

肉桂酸促进糖尿病小鼠创面愈合及创口修复细胞迁移作用研究

张 锐¹, 房志锐¹, 任秀云¹, 张迎雪², 陈 璐^{2*}, 王 虹^{1*}

1. 天津中医药大学医学技术学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学 测试中心, 天津 301617

摘要: **目的** 探讨肉桂酸对糖尿病小鼠创面愈合及创口修复细胞迁移的影响。**方法** 将 16 只雄性 db/db 小鼠随机分为模型组和肉桂酸 (10 mg/kg) 组, 建立切除性创面夹板模型, 另取 6 只 C57BL/6J 小鼠作为对照组。连续给药 16 d, 每 2 天观察创面愈合程度; 给药结束后对皮肤组织进行病理组织学和免疫荧光染色, 检测小鼠创面愈合与组织形态学变化和创面血管密度。根据创面愈合的过程, 采用不同细胞系进行体外实验。qRT-PCR 检测肉桂酸对巨噬细胞炎症因子表达的影响; Matrigel 基质胶成管法、划痕实验、qRT-PCR 检测肉桂酸对创口修复细胞包括人脐静脉内皮细胞、小鼠成纤维细胞和人角质形成细胞的成管能力、迁移能力、分化能力的影响。**结果** 给药 16 d 后, 肉桂酸显著加快糖尿病小鼠伤口愈合速度, 提高体内微血管密度和创面周围再上皮化率及肉芽组织厚度。肉桂酸可显著降低巨噬细胞炎症因子表达, 提高创口修复细胞的迁移能力。**结论** 肉桂酸通过抑制过度炎症反应, 促进创口修复细胞迁移, 促进血管生成和胶原沉积, 加速糖尿病小鼠创面愈合。

关键词: 肉桂酸; 糖尿病创面愈合; 炎症; 创口修复细胞; 血管生成; 成纤维细胞分化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3388-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.017

Effect of cinnamic acid on wound healing and wound repair cell migration in diabetic mice

ZHANG Rui¹, FANG Zhirui¹, REN Xiuyun¹, ZHANG Yingxue², CHEN Lu², WANG Hong¹

1. School of Medical Technology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Instrumental Analysis and Research Center, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the effect of cinnamic acid on wound healing and wound repair cell migration in diabetic mice. **Methods** A total of 16 male db/db mice were randomly divided into model group and cinnamic acid (10 mg/kg) group, an excisional wound splint model was established, and six C57BL/6J mice were taken as control group. Drugs were continuously administration for 16 d, the degree of wound healing was observed every two days; After administration, histopathology and immunofluorescence staining were performed on skin tissue to detect wound healing, tissue morphological changes and wound vascular density in mice. According to the process of wound healing, different cell lines were used for *in vitro* experiments. qRT-PCR was used to detect the effect of cinnamic acid on the expression of inflammatory factors in macrophages; Matrix gel tube formation method, scratch assay, qRT-PCR were used to detect the effect of cinnamic acid on tube-forming, migration and differentiation abilities of wound repair cells including human umbilical vein endothelial cells, mouse fibroblasts and human keratinocytes. **Results** After 16 d of administration, cinnamic acid significantly accelerated wound healing in diabetes mice, increased microvessel density, periwound re-epithelialisation rate and granulation tissue thickness *in vivo*. Cinnamic acid could significantly reduce the expression of inflammatory factors in macrophages and improve the migration ability of wound repair cells. **Conclusion** Cinnamic acid can accelerate wound healing in diabetes mice by inhibiting excessive inflammatory reaction, promoting migration of wound repair cells, promoting angiogenesis and collagen deposition.

收稿日期: 2023-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174205); 国家自然科学基金资助项目 (82274135); 天津市教委科研计划项目 (2021ZD026)

作者简介: 张 锐, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15890240913 E-mail: 15890240913@139.com

*通信作者: 王 虹, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理学。Tel: (022)59596171 E-mail: wanghongsys@tjutc.edu.cn

陈 璐, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为心血管细胞药理学。

Tel: 18502295944 E-mail: chenlutjutc@tjutc.edu.cn

Key words: cinnamic acid; diabetic wound healing; inflammation; wound repair cells; angiogenesis; fibroblast differentiation

糖尿病是一种表现为代谢紊乱的内分泌疾病，是威胁公众健康的 3 大疾病之一^[1]。预计到 2050 年，全球糖尿病患者人数将达到 13.1 亿^[2]。糖尿病溃疡是糖尿病患者最常见的血管并发症^[3]，其主要是由高血糖环境、缺血缺氧以及持续扩大的炎症反应引起^[4]，是世界范围内非创伤性肢体截肢的主要原因。越来越多的证据表明，血管新生障碍导致的氧气和营养物质无法运送至受伤组织，显著延缓了糖尿病患者伤口愈合。目前针对糖尿病溃疡的临床治疗方法包括局部清创、抗生素治疗、血管重建和活体皮肤等效移植等^[5]。虽然这些标准的治疗方法可以控制症状，但仍无法满足糖尿病创面愈合的需求，有效的糖尿病伤口再生的治疗方法仍然难以捉摸，治愈率差强人意，严重影响患者生活质量，因此，急需寻找一种新型且有效的治疗药物。

肉桂酸是一种天然存在的芳香酚酸类物质，广泛存在于肉桂、葡萄、菠菜等食物中，是日常香料和果蔬中最丰富的酚酸之一，同时还是治疗糖尿病的常见中药如桂枝、当归等的活性成分。研究表明，肉桂酸可以改善 db/db 小鼠的空腹葡萄糖水平，调节血脂及改善胰岛素抵抗^[6]。同时，反式肉桂酸可通过蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和 p38-丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路诱导成纤维细胞的迁移^[7]。Choi 等^[8]研究表明肉桂酸可通过上调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和激酶插入域受体 (kinase insert domain receptor, Flk-1/KDR) 表达促进内皮细胞迁移和血管生成。然而，肉桂酸是否影响糖尿病引起的慢性伤口愈合尚未得到证实。本研究选用 db/db 小鼠皮肤损伤模型模拟糖尿病创面并建立创口修复细胞迁移模型，探讨肉桂酸对糖尿病小鼠创面愈合的影响及可能机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性野生型 (C57BL/6JNju, db/+) 小鼠 6 只和糖尿病 (BKS.Cg-Dock7m+/+Lepr db/JNju, db/db) 小鼠 16 只，8~12 周龄，均由南京大学南京生物医学研究所提供，动物生产许可证号 SCXK (苏) 2015-0001。动物于中国医学科学院生物医学放射工程研究所动物房中分笼饲养，12 h 交替照明，

自由进食饮水，温度 22~25 °C，相对湿度 40%~60%。动物实验按照天津中医药大学动物保护与使用委员会批准的指导方针进行 (伦理批准号 TCM-LAEC2019098)。

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞、HaCaT 角质形成细胞、NIH-3T3 成纤维细胞购自中国科学院，人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 购自美国 ATCC。

1.2 药品与试剂

肉桂酸 (批号 DR0063，质量分数 ≥98%) 购自成都德斯特生物科技有限公司；羧甲基纤维素钠购自天津元力立化工有限公司；RIPA 缓冲液 (批号 R0010) 购自北京索莱宝生物科技有限公司；三溴乙醇 (批号 T48402) 购自美国 Sigma 公司；Trizol 试剂 (批号 15596-026) 购自美国 Life Technology 公司；磷酸酶抑制剂 (批号 0469132001)、蛋白酶抑制剂 (批号 0490837001)、PMSF (批号 P0100)、反转录试剂盒 (批号 4897030001)、荧光定量试剂 (批号 4913914001) 购自瑞士 Roche 公司；MTS Assay 试剂盒 (批号 ab197010)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号 ab5694)、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab150080) 购自英国 Abcam 公司；凝集素 (批号 AL-1103)、抗大豆凝集素一抗 (批号 AS-2104-1)、DyLight594 标记的抗山羊 IgG 二抗 (批号 DI-3094-1.5) 购自美国 Vector Laboratories 公司；EGM-2 培养基 (批号 CC-4147)、胎牛血清 (批号 CC-3156) 购自瑞士 Lonza 公司；DMEM 培养基 (批号 06-1055-57-1A) 购自美国 BI 公司；晚期糖基化终末产物活性蛋白 (advanced glycation end products, AGEs, 批号 APB353Ge01)、VEGFA 购自武汉云克隆科技有限公司。

1.3 仪器

Leica S8APO 型体视显微镜 (德国 Leica 公司)；ECLIPSE TE300 型倒置荧光显微镜、ECLIPSE TS100 型倒置相差显微镜、ECLIPSE 型倒置式生物显微镜 (日本 Nikon 公司)；Flex Station 3 型多功能酶标仪 (美国 Molecular Device 公司)；IncuCyte Zoom 实时动态活细胞成像分析仪 (美国 ESSEN 公司)。ACCU-CHEK® Performa Nano 血糖仪及试纸条 (瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 造模、分组及给药 db/db 小鼠适应性喂养 1 周后, ip 三溴乙醇 (16.5 mL/kg) 麻醉, 脱毛, 固定, 在小鼠背部中线处形成 6 mm 全层切除皮肤创面。将环形硅胶夹板固定在创面周围, 用 5-0 缝线缝合。用庆大霉素对伤口进行消毒, 并用 Tegaderm 无菌透明敷料覆盖伤口, 每 2 天更换 1 次无菌透明敷料。将 16 只皮肤损伤小鼠随机分为模型组和肉桂酸 (10 mg/kg) 组, 每组 8 只, 另取 6 只野生型小鼠作为对照组。肉桂酸组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 羧甲基纤维素钠溶液。造模同时开始给药, 连续给药 16 d。

2.1.2 体质量和血糖监测 造模后, 每日称定小鼠体质量, 记录给药 16 d 各组小鼠体质量变化。每 2 日对小鼠尾尖取血, 采用配套血糖仪及试纸对随机血糖浓度进行检测。

2.1.3 创口愈合分析 造模后, 每 2 天拍照记录创口面积, 测量创口闭合程度。采用 Image J 软件对创面闭合程度进行量化, 计算创面愈合率。

创面愈合率 = $1 - \frac{\text{给药后创口面积}}{\text{给药前创口面积}}$

2.1.4 创面皮肤组织病理观察 于实验第 16 天颈椎脱臼处死小鼠, 取创面皮肤组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋组织, 切片脱蜡复水后, 进行苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色。于显微镜下观察并拍照, 分析创面组织结构、肉芽组织及胶原沉积情况。

2.1.5 创面皮肤组织新生血管观察 小鼠于处死前 30 min 尾 iv 凝集素 (用 1 mL HBS 缓冲液稀释), 取创面皮肤组织石蜡包埋组织, 切片脱蜡复水、抗原修复、漂洗、封闭, 滴加抗大豆凝集素一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜; 滴加 DyLight 594 标记的抗山羊 IgG 荧光二抗 (1:200), 室温孵育 30 min, 滴加 DAPI 染核, 封片, 于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞、HaCaT 细胞、NIH-3T3 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 (100 U/mL)-链霉素 (100 mg/mL) 的 DMEM, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养; HUVEC 细胞用含 5% 胎牛血清和生长添加剂的 EGM-2 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 细胞融合度达到 85%~90% 时传代。

2.2.2 肉桂酸对 M1 型巨噬细胞促炎因子表达的影响 采用 qRT-PCR 法检测 RAW264.7 细胞中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) mRNA 表达。取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL。培养 24 h 后, 设置对照组、模型组和肉桂酸 (10、20、40 μ mol/L) 组, 每组设置 3 个复孔。对照组培养基中仅加入 0.1% DMSO; 模型组及各给药组在培养基中加入 1 ng/mL LAGEs, 各给药组给予不同浓度的肉桂酸干预 48 h 后, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 检测 *IL-1 β* 、*TNF- α* mRNA 表达。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: GGTGCTGAGTATGTCGTGGA R: CCTTCCACAATGCCAAAGTT
<i>IL-1β</i>	F: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG R: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
<i>TNF-α</i>	F: GAAGAGAACCTGGGAGTAGATAAGG R: GTCGTAGCAAACCACCAAGC
<i>Collagen III</i>	F: TAAAGAAGTCTCTGAAGCTGATGG R: ATCTATGATGGGTAGTCTCATTGC
<i>α-SMA</i>	F: CCACCGCAAATGCTTCTAAGT R: GGCAGGAATGATTTGGAAGG

2.2.3 肉桂酸对 HUVECs 管状形成和迁移的影响

(1) 细胞活力测定: 取处于对数生长期的 HUVECs, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 细胞计数后, 以 2.5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。置于 37 °C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 12 h 后, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 设置对照组 (含 0.1% DMSO) 和不同浓度的给药组 (分别加入终浓度为 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、40.000、80.000 μ mol/L 的肉桂酸), 每组 6 个复孔。给药后干预 24 h, 避光条件下每孔加入 20 μ L MTS。于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中避光孵育 2 h 后, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 检测细胞活力。

(2) 细胞迁移实验: 将 HUVECs 以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h 后, 使用 96 孔细胞划痕器对细胞进行机械刮伤。设置对照组和不同浓度 (5、10、20、40 μ mol/L) 肉桂酸组, 取出培养基, D-Hank's 洗涤 2 次, 按照实验分组置换成含 5% 胎牛血清的 DMEM

完全培养基放入细胞培养箱继续培养,在倒置显微镜 40 倍镜下拍照记录,记为 0 h;细胞放回培养箱继续培养 24 h,再次进行拍照记录。相差显微镜下观察记录不同时间点细胞迁移情况,用 Image J 软件统计划痕面积,计算划痕愈合率。

划痕愈合率=1-各时间节点划痕面积/0 h 划痕面积

(3) Matrigel 基质胶成管实验:将新鲜 Matrigel 溶胶平铺于 96 孔培养板上,迅速转移进 37 °C 无菌培养箱,待 Matrigel 溶胶凝固后,将 HUMCEs 以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,设置对照组(含 0.1% DMSO)、肉桂酸 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组和 VEGFA (0.1 mg/L) 组,继续培养 18 h,倒置光学显微镜下观察 HUMCEs 的血管生成情况并拍照记录,使用 Image J 软件分析成管结构的节点数。

2.2.4 肉桂酸对 NIH-3T3 细胞迁移及 III 型胶原 (Collagen III) 和 α -SMA 表达的影响

(1) 细胞活力测定:NIH-3T3 细胞以 2.5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。设置对照组和不同浓度 (0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、40.000、80.000 $\mu\text{mol/L}$) 肉桂酸组,每组 6 个复孔。按“2.2.3 (1)”项下方法处理 24 h,检测细胞活力。

(2) 细胞迁移实验:将 NIH-3T3 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中,设置对照组和不同浓度 (10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 肉桂酸组,按“2.2.3 (2)”项下方法处理 10 h,计算划痕愈合率。

(3) 免疫荧光法检测 NIH-3T3 细胞中 α -SMA 蛋白表达:NIH-3T3 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 12 孔板中,设置对照组(含 0.1% DMSO)、肉桂酸 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组,每组设 3 个复孔,培养 48 h 后,用 1 mL PBS 洗涤 2 次,5 min/次;加入 1 mL 3.7% 多聚甲醛固定 10 min,加入 1 mL PBS 洗涤 4 次,用 1 mL 0.1% Triton 透化 3~5 min;加入 1 mL PBS 洗涤 4 次,加入 1% 牛血清白蛋白封闭 30 min;取出玻片置于载玻片上,加入 100 μL α -SMA 一抗 (1:200),4 °C 孵育过夜;将玻片取出置于 24 孔板内,加入 1 mL PBS 洗涤 3 次,加入 200 μL 二抗 (1:250),37 °C 避光孵育 2 h;加入 1 mL PBS 洗涤,加入 200 μL DAPI 溶液避光染色 10 min, PBS 洗涤后,于倒置荧光显微镜 200 倍镜下观察染色的细胞,每孔观察 6 个随机视野,拍照并计数染色阳性的细胞。

(4) qRT-PCR 检测 NIH-3T3 细胞中 α -SMA、Collagen III mRNA 表达:将 NIH-3T3 细胞以 2×10^5

个/孔接种于 12 孔板中,设置对照组和肉桂酸组 (20 $\mu\text{mol/L}$),分别给药培养 6、12、24、48 h,收集细胞,按“2.2.2”项下方法进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.2.5 肉桂酸对 HaCaT 细胞迁移的影响

(1) 细胞活力测定:HaCaT 细胞以 2.5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。设置对照组和不同浓度 (0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000、40.000、80.000 $\mu\text{mol/L}$) 肉桂酸组,每组 6 个复孔。按“2.2.3 (1)”项下方法处理 24 h,检测细胞活力。

(2) 细胞迁移实验:设置对照组和不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 肉桂酸组,按“2.2.3 (2)”项下方法处理 48 h,计算划痕愈合率。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 LSD-*t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用 LSD 法检验。

3 结果

3.1 肉桂酸对糖尿病小鼠体质量及血糖的影响

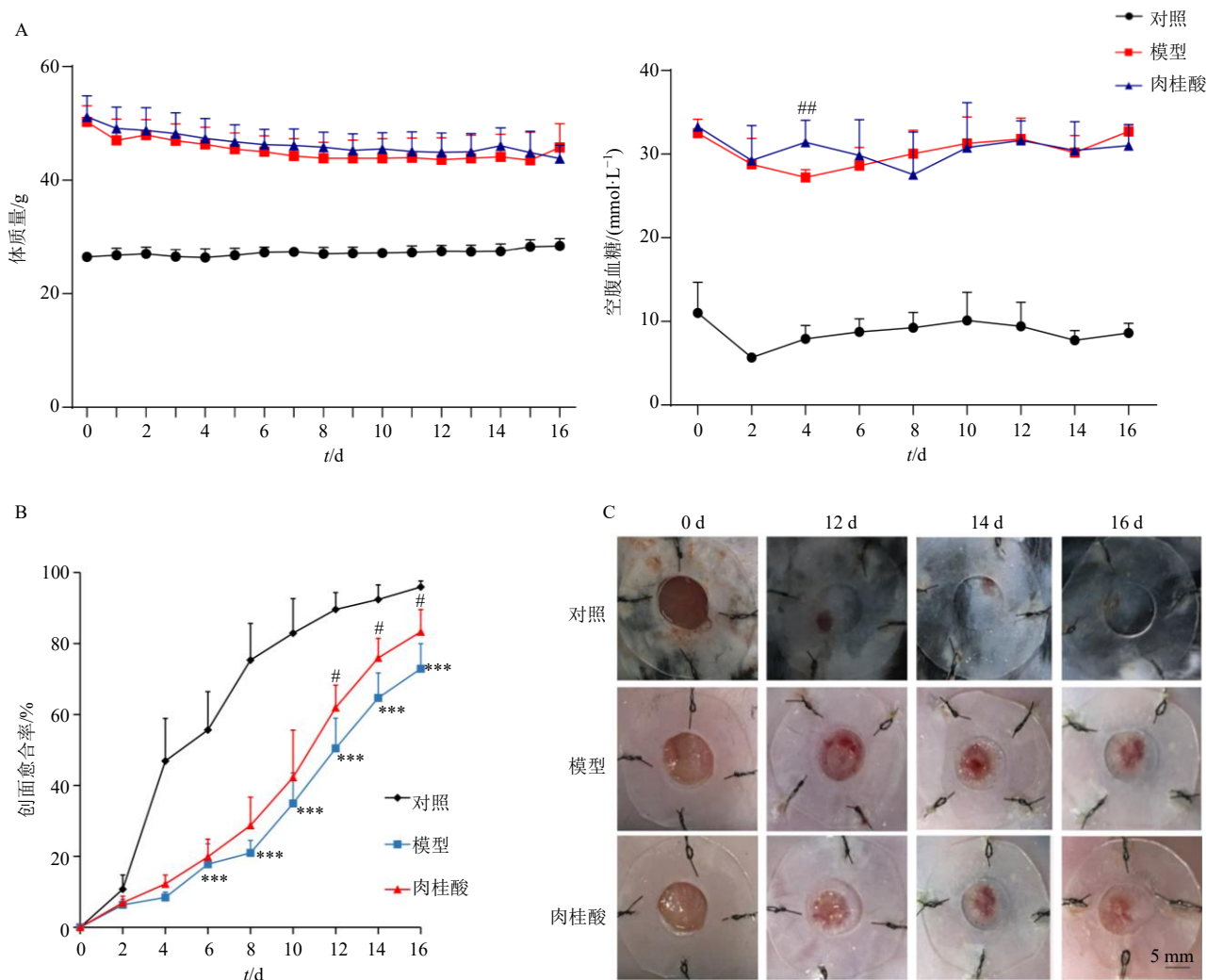
如图 1-A 所示,造模期间对小鼠体质量及血糖进行监测,在给药前,模型组与肉桂酸组小鼠体质量及血糖无差异,对照组较模型组与肉桂酸组有显著差异。给药 16 d 后,与模型组比较,肉桂酸组小鼠体质量及血糖无下降趋势,提示给药 16 d 后,肉桂酸干预对 db/db 糖尿病小鼠体质量及血糖无明显影响。

3.2 肉桂酸对糖尿病小鼠伤口愈合的影响

如图 1-B、C 所示,模型组及肉桂酸组在创伤后小鼠创面愈合率均显著低于对照组 ($P < 0.001$),肉桂酸组和模型组之间比较,前 11 d 创面愈合率均未见统计学意义,第 12~16 天肉桂酸组小鼠创口面积明显缩小,创面愈合率升高,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3.3 肉桂酸对糖尿病小鼠皮肤创面肉芽组织及胶原沉积的影响

如图 2 所示,HE 染色结果显示,与模型组比较,肉桂酸组小鼠新生肉芽组织厚度较厚,且表皮结构连续完整,可见大量成纤维细胞增殖,胶原纤维生成较多,且排列较整齐。Masson 染色结果显示,肉桂酸组小鼠创口处胶原沉积明显,创面胶原纤维排列整齐;对照组小鼠创面显示出稀疏和无序的低水平胶原蛋白沉积。



A-肉桂酸对糖尿病小鼠体重及血糖的影响；B-各时间点创面愈合率；C-各时间点创面愈合图片；与对照组比较：*** $P < 0.001$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

A-effect of cinnamic acid on body weight and blood sugar of diabetes mice; B-wound healing rate at each time point; C-pictures of wound healing at various time points; *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 1 肉桂酸对糖尿病小鼠创面愈合的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$)

Fig. 1 Effect of cinnamic acid on wound healing of diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$)

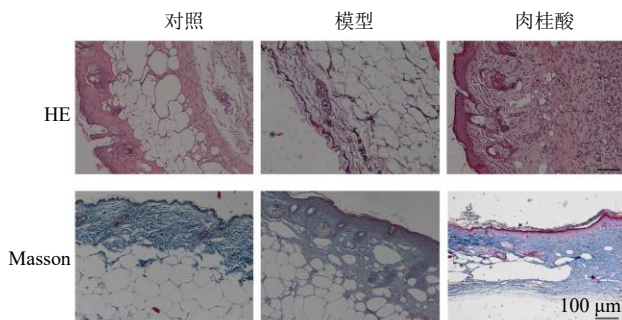
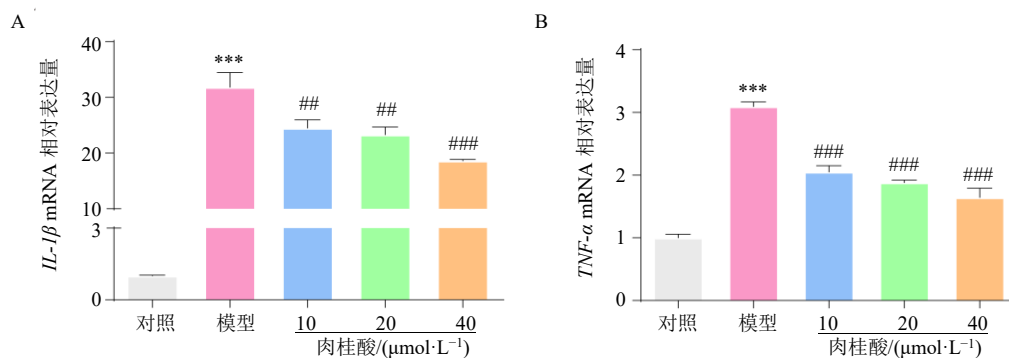


图 2 肉桂酸对糖尿病小鼠皮肤创面肉芽组织及胶原沉积的影响 ($\times 100$)

Fig. 2 Effect of cinnamic acid on granulation tissue and collagen deposition of skin wounds in diabetes mice ($\times 100$)

3.4 肉桂酸抑制 M1 型巨噬细胞促炎因子表达

采用 AGEs 诱导的 RAW264.7 细胞模型考察肉桂酸对创口愈合过程中炎症反应的影响。AGEs 诱导 RAW264.7 细胞 48 h, 如图 3-A、B 所示, 与对照组比较, 模型组 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.001$), 提示巨噬细胞炎症模型建立成功。与模型组比较, 肉桂酸组 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 呈剂量相关性, 表明肉桂酸可以防止 M1 型巨噬细胞过度分泌 $IL-1\beta$ 及 $TNF-\alpha$, 降低糖尿病创面炎症失调导致的 M1 和 M2 表型转换紊乱, 减轻过度炎症并缩短炎症持续时间。



A、B-肉桂酸对 AGEs 诱导的 RAW264.7 细胞 *IL-1β*、*TNF-α* mRNA 表达的影响；与对照组比较：*** $P < 0.001$ ；与模型组比较：## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A, B-effect of cinnamic acid on *IL-1β*, *TNF-α* mRNA expressions in AGEs-induced RAW264.7 cells; *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

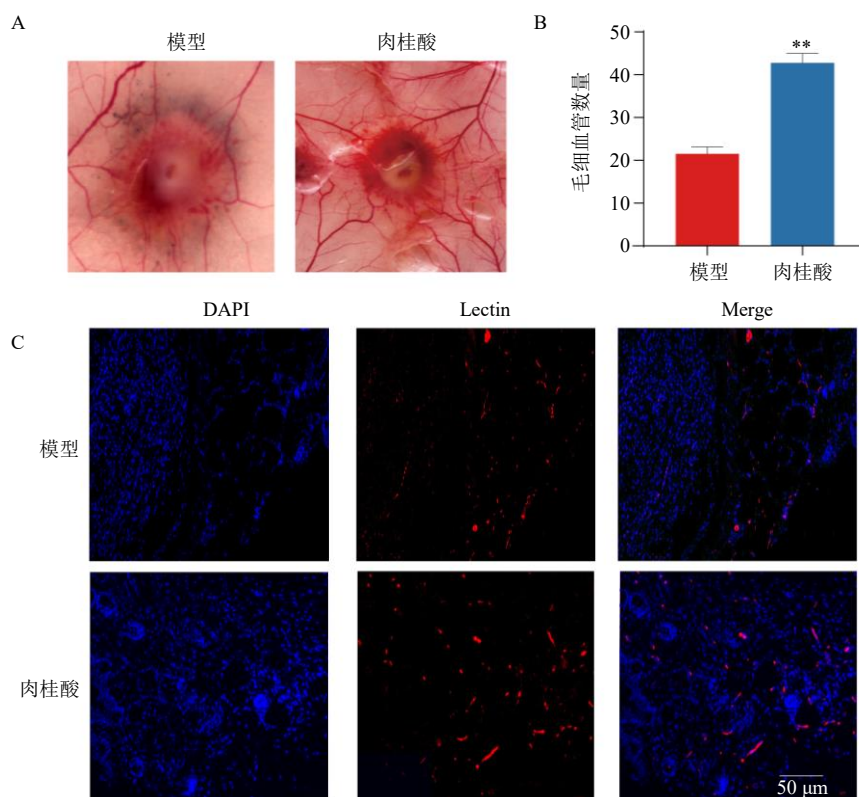
图 3 肉桂酸抑制巨噬细胞炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Cinnamic acid inhibits the expression of inflammatory factors in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 肉桂酸促进糖尿病小鼠创面愈合中的血管生成

显微镜观察糖尿病小鼠真皮旁创面血管及血液循环情况，如图 4-A 所示，与模型组比较，肉桂酸

组微血管密度更高，血供更充足。Lectin 免疫荧光结果显示，肉桂酸组 Lectin⁺信号增加 ($P < 0.01$ ，图 4-B、C)，表明肉桂酸显著促进糖尿病小鼠创口周围毛细血管形成，促进伤口愈合。



A-小鼠创面血管生成；B-损伤后第 16 天伤口毛细血管数量；C-损伤后第 16 天凝集素免疫荧光。与模型组比较：** $P < 0.01$ 。

A-angiogenesis in mouse wounds; B-number of capillaries in wound on 16th day after injury; C-agglutinin immunofluorescence was observed on 16th day after injury; ** $P < 0.01$ vs model group.

图 4 肉桂酸对糖尿病小鼠创面新生血管的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

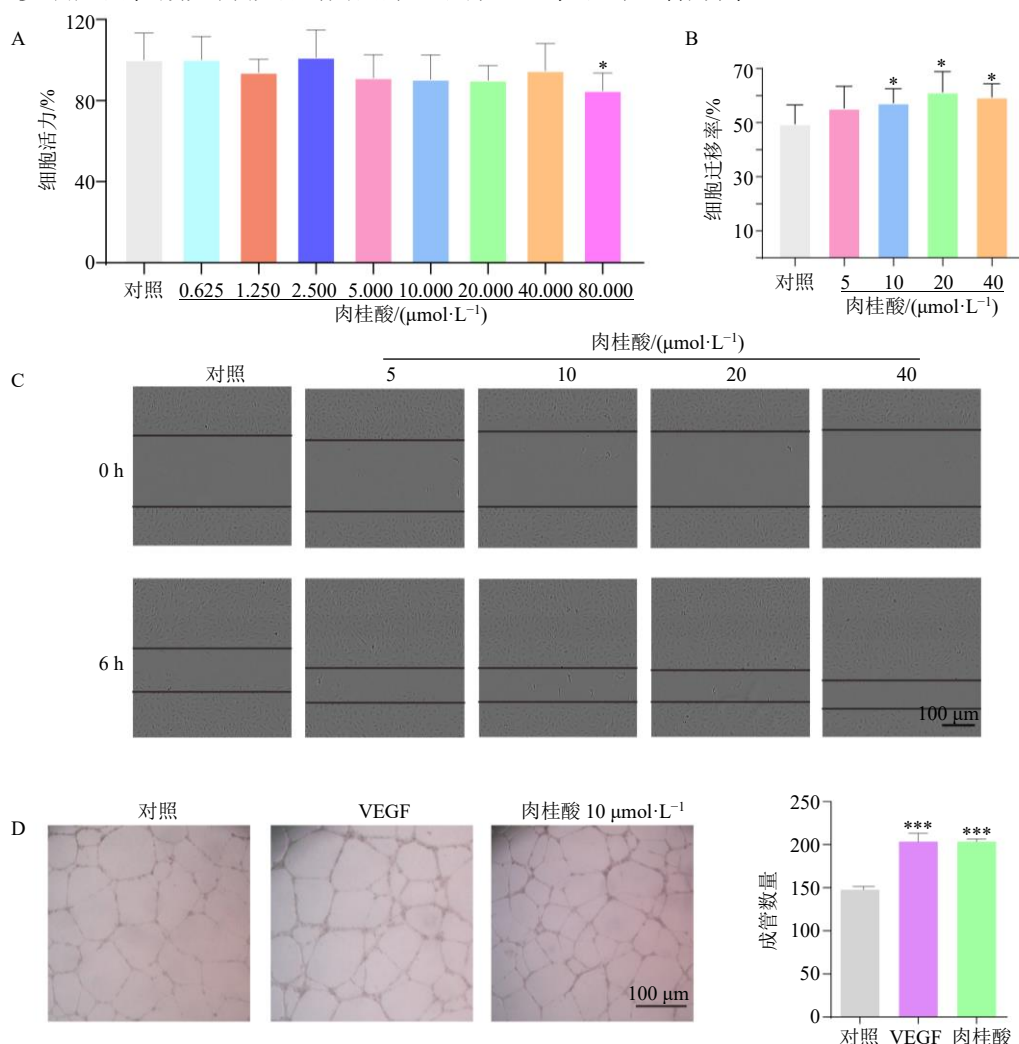
Fig. 4 Effect of cinnamic acid on neovascularization in wounds of diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

为考察肉桂酸是否对 HUVECs 有血管生成作用, 进行细胞迁移实验及小管形成实验。MTS 法检测不同浓度肉桂酸对 HUVECs 细胞活力影响, 结果显示肉桂酸 (0.625~40 $\mu\text{mol/L}$) 对 HUVECs 活力无显著影响 (图 5-A)。体外划痕实验发现, 与对照组比较, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 肉桂酸处理 HUVECs 6 h 后, 细胞迁移率显著升高 ($P < 0.05$, 图 5-B、C)。使用 HUVECs 进行小管形成实验, 结果显示, 肉桂酸处理 HUVECs 18 h 后体外成管节点明显增加 ($P < 0.001$, 图 5-D), 管腔明显形成, 表明肉桂酸具有促进 HUVECs 的成管能力。

3.6 肉桂酸诱导糖尿病创面细胞外基质重塑

为进一步确定肉桂酸如何影响创面肉芽组织形

成, 体外进行 NIH-3T3 细胞划痕实验。首先检测其对 NIH-3T3 细胞活力影响, 如图 6-A 所示, 不同浓度 (0.625~80.00 $\mu\text{mol/L}$) 肉桂酸对 NIH-3T3 细胞活力无明显影响。如图 6-B、C 所示, 与对照组比较, 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 肉桂酸处理 NIH-3T3 细胞 10 h 后, 细胞迁移率均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。如图 6-D 所示, 与对照组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ 肉桂酸处理 NIH-3T3 细胞 48 h 后, α -SMA 阳性细胞数量增加。qRT-PCR 检测肌成纤维细胞标志物 α -SMA 及细胞外基质相关基因 *Collagen III* mRNA 的表达 (图 6-E), 结果显示, 与对照组比较, 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 肉桂酸组 α -SMA、*Collagen III* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001)。

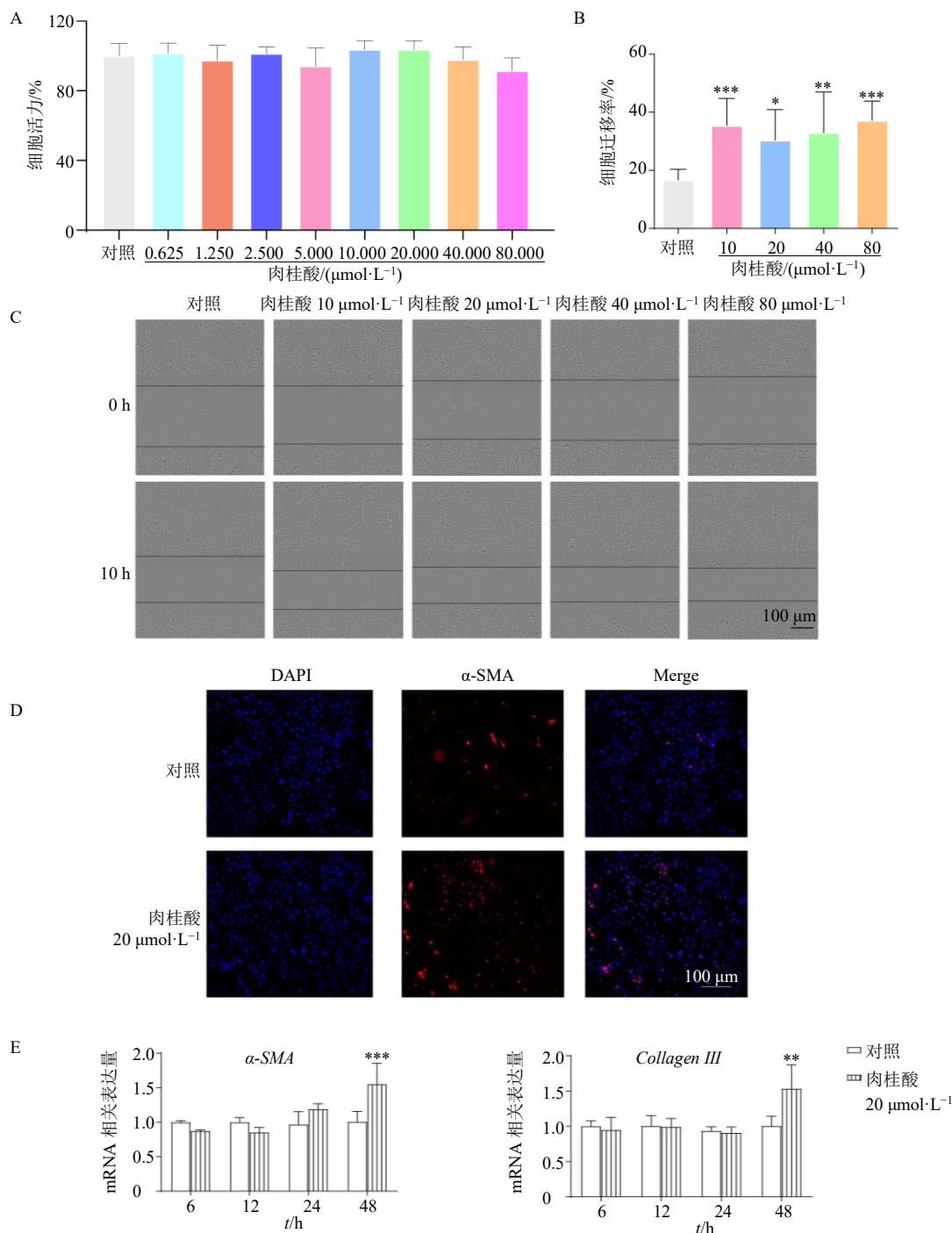


A-MTS 检测不同浓度肉桂酸对 HUVECs 细胞活力影响; B、C-迁移实验; D-各组成管情况及成管情况的定量测量; 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

A-effects of different concentrations of cinnamic acid on viability of HUVECs cells detected by MTS; B, C-migration test; D-quantitative measurement of condition of each component tube and its formation; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 5 肉桂酸对 HUVECs 管状形成和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of cinnamic acid on tube formation and migration of HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-MTS 检测不同浓度肉桂酸对 NIH-3T3 细胞活力的影响; B、C-细胞迁移实验; D- α -SMA 荧光蛋白强度 ($\times 200$); E- α -SMA、Collagen III mRNA 表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-effects of different concentrations of cinnamic acid on viability of NIH-3T3 cells detected by MTS; B, C-cell migration experiment; D- α -SMA fluorescence protein intensity ($\times 200$); E- α -SMA and Collagen III mRNA expressions; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

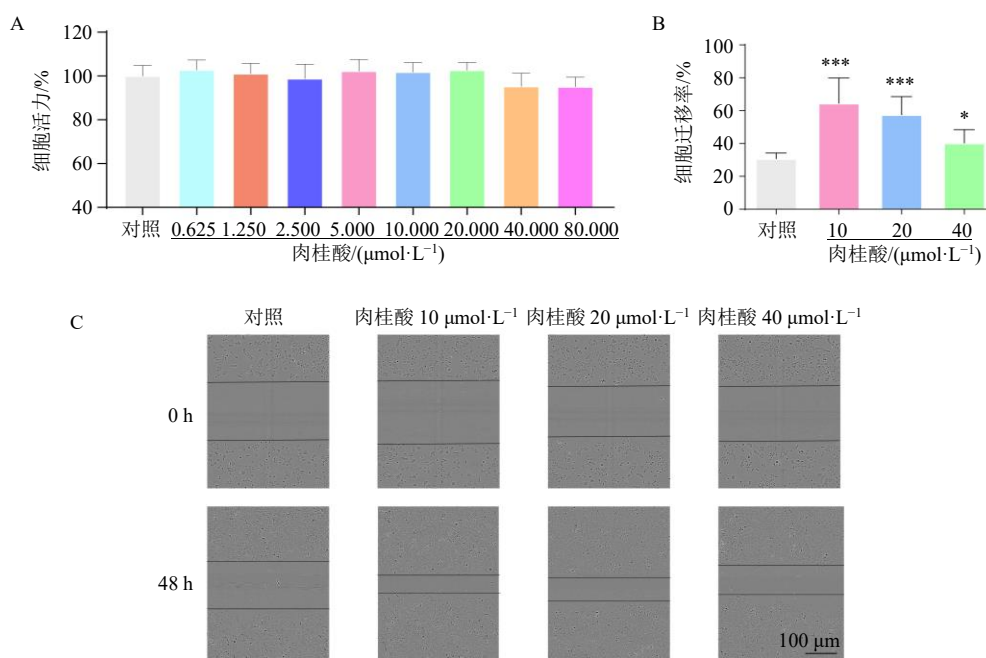
图 6 肉桂酸对 NIH-3T3 细胞迁移及 α -SMA、Collagen III 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of cinnamic acid on migration and expressions of α -SMA and Collagen III of NIH-3T3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 肉桂酸增加糖尿病创面的再上皮化

采用划痕实验观察肉桂酸对 HaCaT 细胞的迁移能力的影响,如图 7-A 所示,肉桂酸 (0.625~80 $\mu\text{mol/L}$) 对 HaCaT 细胞活力无明显影响。如图 7-

B、C 所示,与对照组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 肉桂酸处理 HaCaT 细胞 48 h 后,细胞迁移率均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001),表明肉桂酸可刺激 HaCaT 细胞迁移。



A-MTS 检测不同浓度肉桂酸对角质细胞活力影响；B、C-细胞迁移实验；与对照组比较：* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

A-effects of different concentrations of cinnamic acid on keratinocyte viability detected by MTS; B, C-cell migration test; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 肉桂酸对 HaCaT 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of cinnamic acid on migration of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

在健康个体中，正常的伤口愈合是一个复杂的生物学过程，包括凝血期、炎症期、增殖期和重塑期 4 个阶段^[9]。不同的细胞类型、生长因子和细胞因子在创口愈合各个阶段发挥重要作用。在创面形成后，血小板释放生长因子将白细胞招募至受损区域，引发伤口愈合的炎症期^[10]。在炎症后期单核细胞分化为巨噬细胞，启动伤口愈合的增殖阶段，促进创伤修复细胞（包括内皮细胞、成纤维细胞和角质形成细胞）迁移、增殖和分化，这些细胞负责血管生成、肉芽组织形成、细胞外基质沉积、伤口收缩和再上皮化等过程^[11-12]。在创面愈合的重塑期，参与增殖期的细胞凋亡，留下一个成熟的、基本无血管的、细胞较少的环境。而在糖尿病患者体内，过度炎症、内皮细胞和成纤维细胞功能障碍导致血管生成和胶原合成受阻、再上皮化延迟等，最终导致创面愈合延迟或不愈^[4]。

本研究通过建立 db/db 小鼠切除创面夹板模型，对肉桂酸是否影响糖尿病后创面愈合进行研究。结果显示，给予肉桂酸 16 d 后，糖尿病小鼠体质量及血糖浓度与造模前相比均无显著变化。与对照组

比较，造模第 12 天时，肉桂酸组小鼠创面愈合加快，HE 染色和 Masson 染色也显示创面肉芽组织和胶原蛋白沉积明显增加，表明肉桂酸可促进创面修复但对血糖浓度无影响，其可能是治疗糖尿病引起的慢性伤口愈合的有效药物。

在创口愈合的炎症期，糖尿病创面炎症反应的延迟和失调是导致糖尿病后创面愈合延迟甚至不愈的主要原因之一^[13]。过度的炎症反应会导致巨噬细胞表型转化紊乱，使炎症反应早期 M1 型巨噬细胞释放促炎因子增多，延缓皮肤愈合^[14]。本研究通过建立 AGEs 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型，进一步分析巨噬细胞极化情况。结果显示，肉桂酸可以减少巨噬细胞促炎因子表达，缓解体外 M1 型巨噬细胞过度极化。进一步证明肉桂酸可减轻过度炎症并缩短炎症持续时间，促进糖尿病创口愈合。

血管生成是伤口愈合的另一个重要因素，血管为伤口部位提供充足的氧气和营养物质以供组织生成。与正常皮肤创面愈合过程相比，糖尿病创面由于长期高糖的不良刺激，导致血管受损和创面愈合延迟，进而导致血管生成因子分泌、内皮细胞迁移或增殖和再上皮化减少^[15-16]。体外实验结果显示，

与对照组比较,肉桂酸能促进 HUVECs 的迁移和成管。体内研究进一步证明,肉桂酸可显著改善糖尿病创面的新生血管形成,最终促进糖尿病创面愈合。

成纤维细胞是伤口肉芽组织中发现的主要细胞,负责胶原蛋白合成和细胞外基质沉积^[17]。在伤口愈合增殖期,成纤维细胞从稳态进入激活状态,其迁移能力显著加强并分化出肌成纤维细胞,具有更强收缩特性的肌成纤维细胞能更快地合成细胞外基质从而加速伤口闭合^[18-19]。成纤维细胞向肌成纤维细胞表型变化的实质是成纤维细胞内转录并合成 α -SMA^[20],其是肌成纤维细胞的特征标记物,可调节细胞外基质并促进损伤后的物理组织完整性。胶原蛋白和纤维连接蛋白是细胞外基质的重要组成部分,有助于肉芽组织的完整性和输送生长因子^[21]。本研究结果表明,肉桂酸处理可促进 db/db 小鼠伤口愈合,增加胶原蛋白生成;肉桂酸能够刺激 NIH/3T3 细胞迁移和肌成纤维细胞分化。同时,肉桂酸可显著上调参与胶原蛋白形成的相关基因(Collagen III、 α -SMA)表达。

在创面愈合过程中,角化细胞在伤口上增殖和迁移以进行再上皮化和大量肉芽组织的形成是评估伤口愈合成功的关键早期标志^[22]。本研究结果显示,肉桂酸在体外能够促进 HaCaT 细胞的迁移能力,并在体内促进了创伤后第 16 天伤口的再上皮化过程(图 8)。

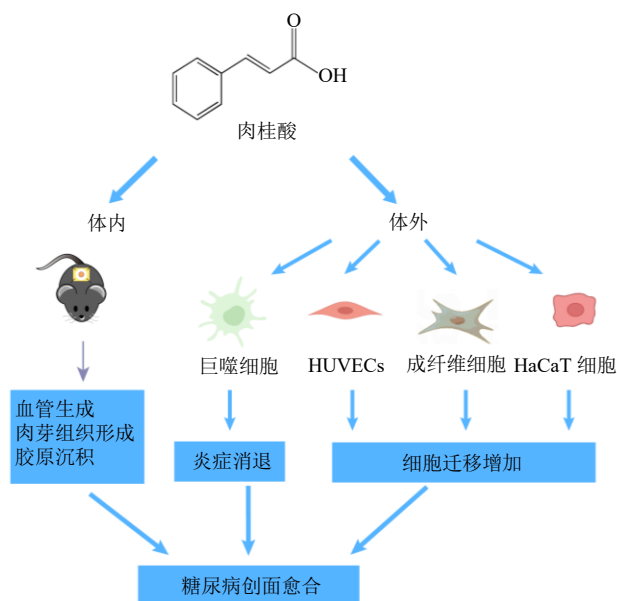


图 8 肉桂酸通过促进创口修复细胞迁移促进糖尿病小鼠创面愈合

Fig. 8 Cinnamic acid promotes wound healing in diabetic mice by promoting wound repair cell migration

糖尿病导致的创面修复是一个多因素参与的过程,本研究发现肉桂酸具有显著的促糖尿病创面修复作用,其机制可能与抑制炎症因子释放,促进创伤修复细胞迁移,促进创面细胞外基质生成、周围新生毛细血管形成和上皮化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ogurtsova K, Guariguata L, Barengo N C, *et al.* IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109118.
- [2] Collaborators G 2 D. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet*, 2023, 402(10397): 203-234.
- [3] Armstrong D G, Boulton A J M, Bus S A. Diabetic foot ulcers and their recurrence [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(24): 2367-2375.
- [4] 向鹏君, 季晖, 顾铭, 等. 糖尿病创面的炎症机制研究进展 [J]. *药学研究*, 2017, 36(11): 667-670.
- [5] 张帅. 糖尿病足溃疡治疗研究进展 [J]. *中国城乡企业卫生*, 2022, 37(2): 61-64.
- [6] 赵丹, 王明慧, 张程斐, 等. 肉桂酸对 db/db 小鼠肝脏 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路的影响 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(10): 3613-3620.
- [7] Viana R D S, Aquino F L T, Barreto E. Effect of *trans*-cinnamic acid and *p*-coumaric acid on fibroblast motility: A pilot comparative study of *in silico* lipophilicity measure [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(24): 5872-5878.
- [8] Choi D Y, Baek Y H, Huh J E, *et al.* Stimulatory effect of *Cinnamomum cassia* and cinnamic acid on angiogenesis through up-regulation of VEGF and Flk-1/KDR expression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(7/8): 959-967.
- [9] 刘永姝, 李新, 韩梁, 等. “伤科要药”三七在骨伤与创伤中的研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(5): 1738-1750.
- [10] Robson M C, Steed D L, Franz M G. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories [J]. *Curr Probl Surg*, 2001, 38(2): 72-140.
- [11] da Silva L, Carvalho E, Cruz M T. Role of neuropeptides in skin inflammation and its involvement in diabetic wound healing [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(10): 1427-1439.
- [12] Kim S K, Lee K J, Hahm J R, *et al.* Clinical significance of the presence of autonomic and vestibular dysfunction in diabetic patients with peripheral neuropathy [J]. *Diabetes Metab J*, 2012, 36(1): 64.

- [13] Tsai C F, Chen G W, Chen Y C, *et al.* Regulatory effects of quercetin on M1/M2 macrophage polarization and oxidative/antioxidative balance [J]. *Nutrients*, 2021, 14(1): 67.
- [14] Zhou X J, Brown B A, Siegel A P, *et al.* Exosome-mediated crosstalk between keratinocytes and macrophages in cutaneous wound healing [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 12732-12748.
- [15] Moura L I F, Dias A M A, Carvalho E, *et al.* Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment: A review [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(7): 7093-7114.
- [16] Chen H, Guo L, Wicks J, *et al.* Quickly promoting angiogenesis by using a DFO-loaded photo-crosslinked gelatin hydrogel for diabetic skin regeneration [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(21): 3770-3781.
- [17] Mansbridge J N, Liu K, Pinney R E, *et al.* Growth factors secreted by fibroblasts: Role in healing diabetic foot ulcers [J]. *Diabetes Obes Metab*, 1999, 1(5): 265-279.
- [18] Lee H J, Jang Y J. Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 711.
- [19] Eming S A, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(265): 265.
- [20] Huang J W, Heng S J, Zhang W L, *et al.* Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 128: 137-144.
- [21] Hamed S, Ullmann Y, Egozi D, *et al.* Fibronectin potentiates topical erythropoietin-induced wound repair in diabetic mice [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(6): 1365-1374.
- [22] Zhang E, Gao B, Yang L, *et al.* Notoginsenoside Ft1 promotes fibroblast proliferation via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and benefits wound healing in genetically diabetic mice [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356(2): 324-332.

[责任编辑 李亚楠]