DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250108.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250108.1650.004

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

孙 健,樊炜静,袁美杰,黄何尘,游 洋,柳国斌✉
(上海中医药大学附属曙光医院,上海 201203)

[摘要] **目的**:评估紫朱软膏对糖尿病足溃疡患者的临床疗效及其对患者创面中性粒细胞胞外陷阱(NETs)及炎症因子NOD样受体基因家族P3(NLRP3)、白细胞介素1(IL-1)表达的影响。**方法**:选取2024年1~6月在上海中医药大学附属曙光医院接受治疗的92例糖尿病足溃疡患者,在采取基础治疗后,随机分为试验组和对照组,每组46例,试验组采用紫朱软膏外敷,对照组采用外喷贝复济(bFGF)并用凡士林纱布外敷治疗。治疗8周后,比较两组的溃疡愈合率、溃疡面积和溃疡深度。采集两组患者治疗后第3天和第7天脱落的溃疡组织标本,采用苏木素-伊红(H&E)染色、免疫荧光染色和免疫组化观察创面炎性细胞数、NETs数、NLRP3和IL-1的表达。**结果**:与本组治疗前相比,两组患者的溃疡面积和溃疡深度均明显降低($P<0.01$)。治疗后试验组的溃疡愈合率明显高于对照组($P<0.01$),试验组的溃疡面积、溃疡深度明显低于对照组($P<0.01$)。与正常皮肤组织相比,两组患者创面的炎性细胞数、NETs数及NLRP3、IL-1表达均明显升高($P<0.01$)。与治疗前相比,治疗后两组患者的创面炎性细胞数、NETs数及NLRP3、IL-1表达均明显降低($P<0.01$)。与对照组相比,试验组在治疗3 d和7 d后创面炎性细胞数、NETs数、NLRP3和IL-1表达明显降低($P<0.01$)。**结论**:紫朱软膏外用具有明显的临床疗效,能够促进糖尿病足溃疡愈合。其机制可能涉及抑制NETs形成以及炎症因子NLRP3和IL-1的表达。

[关键词] 糖尿病足溃疡;紫朱软膏;临床疗效;中性粒细胞胞外诱捕网;NOD样受体基因家族P3(NLRP3);白细胞介素1(IL-1)
[中图分类号] R259 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)01-0001-09

Clinical efficacy of Zizhu ointment on diabetic foot ulcer and its effect on neutrophil extracellular trap and expression of NLRP3 and IL-1 in the wounds

SUN Jian, FAN Weijing, YUAN Meijie, HUANG Hechen, YOU Yang, 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*)
[*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: 2024-08-25 *Revised*: 2024-12-20 *JHMU*, 2026;32(1):1-9

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

[Abstract] **Objective**: To evaluate the clinical efficacy of Zizhu Ointment in the treatment of diabetic foot ulcer and its effects on neutrophil extracellular traps (NETs) and the expression of inflammatory factors NLRP3 and IL-1 in wound tissues. **Methods**: A total of 92 diabetic foot ulcer patients treated at Shuguang Hospital affiliated with Shanghai University of Traditional Chinese Medicine from January to June 2024 were randomly divided into an experimental group and a control group, each consisting of 46 cases, after receiving basic treatment. The experimental group applied Zizhu Ointment topically, while the control group applied basic fibroblast growth factor (bFGF) spray and covered with Vaseline gauze for treatment. After 8 weeks of treatment, the ulcer

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274528);浦东新区卫生健康委员会科研项目(PW2020E-4)
[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] 2024-08-25 [修回日期] 2024-12-20 网络出版时间:2025-01-09 07:53:51

healing rate, ulcer area and ulcer depth of both groups were compared. Specimens of ulcer tissue shed on the 3rd and 7th day after treatment from both groups were collected and observed for the number of inflammatory cells, NETs, and the expression of NLRP3 and IL-1 in the wound using Hematoxylin-Eosin (H&E) staining, immunofluorescence staining, and immunohistochemistry. **Results**: Compared to before treatment in the same group, the ulcer area and ulcer depth in both groups were significantly reduced ($P<0.01$). After treatment, the ulcer healing rate in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$), and the ulcer area, ulcer depth in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$). Compared to normal skin tissue, the number of inflammatory cells, NETs, and the expression of NLRP3 and IL-1 in the wound tissues of both groups were significantly increased ($P<0.01$). Compared to before treatment, the number of inflammatory cells, NETs, NLRP3 and IL-1 expression in the wound of the two groups were significantly decreased after treatment ($P<0.01$). Compared to the control group, the number of inflammatory cells, NETs, and the expression of NLRP3 and IL-1 in the wound tissues of the experimental group were significantly reduced after 3 and 7 days of treatment ($P<0.01$). **Conclusion**: The external use of Zizhu Ointment in the treatment of diabetic foot ulcer has significant clinical efficacy and can promote the healing of diabetic foot ulcers. Its mechanism may involve the inhibition of NETs formation and the expression of inflammatory factors NLRP3 and IL-1.

[**Key words**] Diabetic foot ulcer; Zizhu ointment; Clinical efficacy; Neutrophil extracellar traps; NOD-like receptor family pyrin domain containing 3(NLRP3); Interleukin-1(IL-1)

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer,DFU)是糖尿病患者在病程进展中可能出现的严重并发症,其特征为下肢远端神经功能障碍和血管病变,导致足部感染、溃疡及深层组织损伤[1]。研究表明,大约15%～25%的糖尿病患者会发展出糖尿病足溃疡[2],且糖尿病足溃疡的复发率介于50%～70%[3]。糖尿病足溃疡的慢性和难以治愈的特性导致高住院率、高截肢率和高死亡率,约25%的患者难以实现伤口愈合,而28%的患者可能面临截肢的风险[3,4]。这些问题不仅严重影响了患者的生活质量,还带来了沉重的经济负担,是导致患者残疾和死亡的重要因素。

近期研究表明,中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)在糖尿病足溃疡的愈合过程中扮演了关键角色[5-7]。NETs是由中性粒细胞释放的网状结构,主要由DNA、组蛋白和多种抗菌蛋白组成,在正常情况下对于宿主的免疫防御具有重要意义,能够捕获和消灭病原体,从而防止感染蔓延[8]。但在糖尿病足溃疡的慢性炎症状态下,NETs的过量生成反而加剧了炎症反应,导致创面愈合困难。此外,NETs的过度积累还可能通过促进炎症介质的释放干扰细胞外基质的重建、抑制创面血管再生等,进一步抑制糖尿病足溃疡创面的愈合过程[9]。因此,调控NETs的形成和降解可能成为改善糖尿病足溃疡愈合的新治疗策略[10]。

炎症小体和由其激活的一系列炎症因子在NETs形成过程中的非常重要[11]。NOD样受体基因家族P3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)是一种细胞内模式识别受体,NLRP3在激活后可形成NLRP3炎症小体,进而触发白细胞介素1(interleukin-1,IL-1)等炎症因子的活化和释放。IL-1的释放不仅吸引中性粒细胞向感染或受损区域迁移,还激活了中性粒细胞释放NETs的过程。而NETs的形成反过来又激活NLRP3炎症小体,引发IL-1的产生,形成一个恶性循环,加剧局部炎症反应,从而延缓创面的愈合[12]。NLRP3炎症小体的激活和NETs形成之间的正反馈调节加剧了炎症反应。因此,糖尿病足溃疡创面中NETs的形成与NLRP3和IL-1的表达水平密切相关,抑制NLRP3的激活和IL-1的表达可能是提高创面愈合率的有效策略[13,14]。

紫朱软膏(专利号ZL201010186284.X)是基于我院中医血管外科柳国斌教授结合传统中医外科治疗疮疡的“煨脓长肉”和“祛腐生肌”理论,经过长期临床实践总结的治疗糖尿病足溃疡的经验方[15]。临床应用表明,紫朱软膏在糖尿病足溃疡治疗上具有较好的疗效[16-18]。本研究旨在评估紫朱软膏治疗糖尿病足溃疡的临床疗效,同时观察紫朱软膏对糖尿病足溃疡创面NETs和炎性因子NLRP3、IL-1表达的影响。

1　资料与方法

1.1　研究对象与样本量估算

根据既往研究,公式$N=(U_{\alpha}+U_{\beta})24P(1-P)/(P_1-P_2)^2$,$P=(P_1+P_2)/2$,$\alpha$取值0.05,$\beta$取值0.20。根据常规清创换药治疗和紫朱软膏治疗糖尿病足溃疡的相关研究,P_1[19,20]和P_2[21,22]的值分别为0.402和0.794。$n_1:n_2=1:1$,考虑10%脱落率,各组需要样本量数为46例,总计需要样本量为92例。研究对象为2024年1～6月在上海中医药大学附属曙光医院血管外科和传统中医外科住院治疗的92例糖尿病足溃疡患者。本项目通过上海中医药大学附

属曙光医院伦理委员会审批(伦理编号:2024-1443-026)。

1.2 纳入标准

患者同时符合以下方条件可纳入:(1)符合中国2型糖尿病防治指南(2020年版)中糖尿病诊断标准[23];(2)符合糖尿病足诊断标准[24];(3)年龄40～75岁;(4)符合糖尿病足Wagner分级2～4级;(5)签署知情同意书者。

1.3 排除标准

(1)年龄<40岁或>75岁;(2)包括心肝肾及神经系统等重要脏器功能障碍者;(3)妊娠、哺乳期妇女;(4)有其他部位感染或对本次药物过敏者;(5)依从性不好和自行退出研究者。

1.4 分组方法

采用随机分组,按照随机数字表法将92例糖尿病足溃疡患者分为试验组和对照组,每组46例。试验组中,男性28例,女性18例;年龄41～75岁,平均(62.36±2.26)岁;Wagner分级:2级21例,3级16例,4级9例。对照组中,男性26例,女性20例;年龄40～75岁,平均(63.37±1.87)岁;Wagner分级:2级22例,3级17例,4级7例。两组患者的基线特征比较,差异均无统计学意义(P>0.05),具有可比性。入组多为本地多年糖尿病足溃疡病史患者,患者依从性较强,两组患者均无脱落失访。

1.5 治疗方法

(1)基础治疗:依据中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[23],对所有入组糖尿病足溃疡患者给予基础降糖和对症治疗,并进行彻底的清创治疗等。如果患者有下肢缺血,根据缺血程度和病因进行药物和腔内手术治疗。对足部感染者,则根据患者创面情况和药敏筛查选择合适的抗菌药物。对周围神经病变、足部骨骼病变等进行对症治疗。(2)试验组:在基础治疗的基础上,采用紫朱软膏外敷创面治疗。紫朱软膏为院内制剂,由武汉马应龙药业集团股份有限公司生产(批号:130301),含黄芪1.5%、朱砂3.5%、阿胶2.5%、紫草1.5%、龙血竭3%、冰片0.5% 6种主药及白凡士林等辅料[21]。(3)对照组:在基础治疗的基础上,采用外喷贝复济(rbFGF,珠海亿胜生物制药有限公司,批号:01230505)并用凡士林纱布外敷治疗,每天1次,连续治疗8周[22]。

1.6 疗效指标

(1)主要疗效指标:参照课题组前期的相关研究,以溃疡愈合率为治疗糖尿病足溃疡的主要疗效指标[17]。在糖尿病足溃疡患者治疗前、后拍摄创面,使用EK001型InSight创面3D拍照测量系统识别创面并进行面积测量。溃疡愈合率=[(治疗前溃疡面积－治疗后溃疡面积)/治疗前溃疡面积]×100%。(2)次要疗效指标:包括治疗前后的溃疡面积变化,以及使用InSight创面3D拍照测量系统对创面深度的测量。(3)安全性指标:在治疗前后对所有患者进行血压、心率、呼吸、体温等一般生命体征的监测,并记录任何不良反应的症状和体征。在入组和治疗1周时,进行血液和尿液常规检查以及肝肾功能检测。若出现不良反应,立即停止入组并采取相应的对症处理措施。

1.7 糖尿病足溃疡创面组织NETs、NLRP3和IL-1检测

1.7.1 标本采集及分组 6例正常皮肤标本来源于外伤后皮肤缺损组织,溃疡组织标本取自换药时自动脱落的组织,设为正常(Normal)组。分别采集治疗前、治疗后3 d和治疗后7 d的组织标本并于4%多聚甲醛中固定。

1.7.2 试剂 苏木素-伊红(H&E)染色试剂盒(M020)购于上海歌凡生物科技有限公司。免疫荧光染色试剂盒-抗小鼠Alexa Fluor 488(P0188)、抗兔Alexa Fluor 555(P0179)购于上海碧云天生物技术有限公司。鼠抗人MPO抗体(66177-1-Ig)、兔抗人NLRP3抗体(19771-1-AP)、兔抗人IL-1β抗体(26048-1-AP)、HRP标记羊抗兔二抗(SA00001-2)购于Proteintech公司、兔抗人citrulline-Histone H3-R2/R8/R17(CitH3)(A18298)抗体购于ABclonal公司。免疫组化试剂盒(D601037)购于上海生工生物工程有限公司。

1.7.3 主要仪器 全自动组织病理检测系统,瑞士罗氏公司。TS2倒置荧光显镜,日本尼康公司。图像采集与分析采用ImageView图像分析系统。

1.7.4 H&E染色 固定后的样本依次经历包埋与固定、洗涤与脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片、脱蜡和水化、H&E染色、透明、封片,最后图像通过显微镜拍照并于ImageView图像分析系统进行保存和分析图像。随机选择5个视野,计算中性粒细胞数量。

1.7.5 免疫荧光染色 固定后的样本依次经历洗涤和脱水、透明、浸蜡、包埋后制备成蜡块标本并经切片机进行切片。切片附着玻片后进行烤片、脱蜡、水化、抗原修复、一抗孵育和荧光二抗孵育、DAPI染色、封片、荧光显微镜下拍照并于ImageView图像分析系统进行保存和分析图像。随机选择5个视野,以CitH3/MPO双阳性细胞在每个视野上的数量作为NETs的相对含量[25]。

1.7.6　免疫组化染色　前期处理过程与“1.7.5”一致，随后样本经一抗孵育、二抗孵育、DAB显色、苏木精复染、乙醇连续脱水和中性树脂封片，最终在光学显微镜下观察、拍照。采用ImageJ软件对所有图片进行分析，计算出平均光密度值（AOD）。

1.8　统计学处理

应用SPSS 27.0统计软件进行统计学分析，计量数据以$\bar{x}\pm s$表示。组间比较采用两个独立样本t检验，组内比较采用配对样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，重复测量计量资料采用重复测量方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　两组患者溃疡愈合率、溃疡面积和溃疡深度比较

在本研究的治疗阶段，所有参与者未报告严重的不良事件、过敏反应或其他安全相关的异常指标。在治疗开始前，两组受试者在溃疡面积和溃疡深度方面的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。经过治疗，与各自治疗前的数据相比，两组受试者的溃疡面积、深度出现了明显的下降（$P<0.01$）。进一步比较试验组与对照组的治疗效果，结果显示试验组的溃疡愈合率有明显提升（$P<0.01$），同时试验组在溃疡面积和深度的改善也更为明显（$P<0.01$）。见表1。

表1　两组患者治疗前后溃疡愈合率、溃疡面积和溃疡深度比（n=46，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Comparison of ulcer healing rate，ulcer area and ulcer depth between two groups before and after treatment（n=46，$\bar{x}\pm s$）

组别	时间	溃疡愈合率（%）	溃疡面积（cm^2）	溃疡深度（cm）
试验组	治疗前	-	7.48±1.89	0.85±0.22
	治疗后	86.37±14.62$^{\#}$	1.02±0.58$^{*\#}$	0.14±0.09$^{*\#}$
对照组	治疗前	-	7.35±1.68	0.84±0.20
	治疗后	75.26±12.78	1.82±0.75*	0.19±0.11*

注：与本组治疗前比较，$^{*}P<0.01$；与对照组治疗后相比，$^{\#}P<0.01$。

2.2　紫朱软膏对糖尿病足溃疡创面炎性细胞的影响

在H&E染色的组织中，与正常组的皮肤组织相比，两组糖尿病足溃疡（DFU）创面存在大量浸润的炎性细胞（主要是中性粒细胞）（$P<0.01$）、上皮坏死或缺损，治疗前两组患者创面炎性细胞数量差异无统计学意义（$P>0.05$）。与治疗前相比，两组患者治疗3 d和7 d的创面炎性细胞数比例都明显降低（$P<0.01$）。与本组治疗3 d相比，治疗7 d的创面炎性细胞数也都明显降低（$P<0.01$）。两组不同时间创面炎症细胞数总体比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$），即存在时间效应。与对照组（贝复济，rbFGF）相比，试验组（紫朱软膏，ZZO）治疗3 d和7 d后创面炎性细胞数明显降低（$P<0.01$）。试验组和对照组创面炎症细胞数总体比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$），即存在分组效应。时间因素和分组因素存在交互效应（$P<0.01$），两组创面中性粒细胞数均随时间延长而减低。见图1、表2。

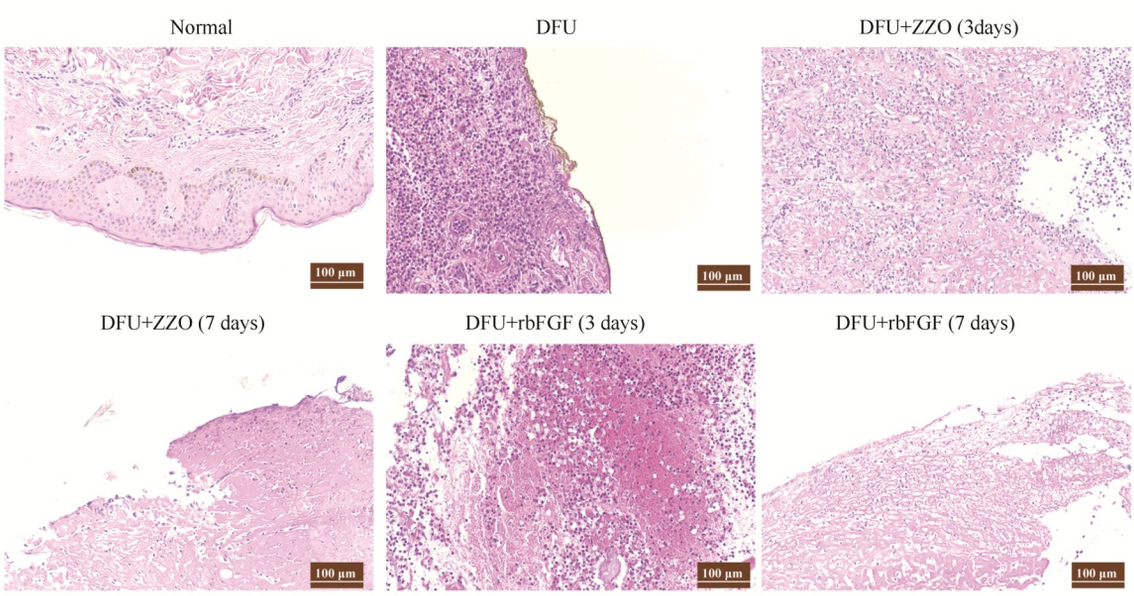


图1　糖尿病足溃疡创面H&E染色

Fig 1　The H&E staining of diabetic foot ulcer wound surface

表2　两组患者创面炎性细胞数量比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Comparison of the number of inflammatory cell on the wound surface between two groups of patients($\bar{x}\pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后3 d	治疗后7 d
正常组	6	15.00±5.48	-	-
试验组	46	263.30±80.82[a]	128.35±58.91[bc]	70.69±42.91[bcd]
对照组	46	257.63±70.86[a]	204.91±79.69[b]	112.93±55.30[bd]
组间			F=7.808	P<0.01
时点间			F=1 524.756	P<0.01
组间·时点间			F=91.077	P<0.01

注：创面炎症细胞数量为显微镜下每个视野的中性粒细胞数量。与正常组相比，[a]P<0.01；与本组治疗前相比，[b]P<0.01；与对照组相比，[c]P<0.01；与本组治疗后3 d相比，[d]P<0.01。

2.3　紫朱软膏对糖尿病足溃疡患者创面NETs的影响

免疫荧光染色的结果显示，与正常的皮肤组织相比，两组糖尿病足溃疡患者创面均存在大量浸润的中性粒细胞(MPO阳性)，而且其中很多中性粒细胞产生了NETs(CitH3阳性)；两组创面NETs比例无明显区别(P>0.05)。与治疗前相比，两组患者治疗3 d和7 d的创面NETs比例都明显降低(P<0.01)。两组不同时间创面NETs比例总体比较，差异具有统计学意义(P<0.01)，即存在时间效应。与本组治疗3 d相比，治疗7 d的创面NETs比例也都明显降低(P<0.01)。与对照组相比，试验组治疗3 d和7 d后创面NETs比例明显降低(P<0.01)。试验组和对照组创面NETs比例总体比较，差异具有统计学意义(P<0.01)，即存在分组效应。时间因素和分组因素存在交互效应(P<0.01)，两组创面NETs比例均随时间延长而减低。见图2、表3。

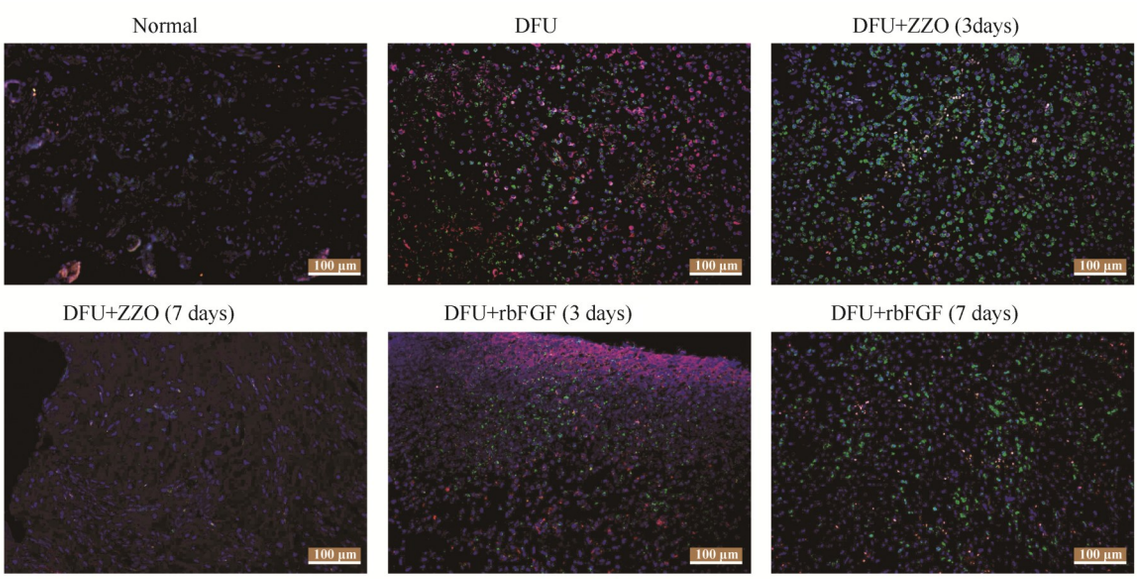


图2　紫朱软膏对糖尿病足溃疡患者创面NETs的影响

Fig 2　Effect of Zizhu onitment on the Nets of diabetic foot ulcer wound surface

表3　两组患者创面NETs数比较(%，$\bar{x}\pm s$)

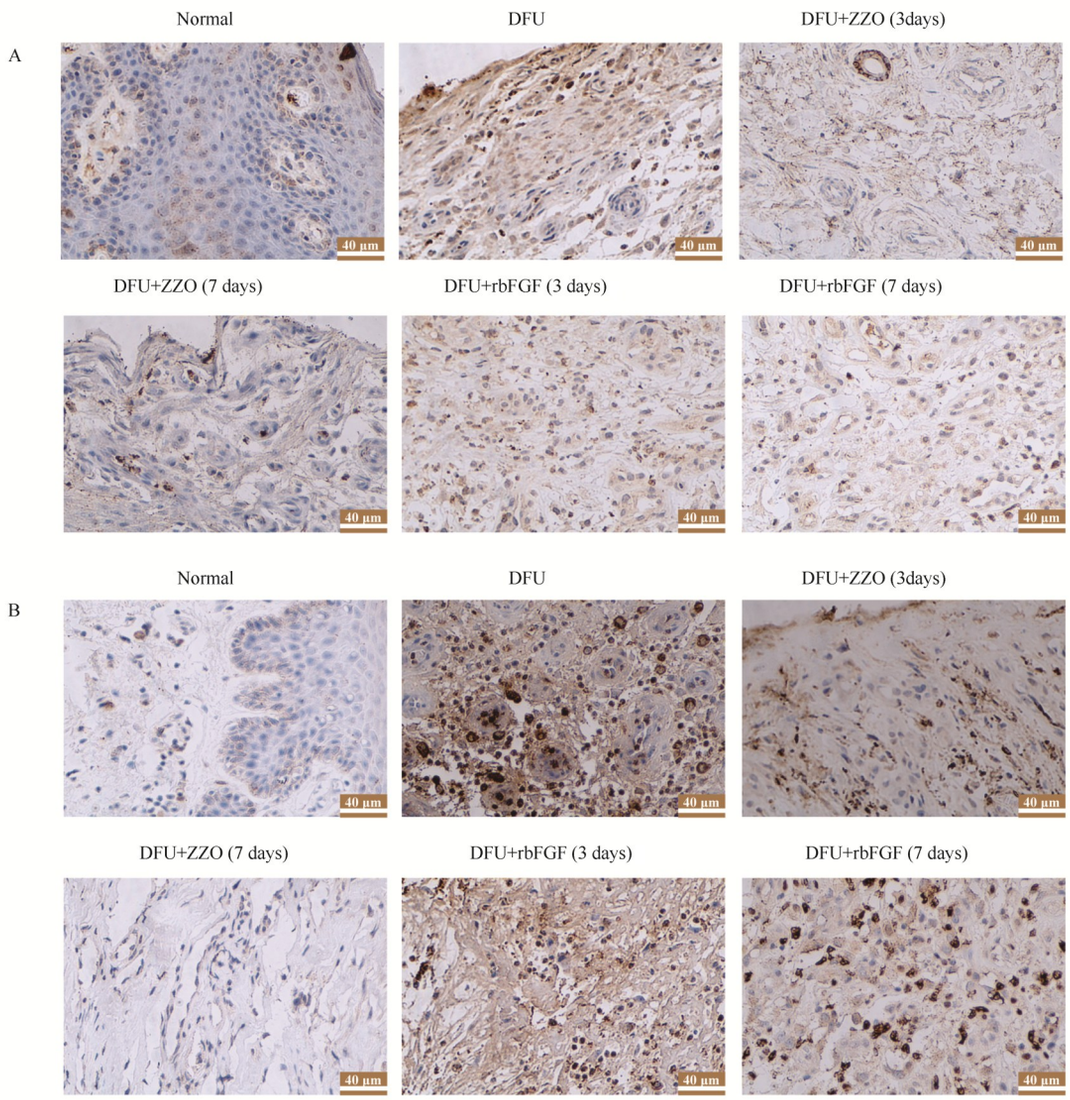
Tab 3　Comparison of the number of NETs on the wound surface between two groups of patients(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后3 d	治疗后7 d
正常组	6	16.65±6.78	-	-
试验组	46	137.35±37.76a	36.68±18.65[bc]	23.08±9.60[bcd]
对照组	46	143.65±41.46a	86.57±22.52[b]	43.35±21.78[bd]
组间			F=23.725	P<0.01
时点间			F=1 828.891	P<0.01
组间·时点间			F=73.314	P<0.01

注：创面NETs为显微镜下每个视野中NETs阳性中性粒细胞数量。与正常组相比，[a]P<0.01；与本组治疗前相比，[b]P<0.01；与对照组相比，[c]P<0.01；与本组治疗后3 d相比，[d]P<0.01。

2.4　紫朱软膏对糖尿病足溃疡患者创面NLRP3和IL-1表达的影响

免疫组化的结果显示，与正常的皮肤组织相比，糖尿病足溃疡患者创面NLRP3和IL-1的表达明显升高(P<0.01)。与治疗前相比，两组患者治疗3 d和7 d的创面NLRP3和IL-1的表达都明显降低(P<0.01)。与本组治疗3 d相比，治疗7 d的创面NLRP3和IL-1的表达明显降低(P<0.01)。与对照组相比，试验组治疗3 d和7 d后创面NLRP3和IL-1的表达明显降低(P<0.01)。见图3A、B及表4、5。



A：NLRP3免疫组化代表性图片；B：IL-1免疫组化代表性图片

图3　紫朱软膏对糖尿病足溃疡创面NLRP3和IL-1表达的影响

Fig 3　The effect of Zizhu onitment on the expression NLRP3 and IL-1 in diabetic foot ulcer wound

表4　两组患者创面NLRP3表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Comparison of NLRP3 expression levels on the wound surface between two groups of patients($\bar{x}\pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后3 d	治疗后7 d
正常组	6	0.067±0.016	-	-
试验组	46	0.382±0.065[a]	0.162±0.027[bc]	0.113±0.013[bcd]
对照组	46	0.375±0.054[a]	0.213±0.031[b]	0.175±0.021[bd]
组间		F=54.729	P<0.01	
时点间		F=909.982	P<0.01	
组间•时点间		F=20.087	P<0.01	

注：创面NLRP3表达水平的表达水平以平均光密度值表示。与正常组相比，[a]P<0.01；与本组治疗前相比，[b]P<0.01；与对照组相比，[c]P<0.01；与本组治疗后3 d相比，[d]P<0.01。

表5　两组患者创面IL-1表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Comparison of IL-1 expression levels on the wound surface between two groups of patients($\bar{x}\pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后3 d	治疗后7 d
正常组	6	0.126±0.027	-	-
试验组	46	0.567±0.086[a]	0.232±0.038[bc]	0.087±0.018[bcd]
对照组	46	0.583±0.096[a]	0.332±0.052[b]	0.216±0.031[bd]
组间		F=106.036	P<0.01	
时点间		F=1 295.282	P<0.01	
组间•时点间		F=23.710	P<0.01	

注：创面中IL-1的表达水平以平均光密度值表示。与正常组相比，[a]P<0.01；与本组治疗前相比，[b]P<0.01；与对照组相比，[c]P<0.01；与本组治疗后3 d相比，[d]P<0.01。

3　讨论

糖尿病足溃疡在中医中属于“脱疽”“筋疽”范畴，认为本病以脾肾亏虚为本、寒湿外伤为标，具有“本虚标实、毒浸迅速、腐肉难去、新肌难生”之特

点。治疗上当“中西并举、内外结合”,即在内科治疗的基础上,重视局部外治在糖尿病足溃疡治疗中的作用[24]。糖尿病足溃疡难愈的原因主要在于局部气血不足和“毒”“瘀”病理产物的阻碍。由于这些病理产物的存在,导致周身气血运行难以到达溃疡局部,影响愈合。中医外治法通过清创和给药双重途径,能迅速促进溃疡愈合,其中“煨脓长肉”理论是重要的指导思想,强调通过外用药物提脓祛腐拔毒,增加脓液渗出,为创面肉芽增生、表皮生长提供条件[15]。紫朱软膏由紫草、朱砂、黄芪、血竭、阿胶、冰片六味中药组成,具有清热解毒、祛腐生肌、补气益血的功效,是基于“煨脓长肉”理论的代表方剂。方中朱砂、紫草为君药,朱砂解毒祛腐,紫草凉血活血,共奏清热解毒、祛腐化瘀之效;黄芪、阿胶、血竭为臣药,黄芪补气生肌,阿胶补血滋阴,血竭活血定痛,三者共助生肌补血;冰片为佐药,通透肌腠助药效。全方六药,秉承补虚祛瘀并用的治疗思想,对糖尿病足溃疡等慢性创面疗效显著[17,18,26,27]。

中性粒细胞在人体免疫防御中发挥着关键作用,它们通过吞噬、脱颗粒和释放NETs对细菌、病毒或组织损伤释放的抗原做出反应,是人体最早对异常抗原做出免疫防御的细胞。在糖尿病足溃疡的发病机制中,中性粒细胞的数量和功能的异常与患者的病程迁延和不良预后密切相关。研究表明,糖尿病足溃疡患者中性粒细胞升高,且中性粒细胞-淋巴细胞比例上调与患者的高截肢率和死亡率相关[28,29]。此外,糖尿病足溃疡患者中性粒细胞NETs比例异常与其发病和病程密切相关[7]。过量产生的NETs激活了NLRP3炎症小体,并促进巨噬细胞向M1型极化,加剧炎性因子如IL-1的释放。而IL-1又会持续吸引中性粒细胞于创面,诱导其释放NETs,如此恶性循环,导致长期异常炎症和溃疡迁延不愈[13,30,31]。因此,靶向抑制NETs以及NLRP3、IL-1等炎症因子可促进糖尿病足溃疡的愈合[14]。

本研究结果显示,紫朱软膏能够明显降低糖尿病足溃疡面积和深度、增加创面愈合率。同时,紫朱软膏还可明显降低糖尿病足溃疡创面炎性细胞的数量、NETs的比例以及NLRP3和IL-1的表达。相关药理学研究表明,紫朱软膏中朱砂和紫草均具有抑制NETs形成的作用[32,33]。另外,前期的实验研究显示,紫朱软膏可以抑制NLRP3和IL-1的表达[26,34]。因此,紫朱软膏可能通过抑制炎性细胞的聚集、NETs的形成以及炎症因子NLRP3和IL-1的表达来促进糖尿病足溃疡的愈合。在糖尿病足溃疡创面中,NETs是由中性粒细胞过度释放一种病理产物,与中医的“毒”和“瘀”概念相似,而紫朱软膏抑制NETs形成可能正是紫朱软膏的“清热解毒、祛腐化瘀”功效的一种体现。

作者贡献度说明:

孙健:实验设计与论文撰写;樊炜静:病例收集;袁美杰:标本采集;黄何尘:资料收集与统计;游洋:病例收集;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 Tang WH, Zhao YN, Cheng ZX, et al. Risk factors for diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis[J].Vascular,2024, 32(3): 661-669.

2 Kaka AS, Landsteiner A, Ensrud KE, et al. Risk prediction models for diabetic foot ulcer development or amputation: A review of reviews[J]. J Foot Ankle Res, 2023, 16(1): 13.

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 Rastogi A, Goyal G, Kesavan R, et al. Long term outcomes after incident diabetic foot ulcer: Multicenter large cohort prospective study (EDI-FOCUS investigators) epidemiology of diabetic foot complications study: Epidemiology of diabetic foot complications study[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2020, 162: 108113.

5 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, 30(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, 2023,30(1): 24-30.

6 Zhu ZY, Zhou SZ, Li SC, et al. Neutrophil extracellular traps in wound healing[J]. Trends Pharmacol Sci, 2024, 45(31): 1033-1045.

7 Yang SF, Gu ZC, 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.

8 Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, et al. Neutrophil extracellular traps: From physiology to pathology[J]. Car-

diovasc Res, 2022, 118(13): 2737-2753.

9 Zhu SN, Yu Y, Ren Y, et al. The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 984.

10 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.

11 Fu JN, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Annu Rev Immunol, 2023, 41(1): 301-316.

12 Heger LA, Schommer N, Van Bruggen S, et al. Neutrophil NLRP3 promotes cardiac injury following acute myocardial infarction through IL-1β production, VWF release and NET deposition in the myocardium[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 14524.

13 Lee MK, Sreejit G, Nagareddy PR, et al. Attack of the NETs! NETosis primes IL-1β-mediated inflammation in diabetic foot ulcers[J]. Clin Sci, 2020, 134(12): 1399-1401.

14 Yang SF, Feng Y, Chen L, et al. Disulfiram accelerates diabetic foot ulcer healing by blocking NET formation *via* suppressing the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway[J]. Translat Res, 2023, 254: 115-127.

15 樊炜静, 王宏飞, 杨宝钟, 等. 论煨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.

16 李文惠, 杨晓, 闫少庆, 等. 紫朱软膏干预糖尿病足愈合过程中细胞因子表达[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(6): 1159-1161.
Li WH, Yang X, Yan SQ, et al. Changes of cytokines in the healing process of diabetic foot and the effect of Zizhu ointment[J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(6): 1159-1161.

17 樊炜静, 王宏飞, 杨宝钟, 等. 煨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.

18 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.

19 黄仁燕, 柳国斌. 中医特色外治方案治疗Wagner2~4级糖尿病足溃疡临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2117-2120.
Huang RY, Liu GB. Clinical observation on the treatment of Wagner Class 2-4 diabetic foot ulcer with characteristic external therapy scheme of traditional Chinese medicine[J]. China J Trad Chin Med Pharm, 2019, 34(5): 2117-2120.

20 杨婷, 邱祥, 柳国斌. 奚氏中医外科技术治疗糖尿病足溃疡180例临床疗效观察[J]. 天津中医药大学学报, 2016,33(35): 298-301.
Yang T, Qiu X, Liu GB. The observation of the clinical effect of Xishi external treatment of traditional Chinese medicine on diabetic foot ulcer[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2016,33(35): 298-301.

21 武宁. 内科综合药物治疗糖尿病足效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(3B): 135-136.
Wu N. Observation on the effect of medical comprehensive medicine on diabetes foot[J]. Chin J Clin Rational Drug Use, 2020, 13(3B): 135-136.

22 梅喜庆, 杨萍萍, 黎英豪. 双黄液辅助治疗促进糖尿病足溃疡愈合的临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 3028-3030.
Mei XQ, Yang PP, Li YH. Clinical observation of Shuanghuang Decoction's adjuvant therapy on promoting the healing of diabetic foot ulcer[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(9): 3028-3030.

23 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41(8): 668-695, 41(9): 757-784.
Chinese Diabetes Society. 2020 Chinese type 2 diabetes prevention and treatment comprehensive guide[J]. Chin J Pract Intern Med, 2021, 41(8): 668-695, 41(9): 757-784.

24 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.

25 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.

26 樊炜静, 李文惠, 卢慧敏, 等. 基于煨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胞葬逃逸的机制研究[J]. 中医药学报, 2023, 51(11): 29-35.
Fan WJ, Li WH, Lu HM, et al. Exploring the mechanism of hematite ointment to reverse the macrophage efferocytosis escape of diabetic refractory wound through NLRP3 based on the theory of weinong zhangrou [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(11): 29-35.

27 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.

28 Chen WW, Chen K, Xu ZX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio predict mortality in patients with diabetic foot ulcers undergoing amputations [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2021: 821-829.

29 Altay FA, Kuzi S, Altay M, et al. Predicting diabetic foot ulcer infection using the neutrophil-to-lymphocyte ratio: A prospective study[J]. J Wound Care, 2019, 28(9): 601-607.

30 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.

31 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.

32 Ma HK, Yao WT, Peng B, et al. Mercury-containing preparations attenuate neutrophil extracellular trap formation in mice and humans through inhibiting the ERK1/2 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2023: 117421.

33 马慧可, 姚文涛, 刘欣, 等. 紫草素对糖尿病小鼠中性粒细胞胞外诱捕网表达的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2023, 29(3): 377-382.
Ma HK, Yao WT, Liu X, et al. Effects of Shikoninon the expressionof neutrophils extracellular traps induced in diabetic mice [J]. Chin J Surg Integr Tradit Western Med, 2023, 29(3): 377-382.

34 胡啸明, 黄仁燕, 韩强, 等. 紫朱软膏对急性创面愈合过程中IL-1β、MMP-9和TGF-β的作用及自噬相关性研究[J]. 中医药学报, 2020, 48(11): 1-9.
Hu XM, Huang RY, Han Q, et al. Effect of Zizhu Ointment on IL-1β, MMP-9 and TGF-β during acute wound healing and correlation of autophagy and would healing[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2020, 48(11): 1-9.

[本文编辑] 朱金月