

• 诊治分析 •

糖尿病足溃疡患者外周血 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体表达变化及临床意义

胡美娇, 杨晓春, 李芳琴, 苏蒙, 陈悦霞

【关键词】 糖尿病; 足溃疡; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素氧合酶-1; NLRP3

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.07.021

【中图分类号】 R587.2 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)07-0917-04

糖尿病足是糖尿病严重并发症之一, 下肢血管病变形成微循环障碍, 导致溃疡和坏疽^[1]。糖尿病足溃疡 (DFU) 是糖尿病足最常见的表现形式, 如若创面出现继发性感染, 不及时控制病情, 软组织感染将进一步侵袭骨质, 造成骨髓炎, 危及生命^[2]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体是固有免疫的重要组分, 在多种炎症性疾病的发生发展中发挥重要作用^[3]。Lee 等^[4]研究表明, DFU 患者体内存在明显的 NLRP3 炎性小体活化。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是 NLRP3 炎性小体上游的调控因子, 被激活可增加血红素氧合酶-1 (HO-1) 表达, 提高细胞抗氧化能力, 进而抑制 NLRP3 炎性小体^[5]。目前有关 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体通路与 DFU 严重程度及骨髓炎发病的临床研究较少。因此, 本研究观察 DFU 不同严重程度及伴有骨髓炎患者 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体表达情况, 以期为 DFU 的临床防治提供参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 前瞻性纳入 2019 年 11 月至 2023 年 12 月诊断为 DFU 患者 95 例 (DFU 组), 并纳入同期 60 例 2 型糖尿病无足溃疡患者 (单纯糖尿病组) 和 60 例糖耐量正常 (空腹血糖 < 6.1 mmol/L, 糖负荷后 2 h 血糖 < 7.8 mmol/L) 的健康人群, 分别作单纯糖尿病组和对照组。DFU 组纳入标准: (1) 符合 2 型糖尿病及 DFU 诊断标准^[6], 年龄 18 ~ 75 岁; (2) 足溃疡 Wagner 分级 II ~ IV 级。排除标准: (1) 存在

癌性溃疡创面; (2) 伴有其他糖尿病并发症; (3) 严重心、肝、肾功能不全; (4) 合并自身免疫疾病、严重脓毒症; (5) 意识不清, 无法正常沟通; (6) 妊娠或哺乳期女性。DFU 患者根据足溃疡 Wagner 分级, 分为 II 级组 (15 例)、III 级组 (57 例) 和 IV 级组 (23 例), 分级越高表明病变程度越严重。DFU 患者根据是否合并骨髓炎, 分为骨髓炎组 (55 例) 和非骨髓炎组 (40 例)。本研究获得杭州市中医院科研伦理委员会通过, 所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 样本采集与处理 研究对象入院 24 h 内, 采集空腹外周静脉血 5 ml, 其中 3 ml 抗凝处理后, 按 1:1 比例混入外周血淋巴细胞分离液, 分离外周血单个核细胞, 用于炎性小体表达检测, 剩余 2 ml 常规分离血清, 用于炎症因子水平检测。

1.3 外周血炎性小体表达检测 提取外周血单个核细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 进行反转录反应, 再根据荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 建立反应体系, Nrf2 上游引物序列 5'-TATAGCGTGCAAACCTCGCC-3', 下游引物序列 5'-AAGTGACTGA-AACGTAGCCG-3'; HO-1 上游引物序列 5'-CGGGCC-AGCAACAAAGTG-3', 下游引物序列 5'-AGTGTAAGGACCCATCGGAGAA-3'; NLRP3 上游引物序列 5'-CATGAGTGCTGCTTGACAT-3', 下游引物序列 5'-GCTTCAGTCCCACACAGA-3'; 内参上游引物序列 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3', 下游引物序列 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3', 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。以 95 °C 预变性 120 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环为

作者单位: 310007 杭州, 杭州市中医院

通信作者: 胡美娇, Email: humeijiao1982@126.com

反应条件,进行荧光定量 PCR 扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Nrf2、HO-1 及 NLRP3 mRNA 水平。

1.4 血清炎症因子水平检测 取分离血清,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.5 统计方法 采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组一般资料比较 DFU 组男 52 例,女 43 例;年龄 42 ~ 73 岁,平均 (55.7 $\pm$ 10.2) 岁。单糖尿病组男 34 例,女 26 例;年龄 37 ~ 75 岁,平均 (54.2 $\pm$ 11.9) 岁。对照组男 37 例,女 23 例;年龄 34 ~ 75 岁,平

均 (56.2 $\pm$ 8.6) 岁。DFU 组、单纯糖尿病组及对照组性别及年龄差异均无统计学意义 ($\chi^2=0.73$ 、 $F=0.67$, 均 $P > 0.05$)。

2.2 3 组外周血炎性小体及炎症因子水平比较 与对照组比较,单纯糖尿病组和 DFU 组外周血 Nrf2、HO-1 mRNA 水平降低,NLRP3 mRNA、血清 IL-1 β 及 TNF- α 水平均增高 (均 $P < 0.05$);与单纯糖尿病组比较,DFU 组 Nrf2、HO-1 mRNA 水平降低,NLRP3 mRNA、IL-1 β 及 TNF- α 水平均增高 (均 $P < 0.05$),见表 1。

2.3 不同 Wagner 分级患者外周血炎性小体及炎症因子水平比较 不同 Wagner 分级患者外周血 Nrf2、HO-1、NLRP3 mRNA、血清 IL-1 β 及 TNF- α 水平差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),见表 2。

2.4 DFU 患者外周血炎性小体及炎症因子水平与 Wagner 分级的相关性 DFU 患者外周血 Nrf2、HO-1 mRNA 水平与 Wagner 分级均呈负相关 ($r=-0.571$ 、

表 1 3 组外周血炎性小体及炎症因子水平比较

指标	DFU 组 (n=95)	单纯糖尿病组 (n=60)	对照组 (n=60)	F 值	P 值
Nrf2 mRNA	0.52 $\pm$ 0.15 ^{ab}	0.73 $\pm$ 0.18 ^a	1.00 $\pm$ 0.21	135.90	< 0.05
HO-1 mRNA	0.45 $\pm$ 0.12 ^{ab}	0.66 $\pm$ 0.19 ^a	1.00 $\pm$ 0.17	227.27	< 0.05
NLRP3 mRNA	1.94 $\pm$ 0.31 ^{ab}	1.62 $\pm$ 0.29 ^a	1.00 $\pm$ 0.24	198.53	< 0.05
IL-1 β (pg/ml)	25.51 $\pm$ 6.83 ^{ab}	18.87 $\pm$ 5.21 ^a	9.25 $\pm$ 2.34	163.43	< 0.05
TNF- α (pg/ml)	61.36 $\pm$ 15.54 ^{ab}	37.79 $\pm$ 8.66 ^a	17.42 $\pm$ 4.06	274.88	< 0.05

注:与对照组比较,a $P < 0.05$;与单纯糖尿病组比较,b $P < 0.05$;NLRP3 为核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3,Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2,HO-1 为血红素氧合酶-1,IL-1 β 为白细胞介素 1 β ,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α

表 2 不同 Wagner 分级患者外周血炎性小体及炎症因子水平比较

指标	II 级组 (n=15)	III 级组 (n=57)	IV 级组 (n=23)	F 值	P 值
Nrf2 mRNA	0.61 $\pm$ 0.17	0.54 $\pm$ 0.13	0.41 $\pm$ 0.10 ^{ab}	12.37	< 0.05
HO-1 mRNA	0.57 $\pm$ 0.14	0.46 $\pm$ 0.11 ^a	0.35 $\pm$ 0.09 ^{ab}	18.38	< 0.05
NLRP3 mRNA	1.85 $\pm$ 0.24	1.92 $\pm$ 0.21	2.05 $\pm$ 0.32 ^{ab}	3.52	< 0.05
IL-1 β (pg/ml)	22.67 $\pm$ 5.28	25.18 $\pm$ 5.67	28.18 $\pm$ 7.11 ^{ab}	4.06	< 0.05
TNF- α (pg/ml)	56.21 $\pm$ 10.25	60.58 $\pm$ 11.37	66.65 $\pm$ 16.50 ^a	3.37	< 0.05

注:与 II 级组比较,a $P < 0.05$;与 III 级组比较,b $P < 0.05$;NLRP3 为核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3,Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2,HO-1 为血红素氧合酶-1,IL-1 β 为白细胞介素 1 β ,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α

-0.524, 均 $P < 0.05$), NLRP3 mRNA、血清 IL-1 β 及 TNF- α 水平与 Wagner 分级均呈正相关 ($r=0.601$ 、0.455、0.416, 均 $P < 0.05$)。

2.5 是否合并骨髓炎患者外周血炎性小体及炎症因子水平比较 与非骨髓炎组比较,骨髓炎组外周血 Nrf2、HO-1 mRNA 水平降低,NLRP3 mRNA、血清 IL-1 β 及 TNF- α 水平均增高 (均 $P < 0.05$),见表 3。

表 3 是否合并骨髓炎患者外周血炎性小体及炎症因子水平比较

指标	骨髓炎组 (n=55)	非骨髓炎组 (n=40)	t 值	P 值
Nrf2 mRNA	0.46 $\pm$ 0.14	0.60 $\pm$ 0.18	4.26	< 0.05
HO-1 mRNA	0.39 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.16	5.06	< 0.05
NLRP3 mRNA	2.03 $\pm$ 0.35	1.82 $\pm$ 0.25	3.24	< 0.05
IL-1 β (pg/ml)	27.32 $\pm$ 7.55	23.02 $\pm$ 6.20	2.95	< 0.05
TNF- α (pg/ml)	64.58 $\pm$ 16.17	56.93 $\pm$ 13.38	2.44	< 0.05

注: NLRP3 为核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, HO-1 为血红素氧合酶-1, IL-1 β 为白细胞介素 1 β , TNF- α 为肿瘤坏死因子 α

3 讨论

随着炎症免疫研究的进展,越来越多研究指出固有免疫细胞炎性体介导的炎症反应在糖尿病中占据关键地位^[7]。当机体感受应激,NLRP3 可与凋亡相关斑点样蛋白、半胱氨酸蛋白酶 1 前体(pro-caspase-1)结合,促进 caspase-1 的成熟,从而促进 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的合成与释放,介导一系列炎症反应^[8]。“炎症学说”是糖尿病病理生理机制的重要观点,可介导氧化应激引起血管内皮功能障碍,从而促进血管病变发生发展。Nrf2 是抗氧化调节因子,可与含有抗氧化剂反应元件的启动子区结合,转录 HO-1、超氧化物歧化酶等多种抗氧化基因,提高细胞抗氧化应激能力^[9]。基础研究表明,激活 Nrf2/HO-1 信号通路的抗氧化活性,可保护内皮细胞功能,抑制氧化损伤,促进 DFU 创面愈合^[10]。同时,研究证实 Nrf2 与 NLRP3 的活化呈负相关,激活 Nrf2 表达,可抑制 NLRP3 活化^[11]。Zhang 等^[12]研究显示调节 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体通路,发挥抗氧化和抗炎作用,可改善糖尿病视网膜病变。本研究结果显示,DFU 和单纯糖尿病患者 Nrf2、HO-1 mRNA 水平较糖耐量正常健康人群显著降低,NLRP3 mRNA、IL-1 β 及 TNF- α 水平较正常健康人群显著增高,且 DFU 患者 Nrf2、HO-1 mRNA 水平较单纯糖尿病患者降低,NLRP3 mRNA、IL-1 β 及 TNF- α 水平较单纯糖尿病患者升高。这说明 DFU 的发生可能与抗氧化水平降低,NLRP3 炎性小体活化有关,由此推断,抑制 Nrf2/HO-1 通路,可激活 NLRP3 炎性小体,进一步促进下游炎症信号通路的爆发,参与 DFU 发病,这与文献^[13]报道基本相符。

本研究结果显示不同 Wagner 分级患者外周血 Nrf2、HO-1、NLRP3 mRNA、IL-1 β 及 TNF- α 水平存在明显差异,IV 级组 Nrf2、HO-1 mRNA 水平更低,NLRP3 mRNA、IL-1 β 及 TNF- α 水平更高。进一步相关性分析结果显示,DFU 患者外周血 Nrf2、HO-1 mRNA 水平与 Wagner 分级呈负相关,NLRP3 mRNA、血清 IL-1 β 及 TNF- α 水平与 Wagner 分级呈正相关(均 $P < 0.05$)。这表明 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体表达与 DFU 病情严重程度密切相关。糖尿病患者体内血糖长期处于较高水平,新陈代谢和内

分泌系统紊乱,会引起一系列神经病变和组织慢性损伤及功能障碍^[7]。感染是影响 DFU 患者预后的主要因素,患者足部远端感染后若没有及时治疗,病原菌可进入骨髓内部,导致骨髓炎症,这是 DFU 感染较为严重的一种临床症状^[14-15]。因此,临床应积极防控 DFU 患者发生骨髓炎,避免 DFU 病情恶化,从而加大治愈难度。本研究结果显示 DFU 进展为骨髓炎患者 Nrf2、HO-1 mRNA 水平进一步降低,NLRP3 mRNA、IL-1 β 及 TNF- α 水平进一步上升,提示体内氧化应激和炎症反应水平加重也参与骨髓炎的发病。

本研究为单中心研究,且观察样本偏少,可能造成数据偏倚,需要多中心、大样本研究来证实;而且本研究结论也无法说明 Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体通路与 DFU、糖尿病足骨髓炎间的因果关系,还需要更多基础实验进一步确认相关机制。此外,Nrf2/HO-1/NLRP3 炎性小体通路表达情况是否可服务于临床 DFU 监测,还需进一步探讨。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] 吴然,白姣姣,赵楠,等.纠正可改变的足溃疡的危险因素是预防糖尿病足的关键[J].中华糖尿病杂志,2021,13(5):454-456.
- [2] 王岗,岳仁宋,龚光明.糖尿病足溃疡愈合后复发危险因素的病例对照研究[J].中国全科医学,2023,26(15):1857-1862.
- [3] YU Z W, ZHANG J, LI X, et al. A new research hot spot: The role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications[J]. Life Sci, 2020, 240: 117138.
- [4] LEE M K S, SREEJIT G, NAGAREDDY P R, et al. Attack of the NETs! NETosis primes IL-1 β -mediated inflammation in diabetic foot ulcers[J]. Clin Sci (Lond), 2020, 134(12): 1399-1401.
- [5] DING X, ZHAO H, QIAO C. Icaritin protects podocytes from NLRP3 activation by Sesn2-induced mitophagy through the Keap1-Nrf2/HO-1 axis in diabetic nephropathy[J]. Phytomedicine, 2022, 99: 154005.
- [6] 贾伟平,陆菊明.中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)编写说明[J].中华糖尿病杂志,2018,10(1):2-3.
- [7] 陈待庆,郑健生,谢可,等.系统免疫炎症指数、C 反应蛋白/清蛋白比值评估糖尿病足溃疡病情严重程度和预后的价值[J].中国感染控制杂志,2023,22(8):901-906.
- [8] BAI B, YANG Y, WANG Q, et al. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 776.
- [9] 郭楠,李彩娜,张艳霞,等.基于 Nrf2/ARE 信号通路改善糖尿病周围神经病变的中药有效成分的研究进展[J].中国临床药理学杂志,2020,36(22):3838-3843.
- [10] LIN S, ZHANG Q, LI S, et al. Antioxidative and angiogenesis-promoting effects of tetrahedral framework nucleic acids in diabetic wound healing with activation of the Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J].

- ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(10): 11397-11408.
- [11] 胡俊, 饶紫兰, 陈江木, 等. 水飞蓟素通过调控 Nrf2 抗氧化通路抑制 NLRP3 炎症小体改善非酒精性脂肪性肝病[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 971-977.
- [12] ZHANG Y, GAO Z, GAO X, et al. Tiliacin protects diabetic retina through the modulation of Nrf2/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathways[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2020, 39(1): 89-99.
- [13] SUN X, WANG X, ZHAO Z, et al. Paeoniflorin inhibited nod-like receptor protein-3 inflammasome and NF- κ B-mediated inflammatory

- reactions in diabetic foot ulcer by inhibiting the chemokine receptor CXCR2[J]. Drug Dev Res, 2021, 82(3): 404-411.
- [14] 申金付, 蒋瑞妹, 王卓群, 等. 糖尿病足患者的死亡相关危险因素分析[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(2): 90-94.
- [15] 李萌, 张会峰, 肖二辉, 等. 糖尿病足患者骨髓炎病原菌分布特点及药敏分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(2): 120-126.

收稿日期: 2024-03-05

(本文编辑: 陈志翔)

两种前臂微型游离皮瓣修复手指创面的临床疗效比较

毛幸, 蔡晓斌, 吴凌峰, 江洵, 蓝益南, 刘舜平, 吴炳林

【关键词】 腕横纹皮瓣; 静脉皮瓣; 手指创面; 临床疗效

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.07.022

【中图分类号】 R622⁺.1 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)07-0920-04

手指软组织缺损常伴有骨骼、肌腱、血管和神经损伤。皮瓣移植能为这些结构的重建提供良好的软组织覆盖, 是临床常用修复方法。然而, 由于手指组织致密且局部组织较少, 带蒂皮瓣转移不仅无法修复较大面积的创面, 而且还会导致较为明显的供区病损。因此, 吻合血管的游离皮瓣移植在手指创面修复中显得尤为重要。它不仅可修复创面, 还能对神经、血管、肌腱进行精准的重建^[1]。随着皮瓣外科的不断发展, 已有很多游离皮瓣用于修复手指, 比如尺动脉穿支皮瓣、足底内侧皮瓣、腓总动脉穿支皮瓣及静脉皮瓣等^[2-4], 但对其优越性比较的报道较少。本文尝试对比桡动脉掌浅支皮瓣与前臂游离静脉皮瓣在手指创面修复中的应用效果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 8 月至 2021 年 6 月丽水市中心医院收治的采用游离腕横纹皮瓣与前臂静脉皮瓣修复手指创面的患者。纳入标准: (1) 年龄 18 ~ 65 岁; (2) 无重大基础疾病; (3) 依从性良好。排除标准: (1) 有重大基础疾病不能耐受手术; (2) 依从性较差。其中采用游离腕横纹皮瓣修复的患者 23

例, 设为 A 组; 采用游离前臂静脉皮瓣修复的患者 19 例, 设为 B 组, 两组一般资料见表 1。本研究获得丽水市中心医院伦理委员会批准, 所有研究对象均自愿参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 方法 在臂丛神经阻滞麻醉下进行, 上臂使用充气式止血带。术区常规刷洗、消毒、铺巾。彻底清创后处理合并伤, 无缺损的行 I 期修复; 有缺损的清创后等待移植重建, 于创面游离出可供吻合的动脉 1 条、静脉 1 ~ 2 条。所有皮瓣切取完毕后先闭合供区以减少出血。

A 组采用游离腕横纹皮瓣。探查桡骨茎突处桡动脉搏动点, 连接舟骨结节, 此为桡动脉掌浅支体表投影。根据创面大小、形状, 以桡动脉掌浅支为中心设计皮瓣, 较创面扩大 10% ~ 20%。首先切开皮瓣前缘, 在深筋膜下向桡侧游离皮瓣; 然后在桡侧腕屈

表 1 两组一般资料

指标	A 组	B 组
年龄(岁)	39.8±9.1	36.9±10.3
性别(男/女, 例)	15/8	15/4
吸烟(是/否, 例)	10/13	9/10
手指(例)		
拇指	5	4
示指	7	5
中指	6	5
环指	4	4
小指	1	1
随访时间(个月)	9.58±1.42	10.03±1.60

作者单位: 323000 浙江省丽水, 丽水市中心医院

通信作者: 蔡晓斌, Email: caixiaobin1974@163.com