

甜菜碱对糖尿病足大鼠创面愈合及 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路的影响

包同新, 王宇峰, 肖 凯, 宋光泽, 刘 申, 韦 兴*

航天中心医院 骨科, 北京 100049

摘要: 目的 探讨甜菜碱对糖尿病足大鼠创面愈合及 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路的影响。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、二甲双胍(200 mg·kg⁻¹, ig 给药)组和甜菜碱低、高剂量(50、100 mg·kg⁻¹, ip 给药)组, 每组 18 只。除对照组外, 其余组大鼠均构建糖尿病足模型。检测大鼠空腹血糖水平和创面愈合率; ELISA 法检测大鼠血清炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C 反应蛋白 (CRP) 水平; HE 染色检测大鼠创面皮肤组织病理学改变; 免疫组化染色检测大鼠创面皮肤组织中 CD31 蛋白阳性表达; 试剂盒法检测大鼠创面皮肤组织中氧化应激指标超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 含量; Western blotting 检测大鼠创面皮肤组织中 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) /沉默信息调节因子相关酶 1 (SIRT1) /叉头框蛋白 1 (FoxO1) 通路相关蛋白表达。结果 给药结束后, 与对照组比较, 模型组大鼠空腹血糖、血清 IL-6、TNF- α 、CRP 水平以及创面皮肤组织中 MDA 含量和 p-FoxO1/FoxO1 值显著升高, 创面愈合率和创面皮肤组织中 CD31 阳性表达率、SOD 活性、p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 且创面皮肤组织病理学损伤严重; 与模型组比较, 甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠空腹血糖、血清 IL-6、TNF- α 、CRP 水平以及创面皮肤组织中 MDA 含量和 p-FoxO1/FoxO1 值显著降低, 创面愈合率和创面皮肤组织中 CD31 阳性表达率、SOD 活性、p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 且创面皮肤组织病理学损伤均有不同程度改善, 且甜菜碱高剂量组和二甲双胍组上述指标变化更为明显。结论 甜菜碱可激活 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路, 减轻糖尿病足大鼠氧化应激和炎症反应, 促进血管生成, 加速创面愈合。

关键词: 糖尿病足; 甜菜碱; 创面愈合; AMPK/SIRT1/FoxO1 通路; 炎症; 氧化应激

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 09-1935-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.09.013

Effect of betaine on wound healing and AMPK/SIRT1/FoxO1 pathway in diabetic foot rats

BAO Tongxin, WANG Yufeng, XIAO Kai, SONG Guangze, LIU Shen, WEI Xing

Department of Orthopedics, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To explore the effects of betaine on wound healing and AMPK/SIRT1/FoxO1 pathway in diabetes foot rats. **Methods** SD rats were randomly grouped into control group, model group, betaine (low and high) dose group (50, 100 mg·kg⁻¹) and metformin group (200 mg·kg⁻¹), with 18 rats in each group. Except the control group, the rats in the other groups were constructed with diabetes foot models. The fasting blood glucose level and wound healing rate were measured. The levels of serum inflammatory factors (IL-6, TNF- α , CRP) were detected by ELISA. HE staining was applied to detect the histopathological changes of the wound skin. Immunohistochemical staining was applied to detect the positive expression of CD31 protein in the wound skin tissue of rats. The level of oxidative stress index (SOD activity, MDA content) in rat wound skin tissue was detected by commercial kit. Western blotting was applied to detect the expression of AMPK/SIRT1/FoxO1 pathway related protein in rat wound skin tissue. **Results** After administration, compared with the control group, the fasting blood glucose, serum IL-6, TNF- α , CRP levels, and the MDA content and p-FoxO1/FoxO1 ratio in the wound skin tissue of the model group were higher, the wound healing rate, the positive expression rate of CD31, the activity of SOD, the ratio of p-AMPK/AMPK and the expression level of SIRT1 protein in the wound skin tissue were lower ($P < 0.05$), the histopathological damage of the wound skin was serious. Compared with the model group, the fasting

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 北京市科技计划项目(2021ZF073)

第一作者: 包同新(1977—), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为慢性创面修复。E-mail: ddd318@163.com

*通信作者: 韦 兴(1970—), 男, 主任医师, 研究方向为骨与软组织肿瘤。E-mail: xinkunchukd1@163.com

blood glucose, serum IL-6, TNF- α , CRP levels, and the MDA content and p-FoxO1/FoxO1 ratio in the wound skin tissue of rats in betaine (low and high) dose groups and metformin group were lower, the wound healing rate, the positive expression rate of CD31, the activity of SOD, the ratio of p-AMPK/AMPK and the expression level of SIRT1 protein in the wound skin tissue were higher ($P < 0.05$), in addition, the histopathological damage of the wound skin was improved to varying degrees, the changes of the above indexes were more obvious in betaine high-dose group and metformin group. **Conclusion** Betaine can activate AMPK/SIRT1/FoxO1 pathway, alleviate oxidative stress and inflammatory reaction, promote angiogenesis and accelerate wound healing in diabetes foot rats.

Key words: diabetes foot; betaine; wound healing; AMPK/SIRT1/FoxO1 pathway; inflammation; oxidative stress

随着生活方式和生活习惯的改变,糖尿病的发生率正呈持续上升趋势,而糖尿病足作为糖尿病的严重并发症之一,已成为糖尿病患者住院和下肢截肢的主要原因,患病率高达25%,严重影响患者生活质量和生命健康,且其安全、有效治疗仍面临着巨大挑战^[1-2]。糖尿病足是患者在长期高血糖基础上发生的周围神经病变,可引起足部溃疡、肢体感染和深层组织破坏等症状,给患者造成极大痛苦,故有效控制血糖,同时使足部痊愈并使患者能够走动是治疗的主要目标^[3]。

近年研究证实,甜菜碱作为一种广泛存在于动植物及微生物体内的季铵盐化合物,具有降低氧化应激和炎症反应以及改善胰岛素抵抗等多种作用,并在癌症、肥胖、糖尿病等许多人类疾病的治疗中发挥积极功效^[4-5]。Zahedi等^[6]研究表明,加载甜菜碱的等离子功能化聚丙烯网布能够促进糖尿病大鼠伤口愈合。此外,据报道,甜菜碱的抗炎和抗氧化作用有助于改善胰岛素敏感性和提供更好的血糖清除率,且AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)在甜菜碱抗糖尿病的潜在作用机制中起核心作用^[7]。另有研究显示,激活AMPK/沉默信息调节因子相关酶1(SIRT1)/叉头框蛋白1(FoxO1)通路能够明显改善2型糖尿病肾病大鼠肾损伤^[8-9]。基于此,本研究通过构建糖尿病足大鼠模型,探究甜菜碱对糖尿病足大鼠创面愈合以及AMPK/SIRT1/FoxO1通路的影响,以期能为糖尿病足相关治疗药物的开发提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

90只6周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量(200±15)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2021-0002。所有大鼠统一饲养在温度(22±1)℃、12h光/暗循环、相对湿度45%~55%的动物房内,自由获取食物和水。大鼠适应性饲养1周后进行分组、模型构建等操作,所有动物实验程序均遵循《实验动物护理和使用指

南》中相关要求。动物实验经航天中心医院伦理委员会批准。

1.2 药物及主要试剂

甜菜碱(美国Sigma公司,货号B2629-100G);盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,货号1911021);链脲佐菌素(北京索莱宝科技有限公司,货号S8050);白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C反应蛋白(CRP)ELISA试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司,货号ER0042、ER1393、ER1048);HE染色试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号E-IR-R117);兔抗血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、AMPK、p-AMPK、SIRT1、FoxO1、p-FoxO1、 β -actin和HRP标记的山羊抗兔IgG(英国abcam公司,货号ab182981、ab207442、ab133448、ab233398、ab179450、ab259337、ab8227、ab6721);DAB显色试剂盒(上海钰博生物科技有限公司,货号YB81223-100);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号A001-3-2、A003-1-2)。

1.3 主要仪器

Accu-ChekActive血糖仪(上海罗氏诊断产品有限公司);Multiskan FC酶标仪(美国赛默飞世尔公司);BX53生物显微镜(日本Olympus公司);WD-9413C凝胶成像分析系统(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型构建与给药

90只SD大鼠按照随机数表法分为对照组、模型组、二甲双胍(盐酸二甲双胍片200 mg·kg⁻¹^[13],阳性药,ig给药)组和甜菜碱低、高剂量(50、100 mg·kg⁻¹,ip给药)^[12]组,每组18只。除对照组外,其余组大鼠构建糖尿病足模型^[10-11]:首先,大鼠给予高脂饲料喂养8周;其次,单次ip 35 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(溶解于0.1 mmol·L⁻¹柠檬酸钠缓冲液中,pH 4.4),72 h后若空腹血糖水平>16.7 mmol·L⁻¹,则糖尿病模型构建成功;ip 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,剃

除大鼠后足背部毛发并用图章印出矩形标记(3 mm × 7 mm),用手术刀切除全层皮肤,伤口深至筋膜,此时糖尿病足模型构建成功。对照组大鼠给予标准饲料喂养8周,且不注射链脲佐菌素(仅注射柠檬酸钠缓冲液),其他操作同造模大鼠。造模成功后次日开始给药;对照组、模型组大鼠每天 ip 等体积 0.9%氯化钠溶液,每天1次,连续28 d。

2.2 大鼠空腹血糖水平检测

分别于给药0(造模后给药前)、14、28 d,大鼠禁食12 h,尾静脉取血后使用血糖仪测定大鼠空腹血糖水平。

2.3 大鼠创面愈合率检测

分别于给药0、14、28 d,使用数码相机记录各组大鼠足部图像,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件定量分析创面面积,计算创面愈合率。

创面愈合率=(原始创面面积-当前测量创面面积)/原始创面面积

2.4 ELISA 法检测大鼠血清炎性因子水平

末次给药结束后24 h内,ip 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血5 mL,血液静置2 h后3 000 r·min⁻¹离心15 min,分离上清液(即血清)。严格参照ELISA试剂盒说明,于酶标仪中检测标准品和血清的各孔吸光度值,根据标准曲线计算血清炎性因子(IL-6、TNF- α 、CRP)水平。

2.5 HE 染色检测大鼠创面皮肤组织病理学改变

取血后颈椎脱臼法处死大鼠,每组随机取6只大鼠创面皮肤组织置于4%多聚甲醛中固定,固定24 h后制备常规石蜡切片(4 μ m厚),切片脱蜡至水后置于苏木素染色液中染色5 min,1%氨水返蓝后置于0.5%伊红染色液中染色1 min,封片后在光学显微镜下观察创面皮肤组织病理学改变并拍照。

2.6 免疫组化染色检测大鼠创面皮肤组织中 CD31 蛋白阳性表达

将“2.5”项中的创面皮肤组织切片脱蜡至水,在柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中煮沸30 min以进行抗原热修复,洗涤后切片用3%过氧化氢室温孵育15 min以消除内源性过氧化物酶活性,随后用山羊血清封闭15 min,添加一抗稀释液(兔抗CD31,1:2 000稀释;PBS代替一抗作为阴性对照)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗涤后添加二抗稀释液(HRP标记的山羊抗兔IgG,1:1 000稀释)37 $^{\circ}$ C孵育1 h,洗涤后使用DAB显色试剂盒显色,苏木素染核,封片后在光学显微镜下观察染色细胞(CD31蛋白阳性表达细胞呈棕褐色)并拍照,随机选取5个视野计数CD31蛋白阳性表达细胞和总细胞(细胞核呈蓝色),计算CD31阳性表达率。

CD31阳性表达率=CD31蛋白阳性表达细胞数/总细胞数

2.7 商品化试剂盒检测大鼠创面皮肤组织中氧化应激指标水平

每组随机取6只大鼠创面皮肤组织加入0.9%氯化钠溶液制备10%组织匀浆液(质量体积比为1:9),BCA法检测蛋白质浓度,严格参照商品化试剂盒说明测定组织匀浆液中SOD活性(WST-1法)、MDA含量(TBA法)。

2.8 Western blotting 检测大鼠创面皮肤组织中 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路相关蛋白表达

每组剩余6只大鼠创面皮肤组织在RIPA裂解液中充分裂解后获取上清液,BCA法检测蛋白质浓度并将蛋白煮沸变性,每泳道上样20 μ g蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳后将分离的蛋白转至PVDF膜,5%BSA室温封闭膜1.5 h,于一抗稀释液(兔抗AMPK、p-AMPK、SIRT1、FoxO1、p-FoxO1、 β -actin,1:1 000稀释)中4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBST洗涤后于二抗工作液(HRP标记羊抗兔IgG,1:5 000稀释)中37 $^{\circ}$ C孵育1 h,再次洗涤后使用化学发光试剂显色。Image J软件分析蛋白条带灰度,计算目的蛋白相对表达量(β -actin为内参蛋白)。

2.9 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件分析数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用SNK-*q*检验。

3 结果

3.1 各组大鼠空腹血糖水平

给药0 d,与对照组比较,各造模大鼠空腹血糖水平显著升高($P < 0.05$)。给药14、28 d,与对照组比较,模型组大鼠空腹血糖水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠空腹血糖水平显著降低($P < 0.05$);与甜菜碱低剂量组比较,甜菜碱高剂量组和二甲双胍组大鼠空腹血糖水平显著降低($P < 0.05$)。见表1。

3.2 各组大鼠创面愈合率

给药14、28 d,与对照组比较,模型组大鼠创面愈合率显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠创面愈合率显著升高($P < 0.05$);与甜菜碱低剂量组比较,甜菜碱高剂量组和二甲双胍组大鼠创面愈合率显著升高($P < 0.05$)。见表2。

3.3 各组大鼠血清 IL-6、TNF- α 、CRP 水平

与对照组比较,模型组大鼠血清IL-6、TNF- α 、CRP水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,甜菜

表1 各组大鼠空腹血糖水平比较($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 1 Comparison of fasting blood glucose levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)		
		给药0 d	给药14 d	给药28 d
对照	—	5.72±0.38	5.64±0.39	5.78±0.41
模型	—	22.48±2.65*	22.09±2.37*	21.63±2.04*
甜菜碱	50	23.61±2.34*	17.12±1.53*#	12.27±1.15*#
	100	22.95±1.93*	12.68±1.29*#&	7.14±0.52*#&
二甲双胍	200	23.04±2.41*	11.54±1.37*#&	6.47±0.46*#&

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与甜菜碱低剂量组比较: &P<0.05

*P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs model group; &P<0.05 vs low-dose group of betaine

表2 各组大鼠创面愈合率比较($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 2 Comparison of wound healing rates among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	创面愈合率/%	
		给药14 d	给药28 d
对照	—	65.36±1.24	89.48±1.36
模型	—	21.69±0.78*	46.37±1.51*
甜菜碱	50	40.52±1.05*#	67.96±1.85*#
	100	52.68±1.31*#&	79.65±2.06*#&
二甲双胍	200	53.07±1.46*#&	80.52±2.32*#&

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与甜菜碱低剂量组比较: &P<0.05

*P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs model group; &P<0.05 vs low-dose group of betaine

碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠血清IL-6、TNF-α、CRP水平显著降低(P<0.05); 与甜菜碱低剂量组比

较, 甜菜碱高剂量组和二甲双胍组大鼠血清IL-6、TNF-α、CRP水平显著降低(P<0.05)。见表3。

3.4 各组大鼠创面皮肤组织病理学改变

HE染色结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠创面皮肤的真皮下层肉芽组织不完整, 并有大量炎症细胞聚集, 同时仅有少量新生血管, 坏死组织较多; 相比于模型组, 甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中炎症细胞浸润减轻, 新生血管增加, 坏死组织减少; 且相比于甜菜碱低剂量组, 甜菜碱高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织病理学损伤改善更为明显。见图1。

3.5 各组大鼠创面皮肤组织中CD31蛋白阳性表达

免疫组化染色结果显示, 创面皮肤组织中CD31蛋白阳性表达呈棕褐色颗粒, 与对照组比较, 模型组大鼠创面皮肤组织中CD31阳性表达率降

表3 各组大鼠血清IL-6、TNF-α、CRP水平比较($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 3 Comparison of serum IL-6, TNF-α and CRP levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF-α(ng·L ⁻¹)	CRP(μg·L ⁻¹)
对照	—	56.28±4.57	14.57±1.83	3.62±0.45
模型	—	176.15±9.62*	53.94±5.16*	22.85±1.36*
甜菜碱	50	108.36±7.83*#	34.18±3.97*#	13.07±0.94*#
	100	72.19±6.05*#&	21.03±2.98*#&	7.11±0.82*#&
二甲双胍	200	68.43±5.89*#&	19.65±3.01*#&	6.76±0.83*#&

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与甜菜碱低剂量组比较: &P<0.05

*P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs model group; &P<0.05 vs low-dose group of betaine

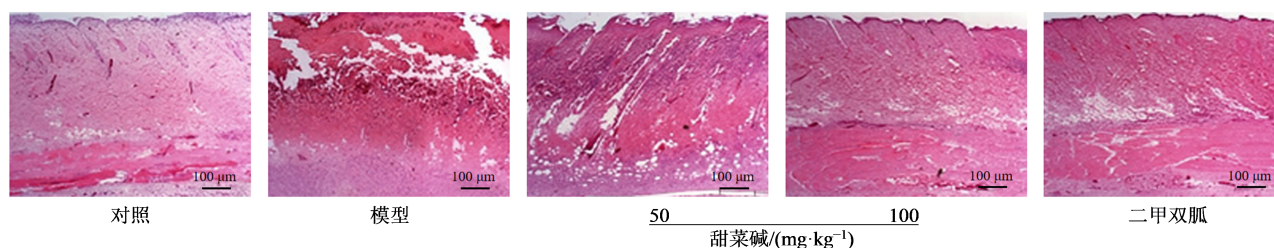


图1 各组大鼠创面皮肤组织病理学改变(HE, ×200)

Fig. 1 Pathological changes in wound skin tissue of rats in each group (HE, ×200)

低($P < 0.05$);与模型组比较,甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中CD31阳性表达率显著升高($P < 0.05$);与甜菜碱低剂量组比较,甜菜

碱高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中CD31阳性表达率显著升高($P < 0.05$)。见图2、表4。

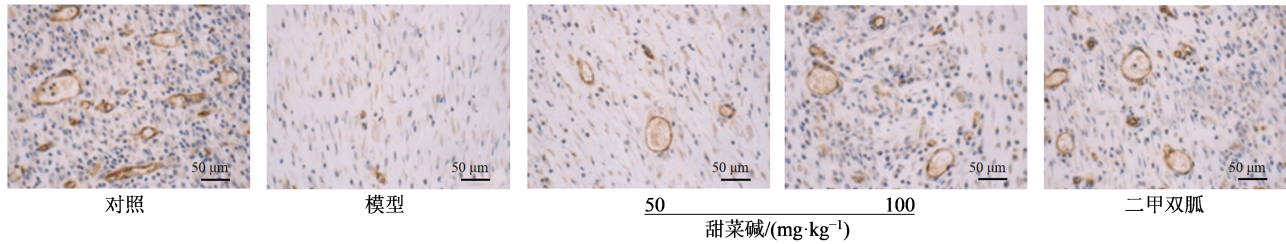


图2 各组大鼠创面皮肤组织中CD31蛋白阳性表达(免疫组化,×400)

Fig. 2 Positive expression of CD31 protein in wound skin tissue of rats in each group (Immunohistochemistry, ×400)

表4 各组大鼠创面皮肤组织中CD31阳性表达率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of CD31 positive expression rates in wound skin tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CD31阳性表达率/%
对照	—	20.45±2.13
模型	—	5.89±0.65*
甜菜碱	50	11.57±1.06 [#]
	100	16.43±1.35 ^{#&}
二甲双胍	200	17.52±1.46 ^{#&}

与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: [#] $P < 0.05$;与甜菜碱低剂量组比较: [&] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs low-dose group of betaine

表5 各组大鼠创面皮肤组织中SOD活性、MDA含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Comparison of SOD activity and MDA content in wound skin tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	4.58±0.61	6.37±0.68
模型	—	1.63±0.35*	29.58±2.43*
甜菜碱	50	2.97±0.41 [#]	18.34±1.85 [#]
	100	3.86±0.52 ^{#&}	11.15±1.08 ^{#&}
二甲双胍	200	4.02±0.47 ^{#&}	10.43±1.26 ^{#&}

与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: [#] $P < 0.05$;与甜菜碱低剂量组比较: [&] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs low-dose group of betaine

3.6 各组大鼠创面皮肤组织中SOD、MDA水平

与对照组比较,模型组大鼠创面皮肤组织中SOD活性显著降低,MDA含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中SOD活性显著升高,MDA含量显著降低($P < 0.05$);与甜菜碱低剂量组比较,甜菜碱高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中SOD活性进一步升高,MDA含量进一步降低($P < 0.05$)。见表5。

3.7 各组大鼠创面皮肤组织中AMPK/SIRT1/FoxO1通路相关蛋白表达

如图3、表6所示,与对照组比较,模型组大鼠创面皮肤组织中p-AMPK/AMPK值和SIRT1蛋白表达水平显著降低,p-FoxO1/FoxO1值显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,甜菜碱低、高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中p-AMPK/AMPK值和SIRT1蛋白表达水平显著升高,p-FoxO1/FoxO1值显著降低($P < 0.05$);与甜菜碱低剂量组比较,甜菜碱高剂量组和二甲双胍组大鼠创面皮肤组织中

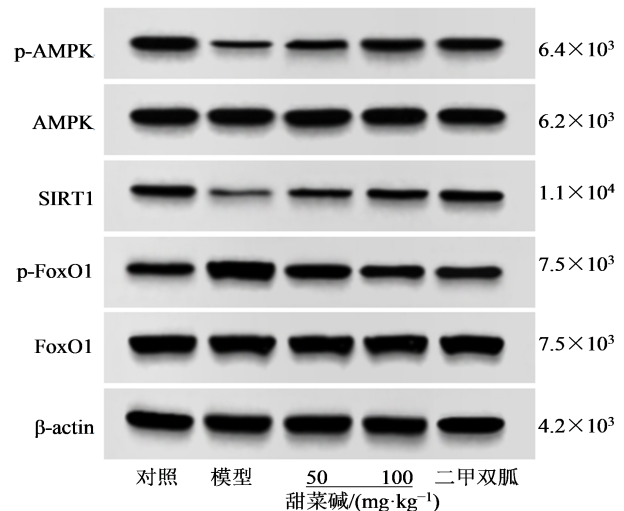


图3 各组大鼠创面皮肤组织中p-AMPK、AMPK、SIRT1、p-FoxO1、FoxO1蛋白表达

Fig. 3 Expression of p-AMPK, AMPK, SIRT1, p-FoxO1, FoxO1 proteins in wound skin tissue of rats in each group

p-AMPK/AMPK值和SIRT1蛋白表达水平进一步升高,p-FoxO1/FoxO1值降低($P < 0.05$)。

表6 各组大鼠创面皮肤组织中p-AMPK/AMPK、p-FoxO1/FoxO1值和SIRT1蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 6 Comparison of p-AMPK/AMPK, p-FoxO1/FoxO1 ratio, and SIRT1 protein expression levels in wound skin tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p-AMPK/AMPK	SIRT1/ β -actin	p-FoxO1/FoxO1
对照	—	0.84±0.07	0.58±0.06	0.55±0.06
模型	—	0.21±0.04*	0.14±0.03*	0.97±0.08*
甜菜碱	50	0.46±0.06*#	0.35±0.04*#	0.78±0.07*#
	100	0.63±0.06*#&	0.49±0.05*#&	0.65±0.07*#&
二甲双胍	200	0.70±0.05*#&	0.52±0.06*#&	0.62±0.06*#&

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与甜菜碱低剂量组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs low-dose group of betaine

4 讨论

糖尿病足作为一种微血管并发症,与糖尿病患者死亡率增加亦密切相关,目前其相关治疗药物的研发仍是临床医师的重点工作^[14]。血糖控制不佳导致的创面愈合延迟是糖尿病足的主要特征之一,因此,积极寻找控制血糖同时又可有效改善糖尿病足创面愈合的有效方法具有重要意义。甜菜碱是一种天然存在且稳定无毒的膳食营养素,可通过多种途径发挥抗氧化应激和抗炎作用^[15]。近年,甜菜碱在糖尿病以及其并发症防治中的作用及相关机制已被多项研究证实,例如,甜菜碱可防止葡萄糖耐受不良,进而预防亚砷酸钠诱导的小鼠糖尿病^[16];甜菜碱可通过胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)/ β 联蛋白(β -catenin)信号通路介导对2型糖尿病大鼠骨流失的保护作用^[17];甜菜碱能够通过调节磷脂酰肌醇激酶(PI3K)/苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路,改善葡萄糖代谢并抑制炎症和氧化应激反应,从而减轻链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠认知功能障碍^[12]等。但甜菜碱对糖尿病足的治疗作用及其相关机制目前仍鲜见报道,尚需进一步探究。

本研究通过喂养高脂饲料联合注射链脲佐菌素以及制备足部创面构建糖尿病足大鼠模型,结果显示,相比于对照大鼠,模型大鼠空腹血糖水平升高,创面愈合率降低,且创面皮肤组织病理学损伤严重,这与既往研究结果^[10-11]相一致,表明糖尿病足大鼠模型构建成功。而给予甜菜碱治疗后,糖尿病足大鼠空腹血糖水平降低,创面愈合率升高,且创面皮肤组织病理学损伤有所改善,提示甜菜碱可降低糖尿病足大鼠血糖,加速创面愈合。糖尿病足中创面愈合是皮肤对外部损伤的自然反应,同时也是一个复杂有序的生物学过程,涉及一系列的生理生化反应,主要包括炎症反应、氧化应激反应、血管生

成以及组织再生等^[18-20]。CD31又称为血小板-内皮细胞黏附分子,主要标记内皮细胞,用于识别血管生成状况^[21]。本研究中,模型大鼠血清炎症因子IL-6、TNF- α 、CRP水平以及创面皮肤组织中脂质过氧化产物MDA含量升高,且创面皮肤组织中抗氧化酶SOD活性和血管生成相关因子CD31阳性表达率降低;而甜菜碱能够降低糖尿病足大鼠中IL-6、TNF- α 、CRP水平和MDA含量,同时升高SOD活性和CD31阳性表达率,表明甜菜碱能够减轻糖尿病足大鼠中炎症和氧化应激反应,促进血管生成。Chen等^[22]研究表明两性离子甜菜碱胶原海绵能够抑制氧化应激、提高抗炎作用,同时促进伤口闭合、肉芽形成、再上皮化、胶原蛋白沉积和血管生成,对全层皮肤创面模型小鼠创面愈合具有明显疗效。但与Chen等^[22]研究不同的是,本研究采用的是通过ip给予糖尿病足大鼠甜菜碱,这也提示有必要进一步优化给药方式,以实现更安全、更有效的治疗目标。

能量代谢障碍可导致包括糖尿病在内的各种慢性炎症疾病,其中AMPK作为主要的细胞能量传感器和重要的代谢稳态调节剂,在糖尿病及其并发症发生和病情进展中发挥关键调控作用,且有望成为糖尿病及其并发症的潜在治疗靶点^[23]。SIRT1作为一种NAD⁺依赖的去乙酰化酶,可通过某些关键蛋白(如PGC-1 α 等)的去乙酰化来调控AMPK信号通路,还可以与FoxO1、PGC-1 α 、NF- κ B等因子相互作用,从而调节氧化应激、炎症、自噬和凋亡等^[24-25]。已有研究表明,甜菜碱可上调AMPK表达,减轻高脂饮食诱导的ApoE^{-/-}小鼠非酒精性脂肪性肝病^[26]。甜菜碱可恢复酒精诱导的FOXO1、PPAR- α 、AMPK等因子的表达和(或)活性改变,治疗酒精引起的脂肪肝变性^[27]。甜菜碱的摄入可防止海马体SIRT1的减少和记忆缺陷,预防淀粉样蛋白 β 肽诱导的小鼠

认知障碍^[28]。本研究结果显示,模型大鼠创面皮肤组织中 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平降低, p-FoxO1/FoxO1 值升高;而甜菜碱治疗可升高糖尿病足大鼠创面皮肤组织中 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平,降低 p-FoxO1/FoxO1 值,表明 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路参与糖尿病足发生过程,且可能在甜菜碱减轻糖尿病足大鼠氧化应激和炎症反应、促进血管生成以及加速创面愈合中发挥重要调控作用。此外,二甲双胍是2型糖尿病的基础药物治疗和首个预防药物,且已有研究显示二甲双胍可能通过激活 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路缓解糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱、肾功能不全和蛋白尿,减轻氧化应激,增强自噬,从而对糖尿病肾病发挥治疗作用^[8],并能够促进糖尿病大鼠皮肤伤口愈合^[29]。本研究以二甲双胍作为阳性药物,结果显示,甜菜碱高剂量组与二甲双胍组对糖尿病足大鼠的作用效果接近,且均优于甜菜碱低剂量组,此结果表明甜菜碱对糖尿病足大鼠的保护作用亦可能与调控 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路有关。

甜菜碱可激活 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路,减轻糖尿病足大鼠氧化应激和炎症反应,促进血管生成,加速创面愈合。本研究为药物治疗糖尿病足提供了一定实验依据。但在作用机制上,本研究仅进行了初步分析,后续仍有待通过特异性干预 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路进行更深入地验证,从而为甜菜碱应用于糖尿病足治疗提供更多的证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pérez-Panero A J, Ruiz-Muñoz M, Cuesta-Vargas A I, et al. Prevention, assessment, diagnosis and management of diabetic foot based on clinical practice guidelines: A systematic review [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(35): e16877.
- [2] Reardon R, Simring D, Kim B, et al. The diabetic foot ulcer [J]. *Aust J Gen Pract*, 2020, 49(5): 250-255.
- [3] Bandyk D F. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment [J]. *Semin Vasc Surg*, 2018, 31(2/3/4): 43-48.
- [4] 安冬, 杨军红, 宋晓萌. 甜菜碱改善肥胖及相关代谢紊乱作用机制的研究进展 [J]. *中南药学*, 2021, 19(7): 1393-1398.
An D, Yang J H, Song X M. Research progress in the mechanism of betaine in reducing obesity and related metabolic disorders [J]. *Central South Pharm*, 2021, 19(7): 1393-1398.
- [5] Veskovcic M, Mladenovic D, Milenkovic M, et al. Betaine modulates oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and Akt/mTOR signaling in methionine-choline deficiency-induced fatty liver disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 848: 39-48.
- [6] Zahedi L, Ghourchi Beigi P, Shafiee M, et al. Development of plasma functionalized polypropylene wound dressing for betaine hydrochloride controlled drug delivery on diabetic wounds [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 9641.
- [7] Szkudelska K, Szkudelski T. The anti-diabetic potential of betaine. Mechanisms of action in rodent models of type 2 diabetes [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 150: 112946.
- [8] Ren H W, Shao Y, Wu C, et al. Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease via AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 500: 110628.
- [9] 姚艺, 李艳丽, 丁洪成, 等. 芒柄花苷经 AMPK/SIRT1/FoxO1 通路对2型糖尿病肾病大鼠肾损伤的改善作用 [J]. *河北医学*, 2022, 28(11): 1785-1790.
Yao Y, Li Y L, Ding H C, et al. The ameliorating effect of ononin on renal injury in rats with type 2 diabetic nephropathy via AMPK/SIRT1/FoxO1 pathway [J]. *Hebei Med*, 2022, 28(11): 1785-1790.
- [10] Sun X L, Wang X, Zhao Z Y, et al. Paeoniflorin accelerates foot wound healing in diabetic rats through activating the Nrf2 pathway [J]. *Acta Histochem*, 2020, 122(8): 151649.
- [11] 郑月月, 石小霞, 柳德学, 等. 芦荟多糖对糖尿病足溃疡大鼠创面愈合的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(2): 153-156.
Zheng Y Y, Shi X X, Liu D X, et al. Effect of aloe polysaccharide on wound healing of rats with diabetic foot ulcer [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(2): 153-156.
- [12] Huang B Q, Hu X L, Hu J, et al. Betaine alleviates cognitive deficits in diabetic rats via PI3K/Akt signaling pathway regulation [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2020, 49(3): 270-278.
- [13] 于泽洋, 李天博, 王江宁. 复方芪参提取物对糖尿病足溃疡模型大鼠创面愈合及 HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 通路的影响 [J]. *河北医学*, 2021, 27(3): 374-379.
Yu Z Y, Li T B, Wang J N. Effects of Compound Qishen Extract on wound healing and HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 pathway in diabetic foot ulcer model rats [J]. *Hebei Med*, 2021, 27(3): 374-379.
- [14] Pitocco D, Spanu T, Di Leo M, et al. Diabetic foot infections: A comprehensive overview [J]. *Eur Rev Med*

- Pharmacol Sci, 2019, 23(2 Suppl): 26-37.
- [15] Zhao G F, He F, Wu C L, et al. Betaine in inflammation: Mechanistic aspects and applications [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1070.
- [16] Esfahani P P, Mahdavinia M, Khorsandi L, et al. Betaine protects against sodium arsenite-induced diabetes and hepatotoxicity in mice [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2023, 30(4): 10880-10889.
- [17] 贾歆, 刘强, 杨建彬, 等. 甜菜碱通过 IGF-1R/ β -catenin 信号通路介导对 2 型糖尿病大鼠骨流失的保护作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(1): 86-90.
Jia X, Liu Q, Yang J B, et al. Protective effect of betaine on bone loss in the type 2 diabetic rats is mediated by IGF-1R/ β -catenin signal pathway [J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(1): 86-90.
- [18] 岳莹, 郝文立, 甘永康. 京万红软膏对糖尿病足大鼠的作用及其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(5): 924-930.
Yue Y, Hao W L, Gan Y K. Effect and mechanism of Jingwanhong Ointment on diabetic foot rats [J]. Drugs Clin, 2022, 37(5): 924-930.
- [19] 周泓宇, 王继先, 艾力江·阿斯拉, 等. 芍药苷对糖尿病足大鼠创面愈合及 NGF/Akt/GSK3 β 通路的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2022, 44(6): 650-656.
et al. The healing effect of paeoniflorin on the wound and regulation of NGF/Akt/GSK3 β pathway on rats with diabetic foot [J]. Int J Tradit Chin Med, 2022, 44(6): 650-656.
- [20] Zhu Y, Wang Y M, Jia Y C, et al. Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats [J]. Wound Rep Reg, 2019, 27(4): 324-334.
- [21] 冯召岚, 盛健健, 董爱武, 等. 自体富血小板凝胶联合脂肪干细胞促进糖尿病足大鼠创面修复的机制研究 [J]. 中国医学创新, 2022, 19(23): 24-30.
Feng Z L, Sheng J J, Dong A W, et al. Study on mechanism of autologous platelet-rich plasma gel combined with adipose-derived stem cells on promoting wound repair of rats with diabetic foot [J]. Med Innov China, 2022, 19(23): 24-30.
- [22] Chen A Q, An Y, Huang W, et al. Highly water-preserving zwitterionic betaine-incorporated collagen sponges with anti-oxidation and anti-inflammation for wound regeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 491.
- [23] Madhavi Y V, Gaikwad N, Yerra V G, et al. Targeting AMPK in diabetes and diabetic complications: Energy homeostasis, autophagy and mitochondrial health [J]. Curr Med Chem, 2019, 26(27): 5207-5229.
- [24] Wang J, Hu J Q, Song Y J, et al. 2'-fucosyllactose ameliorates oxidative stress damage in d-galactose-induced aging mice by regulating gut microbiota and AMPK/SIRT1/FOXO1 pathway [J]. Foods, 2022, 11(2): 151.
- [25] Li H Y, Zheng F C, Zhang Y M, et al. Resveratrol, novel application by preconditioning to attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury in mice through regulate AMPK pathway and autophagy level [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(15): 4216-4229.
- [26] Chen W Q, Zhang X L, Xu M W, et al. Betaine prevented high-fat diet-induced NAFLD by regulating the FGF10/AMPK signaling pathway in ApoE^{-/-} mice [J]. Eur J Nutr, 2021, 60(3): 1655-1668.
- [27] Rehman A, Mehta K J. Betaine in ameliorating alcohol-induced hepatic steatosis [J]. Eur J Nutr, 2022, 61(3): 1167-1176.
- [28] Ibi D, Kondo S, Ohmi A, et al. Preventive effect of betaine against cognitive impairments in amyloid β peptide-injected mice through Sirtuin1 in *Hippocampus* [J]. Neurochem Res, 2022, 47(8): 2333-2344.
- [29] Shawky L M, El Bana E A, Morsi A A. Stem cells and metformin synergistically promote healing in experimentally induced cutaneous wound injury in diabetic rats [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2019, 57(3): 127-138.

[责任编辑 兰新新]