

负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料的制备及在糖尿病足中的基础研究

李成立

滨州医学院烟台附属医院 山东烟台

【摘要】目的 分析在糖尿病足中制备和应用负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料对糖尿病足的作用。**方法** 将 2021 年 1 月-2023 年 12 月作为研究开展阶段,选择糖尿病足大鼠 30 只,所有试验对象每天腹腔均注射 55 mg/kg 链脲佐菌素,持续一周,建立糖尿病足溃疡的模型,在糖尿病大鼠的后足上做 4×4 mm 的伤口,再将 30 例糖尿病足大鼠分 3 组,空白对照组、高糖不含 miR-27b 抑制剂水凝胶组(简称:不含 miR-27b 组)、高糖含 miR-27b 抑制剂水凝胶组(简称:富含 miR-27b 组),每组各 10 只。于治疗后的第 2 周、4 周及 8 周于相应创面上取材,观察三组大鼠炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、PMNs 在各组细胞中的含量以及创面肉芽组织生长情况和 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达。**结果** 富含 miR-27b 组 2 周、4 周、8 周炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 在各组细胞中的含量低于空白对照组以及不含 miR-27b 组,肉芽组织生长率,以及 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达优于空白对照组以及不含 miR-27b 组,差异对比有统计学意义, ($P<0.05$)。**结论** 负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料应用糖尿病足创面可降低炎症因子,调控 PI3K/AKT 通路相关蛋白,促进创面肉芽组织成熟,促使由结缔组织转变为瘢痕组织。

【关键词】 负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料; 糖尿病足; PI3K/AKT 通路相关蛋白; 微小核糖核酸-27b

【收稿日期】 2024 年 9 月 22 日

【出刊日期】 2024 年 10 月 28 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20240428

Preparation of hydrogel dressing loaded with miR-27b inhibitor and its basic research in diabetes foot

Chengli Li

Binzhou Medical College Hospital of Yantai, Shandong, Yantai

【Abstract】 Objective To analyze the effect of the preparation and application of hydrogel dressing loaded with miR-27b inhibitor on diabetic foot. **Methods** The study was carried out from January 2021 to December 2023. Thirty diabetic foot rats were selected. All experimental subjects were intraperitoneally injected with 55 mg/kg streptozotocin every day for one week to establish a model of diabetic foot ulcer. A 4×4 mm wound was made on the hind feet of diabetic rats. The 30 diabetic foot rats were divided into three groups: blank control group, high-glucose hydrogel group without miR-27b inhibitor (abbreviated as: no miR-27b group), and high-glucose hydrogel group with miR-27b inhibitor (abbreviated as: rich in miR-27b group), with 10 rats in each group. At the 2nd, 4th and 8th week after treatment, samples were collected from the corresponding wounds to observe the contents of inflammatory factors IL-1 β , TNF- α , IL-10 and PMNs in the cells of each group, the growth of granulation tissue in the wound and the expression of PI3K/AKT pathway-related proteins in the cells of each group. **Results** The contents of inflammatory factors IL-1 β , TNF- α and IL-10 in the cells of the miR-27b-rich group at 2, 4 and 8 weeks were lower than those in the blank control group and the group without miR-27b, and the granulation tissue growth rate and the expression of PI3K/AKT pathway-related proteins in the cells of each group were better than those in the blank control group and the group without miR-27b, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The application of hydrogel dressing loaded with miR-27b inhibitor on diabetic foot wounds can reduce inflammatory factors, regulate PI3K/AKT pathway-related proteins, promote the maturation of granulation tissue in the wound, and promote the transformation from connective tissue to scar tissue.

【Keywords】 Hydrogel dressing loaded with miR-27b inhibitor; Diabetic foot; PI3K/AKT pathway-related proteins; MicroRNA-27b

糖尿病足是指患者在持续高糖情况下,足部因神经病变而出现下肢保护功能减退的综合征^[1]。治疗难度大、病程长、疾病后果严重等均是糖尿病足的显著特点,不但降低了患者自身的生活质量和生命质量,还令患者时刻面临残疾可能^[2]。而在对糖尿病足创面进行深入研究后发现,在清创完成后,如何促进创面康复是治疗该病的关键所在。现目前,共聚物水凝胶具有优异的生物相容性和生物降解性,是治疗糖尿病的有效方法,而负载的药物对提高预后效果起决定性作用^[3]。miR-27b 是经 RNA 聚合酶II、以及 RNA 聚合酶III复合物催化而来的微小核糖核酸-27b,其成熟体是发挥生物学功能的重要片段^[4]。本文应用 30 例糖尿病足大鼠作为实验对象,旨在探究负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料的制备及在糖尿病足中具体应用,以此为糖尿病足的治疗提供新的研究方向。

1 富含 miR-27b 抑制剂水凝胶的制备方法

1.1 羧甲基- α -环糊精 (CM- α -CD) 的合成

取 3g 的 α -环糊精溶于 60mL 的 5% (w/v) NaOH 中,待完全溶解后,再加入 2.37g 的氯乙酸, 50°C 下剧烈搅拌 5h 后,反应溶液降温至常温,用 2M 的 HCL 将反应溶液的 pH 值调至 6.5。用乙醇和丙酮分别清洗 3 次后,在真空干燥器中干燥 12h 后,得到 CM- α -CD。将氯化亚砷滴加到冷甲醇(甲醇为反应试剂又作为反应溶剂)中,(氯化亚砷的用量为要保护羧酸的 1.2 倍),滴加结束后,让溶液升到室温,再把适量的 CM- α -CD 加进去,得到羧基保护的羧甲基- α -环糊精(MF- α -CD)。称取 5g 的 HOOC-PEG-COOH(分子量为 10000)于 100mL 烧杯中,加入 60mL 去离子水,室温下磁力搅拌使之完全溶解;称取 MF- α -CD (15g)于 150mL 烧杯中,加入 90mL 去离子水,50°C 下磁力搅拌使之完全溶解,冷却至室温。将化合物 1 的水溶液倒入 MF- α -CD 水溶液中,混合 1 分钟,保鲜膜封口,于冰箱冷藏层放置过夜(5 分钟左右开始有白色絮状物析出),冷冻干燥得准聚轮烷 20g。加入适量的过硫酸铵(APS,作为引发剂)和四甲基乙二胺(TEMED,助引发剂),在 4°C 下反应 24h 后得到水凝胶,然后将放入去离子水中 2 周(每天换水),以去除未反应的单体及残留物,得到终产物聚乙二醇/羧甲基- α -环糊精/miR-27b。

1.2 分组及造模

分为三组:空白对照组、高糖不含 miR-27b 抑制剂水凝胶组(简称:不含 miR-27b 组)、高糖含 miR-27b 抑制剂水凝胶组(简称:富含 miR-27b 组)。

1.3 观察指标

①对比三组 2 周、4 周、8 周观察三组大鼠炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、PMNs 在各组细胞中的含量;②对比三组创面肉芽组织生长情况,创面上皮化开始时间,>80%为创面肉芽填充良好。③对比 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达。

2 结果

2.1 对比炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、PMNs 在各组细胞中的含量

富含 miR-27b 组 2 周、4 周、8 周炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 在各组细胞中的含量低于空白对照组以及不含 miR-27b 组,而 PMNs 高于空白对照组以及不含 miR-27b 组,差异对比有统计学意义, ($P < 0.05$)。提示炎症因子下调,PMNs 代表的先天免疫水平提高。

2.2 对比三组创面肉芽组织生长情况

而在肉芽组织生长率上,同样是富含 miR-27b 组优于空白对照组以及不含 miR-27b 组,差异对比有统计学意义, ($P < 0.05$)。见表 2:

2.3 对比 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达

在 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达对比上,富含 miR-27b 组优于空白对照组以及不含 miR-27b 组,差异对比有统计学意义, ($P < 0.05$)。

3 讨论

miR-27b 属于 miRNA 家族的主要成分,在内皮细胞内有较高的表达。用其制备的负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料因此也具有体外调节内皮细胞出芽和增殖的作用^[5]。富含 miR-27b 组的 10 例大鼠其炎症因子水平低于另外两组,代表着先天免疫水平的 PMNS 也高于另外 2 组,推测其可能的机制是 miR-27b 参与人体免疫调节,在炎症反应中呈现正反馈作用。而在新生肉芽的生长对比上,同样也是富含 miR-27b 组的 10 例大鼠肉芽生长率更高,对其深入研究后发现,或可和 Semaphorin-6A(轴突导向调节剂的蛋白)有关。

轴突导向调节剂的蛋白除了在肿瘤转移中水平被下调外,还对内皮细胞有一定的抑制作用。而 miR-27b 可直接作用于此种物质,拮抗其对内皮细胞的抑制,从而促使血管新生不受影响。此外,有研究表明,miR-27b 的上调可以促使内皮细胞发芽,同时一定程度上增加血管内皮生长因子以及碱性成纤维细胞生长因子诱导下的迁移^[6-7]。而这结论和本文的结论一致,即 miR-27b 促血管新生作用于 Semaphorin-6A 等物质,发挥拮抗血管新生,以此提高血管新生信号的肉芽生长的表达,促创面恢复^[8]。

表 1 炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、PMNs 在各组细胞中的含量 ($\bar{x} \pm s$)

	空白对照组	不含 miR-27b 组	富含 miR-27b 组
IL-1 β (pg/mL)			
治疗后 2 周	1451.68 \pm 215.16	1416.19 \pm 21.57	1351.16 \pm 72.19*
治疗后 4 周	1406.19 \pm 106.74	1368.69 \pm 71.19	1301.15 \pm 23.19*
治疗后 8 周	1351.69 \pm 85.19	1315.31 \pm 54.19	1271.26 \pm 0.28*
TNF- α (pg/ml)			
治疗后 2 周	855.62 \pm 12.68	842.16 \pm 32.69	721.69 \pm 45.61*
治疗后 4 周	812.69 \pm 11.69	769.62 \pm 14.69	673.18 \pm 41.15*
治疗后 8 周	785.16 \pm 11.19	732.15 \pm 18.67	622.19 \pm 74.16*
IL-10 (pg/mL)			
治疗后 2 周	31.26 \pm 6.12	28.19 \pm 3.04	24.19 \pm 0.41*
治疗后 4 周	28.19 \pm 4.16	24.19 \pm 3.67	23.19 \pm 0.19*
治疗后 8 周	21.27 \pm 3.08	20.15 \pm 4.16	18.12 \pm 0.64*
PMNs (%)			
治疗后 2 周	51.26 \pm 1.29	54.19 \pm 2.45	58.46 \pm 2.12*
治疗后 4 周	62.19 \pm 0.47	65.19 \pm 0.19	73.15 \pm 0.15*
治疗后 8 周	64.19 \pm 0.19	72.19 \pm 2.45	82.16 \pm 4.32*

备注: * 表示与空白对照组、不含 miR-27b 组差异显著, 有统计学意义。

表 2 对比三组创面肉芽组织生长情况 (N, %)

	空白对照组	不含 miR-27b 组	富含 miR-27b 组
创面肉芽填充率			
治疗后 2 周	30%	35%	40%*
治疗后 4 周	40%	45%	60%*
治疗后 8 周	45%	50%	80%*

表 3 对比 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

	空白对照组	不含 miR-27b 组	富含 miR-27b 组
PI3K/GAPDH	0.48 \pm 0.05	0.55 \pm 0.04	0.74 \pm 0.12*
AKT/GAPDH	0.52 \pm 0.01	0.74 \pm 0.05	0.82 \pm 0.03*
GLUT4/GAPDH	0.62 \pm 0.12	0.72 \pm 0.15	0.93 \pm 0.05*
P-P I3K / β -actin	0.36 \pm 0.01	0.51 \pm 0.17	0.63 \pm 0.12*
P-AKT / β -actin	0.28 \pm 0.02	0.54 \pm 0.17	0.69 \pm 0.15*
GLUT4 / β -actin	0.26 \pm 0.05	0.31 \pm 0.07	0.52 \pm 0.02*

而在 PI3K/AKT 通路相关蛋白在各组细胞中的表达中, 富含 miR-27b 组的大鼠蛋白表达高于另外两组, 因为 PI3K/AKT 通路对人体蛋白合成和糖原合成中有较高的生物学价值, 同时也和内分泌水平的调控密切相关。而富含 miR-27b 组应用了负载 miR-27b 抑制剂水凝胶

敷料, miR-27b 可改善大鼠糖代谢水平以及内分泌水平, 通过上调 PI3K/AKT 通路中的多项蛋白表达, 改善内分泌, 调控胰岛素代谢, 且通过对细胞分化和生长的应用, 促进创面的愈合。

综上所述, 负载 miR-27b 抑制剂水凝胶敷料应用糖

糖尿病足创面可降低炎性因子, 调控 PI3K/AKT 通路相关蛋白, 促进创面肉芽组织成熟, 促使由结缔组织转变为瘢痕组织。

参考文献

- [1] 苏永蔚,周山健,肖大伟,等. 负载 miRNA-27b 的 BMSCs 来源的外泌体治疗实验性骨关节炎[J]. 中国矫形外科杂志,2019,27(8):726-734.
- [2] 孙晓辉,赵斌,刘洋,等. 负载 microRNA-27b-骨髓间充质干细胞来源外泌体的软骨细胞-聚乳酸羟基乙酸共聚物骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的实验研究[J]. 中医正骨,2021,33(1):1-14.
- [3] 罗怡欣,杨川,刘兴州,等. 基于循证指南的糖尿病足敷料选择和应用建议[J]. 中国全科医学,2022,25(32):3990-3998.
- [4] 欧阳棠林,宋丽玉,方慧玲,等. 长链非编码 RNA NEAT1 靶向 miR-27b 调控 RA-FLS 细胞生物学功能机制研究[J]. 现代诊断与治疗,2023,34(18):2697-2700,2726.

- [5] 尚玉,王丹霞. 局部注射富血小板血浆联合水凝胶敷料对糖尿病足溃疡患者创面修复的影响及安全性研究[J]. 陕西医学杂志,2024,53(6):777-781.
- [6] 阳镇,李文川,周宁. LncRNA GHET1 靶向 miR-27b 对胆囊癌细胞增殖、凋亡及转移的影响[J]. 肿瘤防治研究,2023,50(7):681-687.
- [7] 杨向超,李昌伟,周晓华,等. 胃癌组织内 miR-34a 与 miR-27b 表达及其抑制胃癌生长与血管生成的机制[J]. 中国老年学杂志,2023,43(17):4223-4229.
- [8] 易宇光,何佳佳,吴俊波. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨抑制 miR-27b 对 HICH 大鼠模型神经细胞凋亡和炎症因子的影响[J]. 中国老年学杂志,2023,43(16):4001-4005.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS