

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.36.009

基于 MEBT/MEBO 的 ERK1/2 和 p38 信号通路与糖尿病足免疫表达关系的研究*

吴标良¹, 唐乾利^{2△}, 覃晓洁^{3▲}, 冯烈⁴, 王民登¹, 何明杰¹, 吕震⁵

(1. 右江民族医学院附属医院内分泌科, 广西百色 533000; 2. 右江民族医学院附属医院外科, 广西百色 533000; 3. 右江民族医学院附属医院重症医学科, 广西百色 533000; 4. 暨南大学第一临床医学院内分泌科, 广州 510632; 5. 广西中医药大学第一附属医院外科, 南宁 530023)

[摘要] 目的 观察烧伤皮肤再生医疗技术[湿润暴露疗法(MEBT)/湿润烧伤膏(MEBO)]对糖尿病足部创面组织细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 和 p38 信号通路分子及免疫表达的调控作用及关系, 探讨 MEBT/MEBO 对糖尿病足溃疡的修复机制。

方法 糖尿病足患者 40 例予 MEBT/MEBO 干预治疗, 留取治疗前后创面组织行免疫组化检测 ERK1/2 和 p38 信号通路关键分子 ERK1/2、p38、促分裂原活化蛋白激酶(MAPKK6)、原癌基因(c-myc)、Akt、活化复制因子 2 抗体(ATF2)及免疫因子 IgA、IgM、IgG、C3c、C4c 表达情况, 并观察二者间关系。结果 经 MEBT/MEBO 治疗后, 39 例患者足部创面面积有不同程度缩小, 仅 1 例患者无明显变化, 显效 14 例(35.00%), 有效 25 例(62.50%), 无效 1 例(2.50%)。治疗前后信号通路分子全阳性表达、免疫阳性表达(任一指标)及免疫阳性表达(具体指标)比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 在创面信号通路分子表达阳性率升高的同时, 免疫因子阳性表达率亦升高。治疗前创面组织可见免疫因子极少量分布, 治疗后创面组织免疫因子 IgA、IgM、IgG、C3c、C4c 呈广泛、弥漫分布。治疗前创面组织可见信号分子极少量分布, 治疗后创面组织信号通路分子 ERK1/2、p38、MAPKK6、c-myc、Akt、ATF2 呈广泛、弥漫分布。结论 MEBT/MEBO 可能促进了糖尿病足创面 ERK1/2 和 p38 信号通路分子及免疫表达, ERK1/2 和 p38 信号通路及其交互作用可能通过增加创面组织免疫表达而促进了糖尿病足创面的愈合。

[关键词] 糖尿病足; 烧伤皮肤再生医疗技术; 细胞外信号调节激酶 1/2;p38; 免疫

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5069-03

The relationship between ERK1/2 and p38 signaling pathway with the immune expression of diabetic based on MEBT/MEBO*

Wu BiaoLiang¹, Tang QianLi^{2△}, Qin XiaoJie^{3▲}, Feng Lie⁴, Wang MingDeng¹, HE MingJie¹, Lv Zhen⁵

(1. Department of Endocrine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Department of Surgery, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 3. Department of ICU, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 4. Department of Endocrine, the First Clinical Medical College of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China; 5. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530023, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulation on extracellular signal regulated kinase(ERK)1/2 and p38 signaling pathways and immune expression by moist exposed burn therapy/moist exposed burn ointment(MEBT/MEBO)in diabetic foot and their relationship, to explore the repair mechanism of MEBT/MEBO on diabetic foot ulcers. **Methods** Totally 40 diabetic foot patients were treated by MEBT/MEBO, to take wound tissue before and after treatment and detect the expression of ERK1/2, p38, MAPKK6, c-myc, Akt, ATF2, IgA, IgM, IgG, C3c and C4c by immunohistochemistry, to investigate their relationship. **Results** After treatment with MEBT/MEBO, the area of foot wounds in 39 patients was reduced in different degree. Only one patient had no obvious change, 14 patients(35.00%) were markedly effective, 25 patients(62.50%) and 1 patient(2.50%) were ineffective. Before and after treatment, all positive expression, positive immunoreactivity(any index) and positive expression(specific index) of signal pathway molecules were statistically significant($P < 0.05$). While the positive rate of molecular expression in wound pathway increased, the positive expression rate of immune factor increased. Before treatment, a small amount of immune factors were found in the wound tissue. After treatment, the immune factors IgA, IgM, IgG, C3c, C4c were distributed widely and diffusely. Before treatment, the wound tissue showed a very small number of signal molecules. After treatment, the signal pathway molecules MEBT/MEBO and p38, MAPKK6, c-myc, Akt, ATF2 showed broad and diffuse distribution. **Conclusion** MEBT/MEBO may promote the expression of ERK1/2 and p38 signaling molecules and immune in diabetic foot, p38 and ERK1/2 signaling pathway may promote the healing of diabetic foot wound by increasing the expression of immune.

[Key words] diabetic foot; burn skin regenerative medical technique; extracellular signal regulated kinase 1/2;p38; immune

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360547);2013 年广西自然科学基金重点项目(2013GXNSFDA019020)。 作者简介:吴标良(1978—),副主任医师,博士,主要从事内分泌代谢性疾病研究。 △ 通讯作者, E-mail: htmgx@163.com。 ▲ 通讯作者, E-mail: yyqinxj@163.com。

糖尿病足已成为糖尿病的主要严重并发症之一,临幊上尚无特效治疗方法,最终有较高比例患者需要截肢^[1-2]。目前已有多项研究表明,细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 和 p38 信号通路及其交互作用在促进伤口愈合中起着非常关键的作用^[3-4],基于免疫机制推测,在溃疡创面形成及愈合过程中,免疫可能发挥重要的防御、保护作用。本研究拟通过观察湿润暴露疗法(MEBT)/湿润烧伤膏(MEBO)对糖尿病足创面 ERK1/2 和 p38 信号通路分子及免疫因子的表达调控与二者间的关系,从而探讨 MEBT/MEBO 促进糖尿病足溃疡创面的修复机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1 月至 2014 年 6 月于右江民族医学院附属医院和广西中医药大学一附属医院内分泌科确诊 2 型糖尿病(T2DM)并糖尿病足患者 40 例,男 24 例,女 16 例,年龄 33~72 岁,平均(52.83±10.95)岁。符合 WHO 1999 T2DM 及糖尿病足诊断标准^[5]。临幊上具有严重心脏、肝脏、肾脏疾病患者或急性脑血管意外、创伤、免疫系统疾病及肿瘤、精神病史及近 1 年内有服用类固醇激素、抗生素等用药史的患者予以排除,治疗过程中死亡患者亦予不能入选。研究获得医院伦理委员会批准且经患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本取材 采用常规方法清理创面,然后在治疗前取创面肌肉肉芽组织。按 MEBT/MEBO 操作规程处理创面:依据创面大小取适量 MEBO(汕头经济特区美宝制药厂生产,国药准字 Z20000004),作成 MEBO 纱条,均匀覆盖在溃疡面上,2 次/天换药,一直到溃疡创面愈合;若创面有较多坏死组织时,先清理,经 10~14 d 治疗后再次取创面组织。同时予常规血糖、血压和血脂控制,并酌情予以改善循环、抗感染等处理。

1.2.2 疗效判定

1.2.2.1 创面面积变化评估 痊愈:创面完全愈合,临幊症状消失;显效:创面缩小大于或等于 75%,临幊症状消失;有效:创面缩小大于或等于 25%,临幊症状改善;无效:创面缩小不足 25%,临幊症状无改善。

1.2.2.2 疗效指数评估 参考《中药新药临床研究指导原则》(2002 年)相关标准进行综合评价。见表 1。

1.2.3 生化项目检测 清晨空腹采血 3~5 mL,静置 30 min,然后进行离心(3 000 r/min)5 min,取血清检测糖化血红蛋白(HbA1c,高效液相色谱分析法)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C, IFCC 推荐修正法)、三酰甘油(TG, GPO-PAP 法)等生化指标,由专人使用美国贝克曼 COULTER LX20 全自动生化分析系统测定。

1.2.4 免疫组化检测 创面组织标本行免疫组化染色,采用多聚物酶 EliVision 法测定通路信号分子 ERK1/2、p38、促分裂原活化蛋白激酶(MAPKK6)及其底物分子原癌基因(c-myc)、Akt、活化复制因子 2 抗体(ATF2)和免疫指标 IgA、IgM、IgG、C3c、C4c 的表达情况,先取材,然后行石蜡切片,并按试剂盒(immunoway 试剂盒)说明书免疫组化操作。细胞膜、细胞质、细胞间质等部位出现褐色沉着为免疫组化阳性反应,可为连续线状、不连续点状弥漫分布。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 t 检验,计数资料用率表

示,比较使用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

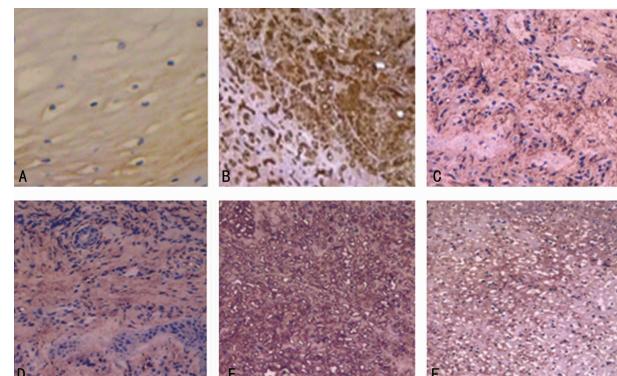
2 结 果

2.1 生化指标及临床疗效观察 40 例患者糖尿病病程(8.03±3.68)年,收缩压(135.38±12.45)mm Hg,舒张压(78.15±8.42)mm Hg, HbA1c(8.05±2.49)%, TC(5.29±2.49)mmol/L, LDL(2.60±1.19)mmol/L, TG(2.23±2.15)mmol/L, 无因各种原因而中途退出研究患者。经 MEBT/MEBO 治疗后,39 例患者足部创面面积有不同程度缩小,仅 1 例患者无明显变化,显效 14 例(35.00%),有效 25 例(62.50%),无效 1 例(2.50%)。

表 1 临床创面疗效评价表

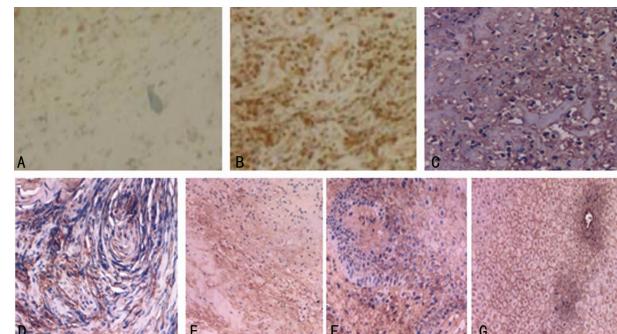
疗效	创面情况	疗效分数
痊愈	愈合	90%~100%
显效	明显缩小	60%~89%
有效	有所缩小、上皮生长	30%~59%
无效	同治疗前或甚于治疗前	<30%

2.2 治疗前后 ERK1/2 和 p38 信号通路分子阳性表达及免疫表达变化 治疗前后信号通路分子全阳性表达、免疫阳性表达(任一指标)及免疫阳性表达(具体指标)比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),在创面信号通路分子表达阳性率升高的同时,免疫因子阳性表达率亦升高。见表 2。



A:治疗前;B:治疗后 IgA(+);C:治疗后 IgM(+);D:治疗后 IgG(+);E:治疗后 C3c(+);F:治疗后 C4c(+)。

图 1 治疗前后免疫因子的表达



A:治疗前;B:治疗后 ERK1/2(+);C:治疗后 p38(+);D:治疗后 MAPKK6(+);E:治疗后 c-myc(+);F:治疗后 Akt(+);G:治疗后 ATF2(+)。

图 2 治疗前后信号分子的表达

2.3 免疫组化检测 治疗前创面组织可见免疫因子极少量分布,治疗后创面组织免疫因子 IgA、IgM、IgG、C3c、C4c 呈广泛、弥漫分布。治疗前创面组织可见信号分子极少量分布,治疗后创面组织信号通路分子 ERK1/2、p38、MAPKK6、c-myc、Akt、ATF2 呈广泛、弥漫分布。见图 1、2。

表 2 创面信号通路分子与免疫表达变化

组别	信号分子	免疫阳性表达	免疫阳性表达(具体指标)				
	全阳性表达	(任一指标)	IgA	IgM	IgG	C3c	C4c
治疗前	9	5	4	2	4	1	0
治疗后	26	26	25	21	23	15	10
χ^2	14.679	9.025	9.028	7.739	5.062	4.119	3.145
P	0.000 1	0.002 4	0.002 1	0.003 0	0.015 1	0.022 1	0.036 3

3 讨 论

由于其复杂的发病机制,糖尿病足是一种目前机制尚未完全阐明的糖尿病严重并发症,同时临幊上也还没有确切、有效的治疗手段^[6-8]。目前临幊上对糖尿病足的治疗多采用在代谢控制的基础上予改善循环、创面局部换药等手段进行综合的治疗,其中创面处理是糖尿病足治疗的重要手段。在临幊中,可有多种方法对糖尿病足创面进行处理,但长期临幊实践表明,传统的中医中药疗法通过去腐生肌等作用机制,在促进溃疡创面愈合方面有其较为突出的治疗效果。MEBO 组方均为传统中医中药,MEBT/MEBO 由 MEBO 发展而来,其以 MEBO 为主要的治疗药物,中医机制上采用 MEBT 为治则,简称 MEBT/MEBO,临幊上已经有 20 余年的实践历史,被认为是中医药外治治疗溃疡创面的较好方法之一^[9]。目前有多项临幊研究表明,MEBT/MEBO 对糖尿病足创面的治疗亦有较好的临床效果^[10-11],本研究结果显示,采用 MEBT/MEBO 治疗糖尿病足创面,创面面积明显缩小,显效率达 35%,有效率达 62.5%,再次证实了 MEBT/MEBO 对糖尿病足创面的较好疗效。

作为 MAPK 类激酶,已有研究表明,ERK1/2 和 p38 信号通路在伤口创面修复中起着较为关键的作用^[3-4],同时研究表明抑制 p38 及 ERK1/2 信号通路或者过度激活 p38 信号通路可以致使创面愈合时间延迟或导致愈合后瘢痕形成^[12-13]。还有研究表明,ERK1/2 及 p38 可发生交互作用,致使 c-myc、Akt 及 ATF2(下游重要目标分子)被调控,进一步对溃疡创面愈合的生理过程发挥调控作用^[14]。从免疫学机制上得知,免疫在维持机体健康和稳定过程中发挥着重要的防御及保护作用,糖尿病足形成是一种机体健康组织受破坏的生理过程,在糖尿病患者足部受到外来感染等不良侵蚀时,机体可通过增强局部免疫,清除局部坏死腐败组织,维护健康组织的稳定,从而参与溃疡创面的修复过程。本研究显示,经 MEBT/MEBO 治疗后,创面组织 ERK1/2 和 p38 信号通路关键分子 ERK1/2、p38、MAPKK6、c-myc、Akt、ATF2 阳性表达明显升高,且与此同时,免疫因子 IgA、IgM、IgG、C3c、C4c 的阳性表达率亦明显上升,表明 MEBT/MEBO 可能促进了糖尿病足创面 ERK1/2 和 p38 信号通路分子及免疫表达,ERK1/2 和 p38 信号通路及其交互作用可能通过增加创面组织免疫表达而促进了糖尿病足溃疡创面的愈合。

受医学伦理及科研条件所限,尚还无法建立空白对照组进行对比研究,ERK1/2 和 p38 信号通路的研究还没有足够深入,研究缺陷拟在后续建立动物模型研究中进一步深入探讨及完善。

参考文献

[1] 王学伟. 生肌膏治疗糖尿病足的疗效观察[J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 114-115.

- [2] Yang WY, Lu JM, Weng JP, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [3] Loughlin DT, Artlett CM. Modification of collagen by 3-deoxyglucosone alters wound healing through differential regulation of p38 MAP kinase[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e18676.
- [4] Chiu WC, Lin JY, Lee TS, et al. β -glycoprotein I inhibits VEGF-induced endothelial cell growth and migration via suppressing phosphorylation of VEGFR2, ERK1/2, and Akt[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1/2): 9-15.
- [5] 陈灏珠, 钟南山, 陆再英. 内科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 739.
- [6] Oliveira AF, De Marchi AC, Leguisamo CP, et al. Estimate of cost for diabetic foot treatment; how to prevent it and save funds[J]. Cien Saude Colet, 2014, 19(6): 1663-1671.
- [7] Hassan MI, Hammad KM, Fouad MA, et al. The using of Lucilia cuprina maggots in the treatment of diabetic foot wounds[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2014, 44(1): 125-129.
- [8] Füessl HS. Fulminant infection in diabetic foot syndrome [J]. MMW Fortschr Med, 2014, 156(7): 34.
- [9] 卢栋, 郭璐, 唐乾利, 等. MEBT/MEBO 治疗慢性难愈合创面 60 例临床疗效观察[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2010, 22(5): 346-350.
- [10] 李杰辉, 张力, 唐乾利, 等. 湿润烧伤膏治疗神经性溃疡临床疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 1095-1096.
- [11] 唐乾利, 韩珊珊, 付军, 等. MEBT/MEBO 对皮肤创面愈合过程中 VEGF、bFGF、EGF mRNA 表达影响的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(5): 597-601.
- [12] Chen WL, Lin CT, Li JW, et al. ERK1/2 activation regulates the wound healing process of rabbit corneal endothelial cells[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(2): 103-111.
- [13] Huh JE, Nam DW, Baek YH, et al. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(1): 46-54.
- [14] Chiacchiera F, Grossi V, Cappellari M, et al. Blocking p38/ERK crosstalk affects colorectal cancer growth by inducing apoptosis in vitro and in preclinical mouse models[J]. Cancer Lett, 2012, 324(1): 98-108.

(收稿日期:2016-07-16 修回日期:2016-10-03)