

论著·基础研究

ATP 代谢及嘌呤信号受体在糖尿病创面愈合炎症反应阶段的变化

王 齐^{1*}, 朱冠娅^{2*}, 谢 挺¹, 葛 奎¹, 牛轶雯³

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院急诊科, 上海 200011; 2. 广东省惠州市中心人民医院烧伤外科, 惠州 516001; 3. 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形科, 上海市烧伤研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·探讨胞外腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 代谢及其相关指标在糖尿病创面损伤修复炎症反应阶段的变化。**方法**·将 96 只 C57BL/6J 小鼠随机分成 4 组, 每组 24 只, 包括正常空白对照组 (NC 组)、正常 ATP 干预组 (NA 组)、糖尿病空白对照组 (DC 组) 和糖尿病 ATP 干预组 (DA 组), 其中采用多次小剂量链脲佐菌素腹腔注射诱导 DC 组和 DA 组小鼠建立糖尿病模型。所有小鼠于背部制造全层皮肤缺损创面模型, 而后 NC 组和 DC 组小鼠的创面局部外用双蒸水处理, NA 组和 DA 组小鼠的创面局部外用 ATP 溶液处理。通过苏木精-伊红染色观察创面中性粒细胞浸润。采用酶联免疫吸附测定检测髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 含量, 超高效液相色谱-串联质谱法检测 ATP 及其代谢产物含量。利用免疫组织化学染色法观察 Connexin43、Pannexin1、CD39、P2X7 及 P2Y2 的阳性表达。通过计算创面愈合速率评估创面愈合速度。**结果**·①创面愈合炎症反应阶段, DC 组小鼠创缘组织 MPO 含量, 中性粒细胞浸润数量, ATP 含量, Connexin43、Pannexin1、CD39、P2X7 及 P2Y2 的表达量均低于 NC 组 (均 $P<0.05$)。②伤后第 14 日, DA 组小鼠创面愈合率明显高于 DC 组 ($P=0.000$)。**结论**·在糖尿病创面愈合炎症反应阶段, 炎症反应存在一定的不足, ATP、ATP 水解酶及嘌呤信号受体均呈低水平状态, 外源性补充 ATP 可在一定程度上加快糖尿病创面愈合速度。

[关键词] 糖尿病; ATP; 炎症反应; 创面愈合**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.01.002 **[中图分类号]** R644 **[文献标志码]** A

Changes of ATP metabolism and purinergic receptors in inflammatory response stage of diabetic wound healing

WANG Qi^{1*}, ZHU Guan-ya^{2*}, XIE Ting¹, GE Kui¹, NIU Yi-wen³

1. Department of Emergency, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Department of Burns Surgery, Huizhou Municipal Central Hospital, Guangdong Province, Huizhou 516001, China; 3. Shanghai Institute of Burn, Department of Burn & Plastic Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the changes of extracellular adenosine triphosphate (ATP) metabolism and its related indices of inflammatory response stage during diabetic wound healing. **Methods**·Ninety-six C57BL/6J mice were divided into 4 groups randomly, i.e. normal control group (NC, $n=24$), normal with ATP applied group (NA, $n=24$), diabetes control groups (DC, $n=24$), and diabetes with ATP applied group (DA, $n=24$). The mice in DA and DC group were induced by streptozocin multiple intraperitoneal injection. Full-thickness excisional wound was created on the dorsum of all mice. Distilled water was applied in NC and DC group. ATP was applied in NA and DA group. Hematoxylin and eosin staining (HE staining) was used to observe neutrophils infiltration. Myeloperoxidase deficiency (MPO) contents were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The contents of ATP and its metabolites in tissues of wound margin were detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Immunohistochemistry was utilized to investigate the expression of Connexin43, Pannexin1, CD39, P2X7 and P2Y2. Healing speed were assessed by the calculation of healing rate on each point. **Results**·① During the inflammatory response stage of wound healing, the MPO contents, neutrophils infiltration numbers, the ATP contents, and the expressions of Connexin43, Pannexin1, CD39, P2X7 and P2Y2 of mice in DC group were all lower than those in NC group (all $P<0.05$). ② On the 14th day after injury, the wound healing rate of mice in DA group was significantly higher than that in DC group ($P=0.000$). **Conclusion**·Inflammatory response is insufficient on the early stage of diabetic wound healing, while ATP, ATP hydrolase and purinergic receptor also remain at low level at the same time. To a certain extent, exogenous application of ATP can accelerate diabetic wound healing rate.

[Key words] diabetes mellitus; adenosine triphosphate (ATP); inflammation; wound healing**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81272111, 81671917); 上海市自然科学基金 (19ZR1432200)。**[作者简介]** 王 齐 (1990—), 女, 住院医师, 硕士; 电子信箱: 15021556851@163.com。朱冠娅 (1992—), 女, 住院医师, 硕士; 电子信箱: 15800399002@163.com。
* 为共同第一作者。**[通信作者]** 牛轶雯, 电子信箱: 13636489036@163.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81272111, 81671917); Natural Science Foundation of Shanghai (19ZR1432200)。**[Corresponding Author]** NIU Yi-wen, E-mail: 13636489036@163.com。

在糖尿病状态下,糖代谢紊乱可导致组织局部的微环境发生一定的变化。研究^[1]显示,糖尿病创面愈合过程中,慢性迁延的炎症反应和组织修复迟滞是其主要的病理特征。炎症反应阶段,创面中的炎症细胞(如中性粒细胞、巨噬细胞)的浸润数量及促炎功能均存在一定的不足^[2]。腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)是生理状态下维持细胞代谢功能的主要能量物质,在应激状态下也可被作为损伤信号分子释放到胞外以调控多种细胞效应^[3]。ATP通过激活嘌呤受体介导嘌呤信号,在炎症细胞的趋化、吞噬和分泌等过程中发挥重要的调控作用,从而参与创面的炎症反应^[4-5];由此推测,ATP代谢在创面愈合过程中与炎症反应密切相关。然而在糖尿病创面的炎症反应阶段,ATP代谢及嘌呤信号是否发生了改变?如若改变,其与糖尿病创面的迁延难愈是否存在一定联系?基于此,本研究通过观察在糖尿病创面愈合的炎症反应阶段,创面组织中ATP代谢、嘌呤信号的改变以及外源性应用ATP后对糖尿病创面愈合情况的影响,探索糖尿病创面炎症反应的转归机制及可能的干预策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

8周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 96 只[购自上海交通大学医学院附属瑞金医院实验动物科学部,动物生产许可证:SCXK(京)2016-0011],体质量为 20~25 g。该实验小鼠饲养于上海交通大学医学院附属瑞金医院实验动物科学部动物饲养室内的标准笼中,使用许可证:SYXK(沪)2011-0113。于 25℃、湿度 50%~60%、12 h 明暗交替条件下,小鼠自由进食、饮水。动物饲养条件符合实验动物管理条例,所有动物相关操作均遵循国家及上海交通大学医学院附属瑞金医院实验动物科学部有关动物伦理规定及条例。

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司),3M 透明敷料(美国 3M 公司),免疫组织化学试剂盒、DAB 显色液(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 分组及糖尿病小鼠模型建立 96 只雄性 C57BL/6J 小鼠被随机分为 4 组,包括糖尿病空白对照组(DC 组)、糖尿病 ATP 干预组(DA 组)、正常空白对照组(NC 组)和正常 ATP 干预组(NA 组),每组 24 只;其中 DC 组和 DA 组小鼠按照文献^[6]建立糖尿病小鼠模型,具体操作如下:禁食 24 h 后,每日向该组小鼠腹腔

注射 1 次 STZ (50 mg/kg),连续 5 d;采集小鼠在建模前、STZ 注射 3 d 后及建模后连续 8 周(1 次/周)的尾静脉血,测定其随机血糖并称重体质量;若建模前小鼠的血糖水平 <8.9 mmol/L,建模后每次监测的血糖水平均 ≥ 16.7 mmol/L,体质量明显下降且出现多饮、多尿、体毛发黄,则视为糖尿病模型诱导成功。此外,于上述时间点对正常小鼠(NC 组和 NA 组)行血糖水平监测。

1.2.2 全层皮肤缺损创面模型制作 糖尿病模型建立成功后,参照文献^[7]制作全层皮肤缺损创面模型。所有小鼠经腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠(60 mg/kg)进行麻醉,而后剃尽其背部体毛,用脱毛膏去除残存鼠毛;脱毛 24 h 后,再次向小鼠腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠(60 mg/kg)进行麻醉,而后使用 9 mm 直径灭菌环钻于其背部正中制造 1 个全层皮肤缺损创面。分别向 DC 组和 NC 组小鼠的背部创面上滴加双蒸水(20 μL)作空白对照,向 NA 组和 DA 组滴加 100 mmol/L ATP 溶液 20 μL 行 ATP 干预。静置数分钟,待滴加溶液吸收后于创面加盖 3M 透明敷料。分别于伤后第 1、3、7、14 日随机挑选每组小鼠 6 只,切取创缘皮肤标本后,用颈椎脱臼法处死小鼠。随后,用 10% 缓冲福尔马林溶液固定部分创缘皮肤组织标本,并于 1 周内制成蜡块用于后期组织细胞学检测;部分新鲜标本则分装于 1.5 mL 离心管并于 -80℃ 超低温冰箱保存,用于检测 ATP、腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)和腺苷一磷酸(adenosine monophosphate, AMP)含量以及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的水平。

1.2.3 中性粒细胞浸润观察 取各组创缘伤后第 1、3 日的石蜡块样本,切片、脱蜡后行苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, H-E staining, H-E 染色),于光学显微镜下观察第 1、3 日的创面炎症细胞浸润情况,每张切片随机选取创缘周围 5 个视野,计数中性粒细胞(分叶核)数量。

1.2.4 MPO 水平检测 按照酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒说明书步骤,检测各组创缘伤后第 1、3 日的创面愈合中 MPO 的含量。

1.2.5 ATP、ADP 和 AMP 含量检测 分别称取创缘伤后第 1 日 NC 组及 DC 组标本各 1 g,加入 15 倍体积的甲醇-水溶剂(体积比 4:1)和瓷珠,于快速研磨仪用 30 Hz 的频率研磨 3 min,在 4℃、14 000 × g 离心 15 min,收取上清液。再向残渣中加入 15 倍体积的甲醇-水溶剂(体积比 4:1),按上述方法重复提取 1 次,合并 2 次提取的上清液。取 400 μL 上清液经氮气挥干后,加入 100 μL 50% 乙腈水溶液复溶,而后于 4℃、14 000 × g 离心 15 min,取上清液进行超高效液相色谱-串联质谱

法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 分析。

采用 HyperCarb PGC 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 3 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 用于分离待测物质。流动相中 A 为 10 mmol/L 乙酸铵的水溶液 (pH=9, 氨水调节), B 为 10 mmol/L 乙酸铵的 90% 乙腈水溶液 (pH=9, 氨水调节)。采用梯度洗脱, 起始流动相为 3%B, 12 min 后升至 100%B 并维持 14 min, 而后返回至 3%B 维持 18 min 平衡色谱柱, 流速为 0.3 mL/min。采用 sMRM 模式对实验样本和定量标准曲线样本同时检测分析, 通过 AB Sciex 公司 Analyst 软件控制仪器、采集数据并进一步对 ATP、ADP 和 AMP 含量进行定量分析。

1.2.6 Connexin43、Pannexin1、CD39、P2X7 及 P2Y2 表达的观察 将伤后第 1、3 日创缘组织石蜡样本切片、脱蜡后, 用免疫组织化学染色分别标记 Connexin43、Pannexin1、CD39、P2X7 及 P2Y2, 并按照免疫组织化学试剂盒说明书进行检测。随意选取各组创缘组织石蜡切片标本 6 张, 每张切片于高倍镜下随机选取 5 个视野, 粗略评估 Connexin43、Pannexin1、CD39、P2X7 及 P2Y2 阳性表达的细胞量。

1.2.7 创面愈合评价 于全层皮肤缺损创面模型制作当日及伤后第 1、3、7、14 日, 用无菌透明塑料薄膜临摹

各组小鼠背部创面周径后进行图像扫描, 通过 Image J 软件计算创面的面积, 并用创面愈合百分比评估创面愈合情况。计算公式为: 创面愈合百分比 = (初始创面面积 - 观察日创面面积) / 初始创面面积 × 100%。

1.2.8 组织形态学观察 取各组伤后第 7 日创缘组织的 H-E 染色切片标本, 于光学显微镜下观察愈合皮肤组织中肉芽生长情况。

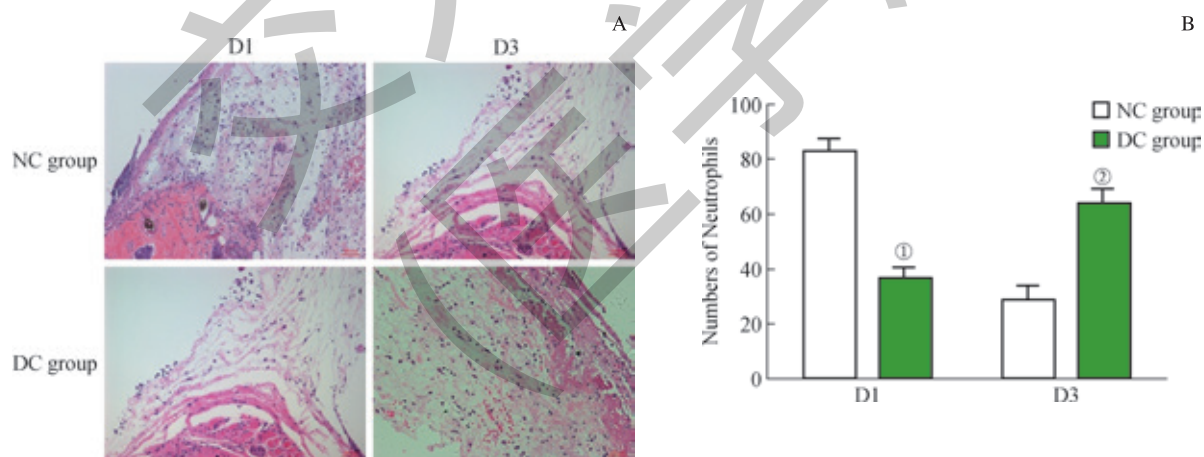
1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 软件对研究数据进行统计分析。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞浸润及计数

创面组织经 H-E 染色后于光学显微镜下观察发现, 炎症反应阶段的糖尿病创面的胶原纤维较纤细, 排列紊乱稀疏, 创缘组织炎症细胞的集中分布较少; 经统计显示, 伤后第 1 日, 糖尿病创面 (DC 组) 中的中性粒细胞数量少于正常创面 (NC 组) ($P=0.000$), 伤后第 3 日则多于 NC 组 ($P=0.002$) (图 1)。



Note: A. Distribution of neutrophils of mice in the two groups by light microscope. B. Numbers of neutrophils of mice in the two groups. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.002$, compared with NC group.

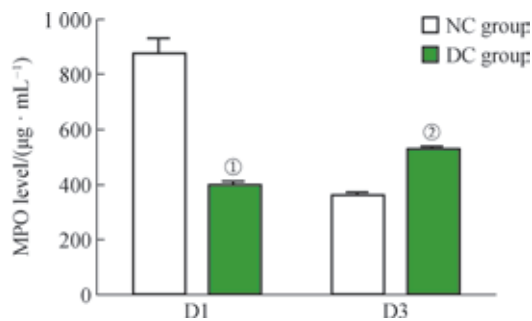
图 1 DC 组和 NC 组小鼠伤后第 1、3 日的创面中性粒细胞分布及计数 (×200, H-E 染色)

Fig 1 Distribution and counting of neutrophils in the DC and NC groups on the first and third day after being wounded (×200, H-E staining)

2.2 创面组织 MPO 水平检测

与 NC 组相比, 伤后第 1 日, DC 组创面中 MPO 的含

量较低 ($P=0.000$), 伤后第 3 日则 DC 组创面中 MPO 的含量较高 ($P=0.000$) (图 2)。



Note: ① $P=0.000$, ② $P=0.002$, compared with NC group.

图 2 ELISA 检测 DC 组和 NC 组小鼠伤后第 1、3 日创面的 MPO 含量

Fig 2 MPO level in the DC and NC groups on the first and third day after being wounded by ELISA

2.3 创面组织中 ATP、ADP 和 AMP 含量检测

通过 UPLC-MS/MS 检测 DC 组及 NC 组小鼠第 1 日创面中 ATP、ADP 和 AMP 的含量, 结果显示 DC 组小鼠创面中的 ATP 含量明显低于 NC 组 ($P=0.010$), 而 ADP、AMP 含量在 2 组间差异无统计学意义 (表 1)。

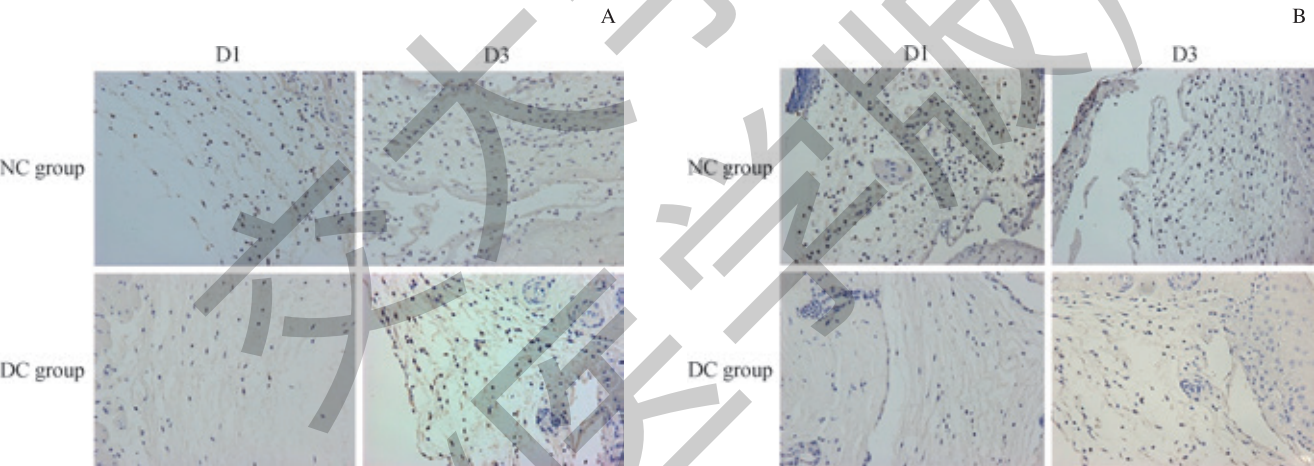
表 1 UPLC-MS/MS 检测 DC 组和 NC 组小鼠伤后第 1 日创缘组织中 ATP、ADP 及 AMP 含量

Tab 1 Level of ATP、ADP and AMP in the DC and NC groups on the first day after being wounded by UPLC-MS/MS

| Item | NC group (n=6) | DC group (n=6) | P value |
|---|-----------------|-----------------|---------|
| ATP/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) | 1.08 ± 0.09 | 0.69 ± 0.11 | 0.010 |
| ADP/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) | 4.40 ± 0.99 | 4.22 ± 1.41 | 0.900 |
| AMP/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) | 6.91 ± 1.11 | 4.78 ± 0.65 | 0.300 |

2.4 创面组织中 Connexin43、Pannexin1 阳性表达的观察

研究^[8]显示, Connexin43、Pannexin1 均表达于细胞膜。本研究通过免疫组织化学染色法标记上述 2 种蛋白, 观察其在创缘组织细胞中的阳性表达情况。结果显示, 创面中 Connexin43 和 Pannexin1 的表达高峰出现在伤后第 1 日和第 3 日, 随后其表达量逐渐下降; 且在伤后第 1 日和第 3 日, DC 组小鼠创缘组织中 Pannexin1 及 Connexin43 的表达量均低于 NC 组 (图 3)。



Note: A. Expression of Connexin43. B. Expression of Pannexin1.

图 3 免疫组织化学法观察 DC 组和 NC 组小鼠伤后第 1、3 日创缘组织细胞中 Connexin43、Pannexin1 阳性表达 ($\times 200$)

Fig 3 Positive expressions of Connexin43 and Pannexin1 in tissues of wound margin of the DC and NC groups on the first and third day after being wounded by immunohistochemistry ($\times 200$)

2.5 创缘组织中 CD39 阳性表达的观察

通过免疫组织化学染色法标记 CD39 后发现, 伤后第

1 日和第 3 日, DC 组小鼠创缘组织细胞中 CD39 阳性表达量明显低于 NC 组 (图 4)。

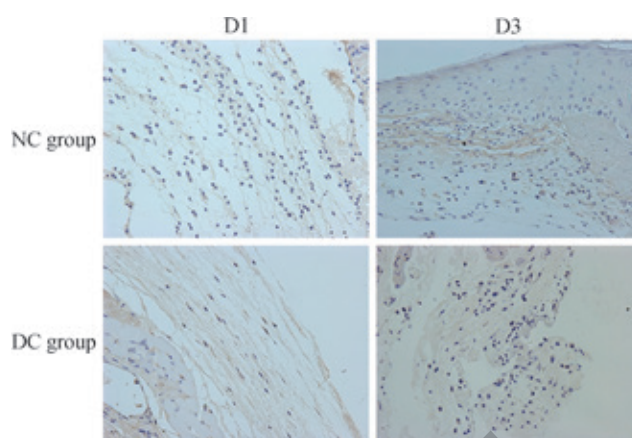


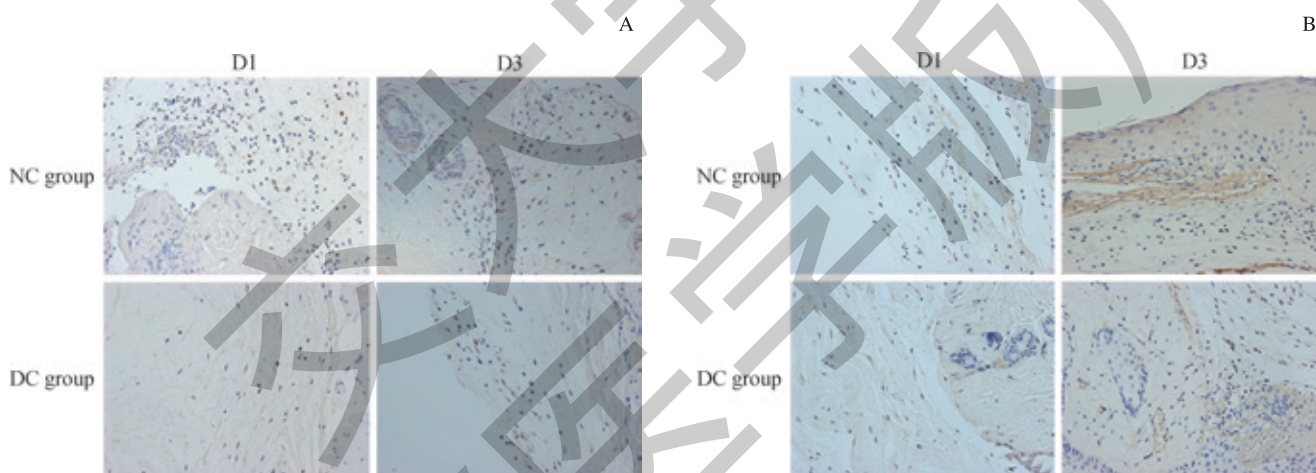
图4 免疫组织化学法观察 DC 组和 NC 组小鼠伤后第 1、3 日创缘组织细胞中 CD39 阳性表达 ($\times 200$)

Fig 4 Positive expression of CD39 in tissues of wound margin of the DC and NC groups on the first and third day after being wounded by immunohistochemistry ($\times 200$)

2.6 创缘组织中 P2X7 和 P2Y2 阳性表达的观察

研究^[9-10]显示, P2X7 和 P2Y2 受体主要表达于细胞膜。通过免疫组织化学染色标记 P2X7 和 P2Y2 受体观察

其在创缘组织细胞中的阳性表达, 伤后第 1 日和第 3 日, DC 组小鼠创缘组织细胞中 P2X7、P2Y2 受体的阳性表达量均低于 NC 组 (图 5)。



Note: A. Expression of P2X7. B. Expression of P2Y2.

图5 免疫组织化学法观察 DC 组和 NC 组小鼠伤后第 1、3 日创缘组织细胞中 P2X7、P2Y2 受体的阳性表达 ($\times 200$)

Fig 5 Positive expressions of P2X7 and P2Y2 receptors in tissues of wound margin of the DC and NC groups on the first and third day after being wounded by immunohistochemistry ($\times 200$)

2.7 创面愈合分析

通过动态观察各组小鼠创面愈合过程发现, 与正常组小鼠相比, 糖尿病组小鼠的创面愈合过程有明显延迟; 而相较于 DC 组, DA 组小鼠的糖尿病创面的愈合速度明显加快。经统计, 随着时间的推移, 4 组小鼠的创面面积逐渐缩

小 (图 6), 愈合率从伤后第 7 日起出现明显差异; 伤后第 14 日, DA 组小鼠的创面愈合百分比为 $(86.630 \pm 4.200)\%$, 显著高于 DC 组 $[(72.390 \pm 2.862)\%]$ ($P=0.000$), 但仍低于 NA 组 $[(98.998 \pm 1.650)\%]$ ($P=0.000$), 而 NC 组和 NA 组间差异无统计学意义 (表 2)。

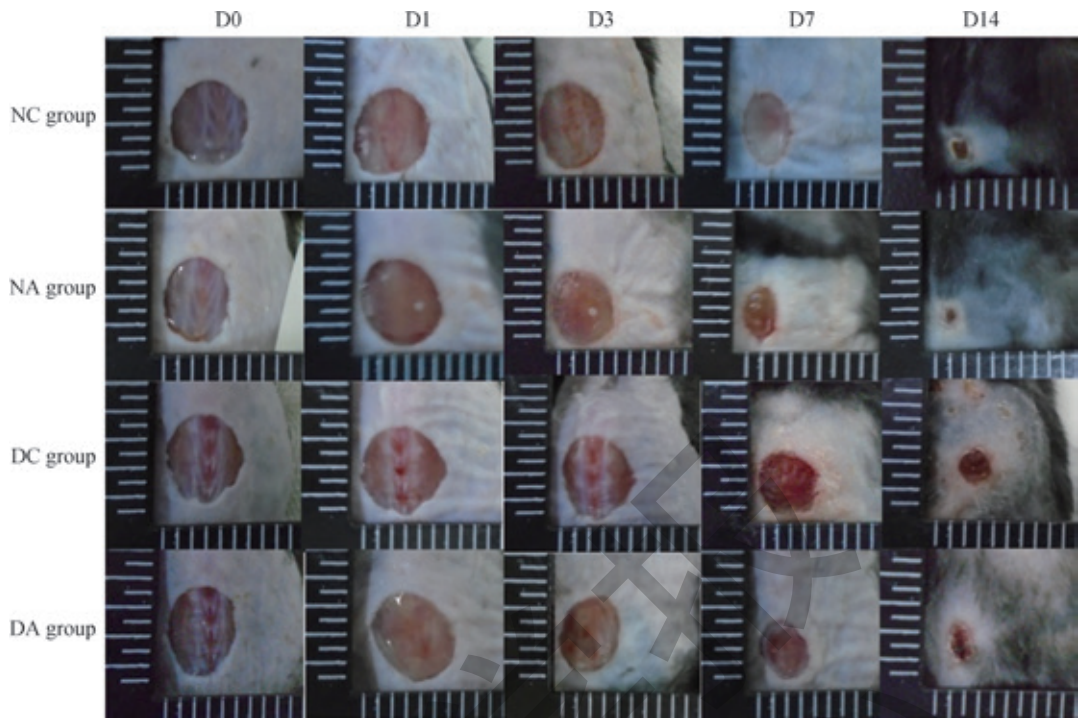


图 6 4 组小鼠在不同时间点的创面愈合情况
Fig 6 Wound healing conditions of the mice in the four groups at different time points

表 2 4 组小鼠伤后第 1、3、7、14 日的创面愈合率比较
Tab 2 Wound healing rate on the first, third, 7th and 14th days after being wounded in each group

| Group | D1 | D3 | D7 | D14 |
|-------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| DC | 12.898 ± 1.452 | 15.849 ± 2.747 | 49.183 ± 3.309 | 72.390 ± 2.862 |
| DA | 14.552 ± 1.077 | 22.034 ± 1.499 | 64.259 ± 2.628 ^① | 86.630 ± 4.200 ^① |
| NC | 15.071 ± 1.723 | 26.300 ± 1.111 | 74.373 ± 1.759 | 94.831 ± 2.962 |
| NA | 15.599 ± 0.856 | 26.930 ± 1.539 | 81.405 ± 2.997 ^② | 98.998 ± 1.650 ^② |

Note: ^① $P=0.000$, compared with DC group; ^② $P=0.000$, compared with DA group.

2.8 组织学形态观察

于光学显微镜下观察各组小鼠伤后第 7 日的创缘组织显示, NC 组和 NA 组小鼠的创缘组织可见大量新生肉芽组织及新生毛细血管, DC 组小鼠创缘组织中仅可见少量

肉芽组织, 且胶原结构稀疏紊乱, 血管样结构较少; 而与 DC 组相比, DA 组小鼠肉芽组织中胶原结构相对整齐且血管样结构较多, 但仍不及 NC 和 NA 组 (图 7)。

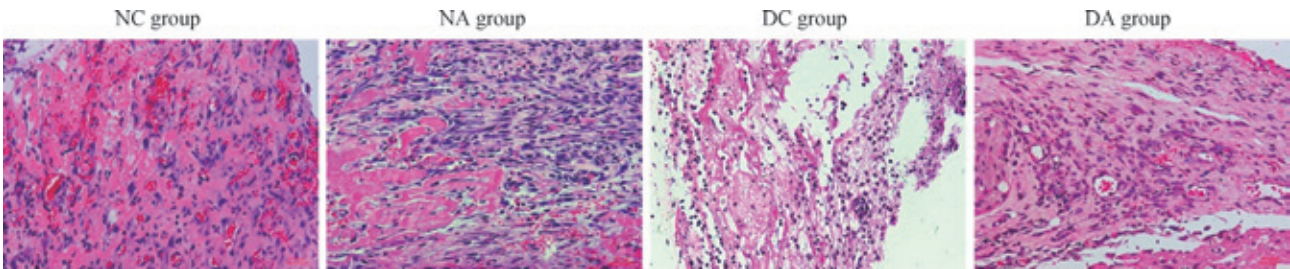


图 7 光学显微镜下观察 4 组小鼠伤后第 7 日创缘组织中肉芽组织生长和新生血管分布情况 (×200, H-E 染色)
Fig 7 Growth of granulation tissue and distribution of neovascularization in the wound tissues of the mice in the four groups on the 7th day after being wounded by the light microscope (×200, H-E staining)

3 讨论

当外源性皮肤组织受损后, 损伤刺激因子将启动炎症-修复-重塑进程, 最终达到创面的愈合。研究^[11-12]显示, 组织细胞受损后会释放多种具有免疫调节活性的内源性物质, 即损伤相关模式分子 (damage associated molecular patterns, DAMPs), 参与协同激活先天免疫系统及调节获得性免疫方向, 对组织修复或异常重构进行调控。其中, ATP 不仅是生理状态下维持细胞代谢功能的主要能量物质, 应激状态下也可作为 DAMPs 分子实现对多种细胞效应的调控^[13]。胞外 ATP 的主要来源有 2 种途径, 即受损、坏死细胞的直接释放或特定信号介导的可控性释放^[14-15]。一般来说, 几乎所有组织细胞在特定的刺激下均可释放 ATP 至胞外^[5, 16-17]。同时, 受损组织局部的高浓度 ATP 在嘌呤受体 P2 的介导下可趋化炎症细胞至创面组织启动炎症反应, 从而参与急性炎症反应过程^[18-20]; 而后, 胞外 ATP 在嘌呤转换酶 CD39 的作用下被水解为 AMP 或腺苷以终止 P2 信号^[13], 且低浓度 ATP 或其降解产物 (AMP 和腺苷) 可参与后续的组织修复重建过程^[21-23]。作为创面愈合的起始阶段, 炎症反应过程有效顺利的进行与创面的如期愈合直接关联^[24], 那么在糖尿病创面早期炎症阶段, ATP 代谢及嘌呤信号通路是否存在一定的异常呢? 本研究通过免疫组织化学染色法观察发现, 在糖尿病创面愈合的早期炎症阶段 (伤后第 1 日), ATP 释放通道蛋白 (Pannexin1、Connexin43)、胞外 ATP 水解酶 (CD39) 及嘌呤信号受体 P2 (P2X7、P2Y2) 的表达均较正常创面明显减少; 通过 UPLC-MS/MS 检测发现, 糖尿病创面组织中 ATP、ADP 及 AMP 的含量在伤后第 1 日低于正常创面; 而在损伤早期给予小鼠创面外源性 ATP 后, 则明显加快了糖尿病创面的愈合速度。继而提示, 在急性损伤早期放大胞外 ATP 信号可在一定程度上加快糖尿病创面愈合。

前期研究^[25-26]表明, 相较于正常创面, 糖尿病创面的早期炎症反应 (伤后第 1 日) 存在一定的不足, 而在炎症转归阶段 (伤后第 3 日), 炎症消退也呈现出一定的迟滞。作为中性粒细胞脱颗粒的标志, MPO 也是评价炎症反应强度的常用指标^[27]。本研究通过对中性粒细胞计数并评估 MPO 水平来对比糖尿病创面与正常创面愈合过程中炎症反应的差别, 结果显示: 正常创面组织在伤后第 1 日可见大量中性粒细胞浸润, MPO 水平较高, 伤后第 3 日则中性粒细胞数量及 MPO 水平均下降; 而与正常创面相比, 糖尿病创面组织在伤后第 1 日的中性粒细胞数量及 MPO 水平均明显偏低, 伤后第 3 日则反之。上述结

果再次提示, 糖尿病创面的早期炎症反应不足, 启动时相较正常创面有所延迟, 且炎症消退也较正常创面有所迟滞。

通过 UPLC-MS/MS 检测创面 ATP 及其代谢产物 (ADP、AMP) 含量发现, 伤后第 1 日, 糖尿病创面含量均低于正常创面组织。但由于检测方法的局限性, 现有手段测定结果所显示的为胞内胞外总量, 难以具体界定胞内和胞外 ATP 的相应含量, 而真正起到启动急性炎症反应, 诱导中性粒细胞氧化呼吸爆发的为胞外 ATP^[3]。因此, 本研究进一步结合创缘组织中 ATP 释放通道蛋白、胞外 ATP 水解酶及嘌呤信号受体 P2 的表达来进行综合分析, 间接评估胞外 ATP 的代谢水平。

皮肤组织损伤后, ATP 不仅可以通过破损的细胞膜被动释放至损伤组织, 还可通过细胞膜上的 ATP 释放通道进行可控性释放。Pannexin1 和 Connexin43 是组织细胞中广泛表达的 2 种 ATP 释放通道蛋白, 经其释放的 ATP 在中性粒细胞趋化过程中扮演着重要角色^[28]。免疫组织化学染色结果显示, 伤后第 1、3 日糖尿病创面组织细胞中 Pannexin1 和 Connexin43 阳性表达量明显低于正常创面, 提示炎症反应阶段经通道释放至胞外的 ATP 相对较少。CD39 又称外核苷三磷酸二磷酸水解酶-1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, ENTPD1), 能够催化水解胞外 ATP 为 ADP 及 AMP^[13]。免疫组织化学染色结果显示, 伤后第 1、3 日糖尿病创面组织细胞中 CD39 的阳性表达量亦明显低于正常创面, 提示糖尿病创面中 ATP 的分解代谢能力也处于较低水平。综合上述结果发现, 在炎症反应阶段相比于正常创面, 糖尿病创面组织中胞外 ATP 代谢状态低迷。

研究^[23]显示, 组织中的胞外 ATP 主要通过激活嘌呤受体 P2 来激活嘌呤信号发挥作用, 其也是调控炎症反应的重要信号。在创面愈合炎症反应阶段, 胞外 ATP 激活 P2Y2 受体与中性粒细胞的趋化、迁移、激活及氧化呼吸爆发密切相关^[29]; 且被激活的 P2X7 受体可参与多种炎症细胞趋化因子和炎症介质的释放^[30-32]。免疫组织化学染色结果显示, 伤后第 1、3 日糖尿病创面组织细胞中 P2Y2 和 P2X7 受体的阳性表达量明显低于正常创面, 提示在炎症反应阶段的嘌呤信号也呈低水平状态。

本研究通过进一步给予小鼠创面外源性 ATP 观察糖尿病小鼠创面愈合情况, 结果发现, 在伤后第 14 日糖尿病组小鼠的创面愈合速度虽然不及正常组小鼠, 但 DA 组明显高于 DC 组, 提示外源性补充 ATP 可在一定程度上加快糖尿病创面的愈合。同时, 通过组织学观察伤后第 7 日各组小鼠的创面组织发现, DA 组小鼠的新生血管数量较

多且组织胶原排列更加整齐,提示外源性补充 ATP 可在一定程度上加速糖尿病创面的胶原沉积和血管新生。但上述情况与愈合早期炎症反应的时效性是否有直接联系,仍有待进一步的实验验证。

综上所述,在糖尿病创面愈合过程的炎症反应阶段,ATP 代谢及嘌呤信号水平均呈低水平状态,外源性补充

ATP 可加速糖尿病创面的愈合;继而提示,胞外 ATP 代谢与创面炎症修复进程相关,且在急性损伤早期放大胞外 ATP 信号可促进糖尿病创面愈合。而究竟能否通过调控创面 ATP 代谢状态,放大糖尿病创面急性炎症期的嘌呤信号,以提高糖尿病创面炎症反应的时效性,将有待于后续研究进一步分析。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Miao MY, Niu YW, Xie T, et al. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation[J]. *Wound Repair Regen*, 2012, 20(2): 203-213.
- [2] Wang Q, Zhu GY, Cao XZ, et al. Blocking AGE-RAGE signaling improved functional disorders of macrophages in diabetic wound[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 1428537.
- [3] Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, et al. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1102.
- [4] Ayna G, Krysko DV, Kaczmarek A, et al. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40069.
- [5] Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration[J]. *Science*, 2017, 356(6342): 1026-1030.
- [6] Chia JS, McRae JL, Thomas HE, et al. The protective effects of CD39 overexpression in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2013, 62(6): 2026-2035.
- [7] Wear-Maggitti K, Lee J, Conejero A, et al. Use of topical sRAGE in diabetic wounds increases neovascularization and granulation tissue formation[J]. *Ann Plast Surg*, 2004, 52(5): 519-522.
- [8] Wang CM, Lincoln J, Cook JE, et al. Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin[J]. *Diabetes*, 2007, 56(11): 2809-2817.
- [9] Mehta N, Kaur M, Singh M, et al. Purinergic receptor P2X₂: a novel target for anti-inflammatory therapy[J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(1): 54-88.
- [10] Burrell HE, Bowler WB, Gallagher JA, et al. Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y₁, P2Y₂, and P2Y₄ receptors[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(3): 440-447.
- [11] Gleeson LE, Sheedy FJ. Metabolic reprogramming & inflammation: fuelling the host response to pathogens[J]. *Semin Immunol*, 2016, 28(5): 450-468.
- [12] Pandolfi F, Altamura S, Frosali S, et al. Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair[J]. *Clin Ther*, 2016, 38(5): 1017-1028.
- [13] Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 567-592.
- [14] Lazarowski ER. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release[J]. *Purinergic Signal*, 2012, 8(3): 359-373.
- [15] Ledderose C, Bao Y, Zhang J, et al. Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 213(2): 334-345.
- [16] Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, et al. Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17406-17416.
- [17] Burow P, Klapperstück M, Markwardt F. Activation of ATP secretion via volume-regulated anion channels by sphingosine-1-phosphate in RAW macrophages[J]. *Pflügers Arch*, 2015, 467(6): 1215-1226.
- [18] Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 422.
- [19] Wang Q, Ju XL, Zhou Y, et al. Necroptotic cells release find-me signal and are engulfed without proinflammatory cytokine production[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51(10): 1033-1039.
- [20] Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 419.
- [21] Hamidzadeh K, Mosser DM. Purinergic signaling to terminate TLR responses in macrophages[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 74.
- [22] Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation[J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 310-317.
- [23] Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses[J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 55: 9-19.
- [24] Wicks K, Torbica T, Mace KA. Myeloid cell dysfunction and the pathogenesis of the diabetic chronic wound[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(4): 341-353.
- [25] 王齐, 曹晓赞, 朱冠娅, 等. 外源性阻断 RAGE 效应对糖尿病小鼠创面中巨噬细胞浸润的影响[J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2017, 37(12): 1588-1593.
- [26] 王齐, 朱冠娅, 牛轶雯, 等. 阻断糖基化终末产物受体效应对小鼠糖尿病创面炎症反应的影响[J]. *中华损伤与修复杂志 (电子版)*, 2017, 12(4): 254-261.
- [27] Haegens A, Vernooij JH, Heeringa P, et al. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents[J]. *Eur Respir J*, 2008, 31(2): 252-260.
- [28] Penuela S, Gehl R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(1): 15-22.
- [29] Chen Y, Yao YL, Sumi YK, et al. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation[J]. *Sci Signal*, 2010, 3(125): ra45.
- [30] di Virgilio F, dal Ben D, Sarti AC, et al. The P2X₇ receptor in infection and inflammation[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 15-31.
- [31] Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, et al. Neutrophil P2X₇ receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10555.
- [32] Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, et al. P2X₇-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia[J]. *Glia*, 2014, 62(4): 592-607.

[收稿日期] 2019-06-06

[本文编辑] 邢宇洋