

糖尿病足患者创面肉芽组织中 Angiotenin 表达的探讨

褚月颌 王鹏华 李代清 于德民

【摘要】 目的 测定 Angiotenin (Amot) 蛋白在糖尿病足溃疡患者创面肉芽组织中的表达, 探讨高糖及缺血对 Amot 表达的影响及其与溃疡预后的关系。**方法** 选取天津医科大学代谢病医院糖尿病足病科住院的糖尿病足溃疡患者, 均符合 Wagner 分级 2~4 级, 共 28 例。根据溃疡侧踝肱指数 (ABI) 及 HbA1c 将糖尿病足溃疡患者分为 4 组: A 组: ABI ≥ 0.7 , HbA1c $< 9\%$; B 组: ABI ≥ 0.7 , HbA1c $\geq 9\%$; C 组: ABI < 0.7 , HbA1c $< 9\%$; D 组: ABI < 0.7 , HbA1c $\geq 9\%$, 每组 7 例。以同时期足部烧伤患者为非糖尿病、非缺血对照组。取各组患者足溃疡创面肉芽组织, 应用 Western 印迹法测定 Amot 蛋白的表达, 每例糖尿病足患者进行 Wagner 分级诊断并随访溃疡的预后情况。**结果** 比较 4 组糖尿病足患者年龄、性别、糖尿病病程、并发症、肾功能、血脂、超敏 C 反应蛋白, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组相比, p80-Amot 在 B 组和 D 组表达明显减少 ($P < 0.05$)。与 A 组相比, p80-Amot 在 B 组和 D 组表达明显减少 ($P < 0.05$)。p130-Amot 在各组间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组患者足溃疡的预后情况没有明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** 高血糖和缺血都会造成糖尿病足患者创面肉芽组织中 Amot 蛋白表达下降, 其中高血糖的作用更显著。Amot 蛋白表达与溃疡预后无明显相关。

【关键词】 Angiotenin; 高糖; 缺血; 糖尿病足; 溃疡预后

Angiotenin expression in wound granulation tissues from patients with diabetic foot Chu Yuejie*, Wang Penghua, Li Daiqing, Yu Demin. *Department of Diabetes Mellitus, Tianjin Chinese Medicine Research Institute Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China

Corresponding author: Wang Penghua, Email: wph200000@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of Angiotenin (Amot) in wound granulation tissues from patients with diabetic foot, and investigate the effects of high glucose and ischemia on the expression of Amot and the relationship between Amot expression and ulcer prognosis. **Methods** Twenty-eight diabetic inpatients with foot ulcers (Wagner's 2-4 grade) from the Department of Diabetic Foot in the Metabolic Diseases Hospital of Tianjin Medical University, were divided into four groups according to their ankle brachial index (ABI) and HbA1c: group A: ABI ≥ 0.7 , HbA1c $< 9\%$; group B: ABI ≥ 0.7 , HbA1c $\geq 9\%$; group C: ABI < 0.7 , HbA1c $< 9\%$ and group D: ABI < 0.7 , HbA1c $\geq 9\%$, with 7 cases in each group. Patients with foot burns at the same time were included as non-diabetic and non-ischemic control group. Wound granulation tissues were sampled from these patients. Western blot was used to determine the expression of Amot. Wagner's grade was assessed in each patient with diabetic foot and the patients were followed up for the evaluation of ulcer prognosis. **Results** The age, gender, course of diabetes, complications, renal function, blood lipid, and sensitive C reactive protein were compared, but no significant difference were found between four diabetic foot groups (all $P > 0.05$). Compared with control group, expression of p80-Amot in group B and group D were significantly reduced (all $P < 0.05$). Compared with group A, expression of p80-Amot in group B and group D were also significantly reduced (all $P < 0.05$). There was no significant difference in expression of p130-Amot between groups ($P > 0.05$). There was also no significant difference in ulcer prognosis between groups ($P > 0.05$). **Conclusions** High glucose and ischemia decrease the expression of Amot in wound granulation tissues in patients with diabetic foot, and high glucose has a more potent effect. There is no significant relationship between Amot expression and ulcer prognosis.

【Key words】 Angiotenin; High glucose; Ischemia; Diabetic foot; Ulcer prognosis

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 226-229)

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4157.2015.04.003

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目 (10JCZDJ19800); 天津市卫生局科技基金 (09KZ87)

作者单位: 300120 天津市中医药研究院附属医院糖尿病科 (褚月颌); 300070 天津医科大学代谢病医院, 卫生部激素与发育重点实验室 (王鹏华, 李代清, 于德民)

通信作者: 王鹏华, Email: wph200000@163.com

糖尿病足溃疡是与糖尿病相关的严重并发症之一,常导致患者疼痛和生活质量下降^[1]。糖尿病足溃疡伤口愈合不良的机制非常复杂,其中在肉芽组织的形成过程中,血管新生障碍是导致糖尿病足溃疡伤口愈合不良的重要原因。Angiomotin(Amot)是 2001 年发现的一种血管生成抑素结合蛋白^[2]。其异构体 p80-Amot 和 p130-Amot 分别在血管生成不同阶段发挥不同作用。体外实验表明,p80-Amot 可增强细胞迁移并稳定管状结构,而 p130-Amot 则与肌动蛋白相关并影响细胞塑形^[3]。作为一种调节血管新生的蛋白,Amot 通过调节内皮细胞迁移和管状结构形成,在伤口愈合过程中发挥重要作用^[4]。而 Amot 表达失调可能是糖尿病患者伤口愈合不良的发病原因。因此本研究测定了 Amot 在糖尿病足患者创面肉芽组织中的表达,旨在评价高血糖及缺血对 Amot 蛋白表达的影响,并进一步分析其与溃疡预后的关系,从而深入探讨其在糖尿病缺血性溃疡愈合的病理过程中发挥的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组 选取 2011 年 2 月至 12 月在天津医科大学代谢病医院糖尿病足病科住院的糖尿病足溃疡患者 28 例,其中男 16 例,女 12 例,平均年龄(63.64 ± 9.59)岁。根据溃疡侧下肢缺血情况[踝肱指数(ABI)]及血糖控制情况(HbA1c)将患者分为 4 组,每组 7 例,A 组:ABI ≥ 0.7 ,HbA1c $< 9\%$;B 组:ABI ≥ 0.7 ,HbA1c $\geq 9\%$;C 组:ABI < 0.7 ,HbA1c $< 9\%$;D 组:ABI < 0.7 ,HbA1c $\geq 9\%$ 。另选取 7 例同时期在天津武警医院烧伤科住院的足部烧伤患者作为非糖尿病、非下肢缺血的对照组。对照组患者平均年龄(59.24 ± 11.57)岁,其中男 5 例,女 2 例,7 例患者两次随机血糖均 < 6 mmol/L,患肢 ABI 均大于 1.0。经本院伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

1.2 临床资料采集 各组患者由专业医师进行病史询问及体格检查,并详细记录于病历中。所有患者入院禁食 12 h,次日清晨采集肘静脉血,采用 ImxAnalyzer 全自动生化仪测定尿素氮、肌酐、肝功能、血脂、血流变,用酶放大化学发光法测定 HbA1c,采用免疫比浊法,应用芬兰 Orion Diagnostica 公司试剂盒测定超敏 C 反应蛋白(hs-CRP),同时测定 24 h 尿微量白蛋白(UMA),并行 ABI、双下肢血管彩色多普勒、心电图、眼底镜检查。空腹血糖为患者住院期间用德国拜耳公司血糖仪测定的所有空腹血糖的平均值。对照组患者同时采集相应的临床资料。

1.3 糖尿病足临床分级标准 采用 Wagner 分级法:0 级,有发生足溃疡危险因素,目前无溃疡;1 级,表浅溃疡,无感染;2 级,较深溃疡,常合并软组织炎,无脓肿或骨的感染;3 级,深部溃疡,有脓肿或骨髓炎;4 级,局限性坏疽;5 级,全足坏疽^[5]。

1.4 治疗经过 28 例糖尿病足溃疡患者入院后均选用胰岛素控制血糖,下肢缺血患者给予前列腺素 E1(凯时)改善血运,神经病变患者给予神经妥乐平营养神经。根据足分泌物培养的药敏结果,结合临床症状选用 1~2 种敏感抗生素控制感染。足溃疡伤口每日用中药敷料换药,并根据创面情况进行必要的清创及窦道冲洗治疗。经上述综合治疗后,病情仍无法控制甚至继续恶化的患者及时进行截趾(肢)手术,术后延续上述治疗至创面愈合。对照组给予敏感抗生素控制感染,足溃疡予换药、清创及窦道冲洗治疗。

1.5 Western 印迹测定 Amot 蛋白的表达 分别提取各组患者足溃疡伤口肉芽组织总蛋白,取等量蛋白(50 μ g)上样进行 SDS-PAGE 电泳(美国 Bio-Rad 公司),转膜,封闭,一抗 4℃过夜,二抗室温孵育 2 h,洗膜,显影。GAPDH 为内参,Amot 一抗工作浓度为 1:100,GAPDH 一抗及 Amot 二抗工作浓度为 1:5 000,GAPDH 二抗工作浓度为 1:4 000。X 光片经图像扫描仪进行灰度扫描,以 Amot 与 GAPDH 的灰度比值表示 Amot 蛋白表达的相对值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。计数资料的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者临床资料的比较 各组患者年龄、性别、糖尿病病程、各种合并症情况、血脂、肾功能以及反映感染情况的 hs-CRP 差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。A 组、C 组空腹血糖和 HbA1c 低于 B 组、D 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。A 组、B 组 ABI 高于 C 组、D 组,A 组、B 组彩色多普勒所测量的双下肢动脉最大狭窄率低于 C 组、D 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.2 各组糖尿病足溃疡患者 Wagner 分级情况 各组糖尿病足溃疡患者中除 A 组、C 组各有 1 例 Wagner 2 级患者外,其余均为 Wagner 3 级、4 级患者(表 2),表明入选病例足溃疡程度较重,多数合并感染与局限性坏疽。

表 1 各组糖尿病患者临床资料的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	糖尿病病程	空腹血糖(mmol/L)	HbA1c(%)	ABI	双下肢动脉最大狭窄率(%)
A 组	7	9.29 ± 6.42	8.04 ± 1.18 ^{ac}	8.27 ± 0.66 ^{ac}	0.83 ± 0.07 ^{bc}	26.86 ± 13.17 ^{bc}
B 组	7	8.86 ± 6.47	13.59 ± 3.10	11.71 ± 2.03	0.87 ± 0.09 ^{bc}	25.57 ± 16.65 ^{bc}
C 组	7	11.57 ± 4.35	7.39 ± 1.46 ^{ac}	7.61 ± 0.90 ^{ac}	0.42 ± 0.22	59.14 ± 13.81
D 组	7	15.14 ± 8.45	13.54 ± 3.29	12.16 ± 1.88	0.48 ± 0.16	69.00 ± 23.94
F 值		1.336	13.413	17.071	16.704	11.393
P 值		0.286	0.000	0.000	0.000	0.000

组别	例数	hs-CRP(mg/L)	甘油三酯(mmol/L)	总胆固醇(mmol/L)	肌酐(μmol/L)
A 组	7	10.10 ± 4.85	1.53 ± 0.78	5.71 ± 1.95	86.60 ± 49.83
B 组	7	9.46 ± 5.04	1.46 ± 0.31	5.62 ± 2.56	73.80 ± 33.34
C 组	7	10.39 ± 4.83	1.50 ± 1.23	5.55 ± 2.32	86.30 ± 18.70
D 组	7	9.49 ± 5.78	1.52 ± 0.58	5.98 ± 2.08	82.10 ± 28.65
F 值		0.056	0.009	0.051	0.208
P 值		0.982	0.999	0.984	0.890

注: A 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c < 9%; B 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c ≥ 9%; C 组: ABI < 0.7, HbA1c < 9%; D 组: ABI < 0.7, HbA1c ≥ 9%; ABI: 踝肱指数; hs-CRP: 超敏 C 反应蛋白; 与 B 组相比, ^aP < 0.01, 与 C 组相比, ^bP < 0.01, 与 D 组相比, ^cP < 0.01

表 2 各组糖尿病患者 Wagner 分级情况[n(%)]

组别	例数	2 级	3 级	4 级
A 组	7	1(14.3)	4(57.1)	2(28.6)
B 组	7	0	4(57.1)	3(42.9)
C 组	7	1(14.3)	3(42.9)	3(42.9)
D 组	7	0	2(28.6)	5(71.4)

注: A 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c < 9%; B 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c ≥ 9%; C 组: ABI < 0.7, HbA1c < 9%; D 组: ABI < 0.7, HbA1c ≥ 9%; ABI: 踝肱指数

2.3 各组患者足溃疡伤口肉芽组织中 Amot 蛋白表达情况 与对照组相比, p80-Amot 在 B 组、D 组中表达明显减少, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。在各组糖尿病足溃疡患者中, 与 A 组相比, p80-Amot 在 B 组、D 组患者中表达也明显减少, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。而 p130-Amot 在各组间的表达差异无统计学意义(P > 0.05), 见图 1。

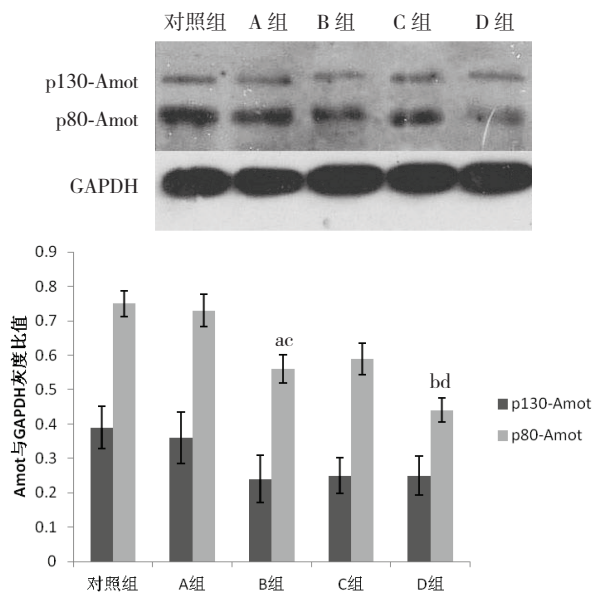
2.4 各组患者预后情况 各组足溃疡患者预后情况见表 3。其中约有 2/3 的患者经治疗后, 足溃疡创面愈合出院。约有 1/3 的患者经上述治疗后, 溃疡创面仍未愈合, 门诊继续换药治疗。C 组有 1 例缺血严重的患者, 创面长期不愈, 患肢疼痛难忍而行高位截肢手术。各组患者预后差异无统计学意义($\chi^2=6.833$, $P=0.077$)。

3 讨论

目前国内、外还没有更多关于 Amot 与伤口愈合方面的研究。鉴于 Amot 在促进血管新生过程中所起的重要作用, 推测其在肉芽组织的形成过程中也是重要的促进因子。

本研究结果显示, 对照组患者 p80-Amot 和 p130-Amot 表达量最多, 在糖尿病足溃疡的各组患者中, A 组表达量最多, 而 D 组表达量最少。表明高糖和

缺血均可能会引起 Amot 蛋白表达的下降, 从而影响肉芽组织中新生血管的形成, 进而造成溃疡伤口难



注: A 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c < 9%; B 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c ≥ 9%; C 组: ABI < 0.7, HbA1c < 9%; D 组: ABI < 0.7, HbA1c ≥ 9%; ABI: 踝肱指数; 与对照组相比, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01; 与 A 组相比, ^cP < 0.05, ^dP < 0.01

图 1 Amot 蛋白在各组患者足溃疡伤口肉芽组织中表达的差异

表 3 各组患者预后情况[n(%)]

组别	例数	愈合	截趾后愈合	截趾后未愈	高位截肢
对照组	7	4(57.1)	2(28.6)	1(14.3)	0
A 组	7	3(42.8)	2(28.6)	2(28.6)	0
B 组	7	2(28.6)	3(42.8)	2(28.6)	0
C 组	7	3(42.8)	1(14.3)	2(28.6)	1(14.3)
D 组	7	1(14.4)	3(42.8)	3(42.8)	0

注: A 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c < 9%; B 组: ABI ≥ 0.7, HbA1c ≥ 9%; C 组: ABI < 0.7, HbA1c < 9%; D 组: ABI < 0.7, HbA1c ≥ 9%; ABI: 踝肱指数

以愈合。与对照组及 A 组相比, p80-Amot 在血糖控制差的两组糖尿病足患者中的表达显著减少, 表明高浓度的葡萄糖较缺血对 p80-Amot 蛋白表达的影响更大。而 p130-Amot 在各组间的表达差异无统计学意义。分析原因, 可能是由于 p130-Amot 与 p80-Amot 在血管新生的不同阶段分别发挥不同的作用所致。有研究表明, p80-Amot 可以增强细胞的迁移并稳定管状结构, 而 p130-Amot 则与肌动蛋白相关并影响细胞的塑形^[6]。Ernkqvist 等^[6]研究分析了两种 Amot 异构体在小鼠胚胎视网膜血管生成过程中的表达, 显示 p80-Amot 主要在细胞迁移阶段表达, 而 p130-Amot 则主要在管状结构稳定和成熟阶段表达, 进一步证实了二者相互作用, 共同调节血管新生。本试验中, 各组患者肉芽组织的取材时间主要掌握在肉芽组织生长的早期阶段。此时, 足溃疡局部的感染情况已经基本得到控制, 坏死组织被清除, 肉芽组织新鲜丰富。而这一时期正是血管内皮细胞、成纤维细胞及上皮细胞大量募集到伤口周围, 形成新生血管的时期。因此, 在细胞迁移阶段表达的 p80-Amot 可能在此期发挥更主要的作用, 表达量也更高。因此, 高糖和缺血对它的影响可能会更大。而 p130-Amot 则主要在血管形成的后期表达。所以, 在本研究中虽然也发现了高糖和缺血使得 p130-Amot 表达下降, 但差异并没有统计学意义。进一步印证了 Amot 的两种拓扑异构体在血管新生的不同阶段各自发挥不同的作用。

在糖尿病足溃疡的各组患者间进一步分析 Amot 蛋白表达与溃疡预后的关系, 各组患者足溃疡的预后情况并没有明显的差异。分析原因, 可能为: (1) 影响溃疡愈合的因素十分复杂, 其中最重要的

因素为感染。(2) Amot 蛋白仅在伤口愈合过程中的某一个阶段发挥作用, 而其他诸多的蛋白因子, 如血管内皮细胞生长因子、表皮生长因子的变化也会影响伤口的愈合。本研究中只测定了 Amot 蛋白的表达情况, 并未检测其他的蛋白因子。因此试验结果没有显示出 Amot 蛋白表达的差异与溃疡愈合的相关性。由此可见, 糖尿病足溃疡难以愈合的机制非常复杂, 还需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Cornell S, Dorsey VJ. Diabetes pharmacotherapy in 2012: considerations in medication selection[J]. Postgrad Med, 2012, 124(4): 84-94.
- [2] Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, et al. Angiotensin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation[J]. J Cell Biol, 2001, 152(6): 1247-1254.
- [3] Bratt A, Birot O, Sinha I, et al. Angiotensin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility[J]. J Biol Chem, 2005, 280(41): 34859-34869.
- [4] Roy S, Khanna S, Rink C, et al. Characterization of the acute temporal changes in excisional murine cutaneous wound inflammation by screening of the wound-edge transcriptome[J]. Physiol Genomics, 2008, 34(2): 162-184.
- [5] 许樟荣. 糖尿病足病变诊断和治疗[J]. 中国糖尿病杂志, 2001, 9(3): 180-183.
- [6] Ernkqvist M, Birot O, Sinha I, et al. Differential roles of p80- and p130-angiotensin in the switch between migration and stabilization of endothelial cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(3): 429-437.

(收稿日期: 2014-12-01)

• 消息 •

《国际内分泌代谢杂志》编辑部网络采编办公系统开通运行通知

各位作者好! 为提高稿件处理和办公效率, 《国际内分泌代谢杂志》编辑部将从 2015 年 2 月开始使用网络采编办公系统。作者投稿采用新的网络平台 (<http://endocrine.paperopen.com>), 不再使用纸质投稿, 特此公告, 望作者予以支持和配合。在使用网络投稿系统中如您有任何疑问、意见和建议, 请您致电 022-83336730, 022-83336731 或者发邮件到 nfmfc@126.com。

注意: 投稿作者请仔细阅读网站首页——左侧“作者中心”——“作者指南”的相关说明, 进行注册, 登陆及投稿。谢谢!

本刊编辑部