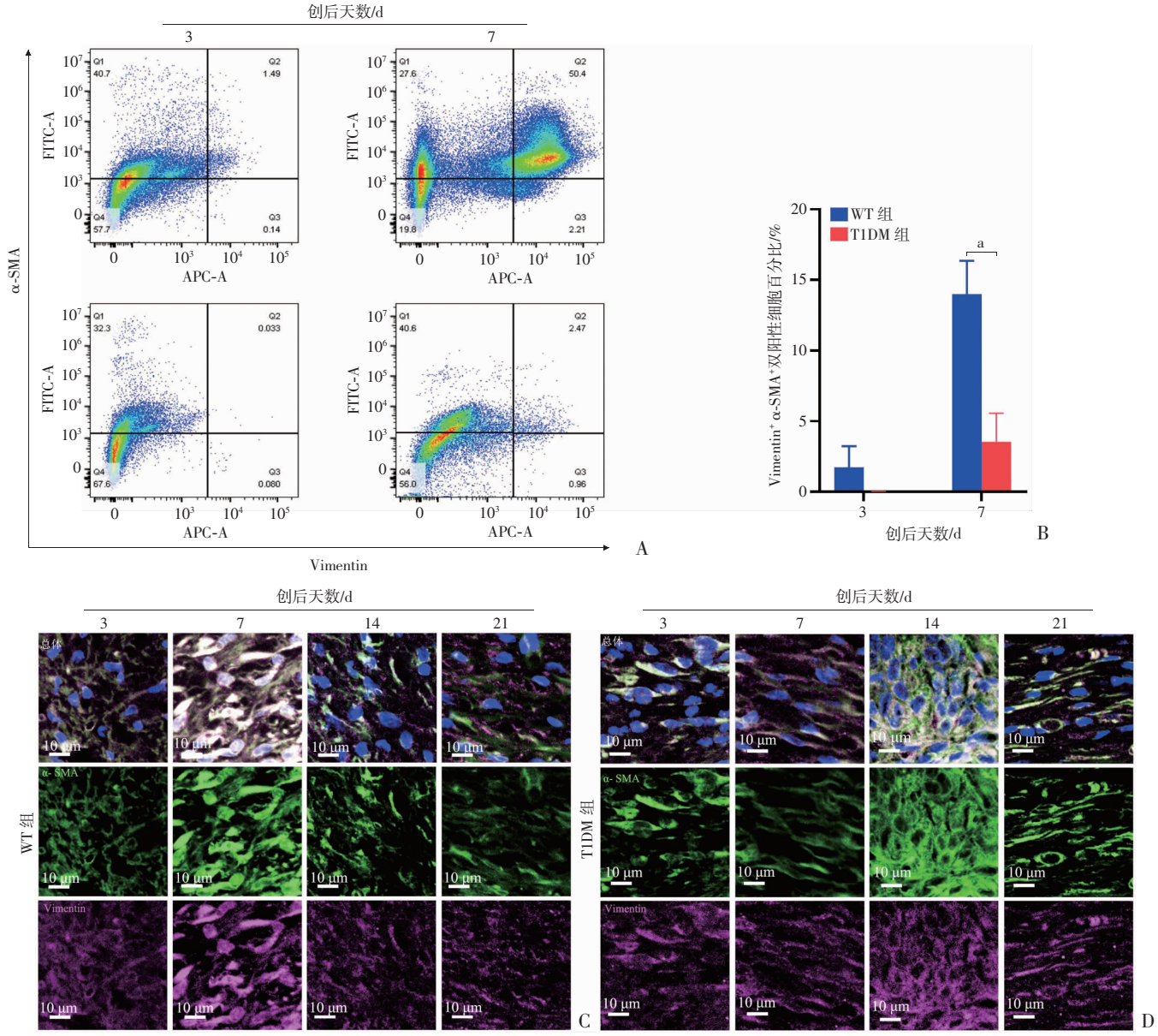
a:$P<0.05$;b:$P<0.01$

A:各时间点 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤切片Ⅰ型胶原免疫组织化学染色观察;B:Ⅰ型胶原蛋白含量统计;C:各时间点 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤切片Ⅲ型胶原免疫组织化学染色观察;D:Ⅲ型胶原蛋白含量统计;E:免疫组织化学染色Ⅲ型胶原与Ⅰ型胶原比例统计;F:蛋白质免疫印迹检测 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原表达;G:蛋白质免疫印迹Ⅲ型胶原与Ⅰ型胶原比例统计

图 7　Ⅰ型糖尿病小鼠皮肤中胶原蛋白比例改变

2.7　Ⅰ型糖尿病对皮肤肌成纤维细胞比例的影响

流式细胞术结果显示,在造创后 7 d,与 WT 组相比,T1DM 组创面边缘组织 Vimentin$^+$和 α-SMA$^+$双阳性所代表的肌成纤维细胞比例减少(图 8A)。造创后 3 d 肌成纤维细胞比例差异无统计学意义,造创后 7 d 肌成纤维细胞比例差异具有统计学意义(P<0.01,图 8B)。免疫组织荧光染色结果显示,在造创后 3 d,T1DM 组表达 α-SMA$^+$的细胞量减少,表达 Vimentin$^+$的细胞量无明显变化。在造创后 7 d,T1DM 组表达 α-SMA$^+$的细胞量和表达 Vimentin$^+$的细胞量均减少。在造创后 14 d,T1DM 组表达 α-SMA$^+$的细胞量和表达 Vimentin$^+$的细胞量反而增多,在造创后 21 d,T1DM 组表达 α-SMA$^+$的细胞量增多,而表达 Vimentin$^+$的细胞量无明显变化(图 8C、D)。各时间点 α-SMA$^+$细胞量差异具有统计学意义(P<0.01,图 8E)。在造创后 3 d 与 21 d 的 Vimentin$^+$细胞量差异无统计学意义,造创后 7 d 与 14 d 的 Vimentin$^+$细胞量差异具有统计学意义(P<0.01,图 8F)。

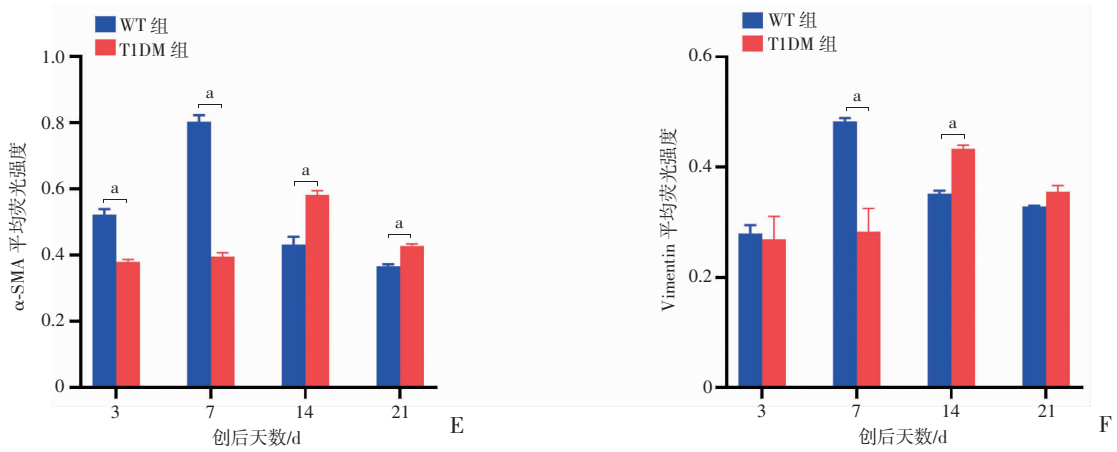


a: P<0.01

A:各时间点 WT 组与 T1DM 组小鼠背部皮肤流式细胞术检测结果;B:肌成纤维细胞比例统计;C:WT 组小鼠背部皮肤免疫荧光染色观察;D:T1DM 组小鼠背部皮肤免疫荧光染色观察

图 8　Ⅰ型糖尿病皮肤肌成纤维细胞表达情况

(图 8E、F 续下页)



a: $P<0.01$

E:α-SMA$^+$细胞量统计;F:Vimentin$^+$细胞量统计

续图 8 Ⅰ型糖尿病皮肤肌成纤维细胞表达情况

3 讨论

本研究通过力学测试、高分辨率成像及组织学检测,评估了Ⅰ型糖尿病对小鼠背部皮肤生物力学完整性和伤口愈合能力的负面影响。研究结果显示,糖尿病患者伤口愈合时间明显延长,主要因肉芽组织在初期生成不足,导致伤口难以恢复稳固状态[6]。这一发现对临床治疗和护理具有参考价值,展示出糖尿病对伤口愈合机制的影响。此外,采用平行于皮肤平面的冰冻切片技术,本研究发现糖尿病小鼠皮肤在宏观与微观力学层面均显著弱化,表现为刚度、粘附力、弹性及回弹性等参数的全面下降。此现象在正常与愈合皮肤中也得到验证,强调了皮肤脆弱是糖尿病的普遍并发症,这种皮肤脆弱特性不仅限于创伤愈合过程,也存在于正常皮肤中[7-9]。本研究通过精准量化手段对糖尿病相关生物力学变化进行客观展示,高分辨率成像的结果显示,糖尿病皮肤中的胶原纤维分布更加紊乱,微观结构的生成存在缺陷,这些改变导致了糖尿病皮肤的机械性能减弱。本研究通过对皮肤微观结构进行量化评估,直观展示了糖尿病所致胶原蛋白失调及皮肤脆弱[6,10]。这些发现进一步印证了糖尿病皮肤的病理机制,并有希望为糖尿病治疗方案的制定提供新的方向[11]。

组织病理切片实验数据显示,糖尿病能使皮肤细胞外基质失调,包括胶原蛋白耗竭、Ⅲ型胶原纤维异常积聚等,这些变化共同导致皮肤机械基础结构的退化。本研究将基质组成变化与功能衰退直接联系起来,更深层次地解释了糖尿病皮肤病理机制,从病理学角度为糖尿病皮肤并发症治疗提供了新的视角[12]。未来研究可聚焦于基质病理机制及调节基质周转平衡的治疗策略[13]。本研究结果与先前文献一致,阐述了糖尿病病理状态下胶原亚型异常累积对伤口愈合的负面影响,尤其是Ⅲ型胶原蛋白的持续存在导致的皮肤机械性能弱化[14]。皮肤机械性能变化与弹性纤维、网状纤维生成异常相结合,为理解糖尿病伤口愈合障碍提供了新的视角。未来需深入探索基质成熟受阻及组织功能恢复不全的病理生理机制[15-17]。糖尿病伤口愈合初期肌成纤维细胞数量显著减少,这与伤口闭合延迟直接相关。这些结果建立了早期细胞化功能障碍与整体组织修复缺陷之间的联系[18-19]。未来研究应进一步探讨基质稳态、细胞因子信号网络及细胞动员机制的相互作用,从而全面揭示糖尿病伤口愈合障碍的分子与细胞基础。

综上所述,本研究从生物力学、组织基质和细胞层面揭示了Ⅰ型糖尿病导致皮肤脆弱和伤口愈合功能障碍的复杂机制,并提出了多种潜在的治疗途径。这些途径包括使用生物材料和技术重建皮肤机械耐久性、促进胶原蛋白亚型更替以及加速伤口成纤维细胞转化等[20-22]。然而,本研究也存在一些局限性,首先,本研究评估皮肤愈合质量的方法是有创性的,如何在糖尿病患者病损处原位无创性分析预估皮肤性能变化,从而在溃疡出现之前确定预防性疗法仍有待探索[23-26]。其次,弹性成像等新兴技术可将组织生物力学与糖化血红蛋白等指标联系起来,对患者进行风险分级[27-29]。此外,由于本研究只关注了Ⅰ型糖尿病模型,没有对Ⅱ型糖尿病的影响和性别差异进行比较研究。尽管一

些临床数据表明Ⅱ型糖尿病皮肤变化不明显[30-31],但对皮肤微观结构进行定量分析仍有必要。未来工作可考虑聚焦于以下几个方面:一是开发无创性评估技术,对糖尿病患者皮肤性能进行实时监测;二是进行更广泛的比较研究,包括不同类型糖尿病及性别差异对皮肤健康的影响;三是探索糖尿病代谢、血管和炎症并发症对皮肤功能的潜在影响,为制定综合治疗方案提供科学依据。未来可进一步加强组织工程和生物材料技术在糖尿病皮肤健康管理中的应用,从而改善患者预后和生活质量。

参考文献:

[1] KIMURA S, TSUJI T. Mechanical and immunological regulation in wound healing and skin reconstruction[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5474. DOI: 10.3390/ijms22115474.

[2] SINGH G, CHANDA A. Biomechanical modeling of progressive wound healing: a computational study[J]. Biomed Eng Adv, 2022, 4: 100055. DOI: 10.1016/j.bea.2022.100055.

[3] TIKHONOVA I V, GRINEVICH A A, TANKANAG A V, *et al*. Skin microhemodynamics and mechanisms of its regulation in type 2 diabetes mellitus[J]. Biophysics, 2022, 67(4): 647-659. DOI: 10.1134/S0006350922040200.

[4] BOURDELY P, PETTI L, KHOU S, *et al*. Autofluorescence identifies highly phagocytic tissue-resident macrophages in mouse and human skin and cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Front Immunol, 2022, 13: 903069. DOI: 10.3389/fimmu.2022.903069.

[5] JIANG Y N, ZHANG X, ZHANG W, *et al*. Infant skin friendly adhesive hydrogel patch activated at body temperature for bioelectronics securing and diabetic wound healing[J]. ACS Nano, 2022, 16(6): 8662-8676. DOI: 10.1021/acsnano.2c00662.

[6] ANDRIOTIS O G, NALBACH M, THURNER P J. Mechanics of isolated individual collagen fibrils[J]. Acta Biomater, 2023, 163: 35-49. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.12.008.

[7] LIAO B Y, OUYANG Q Y, SONG H Q, *et al*. Characteristic analysis of skin keratinocytes in patients with type 2 diabetes based on the single-cell levels[J]. Chin Med J, 2022: 2461-2466. DOI: 10.1097/cm9.0000000000002323.

[8] VAZQUEZ-ZAPIEN G J, MARTINEZ-CUAZITL A, GRANADOS-JIMENEZ A, *et al*. Skin wound healing improvement in diabetic mice through FTIR microspectroscopy after implanting pluripotent stem cells[J]. APL Bioeng, 2023, 7(1): 016109. DOI: 10.1063/5.0130383.

[9] PENSALFINI M, TEPOLE A B. Mechano-biological and biomechanical pathways in cutaneous wound healing[J]. PLoS Comput Biol, 2023, 19(3): e1010902. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1010902.

[10] DAVID P, SINGH S, ANKAR R. A comprehensive overview of skin complications in diabetes and their prevention[J]. Cureus, 2023, 15(5): e38961. DOI: 10.7759/cureus.38961.

[11] ANDRZEJCZAK A, WITKOWICZ A, KUJAWA D, *et al*. NGS sequencing reveals new *UCP*1 gene variants potentially associated with MetS and/or T2DM risk in the Polish population—a preliminary study[J]. Genes, 2023, 14(4): 789. DOI: 10.3390/genes14040789.

[12] GUPTA R, PRIYA A, CHOWDHARY M, *et al*. Pigmented skin exhibits accelerated wound healing compared to the nonpigmented skin in guinea pig model[J]. iScience, 2023, 26(11): 108159. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108159.

[13] ŽNIDARIC M, ŠKRINJAR D, KAPEL A. Electrodermal activity and heart rate variability for detection of peripheral abnormalities in type 2 diabetes: a review[J]. Biomol Biomed, 2023, 23(5): 740-751. DOI: 10.17305/bb.2022.8561.

[14] ALEX L, TULETA I, HANNA A, *et al*. Diabetes induces cardiac fibroblast activation, promoting a matrix-preserving nonmyofibroblast phenotype, without stimulating pericyte to fibroblast conversion[J]. J Am Heart Assoc, 2023, 12(6): e027463. DOI: 10.1161/JAHA.122.027463.

[15] GHARGE S, ALEGAON S G. Recent studies of nitrogen and sulfur containing heterocyclic analogues as novel antidiabetic agents: a review[J]. Chem Biodivers, 2024, 21(2): e202301738. DOI: 10.1002/cbdv.202301738.

[16] AGIUS R, FORMOSA C, SILLATO D, *et al*. A biomechanical investigation of children with type 1 diabetes mellitus: are children's feet a precursor to adulthood foot complications?[J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2023, 113(6): 21-134. DOI: 10.7547/21-134.

[17] SEISER S, ARZANI H, AYUB T, *et al*. Native human and mouse skin infection models to study *Candida auris*-host interactions[J]. Microbes Infect, 2024, 26(1/2): 105234. DOI: 10.1016/j.micinf.2023.105234.

[18] ABU-TOAMIH-ATAMNI H J, LONE I M, BINENBAUM I, *et al*. Mapping novel QTL and fine mapping of previously identified QTL associated with glucose tolerance using the collaborative cross mice[J]. Mamm Genome, 2024, 35(1): 31-55. DOI: 10.1007/s00335-023-10025-0.

[19] LIN Z, LI L Y, CHEN L, *et al*. Lonicerin promotes wound healing in diabetic rats by enhancing blood vessel regeneration through Sirt1-mediated autophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(4): 815-830. DOI: 10.1038/s41401-023-01193-5.

[20] HUFFER A, OZDEMIR T. Substrate stiffness regulates type II diabetic fibroblast phenotype and metabolic activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 709: 149833. DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.149833.

[21] PURWANTI O S, NURSALAM N, PANDIN M G R. Early detection of diabetic neuropathy based on health belief model: a scoping review[J]. Front Endocrinol, 2024, 15: 1369699. DOI: 10.3389/fendo.2024.1369699.

[22] YANG R H, LIU F X, WANG J R, *et al*. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 229. DOI: 10.1186/s13287-019-1312-z.

[23] KIM J H, YOON N Y, KIM D H, *et al*. Impaired permeability and antimicrobial barriers in type 2 diabetes skin are linked to increased serum levels of advanced glycation end-product[J]. Exp Dermatol, 2018, 27(8): 815-823. DOI: 10.1111/exd.13466.

[24] WAASDORP M, DUITMAN J, FLORQUIN S, *et al*. Protease-activated receptor-1 deficiency protects against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice[J]. Sci Rep, 2016, 6: 33030. DOI: 10.1038/srep33030.

[25] POODINEH J, KHAZAEI FEIZABAD A, NAKHAEE A. Antioxidant activities of *Caralluma tuberculata* on streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Drug Dev Res, 2015, 76(1): 40-47. DOI: 10.1002/ddr.21239.

[26] MILLER J D, NAJAFI B, ARMSTRONG D G. Current standards and advances in diabetic ulcer prevention and elderly fall prevention using wearable technology[J]. Curr Geriatr Rep, 2015, 4(3): 249-256. DOI: 10.1007/s13670-015-0136-7.

[27] WATT G P, DE LA CERDA I, PAN J J, *et al*. Elevated glycated hemoglobin is associated with liver fibrosis, as assessed by elastography, in a population-based study of Mexican Americans[J]. Hepatol Commun, 2020, 4(12): 1793-1801. DOI: 10.1002/hep4.1603.

[28] HARRISON S A, RATZIU V, BOURSIER J, *et al*. A blood-based biomarker panel (NIS4) for non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: a prospective derivation and global validation study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(11): 970-985. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30252-1.

[29] MANTOVANI A, CSERMELY A, CASTAGNA A, *et al*. Associations between higher plasma ferritin and hepcidin levels with liver stiffness in patients with type 2 diabetes: an exploratory study[J]. Liver Int, 2023, 43(11): 2434-2444. DOI: 10.1111/liv.15649.

[30] KNAS M, WOŁOSIK K, ZALEWSKA A, *et al*. The skin remodeling in type 1 diabetes and insulin resistance animal models[J]. Physiol Res, 2015, 64(6): 875-881. DOI: 10.33549/physiolres.932991.

[31] ZHANG J J, ZHOU R, XIANG C P, *et al*. Huangbai liniment accelerated wound healing by activating Nrf2 signaling in diabetes[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4951820. DOI: 10.1155/2020/4951820.

(**收稿**:2024-07-04;**修回**:2024-08-21)

(编辑 张艺霖)