

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250429.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250429.1548.002>

紫朱软膏抑制 PAD4 介导的 NETs 形成促进糖尿病小鼠创面愈合的机制研究

孙 健, 游 洋, 樊炜静, 袁美杰, 王宏飞, 柳国斌✉

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 探讨紫朱软膏(Zizhu Ointment, ZZO)通过抑制肽基精氨酸脱氨酶 4(PAD4)介导的中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)从而促进糖尿病小鼠创面愈合中的作用机制。**方法:** 采用糖尿病创面小鼠模型, 将 48 只 C57/BL6J 雄性小鼠随机分为 4 组, 包括正常创面组、糖尿病创面组、ZZO 治疗组及贝复济治疗组, 每组 12 只。在不同时间点(0、3、7 和 14 d)拍照记录创面愈合情况, 并分析各组创面愈合率的差异。采用 H&E 染色分析创面炎症细胞聚集情况; 免疫荧光分析创面 NETs 分布; Western blot 检测创面 Cit-H3/H3 比例; 免疫组化法检测 PAD4、NOD 样受体基因家族 P3(NLRP3)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的蛋白表达; RT-qPCR 法检测 PAD4、NLRP3 和 IL-1 β mRNA 的水平。**结果:** 糖尿病创面组创面愈合率明显低于正常创面组($P < 0.01$), ZZO 治疗组创面愈合率明显高于糖尿病创面组($P < 0.01$), 且在第 7 天愈合效果优于贝复济治疗组($P < 0.05$)。ZZO 可抑制糖尿病小鼠创面炎症细胞聚集($P < 0.01$)及 NETs 的形成($P < 0.01$), 降低 PAD4、NLRP3 和 IL-1 β 的蛋白表达($P < 0.01$)和 mRNA 的水平($P < 0.01$)。**结论:** ZZO 可能通过抑制 PAD4 介导的 NETs 形成以及炎症因子 NLRP3 和 IL-1 β 的释放, 从而促进糖尿病小鼠创面愈合。

[关键词] 糖尿病足溃疡; 紫朱软膏; 中性粒细胞胞外陷阱(NETs); 肽基精氨酸脱氨酶 4(PAD4); NOD 样受体基因家族 P3(NLRP3); 白细胞介素 1 β (IL-1 β)

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)15-1155-11

Study on the mechanism of Zizhu Ointment in promoting wound healing in diabetic mice by inhibiting PAD4-mediated NETs formation

SUN Jian, YOU Yang, FAN Weijing, YUAN Meijie, WANG Hongfei, LIU Guobin✉

(Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82274528); Pudong New Area Health Committee Health and Family Planning Research Project (PW2020E-4); Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine(20DZ2272200)

[Author]: SUN Jian, Associate Chief Physician, E-mail: yamaca@163.com.

[Correspondence to]: LIU Guobin, Ph.D., Chief Physician, Doctoral Supervisor, E-mail: 15800885533@163.com.

Received: 2025-01-25 **Revised:** 2025-04-13

JHMu, 2026;32(15);1155-1165

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which Zizhu Ointment (ZZO) promotes wound healing in diabetic mice by inhibiting neutrophil extracellular traps (NETs) mediated by peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4). **Methods:** A diabetic wound mouse model was used, and 48 male C57/BL6J mice were randomly divided into 4 groups: the normal wound group, the diabetic wound group, the ZZO treatment group, and the Beifuji treatment group, with 12 mice in each group. Wound healing was recorded by photography at different time points (0, 3, 7, and 14 days), and the differences in wound healing rates among the groups were analyzed. H&E staining was used to analyze the aggregation of inflammatory cells in the wound. Immunofluorescence

[基金项目] 国家自然科学基金(82274528);浦东新区卫生健康委员会卫生计生科研项目(PW2020E-4);上海市中医临床重点实验室科研项目(20DZ2272200)

[作者简介] 孙健,副主任医师,E-mail:yamaca@163.com。

[通讯作者] 柳国斌,博士,主任医师,博士生导师,E-mail:15800885533@163.com。

[收稿日期] 2025-01-25 **[修回日期]** 2025-04-13 **网络出版时间:** 2025-04-29 16:45:23

was used to analyze the distribution of NETs in the wound. Western blot was used to detect the Cit-H3/H3 ratio in the wound. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of PAD4, NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), and Interleukin-1 β (IL-1 β). RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of *PAD4*, *NLRP3*, and *IL-1 β* . **Results:** The wound healing rate of the diabetic wound group was significantly lower than that of the normal wound group ($P < 0.01$). The wound healing rate of the ZZO treatment group was significantly higher than that of the diabetic wound group ($P < 0.01$), and the healing effect was better than that of the Beifuji treatment group on day 7 ($P < 0.05$). ZZO could inhibit the aggregation of inflammatory cells ($P < 0.01$) and the formation of NETs ($P < 0.01$) in the wounds of diabetic mice, and reduce the protein expression ($P < 0.01$) and mRNA levels ($P < 0.01$) of PAD4, NLRP3, and IL-1 β . **Conclusion:** ZZO may promote wound healing in diabetic mice by inhibiting PAD4-mediated NETs formation and the release of inflammatory factors NLRP3 and IL-1 β .

[**Key words**] Diabetic foot ulcer; Zizhu Ointment; Neutrophil extracellular traps (NETs); Peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4); NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3); Interleukin-1 β (IL-1 β)

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcers, DFU)作为糖尿病常见的一种严重慢性并发症,是糖尿病患者致残、截肢甚至死亡的主要原因之一^[1-3]。其治疗的最大难题是反复的慢性炎症导致的创面迁延不愈^[4,5]。近期的研究显示,中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)过度产生与糖尿病足溃疡创面炎症期延长乃至停滞存在密切关联,是阻碍创面修复的主要原因之一^[6,7]。

肽基精氨酸脱亚氨酶4(peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)是一种参与蛋白质瓜氨酸化修饰的酶,可在钙离子存在的情况下将蛋白质精氨酸残基转化为瓜氨酸残基,并在多种生理和病理过程中发挥重要作用。研究表明, PAD4在NETs的形成过程中发挥着关键作用^[8]。PAD4被激活后,可促进组蛋白瓜氨酸化,导致组蛋白解聚,使染色质结构松散,进而促使DNA与组蛋白等成分释放到细胞外,形成NETs^[9]。研究发现,抑制PAD4的表达或活性可以明显减轻炎症反应和组织损伤。在糖尿病小鼠模型中,抑制PAD4活性已被证实可以抑制NETs的形成,从而促进创面愈合^[10]。

在中医理论中,糖尿病足溃疡属于“脱疽”和“筋疽”等范畴,其治疗原则主要包括清热解毒、活血化瘀和祛腐生肌等^[11]。紫朱软膏(Zizhu Ointment, ZZO)是上海中医药大学附属曙光医院周围血管病外科的经验方,具有清热解毒、祛腐生肌等功效,并在治疗糖尿病足溃疡等慢性创面方面取得了良好的临床疗效^[12-14]。前期研究显示,紫朱软膏能够明显缩短糖尿病足溃疡的炎症期,降低创面NETs和炎症因子水平,并促进创面愈合^[15]。在此基础上,本研究采用糖尿病创面小鼠模型,旨在从动物水平进一步揭示紫朱软膏治疗糖尿病足溃疡的作用机制,为临床应用提供更深入的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本研究选取了48只8周龄的SPF级

C57/BL6J雄性小鼠,体重23~28 g,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司,安置于上海中医药大学实验动物中心的SPF级饲养室内,饲养条件如下:温度(23 $\pm$ 2)℃,相对湿度55% $\pm$ 5%,12 h光照与12 h黑暗循环。在饲养期间,小鼠可自由获取饲料和水,垫料每3天更换1次,以维持饲养环境的清洁。在正式实验开始前,小鼠进行了为期1周的适应性饲养,以确保其健康状况并降低环境变化对实验结果的潜在影响。所有实验操作严格遵循国家及上海中医药大学实验动物中心的动物使用管理规定,且实验方案已获得上海中医药大学实验动物伦理委员会的审查批准(伦理编号:PZSHUTCM2212140011)。

1.1.2 药物与试剂 紫朱软膏(批号:130301)是上海中医药大学附属曙光医院的院内制剂,由武汉马应龙药业集团股份有限公司生产。其主要成分包括黄芪(1.5%)、朱砂(3.5%)、阿胶(2.5%)、紫草(1.5%)、龙血竭(3%)、冰片(0.5%),以及白凡士林、羊毛脂等辅料。贝复济(外用重组牛碱性成纤维细胞生长因子, recombinant bovine basic fibroblast growth factor for external use, bFGF)由珠海亿胜公司生产,国药准字为S10980077,规格为21 000 U/支。高脂饲料(货号:FB-D12451)购自上海帆泊生物技术有限公司。链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 货号:ST1668-1g)则购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

本研究中所使用的抗体,包括PAD4抗体(货号:17373-1-AP)、髓过氧化物酶(MPO)抗体(货号:66177-1-Ig)、NLRP3抗体(货号:19771-1-AP)、IL-1 β 抗体(货号:26048-1-AP)、Histone H3抗体(货号:17168-1-AP)、GAPDH抗体(货号:10494-1-AP)以及HRP标记羊抗兔二抗(货号:SA00001-2),均购自美国Proteintech公司。此外,兔抗人citrulline-Histone H3-R2/R8/R17(CitH3)抗体(货号:A18298)则购自武汉爱博泰克生物科技有限公

司(ABclonal Technology)。

苏木素-伊红(H&E)染色试剂盒(货号:M020)购自上海歌凡生物科技有限公司。免疫荧光染色试剂盒,包括抗小鼠Alexa Fluor 488(货号:P0188)和抗兔Alexa Fluor 555(货号:P0179),均购自上海碧云天生物技术有限公司。免疫组化试剂盒(货号:D601037)购自上海生工生物工程有限公司。此外, RNA提取试剂盒(货号:DP451)、Quant cDNA第一链合成试剂盒(货号:KR103)以及荧光定量预混试剂(货号:FP205)均购自天根生化科技(北京)公司。

1.1.3 主要仪器 Centrifuge5810型高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;IX71荧光显微镜,日本Olympus公司;Mini-PROTEAN®Tetra垂直电泳仪及Trans-BlotSD半干转膜仪,美国Bio-Rad公司; Tanon 4600化学发光成像分析仪,上海天能科技有限公司;ABI7500荧光定量PCR仪,美国Applied Biosystems公司。

1.2 动物造模

1.2.1 小鼠糖尿病创面模型 小鼠经8周高脂饮食喂养后,采用1.5%的STZ溶液(由柠檬酸和柠檬酸钠配制,剂量为40 mg/kg)进行腹部注射,连续注射5 d。在STZ注射1周后,测量小鼠的随机血糖水平。当血糖值达到16.7 mmol/L以上且维持稳定1周时,再次检测随机血糖,以确认模型的稳定性。随后,去除小鼠背部的毛发,并使用异氟烷气体(由恒丰强生物技术有限公司提供)进行吸入麻醉。在小鼠背部皮肤上标记一个直径为1.5 cm的圆形区域,并沿着该标记切除皮肤全层。

1.2.2 小鼠普通创面模型 对照组小鼠仅接受普通饲料喂养,未接受STZ处理。与此同时,按照“1.2.1”节所述的步骤构建小鼠普通创面模型。

1.3 动物分组及给药

小鼠随机分为4组,每组12只。分组情况如下:正常创面(normal wounds,NW)组,仅使用生理盐水处理;糖尿病创面(diabetic wounds,DW)组,仅使用生理盐水处理;糖尿病创面紫朱软膏治疗(diabetic wounds+Zizhu Ointment,DWZ)组,局部外用紫朱软膏(剂量为0.032 g/cm²,均匀涂抹于创面);糖尿病创面贝复济治疗(diabetic wounds+bFGF,DWB)组,局部外用贝复济(剂量为2喷/cm²,均匀覆盖创面)。皮肤创面模型建立成功后,每日换药一次,持续14 d。

1.4 组织标本采集

在小鼠创面模型建立后的4个时间点(0、3、7和14 d,分别标记为d₀、d₃、d₇和d₁₄),对创面进行拍照以

监测愈合进程。在每个时间点,每组随机选取3只小鼠,采用脊椎脱臼法处死,并收集伤口组织样本,每组共收集3份样本。其中一份组织样本置于4%多聚甲醛溶液中保存,用于后续组织学检测;另外2份样本则迅速置于液氮中保存,用于检测组织中的mRNA和蛋白质表达。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 创面愈合率(wound healing rate, WHR)计算 在测定创面愈合率时,首先在干预后的第0天、第3天、第7天和第14天对小鼠创面进行标准化摄影。随后,借助ImageJ软件对拍摄的创面图像进行分析,以确定各时间点的溃疡面积(wound area, WA)。愈合率的计算公式为: $WHR_x = (WA_0 - WA_x) / WA_0 \times 100\%$, WA₀为创面初始面积, WA_x为特定时间点(3、7、14 d)的创面面积, WHR_x为相应时间点的愈合率。

1.5.2 H&E染色 组织样本首先在4%多聚甲醛溶液中进行固定,随后依次经过洗涤、脱水、透明化处理,并浸入石蜡中进行包埋。将包埋好的蜡块标本使用切片机切成薄片,然后将薄片烤固于载玻片上。接着,对薄片进行脱蜡和水化处理,以便进行H&E染色。染色完成后,对切片进行透明化处理并封片,随后使用显微镜进行拍照。最终,将图像通过ImageView图像分析系统进行保存和分析。每个标本随机选取5个视野进行拍照并进行统计分析。

1.5.3 相关基因mRNA表达检测 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR),首先,将标本置于液氮中研磨,随后利用RNA提取试剂盒分离总RNA,并为每个样本设置3个生物学重复。接着,将提取的RNA逆转录为cDNA,并按照荧光定量预混试剂说明书进行荧光定量PCR分析。PCR反应采用3步法程序:首先,在95℃下预变性15 min;其次,在95℃下变性10 s;接着,在60℃下退火20 s;最后,在72℃下延伸32 s,循环40次。在本实验中,以GAPDH基因为内参照基因,用于标准化各实验样本的基因表达水平。各检测基因的引物序列见表1。

1.5.4 免疫荧光检测 蜡块样本切成薄片后,首先进行烤片处理以固定切片。随后,样本依次经过脱蜡和水化处理,为抗原修复做准备。接着,样本进行一抗孵育,随后进行荧光标记的二抗孵育。之后,使用DAPI对细胞核进行染色,样本随后被密封,准备用于荧光显微镜成像。成像后的图像通过

表1 引物序列
Tab 1 Primer sequence

基因	正向引物序列(5'~3')	反向引物序列(5'~3')
<i>PADI4</i>	CCTACAGGTGAAAGCAGCCA	TCAAAGTCCATTCCGGAGGC
<i>NLRP3</i>	TCAAAGTCCATTCCGGAGGC	ACAGATTGAAGTAAGGCCGG
<i>IL-1β</i>	ATGAAAGACGGCACACCCAC	GCTTGTGCTCTGCTTGTGAG
<i>GAPDH</i>	AAGAGGGATGCTGCCCTTAC	GTTCACACCGACCTTCACCA

ImageView 图像分析系统进行保存和分析。在分析过程中,随机选取 5 个视野,以 CitH3 和 MPO 双阳性细胞占 MPO 阳性细胞的比例作为 NETs 相对含量的评估指标。

1.5.5 免疫组化检测 前期处理过程直至一抗孵育均与“1.5.4”节所述的免疫荧光检测步骤一致。随后,切片使用 HRP 标记的羊抗兔二抗进行孵育。之后,切片经过 DAB 显色和苏木精复染。经过乙醇的连续脱水步骤后,标本用中性树脂进行封片。随机选取 5 个视野在光学显微镜下观察并拍照,使用 ImageJ 图像处理软件对获得的图像进行光密度分析。

1.5.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 组织样本首先使用 PBS 进行洗涤,随后在液氮中研磨以释放蛋白,接着按照蛋白抽提试剂盒的指南提取蛋白。4℃条件下 12 000 r/min 离心,去除沉淀后,按照蛋白定量试剂盒说明书操作,测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样本,加入上样缓冲液,于 100℃变性 10 min,再 4℃下 12 000 r/min 离心去除沉淀。将变性后的蛋白进行 SDS-PAGE 分离,采用半干转移法将蛋白转至 PVDF 膜。PVDF 膜经蛋白封闭后,进行一抗孵育以结合目标蛋白,随后用 TBST 漂洗去除未结合的抗体,再进行二抗孵育,再次用 TBST 漂洗去除未结合的二抗。最后,将 PVDF 膜浸入 ECL 溶液中显影,使用化学发光成像仪捕获图像。

1.6 统计学处理

实验数据通过 SPSS 27.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据之间比较,采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 紫朱软膏对糖尿病小鼠创面愈合的影响

在创面愈合率方面,DW 组相较于 NW 组,在 d_3 ($P < 0.05$) 和 d_7 ($P < 0.05$) 表现出明显降低,而在 d_{14} ($P < 0.01$) 则呈现出更为明显的降低趋势。进一步对比发现,DWZ 组在 d_7 ($P < 0.05$) 和 d_{14} ($P < 0.05$) 的创面愈合率相较于 DW 组有明显提升;DWB 组在 d_{14} ($P < 0.05$) 的创面愈合率也较 DW 组明显提高。此外,在 d_7 ,DWZ 组的创面愈合效率较 DWB 组更高 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

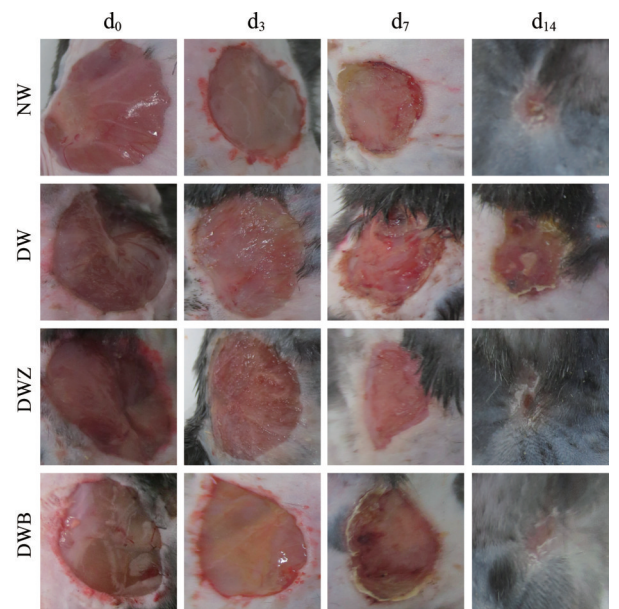


图1 紫朱软膏对糖尿病小鼠创面愈合的影响
Fig 1 The impact of ZZO on the healing of diabetic wounds

表2 各组创面愈合率比较 (% , $n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab 2 Comparison of ulcer healing rate in different groups of wounds (% , $n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	d_3	d_7	d_{14}
NW 组	10.93±3.40	60.50±5.06	92.37±2.45
DW 组	4.77±1.86*	40.40±2.32*	63.73±2.01**
DWZ 组	7.40±1.19	62.50±3.18 ^{#△}	90.47±0.74 ^{##}
DWB 组	7.13±1.22	47.00±2.35 [#]	90.83±2.78 ^{##}
<i>F</i>	2.88	19.47	82.87
<i>P</i>	0.103	0.000	0.000

注:与 NW 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DW 组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 DWB 组相比,[△] $P < 0.05$ 。

2.2 紫朱软膏对糖尿病小鼠创面炎性细胞的影响

为了探究紫朱软膏对糖尿病小鼠创面组织中炎性细胞的影响,在创面修复期的炎症阶段(d_3)和修复阶段(d_7)收集了各组创面组织的标本,并进行了 H&E 染色以评估炎性细胞的数量。结果显示,与 NW 组相比,DW 组、DWZ 组和 DWB 组在 d_3 和 d_7 创面的炎性细胞(主要为中性粒细胞)计数均明显增加($P<0.01$)。进一步分析发现,DWZ 组创面的炎性细胞计数在 d_3 和 d_7 均较 DW 组明显降低($P<0.01$),而 DWB 组创面的炎性细胞计数仅在 d_7 时较 DW 组明显减少($P<0.05$)。此外,DWZ 组创面的炎性细胞计数在 d_3 和 d_7 均较 DWB 组明显降低

($P<0.01$)。见图 2、表 3。

2.3 紫朱软膏对糖尿病小鼠创面组织 NETs 的影响

为了观察紫朱软膏对糖尿病小鼠创面组织 NETs 的影响,选择 d_3 和 d_7 各组创面组织标本进行 MPO/瓜氨酸化组蛋白 H3(Cit-H3)免疫荧光染色,观察各组创面 NETs 的变化。结果显示,与 NW 组相比,DW 组和 DWB 组在 d_3 和 d_7 期创面 NETs 细胞数均明显升高($P<0.01$)。进一步分析发现,DWZ 组在 d_3 和 d_7 创面 NETs 细胞数较 DW 组明显降低($P<0.01$),且与 DWB 组相比,DWZ 组在 d_3 和 d_7 创面 NETs 细胞数也明显减少($P<0.01$)。见图 3、表 4。

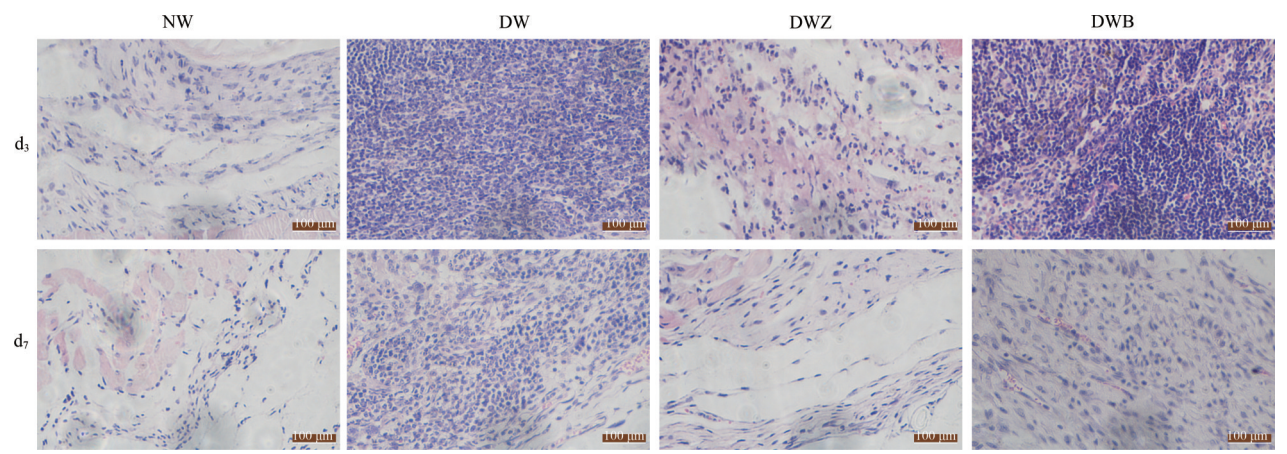


图 2 紫朱软膏对糖尿病创面炎性细胞数的影响($\times 100$,比例尺=100 μm)

Fig 2 The effect of ZZO on the number of inflammatory cells in diabetic wounds($\times 100$, Scale bar=100 μm)

表 3 各组创面炎性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of inflammatory cell numbers in different groups of wounds($\bar{x} \pm s$)

组别	$n \times$ 视野数	d_3	d_7
NW 组	3×5	30.33 ± 18.02	20.73 ± 12.43
DW 组	3×5	$175.40 \pm 48.29^{**}$	$109.27 \pm 32.16^{**}$
DWZ 组	3×5	$104.27 \pm 20.31^{**\#\Delta\Delta}$	$54.33 \pm 16.47^{**\#\Delta\Delta}$
DWB 组	3×5	$158.87 \pm 47.82^{**}$	$79.00 \pm 19.62^{**\#}$
F		44.74	42.76
P		0.000	0.000

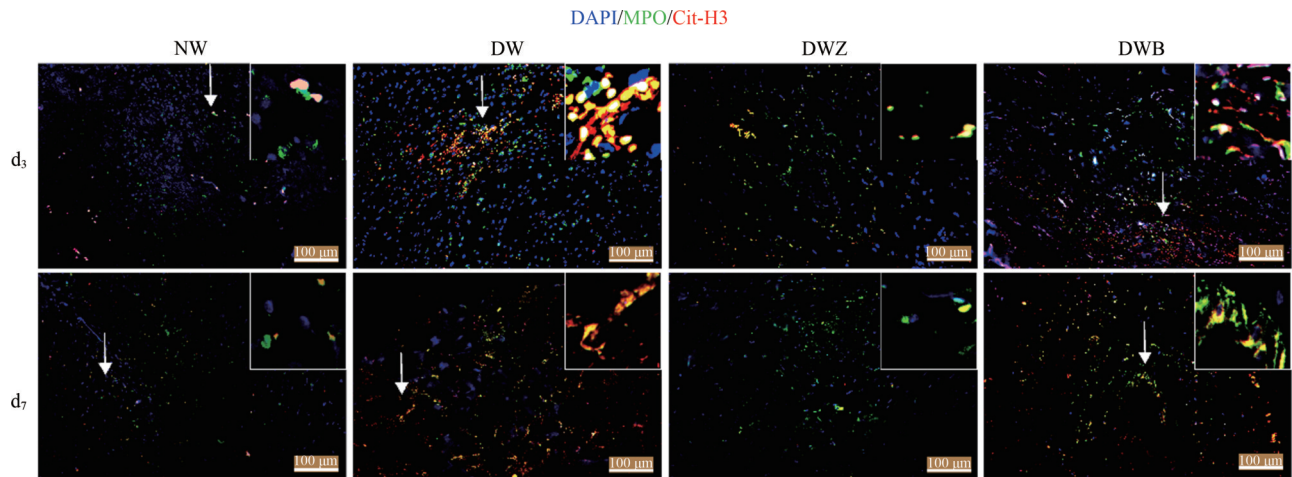
注:与 NW 组相比, $^{**}P<0.01$;与 DW 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$;与 DWB 组相比, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

此外,本研究通过 Western blot 测定了创面组织中 Cit-H3 和总组蛋白 H3 的含量,并依据 Cit-H3/H3 比值来分析创面 NETs 的情况。结果显示,与 NW 组相比,DW 组在 d_3 期创面组织的 Cit-H3/H3 比值明显升高($P<0.05$),在 d_7 期创面组织的 Cit-H3/H3 值明显升高($P<0.01$)。DWB 组在 d_3 和 d_7 期创面组织的 Cit-H3/H3 值也明显升高($P<0.05$)。与 DW 组相比,DWZ 组在 d_3 和 d_7 期创面组织的 Cit-H3/H3 比值均明显降低($P<0.05$)。与 DWB 组相比,

DWZ 组在 d_3 和 d_7 期创面组织的 Cit-H3/H3 比值明显较低($P<0.01$)。见图 4、表 5。

2.4 紫朱软膏对糖尿病小鼠创面 PAD4 及炎症因子 NLRP3 和 IL-1 β 表达的影响

为了探究紫朱软膏通过抑制 NETs 促进糖尿病创面愈合的潜在机制,本研究采用免疫组化技术检测了创面组织中 PAD4 以及炎症因子 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白的表达水平。结果显示,与 NW 组相比,DW 组、DWZ 组和 DWB 组在 d_3 和 d_7 时创面 PAD4



各组 d₃和 d₇期创面 NETs 免疫荧光染色代表性图片,其中 DAPI 染色细胞核,MPO 染色中性粒细胞,Cit-H3 代表 NETs

图 3 各组创面 MPO/Cit-H3 免疫荧光染色 (×100,比例尺=100 μm)

Fig 3 Immunofluorescence staining for MPO and Cit-H3 in wounds of each group (×100, Scale bar=100 μm)

表 4 各组创面 NETs 细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Comparison of NETs cell numbers in different groups of wounds ($\bar{x} \pm s$)

组别	$n \times$ 视野数	d ₃	d ₇
NW 组	3×5	19.47±9.02	19.47±9.02
DW 组	3×5	91.93±29.38**	67.80±37.38**
DWZ 组	3×5	27.53±14.61 ^{##△△}	24.87±11.22 ^{##△△}
DWB 组	3×5	92.40±27.78**	61.20±24.45**
<i>F</i>		35.37	15.49
<i>P</i>		0.000	0.000

注:与 NW 组相比,** $P<0.01$;与 DW 组相比,^{##} $P<0.01$;与 DWB 组相比,^{△△} $P<0.01$ 。

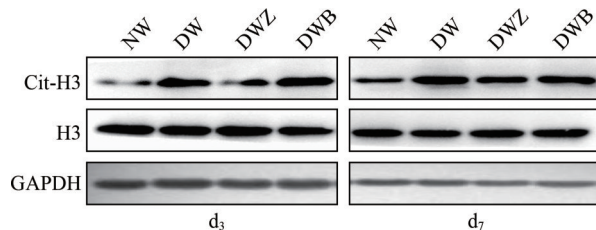


图 4 各组创面组织 Cit-H3 和 H3 免疫印迹分析

Fig 4 Immunoblot analysis of Cit-H3 and H3 in wound tissues of each group

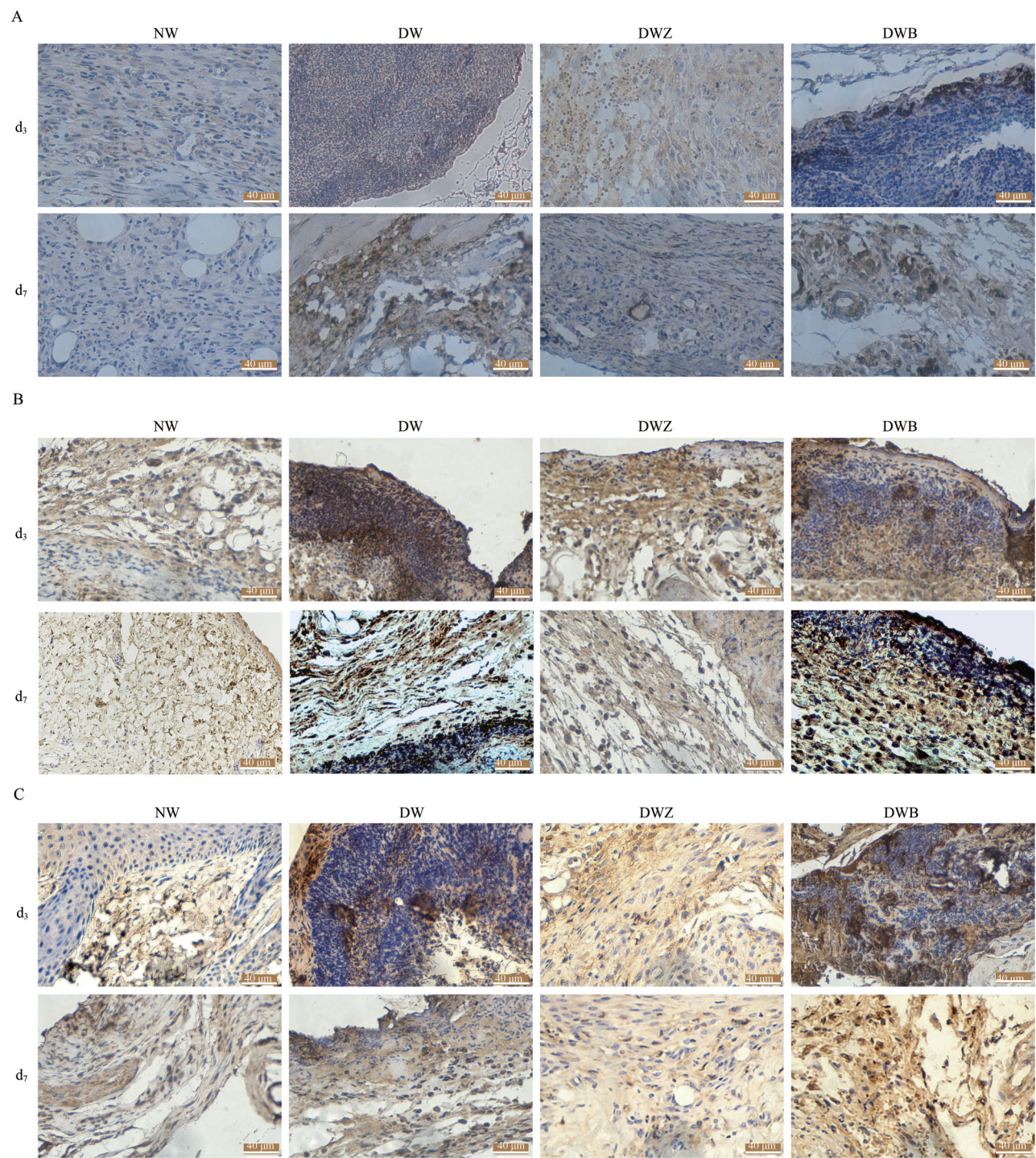
d₃和 d₇时创面 PAD4 的平均光密度值明显低于 DW 组 ($P<0.01$) 和 DWB 组 ($P<0.01$)。同样,与 NW 组相比,DW 组、DWZ 组和 DWB 组在 d₃和 d₇时创面 NLRP3 的平均光密度值均明显增加 ($P<0.01$)。DWZ 组在 d₃和 d₇时创面 NLRP3 的平均光密度值明显低于 DW 组 ($P<0.01$) 和 DWB 组 ($P<0.01$)。此外,与 NW 组相比,DW 组在 d₃和 d₇时创面 IL-1β 的平均光密度值均明显增加 ($P<0.01$)。DWZ 组在 d₃和 d₇时创面 IL-1β 的平均光密度值明显低于 DW 组 ($P<0.01$) 和 DWB 组 ($P<0.01$)。见图 5、表 6。

表 5 各组创面 Cit-H3 和 H3 蛋白含量比值 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 5 The ratio of Cit-H3 to H3 protein content in wound tissues of each group ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	d ₃	d ₇
NW 组	19.47±9.02	19.47±9.02
DW 组	91.93±29.38**	67.80±37.38**
DWZ 组	27.53±14.61 ^{##△△}	24.87±11.22 ^{##△△}
DWB 组	92.40±27.78**	61.20±24.45**
<i>F</i>	65.37	73.73
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 NW 组相比,** $P<0.01$;与 DW 组相比,^{##} $P<0.01$;与 DWB 组相比,^{△△} $P<0.01$ 。



A:PAD4免疫组化染色代表性图片;B:NLRP3免疫组化染色代表性图片;C:IL-1β免疫组化染色代表性图片

图5 紫朱软膏对糖尿病创面组织PAD4、NLRP3和IL-1β表达的影响(×200,比例尺=40 μm)

Fig 5 The effect of ZZO on the expression of PAD4, NLRP3, and IL-1β in diabetic wounds(×200, Scale bar=40 μm)

采用荧光定量PCR技术测定了各组小鼠创面组织 *PAD4*、*NLRP3* 和 *IL-1β* 基因的 mRNA 水平。结果显示,DW 组和 DWB 组在 d₃ 和 d₇ 的创面 *PAD4* 基因 mRNA 水平均明显高于 NW 组 ($P<0.01$), DWZ 组在 d₃ 和 d₇ 创面 *PAD4* 基因 mRNA 水平明显高于 NW 组 ($P<0.01$) 并明显低于 DW 组 ($P<0.01$) 和 DWB 组 ($P<0.01$)。与 NW 组相比,DW 组、DWZ 组和 DWB 组在 d₃ 和 d₇ 的创面 *NLRP3* 基因

mRNA 水平均明显高于 NW 组 ($P<0.01$)。DWZ 组在 d₃ 和 d₇ 创面 *NLRP3* 基因 mRNA 水平均明显低于 NW 组 DW 组 ($P<0.01$) 和 DWB 组 ($P<0.01$)。与 NW 组相比,DW 组、DWZ 组和 DWB 组在 d₃ 和 d₇ 的创面 *IL-1β* 基因 mRNA 水平明显高于 NW 组 ($P<0.01$)。DWZ 组在 d₃ 和 d₇ 创面 *IL-1β* 基因 mRNA 水平明显低于 NW 组 DW 组 ($P<0.01$) 和 DWB 组 ($P<0.01$)。见表 7。

表6 各组创面PAD4、NLRP3和IL-1β平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 The average optical density values of PAD4, NLRP3, and IL-1β in wound tissues of each group ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	$n \times$ 视野数	PAD4	NLRP3	IL-1β
d ₃	NW 组	3×5	0.088±0.013	0.281±0.026	0.249±0.071
	DW 组	3×5	0.457±0.053**	0.578±0.050**	0.500±0.085**
	DWZ 组	3×5	0.224±0.031**#△△	0.317±0.030**#△△	0.314±0.041**#△△
	DWB 组	3×5	0.414±0.034**	0.548±0.067**	0.557±0.052**
	F		75.43	99.56	131.86
	P		0.000	0.000	0.000
d ₇	NW 组	3×5	0.068±0.030	0.217±0.016	0.276±0.036
	DW 组	3×5	0.329±0.044**	0.440±0.071**	0.339±0.053**
	DWZ 组	3×5	0.200±0.024**#△△	0.303±0.092**#△△	0.252±0.063**#△△
	DWB 组	3×5	0.350±0.051**	0.473±0.055**	0.374±0.073**
	F		65.95	56.53	7.53
	P		0.000	0.000	0.010

注:与NW组相比,** $P < 0.01$;与DW组相比,** $P < 0.01$;与DWB组相比,△△ $P < 0.01$ 。

表7 各组创面PAD4、NLRP3和IL-1β相对mRNA表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 7 Relative mRNA expression of PAD4, NLRP3, and IL-1β in each group of wounds ($n=3, \bar{x} \pm s$)

时间	组别	PAD4	NLRP3	IL-1β
d ₃	NW 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	DW 组	3.60±0.12**	5.98±0.28**	3.13±0.13**
	DWZ 组	1.73±0.14**#△△	1.44±0.10**#△△	1.70±0.13**#△△
	DWB 组	3.43±0.21**	5.64±0.49**	3.01±0.25**
	F	165.40	171.63	88.00
	P	0.000	0.000	0.000
d ₇	NW 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	DW 组	2.96±0.14**	3.41±0.18**	2.39±0.15**
	DWZ 组	1.36±0.09**#△△	1.67±0.13**#△△	1.37±0.10**#△△
	DWB 组	3.18±0.23**	2.56±0.08**	1.99±0.12**
	F	117.32	158.78	66.13
	P	0.000	0.000	0.000

注:与NW组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与DW组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与DWB组相比,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$ 。

3 讨论

中医理论认为“脓”和“腐”是慢性疮疡炎症微环境的关键组成部分,正确处理这2个因素对于疮疡的恢复至关重要。在中医治疗中,“煨脓长肉法”是中医外科疮疡中特有的治疗方法,最早记载于《外科启玄·疮疡宜贴膏药论》。该方法通过2种机制发挥作用:首先,利用化腐药物消除创面的有害脓液,促进毒素排出;其次,通过行气补气药物促进有益脓液的形成,以调整疮疡局部的正气与邪气平衡。这2种方法共同作用于疮疡的炎症微环境,推动慢性疮疡向“生肌”阶段的转变,促进愈合^[16-18]。紫朱软膏是一种基于中医外治“煨脓长肉”理论的外用药物,由朱砂、紫草、黄芪、血竭、阿胶、冰片六味中药及辅料组成,具有清热解毒、祛腐生肌、补气

益血的功效,在治疗糖尿病足性溃疡方面疗效确切^[13,19]。本研究通过构建糖尿病小鼠创面模型,观察了紫朱软膏对糖尿病创面愈合的影响。结果显示,紫朱软膏可以促进糖尿病创面的愈合,同时发现紫朱软膏可以抑制糖尿病创面炎性细胞的聚集,提示紫朱软膏可能通过抑制炎症反应、缩短炎症期从而促进糖尿病创面的愈合。

NETs是由中性粒细胞在免疫应答过程中释放的一种网状结构,主要由DNA、组蛋白以及中性粒细胞颗粒蛋白构成,能够在细胞外捕获并杀死细菌等病原体。糖尿病患者通常处于慢性炎症状态,这使得中性粒细胞持续激活,进而导致NETs过度产生。NETs的积累可能会干扰细胞迁移和组织再生过程,并为细菌提供保护,使其免受抗生素和宿主

免疫系统的攻击。此外,NETs 中的组蛋白及其他成分具有细胞毒性,能够损伤周围组织,从而进一步阻碍 DFU 的愈合。同时,NETs 还可促进血管内皮细胞损伤和炎症反应,进而减少创面的血液供应。因此,NETs 是包括糖尿病足溃疡在内的多种慢性炎症性疾病的重要治疗靶点^[20-22]。本研究发现,糖尿病小鼠创面 NETs 含量明显高于正常小鼠创面,而紫朱软膏可以抑制 NETs 的形成。鉴于 NETs 在慢性炎症中的作用,提示紫朱软膏可能通过抑制 NETs 促进糖尿病创面的愈合。

PAD4 是一种钙离子依赖性酶,主要参与蛋白质的翻译后修饰,尤其在细胞应激和炎症反应中发挥重要作用。其核心功能是将蛋白质中的精氨酸残基转化为瓜氨酸残基,从而改变组蛋白的电荷,增强其与 DNA 的亲和力,进而促进 NETs 的形成。研究表明,多数 DFU 组织中 PAD4 表达上调,与溃疡的慢性持续性炎症密切相关。目前,PAD4 已成为炎症、肿瘤等研究领域的关键分子,以 PAD4 为靶点的药物研发也成为包括糖尿病足溃疡在内的多种疾病的潜在治疗方向^[8-10]。NLRP3 是一种炎症小体的关键蛋白,可催化前白介素转化为活性白介素并诱导焦亡^[23]。NLRP3 还可通过释放 IL-1 β 来调节炎症反应,IL-1 β 能够促进中性粒细胞释放 NETs,而 NETs 又可进一步促进多种炎症细胞分泌 IL-1 β ^[24]。PAD4 的高表达、NETs 的形成、NLRP3 炎症体的激活以及 IL-1 β 的成熟和分泌构成了一连串的炎症激活过程,导致糖尿病足溃疡等慢性炎症难以愈合^[25,26]。本研究中,紫朱软膏可以抑制糖尿病小鼠创面 PAD4 的表达,提示紫朱软膏可能通过抑制 PAD4 介导的 NETs 形成促进糖尿病创面的愈合。此外,紫朱软膏还可以抑制 NLRP3 和 IL-1 β 的表达,提示紫朱软膏可能通过抑制 NETs 形成减轻了糖尿病创面的炎症反应,这也与本课题组临床研究相符^[15]。基于“煨脓长肉”理论,推测调节 PAD4、NLRP3 和 IL-1 β 等炎症因子的表达以及抑制 NETs 的形成可能是紫朱软膏发挥“煨脓”和“去腐”效果的关键机制之一。

总体而言,紫朱软膏可能通过抑制 PAD4 介导的 NETs 的形成促进了糖尿病小鼠的创面愈合。本研究对紫朱软膏在此方面的潜在作用机制进行了初步探索,但也存在一些局限性。例如,STZ 诱导的糖尿病小鼠创面模型虽然在研究糖尿病相关病理变化方面具有一定的参考价值,但无法完全模拟人类慢性糖尿病溃疡的复杂病理过程^[27]。在本研究中,建模 14 d 后,NW 组、DWZ 组以及 DWB 组的

愈合率达到 90% 以上,而未经任何处理的 DW 组伤口愈合率也达到了约 63% 左右。这表明 STZ 诱导的糖尿病小鼠溃疡模型在一定程度上确实延缓了创面愈合,延长了炎症期,但经过一段时间的自我调整后,该模型仍具有一定的自我愈合能力,能够结束创面的炎症期^[28]。因此,未来还需要进一步研究开发出一种新的动物创面模型,该模型应尽可能地反映糖尿病患者慢性伤口的实际情况和分子差异^[29,30]。

作者贡献度说明:

孙健:项目整体设计、实施及论文撰写;樊炜静:免疫组化;袁美杰:动物实验与组织收集;王宏飞:荧光定量 PCR 与 Western blot;游洋:免疫荧光及论文修改;柳国斌:审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Chen LH, Sun SY, Gao YY, et al. Global mortality of diabetic foot ulcer: A systematic review and meta analysis of observational studies [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2023, 25(1): 36-45.
- 2 Bonham PA, Brunette G, Crestodina L, et al. 2021 guideline for management of patients with lower-extremity wounds due to diabetes mellitus and/or neuropathic disease: An executive summary [J]. *J Wound Ostomy Continence Nurs*, 2022, 49 (3) : 267-285.
- 3 McDermott K, Fang M, Boulton AJ, et al. Etiology, epidemiology, and disparities in the burden of diabetic foot ulcers [J]. *Diabetes Care*, 2023, 46(1): 209-221.
- 4 Falanga V, Isseroff RR, Soulika AM, et al. Chronic wounds [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 50.
- 5 Raziyeve K, Kim Y, Zharkinbekov Z, et al. Immunology of acute and chronic wound healing [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 700.
- 6 Ibrahim I, Nuermaitaiti Y, Maimaituxun G, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcer related amputation: A prospective cohort study [J]. *Diabetes Ther*, 2024, 15: 1333-1348.
- 7 Heuer A, Stiel C, Elrod J, et al. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps improves primary and secondary intention wound healing in mice [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 614347.
- 8 Ehnert S, Hemmann P, Ihle C, et al. PADI4 minor haplotype as risk factor for excessive NET formation and associated wound healing disorders in diabetes mellitus [J]. *medRxiv*, 2024.

- 9 Liu X, Arfman T, Wichapong K, et al. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease[J]. *J Thromb Haemost*, 2021, 19(7): 1607-1617.
- 10 Shen YM, You Q, Wu YL, et al. Inhibition of PAD4-mediated NET formation by clamide prevents diabetes development in nonobese diabetic mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 916: 174623.
- 11 中国中西医结合学会周围血管病专业委员会. 中西医结合防治糖尿病足中国专家共识(第1版)[J]. *血管与腔内血管外科杂志*, 2019, 5(5): 379-402.
Peripheral Vascular Disease Professional Committee of Chinese Association of Integrative Medicine. Chinese expert consensus on the prevention and management of diabetic foot with integrative medicine (1st edition)[J]. *J Vasc Endovasc Surg*, 2019, 5(5): 379-402.
- 12 韩强, 柳国斌, 严仕梦, 等. 紫朱软膏通过抑制炎症反应促进糖尿病足溃疡愈合的研究[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(21): 1617-1624, 1629.
Han Q, Liu GB, Yan SM, et al. Zizhu Ointment promote shealing of diabetic foot ulcers by inhibiting inflammatory reaction[J]. *J Hainan Med Univ*, 2020, 26(21): 1617-1624, 1629.
- 13 施陈燕, 黄仁燕, 黄何尘, 等. 紫朱软膏联合奚氏中医外科技术治疗糖尿病足溃疡36例临床观察[J]. *中医杂志*, 2022, 63(10): 956-961.
Shi CY, Huang RY, Huang HC, et al. Zizhu ointment combined with XI's external medicine technique of traditional chinese medicine in treating 36 cases of diabetic foot ulcers[J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 63(10): 956-961.
- 14 胡啸明, 黄仁燕, 韩强, 等. 紫朱软膏对急性创面愈合过程中IL-1 β 、MMP-9和TGF- β 的作用及自噬相关性研究[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(4): 251-256, 261.
Hu XM, Huang RY, Han Q, et al. The research about of Zizhu Ointment on autophagy proteins LC3 and Beclin 1 during acute wound healing[J]. *J Hainan Med Univ*, 2020, 26(4): 251-256, 261.
- 15 孙健, 樊炜静, 袁美杰, 等. 紫朱软膏治疗糖尿病足溃疡的临床疗效及对创面中性粒细胞胞外陷阱和NLRP3、IL-1表达的影响[J]. *海南医科大学学报*, 2026, 32(1): 1-9.
Sun J, Fan WJ, Yuan MJ, et al. Effects of Zizhu Ointment on NETs, NLRP3 and IL-1 in diabetes Foot Ulcer Wounds[J]. *J Hainan Med Univ*, 2026, 32(1): 1-9.
- 16 樊炜静, 李文惠, 卢慧敏, 等. 基于痂脓长肉理论探讨紫朱软膏通过NLRP3逆转糖尿病难愈性创面巨噬细胞逃逸的机制研究[J]. *中医药学报*, 2023, 51(11): 29-35.
- 17 樊炜静, 王宏飞, 杨宝钟, 等. 论痂脓长肉理论在慢性难愈性溃疡治疗中的应用[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(11): 138-140.
Fan WJ, Wang HF, Yang BZ, et al. Application of the theory of simmering pus and growing flesh in the treatment of chronic refractory ulcer [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2022, 29(11): 138-140.
- 18 樊炜静, 王宏飞, 杨宝钟, 等. 痂脓长肉中医外治方案治疗Wagner 2~3级糖尿病足溃疡的临床疗效[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 107-114.
Fan WJ, Wang HF, Yang BZ, et al. Clinical observation on Wagner 2-3 diabetic foot ulcer treated by TCM external treatment scheme for euriching pus for tissue growth [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(14): 107-114.
- 19 黄仁燕, 闫少庆, 杨晓, 等. 紫朱软膏治疗非缺血型糖尿病足溃疡临床疗效及其对细胞免疫水平的影响[J]. *山东中医杂志*, 2022, 41(10): 1096-1101.
Huang RY, Yan SQ, Yang X, et al. Effect of Zizhu Ointment on non-ischemic diabetic foot ulcer and cellular immunity level[J]. *Shandong J Tradit Chin Med*, 2022, 41(10): 1096-1101.
- 20 Yang S, Gu Z, Lu C, et al. Neutrophil extracellular traps are markers of wound healing impairment in patients with diabetic foot ulcers treated in a multidisciplinary setting [J]. *Adv Wound Care*, 2020, 9(1): 16-27.
- 21 Huang W, Jiao J, Liu J, et al. MFG-E8 accelerates wound healing in diabetes by regulating "NLRP3 inflammasome-neutrophil extracellular traps" axis [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6(1): 84.
- 22 杨硕菲, 陈亮, 王浙宇, 等. 中性粒细胞陷阱网对糖尿病足临床愈合结局的预测价值[J]. *中国临床医学*, 2023, (1): 24-30.
Yang SF, Chen L, Wang ZY, et al. Predictive value of neutrophil extracellular traps for clinical healing outcome of diabetic foot ulcer[J]. *Chin J Clin Med*, 2023, (1): 24-30.
- 23 Liu D, Yang PL, Gao M, et al. NLRP3 activation induced by neutrophil extracellular traps sustains inflammatory response in the diabetic wound[J]. *Clin Sci*, 2019,

- 133(4): 565-582.
- 24 Kumar R, Patil G, Dayal S. NLRP3-Induced NETosis: A potential therapeutic target for ischemic thrombotic diseases?[J]. *Cells*, 2023, 12(23): 2709.
- 25 Lee MK, Sreejit G, Nagareddy PR, et al. Attack of the NETs! NETosis primes IL-1 β -mediated inflammation in diabetic foot ulcers [J]. *Clin Sci*, 2020, 134(12): 1399-1401.
- 26 Ma XX, Liu QK, Kuai L, et al. The role of neutrophils in diabetic ulcers and targeting therapeutic strategies[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124: 110861.
- 27 樊炜静, 柳国斌. 糖尿病难愈性创面大鼠实验模型的研究进展[J]. *中医药学报*, 2020, 48(8): 76-80.
- Fan WJ, Liu GB. Research progress of experimental model of diabetic wound in rats [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2020, 48(8): 76-80.
- 28 Phang SJ, Arumugam B, Kuppusamy UR, et al. A review of diabetic wound models-novel insights into diabetic foot ulcer [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2021, 15(12): 1051-1068.
- 29 Mieczkowski M, Mrozikiewicz-Rakowska B, Kowara M, et al. The problem of wound healing in diabetes-from molecular pathways to the design of an animal model[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7930.
- 30 Rai V, Moellmer R, Agrawal DK. Clinically relevant experimental rodent models of diabetic foot ulcer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 477(4): 1239-1247.

[本文编辑] 朱金月