

# 糖尿病创面愈合与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子关系的研究

李斌 吴晓勇 徐丽红 黄伟琪 王健 邓海涛 沈耀明 方勇

**【摘要】** 目的 探讨糖尿病创面愈合与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的关系。方法 70 只 C57BL/6 小鼠分为野生小鼠组(对照组, n=35)和糖尿病模型组(DM 组, n=35)。腹腔麻醉后在背部中线两侧各制作 0.8cm×0.8cm 创面。创面动态摄像并于相应时间段取标本,观察创面组织愈合情况,同时计算创面愈合率;ELISA 法测定创面 GM-CSF 表达,显微镜下观察各组创面免疫细胞数目。结果 创面形成后第 3 天起,DM 组小鼠创面愈合率较对照组明显下降,以创面形成后 7d 内变化最为明显;创面形成后第 1 天,两组小鼠创面 GM-CSF 表达均明显增高;创面形成后第 1 天和第 3 天,对照组小鼠创面 GM-CSF 表达显著高于 DM 组。2 组动物在伤后第 5 天,T 淋巴细胞均达到峰值,DM 组显著低于对照组,7~14 天 DM 组稍高于对照组。结论 GM-CSF 的低表达则可能与创面愈合早期炎症细胞浸润减少有关。

**【关键词】** 糖尿病 创面愈合 粒-巨噬细胞集落刺激因子

**To study the relationship between wound healing of diabetes mellitus and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor** Li Bin, Wu Xiaoyong, Xu Lihong, et al. Department of Burns & Plastic Surgery, Jiangyin Municipal People's Hospital Southeast University, Jiangyin City Jingsu province, Jiangsu 214400

**【Abstract】 Objective** To study the relationship between wound healing of diabetes mellitus and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Methods** Seventy C57BL/6 mice were obtained and divided into control group (n=35) and DM group (n=35). All mice were received full thickness skin wound (0.8cm×0.8cm) in each side of midline after deep anesthesia. The wound sites were digitally photographed to calculate the percentage of wound closure using computer image analysis software in different time points post-injury. The content of GM-CSF in the wound sample was measured by ELISA. **Results** The analysis of wound closure showed that wound healing in DM mice was significantly delayed compared with that in the control mice from the third day post-injury. In the DM mice, the levels of GM-CSF expression were increased markedly from the first day post-injury and declined to lower levels in the two groups. At the first day and third day post-injury, GM-CSF levels in DM mice were significantly lower than those in the control mice. **Conclusion** The delayed wound closure in DM mice may be lower expression of GM-CSF in wound site.

**【Key words】** Diabetes mellitus Wound healing Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

创面愈合是炎症细胞、修复细胞细胞外基质以及细胞因子共同参与并高度协调相互调控的复杂过程,任何一个环节的失控均有可能导致创面修复不良,糖尿病创面延迟愈合的机制一直是近年来的研究热点。目前已经证实<sup>[1]</sup>,糖尿病的微血管病变、周围神经性病变是糖尿病创面难愈的病理基础。因炎症细胞在修复中发挥着极为重要的作用,而粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是重要的炎症细

胞趋化和活化因子<sup>[2]</sup>,由于 GM-CSF 是炎症细胞的趋化因子和激活因子,而炎症细胞是 GM-CSF 的靶细胞,故我们认为,GM-CSF 在调控修复细胞和炎症细胞的相互作用方面可能起到了一定作用。本实验通过检测糖尿病小鼠模型创面的 GM2CSF 表达,初步探讨其在糖尿病创面延迟愈合中的可能作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及分组** 雌性 C57BL/6 小鼠 70 只,8~10 周龄,体质量 19~22g,东南大学整形外科研究所提供。

## 1.2 模型制备

**1.2.1 分组模型制作** 70 只小鼠分成糖尿病模型组(DM 组, n=35)和野生小鼠组(对照组, n=35)。

▲本研究为东南大学附属江阴医院立项课题。

作者单位:214400 江苏省江阴市,东南大学附属江阴医院整形烧伤科(李斌、吴晓勇、徐丽红、黄伟琪、王健、邓海涛、沈耀明);上海交通大学医学院第三人民医院烧伤整形科(方勇)

组:小鼠腹腔内无菌注射无菌柠檬酸缓冲液配成 0.55% STZ 溶液( Sigma )(0.1ml/10g, 每日 1 次, 连续 6 日)。注射前及注射停止后 1 周经尾静脉采血测定血糖。若诱导剂注射前基础血糖<8.9mmol/L, 诱导后血糖≥11.2mmol/L, 同时小鼠体重明显下降, 随机抽样的胰腺组织学观察证实胰岛细胞被破坏, 即可视为糖尿病模型诱导成功。②对照组:小鼠腹腔内给予与 DM 组同等量的 PBS 液体注射。

1.2.2 创面模型制作 糖尿病小鼠模型诱导建立后, 3%戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔注射麻醉, 背部剃毛, 用碘叮消毒两遍, 在背部中线两侧(间距 1cm 以上)各切除 0.8cm×0.8cm 全层皮肤, 创面不予缝合, 分笼饲养。

1.3 检测项目

1.3.1 标本采集 于创面形成后第 1、3、5、7、10、14 天时, 两组随机各取动物 5 只, 创面用数码相机摄影, 然后处死动物, 取创面标本。

1.3.2 计算创面愈合率 计算机分析数码相机所拍摄图像, 并按以下公式计算创面愈合率。创面愈合率=(创面初始面积-创面形成后第 n 天的面积)/创面初始面积×100%。

1.3.3 GM-CSF 表达检测 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA 法)分别测定两组小鼠不同时间段创面组织中 GM-CSF 的表达。按试剂盒(R&D)说明书进行操作。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件包进行统计学分析。所有计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行 t 检验。P<0.05 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 创面愈合率 从创面形成后第 3 天, DM 组和对照组动物创面愈合率即出现明显差异(49.88% vs 72.01%, P<0.01); 创面形成后第 7 天, 两组创面愈合率差异最为明显(57.73% vs 96.01%, P<0.01); 创面形成后第 10 天, 对照组小鼠创面已经基本愈合(98.00%), 而 DM 组仍未愈合(78.75%); 创面形成后第 14 天, 创面愈合率对照组已达 100%, 而 DM 组为 92.75%(见图 1)。

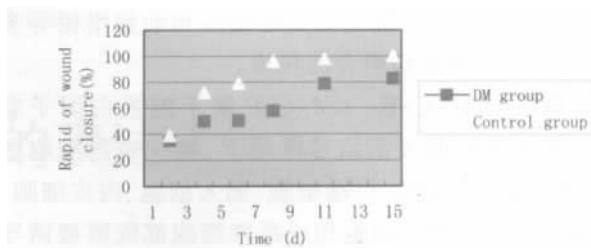


图 1 两组动物创面愈合率的变化

2.2 创面 GM-CSF 表达变化 两组动物创面 GM-CSF 表达均于创面形成后第 1 天即有明显增高。对照组第 1 天即达到峰值, 而 DM 组则在第 3 天达到峰值; 第 14 天两组动物创面的 GM-CSF 表达仍维持较高水平。创面形成后第 1 天和第 3 天, 对照组的 GM-CSF 表达均明显高于 DM 组(P<0.01); 自第 5 天起, 两组动物的 GM-CSF 表达显示无明显差异(P>0.05)(见图 2)。

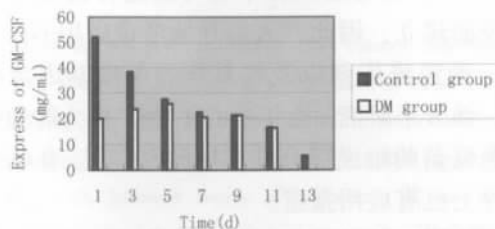


图 2 两组动物创面 GM-CSF 表达的变化

2.3 创面 T-cells 数目对比 二组动物在伤后第五天, T 淋巴细胞均到达峰值, DM 组显著低于对照组, 7~14 天 DM 组稍高于对照组。

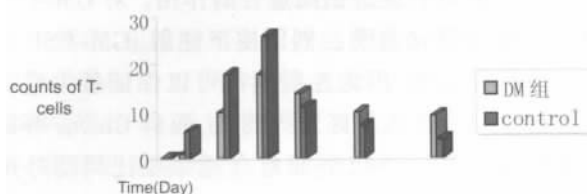


图 3 二组动物创面 T 细胞数量的变化

3 讨论

3.1 目前认为糖尿病创面延迟愈合的主要原因血管、神经和血糖等多重因素导致细胞增殖受抑和胶原代谢障碍, 由于创面生长是由多细胞参与完成, 单方向作用生长因子并不能促进糖尿病创面愈合, 已逐渐成为共识。因此, 本实验将研究转向多方向作用

的细胞因子, 希望从免疫炎症反应和细胞增殖等多重方向探讨糖尿病愈合的规律。

**3.2 有关 GM-CSF** GM-CSF 属于糖蛋白因子家族, 其在特有的激活信号作用下, 被一系列细胞所合成分泌。T 细胞、巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞、软骨细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞都能够被诱导分泌 GM-CSF 蛋白。其中, T 细胞和巨噬细胞可直接在免疫应答或炎症介质刺激过程中被激活分泌, 而内皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞和平滑肌细胞则需要经细胞因子如 IL-1 和 TNF 的诱导才能分泌<sup>[3]</sup>。另外, 在正常状况下, 血循环中 GM-CSF 的浓度极低甚至难以检测到, 但在 LPS 等物质的刺激下, 其浓度可显著升高<sup>[4]</sup>。创面上的 GM-CSF 来源于上皮细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞以及炎症细胞(如 PMN 和 M $\phi$ ), 通过自分泌作用并作用于这些细胞。实验证明, GM-CSF 在免疫反应中它可促进体液免疫及细胞免疫的建立, 因此, 人们开始考虑应用 GM-CSF 作为一种免疫佐剂以及将其作为免疫基因治疗途径的一部分来研究。近年来 GM-CSF 作为肿瘤疫苗和细胞疫苗的组成部分发挥抗肿瘤作用, 在临床肿瘤治疗上已有应用报道。

**3.3 GM-CSF 与糖尿病创面的愈合** Da Costa 等人于 1994 年第一次报道局部创周注射应用 rHuGM-CSF 来治疗 3 例慢性下肢难愈创面<sup>[5]</sup>。之后, Da-Costa 等<sup>[6]</sup> 又对 rHuGM-CSF 的剂量范围进行了研究。除了这些实验研究之外, 大量的临床病例也报道 GM-CSF 具有促进创面愈合的作用。对 GM-CSF 使用途径的研究表明, 创周皮下注射 rGM-CSF 比局部外敷更有效, 因为注射途径可以保证大量的药物转运及渗透入创区发挥药效, 而且 Groves 等认为创周注射途径不仅创面愈合速率要比局部外用快, 而且用药剂量更加容易标准化。糖尿病患者(无论是否伴有感染的存在)中性粒细胞功能的受损导致了创面的延迟愈合, Canturk 等通过对实验糖

尿病鼠的切口模型全身应用 GM-CSF 随机对照实验结果显示: 糖尿病鼠的中性粒细胞计数下降, GM-CSF 治疗组中性粒细胞计数及其吞噬功能明显增高。糖尿病鼠创区羟脯氨酸的水平明显低于用药组, 表明 GM-CSF 对于创面愈合有促进作用, 且对于患有糖尿病等全身疾病伴发的难愈创面有促进作用。Remes 等<sup>[7]</sup>观察临床两位因糖尿病脂性渐进性坏死导致下肢慢性迁延不愈创面的胰岛素依赖型糖尿病患者, 在溃疡局部连续应用 rHuGM-CSF 后 10 周创面愈合, 从而推论局部应用 GM-CSF 可能是治疗糖尿病患者伴发慢性迁延不愈创面的一种有效方法。本实验亦证明 GM-CSF 对创面恢复有利。

#### 参 考 文 献

- 1 Claxton MJ, Armstrong DG, Boulton AJ, et al. Healing the diabetic wound and keeping it healed: modalities for the early 21st century[J]. *CurrDiab Rep*, 2002, 2(6):510-518
- 2 Middleton M, Thatcher N. G2 and GM-CSF [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 1998, 10(2):91-93
- 3 Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*, 2002, 23:403-408
- 4 Hamilton JA, Anderson GP. GM2CSF biology. *Growth Factors*, 2004, 22:225-231
- 5 Groves RW, Schmidt Lucke JA. Recombinant human GM2CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care*, 2000, 13:107-112
- 6 Da Costa RM, Ribeiro Jesus FM, Aniceto C, et al. Randomized, double-blind, placebo controlled, dose ranging study of granulocyte macrophage colony stimulating factor in patients with chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*, 1999, 7:17-25
- 7 Remes K, Ronnema T. Healing of chronic leg ulcers in diabetic necrobiosis lipoidica with local granulocyte macrophage colony stimulating factor treatment. *J Diabetes Complications*, 1999, 13: 115-118

(收稿: 2008-08-14)