

## · 基础研究 ·

## 绿茶多酚表没食子儿茶素没食子酸酯对高脂高糖饮食诱导肥胖小鼠伤口愈合的影响

宁永玲<sup>1,2</sup> 沃达<sup>3</sup> 袁志莹<sup>1</sup> 何嘉<sup>1</sup> 马恩<sup>4</sup> 彭军<sup>1,2</sup> 朱伟东<sup>3</sup> 任丹妮<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 评估绿茶多酚表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 全身性给药对高脂高糖饮食 (HFFD) 诱导的肥胖小鼠伤口愈合障碍的干预效果。方法 7~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠经 60 kcal% 高脂饲料和 20% 果糖水持续饲养 10 周后成为肥胖小鼠, 周龄及相关条件具有可比性的正常饮食组小鼠为对照。在小鼠尾部进行全层切除伤口造模后, 每天腹腔注射 EGCG 进行干预, 连续给药 21 天。在第 0、3、7、14、21 天时测量小鼠体重, 并对伤口部位进行拍照记录。干预完成后, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察小鼠伤口新生皮肤组织形态学; 蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测小鼠皮肤组织中 DNA 双链断裂 (DSB) 特异性生物标志物磷酸化组蛋白 H2AX ( $\gamma$ -H2AX) 的表达水平。结果 与正常饮食组小鼠比较, HFFD 肥胖小鼠体重增重  $>30\%$  ( $P<0.01$ ), 皮肤组织中  $\gamma$ -H2AX 表达上调 ( $P<0.05$ ), 14 天时, 模型组伤口面积为正常饮食组的 1.97 倍; 21 天时, 模型组伤口面积为正常饮食组的 4.49 倍, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。正常饮食小鼠伤口部位新生皮肤可以重新形成完整的表皮细胞层, 肥胖小鼠则表皮细胞过度增殖, 基底细胞和颗粒层细胞分布不典型, 角质层变薄。腹腔注射 EGCG 可使肥胖小鼠皮肤组织中  $\gamma$ -H2AX 表达下调 ( $P<0.05$ )。与模型组小鼠比较, 肥胖小鼠经 EGCG 5.0、10.0 mg/kg 干预后, 21 天时, 中剂量组伤口面积为模型组的 0.32 倍; 高剂量组伤口面积为模型组的 0.13 倍, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 伤口新生皮肤表皮细胞层结构与正常饮食小鼠相似。结论 EGCG 可降低高脂高糖饮食诱导的肥胖小鼠体内 DNA 损伤, 促进伤口愈合及皮肤组织结构重塑, 但机制还有待深入研究。

**关键词** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 肥胖小鼠; 伤口愈合; 高脂高糖饮食; 磷酸化组蛋白 H2AX

**Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Improves Wound Healing in Obese Mice Fed with High-fat High-fructose Diet**

NING Yong-ling<sup>1,2</sup>, WO Da<sup>3</sup>, YUAN Zhi-ying<sup>1</sup>, HE Jia<sup>1</sup>, MA En<sup>4</sup>, PENG Jun<sup>1,2</sup>, ZHU Wei-dong<sup>3</sup>, and REN Dan-ni<sup>1,2</sup> 1 Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 2 Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou (350122); 3 Innovation and Transformation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 4 Tongji University School of Medicine, Shanghai (200092)

**ABSTRACT Objective** To evaluate the effect of systemic epigallocatechin gallate (EGCG) administration on impeded wound healing response in obese mice fed with high-fat high-fructose diet (HFFD).

**Methods** Obesity model was induced in 7- to 8-week-old male C57BL/6J mice fed with HFFD containing high-fat chow (60 kcal% from fat) supplemented with 20% fructose dissolved in drinking water for 10 weeks. Age-matched mice fed a normal diet were used as the control. Mice full-thickness wound-healing models were performed on the dorsal aspect of mice tails, and subsequently injected with either EGCG or deionized water (i.p. daily) for 21

基金项目: 福建中医药大学高层次人才科研项目 (No. X2019001- 人才; No. X2021001- 人才; No. X2021002- 人才; No. X2021003- 人才); 福建中医药大学青年科研拔尖人才项目 (No. XQB202201)

作者单位: 1. 福建中医药大学中西医结合研究院 (福州 350122); 2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室 (福州 350122); 3. 福建中医药大学科技创新与转化中心 (福州 350122); 4. 同济大学医学院 (上海 200092)

通讯作者: 任丹妮, Tel: 0591-22861157, E-mail: danny1217@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220601.146

successive days. Mice body weight and degree of wound-healing were measured and photographed on days 0, 3, 7, 14, and 21. On day 21, hematoxylin & eosin (HE) staining was used to observe the morphology of newly formed skin tissues at the wound site, and Western Blot analysis was used to detect the expression of DNA double-strand breaks (DSB) in the mice skin tissue via the specific biomarker  $\gamma$ -H2AX. **Results** Compared with mice fed a normal diet, the body weight of HFFD-fed obese mouse increased for more than 30% ( $P<0.01$ ).  $\gamma$ -H2AX expression of the skin tissue was significantly up-regulated ( $P<0.05$ ) in obese mice. The wound area of the model group was 1.97 times that of the control group on day 14 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The wound area of the model group was 4.49 times that of the control group on day 21 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). By day 21 post-wound, mice fed a normal diet had completely recovered epidermis surrounding the newly formed skin tissues at the wound site, while HFFD-fed obese mice had significantly impaired wound-healing response characterized by excessive proliferation of epidermal cells, no typical basal and granular layers, and thinner stratum corneum. Notably, mice intraperitoneal injected with EGCG significantly reduced the level of  $\gamma$ -H2AX expression in the skin tissues of obese mice ( $P<0.05$ ). After intervened by EGCG at 5 and 10 mg/kg respectively, the wound area of the middle-dose group was 0.32 times that of the model group, and the wound area of the high-dose group was 0.13 times that of the model group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The structure of the epidermal cell layer of the wound neonatal skin was similar to that of the normal diet mice. **Conclusions** Systemic administration of EGCG reduced DNA damage, promoted wound-healing response and skin tissue remodeling in HFFD-fed obese mice. However, the mechanism remains to be further studied.

**KEYWORDS** epigallocatechin gallate; obese mouse; wound healing; high-fat high-fructose diet;  $\gamma$ -H2AX

《临证指南医案·卷五·湿》<sup>[1]</sup>提到：“湿从内生，必其人膏粱酒醴过度，或嗜饮茶汤太多，或食生冷瓜果及甜腻之物。其人色白而肥，肌肉柔软”，指出饮食结构偏肥甘厚味，或饮食过度，超出身体代谢所需，日久就会形成肥胖。随着现代生活水平不断提高，食物已偏向于以高糖、高脂肪、高热量为主的膳食结构，极易引起营养过剩，导致当前肥胖发病率逐年升高，已然成为世界性的公共卫生问题。值得重视的是，肥胖不仅是一种疾病，而且也是一种危害人类健康的危险因素。近年来，多项研究表明，肥胖症的发生通常会伴随全身性的氧化应激状态，进而引起细胞 DNA 损伤，导致细胞功能异常，影响多个生理过程，比如可能发生皮肤组织结构重塑障碍等<sup>[2-4]</sup>。

表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 占 50%~80%，是生理活性最强的绿茶茶多酚成分。研究发现，EGCG 局部用药可以通过调节中性粒细胞、巨噬细胞等免疫细胞的募集及极性转换等抑制炎症阶段，促进链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导的 1 型糖尿病模型或瘦素受体缺陷的 2 型糖尿病模型等伤口愈合<sup>[5-9]</sup>。但是，EGCG 能否改善高热量饮食自然诱导的肥胖模型的伤口愈合障碍问题，尚未有研究报道。本研究拟使用高脂高糖饮食诱导 C57BL/6J 肥胖小鼠为动物模型，采用尾部全层切除伤口造模方式和腹腔注射方式，评估全身性给药 EGCG 对肥胖小鼠伤口愈合障碍的治疗

效果，现报告如下。

## 材料与方法

1 动物 C57BL/6J 小鼠 41 只，雄性，体重 ( $20 \pm 2$ ) g，7~8 周龄，购买于上海斯莱克实验动物责任公司，生产许可证号：SCXK (沪) 2018-0016。小鼠饲养于福建中医药大学动物中心，许可证号：FJTICM IACUC 2019040。饲养环境为 ( $25 \pm 1$ ) °C，相对湿度 ( $55 \pm 5$ ) %，12h/12h 光照黑暗循环。该实验已通过福建中医药大学动物实验伦理会审查 (No. 2020-052)，符合实验动物伦理委员会相关指导原则。

2 药物 EGCG 购自美国 Selleck 公司，货号：S2250，批号：S225006，100 mg/支，纯度 99.68%。使用无菌去离子水配制 EGCG 储存液 (40 mg/mL)，分装，-80 °C 保存。

3 主要试剂及仪器 60 kcal% 高脂饲料 (含 26.2% 蛋白质，26.3% 碳水化合物，34.9% 脂肪)，美国 Research Diets 公司，货号：D12492，批号：21010504)；D-果糖 (上海麦克林生化科技有限公司，货号：D809612，批号：C12245947)；兔抗磷酸化组蛋白 H2AX ( $\gamma$ -H2AX) 抗体 (美国 Abcam 公司，货号：ab81299，批号：GR3338944-9)；兔抗 H2AX 抗体 (美国 Abcam 公司，货号：ab124781，批号：GR3239191-6)；小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢

酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 60004-1-Ig, 批号: 10020246); 辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Sab 公司, 货号: L3012, 批号: 8715); HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (美国 Sab 公司, 货号: L3032, 批号: 6229); 灵敏化学发光检测试剂盒 (上海百赛生物技术股份有限公司, 货号: S6008L-A, 批号: 210510E3-1); 乙基苯基聚乙二醇 (nonidet P-40, NP-40) 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: N8032, 批号: 20210308)。冰冻切片包埋剂 (optimum cutting temperature compound, OCT) (美国 Sakura 公司, 货号: 4583, 批号: 1783-00); 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1120, 批号: 20210308); 化学发光显影仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: ChemiDoc MP), 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: PowerPac Universal), 光学显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: DMI4000B)。

## 4 方法

### 4.1 分组方法

4.1.1 正常饮食小鼠与肥胖小鼠伤口愈合比较实验 将周龄及饲养环境相同的小鼠分为正常饮食组与模型组, 每组 3 只。

4.1.2 EGCG 干预肥胖小鼠伤口愈合的有效剂量实验 依据文献 [10] 报道, EGCG 20 mg/kg 持续 60 天经腹腔注射 C57BL/6J 小鼠, 未出现明显毒副作用; 2.5 mg/kg 持续给药 14 天可促进 C57BL/6J 小鼠海马神经形成 [11]。分模型组、低剂量组 (2.5 mg/kg)、中剂量组 (5.0 mg/kg) 及高剂量组 (10.0 mg/kg), 每组 5 只。

4.1.3 EGCG 干预肥胖小鼠伤口愈合实验 依据 4.1.2 有效治疗剂量实验的结果, 选择中剂量进行后续实验。分模型组、中剂量组 (5.0 mg/kg)、正常饮食组, 每组 5 只。

### 4.2 造模方法

4.2.1 肥胖小鼠模型 41 只雄性 C57BL/6J 小鼠常规饲养至体重为 (23.0 ± 2.0) g 时, 按体重分为正常饮食组 (8 只) 和肥胖组 (33 只)。正常饮食小鼠继续进行常规饲养, 肥胖小鼠饮食则更换为 60 kcal% 高脂饲料和 20% 果糖水。10 周后, 若肥胖小鼠体重比正常饮食小鼠体重增重 >10 g, 即可认为肥胖模型造模成功 [12]。

4.2.2 伤口造模 41 只小鼠腹腔注射 1.5% 戊巴

比妥钠麻醉, 背部朝上, 四肢用胶带固定。手术刀经消毒后, 从距小鼠尾根部 0.5 cm 处全层刮取 1 cm × 0.3 cm 皮肤组织。伤口造模后, 肥胖小鼠维持高脂高糖饮食。

4.3 干预方法 使用去离子水将 EGCG 储存液稀释至适当浓度后, 根据各组剂量 (2.5、5.0、10.0 mg/kg) 进行腹腔注射 (注射体积为 100 μL), 从伤口造模当天开始直至观察结束, 连续给药 21 天, 每天 1 次。

### 4.4 观察指标及检测方法

4.4.1 伤口面积测量 伤口造模后, 观察期为 21 天。在伤口造模第 0、3、7、14、21 天分别进行数码拍照记录, 以标尺作为参照。使用 Image J 通过伤口边缘测量尚未愈合伤口面积, 再根据每只小鼠造模当天伤口面积进行归一化计算, 用百分比表示, 造模当天为 100% [13]。

4.4.2 体重检测 在伤口造模第 0、7、14、21 天时, 测量小鼠体重。

4.4.3 3 组小鼠皮肤组织  $\gamma$ -H2AX、H2AX 蛋白表达 采用蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测。伤口造模后第 21 天时, 取小鼠皮肤组织。将新鲜皮肤组织在冰上剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右大小, 预冷 PBS 洗涤 1 次。加入 200 μL 含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的 NP40 细胞裂解液, 匀浆, 冰上放置 30 min, 期间剧烈震荡 3 次。13 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 收集上清即得到总蛋白。BCA 法定量检测后, 调整至工作浓度。SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 45 min。兔抗小鼠  $\gamma$ -H2AX、兔抗小鼠 H2AX 或小鼠抗小鼠 GAPDH 一抗 (1: 1 000) 4℃ 摇床孵育过夜, 含 0.1% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液 (TBST) 洗涤 3 次; 山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗 (1: 5 000) 室温摇床孵育 1.5 h, TBST 洗涤 3 次。化学发光法曝光显影, Image J 统计分析灰度值。以 GAPDH 为蛋白质含量归一化内参, 计算各样本目的蛋白的相对含量。蛋白样品重复检测两次。

4.4.4 3 组小鼠伤口愈合部位表皮结构观察 采用 HE 染色检测。伤口造模后第 21 天时, 采集伤口部位新生皮肤组织, 经冰上 OCT 浸泡 2 h 后, 置于液氮上, 速冻 10 min 后, 转移至 -80℃ 保存。待切片时, 提前 30 min 将标本置于冰冻切片机中, 切片厚度为 10 μm。将组织切片放置于室温 30 min 后, 苏木素染色 30 s, 蒸馏水洗涤; 盐酸分化 3 min, 自来水冲洗 2 次, 每次 2 min; 伊红染色 30 s, 蒸馏水

洗涤;脱水:75%乙醇,3 s;85%乙醇,3 s;95%乙醇,3 s;无水乙醇,3 s;无水乙醇,1 min;二甲苯 1 min,2 次;中性树胶封片。光学显微镜拍照。

4.5 统计学方法 应用 Prism 7.0 统计软件对数据进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 或 SNK 分析,两组间比较采用成组或配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 2 组小鼠体重比较(表 1) 与正常饮食组比较,经高脂高糖饮食喂食 10 周后,模型组小鼠体重增重  $>30\%$ ,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

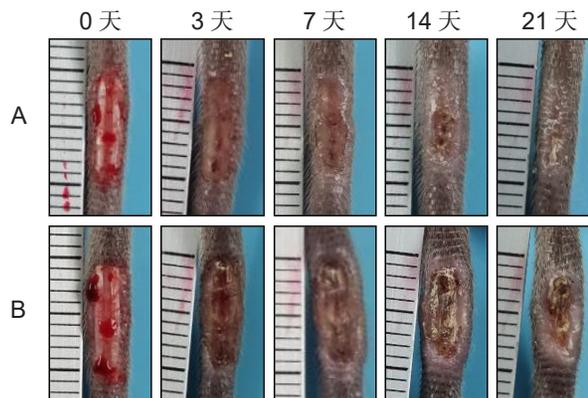
表 1 2 组小鼠体重比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	体重
正常饮食	3	0 周	24.57 ± 0.80
		10 周	32.23 ± 1.19
模型	3	0 周	24.47 ± 0.76
		10 周	42.98 ± 2.53*

注:与正常饮食组比较,\* $P < 0.01$

2 2 组小鼠愈合情况、伤口面积比较(图 1,表 2) 与干预前比较,正常饮食组伤口面积在 3、7、14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),模型组伤口面积在 21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与干预 3 天比较,正常饮食组伤口面积在 14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),模型组伤口面积在 21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与干预 7 天比较,正常饮食组伤口面积在 14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与干预 14 天比较,正常饮食组伤口面积在 21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。14 天时,模型组伤口面积为正常饮食组的 1.97 倍;21 天时,模型组伤口面积为正常饮食组的 4.49 倍,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

3 4 组小鼠伤口愈合情况、伤口面积及体重比较(图 2,表 3、4) 与干预前比较,低剂量组伤口面积在 3、7、14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),中、高剂量组伤口面积在 14、21 天



注:A 为正常饮食组;B 为模型组

图 1 2 组小鼠各时间段伤口愈合比较

时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。分别与干预 3、7 天比较,中、高剂量组伤口面积在 14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),模型组、低剂量组伤口面积在 21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与干预 14 天比较,4 组伤口面积在 21 天时差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。14 天时,中剂量组伤口面积为低剂量组的 0.59 倍,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。21 天时,中剂量组伤口面积为模型组的 0.32 倍;高剂量组伤口面积为模型组的 0.13 倍,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。经 EGCG 干预 21 天后小鼠体重已回升,与干预前比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );模型组小鼠体重较干预前仍未开始恢复 ( $P < 0.01$ )。

4 3 组小鼠伤口愈合情况、伤口面积及体重比较

表 3 4 组小鼠干预前后体重变化比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间	体重
模型	5	干预前	43.34 ± 3.83
		干预 21 天	40.34 ± 3.77*
低剂量	5	干预前	42.56 ± 2.33
		干预 21 天	39.16 ± 3.20
中剂量	5	干预前	42.68 ± 2.35
		干预 21 天	41.70 ± 1.90
高剂量	5	干预前	43.03 ± 1.49
		干预 21 天	41.23 ± 2.58

注:本组干预前比较,\* $P < 0.01$

表 2 2 组小鼠伤口面积比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

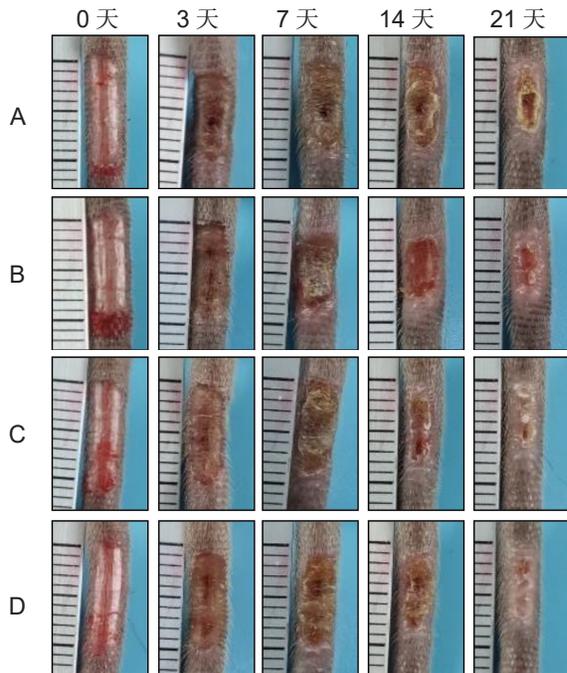
组别	n	伤口面积				
		0 天	3 天	7 天	14 天	21 天
正常饮食	3	100	83.47 ± 6.30*	72.77 ± 5.13*	38.26 ± 7.84**△△▲	10.74 ± 2.89**△△▲
模型	3	100	90.67 ± 4.55	82.95 ± 18.61	75.32 ± 16.21●	48.24 ± 11.33**●●

注:与本组干预前比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与本组 3 天比较,△ $P < 0.05$ ,△△ $P < 0.01$ ;与本组 7 天比较,▲ $P < 0.01$ ;与本组 14 天比较,○ $P < 0.01$ ;与正常饮食组同期比较,● $P < 0.05$ ,●● $P < 0.01$

表 4 4 组小鼠伤口面积比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	伤口面积				
		0 天	3 天	7 天	14 天	21 天
模型	5	100	80.49 ± 7.93*	73.16 ± 8.16*	64.05 ± 12.18*	31.69 ± 9.96* <sup>△▲○</sup>
低剂量	5	100	79.71 ± 5.33*	77.81 ± 6.04*	67.79 ± 7.75*	25.78 ± 11.93* <sup>△▲○</sup>
中剂量	5	100	90.10 ± 12.64	86.56 ± 7.07	40.00 ± 11.69* <sup>△▲☆</sup>	10.06 ± 15.49* <sup>△▲○●</sup>
高剂量	5	100	87.17 ± 12.33	88.60 ± 8.79	52.34 ± 23.66* <sup>△▲</sup>	4.14 ± 5.27* <sup>△▲○●●</sup>

注: 与本组干预前比较, \* $P < 0.05$ ; 与本组 3 天比较, <sup>△</sup> $P < 0.01$ ; 与本组 7 天比较, <sup>▲</sup> $P < 0.01$ ; 与本组 14 天比较, <sup>○</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组同期比较, <sup>●</sup> $P < 0.05$ , <sup>●●</sup> $P < 0.01$ ; 与低剂量同期比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$



注: A 为模型组; B 为低剂量组; C 为中剂量组; D 为高剂量组

图 2 EGCG 改善肥胖小鼠伤口愈合情况比较

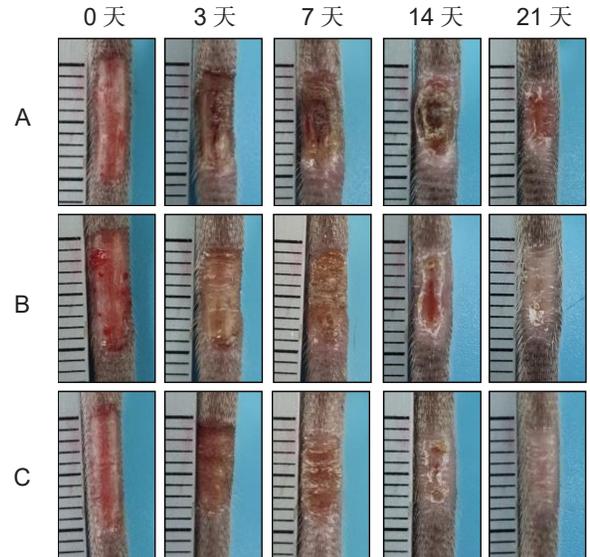
(图 3, 表 5、6) 与干预前比较, 正常饮食、中剂量组伤口面积在 3、7、14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 模型组伤口面积在 14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与干预 3 天比较, 3 组伤口面积在 14、21 天时差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与干预 7 天比较, 正常饮食、中剂量组伤口面积在 14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 模型组伤口面积在 21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与干预 14 天比较, 模型、中剂量组伤口面积在

21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

21 天时, 模型组伤口面积为正常饮食组的 2.44 倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 中剂量组伤口面积为正常饮食组的 1.22 倍, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与干预前比较, 正常饮食组体重在 14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 模型组体重在 7、14、21 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 中剂量组体重在 7、14 天时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。21 天时, 中剂量组体重已恢复至创伤前, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 5 3 组小鼠伤口皮肤组织结构重塑功能比较 (图 4)

21 天时, 正常饮食组伤口部位皮肤重新形成完整的



注: A 为模型组; B 为中剂量组; C 为正常饮食组

图 3 肥胖小鼠经 EGCG 干预后伤口愈合与正常饮食小鼠比较

表 5 3 组小鼠伤口面积比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	伤口面积				
		0 天	3 天	7 天	14 天	21 天
正常饮食	5	100	87.90 ± 8.01*	70.40 ± 10.41*	38.02 ± 25.20* <sup>▲</sup>	8.63 ± 10.15* <sup>△▲</sup>
模型	5	100	87.82 ± 8.60	83.68 ± 10.51	68.15 ± 13.68* <sup>△</sup>	21.03 ± 5.07* <sup>△▲○●</sup>
中剂量	5	100	81.33 ± 6.29*	75.25 ± 9.25*	44.48 ± 14.24* <sup>△▲</sup>	10.54 ± 8.79* <sup>△▲○</sup>

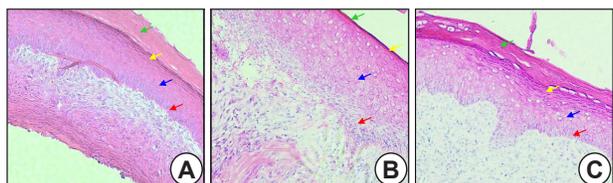
注: 与本组干预前比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与本组 3 天比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与本组 7 天比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与本组 14 天比较, <sup>○</sup> $P < 0.01$ ; 与正常饮食组同期比较, <sup>●</sup> $P < 0.05$

表 6 3 组小鼠体重变化比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	体重			
		0 天	7 天	14 天	21 天
正常饮食	5	31.70 ± 1.49	31.16 ± 1.41	30.92 ± 1.57**	30.54 ± 1.74**
模型	5	43.24 ± 2.90	41.14 ± 3.69*	40.52 ± 3.94*	41.48 ± 3.46*
中剂量	5	43.06 ± 2.92	41.18 ± 2.63**	40.80 ± 2.48**	43.18 ± 2.78

注: 与本组干预前比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

表皮层, 从内到外分别为栅栏状排列的基底层 (红色箭头)、棘层 (蓝色箭头)、平行排列的颗粒层 (黄色箭头) 和角质层 (绿色箭头)。模型组组织形态学改变明显, 表皮细胞层排列紊乱, 表现为表皮细胞过度增殖, 基底层细胞层数增多, 栅栏状排列消失, 棘细胞层增厚, 颗粒层变薄或消失, 角质层变薄。中剂量组表皮细胞层分布接近正常饮食组。



注: A 为正常饮食组; B 为模型组; C 为中剂量组; 红色箭头表示基底层; 蓝色箭头表示棘层; 黄色箭头表示颗粒层; 绿色箭头表示角质层

图 4 3 组小鼠伤口新生组织结构形态学 (HE,  $\times 200$ )

6 3 组小鼠皮肤组织中  $\gamma$ -H2AX 表达水平比较 (图 5, 表 7) 与正常饮食组比较, 模型组皮肤组织中 DNA 双链断裂标志蛋白  $\gamma$ -H2AX 表达上调 ( $P < 0.05$ ), 而 EGCG (5.0 mg/kg) 干预可降低  $\gamma$ -H2AX、H2AX 的表达 ( $P < 0.05$ )。

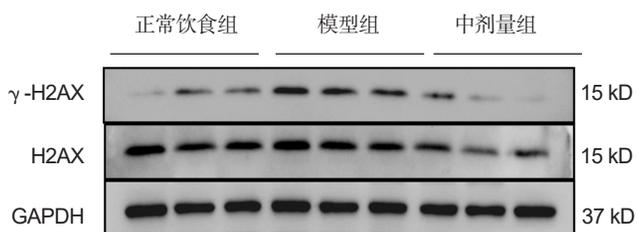


图 5 3 组小鼠皮肤组织中  $\gamma$ -H2AX、H2AX 表达电泳图

表 7 3 组小鼠  $\gamma$ -H2AX、H2AX 相对表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$\gamma$ -H2AX/GAPDH	H2AX/GAPDH
正常饮食	3	0.26 ± 0.17	0.62 ± 0.07
模型	3	0.57 ± 0.03*	0.59 ± 0.06
中剂量	3	0.17 ± 0.19 <sup>△</sup>	0.39 ± 0.10 <sup>△</sup>

注: 与正常饮食组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$

### 讨 论

皮肤伤口愈合对于机体的安全和存活至关重要, 其过程涉及细胞内和细胞间的多种信号传导途径以及

不同细胞成分和细胞外基质之间的复杂相互作用<sup>[14]</sup>。为了高效寻找改善伤口愈合的药物, 适当的动物模型对于临床转化具有重要的现实意义。对此, 学者已开发出多种动物模型用于临床前实验, 比如 STZ 诱导的 1 型糖尿病模型或瘦素受体缺陷的 2 型糖尿病模型等都可以发生伤口愈合延滞, 但还是不能很好的模拟自然发生的疾病微环境<sup>[15]</sup>。此外, 小鼠背部皮肤表皮结构与人皮肤组织的多层表皮结构大相径庭, 其愈合主要原理有所不同。人皮肤伤口愈合主要依赖于表皮细胞的爬行和增殖, 而小鼠背部皮肤切除造模的伤口愈合 90% 以上归因于皮肤收缩<sup>[16]</sup>。使用夹板环固定伤口周围可以防止皮肤皱缩, 但同时又不可避免的新增了变量因素<sup>[17]</sup>。通过形态学观察可知, 小鼠尾部表皮细胞结构与人体皮肤表皮结构最为相似<sup>[13, 18]</sup>。本实验模拟现代社会的高热量膳食结构, 使用高脂高糖饮食诱导自然肥胖小鼠, 并在尾部进行全层切除伤口造模, 发现创伤后小鼠体重在 7 天内迅速下降, 伤口愈合出现显著延滞, 21 天尚不能完全愈合, 非常适合用于伤口愈合障碍的实验研究和药物筛选。

EGCG 作为一种植物来源的天然活性化合物, 已应用于治疗肿瘤及心血管疾病等的临床试验研究<sup>[19, 20]</sup>。在伤口愈合方面, EGCG 作为外敷药物业已开展广泛研究<sup>[6]</sup>。有研究表明, 室温情况下, EGCG 在 pH>6.0 时会迅速降解<sup>[21]</sup>, 但是伤口部位通常呈碱性环境, 因此 EGCG 外用需要使用纳米等高分子材料以稳定其结构<sup>[22]</sup>, 增加成药成本, 存在一定的局限性。同时, 考虑到肥胖是一种系统性疾病, 而并非一种单一症状。因此, 肥胖小鼠全身性给药显得更为合理, 不仅可以增加 EGCG 的生物利用度, 还可以调节肥胖小鼠机体整体状态, 也符合中医治疗的整体观念。本研究结果表明, 腹腔注射 EGCG 可以有效改善肥胖小鼠伤口愈合。此外, 创伤是一种局部损伤, 同时属于消耗性病症, 会引发全身代谢反应。创伤后 2~5 天内蛋白质分解加速, 其中消耗最多的是骨骼肌, 进而导致机体消瘦<sup>[23]</sup>。创伤 3~12 周后, 创伤反应从分解代谢逐渐转入合成代谢, 体重与体力得到恢复, 创口也开始获得抗张力, 这些均是机体创伤后全面康复的预兆<sup>[24]</sup>。本研究显示小鼠经 EGCG 干预后体重可以快速回升至创伤前, 从另一层面提示了 EGCG 对肥胖小鼠创伤修复具有积极的促进作用。

现代学者通过临床流行病学调查发现, 痰湿体质与肥胖密切相关, 生活习惯、体型、饮食等都会影响痰湿体质形成。而饮食偏食导致的痰湿, 主要在于好

食膏粱厚味、喜食黏腻之物等<sup>[25]</sup>。研究表明,痰湿体质未病人群会表现出明显的氧化应激现象<sup>[26]</sup>。在此状态下,因氧化还原失衡而产生过多的自由基具有高度反应性,会直接引起 DNA 的氧化损伤,导致组织修复功能紊乱。DNA 双链断裂 (DNA double strand break, DSB) 是极为严重的 DNA 损伤形式,其数量与  $\gamma$ -H2AX 表达水平呈对应关系<sup>[27, 28]</sup>。本研究发现肥胖小鼠皮肤组织中  $\gamma$ -H2AX 升高,这可能与痰湿体质肥胖引起的氧化应激状态有关<sup>[29]</sup>。最近研究表明, DNA 损伤会引起成纤维细胞形成核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体,大量产生 IL-1 $\beta$ ,进而导致表皮细胞过度增殖和分化缺陷<sup>[30]</sup>。曾有研究报道,糖尿病患者伤口边缘表皮细胞增殖异常活跃,而迁移能力和分化受到抑制,导致再上皮化过程缓慢<sup>[31, 32]</sup>。使用高脂高糖诱导的肥胖小鼠表皮细胞也出现类似现象,表皮细胞过度增殖且分布紊乱,并抑制分化,导致颗粒层细胞显著减少,角质层变薄,引起伤口愈合障碍。茶叶是一味具有明确疗效的中药,其性寒能清热,味苦能燥湿,具有化痰利湿的功效<sup>[33, 34]</sup>。本研究结果表明,绿茶活性单体 EGCG 可以有效减少肥胖小鼠皮肤组织中 DSB 发生,促进伤口愈合及组织结构重塑,但其中所涉及的调节信号通路和分子机制还有待进一步验证和深入研究。

综上所述,本研究通过观察皮肤伤口愈合情况、新生皮肤组织结构重塑、体重变化、皮肤 DNA 损伤标记蛋白分子的表达调节等方面,探讨了 EGCG 全身性给药对高脂高糖饮食诱导的肥胖小鼠伤口愈合障碍的治疗作用,为其临床转化和推广应用提供了实验依据。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] 林潼,刘敏. 中医药治疗单纯性肥胖的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27 (6): 1036-1040.
- [2] Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, et al. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (4): 1786-1811.
- [3] Hirt PA, Castillo DE, Yosipovitch G, et al. Skin changes in the obese patient [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2019, 81 (5): 1037-1057.
- [4] Wlodarczyk M, Nowicka G. Obesity, DNA damage, and development of obesity-related diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (5): 1146-1163.
- [5] Zhao XD, Pei DN, Yang YX, et al. Green tea derivative driven smart hydrogels with desired functions for chronic diabetic wound treatment [J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31 (18): 2009442.
- [6] Xu FW, Lv YL, Zhong YF, et al. Beneficial effects of green tea EGCG on skin wound healing: a comprehensive review [J]. *Molecules*, 2021, 26 (20): 6123-6138.
- [7] 张彦,汪天赐,蔡婧,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯促进 2 型糖尿病伤口愈合的实验研究 [J]. *安徽医药*, 2020, 24 (9): 1712-1718.
- [8] Huang YW, Zhu QQ, Yang XY, et al. Wound healing can be improved by (-)-epigallocatechin gallate through targeting Notch in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (1): 953-964.
- [9] 李迎,陈旭东,张天琦,等. Nrf2 激动剂 EGCG 对糖尿病伤口愈合障碍的治疗作用研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36 (8): 923-927.
- [10] Wang Y, Li M, Xu X, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes neural progenitor cell proliferation and sonic hedgehog pathway activation during adult hippocampal neurogenesis [J]. *Mol Nutr Food Re*, 2012, 56 (8): 1292-1303.
- [11] Ortiz-López L, Márquez-Valadez B, Gómez-Sánchez A, et al. Green tea compound epigallocatechin-3-gallate (EGCG) increases neuronal survival in adult hippocampal neurogenesis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Neuroscience*, 2016, 322: 208-220.
- [12] Ishimoto T, Lanasa MA, Rivard CJ, et al. High-fat and high-sucrose (Western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase [J]. *Hepatology*, 2013, 58 (5): 1632-1643.
- [13] Liu N, Matsumura H, Kato T, et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing [J]. *Nature*, 2019, 568 (7752): 344-350.
- [14] Rodrigues M, Kosarić N, Bonham CA, et al. Wound healing: a cellular perspective [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99 (1): 665-706.
- [15] Grada A, Mervis J, Falanga V. Research techniques

- made simple: animal models of wound healing[J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138 ( 10 ): 2095–2105.
- [ 16 ] Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 90 ( 1 ): 3–12.
- [ 17 ] Mascharak S, desJardins-Park HE, Davitt MF, et al. Preventing engrailed-1 activation in fibroblasts yields wound regeneration without scarring[J]. *Science*, 2021, 372 ( 6540 ): eaba2374.
- [ 18 ] Falanga V, Schraye D, Cha J, et al. Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice[J]. *Wound Repair Regen*, 2004, 12 ( 3 ): 320–326.
- [ 19 ] Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, et al. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease[J]. *J Am Coll Nutr*, 2007, 26 ( 2 ): 95–102.
- [ 20 ] Samavat H, Ursin G, Emory TH, et al. A randomized controlled trial of green tea extract supplementation and mammographic density in postmenopausal women at increased risk of breast cancer[J]. *Cancer Prev Res ( Phila )*, 2017, 10 ( 12 ): 710–718.
- [ 21 ] Frasher L, Schielein MC, Tizek L, et al. Great green tea ingredient? A narrative literature review on epigallocatechin gallate and its biophysical properties for topical use in dermatology[J]. *Phytother Res*, 2020, 34 ( 9 ): 2170–2179.
- [ 22 ] Leu JG, Chen SA, Chen HM, et al. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and  $\alpha$ -lipoic acid[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8 ( 5 ): 767–775.
- [ 23 ] 高根五. 创伤的全身反应 [J]. *重庆医药*, 1981, ( 1 ): 1036–1040.
- [ 24 ] 过邦辅. 创伤后的病理生理反应 [J]. *国外医学·创伤与外科基本问题分册*, 1980, ( 1 ): 1–16.
- [ 25 ] 吴鑫鑫. 饮食偏嗜与痰湿体质关系的中医文献研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [ 26 ] 李玲孺, 王济, 李英帅, 等. 氧化应激机制在痰湿体质研究中的应用探索 [J]. *南京中医药大学学报*, 2013, 29 ( 1 ): 5–8.
- [ 27 ] 瞿敏敏, 陈佳, 郭磊, 等. DNA 损伤标志物  $\gamma$ -H2AX 及其在毒性测试应用中的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35 ( 6 ): 401–411.
- [ 28 ] Bourton EC, Plowman PN, Smith D, et al. Prolonged expression of the  $\gamma$ -H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129 ( 12 ): 2928–2934.
- [ 29 ] 李炜娟, 肖元梅. PARP1 在氧化应激诱导的 DNA 损伤及其修复过程中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35 ( 23 ): 6924–6925.
- [ 30 ] Seldin L, Macara IG. DNA damage promotes epithelial hyperplasia and fate mis-specification via fibroblast inflammasome activation[J]. *Dev Cell*, 2020, 55 ( 5 ): 558–573.
- [ 31 ] Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review[J]. *Adv Wound Care ( New Rochelle )*, 2014, 3 ( 7 ): 445–464.
- [ 32 ] Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta - catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167 ( 1 ): 59–69.
- [ 33 ] 何峻, 陈良欣, 王宁, 等. 中医文献视角下的茶叶性味、功效和药方 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 ( 9 ): 5630–5634.
- [ 34 ] 梁木子. 茶叶的体质养生文献研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.

( 收稿: 2022-04-02 在线: 2022-07-06 )

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶