

负载富血小板血浆的水凝胶促进糖尿病大鼠创面愈合

张娅¹, 牟秋菊², 王自林¹, 刘宏杰¹, 祝丽丽²

https://doi.org/10.12307/2023.976

投稿日期: 2022-12-05

采用日期: 2023-01-16

修回日期: 2023-04-08

在线日期: 2023-04-26

中图分类号:

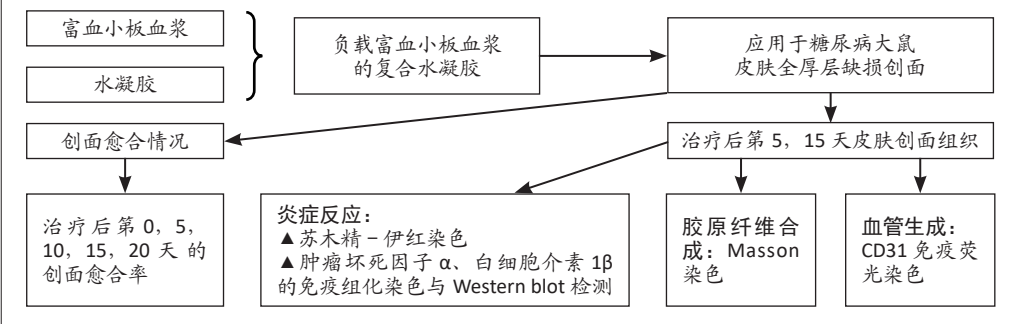
R459.9; R318; R641

文章编号:

2095-4344(2024)05-00690-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 负载富血小板血浆的复合水凝胶修复糖尿病大鼠皮肤创面



文题释义:

富血小板血浆: 是富含血小板的血浆浓缩物, 因其富含大量生长因子而被用于创面治疗。富血小板血浆中所含的血小板及生长因子, 不但可对创面的止血、修复及抗感染发挥作用, 还能对细胞增殖、血管生成等有促进作用。

水凝胶: 是一种具有三维网络状结构的聚合物, 含水量高且具有良好的生物相容性, 将其作为创面敷料能给受损皮肤组织提供稳定湿润的创面修复环境, 加速创面愈合。

摘要

背景: 糖尿病创面存在感染、缺血、周围神经病变、血管病变等复杂情况, 结构功能单一的普通水凝胶敷料不能满足糖尿病创面愈合的需求。

目的: 探讨负载富血小板血浆的水凝胶修复糖尿病大鼠皮肤全厚层缺损创面的效果。

方法: 抽取SD大鼠血液, 制备富血小板血浆; 分别制备单纯的羧甲基壳聚糖/氧化硫酸软骨素水凝胶与负载富血小板血浆的羧甲基壳聚糖/氧化硫酸软骨素水凝胶。取成年雄性SD大鼠, 腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病模型。造模成功后, 在糖尿病大鼠背部制作直径为2 cm的圆形全厚层皮肤缺损创面, 采用随机数字表法分为4组干预, 每组10只: 空白组创面贴敷纱布, 水凝胶组、富血小板血浆组和复合水凝胶组创面分别贴敷单纯的水凝胶、富血小板血浆和负载富血小板血浆的水凝胶, 治疗20 d内观察创面愈合情况。

结果与结论: ①治疗后第20天, 水凝胶组、富血小板血浆组和复合水凝胶组创面愈合率高于空白组($P < 0.05$), 复合水凝胶组创面愈合率高于富血小板血浆组($P < 0.05$); ②治疗后第5天的苏木精-伊红染色显示, 与空白组、水凝胶组和富血小板血浆组相比, 复合水凝胶组创面组织中有大量的炎细胞浸润、新生肉芽组织及毛细血管生成; ③治疗后第5天的免疫组化染色及Western blot检测结果显示, 复合水凝胶组创面组织中的肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 蛋白表达低于空白组、水凝胶组和富血小板血浆组($P < 0.05$); ④Masson染色显示, 治疗后第15天, 与空白组、水凝胶组和富血小板血浆组相比, 复合水凝胶组创面组织中胶原纤维更多, 排列整齐、分布均匀致密; ⑤CD31免疫荧光染色显示, 治疗后第15天, 复合水凝胶组创面组织中的CD31表达高于空白组、水凝胶组和富血小板血浆组($P < 0.05$); ⑥结果显示, 负载富血小板血浆的复合水凝胶能够通过促进肉芽组织生成、胶原纤维合成、血管生成以及减轻炎症反应来促进糖尿病大鼠皮肤全厚层缺损创面的愈合。

关键词: 糖尿病创面; 水凝胶; 富血小板血浆; 创面愈合; 炎症; 血管生成

Hydrogel loaded with platelet-rich plasma promotes wound healing in diabetic rats

Zhang Ya¹, Mu Qiuju², Wang Zilin¹, Liu Hongjie¹, Zhu Lili²

¹Teaching and Research Department of Clinical Laboratory Fundamentals and Hematology, School of Medical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China; ²Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Zhang Ya, Master candidate, Junior technologist, Teaching and Research Department of Clinical Laboratory Fundamentals and Hematology, School of Medical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Zhu Lili, Senior technologist, Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

¹贵州医科大学医学检验学院临床检验基础与血液学检验教研室, 贵州省贵阳市 550000; ²贵州医科大学附属医院输血科, 贵州省贵阳市 550000

第一作者: 张娅, 女, 1995年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 贵州医科大学在读硕士, 初级技师, 主要从事临床血细胞治疗研究。

通讯作者: 祝丽丽, 主任技师, 贵州医科大学附属医院输血科, 贵州省贵阳市 550000

https://orcid.org/0000-0002-9679-1382(张娅)

基金资助: 贵州省卫健委项目(gzwbkj2021-366), 项目负责人: 祝丽丽; 贵阳市科技局项目筑科合([2018]1-75), 项目负责人: 祝丽丽

引用本文: 张娅, 牟秋菊, 王自林, 刘宏杰, 祝丽丽. 负载富血小板血浆的水凝胶促进糖尿病大鼠创面愈合[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(5):690-696.



Abstract

BACKGROUND: Diabetic wounds have complicated conditions such as infection, ischemia, peripheral neuropathy, and vascular disease. Ordinary hydrogel dressings with single structure and function cannot meet the needs of diabetic wound healing.

OBJECTIVE: To explore the effect of a hydrogel loaded with platelet-rich plasma on wound healing of full-thickness skin defects in diabetic rats.

METHODS: The blood of SD rats was extracted to prepare platelet-rich plasma. Carboxymethyl chitosan/oxchondroitin sulfate hydrogel and carboxymethyl chitosan/oxchondroitin sulfate hydrogel loaded with platelet-rich plasma were prepared separately. Streptozotocin was used to induce diabetes model in adult male SD rats. A round full-thickness skin wound with a diameter of 2 cm was made on the back of diabetic rats. The rats were randomly divided into four groups ($n=10$ per group). The blank group was applied with gauze on the wound. The hydrogel group, platelet-rich plasma group, and composite hydrogel group were respectively applied with the corresponding hydrogel, platelet-rich plasma and hydrogel loaded with platelet-rich plasma. The wound healing was observed within 20 days after treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) On day 20 after treatment, the wound healing rate of the hydrogel group, platelet-rich plasma group and composite hydrogel group was significantly higher than that of the blank group ($P < 0.05$). The wound healing rate of the composite hydrogel group was significantly higher than that of the platelet-rich plasma group ($P < 0.05$). (2) The results of hematoxylin-eosin staining on day 5 after treatment showed that compared with the blank group, hydrogel group and platelet-rich plasma group, there were a large number of inflammatory cell infiltration, new granulation tissue and capillary formation in the wound tissue of the composite hydrogel group. (3) On day 5 after treatment, the results of immunohistochemical staining and western blot assay showed that the expression levels of tumor necrosis factor α and interleukin 1β in wound tissue in the composite hydrogel group were significantly lower than those in the blank group, hydrogel group and platelet-rich plasma group ($P < 0.05$). (4) Masson staining results on day 15 after treatment showed that compared with the blank group, hydrogel group and platelet-rich plasma group, there were more collagen fibers in the wound tissue of the composite hydrogel group, which were orderly, evenly distributed and dense. (5) CD31 immunofluorescence staining showed that on day 15 after treatment, the expression of CD31 in wound tissue of the composite hydrogel group was significantly higher than that of the blank group, hydrogel group and platelet-rich plasma group ($P < 0.05$). (6) These results suggest that the hydrogel loaded with platelet-rich plasma can promote the healing of full-thickness skin defect wounds in diabetic rats by promoting granulation tissue, collagen fiber and angiogenesis, and reducing the inflammatory response.

Key words: diabetic wound; hydrogel; platelet-rich plasma; wound healing; inflammation; angiogenesis

Funding: Guizhou Provincial Health Commission Project, No. gzwkj2021-366 (to ZLL); a grant from Guiyang Science and Technology Bureau, No. [2018]1-75 (to ZLL)

How to cite this article: ZHANG Y, MU QJ, WANG ZL, LIU HJ, ZHU LL. Hydrogel loaded with platelet-rich plasma promotes wound healing in diabetic rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(5):690-696.

0 引言 Introduction

糖尿病创面是糖尿病严重的并发症之一，也是非创伤性截肢的主要原因，病理机制复杂，损伤后局部溃疡难愈、复发率高、医疗费用高，尚无特效药物^[1]，给患者和社会带来了巨大的负担^[2-3]。目前，糖尿病创面的治疗主要是采用手术清创、移植植物移植和创面负压治疗等方法，防止创面感染^[4-6]。然而，由于该类创面局部微循环差，组织缺血、缺氧，传统疗法并不能达到令人满意的治疗结果^[7]，因此，目前需要寻找促进糖尿病创面愈合的新策略。

富血小板血浆是全血经过离心后得到的富含血小板的血浆浓缩物^[8]，其主要成分是高浓度的血小板、纤维蛋白和白细胞，激活后含有多种丰富的生长因子，如血小板衍生生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子等^[9-10]。研究表明，富血小板血浆中高浓度的生长因子及纤维蛋白作用于局部可有效促进组织再生及创面愈合^[11-12]。但是，富血小板血浆激活后富含生长因子的上清液与纤维蛋白胶体分离，导致其可塑性差。此外，富血小板血浆中不稳定的纤维蛋白基质迅速降解导致生长因子的爆发性释放，限制了其在临床医学中的应用^[13-14]。

羧甲基壳聚糖是由壳聚糖羧甲基化所得到的一种水溶性衍生物，由羧甲基壳聚糖为原料制备的水凝胶具有良好的生物相容性，能够促进创面愈合和组织修复^[15-16]。硫酸软骨素是存在于软骨细胞外基质中的一种多糖，具有良好的生物相容性、可降解性等^[17-18]，其可用高碘酸钠进行氧化，得到的氧化硫酸软骨素同样具有生物相容性，且生物稳定性提高^[19]。由羧甲基壳聚糖水凝胶和氧化硫酸软骨素制备的水凝胶具有较高含水量，可以为干燥结痂创面提供额外的水分，有利于创面清创^[20]；与此同时，该水凝胶还可以吸收创面处过多的

渗出液并保持创面湿润环境，因此具有优异的渗出液管理能力^[21]。然而，由于糖尿病创面存在感染、缺血、周围神经病变、血管病变等复杂情况，结构功能单一的普通水凝胶敷料不能满足糖尿病创面愈合的需求。此外，用富血小板血浆覆盖创面时容易与创面分离，造成创面坏死、渗出，失去抗炎和修复作用。因此，若能够将羧甲基壳聚糖/氧化硫酸软骨素水凝胶用于负载富血小板血浆后治疗糖尿病创面，将两者优势取长补短，将为糖尿病创面的治疗提供新思路。

因此，此次实验旨在研制一种由羧甲基壳聚糖和氧化硫酸软骨素组成的水凝胶，用于负载富血小板血浆，使之具有优良的生长因子缓释性和胶体机械强度，探讨其对糖尿病皮肤全厚层缺损创面愈合的作用，以期为糖尿病创面寻找一种新的治疗策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验和组织切片染色实验，组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2022年1-11月在贵州医科大学附属医院临床研究中心和临床研究中心实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雄性SD大鼠80只，SPF级，体质量280-320 g，购自浙江维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK(浙)2019-0001。所有大鼠均饲养于贵州医科大学附属医院临床研究中心实验动物中心，大鼠饲养环境温度15-22℃，湿度50%-60%，12 h明暗交替环境下自由进食、饮水。所有大鼠适应性饲养1周，其中20只用于采集富血小板血浆。实验方案经贵州医科大学动物实验中心审核批准(批准号：2201187)。

1.3.2 主要试剂与仪器 硫酸软骨素、羧甲基壳聚糖、乙二醇、高碘酸钠(上海麦克林生化科技有限公司);链脲佐菌素(美国 sigma 公司);血糖仪、血糖试纸(上海强生制药有限公司);异氟烷(深圳瑞沃德有限公司);高脂高糖饲料(江苏协同生物有限公司);兔抗肿瘤坏死因子 α 、兔抗白细胞介素 1β 、小鼠抗 CD31(英国 Abcam 公司);苏木精-伊红染色试剂盒、Masson 染色试剂盒、BCA 蛋白质测定试剂盒(北京索莱宝有限公司);ELISA 试剂盒(美国 RayBiotech 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 氧化硫酸软骨素的制备 参考先前的研究,采用高碘酸钠氧化法制备氧化硫酸软骨素^[19]。将 5 g 硫酸软骨素溶于 100 mL 蒸馏水中,待溶解完全后向其中加入 3.3 g 高碘酸钠,30 °C 条件下避光;8 h 后加入 5 mL 乙二醇,继续搅拌半小时终止反应,然后将产物用蒸馏水透析 3 d,将所得的氧化硫酸软骨素冷冻干燥并储存在 4 °C 下,直到再次使用。

1.4.2 富血小板血浆的制备 采集 SD 大鼠全血,采用二次离心法制备富血小板血浆:首先以 500 \times g 离心 10 min,吸取上层黄色部分血浆层及血小板层,弃去下层红色部分的血细胞层;再以 1 200 \times g 离心 15 min,弃去上层部分的贫血小板血浆,所得的下层部分即为富血小板血浆。将所得的富血小板血浆冻存在 -80 °C 备用,使用时将富血小板血浆与葡萄糖酸钙溶液按 10 : 1 的比例混合即可。

1.4.3 水凝胶的制备 用蒸馏水将羧甲基壳聚糖和氧化硫酸软骨素分别配制成不同质量浓度的溶液,然后将 30 mg/mL 的羧甲基壳聚糖溶液与 30 mg/mL 的氧化硫酸软骨素溶液等体积混合,搅拌充分后静置,即可得到羧甲基壳聚糖/氧化硫酸软骨素水凝胶(记为水凝胶)。使用时将富血小板血浆、羧甲基壳聚糖溶液和含葡萄糖酸钙溶液的氧化硫酸软骨素溶液按体积比为 1 : 1 : 1 混合均匀,即可制得负载富血小板血浆的复合水凝胶(记为复合水凝胶)。

1.4.4 复合水凝胶的缓释性能检测 向复合水凝胶、富血小板血浆中分别加入 PBS,在预定的时间间隔收集 PBS,同时补充等量 PBS,采用 ELISA 试剂盒检测血小板衍生生长因子的累计释放量。

1.4.5 糖尿病大鼠模型的建立 采用随机数字表法将 60 只 SD 大鼠分为模型组($n=50$)和正常对照组($n=10$)。适应性饲养 1 周后,模型组使用高脂高糖饲料喂养 8 周。禁食不禁水 12 h,使用 0.1 mol/L (pH=4.5) 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制 2% 的链脲佐菌素溶液,现配现用。高脂高糖饲料喂养 2 周后,模型组腹腔注射 2% 链脲佐菌素溶液 35 mg/kg,正常对照组给予相同剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,模型组继续高脂高糖饲料。注射 3 d 后检测大鼠尾静脉空腹血糖,血糖 > 16.7 mmol/L 的大鼠入组;血糖值 < 16.7 mmol/L 的大鼠,待血糖恢复正常后再注射常规剂量链脲佐菌素。每周监测大鼠空腹血糖和体质量水平,血糖值持续 > 16.7 mmol/L 达 4 周的大鼠视为糖尿病造模成功。

1.4.6 皮肤创面模型的建立及分组干预 取糖尿病模型建立成功的大鼠 40 只,异氟烷(剂量为 0.6-0.8 L/min)吸入麻醉后,大鼠取俯卧位,固定住四肢,用体积分数 75% 乙醇消毒,在大鼠背部制备直径为 2 cm 的圆形皮肤全厚层缺损,纱布压迫伤口止血,采用随机数字表法分为 4 组:空白组、水凝胶组、富血小板血浆组、复合水凝胶组,每组 10 只。伤后即刻,空白组创面贴敷纱布,水凝胶组、富血小板血浆组、复合水凝胶组创面分别贴敷水凝胶、富血小板血浆和复合水凝胶,0.2 mL/创面,医用纱布包扎,医用胶带固定。糖尿病创面成模后,全部大鼠单笼单只饲养。

1.4.7 取材 治疗第 0, 5, 10, 15, 20 天不同的时间点,在同一高度下拍摄大鼠创面图片,计算创面愈合率。治疗第 5, 15 天后每组随机取 3 只大鼠,麻醉后处死,无菌条件下从距创面边缘 5 mm 处切取包括整个创面在内的组织块,使用 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋后制备组织切片,用于后续的苏木精-伊红染色、Masson 染色、免疫组化染色、Western blot 检测和免疫荧光染色。

1.4.8 检测指标

大鼠皮肤创面愈合情况:根据治疗后第 0, 5, 10, 15, 20 天获得的照片,通过软件分析大鼠创面愈合率。创面愈合率=(创面初始面积-当日测量面积)/创面初始面积 \times 100%,以创面愈合率作为评价创面愈合情况的指标。

组织病理学观察:取治疗后第 5 天的大鼠创面组织,制备成石蜡切片,将切片脱蜡至水后,进行苏木精-伊红染色,在光学显微镜下观察创面组织的炎症细胞浸润和新生肉芽组织生成情况。治疗后第 15 天,取各组创面组织切片,脱蜡至水后进行 Masson 染色,组织中蓝色区域为胶原纤维,在光学显微镜下观察各组大鼠创面组织中胶原纤维合成情况。

免疫组化染色:治疗后第 5 天,取各组创面组织进行肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 免疫组化染色。将组织切片脱蜡至水,进行抗原修复后,分别加入一抗溶液[兔抗肿瘤坏死因子 $\alpha(1 : 200)$ 、兔抗白细胞介素 $1\beta(1 : 500)$],4 °C 孵育过夜。次日,用 PBS 洗涤后分别加入 HRP 标记的二抗溶液,室温孵育 1 h,然后用 DAB 显色,苏木精复染,组织切片脱蜡后用中性树脂封固。阳性表达呈棕黄色。每张切片在高倍镜下随机选取 5 个视野,观察各组创面组织中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的表达情况。

Western blot 检测:取治疗后第 5 天的大鼠创面组织,将组织块剪碎后加入新鲜配制的 RIPA 裂解混合液(RIPA : PMSF=100 : 1)于冰上提取样本总蛋白质,用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定上清液中的蛋白质浓度。然后将变性后的蛋白样品用 SDS-PAGE 凝胶分离,将蛋白质转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗溶液[兔抗肿瘤坏死因子 $\alpha(1 : 1 000)$ 和兔抗白细胞介素 $1\beta(1 : 1 000)$]4 °C 孵育过夜。次日,TBST 洗涤后,将 PVDF 膜与 HRP 结合的二抗溶液室温孵育 1 h, TBST 洗涤,加适量 ECL 发光液用凝胶成像仪曝光显影。

免疫荧光染色: 治疗后第 15 天, 取各组大鼠创面组织进行 CD31 免疫荧光染色。将组织切片脱蜡至水, 进行抗原修复后, 加入一抗溶液鼠抗 CD31(1 : 200), 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤后, 加入对应的荧光二抗, 避光孵育 1 h, PBS 洗涤后, 滴加 DAPI 避光孵育 20 min, 用抗荧光衰减封片剂进行封固, 然后在荧光显微镜下随机选取 5 个视野, 观察各组创面组织血管生成情况。

1.5 主要观察指标 各组大鼠创面愈合率、组织病理形态、炎症因子蛋白表达及血管生成情况。

1.6 统计学分析 使用采用 IBM SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析并作图。定量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。该文统计学方法已经贵州医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 复合水凝胶缓释性能检测 采用 ELISA 法检测复合水凝胶中生长因子的缓释能力, 如表 1 所示, 在前 12 h 内, 富血小板血浆组中血小板衍生生长因子呈爆发性释放, 并在第 48 小时含量不再明显增加, 提示血小板衍生生长因子的释放达到平衡, 而复合水凝胶能够持续释放生长因子血小板衍生生长因子。

表 1 | 复合水凝胶与富血小板血浆中血小板衍生生长因子的释放情况 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

时间	富血小板血浆	复合水凝胶
第 3 小时	523.24±27.25	318.21±56.04
第 6 小时	724.12±30.13	478.10±62.62
第 12 小时	1 027.76±63.20	514.82±60.79
第 24 小时	1 203.13±46.31	633.85±64.80
第 48 小时	1 252.24±41.37	781.78±27.18

2.2 糖尿病大鼠模型的建立 实验期间正常对照组大鼠毛发光亮、精神良好、行为活跃, 模型组大鼠在注射链脲佐菌素后毛发粗糙变黄, 逐渐出现精神倦怠、活动减少等表现。注射链脲佐菌素 28 d 后, 正常对照组大鼠体质量为 (519.17±9.92) g, 模型组大鼠体质量为 (493.8±8.38) g, 两组间体质量比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 注射链脲佐菌素后的第 7, 14, 21, 28 天, 模型组大鼠血糖值均明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 正常对照组与模型组大鼠体质量和血糖值的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Comparison of body mass index and blood glucose of rats in the normal control and model groups

时间	体质量 (g)		血糖值 (mmol/L)	
	正常对照组 (n=10)	模型组 (n=40)	正常对照组 (n=10)	模型组 (n=40)
第 3 天	409.96±7.35	432.02±6.75	10.66±0.79	19.06±2.44 ^a
第 7 天	442.98±7.15	420.04±6.74	10.13±0.71	25.21±2.28 ^a
第 14 天	471.24±8.65	448.43±7.06	9.69±0.69	24.90±1.59 ^a
第 21 天	496.54±9.12	467.88±5.61	9.70±0.76	27.53±0.91 ^a
第 28 天	519.17±9.92	493.80±8.38	9.89±0.54	28.49±1.28 ^a

表注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$

2.3 各组大鼠创面愈合情况 见图 1。

治疗后第 5 天, 各组大鼠创面覆盖有不同程度痂壳, 痂壳间隙及创面周围有红肿现象, 创面无感染及化脓。治疗后第 10 天, 与空白组创面愈合率相比, 其余 3 组大鼠皮肤创面面积均有不同程度减小。治疗后第 15 天, 与空白组创面愈合率相比, 水凝胶组、富血小板血浆组和复合水凝胶组创面愈合率升高, 其中复合水凝胶组创面愈合率最高。治疗后第 20 天, 富血小板血浆组创面较前虽有明显缩小, 但仍有部分创面未愈合, 而复合水凝胶组创面基本愈合完全, 提示与富血小板血浆和水凝胶相比, 复合水凝胶具有更优异的促愈合能力。

2.4 各组大鼠创面形态学观察 治疗后第 5 天的苏木精-伊红染色结果显示, 空白组大鼠创面组织中炎症细胞稀疏分布, 可见大量炎性渗出; 水凝胶组创面可见一定数量炎症细胞、新生肉芽组织以及散在孤立的毛细血管; 富血小板血浆组创面可见较多新生肉芽组织及毛细血管生成; 复合水凝胶组创面有大量的新生肉芽组织生成, 肉芽组织中可见大量血管, 见图 2。

治疗后第 15 天的 Masson 染色结果显示, 空白组胶原纤维 (蓝染) 数量少, 排列较为无序, 分布欠均匀; 与空白组相比, 水凝胶组、富血小板血浆组胶原纤维有增加, 但排列疏松、分布不均匀, 复合水凝胶组胶原纤维数量多且分布均匀、致密, 排列整齐有序, 见图 2。

2.5 各组大鼠创面组织中的炎症反应情况 治疗后第 5 天, 创面组织中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 免疫组织化学染色结果显示, 复合水凝胶组创面组织中的肿瘤坏死因子 α 阳性比例 (25.01±2.64)% 明显低于空白组 (75.87±3.75)%、水凝胶组 (64.07±3.31)% 和富血小板血浆组 (38.57±2.18)% ($P < 0.05$); 复合水凝胶组创面组织中的白细胞介素 1β 阳性比例 (42.26±5.62)% 明显低于空白组 (81.23±4.16)%、水凝胶组 (72.88±3.28)% 和富血小板血浆组 (59.84±4.76)%, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

此外, 治疗后第 5 天的 Western blot 检测结果显示, 复合水凝胶组创面组织中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的蛋白表达明显低于空白组、水凝胶组和富血小板血浆组, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

以上结果表明, 复合水凝胶可以降低创面组织中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的表达。

2.6 各组大鼠创面组织中的血管生成情况 治疗后第 15 天的大鼠创面组织 CD31 免疫荧光染色结果显示, 复合水凝胶组创面微血管数量为 (34.20±1.51) 个 / 视野, 高于空白组 (11.20±1.27) 个 / 视野、水凝胶组 (17.00±1.42) 个 / 视野和富血小板血浆组 (24.87±1.26) 个 / 视野, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5, 结果表明复合水凝胶可以加快创面组织中血管生成速度。

2.7 水凝胶的组织相容性 由大鼠创面组织学形态观察结果可知, 复合水凝胶具有良好的组织相容性。

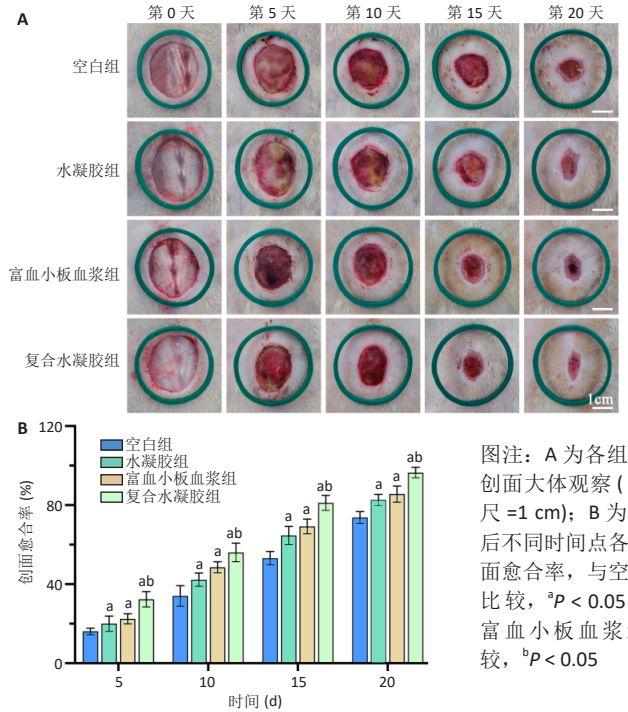


图1 | 治疗后不同时间点各组大鼠创面愈合大体观察
Figure 1 | General observation on wound healing of rats in each group at different time points after treatment

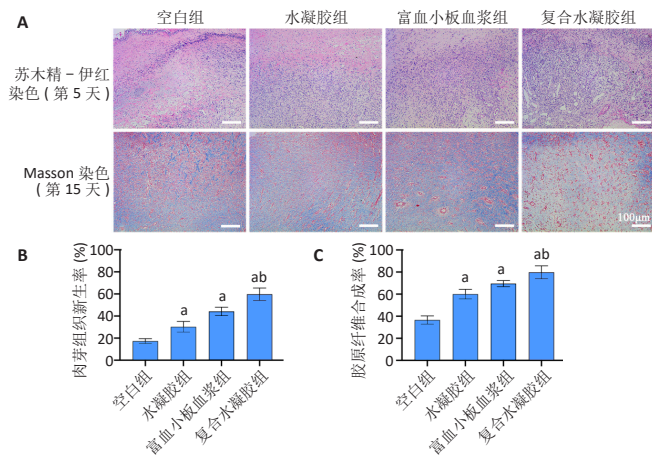


图2 | 治疗后各组大鼠创面组织学观察结果
Figure 2 | Histological observation of wounds in rats of each group after treatment

3 讨论 Discussion

糖尿病创面是糖尿病严重的并发症，具有医疗费用高、反复发作、致残率高等特点^[22]，临床治疗尚无特效药。目前认为炎症反应过度 and 延长以及血管生成受损是导致糖尿病创面迁移不愈的重要原因^[23-24]，因此，调控创面炎症反应和微血管功能障碍对促进糖尿病创面愈合具有重要作用。

创面愈合过程分为止血、炎症、增殖修复和组织重塑4个高度复杂且动态级联的修复进程，各个阶段均需要不同细胞和生长因子参与，以实现组织的最终愈合^[25-26]。低氧、组

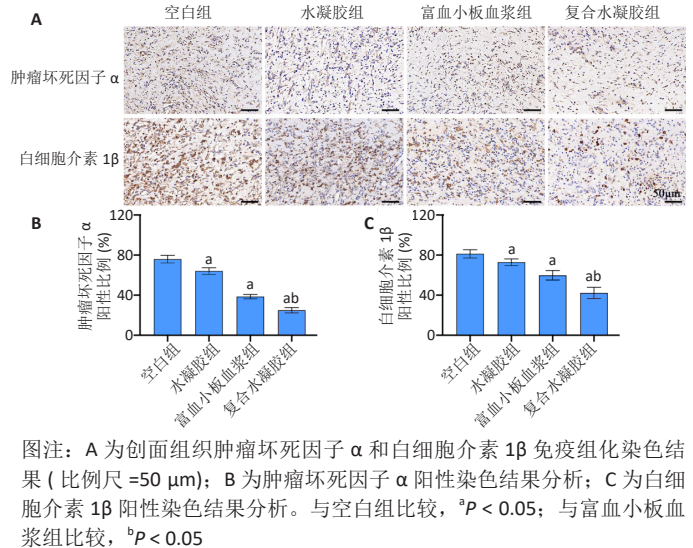


图3 | 治疗后第5天各组大鼠创面组织中肿瘤坏死因子α和白细胞介素1β表达情况(免疫组化染色)
Figure 3 | Tumor necrosis factor α and interleukin 1β expression in wound tissue of rats in each group on day 5 after treatment (immunohistochemical staining)

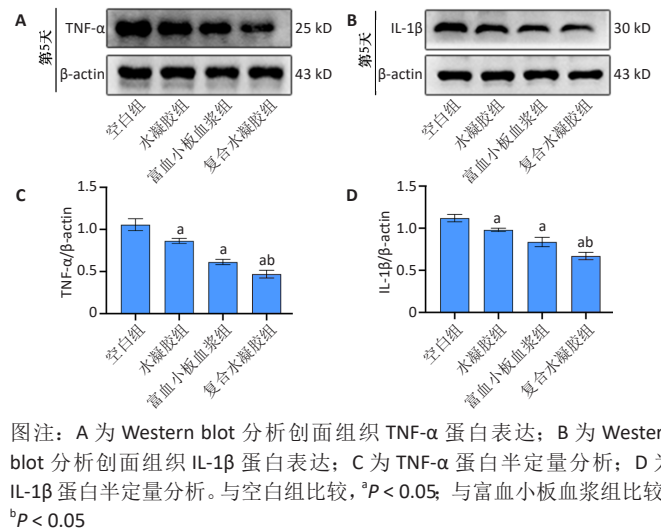


图4 | 治疗后第5天各组大鼠创面组织中肿瘤坏死因子α(TNF-α)和白细胞介素1β(IL-1β)蛋白表达
Figure 4 | Tumor necrosis factor α and interleukin 1β protein expression in wound tissue of rats in each group on day 5 after treatment

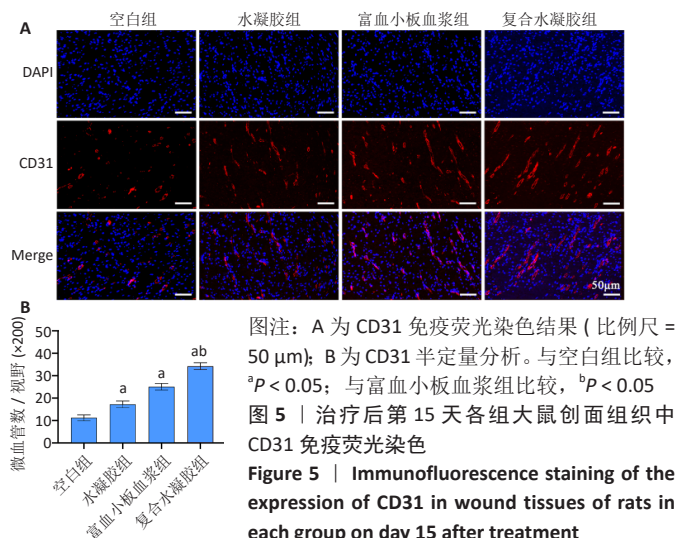


图5 | 治疗后第15天各组大鼠创面组织中CD31免疫荧光染色
Figure 5 | Immunofluorescence staining of the expression of CD31 in wound tissues of rats in each group on day 15 after treatment

织缺血、细菌感染等因素可导致糖尿病创面中的炎症细胞及炎症因子显著增加,进而致使炎症反应过度,抑制创面再生,最终导致炎症期延长。在增殖期内,修复细胞如不能得到生长因子的有效刺激,其增殖和成熟可能受限,进而导致创面迁移不愈^[27-28]。研究表明,富血小板血浆激活后释放的生长因子可改善难愈性创面中有活性的生长因子缺乏的不足,并构成生长因子调控网络^[29-30]。此外,富血小板血浆能够调节损伤部位的主要炎症细胞(如中性粒细胞和巨噬细胞等)分泌炎症因子,如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素 6 等,将创面从炎症循环转移到愈合的增殖阶段^[31]。此次实验发现,富血小板血浆减轻了创面组织的炎症反应,创面组织炎症反应较空白组有显著改善,炎性细胞浸润明显减少,新生肉芽组织增多,提示富血小板血浆能够调控创面愈合微环境,促进糖尿病创面愈合。

水凝胶是由天然和/或合成的亲水聚合物通过物理或化学交联产生的,具有三维网状结构^[32]。水凝胶既能保持创面湿润利于愈合又能有效缓解创面疼痛,降低伤口温度,且易于更换^[33]。研究表明,氧化硫酸软骨素可降低糖尿病大鼠血清炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 和单核细胞趋化蛋白 1 的表达水平^[34]。羧甲基壳聚糖因其含有的羟基结构,也具有较好的抗氧化能力^[35-36]。由羧甲基壳聚糖水凝胶和氧化硫酸软骨素制备的水凝胶具有良好的生物相容性、较高的含水量和多孔的纤维网状结构等特性^[37-38]。因此,此次实验将羧甲基壳聚糖和氧化硫酸软骨素水凝胶作为支架材料负载富血小板血浆,形成一种复合载药水凝胶敷料,既可为糖尿病创面提供湿润环境、吸收创面渗出液,又可以弥补单纯应用富血小板血浆的缺点,改善富血小板血浆可塑性差及生长因子爆发性释放等缺陷。此次实验结果显示,与富血小板血浆相比,复合水凝胶能够持续缓释生长因子促进创面愈合,创面愈合更快,提示复合水凝胶具备更佳的促愈合作用。

由于糖尿病患者长期处于高血糖负荷状态,皮肤组织结构发生了病理性的改变,创伤后早期炎症反应不足,后又因持续过度的炎症反应导致创面中的炎症细胞及炎症因子显著增加^[39],因此,炎症反应的调节是治疗糖尿病创面愈合的关键因素。此次实验中苏木精-伊红染色结果显示,在创面炎症转归阶段(约伤后第5天),空白组创面存在大量的炎症渗出,提示空白组创面仍停留在炎症期;水凝胶组、富血小板血浆组创面可见少量的炎症细胞和新生肉芽组织,复合水凝胶组创面有大量的新生肉芽组织,肉芽组织中可见血管生成,提示水凝胶和富血小板血浆可以改善创面的炎症反应,而复合水凝胶更有利于促进创面修复由炎症阶段向增殖阶段的转变。免疫组化染色和Western blot检测结果显示,治疗5d后,复合水凝胶组创面组织中的肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 表达明显低于空白组、水凝胶组和富血小板血浆组,提示复合水凝胶能改善创面局部的炎症反应,促进皮肤组织细胞及细胞因子的协同运作,从而加速创面愈合。

胶原是创面修复过程中的重要基质^[40]。Masson染色结果显示,治疗15d后,空白组创面胶原纤维数量少,排列为无序,分布欠均匀;水凝胶组和富血小板血浆组创面胶原纤维有增加,但排列疏松、分布不均匀;相比之下,复合水凝胶组创面胶原纤维数量多且分布均匀,更加致密,排列整齐有序,以上结果提示复合水凝胶对于创面胶原的再生有更好的促进作用。

在创面愈合的增殖阶段,新生血管能够促进肉芽组织生成和改善创面微循环,为组织修复提供丰富的营养物质^[41]。CD31是内皮细胞中高度表达的细胞黏附和信号受体,参与内皮细胞的信号传导及组织血管形成^[42]。CD31免疫荧光染色结果显示,治疗15d后,与空白组相比,水凝胶组和富血小板血浆组创面新生微血管数量明显增加,表明水凝胶和富血小板血浆具有促进创面新生血管形成作用;相较于富血小板血浆组,复合水凝胶组创面新生微血管数更多,提示复合水凝胶对于创面血管生成具有更好的促进作用。

综上所述,羧甲基壳聚糖和氧化硫酸软骨素复合水凝胶负载富血小板血浆可以有效改善创面组织炎症情况,并通过促进创面新生肉芽组织生成、胶原纤维合成、血管生成来促进糖尿病大鼠皮肤全厚层缺损创面愈合,有望为糖尿病创面的临床治疗提供新的医学策略。

作者贡献: 实验设计为张娅,实验实施为张娅、王自林,实验评估为牟秋菊,资料收集为刘宏杰,张娅成文,祝丽丽审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LIU C, GE HM, LIU BH, et al. Targeting pericyte-endothelial cell crosstalk by circular RNA-cPWWP2A inhibition aggravates diabetes-induced microvascular dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116(15):7455-7464.
- [2] SHI Q, QIAN Z, LIU D, et al. GMSC-Derived Exosomes Combined with a Chitosan/Silk Hydrogel Sponge Accelerates Wound Healing in a Diabetic Rat Skin Defect Model. *Front Physiol*. 2017;8:904.
- [3] ZAREI F, SOLEIMANINEJAD M. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup1): 906-911.
- [4] MARTÍ-CARVAJAL AJ, GLUUD C, NICOLA S, et al. Growth factors for treating diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 2015(10):CD008548.
- [5] SHEN YI, CHO H, PAPA AE, et al. Engineered human vascularized constructs accelerate diabetic wound healing. *Biomaterials*. 2016;102: 107-119.

- [6] SEIDEL D, STORCK M, LAWALL H, et al. Negative pressure wound therapy compared with standard moist wound care on diabetic foot ulcers in real-life clinical practice: results of the German DiaFu-RCT. *BMJ Open*. 2020;10(3):e026345.
- [7] HAN G, CEILLEY R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther*. 2017;34(3):599-610.
- [8] CAKIN MC, OZDEMIR B, KAYA-DAGISTANLI F, et al. Evaluation of the in vivo wound healing potential of the lipid fraction from activated platelet-rich plasma. *Platelets*. 2020;31(4):513-520.
- [9] HESSELER MJ, SHYAM N. Platelet-rich plasma and its utility in the treatment of acne scars: A systematic review. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(6):1730-1745.
- [10] SHAIK JA, ESTHARABADI N, FARAH RS, et al. Heterogeneity in amount of growth factors secreted by platelets in platelet-rich plasma samples from alopecia patients. *Exp Dermatol*. 2020;29(10):1004-1011.
- [11] OUDELAAR BW, PEERBOOMS JC, HUIS IN 'T VELD R, et al. Concentrations of Blood Components in Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems: A Review of the Literature. *Am J Sports Med*. 2019;47(2):479-487.
- [12] SUTHAR M, GUPTA S, BUKHARI S, et al. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):16.
- [13] LI S, DONG Q, PENG X, et al. Self-Healing Hyaluronic Acid Nanocomposite Hydrogels with Platelet-Rich Plasma Impregnated for Skin Regeneration. *ACS Nano*. 2022;16(7):11346-11359.
- [14] LIU X, YANG Y, NIU X, et al. An in situ photocrosslinkable platelet rich plasma- Complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair. *Acta Biomater*. 2017;62:179-187.
- [15] CAO J, WU P, CHENG Q, et al. Ultrafast Fabrication of Self-Healing and Injectable Carboxymethyl Chitosan Hydrogel Dressing for Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(20):24095-24105.
- [16] LV X, LIU Y, SONG S, et al. Influence of chitosan oligosaccharide on the gelling and wound healing properties of injectable hydrogels based on carboxymethyl chitosan/alginate polyelectrolyte complexes. *Carbohydr Polym*. 2019;205:312-321.
- [17] ALINEJAD Y, ADOUNGOTCHODO A, HUI E, et al. An injectable chitosan/chondroitin sulfate hydrogel with tunable mechanical properties for cell therapy/tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2018;113:132-141.
- [18] SHARMA S, SWETHA KL, ROY A. Chitosan-Chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds. *Int J Biol Macromol*. 2019;132:97-108.
- [19] ZHOU L, FAN L, ZHANG FM, et al. Hybrid gelatin/oxidized chondroitin sulfate hydrogels incorporating bioactive glass nanoparticles with enhanced mechanical properties, mineralization, and osteogenic differentiation. *Bioact Mater*. 2020;6(3):890-904.
- [20] LI H, CHENG F, WEI X, et al. Injectable, self-healing, antibacterial, and hemostatic N,O-carboxymethyl chitosan/oxidized chondroitin sulfate composite hydrogel for wound dressing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;118:111324.
- [21] FAN M, MA Y, TAN H, et al. Covalent and injectable chitosan-chondroitin sulfate hydrogels embedded with chitosan microspheres for drug delivery and tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:67-74.
- [22] AYUK SM, ABRAHAMSE H, HOURELD NN. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2897656.
- [23] YANG S, HU L, HAN R, et al. Neuropeptides, Inflammation, Biofilms, and diabetic Foot Ulcers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2022;130(7):439-446.
- [24] QIAN Z, WANG H, BAI Y, et al. Improving Chronic Diabetic Wound Healing through an Injectable and Self-Healing Hydrogel with Platelet-Rich Plasma Release. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(50):55659-55674.
- [25] TOTTOLI EM, DORATI R, GENTA I, et al. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):735.
- [26] ZHANG Y, WANG ZL, DENG ZP, et al. Emerging Delivery Strategies of Platelet-Rich Plasma with Hydrogels for Wound Healing. *Adv Polym Technol*. 2022;(2022):5446291.
- [27] ZHAO R, LIANG H, CLARKE E, et al. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2085.
- [28] LIAO X, LIANG JX, LI SH, et al. Allogeneic Platelet-Rich Plasma Therapy as an Effective and Safe Adjuvant Method for Chronic Wounds. *J Surg Res*. 2020;246:284-291.
- [29] ORTOLANI E, GUERRIERO M, COLI A, et al. Effect of PDGF, IGF-1 and PRP on the implant osseointegration. An histological and immunohistochemical study in rabbits. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014;5(2):66-68.
- [30] ZHANG X, YAO D, ZHAO WY, et al. Engineering platelet-rich plasma based dual-network hydrogel as a bioactive wound dressing with potential clinical translational value. *Adv Funct Mater*. 2020;31(8):2009258.
- [31] EVERTS P, ONISHI K, JAYARAM P, et al. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7794.
- [32] IRMAK G, GÜMÜŞDERELİOĞLU M. Patients- and tissue-specific bio-inks with photoactivated PRP and methacrylated gelatin for the fabrication of osteochondral constructs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;125:112092.
- [33] GROWNEY EA, LINDER HR, GARG K, et al. Bio-conjugation of platelet-rich plasma and alginate through carbodiimide chemistry for injectable hydrogel therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(5):1972-1984.
- [34] MEDEIROS LHC, VASCONCELOS BMF, SILVA MB, et al. Chondroitin sulfate from fish waste exhibits strong intracellular antioxidant potential. *Braz J Med Biol Res*. 2021;54(10):e10730.
- [35] CHANG SH, WU CH, TSAI GJ. Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties. *Carbohydr Polym*. 2018;181:1026-1032.
- [36] LIU F, LI HY, WANG Z, et al. Carboxymethyl chitosan reduces inflammation and promotes osteogenesis in a rabbit knee replacement model. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020;21(1):775.
- [37] KHARKAR PM, KIICK KL, KLOXIN AM. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. *Chem Soc Rev*. 2013;42(17):7335-7372.
- [38] CHEN YR, ZHOU ZX, ZHANG JY, et al. Low-Molecular-Weight Heparin-Functionalized Chitosan-Chondroitin Sulfate Hydrogels for Controlled Release of TGF- β 3 and in vitro Neocartilage Formation. *Front Chem*. 2019;7:745.
- [39] LI HL, LIU XT, HUANG SM, et al. Repair function of essential oil from *Crocodylus Siamensis* (Schneider, 1801) on the burn wound healing via up-regulated growth factor expression and anti-inflammatory effect. *J Ethnopharmacol*. 2021;264:113286.
- [40] MARTIN P, NUNAN R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015;173(2):370-378.
- [41] KAKUDO N, MORIMOTO N, OGAWA T, et al. Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(7):1941-1948.
- [42] WEI S, XU P, YAO Z, et al. A composite hydrogel with co-delivery of antimicrobial peptides and platelet-rich plasma to enhance healing of infected wounds in diabetes. *Acta Biomater*. 2021;24:205-218.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LJY)