

重度糖尿病足胫骨横向骨搬运术治疗后 创面愈合方式及机制研究

连浩宇¹, 花奇凯², 陈炎², 何立环³, 庄胜², 杨思捷², 李山郎⁴, 镇普祥³, 高伟²,
丁毅², 刘光炜², 聂新宇⁴, 邝晓聪¹

(1. 广西医科大学基础医学院, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530021; 3. 广西医科大学再生医学研究中心, 广西 南宁 530021;
4. 广西生物医药协同创新中心, 广西 南宁 530021)

摘要 目的:探讨重度糖尿病足胫骨横向骨搬运术治疗后创面愈合方式及机制。**方法:**2014 年 12 月至 2018 年 6 月收治 136 例重度糖尿病足患者。按照 Wagner 分级标准, 3 级 66 例、4 级 60 例、5 级 10 例。按照 TEXAS 分级标准, 2B 级 32 例、2C 级 2 例、2D 级 11 例、3B 级 13 例、3D 级 78 例。均采用胫骨横向骨搬运术治疗。对创面愈合过程进行大体观察, 同时分别于术前及术后 1 个月复诊时切取创面边缘组织, HE 染色观察创面组织形态, 免疫组织化学染色观察 Ki-67、CD31 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达情况。**结果:**①创面大体观察结果。术后初期创面处于炎性期, 有炎性细胞浸润, 创面黄白; 随后有新鲜肉芽组织形成, 肉芽组织由创面周围向创面中心移行, 创面红润, 进入增生期; 肉芽组织覆盖创面的过程中, 上皮组织逐渐由创面四周向中心移行, 1~3 个月时创面愈合 50% 左右, 上皮组织最终覆盖创面, 仅留线性瘢痕。②创面组织形态观察结果。术前创面边缘组织表皮结构不完整, 坏死结构较多。术后 1 个月创面边缘组织可清晰地观察到完整表皮结构, 分为角质层、颗粒层、棘层和基底层; 真皮层结缔组织中可观察到血管及胶原纤维, 纤维结构少见。术前、术后创面边缘组织表皮均有大量炎性细胞浸润。③术后 1 个月时, 创面边缘组织中 Ki-67、CD31、VEGF 染色阳性细胞面积百分比均大于术前[(1.850±1.287)%, (7.480±5.272)%, $Z=3.292, P=0.001$]; (0.395±0.139)%, (1.082±0.636)%, $Z=3.403, P=0.001$]; (0.341±0.217)%, (2.428±1.502)%, $Z=3.780, P=0.000$]。**结论:**胫骨横向骨搬运术能有效促进重度糖尿病足创面愈合, 治疗后创面愈合方式为再生愈合, 其机制可能是该手术能促进创面组织细胞增殖与毛细血管再生。

关键词 糖尿病足; 足溃疡; 骨搬运; 临床试验

A study of pattern and mechanism of action of wound healing of severe diabetic foot after treatment with transverse tibial bone transport surgery

LIAN Haoyu¹, HUA Qikai², CHEN Yan², HE Lihuan³, ZHUANG Sheng², YANG Sijie², LI Shanlang⁴, ZHEN Puxiang³, GAO Wei², DING Yi², LIU Guangwei², NIE Xinyu⁴, KUANG Xiacong¹

1. School of Basic Medical Sciences of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China
2. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China
3. Research Center for Regenerative Medicine of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China
4. Guangxi Collaborative Innovation Center for biomedicine, Nanning 530021, Guangxi, China

ABSTRACT Objective: To explore the pattern and mechanism of action of wound healing of severe diabetic foot after treatment with transverse tibial bone transport surgery. **Methods:** One hundred and thirty-six patients with severe diabetic feet were recruited from December 2014 to June 2018. According to the Wagner classification criteria, the diabetic feet belonged to grade 3 (66), 4 (60) and 5 (10). According to the TEXAS classification criteria, the diabetic feet belonged to grade 2B (32), 2C (2), 2D (11), 3B (13) and 3D (78). All patients were treated with transverse tibial bone transport surgery. The roughly observation on wound healing procedure was performed, and the

基金项目: 广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198293); 广西壮族自治区医疗卫生重点学科资助项目(S2017032); 广西生物医药协同创新中心研究生创新创业项目(GCICB-IE-2018007)

通讯作者: 邝晓聪 E-mail: kuangxiacong@gxmu.edu.cn

wound margin biopsies was performed before the surgery and at 1 month after the surgery. The wound tissue morphology and the expressions of Ki-67, CD31 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were observed through HE staining and immunohistochemical staining respectively. **Results:** The results of roughly observation on wound surface showed that (1) the early postoperative wound was in the inflammatory stage, presenting with inflammatory cell infiltration and yellowish-white surface; (2) the fresh granulation tissues formed subsequently and migrated from the periphery to the center of the wound, and the ruddy wound surface demonstrated that the wound entered into the hyperplasia stage; (3) the epithelial tissues gradually migrated from the periphery to the center of the wound when wound surface was covered by granulation tissues; (4) about 50% of wound healed within 1-3 months, and the wound surface was covered by epithelial tissues in the end, only the linear scars were found. The results of histomorphology observation on wound surface showed that (1) the epidermal structures of marginal tissues of wound were incomplete and many necrotic structures were found in wound surface before the surgery; (2) the complete epidermal structures, including cuticle, granular layer, spinous layer and basal layer were found in the marginal tissues of the wound at 1 month after the surgery; (3) the blood vessels and collagen fibers were found within the connective tissues of dermis and less fiber structure was found; (4) a large number of inflammatory cell infiltration was found in the epidermis of marginal tissues of wound surface before and after the surgery. The area percentages of positive Ki-67, CD31 and VEGF staining cells in marginal tissues of wound were higher at 1 month after the surgery compared to pre-surgery (1.850 ± 1.287 vs $7.480 \pm 5.272\%$, $Z = 3.292$, $P = 0.001$; 0.395 ± 0.139 vs $1.082 \pm 0.636\%$, $Z = 3.403$, $P = 0.001$; 0.341 ± 0.217 vs $2.428 \pm 1.502\%$, $Z = 3.780$, $P = 0.000$). **Conclusion:** The transverse tibial bone transport surgery can effectively promote the wound healing of severe diabetic foot by means of regenerative healing, and its mechanisms of action may be that it can promote the cells proliferation and capillary regeneration in wound tissues.

Keywords diabetic foot; foot ulcer; bone transport; clinical trial

糖尿病足主要表现为足部体表溃疡或深部多层组织损伤,常伴有感染,创面复杂,严重的可引起脓毒血症、多器官衰竭等。对于症状较轻的 Wagner 1、2 级糖尿病足^[1],采用外科清创、负压吸引及抗感染等综合治疗^[2-5],创面愈合率较高,但对于 Wagner 3 级以上的重度糖尿病足,采用这些方法治疗后创面愈合多不理想,常发展为慢性难愈性创面,甚至恶化,最终导致截肢^[6-7]。本课题组花奇凯教授利用胫骨横向骨搬运术治疗糖尿病足^[8],在前期治疗的 93 例 Wagner 3 级以上患者中,仅 1 例截肢,创面愈合均较完整。这提示此类创面的愈合过程可能是再生修复,但目前缺乏较为系统的临床研究。为此,我们对重度糖尿病足胫骨横向骨搬运术治疗后创面的愈合过程进行了研究,现总结报告如下。

1 临床资料

以 2014 年 12 月至 2018 年 6 月在广西医科大学第一附属医院骨关节外科住院治疗的 136 例重度糖尿病足患者为研究对象。男 103 例,女 33 例;年龄 32~89 岁,中位数 62 岁;按照 Wagner 分级标准,3 级 66 例、4 级 60 例、5 级 10 例;按照 TEXAS 分级标准^[9],2B 级 32 例、2C 级 2 例、2D 级 11 例、3B 级 13 例、3D 级 78 例。均采用胫骨横向骨搬运术治疗。试验方案经医院医学伦理委员会审查通过。

2 方法

2.1 创面大体观察及组织形态观察 肉眼观察胫骨横向骨搬运术后创面的愈合过程。术前及术后 1 个月复诊时切取创面边缘组织进行组织,用 10% 福尔马林固定、石蜡包埋、切片,分别进行 HE 染色与免疫组织化学染色。将切片常规脱蜡水化后,滴加适量苏木素染液,染色 5 min,水洗 3 次。盐酸酒精分化水洗后于饱和碳酸锂溶液中返蓝并水洗,滴加适量伊红染液染色 30 s,水洗后进行脱水处理,晾干后以中性树脂封片。于 OLYMPUS CX21 显微镜下拍摄 HE 染色图像,用 K-Viewer 软件(KFBIO 公司)对图像处理后进行观察。

2.2 创面组织 Ki-67、CD31、VEGF 表达情况观察

将切片置于 60℃ 恒温箱,20 min 后取出常规脱蜡水化。置于柠檬酸盐缓冲液中,高温高压下进行抗原修复。PBS 洗涤 2 次,每次 3 min。3% 过氧化氢浸泡 10 min, PBS 洗涤 2 次,每次 3 min。以 5%~10% 山羊血清封闭,室温孵育 20 min。甩干后分别滴加鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术公司)、兔抗人 CD31 单克隆抗体(Abcam 公司)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体稀释液(1:250)(Abcam 公司),于 4℃ 冰箱过夜。次日用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min。

滴加稀释的二抗生物素标记山羊抗小鼠/兔 IgG 工作液(北京中杉金桥生物技术公司), 37 ℃ 恒温孵育 20 min。PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min。滴加碱性磷酸酶标记链霉卵白素稀释液(1:100)(北京中杉金桥生物技术公司), 37 ℃ 孵育 15 min。PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min。DAB(北京中杉金桥生物技术公司)显色 2 ~ 5 min。PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min。滴加苏木素复染、水洗、分化、返蓝、脱水、透明及烘干后, 以中性树胶封片。使用 Leica DM1000 正置显微镜拍摄免疫组化染色图像, 用 Image - Pro Plus 6.0 软件(MEDIA CYBERNETICS 公司)计算阳性细胞面积百分比。

2.3 数据统计 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。术前与术后 1 个月创面边缘组织中 Ki-67、CD31、VEGF 染色阳性细胞面积的比较均采用秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 创面大体观察结果 136 例患者中, 仅 1 例 Wagner 5 级患者因急性下肢血栓形成紧急截肢, 其余

患者的创面均愈合。愈合时间 3 ~ 8 个月, 中位数 5 个月。术后初期创面处于炎性期, 有炎性细胞浸润, 创面黄白; 随后有新鲜肉芽组织形成, 肉芽组织由创面周围向创面中心移行, 创面红润, 进入增生期; 肉芽组织覆盖创面的过程中, 上皮组织逐渐由创面四周向中心移行, 1 ~ 3 个月时创面愈合 50% 左右, 上皮组织最终覆盖创面, 仅留线性瘢痕。74 例合并骨髓炎的患者, 骨髓炎均在骨搬移过程中痊愈。随访至术后 3 ~ 24 个月, 4 例患者足部溃疡复发。其中 1 例因肾功能衰竭导致足部溃疡复发者, 经再次胫骨横向骨搬移治疗后痊愈; 3 例因血糖控制不佳复发者, 经常规清创换药及控制血糖后痊愈。见图 1。

3.2 创面组织形态观察结果 术前创面边缘组织表皮结构不完整, 坏死结构较多。术后 1 个月创面边缘组织可清晰地观察到完整表皮结构, 分为角质层、颗粒层、棘层和基底层; 真皮层结缔组织中可观察到血管及胶原纤维, 纤维结构少见。术前、术后创面边缘组织表皮均有大量炎性细胞浸润。见图 2。



图 1 Wagner 4 级糖尿病足胫骨横向骨搬移术治疗前后创面外观图片

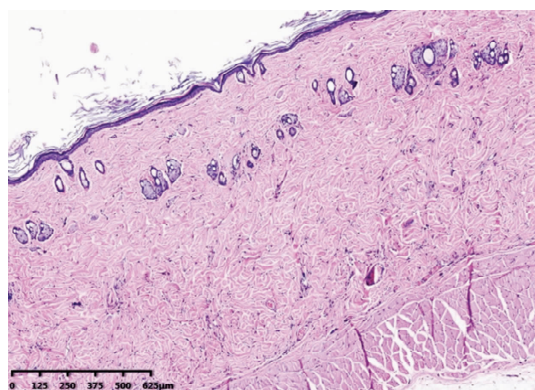
3.3 创面组织 Ki-67、CD31、VEGF 表达情况观察结果

术前创面边缘组织中 Ki-67 染色阳性细胞主要分布于表皮层,薄且仅有 1~2 层细胞;创面边缘组织中可见少量 CD31 和 VEGF 染色阳性细胞。术后 1 个月,创面边缘组织中 Ki-67 染色阳性细胞在真皮层中广泛分布,且表皮层中的 Ki-67 染色阳性细胞层数增多;创面边缘组织中可见大量 CD31 和 VEGF 染

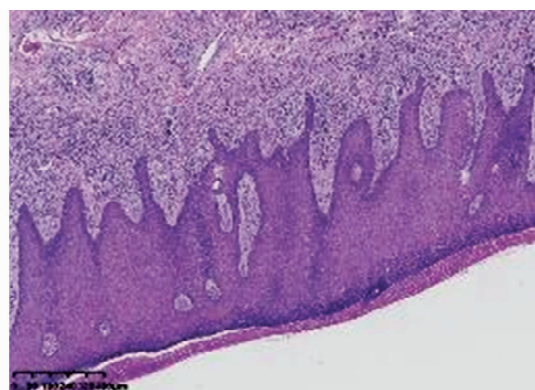
色阳性细胞。术后 1 个月时,创面边缘组织中 Ki-67、CD31、VEGF 染色阳性细胞面积百分比均大于术前。见图 3、表 1。

4 讨论

机体表面发生创伤或溃疡后,创面一般是按炎症、增生、重塑的过程进行愈合^[10-13]。当出现感染、缺血缺氧等因素时,会导致创面微环境改变,会使创



(1)术前



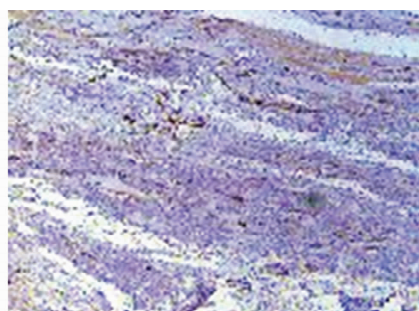
(2)术后1个月

(1)中标尺长度为 625 μm; (2)中标尺长度为 400 μm

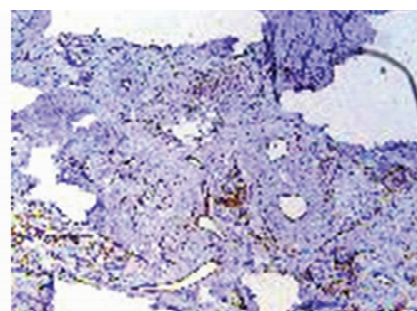
图 2 Wagner 4 级糖尿病足胫骨横向骨搬移术治疗前后创面边缘组织 HE 染色结果



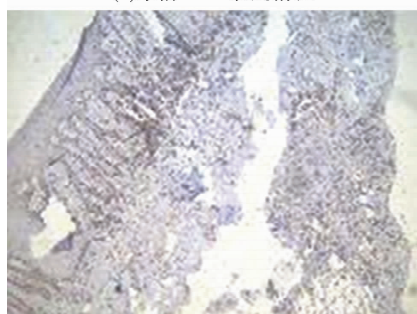
(1)术前Ki-67表达情况



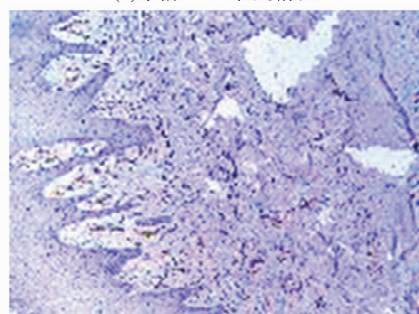
(2)术前CD31表达情况



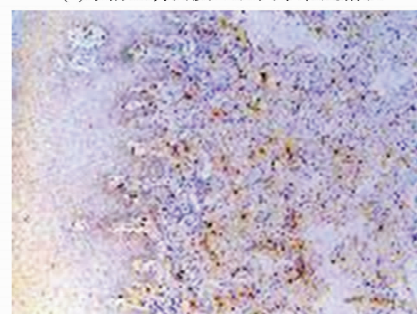
(3)术前血管内皮生长因子表达情况



(4)术后1个月Ki-67表达情况



(5)术后1个月CD31表达情况



(6)术后1个月血管内皮生长因子表达情况

图 3 Wagner 4 级糖尿病足胫骨横向骨搬移术治疗前后创面边缘组织中 Ki-67、CD31、血管内皮生长因子表达情况 (免疫组织化学染色 ×40)

表 1 重度糖尿病足胫骨横向骨搬移术治疗前后创面边缘组织中 Ki-67、CD31、血管内皮生长因子染色阳性细胞面积百分比

抗原	样本量(例)	阳性细胞面积百分比		Z 值	P 值
		术前	术后 1 个月		
Ki-67	30	(1.850 ± 1.287)%	(7.480 ± 5.272)%	3.292	0.001
CD31	30	(0.395 ± 0.139)%	(1.082 ± 0.636)%	3.403	0.001
血管内皮生长因子	30	(0.341 ± 0.217)%	(2.428 ± 1.502)%	3.780	0.000

面愈合过程停滞在炎症期无法向后发展,迁延不愈,从而形成慢性难愈性创面^[10]。创面长期不愈合还会继发病理性瘢痕增生,而且严重感染和创面恶化最终只能进行截肢处理。重度糖尿病足溃疡创面是典型的慢性难愈性创面,出现瘢痕和截肢的概率很高^[14]。

本组患者 Wagner 分级均为 3 级以上,而且从 TEXAS 分级来看,均合并感染。最终除 1 例患者截肢外,其余患者的创面均愈合。溃疡创面愈合处皮肤完整,仅出现线状或微小面积瘢痕,提示创面基本为移行修复的皮肤所覆盖。术后创面边缘组织 HE 染色结果显示,创面修复的皮肤组织有完整的组织结构,包括表皮和真皮层,有基底层、微血管等结构,可在表皮层与基底层见到明显的炎性细胞浸润,以单核细胞为主,基本无中性粒细胞,提示胫骨横断骨搬移术后,创面愈合的方式是组织再生修复。术后创面组织中 Ki-67 染色阳性细胞面积明显大于术前,说明术后创面局部组织细胞增殖能力增强。

糖尿病病程长,其糖基化产物会引起机体血管损伤(尤其是微血管损伤)、神经病变以及其他复杂全身性改变,是导致慢性难愈性创面的内因。微血管病变,主要包括血管损伤、血管数量减少和血流分布不均。糖尿病足的血管病变和神经病变之间存在明显联系。微循环血流分布不均和缺血可引起外周神经营养不良,运动、感觉和自主神经纤维都受到影响;反之,交感神经和自主神经病变,也会导致血流分布不均。这些都可以导致创面愈合困难^[15-21]。CD31 是免疫球蛋白超家族成员之一,在内皮细胞中表达,是细胞黏附的信号受体,并参与组织血管生成的信号传导。主要分布于血管内皮、血小板以及白细胞中,集中表达则是在血管内皮细胞间隙,发挥维持血管内皮细胞完整性的作用^[19-20]。VEGF 主要表达于巨噬细胞、T 淋巴细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞及血管内皮细胞上,是血管内皮细胞的特异性分裂原,可促进血管内皮细胞增殖,诱导血管发生;同时 VEGF 也可改变血管通透性,为血管生成提供条件,并参与新生血管外基质的构筑、新生血管芽的形成及新生血管的成熟改建等^[22-24]。经胫骨横断骨搬移术治疗后,创面边缘组织中 CD31 和 VEGF 染色阳性细胞明显增多,提示创面组织中有大量新生血管生成。

本研究的结果提示,胫骨横断骨搬移术能有效促进重度糖尿病足创面愈合,治疗后创面愈合方式为再生愈合,其机制可能是该手术能促进创面组织细胞增殖与毛细血管再生。

5 参考文献

- [1] WAGNER F W. The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment [J]. Foot Ankle, 1981, 2(2): 64-122.
- [2] KASIEWICZ L N, WHITEHEAD K A. Recent advances in biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers [J]. Biomater Sci, 2017, 5(10): 1962-1975.
- [3] GARIANI K, LEBOWITZ D, VON DACH E, et al. Remission in diabetic foot infections: Duration of antibiotic therapy and other possible associated factors [J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21(2): 244-251.
- [4] CHEN S Y, GIURINI J M, KARCHMER A W. Invasive systemic infection after hospital treatment for diabetic foot ulcer: risk of occurrence and effect on survival [J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(3): 326-334.
- [5] ATEF A, EL-TANTAWY A. Management of open infected comminuted tibial fractures using Ilizarov concept [J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2014, 24(3): 403-408.
- [6] 王玉珍, 王爱红, 赵湜, 等. 中国南方与北方地区糖尿病足病危险因素分析 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(26): 1817-1820.
- [7] 王爱红, 许樟荣, 纪立农. 中国城市医院糖尿病截肢的临床特点及医疗费用分析 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92(4): 224-227.
- [8] 花奇凯, 王林, 洗呈, 等. Ilizarov 胫骨横断骨搬移微循环重建技术治疗下肢慢性缺血性疾病的临床疗效 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(21): 2007-2011.
- [9] LAVERY L A, ARMSTRONG D G, HARKLESS L B. Classification of diabetic foot wounds [J]. J Foot Ankle Surg, 1996, 35(6): 528-531.
- [10] HAN G, CEILLEY R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments [J]. Adv Ther, 2017, 34(3): 599-610.
- [11] SINGER A J, CLARK R A. Cutaneous wound healing [J]. N Engl J Med, 1999, 341(10): 738-746.
- [12] KAPLANI K, KOUTSI S, ARMENIS V, et al. Wound healing related agents: Ongoing research and perspectives [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 129: 242-253.
- [13] GURTNER G C, WERNER S, BARRANDON Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. Nature, 2008, 453(7193): 314-321.
- [14] WONG S L, DEMERS M, MARTINOD K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing [J]. Nat Med, 2015, 21(7): 815-819.
- [15] WANG C, MAO C, LOU Y, et al. Monotropein promotes angiogenesis and inhibits oxidative stress-induced autophagy in endothelial progenitor cells to accelerate wound healing [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1583-1600.

(下转第 33 页)