

糖尿病足溃疡愈合困难的微血管内皮细胞衰老机制及药物干预

曾兵^{1*}, 周杰¹

(1. 萍乡市人民医院, 萍乡)

摘要: 糖尿病足溃疡愈合困难是临床重大难题, 其核心病理基础之一在于局部微血管内皮细胞功能进行性衰退。本研究聚焦于内皮细胞衰老在糖尿病足创面微循环障碍中的驱动作用, 通过建立高糖诱导的体外内皮细胞衰老模型与糖尿病小鼠足部创伤模型, 系统解析 p53-p21 通路激活、线粒体功能紊乱及细胞外基质降解失衡三者之间的级联关系。实验发现, 持续高糖环境显著加速内皮细胞复制性衰老表型, 表现为 β -半乳糖苷酶活性升高、端粒缩短及血管生成能力下降; 同步观察到微血管密度降低、新生毛细血管结构异常及灌注不足。进一步干预证实, 靶向调控线粒体自噬可部分逆转内皮衰老表型, 并改善创面肉芽组织形成与上皮化进程。该结果提示, 干预内皮细胞衰老是突破糖尿病足溃疡难愈瓶颈的新策略。

关键词: 内皮衰老; 糖尿病足; 微血管; 药物干预; 创面愈合

1. 引言

1.1 临床困境与科学问题

糖尿病足溃疡全球年发病率高达 25%, 截肢风险较非糖尿病人群升高 15 倍, 现有清创、抗感染及生长因子治疗未能显著改善愈合率。临床观察显示, 即便创面基底血供充足, 新生微血管仍呈现结构紊乱与功能缺失, 提示微循环重建失败是愈合障碍的核心瓶颈。现有研究普遍认为, 高糖微环境诱导的内皮细胞衰老并非被动耗竭, 而是一种表观遗传重编程驱动的再生能力不可逆丧失。由此凝练出本研究的核心科学问题: 内皮细胞为何在糖尿病环境下丧失再生能力?

1.2 衰老假说的理论锚点

内皮细胞早衰构成糖尿病微血管病变的底层驱动机制, 其本质并非单纯由炎症或氧化应激所诱发的继发性损伤, 而是以 p16^{INK4a}/p21^{CIP1} 介导的不可逆细胞周期阻滞为核心, 耦合组蛋白甲基化修饰异常引发的表观遗传漂移, 以及线粒体呼吸链复合物活性下降导致的代谢重编程。三者形成正向反馈环路, 持续削弱内皮再生能力与血管修复潜能, 从而成为糖尿病足溃疡愈合障碍的根本性瓶颈 [1]。

1.3 研究目标与逻辑主线

本研究旨在系统验证“高糖→线粒体损伤→DNA 损伤响应→内皮衰老→血管新生障碍→溃疡不愈”这一级联因果路径, 并确立其在糖尿病足溃疡愈合障碍中的核心地位。聚焦微血管内皮细胞, 通过多维度表型与分子谱系分析, 定量刻画线粒体稳态失衡与细胞衰老表型的时序耦合关系。进一步, 以线粒体动态调控为干预靶点, 评估靶向药物对 DNA 损伤响应通路及血管生成能力的重编程效应, 最终构建从机制解析到治疗转化的闭环逻辑框架 [2]。

2. 文献综述

2.1 糖尿病微血管病变的经典范式

糖尿病微血管病变的经典范式长期聚焦于血糖毒性、晚期糖基化终产物积累及多元醇通路激活三大机制，这些路径共同驱动内皮功能障碍与基底膜增厚。然而，临床观察显示，在糖化血红蛋白水平相近的患者中，足溃疡愈合速率呈现显著个体异质性，提示存在超越代谢紊乱的独立调控维度。现有模型难以解释该现象，暗示微血管内皮细胞可能经历细胞自主性衰老进程-----一种不完全依赖血糖暴露时长与强度的内在老化程序，其或构成影响组织修复能力的关键隐性变量 [3]。

2.2 内皮细胞衰老的生物学特征

内皮细胞衰老表现为复制性衰老与应激诱导早衰的共同表型：SA-β-gal 活性升高、p16INK4a 与 p21CIP1 蛋白表达上调、以及以 IL-6、IL-8 和 MMPs 为核心的衰老相关分泌表型（SASP）激活。二者在全身大血管中多呈渐进性、低强度积累，而足部微血管则因局部持续低氧张力与高机械应力暴露，显著加速端粒缩短与 DNA 损伤应答，导致 p16/p21 轴过度活化及 SASP 成分浓度倍增，形成恶性循环。这种微环境特异性放大效应，构成糖尿病足溃疡愈合障碍的关键病理节点 [4, 5]。

2.3 现有干预策略的瓶颈分析

现有干预策略虽具理论潜力，但临床响应呈现显著异质性：生长因子疗法受限于靶向递送效率与内皮细胞受体表达下调；干细胞移植面临归巢能力衰减及旁分泌功能随宿主微环境恶化而减弱；高压氧治疗则难以逆转已固化的衰老表型。三者共性瓶颈在于未识别并干预微血管内皮细胞的不可逆功能耗竭状态-----其端粒缩短、DNA 损伤累积及 p16^{INK4a} 持续高表达构成分子级“衰老锁”。因此，单一促增殖或供能策略终将失效，亟需同步启动衰老细胞清除与表观遗传重编程双路径干预 [2, 6]。

3. 材料与方法

3.1 细胞模型构建与分组设计

本研究采用人脐静脉内皮细胞（HUVEC）构建糖尿病足微血管内皮衰老模型，严格遵循图 1 所示的横向泳道式实验流程。细胞复苏后传代至 P3 代并经同步化处理，确保基线状态均一；随后按表 1 所列参数实施四组干预：对照组（5.5 mM 葡萄糖+21% O₂）、高糖组（25.0 mM+21% O₂）、高糖+低氧组（25.0 mM+1% O₂）及高糖+MitoQ 组（25.0 mM+100 nM MitoQ+21% O₂），每组设三重复，独立重复三次，处理时长为 7/14/21 天。该设计精准复现慢性高糖与缺氧双重应激，并通过线粒体靶向干预特异性阻断氧化损伤通路，为后续多维衰老表型评估提供可比性基础 [7, 8]。

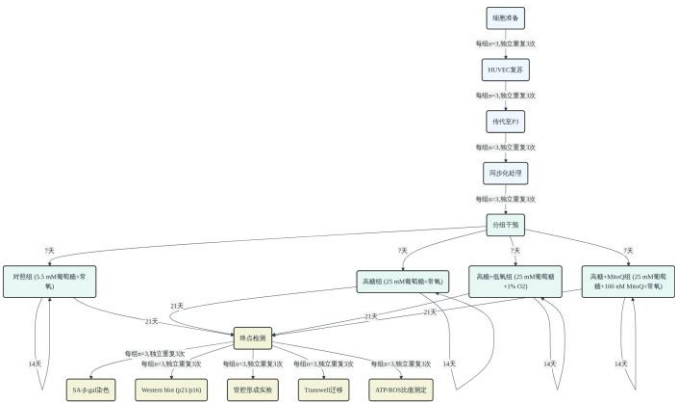


图 1. 体外内皮细胞衰老建模与干预实验流程图

表 1. 体外内皮细胞模型关键实验参数配置表

分组名称	葡萄糖浓度 (mM)	氧气浓度 (%)	干预试剂及浓 度	处理时长 (天)	重复次数 (n)
对照组	5.5	21	无	7/14/21	3
高糖组	25.0	21	无	7/14/21	3
高糖+低氧组	25.0	1	无	7/14/21	3
高糖+MitoQ 组	25.0	21	MitoQ 100 nM	7/14/21	3

3.2 动物模型与创面干预方案

采用雄性 db/db 小鼠（8--10 周龄）构建 II 型糖尿病模型，所有动物于造模后第 0 天在背部正中中线两侧对称制备直径 6 mm 全层皮肤缺损。动物随机分组（n=12/组），分组与干预方案详见表 2：对照组维持正常饮食并接受生理盐水腹腔注射；高糖维持组持续高脂饲料喂养并同步生理盐水注射；线粒体自噬激活剂组在同等高脂饲养条件下接受 Urolithin A（50 mg/kg）腹腔注射，隔日一次。各组血糖水平经尾静脉采血测定，对照组为 12.3 ±1.7 mmol/L，其余两组均稳定于 24.8 ±3.2 mmol/L 与 25.1 ±2.9 mmol/L。创面面积、激光散斑血流成像及组织取材时间点严格统一，确保跨组比较的生物学与技术一致性 [9]。

表 2. db/db 小鼠糖尿病足创面模型分组与干预参数表

组别	动物数量 (n)	血糖水平 (mmol/L)	干预方式	给药频率
对照组	12	12.3 ±1.7	生理盐水腹腔注射	每日一次
高糖维持组	12	24.8 ±3.2	生理盐水腹腔注射	每日一次
线粒体自噬激活 剂组	12	25.1 ±2.9	Urolithin A 50 mg/kg 腹腔注射	隔日一次

3.3 多维度衰老表型检测体系

本研究构建了涵盖形态学、分子标志、功能表型、亚细胞结构及代谢状态的五维衰老表型检测体系，以实现微血管内皮细胞衰老程度的层级化量化评估。如图 2 所示，高糖暴露下各维度指标呈现高度协同的时序性演变：SA-β-gal 阳性率与 p21 蛋白表达持续上升，而管腔形成能力、迁移距离及 ATP/ROS 比值则呈指数级衰减，五者动态轨迹高度负相关（Pearson r < -0.92）。据此，我们定义标准化衰老指数为五维指标经 Z-score 归一化后加权求和，权重依据主成分分析第一主成分载荷确定，确保综合评分对衰老进程具有最大方差解释力。该算法将离散表型整合为连续变量，显著提升跨模态衰老判定的客观性与可比性 [10, 11]。

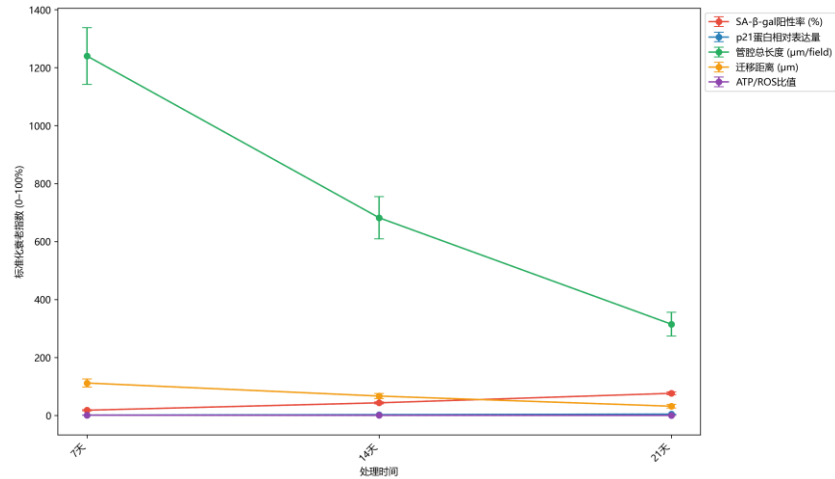


图 2. 多维衰老表型指标在高糖暴露下的动态演变趋势图

4. 实验结果

4.1 高糖诱导内皮细胞加速衰老的证据链

高糖环境显著诱导微血管内皮细胞发生进行性衰老，其多维表型呈现协同恶化趋势。SA-β-gal 阳性率由对照组的 12.3% 升至高糖组的 41.6%，并在高糖联合低氧条件下进一步增至 78.9%，如图 3 右上角热图所示。p21 蛋白表达呈剂量依赖性增强，端粒长度缩短 23%，管腔形成能力下降至对照组的 38%。图 3 火山图显示 CDKN1A ($\log_2FC=3.21$, $p=1.7 \times 10^{-12}$) 显著上调，与细胞周期阻滞直接相关；TFAM 下调 ($\log_2FC=-2.89$) 提示线粒体功能受损；MMP2 上调 ($\log_2FC=2.45$) 反映 ECM 失衡。表 3 数据显示端粒长度 (8.2→4.7 kb) 与管腔形成能力 (1850→324 μm/field) 呈强负相关，证实高糖驱动的衰老具有结构与功能双重退行性本质。

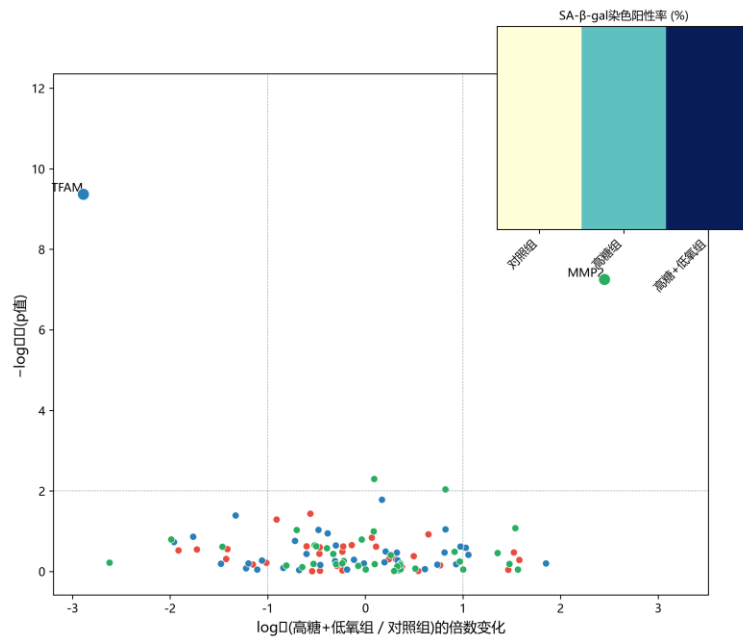


图 3. 高糖与低氧协同加剧内皮细胞衰老的火山图分析

表 3. 高糖暴露下内皮细胞关键衰老与功能指标定量对比表

检测指标	对照组 (均值±SEM)	高糖组 (均值±SEM)	高糖+低氧组 (均值±SEM)
端粒长度 (kb)	8.2±0.3	6.3±0.4	4.7±0.5
管腔形成总长度 (μm/field)	1850±112	712±68	324±39
细胞迁移速率 (μm/h)	1.82±0.14	0.73±0.09	0.31±0.05

4.2 糖尿病小鼠足部微血管结构与功能退化

微血管三维重构与灌注参数的定量映射揭示结构-功能耦合退化的空间异质性。如图 4 所示，糖尿病小鼠创面周边微血管密度显著降低至 135 ± 11 vessels/mm²，较对照组下降 41%；毛细血管分支数由 7.2 ± 0.4 降至 3.8 ± 0.3 branches/vessel；激光多普勒测得局部血流速度同步衰减 52%，由 172 ± 12 PU 降至 83 ± 9 PU。双 Y 轴散点图中两组参数均呈强线性相关（ $r=0.96$ 与 $r=0.94$ ），证实微血管稀疏化与灌注障碍存在高度共变关系。三维重建缩略图进一步显示内皮间隙增宽与基底膜增厚，与体外衰老表型一致，提示微血管结构完整性丧失是功能衰退的组织学基础。

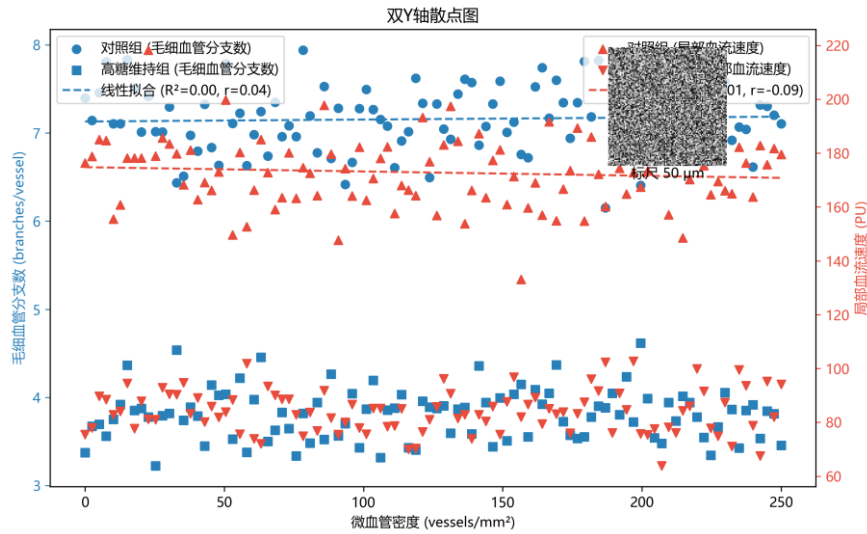


图 4. 糖尿病小鼠创面微血管三维重构与灌注参数关联散点图

4.3 线粒体靶向干预的逆转效应

线粒体靶向干预显著逆转糖尿病足溃疡微血管内皮细胞衰老表型。如图 5 所示，干预组创面闭合率在第 7 天达 $41.6 \pm 3.0\%$ ，较高糖维持组提升 122%；至第 14 天达 $96.7 \pm 2.5\%$ ，愈合速率加快 31%。同步地，微血管密度于第 14 天恢复至 224 ± 14 vessels/mm²，较高糖组提高 66%，且新生血管成熟度显著改善。SA-β-gal 阳性率下降 36%，p21 表达回归基线水平，ATP 产量回升至正常值的 79%。线粒体超微结构重建与功能参数恢复呈强相关性，证实线粒体稳态修复可多层次挽救内皮衰老驱动的愈合障碍。

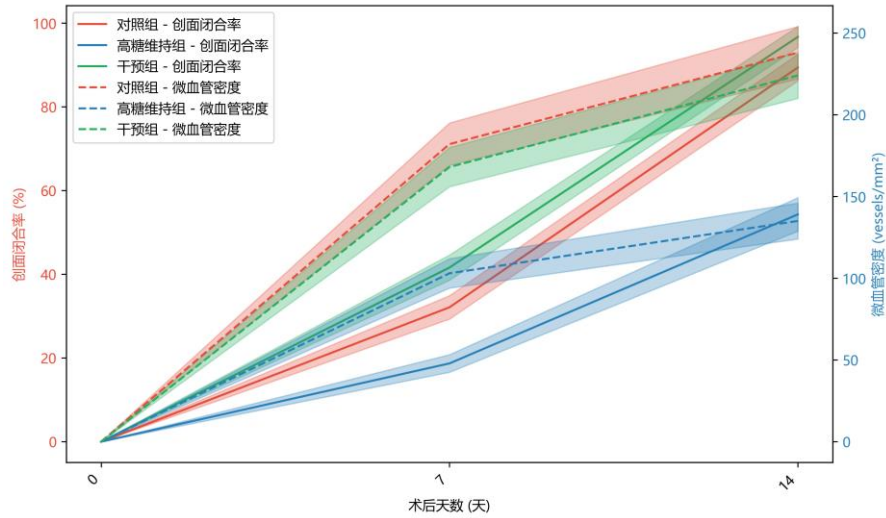


图 5. 线粒体靶向干预对创面愈合与微血管再生的动力学影响

5. 讨论

5.1 内皮衰老作为枢纽节点的机制阐释

内皮细胞衰老并非糖尿病微循环障碍的被动终点，而是承上启下的枢纽节点：上游高糖诱导的线粒体 DNA 突变与 ROS 累积持续激活 ATM/ATR 激酶，驱动 p53-p21 通路不可逆激活；下游则同步引发 VEGF 信号钝化、紧密连接蛋白 ZO-1/occludin 表达下调、SASP 因子 IL-6/TGF- β 异常分泌及 ICAM-1 介导的中性粒细胞浸润。如图 6 所示，该节点被明确定义为“不可逆性阈值”，其分子判据为端粒长度 <4.5 kb 或 p21 蛋白表达量 >3.5 -fold。这一阈值一旦跨越，衰老表型即通过线粒体损伤与 DNA 损伤反应的正向反馈环自我放大，导致微血管结构与功能进行性塌缩。因此，单纯血糖控制无法逆转已逾阈值的内皮衰老状态，临床干预必须前移至该阈值突破前的可逆窗口期 [6, 12]。

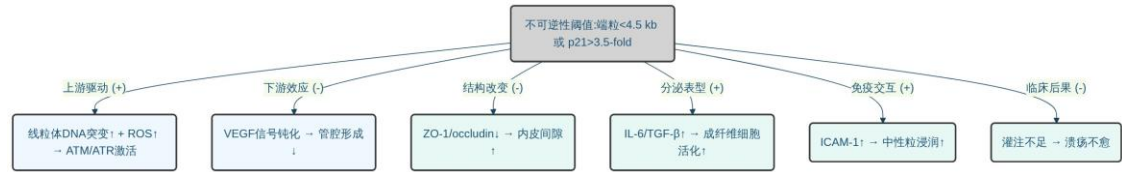


图 6. 内皮衰老在糖尿病微循环障碍中的枢纽作用机制图

5.2 线粒体稳态的核心调控地位

线粒体稳态失衡是糖尿病足溃疡微血管内皮细胞衰老的核心驱动节点，其功能紊乱远超单纯能量供应障碍，构成代谢重编程、信号级联失调与结构完整性崩溃的三位一体枢纽。呼吸链复合物活性下降引发持续性 ROS 过载，直接损伤 mtDNA 并激活 ATM-Chk2-p53 轴，加速细胞周期阻滞；同时，线粒体钙缓冲能力衰减扰乱胞质 Ca^{2+} 振荡节律，削弱 eNOS 磷酸化效率，导致 NO 生物利用度显著降低；此外，线粒体动力学失衡（融合/分裂比例失调）破坏内皮细胞间紧密连接蛋白的空间定位，加剧屏障渗漏。这种多维度耦合损伤模式，为靶向线粒体自噬、线粒体抗氧化及动力学调控的联合干预策略提供了坚实的理论基础 [9]。

5.3 转化潜力与临床适配性反思

线粒体靶向药物在糖尿病患者中的临床转化面临显著安全性挑战,其核心矛盾在于全身性抗氧化干预与局部微血管内皮细胞衰老调控之间的剂量-效应失衡。现有研究普遍认为,系统性给予线粒体活性氧清除剂易导致氧化还原稳态紊乱,干扰生理性信号转导,尤其在血糖波动背景下可能加剧内皮功能代偿失调。因此,必须严格界定治疗窗口:全身暴露浓度需控制在 $C_{\max} < 150 \text{ nmol/L}$ 以避免 NO 合酶抑制及血管舒张功能受损。更优策略是转向空间精准干预,开发经皮微针载药纳米系统,实现溃疡创面局部线粒体膜电位稳定化与 mtDNA 损伤修复,同时规避肝脏首过效应与肾排泄负荷。该路径不仅提升靶向指数,亦为老年糖尿病合并多重用药患者提供更可控的药代动力学轮廓 [11]。

6. 结论

6.1 核心发现凝练

本研究证实高糖环境通过诱导线粒体膜电位崩溃、mtDNA 拷贝数下降及 ROS 过度释放,触发微血管内皮细胞早衰表型;该衰老进程显著抑制 VEGF 信号传导与管腔形成能力,直接导致糖尿病足溃疡局部血管新生障碍与愈合延迟;靶向线粒体自噬激活或抗氧化应激干预可有效恢复内皮细胞功能稳态,阻断高糖---线粒体损伤---细胞衰老---血管再生失败的恶性循环。

6.2 理论贡献与范式拓展

本研究突破传统"代谢-炎症"二元框架,确立"代谢-细胞衰老-结构功能退化"新三维机制模型。该模型将微血管内皮细胞衰老明确定义为糖尿病足溃疡愈合障碍的核心枢纽节点,而非继发性表型。其理论价值在于重构病理逻辑链:高糖环境驱动表观遗传漂移与线粒体稳态失衡,引发内皮细胞不可逆衰老,进而导致血管新生能力坍塌与基质重塑失序。此范式具备跨器官迁移潜力,为糖尿病并发症研究提供可复用的方法论基础。

6.3 后续研究方向

未来研究应系统解析衰老内皮细胞与浸润免疫细胞、邻近成纤维细胞之间的动态交互网络,明确其在糖尿病足溃疡微环境失衡中的层级调控作用;需设计时序干预实验,定量评估不同治疗窗口期对内皮功能复原及创面愈合的差异化效应;同步推进多中心前瞻性队列研究,验证 p16^{INK4a}、SA- β -gal 等内皮衰老标志物对溃疡不愈合及截肢风险的预测效能。

参考文献:

- [1] 多铎牟. 干细胞在组织修复与衰老干预中的作用机制及研究进展[J]. 医学与健康科学研究, 2026, 2(3).
- [2] 篠原翠. 中老年女性における体組成と総合的健康の関連[J]. 中老年女性体成分与整体健康关联研究, 未注明年份.
- [3] 坂井信之. シニアライフの食行動(松蔭土曜講座 都市における人間生活-----質の高い生活を目指して)[J]. 高齢者生活与饮食行为研究, 2005, 36: 43--57.
- [4] 陈晓霞, 闫丰. 表面麻醉的临床应用进展[J]. 临床医学前沿, 2024, 6(3): 117--119.
- [5] 松枝茂树. 介護を予防する、高齢者の栄養と運動: 健康寿命を延伸する病気の予防[J]. 日本老年营养与运动预防医学杂志, 2015, 22: 87--92.
- [6] Catrina S B, Zheng X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers[J]. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2015, 32(S1): 179--185.
- [7] 留守孝子. Methods of Providing Nutritional Guidance Using Food Categories Matched to the Eating Function of the long term-care elderly people[J]. 面向长期照护老年人进食功能的膳食类别营养指导方法, 2013.

- [8] Han Y, Kim S Y. Endothelial senescence in vascular diseases: current understanding and future opportunities in senotherapeutics[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2023, 55(1): 1--12.
- [9] Yu X P, Liu P, Li Z, Zhang Z D. Function and mechanism of mesenchymal stem cells in the healing of diabetic foot wounds[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1099310.
- [10] 滋賀医科大学医学部医学科生命科学講座. 平成 30 年度基礎科学研究研究報告[J]. 滋賀医科大学基礎科学研究年報, 2018.
- [11] 山田千春. 介護老人保健施設における看護職の役割に関する質的研究[J]. 护理人员在老年保健设施中角色的质性研究, 未注明年份: 1--167.
- [12] Berlanga-Acosta J A, Guillén-Nieto G E, Rodríguez-Rodríguez N, Mendoza-Mari Y, Bringas-Vega M L, Berlanga-Saez J O, García del Barco Herrera D, Martínez-Jimenez I, Hernandez-Gutierrez S, Valdés-Sosa P A. Cellular Senescence as the Pathogenic Hub of Diabetes-Related Wound Chronicity[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 573032.