

论著·基础研究

低氘水联合富血小板血浆对大鼠糖尿病溃疡创面愈合的影响

王湘琦, 赵超然, 熊爱兵

西南医科大学附属医院烧伤整形外科, 泸州 646000

[摘要] **目的**·观察低氘水联合富血小板血浆对大鼠糖尿病溃疡创面愈合的影响,并探讨其可能的机制。**方法**·将100只雄性SD大鼠随机分为2组:正常对照组(A组, $n=20$)及糖尿病组($n=80$)。糖尿病组大鼠经高脂饲料喂养4周后,采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)+皮肤全层切除复制大鼠糖尿病溃疡模型;随后将造模成功的72只大鼠随机分为糖尿病模型组(B组)、富血小板血浆组(C组)、低氘水组(D组)和低氘水联合富血小板血浆组(E组),每组各18只。A组普通饲料喂养4周后,腹腔注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液+皮肤全层切除复制正常溃疡模型。各组分别予以对应处理并于处理3、7和14 d后处死动物,在各对应时间点测大鼠随机血糖;取创面及创缘组织,观察各组大鼠溃疡创面愈合情况、局部组织形态学变化,并采用酶联反应吸附法检测各组创面组织中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、组织金属蛋白酶抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的含量。**结果**·D组及E组随机血糖较干预前降低。各糖尿病组创面炎症反应均较A组慢,E组肉芽成熟效果较B、C、D组好,在各干预组中效果最佳,新生血管及成纤维细胞出现时间早且数量多。A组TIMP-1含量明显高于各糖尿病组($P<0.05$),B组TIMP-1含量明显低于C组、D组和E组($P<0.05$),E组TIMP-1含量明显高于C组及D组($P<0.05$)。B组MMP-9含量明显高于A组、C组、D组和E组($P<0.05$),E组MMP-9含量明显低于C组及D组($P<0.05$)。**结论**·低氘水对大鼠糖尿病溃疡创面愈合有促进作用;低氘水联合富血小板血浆对大鼠糖尿病溃疡创面愈合有显著促进作用,其可能与降低大鼠随机血糖、提高溃疡创面TIMP-1、抑制MMP-9表达有关。

[关键词] 低氘水;富血小板血浆;糖尿病溃疡;基质金属蛋白酶-9;组织金属蛋白酶抑制物-1;大鼠

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.03.008 **[中图分类号]** R62 **[文献标志码]** A

Effect of deuterium depleted water combined with platelet-rich plasma on wound healing of diabetic ulcer in rats

WANG Xiang-qi, ZHAO Chao-ran, XIONG Ai-bing

Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

[Abstract] **Objective**·To observe the effect of deuterium depleted water combined with platelet-rich plasma on wound healing of diabetic ulcer in rats, and to explore its possible mechanism. **Methods**·Male SD rats were randomly divided into two groups, normal control group (group A, $n=20$) and diabetic group ($n=80$). Rats in the diabetic group were fed with high-fat diet for 4 weeks, and the rat diabetic ulcer model was replicated by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) + skin full-thickness resection; then randomly divided into diabetic model group (group B), platelet-rich plasma group (group C), deuterium depleted water group (group D), and deuterium depleted water combined platelet-rich plasma group (group E), with 18 rats for each group. Group A with common feed was fed for 4 weeks after intraperitoneal injection of an equal volume of citric acid-sodium citrate buffer + skin full-thickness resection to replicate the normal ulcer model. The animals were sacrificed after treatment for 3, 7 and 14 d, and the random blood glucose was measured at each corresponding time point. The wound surface and wound margin tissue were taken to observe the wound healing and local histomorphology of each group. The contents of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the wound tissue of each group were detected by enzyme-linked reaction adsorption method. **Results**·Random blood glucose in group D and group E was lower than that before intervention. The inflammatory response of the wounds in each diabetic group was slower than that in group A. The granulation ripening effect of group E was faster than that of group B, C, and D. The effect was best in each intervention group, and the neovascularization and fibroblasts appeared earlier and in large quantities. The content of TIMP-1 in group A was significantly higher than that in group B, C, D and E ($P<0.05$). The content of TIMP-1 in group B was significantly lower than that in group C, D and E ($P<0.05$). The content of TIMP-1 was significantly higher than that of group C and D ($P<0.05$). The content of MMP-9 in group B was significantly higher than that in group A, C, D and E ($P<0.05$). The content of MMP-9 in group E was significantly lower than that in group C and D ($P<0.05$). **Conclusion**·Deuterium depleted water can promote the healing of diabetic ulcer wounds. Deuterium depleted water combined with platelet-rich plasma can significantly promote the healing of diabetic ulcer wounds, which may be related to the decrease of random blood glucose, the increase of TIMP-1 and the inhibition of MMP-9 expression.

[Key words] deuterium depleted water; platelet-rich plasma; diabetic ulcer; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; rat

[作者简介] 王湘琦 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: 672257635@qq.com。

[通信作者] 熊爱兵, 电子信箱: xiongyang22000@aliyun.com。

[Corresponding Author] XIONG Ai-bing, E-mail: xiongyang22000@aliyun.com.



糖尿病足溃疡 (diabetes foot ulcer, DFU) 是常见的糖尿病慢性合并症之一, 是导致糖尿病患者截肢致残的主要原因。溃疡的发生被认为是截肢的前兆, 而下肢截肢经常会导致糖尿病患者死亡, 70% 的患者在截肢手术后 5 年内死亡^[1-2]。DFU 的高截肢率和高死亡率, 严重影响患者的生活质量, 给家庭带来了经济负担。因此, 预防和治疗 DFU 十分重要。富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 属于血小板浓缩物, 含有大量高浓度的生长因子, 可促进软组织的修复。前期有学者研究发现, PRP 对于糖尿病溃疡创面愈合有独特的优势和效果^[3], 在统计学上有更高的愈合率和更低的并发症发生率^[4]。低氘水 (deuterium depleted water, DDW) 为氘体积分数低于 0.015% 的水^[5], 有一系列生物学效应, 如抗氧化、抗衰老、抗抑郁、抗辐射、保护心血管系统、降血糖、抗肿瘤等作用^[6]。本实验拟观察 DDW 联合 PRP 在大鼠糖尿病溃疡创面中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

健康清洁级雄性 SD 大鼠 120 只, 质量 160 ~ 200 g, 购自辽宁长生生物股份有限公司, 生产许可证号为 SCXK (辽) 2015-0001, 饲养于西南医科大学实验动物中心。

1.2 主要仪器与试剂

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、柠檬酸、柠檬酸三钠、葡萄糖均购自北京索莱宝公司; 水合氯醛 (源叶生物); 大鼠基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、组织金属蛋白酶抑制物-1 (TIMP-1) Elisa 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 高速冷冻离心机 (Eppendorf); 酶标仪 (Rayto, RT-6100); 洗板机 (Tianshi, 988 洗板机); 电热恒温箱 (武汉-恒苏净科学仪器有限公司); 移液器 (Finnpipette, 20 ~ 200 μ L); 罗氏血糖仪 (活力型)、罗氏血糖试纸、飞科剃刀; 高脂高糖饲料 (67% 大鼠维持饲料+10% 猪油+20% 蔗糖+2.5% 胆固醇+0.5% 胆酸钠, 由北京科澳协力饲料有限公司提供); 大鼠普通饲料 (成都达硕生物科技有限公司); 低氘水 (泸州哈罗德健康科技有限公司)。本实验用水符合三级水标准。

1.3 动物分组及模型的建立

健康清洁级雄性 SD 大鼠 120 只, 适应性喂养 1 周后, 选 100 只随机分为正常对照组 ($n=20$) 和糖尿病组 ($n=80$), 分别称取 2 组大鼠体质量, 测随机血糖。剩余

20 只大鼠用于制取 PRP, 普通饲料饲养, 不参与造模与分组。

1.3.1 糖尿病大鼠溃疡模型的建立及分组 糖尿病组大鼠予以高脂高糖饲料饲养。饲养 4 周后, 禁食 12 h (不禁水), 给予 1% 的 STZ 溶液 (临用前用 0.1 mol/L、pH4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制, 冰浴、避光操作) 单次腹腔注射 (30 mg/kg), 7 d 后采用尾静脉采血法测大鼠随机血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L 表示糖尿病模型大鼠建立成功^[7]。成模后以 7% 水合氯醛 (0.5 mL/100 g) 腹腔注射进行麻醉, 备皮消毒, 在背部制作约 3 cm \times 3 cm 的正方形创面, 深达筋膜。拍照后医用纱布覆盖创面, 胶带包扎固定。将造模成功^[8-9]的 72 只大鼠随机分为糖尿病模型组 (B 组)、PRP 组 (C 组)、低氘水组 (D 组) 及低氘水联合 PRP 组 (E 组), 每组各 18 只。

1.3.2 正常大鼠溃疡模型建立 正常对照组 (A 组) 继续予普通饲料喂养 4 周后, 禁食 12 h, 不禁水, 在相同操作条件下注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 7 d 后采用尾静脉采血法测血糖。以 7% 水合氯醛 (0.5 mL/100 g) 腹腔注射, 备皮消毒, 在背部制作约 3 cm \times 3 cm 的正方形创面, 深达筋膜。拍照后医用纱布覆盖创面, 胶带包扎固定。

1.4 PRP 的制备

采用改良 Landesberg 法^[10]制作。每次取 2 ~ 3 只大鼠, 称重麻醉后, 用预先装有 1 mL 柠檬酸葡萄糖溶液 (ACD 抗凝剂) 的 5 mL 真空离心管及一次性静脉采血针, 直视下从每只大鼠腹主动脉取血约 10 mL (约 5 mL 血装一离心管), 摇匀后, 取 1 mL 全血进行全血细胞分析, 测得血小板计数为 646×10^9 。第一次以 $200 \times g$ 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件离心 15 min, 离心后管内全血分为 3 层, 下层为红细胞, 上层为上清液, 中间交界层即富含血小板。在划分中层与下层两部分的线下方 2 mm 处标记, 移取该点以上的全部内容物^[11]至另一不装有抗凝剂的空白离心管, 摇匀, 再以 $500 \times g$ 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件离心 10 min, 得到 2 个部分, 上层即贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP), 下层为含有少量红细胞、血浆和血小板混合物, 即 PRP。用移液枪吸取上份 PPP, 即获得 PRP, 经全血细胞分析测得血小板计数为 $4\,296 \times 10^9$ 。

1.5 各组干预方案

A 组和 B 组: 生理盐水灌胃, 饮用普通水; 溃疡局部常规消毒后涂抹生理盐水, 然后无菌纱布覆盖。C 组: 生理盐水灌胃, 饮用普通水; 溃疡局部常规消毒后涂抹 PRP, 然后用无菌纱布覆盖。D 组: 低氘水灌胃, 饮用低

氙水; 溃疡局部常规消毒后涂抹生理盐水, 然后无菌纱布覆盖。E 组: 低氙水灌胃, 饮用低氙水; 溃疡局部常规消毒后涂抹 PRP, 然后用无菌纱布覆盖。各组灌胃量均为 $0.01 \text{ mL}/(\text{g} \cdot \text{d})^{[12]}$ 。每只大鼠均单笼饲养, 于术后第 1 日开始换药, 每日更换垫料 1 ~ 2 次, 换药 1 次, 并祛除创面硬痂。PRP 每隔 1 d 使用 1 次, PRP 及生理盐水每次每创面使用量均为 $100 \mu\text{L}$ 。

1.6 样本获取及指标检测

分别于溃疡造模后的第 3 日、第 7 日及第 14 日, 每组各随机选取 6 只大鼠, 测血糖 (早晨 9 时) 后麻醉, 照相并观察溃疡愈合情况。取创面及周围 5 mm 内组织, 将一半肉芽组织进行苏木精 - 伊红染色 (H-E 染色), 观察组织病理学改变; 另一半立即置于液氮中冷却, 随后 -80°C 保存, 用于各组大鼠创面组织 MMP-9、TIMP-1 蛋白含量检测。

1.6.1 溃疡大鼠创面恢复情况 ①大体观察: 观察创面的基本情况, 拍照后用 Image J 图像软件进行溃疡面积的测量, 以创面愈合率作为评价大鼠溃疡愈合情况的指标。创面愈合率 = (创面初始面积 - 创面当前面积) / 初始面积 $\times 100\%$ 。②组织病理形态学观察: 取创面及周围 5 mm 内组织, 进行 H-E 染色, 使用光学显微镜观察创面的组织形态学变化, 主要观察创面肉芽组织、新生毛细血管、成纤维细胞及胶原等的变化。

1.6.2 创面组织 MMP-9 和 TIMP-1 的检测 取创面及周围 5 mm 内组织, 采用酶联免疫吸附法检测创面组织 MMP-9 和 TIMP-1 的含量。所有指标均按照试剂盒说明进行操作。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

正常对照组大鼠皮毛光亮, 精神良好, 皮脂丰厚。糖尿病组大鼠在 STZ 注射后精神状态变得稍差, 皮毛粗糙、萎黄, 且易脱毛, 饮水量、饮食量、尿量明显增加; 随着时间变化, 体质量较正常对照组明显减轻, 皮脂变薄。

2.2 正常对照组及糖尿病组大鼠体质量及血糖结果的比较

在适应性喂养 1 周后, 2 组大鼠体质量无明显差异;

糖尿病组大鼠经高脂高糖饲料喂养 4 周后, 体质量增长略比正常对照组大鼠快; 正常对照组大鼠在经柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液注射 7 d 后体质量稍有增长, 而糖尿病组大鼠在经 STZ 注射 7 d 后体质量反而降低 (表 1)。

表 1 造模前后大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, g)

Tab 1 Changes in body weight of rats before and after modeling ($\bar{x} \pm s$, g)

Group	n	Initial weight	1 d before injection	7 d after injection
Normal control	18	230.69 ± 10.37	352.19 ± 38.81	363.99 ± 34.17
Diabetic	72	229.51 ± 8.30	358.84 ± 39.75	308.27 ± 45.37

初始状态下, 糖尿病组大鼠的随机血糖与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 糖尿病组大鼠经高脂高糖饲料喂养 4 周后, 其血糖较正常对照组稍高, 但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。在 STZ/柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液注射 7 d 后, 糖尿病组大鼠血糖较正常对照组明显增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明高脂饲料喂养配合 STZ 诱导的 2 型糖尿病大鼠模型建立成功 (表 2)。

表 2 造模前后大鼠血糖水平变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab 2 Changes of blood glucose level in rats before and after modeling ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Group	n	Initial glucose	1 d before injection	7 d after injection
Normal control	18	7.11 ± 0.68	7.14 ± 0.50	7.06 ± 4.87
Diabetic	72	7.13 ± 0.64	7.42 ± 0.61	$24.32 \pm 4.44^{\oplus}$

Note: $^{\oplus} P = 0.000$, compared with normal control group.

2.3 各糖尿病组大鼠血糖变化

A、B、C 组在各干预时间点的随机血糖水平与干预前相比, 差异无统计学意义; 在 D 组及 E 组可观察到, 在低氙水干预后大鼠随机血糖开始缓慢下降, 在干预第 14 日后较干预前明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 干预后不同时间点各组大鼠随机血糖变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, mmol/L)

Tab 3 Random blood glucose changes in rats of different groups at different time points after intervention ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, mmol/L)

Group	Before intervention	3 d after intervention	7 d after intervention	14 d after intervention
A	7.06 ± 0.49	7.35 ± 0.64	6.68 ± 0.76	7.22 ± 0.66
B	24.20 ± 3.75	23.80 ± 5.49	23.22 ± 2.38	23.97 ± 4.96
C	22.67 ± 4.29	21.23 ± 3.70	21.50 ± 3.98	22.68 ± 2.76
D	24.42 ± 5.24	22.73 ± 4.67	21.80 ± 4.70	$19.50 \pm 4.66^{\oplus}$
E	26.00 ± 4.07	24.25 ± 4.19	22.5 ± 2.93	$22.10 \pm 3.34^{\oplus}$

Note: $^{\oplus} P = 0.044$, $^{\oplus} P = 0.038$, vs before intervention in the same group.



2.4 各组大鼠创面恢复情况及组织病理形态学观察

各组大鼠创面均无明显感染, 有不同程度渗出、水肿及少量出血, 随着时间推移各创面均在逐步愈合 (图 1)。在干预第 3 日, H-E 染色结果显示: A 组炎症细胞浸润明显, 可见少量新生毛细血管及成纤维细胞; B 组可见少量炎症细胞、成纤维细胞及新生毛细血管; C 组可见炎症细胞浸润, 有少量新生毛细血管及成纤维细胞; D 组可见炎症细胞浸润, 有少量新生毛细血管及成纤维细胞; E 组可见炎症细胞浸润, 伴少量新生毛细血管及成纤维细胞。在干预第 7 日, H-E 染色结果显示: A 组可见大量新生毛细血管及成纤维细胞, 有少量胶原纤维, 仍可见较多炎症细胞; B 组可见炎症细胞浸润, 新生毛细血管较其他组少, 有少量成纤维细胞; C 组可见较多的新生毛细血管及成纤维

细胞, 有少量胶原纤维; D 组可见较多的新生毛细血管及成纤维细胞, 有少量胶原纤维; E 组可见成纤维细胞及新生毛细血管增多, 有少量胶原纤维, 炎症细胞减少。在干预第 14 日, H-E 染色结果显示: A 组可见大量胶原纤维, 少量新生毛细血管、成纤维细胞及炎症细胞; B 组可见胶原纤维, 少量成纤维细胞及新生毛细血管; C 组可见较多胶原纤维及新生毛细血管, 伴少量炎症细胞浸润; D 组可见较多胶原纤维及新生毛细血管, 伴少量炎症细胞浸润; E 组可见大量胶原纤维及较多的新生小动脉和小静脉。各糖尿病组创面炎症反应均较正常对照组慢; E 组肉芽成熟效果较其余 3 个糖尿病组快, 在各干预组中效果最佳, 新生血管及成纤维细胞出现时间早且数量多, 为创面修复提供了前提条件 (图 2)。

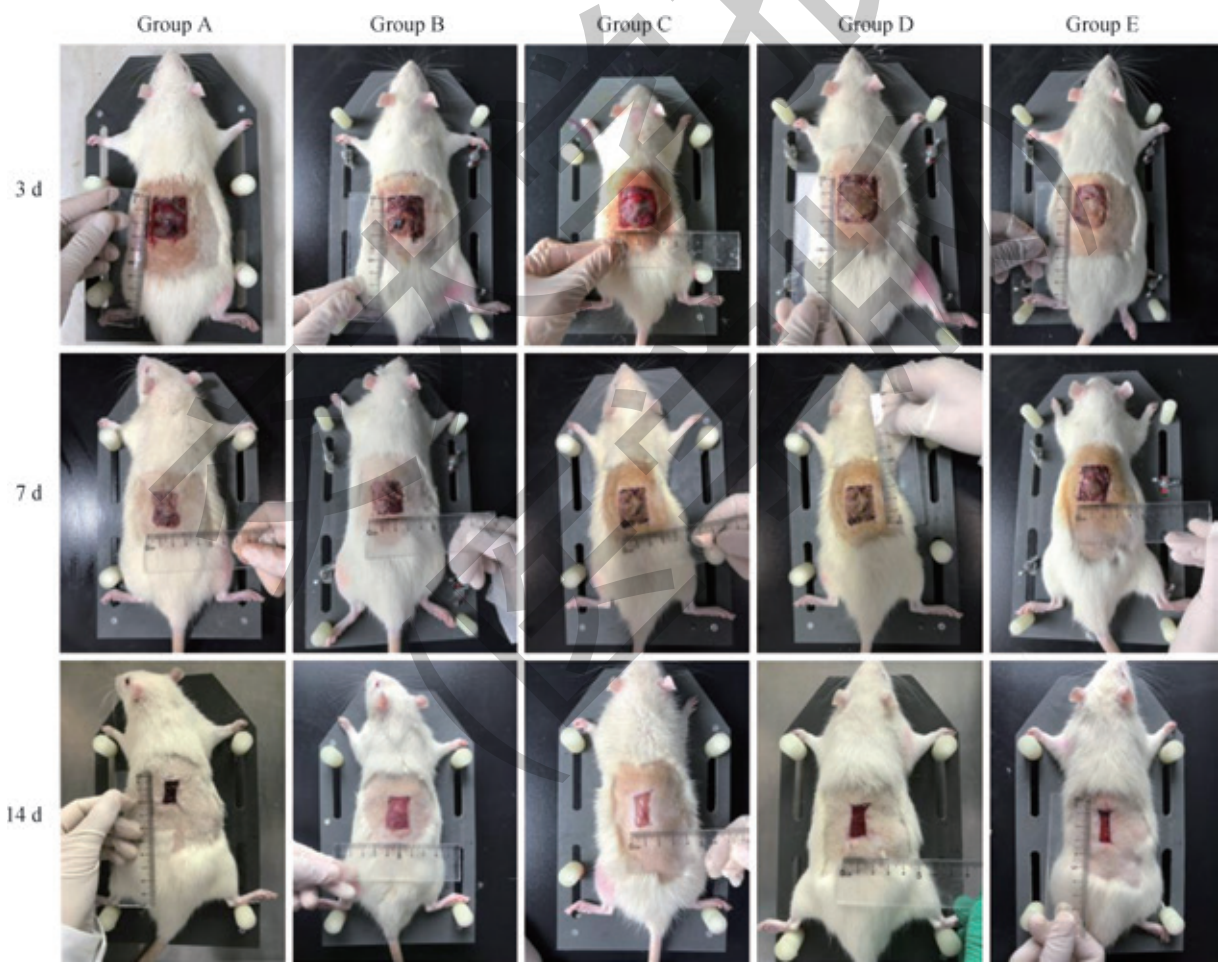


图 1 各组大鼠创面愈合情况的比较
Fig 1 Comparison of wound healing in each group of rats

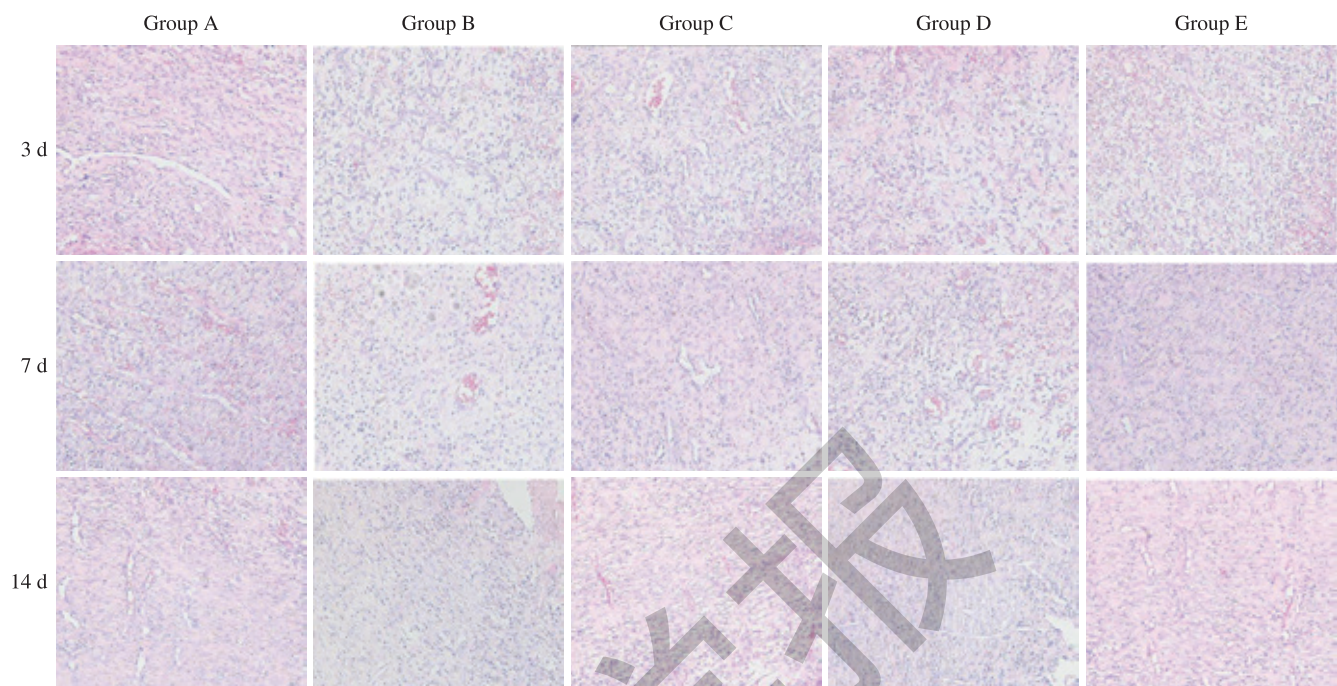


图 2 各组大鼠创面组织 H-E 染色 (×200)
Fig 2 H-E staining of wound tissue in each group of rats (×200)

2.5 各组大鼠愈合率的比较

干预第 3 日: 各糖尿病组大鼠创面愈合率均明显低于正常对照组 (A 组) ($P<0.05$); C 组、D 组及 E 组创面愈合率均高于 B 组 ($P<0.05$), 但两两之间的差异均无统计学意义; 各组创面愈合率由高到低依次为 A 组 >E 组 >C 组 >D 组 >B 组。干预第 7 日: A 组创面愈合率大于 B 组、C 组及 D 组 ($P<0.05$); E 组愈合率虽低于 A 组, 但 2 组差异无统计学意义; 各组创面愈合率由高到低依次为 A 组 >E 组 >D 组 >C 组 >B 组。干预第 14 日: A 组创面愈合率大于 B 组、C 组及 D 组 ($P<0.05$); E 组愈合率虽低于 A 组, 但 2 组差异无统计学意义; 各组创面愈合率由高到低依次为 A 组 >E 组 >C 组 >D 组 >B 组 (表 4)。

表 4 干预后不同时间点各组大鼠创面愈合率的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, %)
Tab 4 Changes of wound healing rate in rats of different groups at different time points after intervention ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, %)

Group	3 d after intervention	7 d after intervention	14 d after intervention
A	9.25 ± 1.91	52.20 ± 3.67	86.25 ± 5.23
B	2.04 ± 0.87 ^①	30.76 ± 7.35 ^①	61.00 ± 2.15 ^①
C	5.21 ± 1.06 ^{①③}	44.38 ± 3.87 ^{①⑤}	77.98 ± 3.84 ^{③⑥}
D	5.00 ± 1.08 ^{①④}	44.63 ± 2.73 ^{①⑥}	76.38 ± 7.13 ^{③⑥}
E	6.47 ± 1.61 ^{②③}	49.19 ± 5.31 ^②	82.40 ± 6.81 ^③

Note: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.002$, ^③ $P=0.010$, ^④ $P=0.012$, ^⑤ $P=0.013$, ^⑥ $P=0.004$, compared with group A; ^⑦ $P=0.000$, ^⑧ $P=0.001$, compared with group B.

2.6 各组大鼠创面组织 MMP-9 含量的比较

各糖尿病组大鼠创面组织中 MMP-9 含量在观察的各时间点均明显高于正常对照组 (A 组)。C 组、D 组及 E 组在干预 3 d 后, MMP-9 含量较 B 组明显降低 ($P<0.05$); 干预 3 d 后 E 组 MMP-9 含量较 C 组及 D 组明显降低, 7 d 后差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 5)。

表 5 干预后不同时间点各组大鼠创面组织 MMP-9 含量的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, ng/g)
Tab 5 Changes of MMP-9 content in wound tissues of rats in different groups at different time points after intervention ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, ng/g)

Group	3 d after intervention	7 d after intervention	14 d after intervention
A	1 032.79 ± 42.84	995.85 ± 99.86	1 104.57 ± 35.60
B	2 704.24 ± 185.55 ^①	2 871.10 ± 198.90 ^①	2 585.30 ± 51.67 ^①
C	1 595.07 ± 124.97 ^{①②}	1 481.98 ± 146.67 ^{①②}	1 688.55 ± 97.01 ^{①②}
D	1 678.32 ± 111.92 ^{①②}	1 620.28 ± 94.37 ^{①②}	1 664.71 ± 181.88 ^{②⑥}
E	1 404.52 ± 58.17 ^{①②③}	1 222.10 ± 86.35 ^{①②③④}	1 122.89 ± 82.08 ^{②⑥⑦}

Note: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.007$, ^③ $P=0.005$, compared with group A; ^④ $P=0.000$, compared with group B; ^⑤ $P=0.002$, ^⑥ $P=0.000$, compared with group C; ^⑦ $P=0.009$, ^⑧ $P=0.000$, ^⑨ $P=0.003$, compared with group D.

2.7 各组大鼠创面组织 TIMP-1 含量的比较

各糖尿病组大鼠创面组织中 TIMP-1 含量在各时间点均低于正常对照组 (A 组), 而 C 组、D 组及 E 组干预后 TIMP-1 含量均较 B 组升高 (均 $P<0.05$)。E 组干预 3 d 后 TIMP-1 含量升高较 C 组及 D 组明显 ($P<0.05$); 在干预 14 d 后, 与 A 组差异无统计学意义 (表 6)。

表 6 干预后不同时间点各组大鼠创面组织 TIMP-1 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/g)
Tab 6 Changes of TIMP-1 content in wound tissue of rats in different groups at different time points after intervention ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/g)

Group	3 d after intervention	7 d after intervention	14 d after intervention
A	979.76 ± 59.42	1 055.14 ± 88.35	1 102.83 ± 98.35
B	574.68 ± 25.13 ^①	531.70 ± 23.46 ^①	576.72 ± 23.65 ^①
C	702.04 ± 17.32 ^{①②}	28.33 ± 54.93 ^{①②}	688.24 ± 40.52 ^{①②}
D	634.45 ± 24.05 ^{①③④}	622.05 ± 59.28 ^{①⑤⑥}	697.92 ± 30.48 ^{①⑦}
E	770.24 ± 42.37 ^{①②③④}	860.43 ± 59.26 ^{①②③④}	974.84 ± 89.70 ^{①②③④⑤⑥⑦⑧}

Note: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.001$, compared with group A; ^③ $P=0.000$, ^④ $P=0.010$, ^⑤ $P=0.016$, ^⑥ $P=0.001$, compared with group B; ^⑦ $P=0.004$, ^⑧ $P=0.006$, ^⑨ $P=0.001$, ^⑩ $P=0.002$, compared with group C; ^⑪ $P=0.004$, ^⑫ $P=0.000$, ^⑬ $P=0.003$, compared with group D.

3 讨论

皮肤是人体最大的器官之一，主要有 3 个关键作用：屏障功能、感觉功能、代谢功能。皮肤受损时，会经历伤口愈合的过程。伤口愈合的 4 个阶段是炎症、血管生成、再上皮化和重塑。由于各种原因，一些伤口修复减慢或中断，这些伤口被称为慢性伤口^[13]。糖尿病慢性足溃疡是糖尿病患者较严重且常见的并发症，是常见的慢性伤口之一，在糖尿病人群中的终身发病率高达 15%^[14]。尽管发病率很高，但目前的治疗方案仍然有限。常见的外科治疗方法主要是清创，随后换药、控制感染和血糖水平。尽管采用了各种综合方法，但患者并发症发生率和截肢率仍然很高^[15]。

2 型糖尿病大鼠模型已较成熟。有研究^[16-17]表明，STZ 对胰岛 β 细胞具有高度选择性毒性作用，通过自由基损伤胰岛 β 细胞，使其胰岛素的合成减少，进而引发糖尿病。通过高脂高糖喂养 1 ~ 2 个月诱导大鼠胰岛素抵抗后，再加小剂量一次性腹腔注射 STZ 来损伤胰岛功能，能引起血糖升高，模拟 2 型糖尿病发病的过程。张玉领等^[18]发现高脂高糖喂养 4 周后，大鼠出现明显的肥胖及胰岛素抵抗，一次性腹腔注射 STZ 30 mg/kg，可成功制备 2 型糖尿病大鼠模型，其成模率高，模型稳定，无动物死亡，更适用于 2 型糖尿病的相关研究。

PRP 是全血经离心后获得的高浓度血浆，富含多种生长因子，可促进软组织的修复。研究^[4, 19-20]表明，PRP 治疗 DFU 有较好的疗效。本次实验也发现，经 PRP 干预后

的糖尿病大鼠创面愈合率较模型组高。低氘水能够降低胰岛素抵抗性、降低糖尿病患者血糖含量^[12, 21-22]。Wang 等^[23]报道，低氘水可促进醌氧化还原酶 1 (NADPH: quinone oxidoreductase-1, NQO1) 的表达，从而抑制 MMP-9 的表达。本研究也发现，低氘水干预组大鼠随机血糖在干预 14 d 后明显下降，在各个时间点的创面愈合率较糖尿病模型组高；说明低氘水可降低糖尿病大鼠随机血糖，对糖尿病大鼠溃疡创面愈合有促进作用。

研究^[24]表明，糖尿病患者足部伤口中，MMPs 表达增加，其抑制因子 TIMPs 表达减少，导致伤口难以愈合。MMPs 是一组具有共同生物化学性质的可降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的锌依赖性肽链内切酶，是参与 ECM 降解的主要蛋白酶之一；TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制因子，能调节 MMPs 的活性。MMP-9 是金属蛋白酶家族中相对分子量最大的酶，可作用较广泛的底物，包括 IV、V、VII、X 型胶原，明胶，纤连蛋白，玻连蛋白及层粘连蛋白等，对这些底物起着降解作用^[25]。MMP-9 通过分解 ECM 成分参与伤口的愈合过程。糖尿病患者动脉中高含量的 MMP-9 能使中性粒细胞和巨噬细胞表达增强，这 2 种细胞是主要的炎症反应细胞，因此导致 DFU 延迟愈合^[26]。TIMPs 是 MMPs 的内源性抑制剂，可抑制 MMPs 活性，刺激细胞分裂，结合 ECM，抑制血管形成，诱导细胞凋亡^[25]。TIMP-1 对 MMP-9 有直接的抑制作用，是 MMP-9 的特异性抑制剂。TIMP-1 与活性 MMP-9 形成非共价复合物，通过抑制 MMP-9 活性来减少 ECM 的降解。郑洁等^[25]的研究表明，MMP-9 与糖尿病溃疡的愈合密切相关，且 MMP-9/TIMP-1 有望成为未来 DFU 治疗的新靶点。本实验研究发现，糖尿病组大鼠创面 MMP-9 水平高于空白对照组，而经 PRP、低氘水、PRP 联合低氘水治疗后 MMP-9 明显降低，且低氘水联合 PRP 治疗组干预 14 d 后效果最明显；糖尿病组大鼠创面 TIMP-1 水平低于空白对照组，而经 PRP、低氘水、PRP 联合低氘水治疗后 TIMP-1 明显升高，且低氘水联合 PRP 治疗组干预 14 d 后效果最明显。

综上所述，低氘水联合 PRP 对大鼠糖尿病溃疡创面愈合有显著的促进作用，其可能与调控 MMPs 的表达有关，即通过提高溃疡创面 TIMP-1 表达，从而抑制 MMP-9 的表达，减少 ECM 的降解。

参·考·文·献

- [1] Ilonzo N, Patel M, Lantis JC, et al. Managing the diabetic foot ulcer: how best practices fit the real 2018 United States[J]. *Surg Technol Int*, 2018, 32: 49-59.
- [2] CTindong M, Palle JN, Nebongo D, et al. Prevalence, clinical presentation, and factors associated with diabetic foot ulcer in two regional hospitals in cameroon[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2018, 17(1): 42-47.
- [3] 李立, 柴益民. 富血小板血浆在糖尿病溃疡创面的应用[J]. *国际骨科学杂志*, 2016, 37(3): 174-178.
- [4] Hirase T, Ruff E, Surani S, et al. Topical application of platelet-rich plasma for diabetic foot ulcers: a systematic review[J]. *World J Diabetes*, 2018, 9(10): 172-179.
- [5] 徐志红, 张舒羽, 潘璐, 等. 低氘水在生物医学领域研究进展[J]. *化工时刊*, 2017, 31(10): 34-38.
- [6] 罗安玲, 郑有丽, 丛峰松, 等. 低氘水生物学效应的研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(4): 467-471.
- [7] Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus[J]. *In Vivo*, 2009, 23(2): 245.
- [8] 郑琪, 李友山. 四效散对糖尿病足溃疡大鼠创面愈合的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22): 114-118.
- [9] 李友山, 郑琪, 冀凌云, 等. 改良 STZ 法制备糖尿病足溃疡大鼠模型[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43 (1): 158-160.
- [10] 李薇薇, 冯锐. 富血小板血浆凝胶制备及对大鼠皮瓣成活的作用分析[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(1): 64-69.
- [11] Venter NG, Marques RG, Santos JS, et al. Use of platelet-rich plasma in deep second-and-third-degree burns[J]. *Burns*, 2016, 42(4): 807-814.
- [12] 周振宇, 沈才洪, 卢中明, 等. 低氘白酒对糖尿病大鼠糖代谢和胰岛细胞及其功能的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2010, 30(10): 1204-1207.
- [13] Jones JJ, Nguyen TT, Peng Z, et al. Targeting MMP-9 in diabetic foot ulcers[J]. *Pharmaceuticals*, 2019, 12(2): 79.
- [14] Cooper S. The biology of the skin[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2016, 10: 48-60.
- [15] Everett E, Mathioudakis N. Update on management of diabetic foot ulcers[J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2018, 14(11): 153-165.
- [16] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26 (1): 5-20.
- [17] 杨架林, 李果, 刘优萍, 等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐菌素建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(3): 138-141.
- [18] 张玉领, 陈培, 刘家秀, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(15): 3922-3924.
- [19] Babaei V, Afradi H, Gohardani HZ, et al. Management of chronic diabetic foot ulcers using platelet-rich plasma[J]. *Wound Care*, 2017, 26: 784-787.
- [20] 王江宁, 高磊. 糖尿病足慢性创面治疗的新进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(7): 832-837.
- [21] Dzhimak SS, Barishev MG, Basov AA, et al. Influence of deuterium depleted water on freeze-dried tissue isotopic composition and morphofunctional body performance in rats of different generations[J]. *Biophysics*, 2014, 59(4): 614-619.
- [22] Lisic AB, Barishev MG, Basov AA, et al. Influence of deuterium depleted water on the organism of laboratory animals in various functional conditions of nonspecific protective systems[J]. *Biophysics*, 2015, 59 (4): 620-627.
- [23] Wang H, Zhu B, He Z, et al. Deuterium-depleted water (DDW) inhibits the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(6): 489-496.
- [24] 张东萍, 曹建春. 血竭生肌膏对糖尿病大鼠基质金属蛋白酶类表达的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2016, 22(6): 571-575.
- [25] 郑洁, 祝友鹏, 李恭驰, 等. 细菌和基质金属蛋白酶-9 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 对糖尿病足创面愈合影响的研究进展[J]. *感染、炎症、修复*, 2018, 19(3): 177-180.
- [26] Liu Y, Min D, Bolton T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(11): 117-119.

[收稿日期] 2019-09-04

[本文编辑] 吴 洋