DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250327.006
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250327.1226.012

基于miR-155/FGF7通路介导的巨噬细胞极化探讨顾步汤改善糖尿病足溃疡的分子机制

王继雪[1],杨稀瑞[2],周 涛[1],燕树勋[3]✉,王思琦[4],夏联恒[5],袁星星[6]
(1.河南中医药大学第一附属医院周围血管科,河南 郑州 450000;2.河南中医药大学第一附属医院眼科,河南 郑州 450000;3.河南中医药大学第一附属医院内分泌科,河南 郑州 450000;4.河南中医药大学第一附属医院,河南 郑州 450000;5.黑龙江中医药大学附属第一医院周围血管科,黑龙江 哈尔滨 1500006;6.黑龙江省中医药科学院,黑龙江 哈尔滨 150006)

[摘要] **目的**:探讨顾步汤通过miR-155/FGF7信号通路调控巨噬细胞极化,揭示其在改善糖尿病足溃疡(DFU)的作用机制。**方法**:实验分为5组:空白组、模型组、顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤+miR-155 inhibitor组。通过腹腔注射55 mg/kg链脲佐菌素,构建SD大鼠糖尿病模型,并构建DFU模型。顾步汤组给予顾步汤浓缩液(90 mL/kg)进行灌胃,空白组和模型组则以蒸馏水(90 mL/kg)灌胃,miR-155 inhibitor组通过腹腔注射miR-155 inhibitor(20 μmoL/L),顾步汤+miR-155 inhibitor组则同时进行腹腔注射和灌胃。通过H&E染色观察各组大鼠溃疡组织的病理形态,酶联免疫吸附法检测各组血清中炎症因子(IL-6、IL-1β、IL-10、IL-4)水平,流式细胞术分析溃疡组织中巨噬细胞CD206表达及巨噬细胞极化标记分子表达,qPCR和Western blot检测miR-155、iNOS、COX-2、Arg-1、YM-1及FGF7表达。**结果**:与空白组相比,模型组IL-6、IL-1β水平、CD68、iNOS、COX-2、miR-155表达量及CD68/CD206的比值均显著升高;而IL-4、IL-10水平、CD206、Arg-1、YM-1及FGF7表达显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,顾步汤组IL-6、IL-1β水平、CD68、iNOS、COX-2、miR-155表达量及CD68/CD206比值均显著下降,而IL-4、IL-10的水平、CD206、Arg-1、YM-1及FGF7表达显著升高($P<0.05$)。**结论**:顾步汤通过靶向miR-155上调FGF7表达,促进巨噬细胞M2极化,抑制炎症,最终改善DFU症状。

[关键词] 顾步汤;糖尿病足溃疡;巨噬细胞极化;miR155/FGF7通路
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)21-1621-09

Exploration of the molecular mechanism of Gubu Decoction in regulating miR-155/FGF7 pathway mediated macrophage polarization to treat diabetic foot ulcers

WANG Jixue[1], YANG Xirui[2], ZHOU Tao[1], YAN Shuxun[3]✉, WANG Siqi[4], XIA Lianheng[5], YUAN Xingxing[6]
(1. *Department of Peripheral Vascular Surgery*, *the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM*, *Zhengzhou* 450000, *China*; 2. *Department of Ophthalmology*, *the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450000, *China*; 3. *Department of Endocrinology*, *the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450000, *China*; 4. *The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450000, *China*; 5. *Department of Peripheral Vascular Medicine*, *the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine*, *Harbin* 150006, *China*; 6. *Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine*, *Harbin* 150006, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82205195, 82205117); *Henan Province Postdoctoral Research Project* (*HN*2024080, *HN*2024083); *Henan Province Medical Science and Technology Key Project* (*LHGJ*2024067, *LHGJ*20230686); *Research Special Project of Henan Province Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine* (2022*JDZX*127, 2022*JDZX*135)

[*Author*]: *WANG Jixue*, *M.D.*, *E-mail*: *wjxyxr*@126.*com*.
[*Correspondence to*]: *YAN Shuxun*, *M.D.*, *Professor*, *Chief Physician*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *ysx*982001@163.*com*.

Received: 2024-11-12 *Revised*: 2025-03-02 *JHMU*, 2025;31(21):1621-1629

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82205195,82205117);河南省博士后科研项目(HN2024080,HN2024083);河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ2024067,LHGJ20230686);河南省中医临床研究基地科研专项(2022JDZX127,2022JDZX135)

[作者简介] 王继雪,博士,E-mail:wjxyxr@126.com。
[通讯作者] 燕树勋,博士,教授,主任医师,博士生导师,E-mail:ysx982001@163.com。

[收稿日期] 2024-11-12 [修回日期] 2025-03-02 网络出版时间:2025-03-27 14:04:28

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Gubu Decoction (GBD) in improving diabetes foot ulcer (DFU) by regulating macrophage polarization through the miR-155/FGF7 signal pathway. Methods: SD rat diabetes model was established by intraperitoneal injection of 55 mg/kg streptozotocin, and the wound model of difficult DFU was established. The experiment was divided into 5 groups: the blank group, the model group, the GBD group, the miR-155 inhibitor group, and the GBD+miR-155 inhibitor group. The GBD group was given GBD concentrate (90 mL/kg) by gavage, while the blank group and model group were given distilled water (90 mL/kg) by gavage. The miR-155 inhibitor group was injected intraperitoneally with miR-155 inhibitor (20 μmol/L), while the GBD+miR-155 inhibitor group was injected intraperitoneally and gavage simultaneously. The pathological morphology of ulcer tissues in each group of rats was observed by H&E staining. The levels of inflammatory factors (IL-6, IL-1β, IL-10, IL-4) in the serum of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Flow cytometry was used to analyze the expression of CD206 and macrophage polarization marker molecules in ulcer tissues. qPCR and Western blot were used to detect the expression of miR-155, iNOS, COX-2, Arg-1, YM-1, and FGF7. Results: Compared to the blank group, the levels of IL-6, IL-1β, CD68, iNOS, COX-2, miR-155 expression, and CD68/CD206 ratio were significantly increased in the model group. The levels of IL-4, IL-10, CD206, Arg-1, YM-1, and FGF7 were significantly reduced ($P<0.01$). Compared to the model group, the levels of IL-6, IL-1β, CD68, iNOS, COX-2, miR-155 expression, and CD68/CD206 ratio were significantly decreased in the GBD group, while the levels of IL-4, IL-10, CD206, Arg-1, YM-1, and FGF7 expression were significantly increased ($P<0.05$). Conclusion: GBD upregulates FGF7 expression by targeting miR-155, promotes M2 polarization of macrophages, inhibits inflammation, and ultimately improves DFU symptoms.

[Key words] Gubu Decoction; Diabetic foot ulcers; Macrophage polarization; miR-155/FGF-7 pathway

糖尿病足(diabetic foot,DF)是指由于糖尿病患者出现血管与神经病变、感染等多种因素所导致的下肢疼痛、足部溃疡或坏死等病症的统称[1]。根据世界卫生组织的数据显示,目前全球范围内糖尿病患者的数量已达到4.22亿,预计其中有19%～34%的患者可能最终发展为糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer,DFU)[2,3]。作为糖尿病的一种严重并发症,DFU不仅对患者的生活质量造成显著影响,同时也给患者的家庭及社会带来了沉重的负担,成为我国当前医疗卫生领域面临的一项重大挑战。

巨噬细胞在机体的固有免疫反应中发挥着至关重要的作用,其在激活后会经历极化,导致其表型和功能状态出现显著变化。目前,已知巨噬细胞的极化主要分为促炎性M1型和抗炎性M2型巨噬细胞。研究表明,巨噬细胞的极化在溃疡愈合与创伤修复过程中具有重要意义。具体而言,巨噬细胞可以通过趋化作用在不同的炎症微环境中聚集,展示出极高的可塑性,并能够调节免疫反应以影响炎症水平。这不仅使其有效地吞噬和清除坏死组织,还能分泌抑制炎症的因子,促进成纤维细胞的增殖,并加速肉芽组织的形成。因此,调节巨噬细胞极化引起的炎症微环境可能是改善DFU愈合的重要策略。课题组的前期研究已经证实,顾步汤能够增加M2型巨噬细胞的数量,并促进成纤维细胞的增殖与迁移,但其具体机制仍需进一步探讨。本研究将通过腹腔注射链脲佐菌素,在SD大鼠中建立糖尿病模型,并在此基础上构建大鼠皮肤难愈伤口模型,利用高糖刺激建立巨噬细胞极化模型,观察顾步汤如何通过miR-155/FGF7信号通路来介导M2型巨噬细胞极化,以揭示顾步汤促进DFU愈合的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 本研究采用50只健康的SPF级SD大鼠,所有实验动物由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证编号为SCXK(京)2016-0011。在饲养条件方面,实验室的室温21～25 ℃,湿度36%～46%。大鼠在实验期间能够自由取食及饮水,且光照按照昼夜交替的方式进行提供。根据《关于善待实验动物的指导性意见》要求对实验进行严谨操作[6]。实验研究伦理审批号:2023033104。

1.1.2 药物与试剂 顾步汤的组成成分包括黄芪30 g、石斛30 g、当归30 g、金银花30 g、牛膝30 g、紫花地丁30 g、菊花15 g、人参9 g以及甘草9 g。由河南中医药大学第一附属医院的制剂室进行制备。在制备过程中,首先使用武火对药材进行煎煮30 min,提取200 mL药液;随后,加入水进行第二次煎煮,采用文火处理30 min,再次提取200 mL的药液。最终,将两次提取的药液混合,总计400 mL,并继续煎煮至200 mL,最后浓缩至100 mL,并在4 ℃的环境下进行保存。

苏木素-伊红(H&E)染色试剂盒(北京索莱宝科技,批号G1120);Annexin V-FITC试剂盒(南京凯基生物,批号KGA08);CD68和CD206一抗均购自英国Abcam公司(批号ab283654、ab300621);白

细胞介素4(Interleukin-4,IL-4)、IL-6、IL-1β和IL-10的检测试剂盒则购自江苏酶免实业有限公司(批号:MM-0191R1、MM-0190R2、MM-0922R2和MM-0195R2)。Lipo6000转染试剂盒购自上海碧云天生物(批号:C0526-10 mL);FGF7一抗、GAPDH一抗、HRP标记的二抗、ECL化学发光试剂盒以及BCA蛋白检测试剂盒均购自美国CST公司(批号:#9740、#12620、#7074、#6883和#7780)。荧光素标记的山羊抗兔二抗(Abcam,批号ab6858)和山羊抗兔IgG(上海生工生物工程有限公司,货号:D110058);qPCR试剂盒购自美国Roche公司(批号:KK4610)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组与模型制备 对SD大鼠进行为期1周的适应性喂养后,随机将其分为5个实验组:空白组、模型组、顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤+miR-155 inhibitor组,每组各含10只大鼠。除空白组外,其余4组均通过腹腔注射55 mg/kg链脲佐菌素构建糖尿病大鼠模型。经过为期3周的观察,血糖水平超过16.7 mmol/L被视为成功建立模型的标志。在此基础上,使用1%戊巴比妥钠(剂量为100 mg/kg)进行腹腔麻醉,随后制作2.5 cm×2.5 cm全层皮肤缺损创面,并采用生理盐水纱布进行止血处理。成功建立模型后,依据课题组之前的实验结果,顾步汤组在建模期间接受顾步汤浓缩液(90 mL/kg)灌胃治疗,而空白组与模型组则用同计量蒸馏水进行灌胃。对于miR-155 inhibitor组,采用腹腔注射miR-155 inhibitor(浓度为20 μmol/L),而顾步汤+miR-155 inhibitor组则同时接受miR-155 inhibitor(相同浓度)和顾步汤浓缩液同剂量灌胃治疗。所有组别均每日进行1次治疗,持续7 d,总治疗周期为两周。

1.2.2 巨噬细胞分离及培养 首先,处死SD大鼠,并使用75%乙醇溶液对其后肢进行消毒。接下来,使用无菌剪刀及手术镊小心地剔除大鼠后肢皮肤肌肉组织,并彻底清除附着在股骨、胫骨上的残余组织。将股骨、胫骨置于75%乙醇溶液的培养皿中,反复注入预热至适宜温度的10%DMEM血清。将收集所得到的细胞转移至PE管中,离心(150×g,持续5 min)。离心结束后,将10%胎牛血清和20 ng/mL巨噬细胞集落刺激因子的DMEM加入PE管,吹打至均匀,转至培养皿。经过5 d培养,消化收集巨噬细胞,以1×10^5细胞/孔比例种于24孔板。以便进行后续实验研究。

1.2.3 H&E染色 取大鼠的溃疡组织样本,并将其在4%的多聚甲醛溶液中固定24 h。随后,按照标准的实验程序进行脱水、包埋及切片处理。接着,使用二甲苯对样本进行透明化,随后进行梯度乙醇的脱水处理。此后,实施伊红染色,并用双蒸水进行清洗,接着进行苏木精染色,再次使用双蒸水进行清洗,最后使用中性树胶进行封片处理。所有步骤完成后,样本将被置于显微镜下进行观察。

1.2.4 流式细胞术检测溃疡组织中M2型巨噬细胞标记CD206的表达 将从各组大鼠提取的溃疡组织切割成小块后,对样本在PBS溶液中处理。经过5次消化处理后,通过尼龙细胞对样本过滤,离心,悬浮。使用600 μL红细胞裂解液,去除红细胞;随后用FACS缓冲液10 mL对洗涤细胞,3%牛血清白蛋白封闭30 min,随后用CD206抗体及其对应的Ⅱ抗体进行孵育。最后,样品通过流式细胞仪进行检测,采用Ex-Press Plus程序。为排除荧光抗体的非特异性结合,使用FITC同种型和PE同种型对细胞进行孵育处理。

1.2.5 ELISA法检测 提取大鼠溃疡组织后,使用冷冻研磨仪对组织样本进行充分匀浆处理,然后以3 000 r/min的速度离心20 min,收集上清液。利用ELISA试剂盒测定各组培养液上清中IL-6、IL-1β、IL-10和IL-4的浓度,实验操作步骤应严格遵循说明书的指导。

1.2.6 流式细胞术检测巨噬细胞极化标记分子表达 将细胞以浓度为1×10^6个/mL的方式接种于六孔板内,经过24 h的分组处理后,收集细胞并用PBS进行两次洗涤。随后,取100 μL的细胞悬液,加入5 μL的Annexin V-FITC和1 μL的PI,室温下避光孵育15 min,最后利用流式细胞仪进行检测。

收集各组细胞后,进行离心处理并转移至流式细胞上样管中。随后,加入抗CD68-FTIC和CD206-FITC的荧光标记抗体进行染色。将样品混匀后,在避光条件下于室温下染色30 min,并用PBS冲洗2次。最后,使用200 μL的2% PFA重悬细胞,并通过流式细胞仪进行检测。

1.2.7 Western blot法检测 取用100 mg的溃疡组织,并使用RIPA裂解液在冰上进行匀浆处理。随后,将匀浆液在4 ℃下以12 000 r/min的速度离心10 min,收集上清液。通过Nanodrop进行定量,并根据需要制备30 μg的样品,随后煮沸以备使用。使用采用BCA法对蛋白浓度进行测定。提取的蛋白经100 ℃下变性5 min,行电泳分析,转膜并进行封闭处理。加入FGF7蛋白(稀释比例1∶1 000)和GAPDH(稀释比例1∶1 000)的一抗,孵育过夜。第

2天加入二抗进行2 h的孵育，使用ECL显影法进行可视化。膜经过TBST清洗后，添加ECL显影剂，应用化学发光检测系统拍摄，并对FGF7的相对表达水平进行分析。

1.2.8 qPCR检测溃疡组织miR-155表达水平 采用TRIzoL法提取细胞内总RNA，随后进行逆转录以合成互补DNA（cDNA）。根据实时定量聚合酶链反应（qPCR）试剂盒的使用说明进行mRNA的定量分析。引物序列如下：*miR-155*引物的正向序列为 5′-CGGCGGTTA-ATGCTAATTGTGAT-3′，反向序列为5′-GTGCAGGGTCCGAGGT-3′；*U6*引物的正向序列为5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAA-3′，反向序列为5′-CGCTTCACGAATTTGCCTGTCAT-3′。设定扩增条件：95 ℃ 5 min预变性，随后进行变性阶段，95 ℃ 20 s；58 ℃ 15 s退火；72 ℃10 s延伸。整个过程共进行42个循环。采用*U6*作为内参，通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算miR-155的相对表达量。实验重复3次，并计算得出平均值。

1.3 统计学处理

本研究所涉及的数据均通过SPSS 26.0软件进行数据分析。其中，多组组间比较采用方差分析，组间多重比较采用LSD分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠溃疡组织病理情况观察

空白组创面组织中胶原纤维的含量较为丰富，伴随新生肉芽及毛细血管，炎性细胞浸润程度相对较低，仅可观察到少量炎性细胞浸润。模型组创面组织可观察到大量炎性细胞浸润，胶原纤维、肉芽及新生毛细血管数量显著降低。然而，顾步汤组、miR-155 inhibitor组以及顾步汤＋miR-155 inhibitor组的创伤组织中，炎症细胞浸润较模型组下降。胶原纤维、肉芽及新生毛细血管数量逐渐增加。其中，顾步汤＋miR-155 inhibitor组的变化最为显著，见图1。

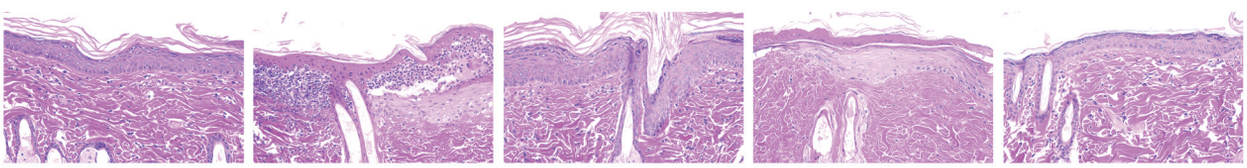


图1 顾步汤对溃疡组织病理学变化的影响（×200）

Fig1 Effects of Gubu Decoction on the pathological changes of ulcer tissue（×200）

2.2 顾步汤对溃疡组织中巨噬细胞CD206的表达

与空白组相比，模型组大鼠的溃疡组织中M2型巨噬细胞（F4/80＋CD206＋）的比例显著降低（$P<0.01$）。与模型组相比，顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤＋miR-155 inhibitor组的溃疡组织中M2型巨噬细胞（F4/80＋CD206＋）的比例显著增加（$P<0.01$）。见图2、表1。

2.3 顾步汤对炎症因子含量的影响

与空白组相比，模型组的溃疡组织中IL-6和IL-1β的水平显著上升，IL-4和IL-10的水平则显著下降（$P<0.01$）。与模型组相比，顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤＋miR-155 inhibitor组的上清液中IL-6和IL-1β的浓度显著降低（$P<0.01$）。此外，与模型组比较，顾步汤组、miR-155 in-

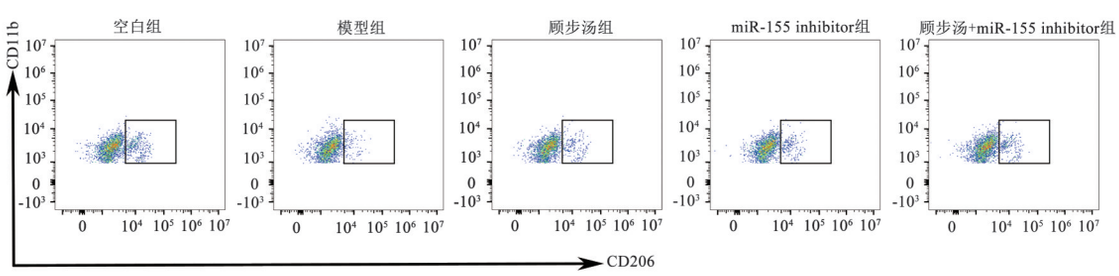


图2 顾步汤对溃疡组织中巨噬细胞CD206表达的比较

Fig 2 Comparison of CD206 expression in macrophages of ulcer tissue treated with Gubu Decoction

表1　顾步汤对溃疡组织中巨噬细胞CD206的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab1　Effect of GuBu Decoction on CD206 macrophages in ulcer tissue(n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	CD206
空白组	15.40±1.03
模型组	4.81±0.38**
顾步汤组	8.57±0.66##
miR-155 inhibitor组	9.16±0.72##
顾步汤+miR-155 inhibitor组	10.90±0.81##
F	60.000
P	<0.001

注:与空白组比较,**P<0.01;与模型组比较,##P<0.01。

hibitor组和顾步汤+miR-155 inhibitor组的上清液中IL-4和IL-10的浓度显著升高(P<0.05和P<0.01)。见表2。

2.4　顾步汤对巨噬细胞表型的影响

与空白组相比,模型组CD96表达及CD86/CD206比值显著升高,而CD206表达显著下降(P<0.01)。与模型组相比,顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤+miR-155 inhibitor组CD86表达和CD86/CD206比值下降,且CD206表达升高(P<0.01)。见图3、表3。

表2　顾步汤对炎症因子含量的影响(pg/mL,n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of Gubu Decoction on inflammatory factor content(pg/mL,n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6	IL-1β	IL-4	IL-10
空白组	8.39±0.87	28.04±4.35	28.28±1.03	80.87±9.96
模型组	28.45±2.51**	66.57±9.97**	9.81±1.62**	38.34±4.91**
顾步汤组	18.64±2.66##	55.25±5.32##	16.39±1.78##	50.34±1.78##
miR-155 inhibitor组	19.76±3.92##	49.58±6.18##	11.12±1.09#	50.69±2.01#
顾步汤+miR-155 inhibitor组	9.87±1.73##	32.11±1.35##	19.91±2.36##	63.87±3.42##
F	40.800	36.564	62.042	92.242
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,**P<0.01;与模型组比较,#P<0.05,##P<0.01。

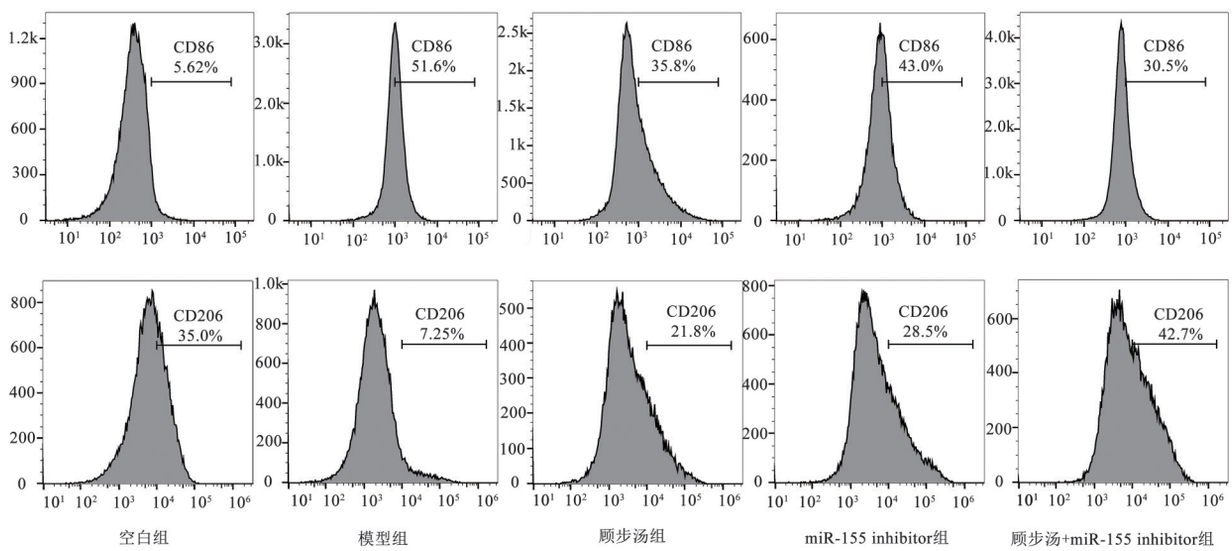


图3　各组巨噬细胞CD86和CD206表达的比较

Fig 3　Comparison of CD86 and CD206 expression in macrophages between different groups

2.5　顾步汤对巨噬细胞标记分子表达的影响

与空白组相比,模型组iNOS和COX-2表达上升,而Arg-1和YM-1表达下降(P<0.01)。相较于模型组,顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤+miR-155 inhibitor组iNOS和COX-2表达降低,同时Arg-1和YM-1表达上升(P<0.01)。见表4。

2.6　顾步汤对miR-155和FGF7表达的影响

与空白组相比,模型组miR-155表达升高,而FGF7的表达水平下降(P<0.01)。相较于模型组,顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤+miR-155 inhibitor组的巨噬细胞中miR-155的表达水平均显著降低,同时FGF7的表达水平显著升高(P<

表3 顾步汤对巨噬细胞表型的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of Gubu Decoction on macrophage phenotype (n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	CD86	CD206	CD86/CD206
空白组	5.62±1.23	35.00±1.67	0.16±0.04
模型组	51.60±3.61**	7.25±0.98**	7.11±0.72**
顾步汤组	35.80±2.23##	21.80±1.06##	1.64±0.21##
miR-155 inhibitor组	43.00±2.71##	28.50±1.32##	1.51±0.19##
顾步汤+miR-155 inhibitor组	30.50±1.87##	42.70±2.15##	0.71±0.12##
F	116.512	313.878	433.633
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,**P<0.01;与模型组比较,##P<0.01。

表4 顾步汤对巨噬细胞极化标记分子表达的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effect of Gubu Decoction on the expression of polarization marker molecules in macrophages (n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	iNOS	COX-2	Arg-1	YM-1
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	4.31±0.12**	3.89±0.22**	0.12±0.03**	0.23±0.05**
顾步汤组	3.15±0.09##	3.41±0.21##	0.54±0.04##	0.76±0.06##
miR-155 inhibitor组	3.21±0.08##	3.35±0.24##	0.59±0.08##	0.78±0.05##
顾步汤+miR-155 inhibitor组	1.52±0.04##	1.36±0.09##	0.91±0.05##	0.89±0.09##
F	315.285	496.637	83.698	38.911
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,**P<0.01;与模型组比较,##P<0.01。

0.01)。见表5。

2.7 顾步汤对FGF7蛋白表达的影响

与空白组相比,模型组中FGF7的表达水平显著降低(P<0.01)。与此同时,与模型组进行比较,顾步汤组、miR-155 inhibitor组及顾步汤与miR-155 inhibitor联合组的FGF7表达均显著上升(P<0.01)。见表6、图4。

表5 顾步汤对巨噬细胞miR-155和FGF7表达的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab 5 Effects of Gubu Decoction on the expression of miR-155 and FGF7 in macrophages (n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	miR-155相对表达	FGF7相对表达
空白组	1.00±0.01	1.00±0.02
模型组	3.30±0.19**	0.18±0.03**
顾步汤组	2.72±0.09##	0.45±0.05##
miR-155 inhibitor组	2.89±0.11##	0.49±0.06##
顾步汤+miR-155 inhibitor组	1.24±0.05##	0.71±0.05##
F	515.210	369.441
P	<0.001	<0.001

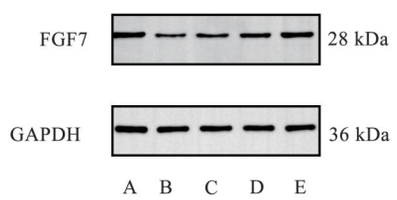
注:与空白组比较,**P<0.01;与模型组比较,##P<0.01。

表6 顾步汤对巨噬细胞FGF7蛋白表达的的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Tab 6 Effect of Gubu Decoction on FGF7 protein expression in macrophages(n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	FGF7/GAPDH
空白组	0.92±0.16
模型组	0.24±0.05**
顾步汤组	0.49±0.08##
miR-155 inhibitor组	0.51±0.06##
顾步汤+miR-155 inhibitor组	0.83±0.14##
F	42.212
P	<0.001

注:与空白组比较,**P<0.01;与模型组比较,##P<0.01。



A:空白组;B:模型组;C:顾步汤组;D:miR-155 inhibitor组;E:顾步汤+miR-155 inhibitor组

图4 顾步汤对FGF7蛋白表达的比较

Fig 4 Comparison of Gubu Decoction on FGF7 protein expression

3 讨论

DFU的发生主要源自于持续的高血糖状态,这一过程涉及复杂的病理机制,涵盖多种细胞类型与分子,并受到表观遗传调控的影响[7]。在DFU愈合的过程中,巨噬细胞扮演着至关重要的角色,而高血糖及氧化应激将对其表观遗传调控产生影响,促使巨噬细胞出现极化现象。巨噬细胞极化状态与DFU炎症持续时间关系密切,而炎症窗口期的延长则是DFU愈合延迟的主要病理因素[8]。通常情况下,巨噬细胞极化常表现为促炎性M1型与抑炎性M2型,且其表型会根据DFU愈合阶段的不同而发生变化。M1型巨噬细胞通过CD68、iNOS和COX2等分子,分泌细胞因子如IL-6、IL-1β和TNF-α,发挥其在免疫监控中的作用,调节创伤愈合的过程[9]。M2型巨噬细胞通过CD206、Arg-1和YM-1等分子,分泌IL-4与IL-10等细胞因子,发挥抗炎特性。在持续的高血糖状态下,巨噬细胞的表型转变受到限制,M1型巨噬细胞的滞留时间明显延长,而M2型巨噬细胞则表现出相对较短的滞留期。因此,溃疡的愈合时长在很大程度上取决于M2型巨噬细胞在溃疡组织中的主导时间[10]。随着炎症反应的减轻,创面组织内的巨噬细胞数量逐渐减少,M1型巨噬细胞转变为M2型巨噬细胞的过程得以实现[11]。研究结果证实,经高糖作用下,巨噬细胞主要分化成M1型,大量产生IL-6和IL-1β。而顾步汤可上调CD206、Arg-1和YM-1表达,降低CD68、iNOS和COX2表达,促进巨噬细胞从M1型向M2型转化,发挥其抗炎疗效。

微小RNA(miRNA)是一个重要的内源性非编码小RNA家族,其长度通常介于18~25个核苷酸之间,并广泛分布于真核生物之中。在细胞核中,初级miRNA经过加工,形成具备茎环或发夹结构的前体miRNA。这些前体miRNA可通过相关转运从细胞核转移至细胞质中,进一步加工为成熟miRNA[12]。成熟的miRNA通过特异性结合于下游3′非翻译区域,发挥其在转录后抑制mRNA翻译或促进mRNA降解的功能,从而对其病理生理效应产生影响。近期的研究逐渐揭示出,在DFU愈合过程中,尤其是在炎症阶段,miRNA发挥着重要作用。miRNA可通过靶向调节多种转录因子,控制巨噬细胞极化,从而调节炎症反应的全过程。作为一种多功能的miRNA,目前miR-155已被证实能够调控巨噬细胞极化,在M2型向M1型转换时表现为高表达状态,而在M1型向M2型转换时则表达较低[13]。*FGF7*作为miR-155的重要调控靶基因,在细胞增殖迁移及组织愈合中具有重要意义[14]。研究表明,miR-155在糖尿病小鼠的溃疡组织中呈现高表达状态,显示出促炎效应,延迟创面再上皮化过程[15]。而当敲除*miR-155*基因后,小鼠溃疡组织中M1型巨噬细胞会逐渐降低,M2型巨噬细胞逐渐升高,致创面炎症反应症状缓解,增强创面的修复能力[16]。

顾步汤作为一种经典的中药方剂,主要用于治疗DFU,其关键成分为黄芪。黄芪以其益气、排脓生肌及利水消肿的功效而著称。研究表明,黄芪中含有的多糖APS2-1能够有效增强机体的非特异性免疫和体液免疫功能,促进表皮生长因子及细胞周期调控蛋白的分泌,进而有利于表皮细胞和血管的再生,改善创伤愈合的进程[17]。此外,黄芪还富含黄芪甲苷及多种有效成分,具有增强患者免疫力及修复血管损伤的药理作用[18]。牛膝通过化瘀活血、滋肝补肾的功效与人参协同作用,而人参则可补益气血。这种组合能够温和清热,同时具备一定的泻阴火及补元气的功能,因而被视为治疗创伤的良药。根据张筱茜等[19]的研究,通过网络药理学分析发现,牛膝中所含的槲皮素能够有效保护胰岛β细胞免受高糖等因素的损害[20],减轻氧化应激对细胞的影响,并抑制炎症反应[21]。此外,槲皮素通过下调促炎因子及上调抗炎因子的方式[22],降低创伤愈合过程中出现的过度炎症反应[23]。人参的主要活性成分为人参总皂苷,其通过抑制炎症反应及细胞内钙离子流入,从而改善微循环及氧化应激状态[24]。有研究显示[25],人参皂苷不仅可以诱导骨髓间充质干细胞,降低DFU模型大鼠血清中炎症因子水平,提升生长因子含量,并下调Wnt通路上下游相关蛋白表达,加速DFU愈合。此外,当归亦能起到补益气血的作用,而金银花、石斛、蒲公英及紫花地丁则被认为具有清热利湿及解毒的功效。药理学研究表明,金银花中的主要成分绿原酸能够通过调节内皮细胞损伤中的内皮素-1与一氧化氮的平衡,改善微血管内皮细胞的损伤,促进周围神经的血液及氧气供应,从而在DFU的创面愈合中发挥及其重要作用[26]。本研究结果表明,顾步汤能够显著降低miR-155的表达水平,同时上调FGF7的表达,从而促进巨噬细胞由M1型极化向M2型极化的转变。

综上所述,基于之前的研究成果,进一步阐释

了顾步汤在改善DFU中的分子机制及其相关作用靶点。研究结果表明,顾步汤可靶向调节miR-155/FGF7信号通路相关因子表达,促进M2型巨噬细胞极化,发挥其抑制炎症的能力,从而起到改善DFU作用。

作者贡献度说明:

王继雪:设计实验,文稿撰写;袁星星、夏联恒:细胞实验和指标检测;杨稀瑞,王思琦:统计分析;周涛,燕树勋:最后校审。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Sk A, Vijayakumar C, Nelson T, et al. A study on prevalence, profile, and risk factors of developing fungal infection in patients with diabetic foot ulcer [J]. Wound Manag Prev, 2023, 69(3): 11-17.

2 Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.

3 Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence [J]. N Engl J Med, 2017, 376(24): 2367-2375.

4 Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, et al. A guiding map for inflammation [J]. Nat Immunol, 2017, 18(8): 826-831.

5 王继雪,杨稀瑞,马海涛,等.基于网络药理学探讨顾步汤治疗糖尿病足溃疡作用机制[J].中国中医药信息杂志, 2023, 30(12):16-24.
Wang JX, Yang XR, Ma HT, et al. Exploring the mechanism of Gubu Decoction in treating diabetes foot ulcer based on network pharmacology [J]. Chin J Tradit Chin Med Inf, 2023,30(12): 16-24.

6 贺争鸣.实验动物管理与使用指南[M].北京:科学出版社,2016:142-150.
He ZM. Guidelines for the management and use of experimental animals [M]. Beijing: Science Press, 2016:142-150.

7 张道英,杨燕玲,黄浩,等.糖尿病足病理机制与治疗方法研究进展[J].沈阳药科大学学报,2021,38(6): 636-642.
Zhang DY, Yang YL, Huang H, et al. Research progress on pathological mechanism and treatment of diabetes foot [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2021, 38(6): 636-642.

8 Wu K, Lin K, Li X, et al. Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1731.

9 Chiaranunt P, Tai SL, Ngai L, et al. Beyond immunity: Underappreciated functions of intestinal macrophages [J]. Front Immunol, 2021, 12:749708.

10 胡啸明,柳国斌.巨噬细胞自噬极化效应在糖尿病性溃疡愈合中的作用及中医药应用展望[J].海南医学院学报,2020,26(12):950-954.
Hu XM, Liu GB. The role of macrophage autophagy polarization effect in the healing of diabetes ulcer and prospects for the application of traditional Chinese medicine [J]. J Hainan Med Univ, 2020, 26 (12): 950-954.

11 Yu Q, Wang Y, Dong L, et al. Regulations of glycolytic activities on macrophages functions in tumor and infectious inflammation [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:287.

12 Partin AC, Zhang K, Jeong BC, et al. Cryo-EM structures of human drosha and DGCR8 in complex with primary microRNA [J]. Mol Cell, 2020, 78(3): 411-422.

13 Nampoothiri SS, Rajanikant GK. miR-9 upregulation integrates post-ischemic neuronal survival and regeneration *in vitro* [J]. Cell Mol Neurobiol, 2019, 39 (2): 223-240.

14 Moura J, Sørensen A, Leal EC, et al. microRNA-155 inhibition restores fibroblast growth factor 7 expression in diabetic skin and decreases wound inflammation [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5836.

15 Guo J, Hu Z, Yan F, et al. *Angelica dahurica* promoted angiogenesis and accelerated wound healing in db/db mice *via* the HIF-1α/PDGF-β signaling pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 160: 447-457.

16 Pan X, Yang L, Wang S, et al. Semaglutide alleviates inflammation-induced endothelial progenitor cells injury by inhibiting miR-155 expression in macrophage exosomes [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 119: 110196.

17 赵秉江.黄芪多糖促进皮肤伤口愈合的作用及其相关机制的研究[D].兰州大学, 2017.
Zhao BJ. Research on the effect and related mechanisms of *Astragalus* polysaccharides in promoting skin wound healing [D]. Lanzhou University, 2017.

18 邵长鑫,林欢欢,靳晓杰,等.黄芪的炮制历史沿革及现代研究进展[J].中草药,2023,54(15):5057-5074.
Shao CX, Lin HH, Jin XJ, et al. The historical evolution and modern research progress of Huangqi processing [J]. Chin Herbal Med, 2023, 54 (15): 5057-5074.

19 张筱茜,范琦琛,王艮一,等.基于网络药理学和分子对

接探讨三妙丸治疗糖尿病足溃疡的作用机制[J].中医临床研究,2023,15(26):98-103.

Zhang XQ, Fan QC, Wang GY, et al. Based on network pharmacology and molecular docking, explore the mechanism of Sanmiao Pill in treating diabetes foot ulcer [J]. Clin Res Tradit Chin Med, 2023, 15 (26): 98-103.

20 李文雯,钟大鹏,张卫,等.槲皮素对糖尿病大鼠胰岛β细胞损伤的保护作用及机制研究[J].广西医科大学学报,2021,38(2):298-303.

Li WW, Zhong DP, Zhang W, et al. The protective effect and mechanism of Quercetin on pancreatic islet β cell injury in diabetes rats [J]. J Guangxi Med Univ, 2021,38 (2): 298-303.

21 Sela A, Shkuri N, Tish N, et al. Carboxymethyl chitosan-Quercetin conjugate: A sustainable one-step synthesis and use for food preservation [J]. Carbohydr Polym, 2023, 316: 121084.

22 王程,窦文芳,何丽丽.微生物糖基转移酶催化合成槲皮素糖苷及其抗炎活性评价[J].生物技术进展,2020,10(2):170-175.

Wang C, Dou WF, He LL. Microbial glycosyltransferase catalyzed synthesis of Quercetin glycoside and evaluation of its anti-inflammatory activity [J]. Adv Biotechnol, 2020, 10(2): 170-175.

23 谭睿陟.槲皮素通过抑制Mincle/Syk/NF-κB信号途径维护的巨噬细胞炎症改善急性肾损伤的作用研究[D].泸州:西南医科大学,2020.

Tan RZ. Study on the effect of Quercetin on improving acute kidney injury by inhibiting macrophage inflammation maintained by the Mingle/Syk/NF-κB signaling pathway [D]. Luzhou: Southwest Medical University, 2020.

24 任李梅,杨松,卢姝言,等.人参总皂苷在巨噬细胞RAW264.7中降低脂多糖诱导的炎症和氧化应激[J].中国医院药学杂志,2022,42(9):896-901.

Ren LM, Yang S, Lu SY, et al. Ginsenosides reduce lipopolysaccharide induced inflammation and oxidative stress in macrophages RAW264.7 [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(9): 896-901.

25 马红伟,刘攀云,张雅琼.人参皂苷诱导骨髓间充质干细胞干预糖尿病大鼠皮肤溃疡的愈合及Wnt/β-catenin信号表达[J].中国组织工程研究,2019,23(33):5300-5306.

Ma HW, Liu PY, Zhang YQ. Ginsenoside induces bone marrow mesenchymal stem cells to interfere with the healing of skin ulcers and Wnt/β-catenin signal expression in diabetes rats [J]. China Tissue Eng Res, 2019, 23(33): 5300-5306.

26 牟天易,汤洋,曾勇,等.中药水煎液冲洗联合负压伤口治疗对糖尿病足创面的疗效及病理观察[J].解放军医学院学报,2021,42(9):927-954.

Mou TY, Tang Y, Zeng Y, et al. The curative effect and pathological observation of the treatment of diabetes foot wounds with Chinese medicine decoction flushing combined with negative pressure wound [J]. J PLA Med Univ, 2021,42 (9): 927-954.

[本文编辑] 宋睿璞 朱金月