

· 基础研究 ·

国产新药红色诺卡菌细胞壁骨架蛋白促进烫伤创面愈合的作用及相关机制研究

郝清¹, 王严建², 张爱君^{3△}

(1. 徐州医科大学整形外科, 江苏徐州 221000; 2. 南京鼓楼医院集团宿迁医院皮肤科, 江苏宿迁 223800;

3. 徐州医科大学附属医院整形外科, 江苏徐州 221000)

[摘要] 目的 探究红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)促进烫伤创面愈合的机制。方法 建立小鼠深Ⅱ度烫伤模型, 将 30 只雄性 BALB/C 小鼠随机分为 2 组, Nr-CWS 组与生理盐水组, Nr-CWS 组: 将 60 μg Nr-CWS 溶解于 1 mL 生理盐水, 外涂小鼠创面, 并裸露创面保持创面干燥; 对照组: 用生理盐水 1 mL 外涂小鼠创面, 裸露创面保持创面干燥。2 组小鼠每天换 1 次药, 连续给药 22 d, 相机记录下创面愈合情况, 并于第 3、7、14、21 天, 留取创面皮肤组织制作冰冻切片, HE、Masson 染色进行病理学分析, 免疫组织化学染色观察创面 CCR7、CD206、LY6G、CD31 变化, 酶联吸附试验检测创面肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、转化生长因子-β(TGF-β)变化。**结果** 治疗后, Nr-CWS 组烫伤创面愈合时间早于对照组, 创面愈合率高于对照组; 烫伤第 3 天 Nr-CWS 组中性粒细胞 LY6G 阳性细胞率远低于对照组 [(16.00±2.94)% vs. (31.00±2.93)%], $P<0.01$; Nr-CWS 组 M1、M2 型巨噬细胞峰值出现早于对照组 ($P<0.01$); 烫伤创面愈合过程中, TNF-α 表达量与 M1 型巨噬细胞数量均呈下降趋势, CD31 细胞阳性率、TGF-β 表达量与 M2 型巨噬细胞数量均呈先升后降的趋势。**结论** Nr-CWS 可加速烫伤创面愈合, 减少创面中性粒细胞的聚集, 并且在烫伤的早期阶段促进伤口巨噬细胞的增殖, 促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞转化, 促进伤口从炎症反应阶段过渡到修复阶段。

[关键词] 红色诺卡菌细胞壁骨架; 烫伤创面; 创面愈合; 巨噬细胞; 极化; 炎症

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2025.11.014

中图法分类号: R644

文章编号: 1009-5519(2025)11-2573-08

文献标识码: A

Study on the role and mechanism of the red nocardia cell wall skeleton protein as a new domestic drug in promoting healing of scald wounds

HAO Qing¹, WANG Yanjian², ZHANG Aijun^{3△}

(1. Department of Plastic Surgery, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China;

2. Department of Dermatology, Sugian Hospital of Nanjing Drum Tower Hospital Group, Sugian, Jiangsu 223800, China; 3. Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism by which the red nocardia cell wall skeleton(Nr-CWS) promotes healing of scald wounds. **Methods** A model of deep second-degree burn in mice was established. A total of 30 male BALB/C mice were randomly divided into the Nr-CWS group and the normal saline group. Dissolve 60 μg Nr-CWS in 1 mL of physiological saline, and applied it externally to the mouse wounds. Keep the exposed wounds dry. The control group was treated by applying 1mL of physiological saline to the mouse wounds, while keeping the exposed wounds dry. Both groups of mice had the medication changed once a day, and the treatment was continued for 22 days. The healing status of the wounds was recorded using a camera, and skin tissue samples from the wounds were collected on days 3, 7, 14, and 21 for making frozen sections. Pathological analysis was conducted using Hematoxylin and Eosin staining(HE staining) and Masson staining. Immunohistochemical(IHC) staining was conducted to observe changes in CCR7, CD206, LY6G, and CD31 expression at the wound site. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) was used to detect the levels of TNF-α and TGF-β in the wound. **Results** After treatment, the Nr-CWS group exhibited earlier burn wound healing time and higher healing rates compared to the control group. On Day 3, the positive rate of LY6G+ neutrophils in the Nr-CWS group was significantly lower than that in the control group [(16.00±2.94)% vs. (31.00±2.93)%], $P<0.01$. Furthermore, the peaks of M1 and M2 macrophages occurred earlier in the Nr-CWS group compared to the control group ($P<0.01$). During the healing process of the scald

wounds, the expression level of TNF- α and the number of M1 type macrophages both showed a downward trend, while the positive rate of CD31 cells, the expression level of TGF- β , and the number of M2 type macrophages all showed an initial increase followed by a decrease. **Conclusion** The Nr-CWS can accelerate scald wound healing, reduce the aggregation of neutrophils in the wound, and promote macrophages proliferation of wound in the early stages of scald wound, facilitating the transformation of M1 type macrophages to M2 type macrophages, and promoting the transition of the wound from the inflammatory reaction stage to the repair stage.

[Key words] Red nocardia cell wall skeleton; Scald wound; Wound healing; Macrophage; Polarization; Inflammation

皮肤是人体最大、最复杂的器官,分布着大量免疫细胞,具有物理和化学生物屏障功能。皮肤的烫伤不仅影响局部,还可能会通过炎症造成全身损伤^[1]。烫伤后,皮肤的物理化学免疫屏障消失,细菌感染风险增加,对患者的生命构成威胁^[2]。烫伤创面应尽早清除焦痂及坏死组织,尽早植皮。但皮肤来源受限,且自体皮肤移植后也有不成活的风险。异种皮如猪皮移植有排斥及感染的风险,此外,皮肤组织工程仍处于实验阶段^[3]。传统的烫伤创面治疗药物如银离子敷料等对烫伤创面愈合效果并不显著,因此亟待新药物的研发^[4]。红色诺卡菌细胞壁骨架(Nr-CWS)是从红色杆菌中提取的一种细胞壁骨架成分,能够上调机体的免疫功能,具有促进巨噬细胞活化、吞噬病原体等功能^[5]。并且已应用于临床宫颈糜烂、肿瘤及糖尿病创面的治疗^[6-7]。

烫伤创面的愈合与创面炎症状态、中性粒细胞数量、巨噬细胞数量及极化、分泌的因子密切相关。Nr-CWS 具有调节免疫细胞的功能,那么 Nr-CWS 是否可以促进烫伤创面的愈合,其愈合过程与巨噬细胞数量及极化是否有关,尚不清楚。本实验设立对照组,研究 Nr-CWS 对烫伤创面的愈合效果,以及对巨噬细胞极化及其分泌的细胞因子的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂、仪器 32 只 8 周龄雄性 BABL/C 小鼠,由徐州医科大学动物实验中心提供,为小鼠提供符合标准的水和食物,严格按照动物委员会的标准进行实验,并经过徐州医科大学伦理委员会批准(批号 202204A171)。Nr-CWS 购自辽宁格瑞仕特生物制药有限公司,苏木精-伊红(HE)染液、马松(Masson)染液购自中国武汉赛维尔生物技术有限公司,小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)酶联吸附试验(ELISA)试剂盒购自中国国药集团化学试剂有限公司,抗 CCR7 抗体、抗 CD206 抗体、抗 CD31 抗体、抗 LY6G 抗体购自英国 Abcam 公司,正置光学显微镜、成像系统购自日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 小鼠适应性饲养 1 周后,于实验前 1 d 22:00 禁食水。腹腔注射浓度为 180 mg/kg 的水合氯醛,待小鼠麻醉后,用剃毛机将小鼠背部中央

位置毛发剃去,并用脱毛膏将剃毛区剩余的毛发处理干净,将 100 °C 的 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm 正方体铁块施加 0.5 kg 压力按于小鼠背部中央脱毛区 10 s,造成小鼠背部面积为 2.25 cm² 深Ⅱ度烫伤区域。烫伤完成后将小鼠脱颈处死,用牙科剪沿创面 2 mm 剪下皮肤创面,做 HE、Masson 染色。

1.2.2 动物分组及处理 共 32 只小鼠,经上述造模烫伤后 24 h 处死小鼠 2 只,放置标尺并拍摄创面照片,进行固定后制作切片。将剩余 30 只小鼠随机分为 2 组:Nr-CWS 组与对照组,每组 15 只。Nr-CWS 组:取 Nr-CWS 60 μg 溶解于 1 mL 生理盐水,用药液浸湿棉球,外涂小鼠创面,并裸露创面保持创面干燥;对照组:用生理盐水 1 mL 棉球外涂,裸露创面保持创面干燥。因裸露创面造成药物流失量大,为保证药物有效浓度,两组小鼠换药频率为 1 次/天,给药 22 d。于第 3、7、14、21 天,每组各处死 3 只小鼠,放置标尺拍摄创面照片,留取小鼠创缘 1.0~1.5 mm 皮肤组织进行后续实验。

1.2.3 创面评估 在第 2、6、10、14、22 天,相机记录下创面愈合情况并用 Image J 软件计算创面大小,统计分析伤口愈合率及 2 组小鼠烫伤创面平均愈合时间,计算公式为:创面愈合率(%) = (2.25 - 创面面积)/2.25 × 100%。第 14 天,取创口周围新生组织,固定后制成切片,进行 HE 及 Masson 染色,并置于显微镜下评估表皮损伤及再上皮化程度、真皮层受损和恢复情况,以及炎症细胞浸润情况和创面愈合质量。

1.2.4 免疫组织化学(免疫组化)染色 取石蜡组织,经过组织脱蜡、抗原修复等步骤,滴加已稀释的兔抗鼠 CCR7、CD206、CD31 和 LY6G 一抗(1:100),在 4 °C 冰箱中过夜,第 2 天滴加二抗孵育,滴加 DAB 显色液显色,再经过复染、脱水、透明、封片等,在光学显微镜下观察,拍摄照片。

1.2.5 ELISA 从 -80 °C 冰箱取出标本,常温下溶化,严格按照试剂盒操作说明进行操作,分别检测 TNF- α 、TGF- β 水平。

1.3 统计学处理 阳性细胞率均值,标准差用表示,两组间独立数据比较采用独立样本 t 检验,不同时间重复测量数据采用重复测量方差分析,免疫组织化学细胞阳性率结果及 ELISA 对重复测量方差分析结果

进行简单效应分析和 Bonferroni 校正。采用 Image J、IBM SPSS Statistics 23.0 软件和 GraphPad Prism 9.4 软件进行数据处理分析与图表制作。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 深Ⅱ度烫伤模型构建 HE 染色示: 表皮层消失, 真皮深层受损, 仅残留部分皮肤附属器。Masson 染色示: 表皮层消失, 真皮深层胶原纤维肿胀、变性、排列紊乱, 呈红蓝交替染色特征, 并且以暗红色为主, 真皮胶原纤维符合深Ⅱ度烫伤标准。见图 1。

2.2 烫伤创面大体观察 小鼠在烫伤造模成功后全部存活, 无脱水, 无腹泻。肉眼可见: 刚烫伤完的创面呈灰白色, 受热后创面稍皱缩, 创面水肿。第 2 天, Nr-CWS 组创面略高于正常皮肤, 肉眼观察创面呈黄褐色、有少量结痂, 创面形状较规则。对照组创面水肿, 略高于周围正常皮肤, 形状较规则。第 6 天, Nr-CWS 组全部结痂, 与周围皮肤界限清楚, 部分痂皮脱落。对照组创面呈深黄色, 与周围组织分界明显, 有

形成痂皮的趋势。第 10 天, Nr-CWS 组创面均呈现褐色结痂, Nr-CWS 组小鼠创面分泌物较少。对照组创面分泌物较多, 痂皮较深。第 14 天, Nr-CWS 组创面大部分痂皮已脱落, 创面呈暗红色, 仅残留部分痂皮, 创面周围毛发生长整齐, 创面趋于愈合。对照组部分毛发开始与创面分离, 有脱落趋势, 创面周围毛发生长不均匀。第 21 天, Nr-CWS 组创面已完全愈合, 对照组仍残留部分痂皮。见图 2。

2.3 创面愈合情况 对 2 组小鼠的创面愈合率及创面直径进行比较, 结果显示, 2 组的创面愈合率均随时间推移显著提高, 但 Nr-CWS 组的愈合率在第 2~14 天各时间点均显著高于对照组($P < 0.001$)。至第 22 天 2 组创面均接近完全愈合, 但 Nr-CWS 组达到完全愈合的时间更早。此外, 交互效应分析表明, 2 组愈合率的增长趋势存在显著差异($P < 0.001$), Nr-CWS 组在早期(第 2~14 天)表现出更快的愈合速度, 而对照组直至第 22 天才接近完全愈合。见表 1、2。

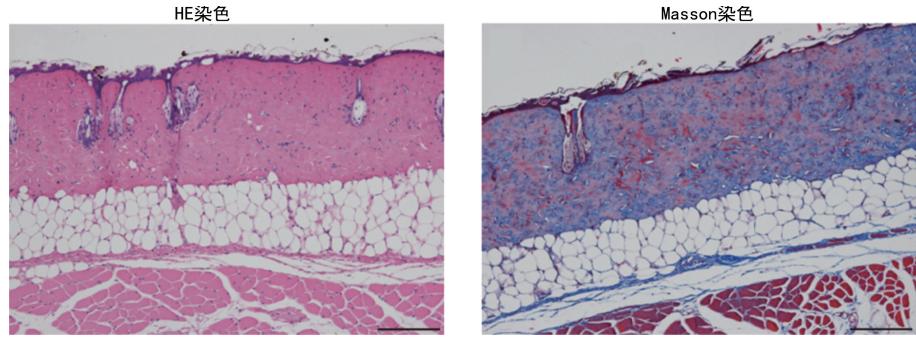


图 1 烫伤完成小鼠创面皮肤染色(160×)

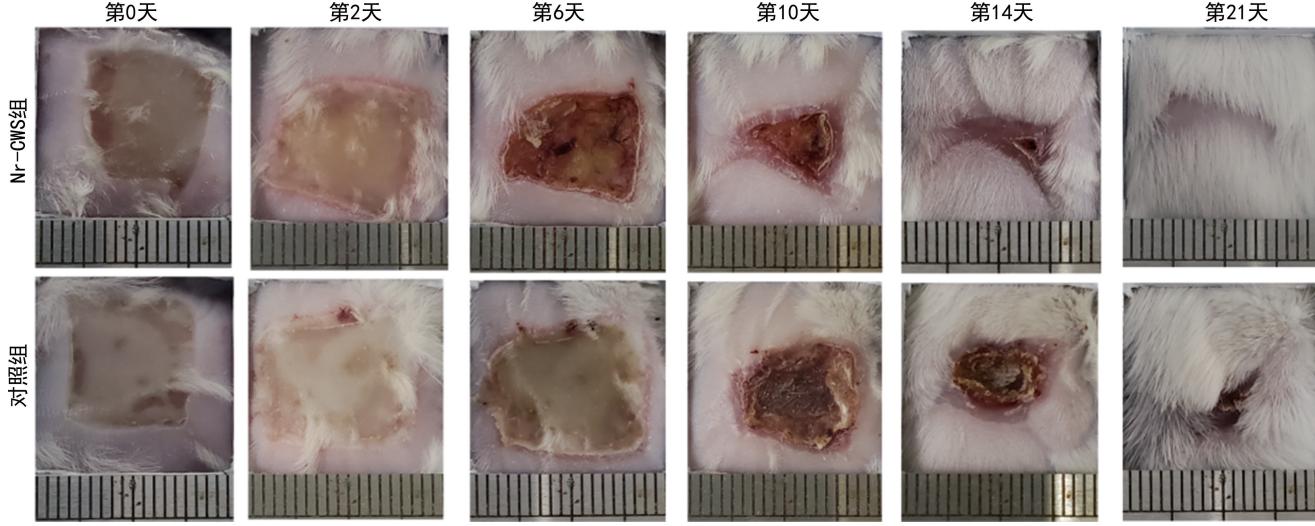


图 2 小鼠创面变化情况

2.4 创面的组织学变化 在第 14 天对烫伤创面进行 HE 染色中观察到, 与对照组相比, Nr-CWS 组创面已更接近正常创面, 毛囊、汗腺等皮肤附件已基本形成, 表皮层完整, 厚度均匀, 表面呈波浪状, 毛囊从皮下一直延伸到表皮层, 并附着汗腺, 真皮层稍薄, 炎

症细胞浸润少; 对照组表皮层明显增厚, 真皮层增厚, 未见皮肤附件, 同时可见大量炎症细胞浸润。Masson 染色中观察到相似的结果, 第 14 天时, Nr-CWS 组皮肤完整性已接近正常皮肤。对照组表皮、真皮层明显增厚, 轻微角化过度, 真皮层红蓝相间, 间质不均匀,

胶原纤维中掺杂肌原纤维,未见皮肤附件,伴有炎症

细胞浸润。见图 3。

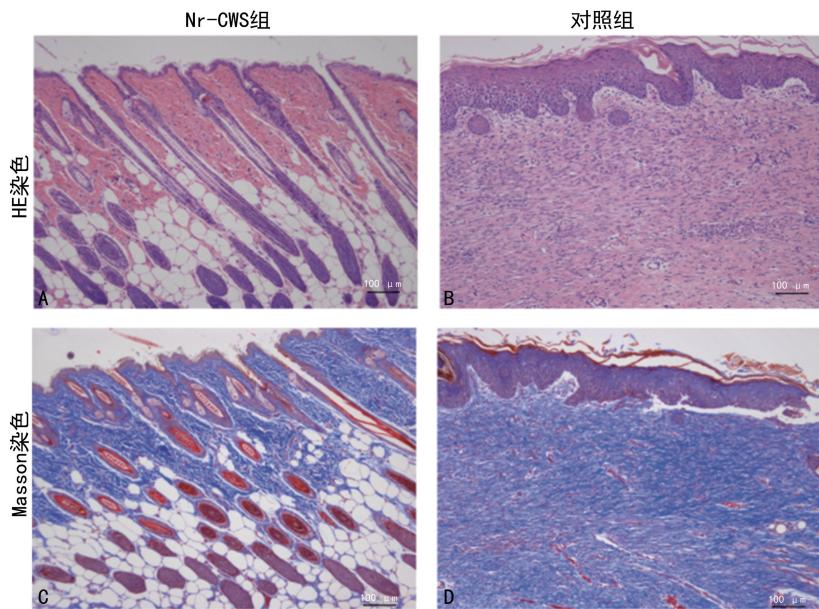


图 3 第 14 天创面组织学染色图(100×)

表 1 不同时间节点 2 组创面愈合率结果($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	第 2 天	第 6 天	第 10 天	第 14 天	第 22 天
Nr-CWS 组	3	24.33±2.08	44.33±4.04	72.67±2.52	92.33±2.52	100.00±0.00
对照组	3	12.67±2.52	17.00±3.61	38.67±3.51	63.33±4.73	99.53±0.50

注:时间效应, $F=1376.629, P<0.001$;组间效应, $F=128.852, P<0.001$;交互效应, $F=60.515, P<0.001$ 。

表 2 不同时间节点 2 组创面直径结果($\bar{x} \pm s$, cm)

组别	n	第 2 天	第 6 天	第 10 天	第 14 天	第 22 天
Nr-CWS 组	3	1.78±0.05	1.24±0.06	0.73±0.22	0.38±0.12	0.03±0.06
对照组	3	1.87±0.16	1.62±0.04	1.24±0.13	1.11±0.16	0.18±0.16

注:时间效应, $F=183.414, P<0.001$;组间效应, $F=41.061, P<0.003$;交互效应, $F=7.547, P<0.001$ 。

2.5 创面 LY6G、CCR7、CD206、CD31 表达情况分析

2.5.1 创面中性粒细胞 LY6G 免疫组化结果分析

第 3 天 Nr-CWS 组皮下组织出现散在中性粒细胞,并向上层浸润,平均阳性细胞率($16.00 \pm 2.94\%$)。对照组皮下浸润大量中性粒细胞,并向积聚在脂肪层,平均阳性细胞率($31.00 \pm 2.93\%$),烫伤第 3 天,对照组中性粒细胞阳性细胞率远高于 Nr-CWS 组($P<0.01$)。见图 4。

2.5.2 创面 M1 型巨噬细胞 CCR7 免疫组化结果分析

Nr-CWS 组创面在第 3 天积聚大量 CCR7 型巨噬细胞,远高于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。Nr-CWS 组 CCR7 型巨噬细胞峰值主要出现在烫伤第 3 天,而对照组从第 3 天开始上升,到第 7 天达峰值,第 7 天 Nr-CWS 组 CCR7 型巨噬细胞高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。第 14~21 天 Nr-CWS 组、对照组创面散落 CCR7 型巨噬细胞,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 5、表 3。

2.5.3 创面 M2 型巨噬细胞 CD206 免疫组化结果分

析 Nr-CWS 组烫伤创面 CD206 细胞阳性率从第 3 天开始上升,到第 7 天达峰值并开始下降,第 21 天达最低值。对照组从第 3 天开始保持上升趋势,并持续到第 21 天。第 3~7 天,Nr-CWS 组烫伤创面 CD206 型巨噬细胞远高于对照组($P<0.001$)。第 14 天出现反转,Nr-CWS 组烫伤创面 CD206 型巨噬细胞阳性细胞率低于对照组($P<0.01$),此差异在第 21 天更为显著($P<0.001$)。见图 6、表 4。

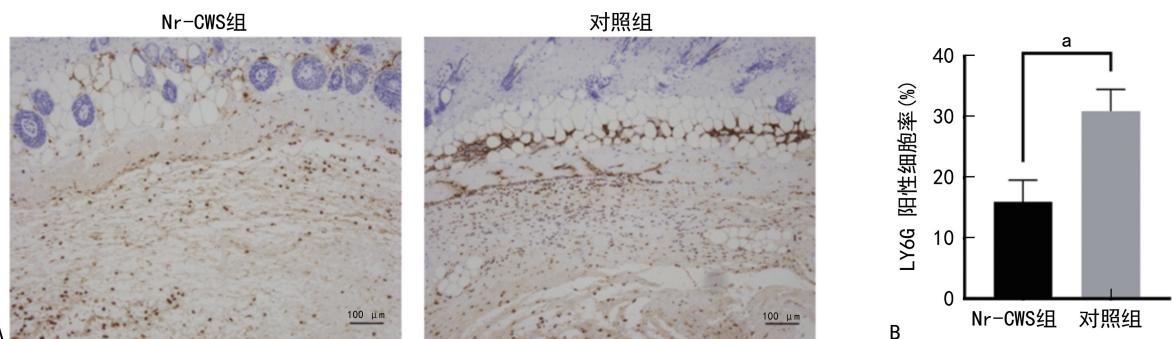
2.5.4 创面血管内皮细胞标志物 CD31 免疫组化结果分析

Nr-CWS 组烫伤创面内皮细胞标志物 CD31 细胞阳性率从第 3 天开始上升,到第 7 天达峰值,并从第 7 天后开始下降,第 21 天达最低值。对照组从第 3 天开始保持上升趋势,并持续到第 21 天。第 3 天 2 组烫伤创面散落血管内皮细胞阳性率无明显差异($P>0.05$)。第 7 天 Nr-CWS 组烫伤创面散落血管内皮细胞阳性率远高于对照组($P<0.001$)。到第 14 天时对照组略低于 Nr-CWS 组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。第 21 天 Nr-CWS 组烫伤创面散落

CD31 型血管内皮细胞阳性率远低于对照组 ($P < 0.001$)。见图 7、表 5。

2.6 创面 TNF- α 和 TGF- β 表达情况 Nr-CWS 组与对照组 TNF- α 表达量总体上呈下降趋势。第 3~7 天 Nr-CWS 组 TNF- α 表达量均高于对照组 ($P < 0.01$)，第 14 天出现反转，Nr-CWS 组 TNF- α 表达量开始低于对照组 ($P < 0.05$)。至第 21 天 Nr-CWS 组 TNF- α 表达量持续下降，并低于对照组 ($P < 0.05$)。

见表 6。Nr-CWS 组 TGF- β 表达量从第 3 天开始上升，到第 7 天达到最高值，之后呈下降趋势，第 21 天达最低值。对照组从第 3 天开始保持上升趋势，并持续到第 21 天。第 3~7 天 Nr-CWS 组 TGF- β 表达量均显著高于对照组 ($P < 0.001$)。第 14~21 天 Nr-CWS 组 TGF- β 表达量显著低于对照组 ($P < 0.001$)。见表 7。



注：A. 第 3 天小鼠创面中性粒细胞 LY6G 免疫组化染色 (200 \times)；B. Image J 软件计算 2 组创面中性粒细胞 LY6G 平均阳性细胞率； $^a P < 0.01, n=3$ 。

图 4 小鼠创面 LY6G 免疫组织化学染色

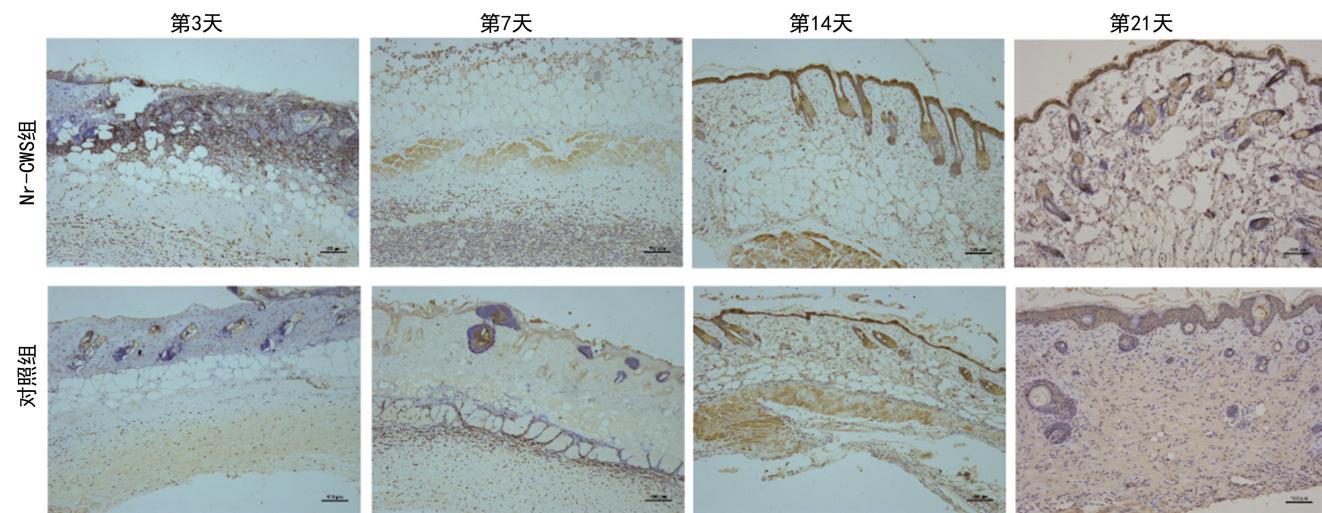


图 5 第 3、7、14、21 天小鼠创面 M1 型巨噬细胞 CCR7 染色 (200 \times)

表 3 2 组创面 CCR7 免疫组化结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
Nr-CWS 组	3	46.10±3.03	38.28±2.06	11.67±3.35	7.85±1.33
对照组	3	10.23±2.46	23.78±4.52	15.48±1.98	12.74±3.32
组间效应(Bonferroni 校正)	—	$P < 0.001$	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

注：—表示无此项。

表 4 2 组创面 CD206 免疫组化结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
Nr-CWS 组	3	25.27±2.95	33.09±2.83	8.49±2.05	6.44±1.70
对照组	3	3.18±1.62	5.63±2.85	23.67±3.35	30.11±3.06
组间效应(Bonferroni 校正)	—	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.01$	$P < 0.001$

注：—表示无此项。

Nr-CWS 组

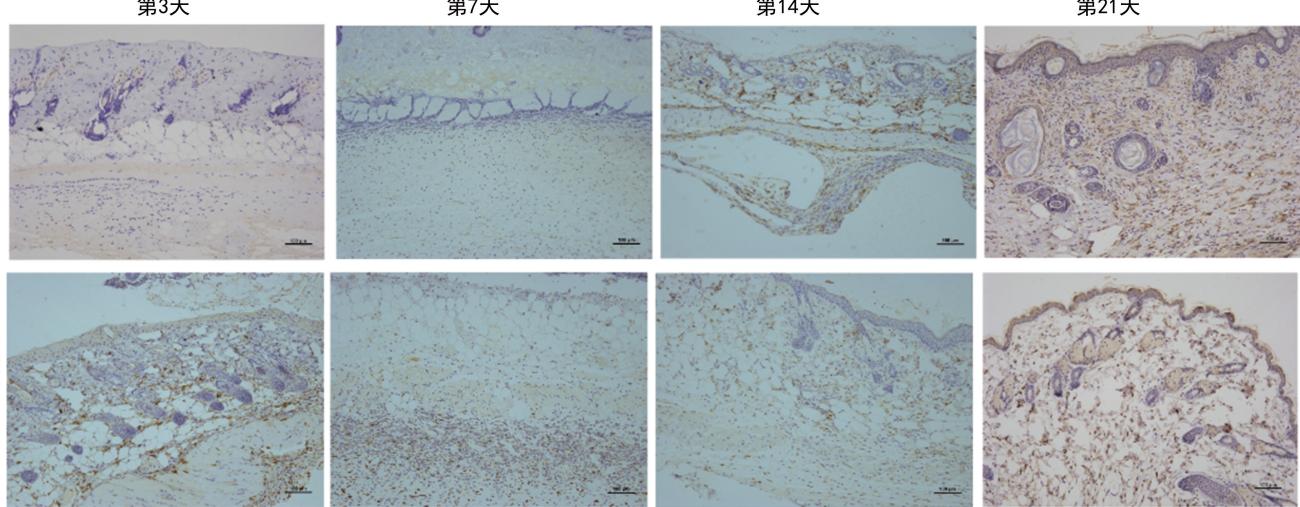


图 6 第 3、7、14、21 天小鼠创面 M2 型巨噬细胞 CD206 染色(200×)

对照组

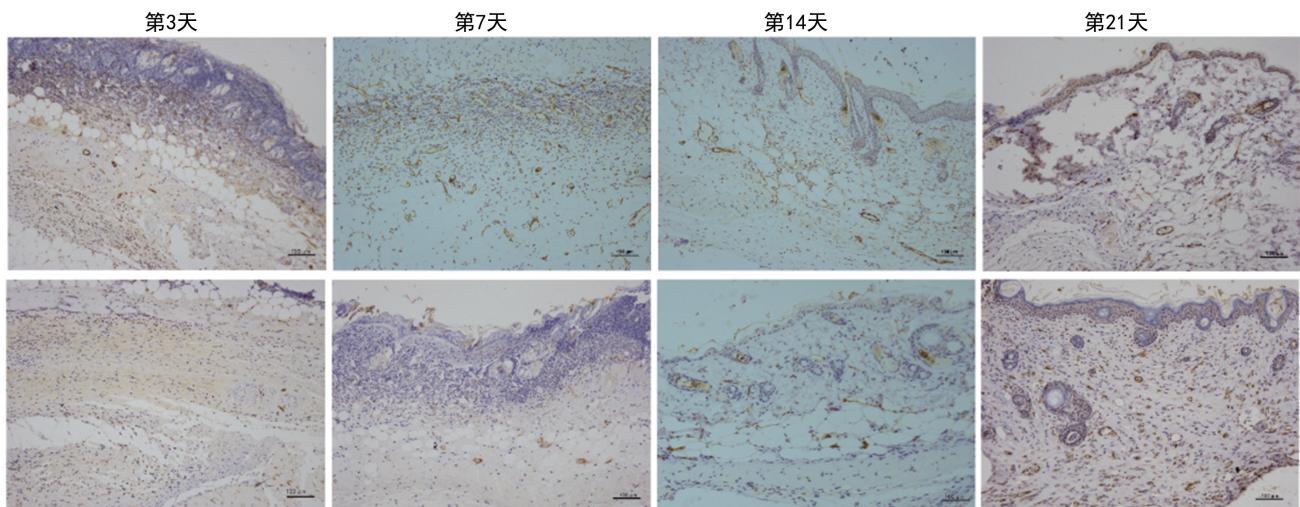


图 7 第 3、7、14、21 天小鼠血管内皮细胞标志物 CD31 染色(200×)

表 5 2 组创面 CD31 免疫组化结果($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
Nr-CWS 组	3	10.73±2.72	31.25±3.83	20.03±2.85	13.61±1.67
对照组	3	8.24±2.06	9.03±2.52	23.82±3.33	30.79±2.59
组间效应(Bonferroni 校正)	—	P>0.05	P<0.001	P>0.05	P<0.001

注:—表示无此项。

表 6 2 组创面 TNF- α 结果($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
Nr-CWS 组	3	374.55±16.86	340.59±10.37	169.09±9.53	117.99±15.59
对照组	3	291.18±16.85	264.12±16.40	204.58±19.50	166.62±11.22
组间效应(Bonferroni 校正)	—	P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05

注:—表示无此项。

表 7 2 组创面 TGF- β 结果($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
Nr-CWS 组	3	284.43±13.17	344.41±22.19	178.38±9.00	117.95±15.51
对照组	3	119.66±17.50	171.28±11.93	271.98±9.49	296.47±12.15
组间效应(Bonferroni 校正)	—	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001

注:—表示无此项。

3 讨 论

烫伤是常见的意外伤,严重的烫伤易留瘢痕,影响美观,给患者身心造成损伤,关节区烫伤遗留瘢痕易给患者造成功能障碍^[8]。与一般创面相比,烫伤易感染,易留瘢痕。烫伤伤口愈合是一个复杂的多步骤过程,涉及血凝块形成、炎症、再上皮化、肉芽组织形成、新生血管形成和重塑的重叠阶段^[9]。皮肤具有复杂的免疫细胞网络,这些免疫细胞分布在组织中,对宿主皮肤防御和稳态至关重要,且在伤口愈合过程中起着至关重要的作用,高度复杂的免疫网络包括多种免疫细胞的协同作用。

中性粒细胞是最早被募集到烫伤创面的免疫细胞,成熟中性粒细胞的寿命只有 24 h,当中性粒细胞凋亡裂解时,体内的各种有毒物质会被释放到细胞外加重创面损伤^[10]。中性粒细胞的大量持续聚集会加重炎症,甚至转化为慢性炎症。中性粒细胞的增多会诱导更多的巨噬细胞到达炎症创面,吞噬清除中性粒细胞,减轻炎症。本实验中,第 3 天 Nr-CWS 组烫伤创面的中性粒细胞少于对照组,这一结果表明 Nr-CWS 可能通过增强烫伤创面中巨噬细胞的募集,清除中性粒细胞。不同于中性粒细胞,巨噬细胞寿命更长,且具有强大的吞噬能力,紧随中性粒细胞到达创面。当皮肤遭受损伤时,真皮巨噬细胞会被迅速激活并紧随中性粒细胞到达创面,吞噬杀灭病原体,并清除凋亡中性粒细胞。不同炎症因子会诱导原始单核细胞分化为不同表型和功能的巨噬细胞。

伤口愈合的 3 个阶段:急性炎症阶段、细胞迁移增殖阶段、重塑阶段^[11]。在急性炎症阶段,M1 巨噬细胞具有很强的吞噬、清除病原体能力。本实验中,Nr-CWS 能够诱导大量 M1 型巨噬细胞向创面聚集并清除坏死组织,减少烫伤小鼠的感染,实验结果也证明 Nr-CWS 可以减少烫伤创面的感染。在细胞迁移增殖阶段,M2 巨噬细胞迁移到伤口床并参与形成肉芽组织。巨噬细胞从伤口边缘和骨髓中招募成纤维细胞,巨噬细胞诱导部分成纤维细胞向肌纤维细胞转变。在重塑阶段,巨噬细胞和肌纤维细胞发生凋亡并从伤口消失^[12],创面血管萎缩减少。

早期炎症中性粒细胞的减少,转而由巨噬细胞和成纤维细胞主导完成的增殖和重塑。当巨噬细胞较早地进入伤口时,可以清除病原体,启动血管生成、成纤维细胞迁移和胶原合成。加快创面愈合分 3 个阶段,由急性炎症阶段向细胞迁移增殖阶段的转变^[13]。

先前的研究表明,Nr-CWS 可以作为免疫调节剂,上调机体的免疫功能^[14]。一些研究人员将其应用于小鼠皮肤伤口,发现 Nr-CWS 可以促进伤口愈合^[15]。正常创面中,早期主要分布的是 M1 型巨噬细胞,其在创伤后第 7~14 天达高峰,而 M2 型巨噬细胞主要分布在晚期创面及瘢痕增生期,在创伤后第 14~28 天达高峰^[16]。本实验中,第 3 天 Nr-CWS 组 M1

型巨噬细胞即达峰值,并向创面聚集、增殖,清除中性粒细胞,取代中性粒细胞成为创面最主要的炎症细胞,分泌相关炎症因子,如 TNF- α ,并促进表皮及毛囊的再生。第 7 天 Nr-CWS 促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞转化,M1 型巨噬细胞开始减少,M2 型巨噬细胞达峰值,远早于正常创面的第 14~28 天。从第 14 天开始,Nr-CWS 组创面中 M1、M2 巨噬细胞迅速减少,持续低于对照组,可能与炎症早期巨噬细胞的过度消耗有关。有研究表明,M2 型巨噬细胞在创面的持续存在及激活会导致瘢痕的形成^[17]。重塑期,M1、M2 巨噬细胞的减少,导致血管形成及肌成纤维细胞的减少,有利于创面的重塑,减少瘢痕的形成。

本研究中,前 7 天的烫伤创面,Nr-CWS 组 M1 型巨噬细胞与 TNF- α 表达量均远高于对照组,并于第 3 天之后呈下降趋势。这表明在创面愈合过程中,M1 型巨噬细胞可分泌 TNF- α 等相关炎症因子,杀伤病原体,减少烫伤小鼠的感染机会;M2 型巨噬细胞从第 3 天开始增加到第 7 天达高峰,并伴随着 TGF- β 、CD31 表达量的增长,创面也相较于对照组愈合快,可能与增多的 M2 型巨噬细胞,分泌 TGF- β 诱导成纤维细胞分化为肌成纤维细胞分泌胶原纤维及细胞外基质,以及血管内皮生长因子促进血管生成有关。到第 14、21 天,M2 型巨噬细胞数量迅速减少,TGF- β 、CD31 表达量也迅速减少,创面成纤维细胞向肌成纤维细胞转化减少,细胞外基质减少,毛囊生长增多,创面愈合更快。值得注意的是,CD206、CD31 与炎症因子在第 14 天的“反转”现象反映 Nr-CWS 能够加速炎症-修复进程。加速巨噬细胞的转化和血管生成在早期完成,避免过度修复导致的瘢痕形成。而对照组因修复延迟,第 14 天时对照组仍处于修复中期,相关标志物持续高表达,M2 型巨噬细胞持续聚集以应对延迟的修复需求。这一结果符合 Nr-CWS 早期强效干预,后期减少过度修复的作用特点,与其促进创面快速愈合、减少瘢痕的临床效果一致。

在第 14 天的表达反转(Nr-CWS 组低于对照组)可能反映 Nr-CWS 加速了创面修复进程。早期 M2 型巨噬细胞和血管生成的快速激活(第 3~7 天)促使 Nr-CWS 组更早进入重塑阶段,导致相关标志物表达下降;而对照组因修复延迟,M2 型巨噬细胞和 CD31⁺ 血管内皮细胞仍处于增殖期,故表达量较高。这一现象与 Nr-CWS 组创面更早愈合的组织学结果一致。

Nr-CWS 对巨噬细胞表型转化的调控涉及多条信号通路的协同作用。具体而言,在伤口愈合模型中,Nr-CWS 通过处理上调巨噬细胞中 PI3K、Akt 和 mTOR 的磷酸化水平,激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,促进巨噬细胞向 M2 表型极化。该通路的激活会进一步诱导 IL-10 和 TGF- β 1 的分泌。同时,Nr-CWS 增强巨噬细胞的迁移和吞噬能力,促进伤口局

部 M2 型细胞的募集,从而推动组织修复进程^[5]。在肿瘤微环境中,Nr-CWS 通过双重机制调控巨噬细胞的抗肿瘤功能。一方面,其通过 TNF- α /TNFR1/caspase-8 通路增强巨噬细胞的促凋亡活性。另一方面,Nr-CWS 抑制 Wnt/ β -catenin 通路,从而抑制肿瘤细胞迁移。此外,Nr-CWS 通过下调 PD-L1 表达解除免疫抑制,促进 M1 型巨噬细胞的抗肿瘤活性。这种双重调控机制表明,Nr-CWS 可通过协同激活促凋亡通路与抑制促癌信号发挥抗肿瘤作用^[14]。在皮肤损伤修复中,Nr-CWS 通过激活 TGF- β 1/Smad 通路驱动巨噬细胞的 M2 极化及血管生成。动物实验显示,Nr-CWS 处理显著上调伤口组织中巨噬细胞标志物 CD68 和 F4/80 的表达及 TGF- β 1 的蛋白水平,进一步激活下游 Smad 蛋白,促进血管内皮生长因子的释放,使新生血管密度显著增加。此外,Nr-CWS 通过该通路还可加速细胞外基质重塑,缩短伤口完全愈合时间^[15]。

本研究也存在一些局限性,通过之前的研究知道,Nr-CWS 可以促进烫伤创面的愈合,然而未对其分子机制进行具体实验研究。此外,Nr-CWS 对其他皮肤细胞(如成纤维细胞、内皮细胞和人角质形成细胞)的机制需要更加深入的探索。

综上所述,Nr-CWS 能使烫伤创面炎症从嗜中性粒细胞主导的炎症向巨噬细胞主导的炎症转变,并促进烫伤创面从炎症反应期向肉芽组织增生期及重塑期转变,从而加快创面愈合。

参考文献

- [1] BURGESS M, VALDERA F, VARON D, et al. The Immune and Regenerative Response to Burn Injury [J]. Cells, 2022, 11(19):3073.
- [2] 马清昌,刘燕. 安尔碘Ⅲ型皮肤消毒液对烧烫伤后伤口感染患者创面修复效果的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(24):32-34.
- [3] 李峰,黎君友. 基因工程猪皮的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志, 2022, 17(2):163-166.
- [4] ROSS J A, ALLAN N, OLSON M, et al. Comparison of the efficacy of silver-based antimicrobial burn dressings in a porcine model of burn wounds[J]. Burns, 2020, 46(7): 1632-1640.
- [5] HU K, XU Y, LI X, et al. The nocardia rubra cell wall skeleton regulates macrophages and promotes wound healing[J]. Curr Issues Mol Biol, 2022, 44(12): 5995-6005.
- [6] TAO Y, WANG G, ZHAI J, et al. Functional modulation of CD8 $^{+}$ T cell by approved novel immune enhancer: nocardia rubra Cell-Wall Skeletons (Nr-CWS) [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78:106023.
- [7] CHEN W, ZHANG Y, ZHAO C, et al. Nocardia rubra cell wall skeleton up-regulates $^{+}$ T cell subsets and inhibits PD-1/PD-L1 pathway to promote local immune status of patients with high-risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia[J]. Front Immunol, 2021, 11:612547.
- [8] 王浩,李欣,董宇,等. 烧伤患者皮肤软组织扩张瘢痕修复术 I 期术后切口感染病原菌及 sTREM-1、TLR4、PCT 水平[J]. 中华医院感染学杂志, 2024, 34(24):3759-3763.
- [9] 赵建伟,李勋胜,吕金朋,等. 鹿茸干细胞外泌体复合水凝胶促进烫伤皮肤的修复[J]. 中国组织工程研究, 2024, 12(7):1-9.
- [10] ELROD J, LENZ M, KIWIT A, et al. Murine scald models characterize the role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in severe burns [J]. Front Immunol, 2023, 14:1113948.
- [11] WU Y, HIRSCHI K K. Tissue-resident macrophage development and function[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 617879.
- [12] NAKAI K. Multiple roles of macrophage in skin[J]. J Dermatol Sci, 2021, 104(1):2-10.
- [13] WITTE M B, BARBUL A. General principles of wound healing[J]. Surg Clin North Am, 1997, 77(3):509-528.
- [14] ZHANG S, WANG H, LIU Y, et al. Nocardia rubra cell-wall skeleton influences the development of cervical carcinoma by promoting the antitumor effect of macrophages and dendritic cells[J]. Cancer Med, 2022, 11(5): 1249-1268.
- [15] WANG Y, HU Y, MA B, et al. Nocardia rubra cell wall skeleton accelerates cutaneous wound healing by enhancing macrophage activation and angiogenesis[J]. Int Med Res, 2018, 46(6):2398-2409.
- [16] HAYDONT V, NEIVEYANS V, PEREZ P, et al. Fibroblasts from the human skin dermo-hypodermal junction are distinct from dermal papillary and reticular fibroblasts and from mesenchymal stem cells and exhibit a specific molecular profile related to extracellular matrix organization and modeling[J]. Cells, 2020, 9(2):368.
- [17] CHE H, XU J, WU D, et al. Reactive oxygen species-responsive polydopamine-PtCuTe nanoparticle-loaded microneedle system for promoting the healing of infected skin wounds[J]. Control Release, 2024, 376:999-1013.

(收稿日期:2025-04-02 修回日期:2025-08-15)