

参黄合剂对大鼠瘻管创面血管及内皮细胞的影响

王传思¹, 谢贻祥¹, 于庆生², 姚磊¹, 黄鸿武¹, 王永森¹, 王小龙¹

摘要 目的: 观察参黄合剂对大鼠瘻管创面组织中血管生成及内皮细胞凋亡的影响。**方法:** 选用 180 只雄性 SD 大鼠用于瘻管术后模型, 造模成功后, 按随机数字表法分为空白对照组、空白模型组、模型对照组、生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组等 6 组, 每组 30 只。分别于术后第 1、7、14 d 从各组取出 10 只大鼠处死取标本, 观察各组大鼠创面肉芽形态变化及血管内皮细胞凋亡情况。**结果:** 术后 1 d、7 d 和 14 d 空白对照组镜下毛细血管及凋亡细胞无明显变化; 其余各组术后 1 d 可见凋亡细胞、毛细血管及大量渗出液及炎性细胞, 术后 7 d、14 d 可见大量由内皮细胞增生形成的实性细胞索及扩张的毛细血管, 在毛细血管周围有许多新生的成纤维细胞, 凋亡细胞、渗出液及炎性细胞逐渐减少。在术后第 7 d 时参黄合剂组 VEGF mRNA (13.64 ± 3.19) 开始增加, 凋亡指数 (1.92 ± 0.15) 开始下降, 均达到高速增长期; 第 14 d 参黄合剂组 VEGF mRNA (18.48 ± 3.18) 继续上升、凋亡指数 (1.48 ± 0.16) 继续下降, 速度放缓。治疗 7 d 时, 参黄合剂组大鼠创面肉芽组织中 VEGF mRNA 及凋亡指数与空白对照组 VEGF mRNA (7.37 ± 1.32)、凋亡指数 (2.42 ± 0.16), 生理盐水组 VEGF mRNA (7.76 ± 1.05)、凋亡指数 (2.53 ± 0.17) 及高锰酸钾组 VEGF mRNA (10.53 ± 1.24)、凋亡指数 (2.16 ± 0.17) 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗 14 d 时, 参黄合剂组创面 VEGF mRNA 及凋亡指数与空白对照组 VEGF mRNA (9.46 ± 1.25)、凋亡指数 (2.15 ± 0.14), 生理盐水组 VEGF mRNA (9.47 ± 1.73)、凋亡指数 (2.22 ± 0.15) 及高锰酸钾组 VEGF mRNA (14.65 ± 1.45)、凋亡指数 (1.76 ± 0.11) 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 参黄合剂促进创面肉芽组织中血管生成, 抑制了血管内皮细胞的凋亡, 调节了 VEGF mRNA 的表达, 加速创面修复。

关键词: 参黄合剂; 瘻管; 血管生成; 内皮细胞凋亡; 大鼠

中图分类号: Q95-33; 文献标识码: A 文章编号: 1007-6948(2019)01-0049-07

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.01.011

Effect of Shenhuang Mixture on Blood Vessel and Endothelial Cells of Rat Fistula Wound WANG Chuanshi, XIE Yi-xiang, YU Qing-sheng, et al. *Department of Anorectal Surgery, The Affiliated Lu'an Hospital of Anhui Medical University, Lu'an (237005), China*

Abstract: Objective To observe the effect of Shenhuang Mixture on angiogenesis and endothelial cell apoptosis in rat fistula wound tissue. **Methods** Male Sprague-Dawley rats (180 rats) were used for the post-fistula model. After the model was established successfully, the rats were divided into blank control group, blank model group, model control group, saline group, potassium permanganate group and Shenhuang Mixture group ($n=30$). Ten rabbits were sacrificed on day 1, 7 and 14 after operation respectively from each group to observe the morphological changes of granulation and apoptosis of vascular endothelial cells. **Result** There was no significant change of capillary and apoptotic cells in the control group on day 1, 7 and 14 after operation. Apoptotic cells, capillaries, exudates and inflammatory cells were observed on day 1 after operation in other groups. On day 7 and 14 after operation, a large number of solid cords and dilated capillaries formed by endothelial cell proliferation were observed. There were many new fibroblasts around the capillaries. Apoptotic cells, exudates and inflammatory cells gradually decreased. On day 7 after operation, the expression of VEGF

mRNA (13.64 ± 3.19) and the apoptotic index (1.92 ± 0.15) in Shenhuang Mixture group began to decrease, all of which reached the high growth phase. On day 14, the VEGF mRNA expression in Shenhuang Mixture group was (18.48 ± 3.18), continued to rise, the apoptotic index (1.48 ± 0.16)

基金项目: 安徽省卫生计生委中医药科研课题项目 (2014zy53); 安徽省卫生和计划生育委员会科研计划项目 (全科医学临床科研课题) (2016QK056)

1. 安徽医科大学附属六安医院结直肠肛门外科 (六安 237005)

2. 安徽中医药大学第一附属医院普外科 (合肥 230031)

通信作者: 于庆生, E-mail: qsy6312@126.com

continued to decline, slowing down. On day 7 after treatment, VEGF mRNA and apoptosis index in granulation tissue of Shenhuang Mixture group were significantly higher than VEGF mRNA (7.37 ± 1.32) and apoptotic index (2.42 ± 0.16) in blank control group, VEGF mRNA (7.76 ± 1.05) and apoptotic index (2.53 ± 0.17) in normal saline group, and VEGF mRNA (10.53 ± 1.24) and apoptotic index (2.16 ± 0.17) in potassium permanganate group ($P < 0.05$). On day 14 of treatment, VEGF mRNA and apoptosis index in Shenhuang Mixture group were significantly higher than VEGF mRNA (9.46 ± 1.25) and apoptotic index (2.15 ± 0.14) in blank control group, VEGF mRNA (9.47 ± 1.73) and apoptotic index (2.22 ± 0.15) in normal saline group, and VEGF mRNA (14.65 ± 1.45) and apoptotic index (1.76 ± 0.11) in potassium permanganate group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The effect of Shenhuang Mixture is to promote angiogenesis in granulation tissue, inhibit the apoptosis of vascular endothelial cells, regulate the expression of VEGF mRNA, and accelerate the wound repair.

Key words: Shenhuang Mixture ; fistula ; angiogenesis ; endothelial cell apoptosis ; rats

肛瘘是临床上常见病、多发病,手术是主要治疗方法,但创面修复缓慢^[1]。为加速创面修复,各种生物制剂正在逐步应用于临床,但效果不确切,中医药因疗效肯定而得到推广应用^[2]。本课题组通过前期临床实验研究发现,中药能明显减轻肛瘘术后疼痛,减少出血,促进创面愈合^[3]。创面修复是一个多种细胞因子调控的复杂的生物学过程,而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所知对血管内皮细胞的激活作用最强的细胞因子,我们前期临床研究亦发现参黄合剂对于内痔患者的 VEGF 具有很好的调控作用^[4],目前,国内外尚无公认的肛瘘术后模型,我们通过对污染性创面进行改良,模拟肛瘘术后的局部微环境,通过建立大鼠体表瘘管模型,发现参黄合剂能够促进创面血管生成及改善微循环^[5]。本研究进一步观察不同时段中药参黄合剂熏洗对大鼠体表瘘管创面血管生成及内皮细胞凋亡的影响,以期从多角度探讨参黄合剂治疗肛瘘的深层机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 健康成熟雄性 Sprague-Dawley 大鼠,清洁级,2月龄,体质量 200~250 g(安徽医科大学动物实验中心提供),动物许可证号为 SCXK(皖)2014-0005。

1.2 药物制备 参黄合剂:将中药苦参、黄柏、孩儿茶、五倍子、乌头、樟脑、冰片、制乳没按 20、20、10、5、10、10、15、15 质量比混合,量取混合生药 180 g,加水 500 mL,煎 30 min(其中乌头先煎,樟脑、冰片后下),过滤浓缩至 1.0 g/mL 的生药煎剂(六安市人民医院中药房提供并制备),4℃保存,给药前复温。生理盐水购自山

东齐都药业有限公司(国药准字 H20113297),高锰酸钾购自济南康福生制药有限公司(国药准字 H37022233)。

1.3 主要仪器与试剂 TUNEL 试剂盒(上海罗氏诊断产品有限公司),抗 α -SMA 单抗、抗鼠 IgG2a-过氧化物酶、苏木精、伊红(上海杰美基因医药科技有限公司),DAB 显示液(武汉博士德生物工程有限公司),MV2CP410 摄像机、IMS 细胞图像分析系统、CCD 摄像机、100 倍光学显微镜、Nikon 80i 荧光显微镜、透射电镜(JEOLI200EX,新飞达光学仪器公司)。

1.4 动物模型制备 参照王琛^[6]SD 大鼠颈背部埋置弹簧纱条加种植金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液的方法,制备成一种病情相对稳定,重复性好,适合于进行防治研究的体表瘘管模型,术前用电动剃刀在所有大鼠颈背部剃毛备皮,面积约为 4 cm × 4 cm。采用氯胺酮按 100 mg/kg,行腹腔麻醉。麻醉达效后用新洁尔灭酊消毒皮肤。用小圆刀在脊柱左侧 1.5 cm,颈后 1 cm 处做一长 0.5 cm 与脊柱垂直的切口,在其尾骨侧相距 3 cm 处做另一长 0.5 cm 的垂直切口,两处切口均深达皮下肌层,用血管钳自一切口内探入,钝性分离,穿过肌层后自另一切口处探出,引入弹簧纱条后用三角缝针在两端切口分别将弹簧边缘与皮肤缝合固定。用 1 mL 注射器抽取 9×10^8 CFU/mL 浓度的金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌混合菌液注入大鼠弹簧纱条内,每只大鼠注入量均为 0.2 mL(ATCC25922,由六安市人民医院临床检验中心提供, 1×10^{10} CUF/L),造模后 30 d,拆除所有大鼠的弹簧纱条,见瘘口有脓性分泌物者为造模成功,所有入选造模大鼠常规行瘘管切开挂线术,使之

形成一个“急性、开放、渗血、感染”创面，即造成类似于临床肛瘘术后的创面，以后每次治疗前 0.5 h 在创面上滴加大肠埃希菌。空白对照组不作任何处理，空白模型组仅作造瘘不做瘘管切开挂线术，模型对照组仅作瘘管切开挂线术，不用任何药物处理。

1.5 动物分组及给药 选用 SD 大鼠 180 只，常规适应性饲养一周，按随机数字表法分为 6 组：空白对照组、空白模型组、模型对照组、生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组，每组 30 只，空白对照组、空白模型组、模型对照组正常喂养，生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组分别给予生理盐水纱条，高锰酸钾 1:5000 水浸泡纱条，参黄合剂浸泡纱条湿敷 30 min，于术后第 1 d 开始，每天上午、下午各一次，总疗程 14 d。

1.6 观测指标及方法 标本提取及形态学观察：第 1、7、14 d 从每组中随机取 10 只大鼠，其中 5 只立即腹腔注射麻醉后脱颈处死，空白对照组取相应部位正常组织，其余 5 组取创面边缘至创面中心的宽约 0.5 cm 的创面边缘修复肉芽组织，面积约 0.5 cm × 0.5 cm，称重待测，另 5 只作创面肉芽组织的分离、培养。取 1 克创面肉芽组织，常规固定、石蜡切片、HE 染色，在普通光镜下观察创面肉芽组织形态学改变情况并摄片。

凋亡检测：瘘管组织匀浆后，冰 PBS 洗 2 次后，用含 2% 胎牛血清的 PBS 制备单细胞悬液，调整细胞数为 $(1\sim 2 \times 10^9/L)$ ；取 1 mL 细胞至 1.5 mL 离心管中，加 3 mL 冰冷的 70% 乙醇；4 ℃ 固定细胞 24 h。取固定后的细胞，再用 PBS 洗 2 遍，离心倒掉乙醇，加入 100 g/L 的 RNase A 1 mL，37 ℃ 水浴，加入 1 mL PI (20 mg/L) 染色液，4 ℃ 避光孵育 30 min 后，用流式细胞术检测各组大鼠 VEGF 的 DNA 含量 ($n=3$)，分析凋亡指数 (凋亡指数 = 凋亡细胞数目 / 总细胞数目 × 100%)。

用 RT-PCR 法检测中药治疗前后大鼠肉芽组织中 VEGF mRNA 表达情况 ($n=3$)。

1.7 统计学方法 应用 SPSS12.0 统计软件进行统计学处理，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，每组治疗前后自身比较进行配对 *t* 检验，组间比较用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普通光镜下观察肉芽组织形态 术后 1 d 镜下空白对照组无明显变化，空白模型组、模型对照组、生理盐水组、高锰酸钾组及参黄合剂组标本均可见毛细血管、大量渗出液和炎性细胞，各组之间未见明显区别，术后 7 d 空白对照组无明显变化，余 5 组可见大量由内皮细胞增生形成的实性细胞索及扩张的毛细血管，向创面垂直生长，并以小动脉为轴心，在周围形成祥状弯曲的毛细血管网。在毛细血管周围有许多新生的成纤维细胞，渗出液及炎性细胞明显减少，空白模型组、模型对照组、生理盐水组之间比较未见明显区别，高锰酸钾组及参黄合剂组与空白模型组、模型对照组、生理盐水组比较增加较明显，参黄合剂组比高锰酸钾组增加明显，参黄合剂组增加最明显，术后 14 d 空白对照组无明显变化，余 5 组毛细血管及成纤维细胞较第 7 d 仍有增加，增幅下降，渗出液及炎性细胞明显减少，空白模型组、模型对照组、生理盐水组之间比较未见明显区别，高锰酸钾组及参黄合剂组与空白模型组、模型对照组、生理盐水组比较增加较明显，参黄合剂组增加最明显。具体见图 1-3。

2.2 流式细胞仪检测各组大鼠瘘管内皮细胞凋亡情况 术后 1 d 各组存在一定数量的凋亡细胞，各组之间未见明显区别，术后 7 d 空白对照组无明显变化，余 5 组凋亡细胞明显减少，空白模型组、模型对照组、生理盐水组之间比较未见明显区别，

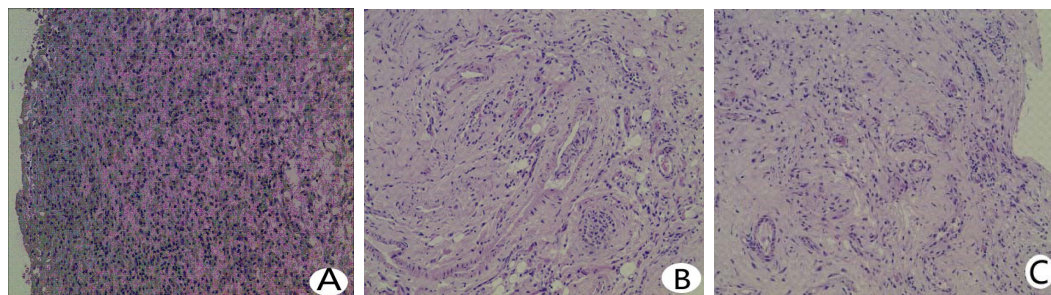


图 1 生理盐水组术后 1 d、7 d、14 d (HE 染色 × 100)

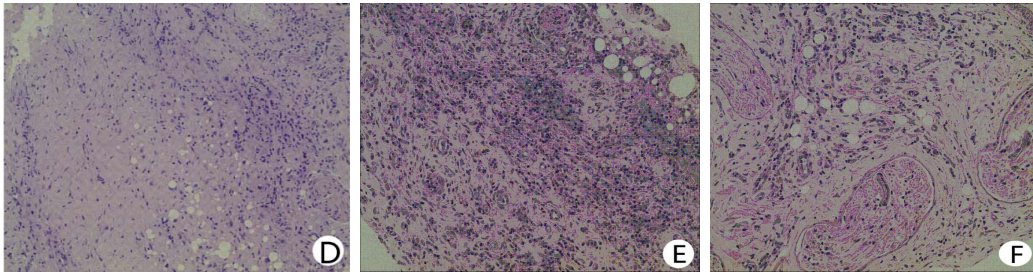


图 2 高锰酸钾组术后 1 d、7 d、14 d 肉芽 (HE 染色 × 100)

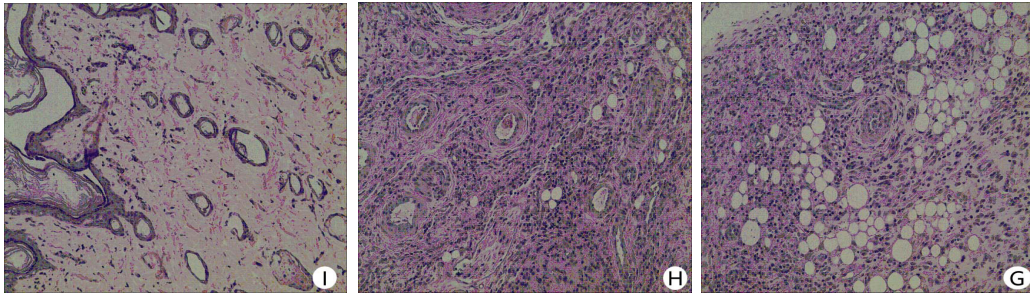


图 3 参黄合剂组术后 1 d、7 d、14 d 肉芽 (HE 染色 × 100)

高锰酸钾组及参黄合剂组与空白模型组、模型对照组、生理盐水组比较减少较明显,参黄合剂组减少最明显。术后 14 d 空白对照组无明显变化,余 5 组凋亡细胞较第 7 d 仍有减少,降幅减小,空

白模型组、模型对照组、生理盐水组之间比较未见明显区别,高锰酸钾组及参黄合剂组与空白模型组、模型对照组、生理盐水组比较减少较明显,参黄合剂组减少最明显。具体见图 4-6。

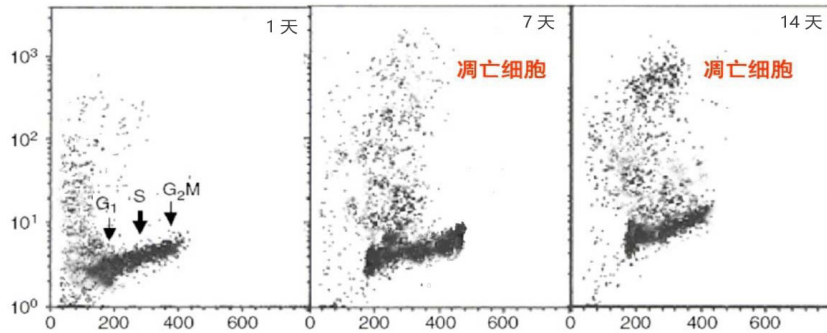


图 4 生理盐水组血管内皮细胞凋亡图

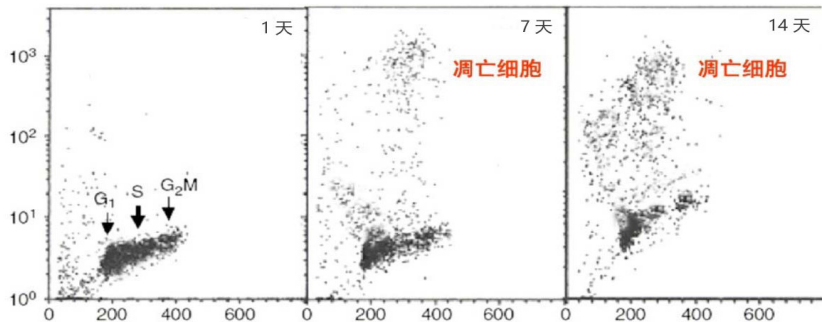


图 5 高锰酸钾组血管内皮细胞凋亡图

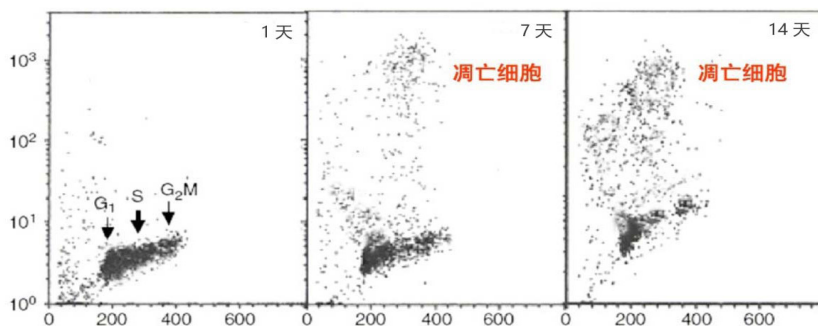


图 6 参黄合剂组血管内皮细胞凋亡图

2.3 各组大鼠瘘管内皮细胞凋亡指数 术后 1 d 各组大鼠凋亡指数未见明显区别, 参黄合剂组与高锰酸钾组、生理盐水组、空白模型组、模型对照组相比差异不具有显著性 ($P>0.05$), 参黄合剂组、高锰酸钾组、生理盐水组、空白模型组、模型对照组各组术后 7 d、14 d 与 1 d 相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。参黄合剂组和高锰酸钾组治

疗 7 d, 凋亡指数均降低, 与生理盐水组、空白模型组、模型对照组比较差异均有显著性 ($P<0.05$)。参黄合剂组和高锰酸钾组治疗 14 d, 凋亡指数均进一步降低, 与参黄合剂组和高锰酸钾组治疗 7 d 相比, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。治疗 7 d、14 d 参黄合剂组与高锰酸钾组组间比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 凋亡指数 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

组别	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照组	2.80 ± 0.22	2.84 ± 0.19	2.60 ± 0.14
空白模型组	2.82 ± 0.24	2.46 ± 0.13	2.18 ± 0.18
模型对照组	2.76 ± 0.26	2.42 ± 0.16	2.15 ± 0.14
生理盐水组	2.72 ± 0.21	2.53 ± 0.17	2.22 ± 0.15
高锰酸钾组	2.60 ± 0.19 ^a	2.16 ± 0.17 ^a	1.76 ± 0.11 ^a
参黄合剂组	2.66 ± 0.17 ^a	1.92 ± 0.15 ^{a, b}	1.48 ± 0.16 ^{a, b}

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

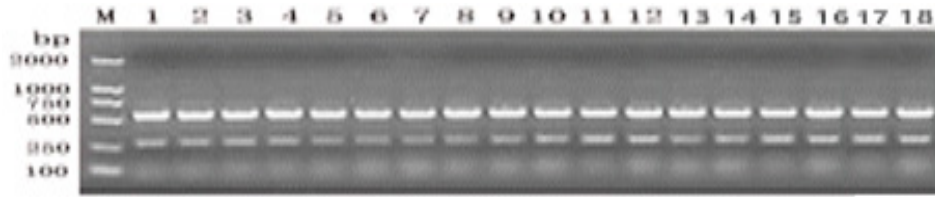
2.4 创面组织中 VEGF mRNA 的表达 数值取与内参基因 β -actin 表达量比值计算, RT-qPCR 结果显示, 术后 1 d 各组大鼠 VEGF mRNA 表达未见明显区别, 与对照组相比差异不具有显著性 ($P>0.05$), 各组术后 7 d、14 d 与 1 d 相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。参黄合剂组和高锰酸钾组治疗 7 d, VEGF mRNA 表达均上升, 与生理盐水

组、空白模型组、模型对照组比较差异均有显著性 ($P<0.05$)。参黄合剂组和高锰酸钾组治疗 14 d, VEGF mRNA 表达均进一步升高, 与治疗 7 d 相比, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。治疗 7 d、14 d 参黄合剂组和高锰酸钾组组间比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 大鼠创面 VEGF mRNA 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照组	4.10 ± 1.02	4.99 ± 1.14	5.12 ± 1.06
空白模型组	4.22 ± 1.23	7.56 ± 0.13	9.18 ± 1.11
模型对照组	4.23 ± 1.07	7.37 ± 1.32	9.46 ± 1.25
生理盐水组	4.42 ± 1.29	7.76 ± 1.05	9.47 ± 1.73
高锰酸钾组	4.72 ± 1.09 ^a	10.53 ± 1.24 ^a	14.65 ± 1.45 ^a
参黄合剂组	4.67 ± 1.35 ^a	13.64 ± 3.19 ^{a, b}	18.48 ± 3.18 ^{a, b}

注: 与对照组比较: ^a $P<0.05$; 与模型组比较: ^b $P<0.05$



注：上层为 β -actin，下层为目的基因，1、2、3、4、5、6为术后1 d空白对照组、空白模型组、模型对照组、生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组；7、8、9、10、11、12为术后7 d空白对照组、空白模型组、模型对照组、生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组；13、14、15、16、17、18为术后14 d空白对照组、空白模型组、模型对照组、生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组。

图7 参黄合剂对大鼠瘘管创面 VEGF mRNA 表达电泳图

3 讨论

肛瘘占我国肛门直肠疾病总发病率的1.67% ~ 3.60%，多是肛痈溃后或切开引流排脓后，脓腔得以修复，由新生的肉芽组织和结缔组织填充，但由于原发内口的存在，感染物不断由内口进入瘘道，使管腔不能完全闭合而形成由致密结缔组织包绕的慢性病理性管道^[7]。手术是目前国内外治疗肛瘘的主要方法，不管何种手术方式，造成创伤是不可避免的，必然就形成一个“开放、急性、渗血”的肛瘘创面^[8]。

我们通过肛瘘术后的中医系统辨证分析，确立了中医证型（湿热内蕴、经络淤阻）和治疗方法（清热祛湿、活血消肿），组成了方剂（参黄合剂）和药物。既往研究表明中药参黄合剂应用于混合痔患者，可以促进炎症消退，减轻术后肿痛，使术后创面愈合时间缩短，效果显著^[9]。进一步应用于肛周脓肿、肛瘘术后患者，亦取得了显著的临床效果，可明显缩短疗程，促进组织修复和创面愈合^[3,10]。因此在肛肠科疾病术后的愈合过程中，及时应用中药参黄合剂，能够发挥传统中医中药在这方面的优势。尽管现在该领域研究较多，但都停留在临床观察阶段，没有对调控机制进行深入系统研究，这就使中医中药在这一领域里的应用受到制约。

为了对瘘管进行更深入的研究，多年来人们一直在寻找一种可重复性好、简单、经济且与临床接近的动物模型。临床上发现由脓肿形成瘘管是一个慢性过程，我们结合文献，采用3 cm长，外径0.4 cm的弹簧内置纱条后置入大鼠肌层内，再注入细菌，既可以使细菌与周围组织广泛接触，又不会在拔除时破坏管壁组织，局部病理检查发现，金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液组的管壁组织结构与临床瘘管结构相似：管腔周围见肉芽组织明显增生，大量成纤维细胞生成，炎症细胞

浸润和少量新生毛细血管，伴不均匀的内层增生，每次治疗前0.5 h在创面上滴加大肠埃希菌，以模拟肛瘘创面污染环境，使实验更接近于真实临床环境^[6]。

创面修复是多种细胞因子参与调控的，以恢复正常组织的功能和形态完整为目的的复杂的细胞活动^[11]。在此过程中，局部血供情况直接影响创面组织修复。创伤愈合过程中，创伤部位产生的新生血管，既能保证创面组织修复所需要的营养和氧、生物活性物质，也有利于坏死物质的吸收和运输，控制局部感染。因此，血管生成对创面组织愈合有着非常重要的意义^[12]。本次实验将参黄合剂应用于瘘管术后创面的动物模型上，在创面修复的不同时期，参黄合剂组创面局部血管生成明显高于高锰酸钾组、生理盐水组及空白模型组，表现出对创面修复过程中毛细血管具有较好的调节作用，明显加速了创面新生血管生成，有效地加快创面愈合速度，提高创面愈合质量。

由于肛瘘创面所处位置的关系，修复缓慢^[13]。创面修复虽是多种细胞因子参与调控的复杂的细胞活动，但发挥了十分重要作用的VEGF是血管内皮细胞激活的第一步。VEGF是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原，特异地作用于血管内皮细胞促进血管生成^[14]。VEGF结合于内皮细胞表面VEGF受体的胞外区，磷酸化此区域内的酪氨酸残基，激活下游蛋白，促进内皮细胞分裂、增殖和迁移，阻止新生细胞凋亡，促进创面修复^[15]。

本实验结果表明，在创面修复的不同时期，参黄合剂组创面局部VEGF mRNA表达明显高于高锰酸钾组、生理盐水组及空白模型组，参黄合剂组创面局部凋亡细胞及凋亡指数明显低于高锰酸钾组、生理盐水组及空白模型组，对创面修复过程中VEGF表达具有较好的调节作用，通过抑

制细胞凋亡功能,明显加速了创面 VEGF 表达,有效地加快创面的愈合速度,提高创面愈合质量。本模型为肛瘘模型,属于肛周脓肿炎症消退稳定期,加之术后早期手术刺激,局部炎症一般呈一过性升高,加之中药的清热解毒作用,故术后 1 d 细胞凋亡未见明显变化,组间比较未见明显差异。高锰酸钾对创面组织修复的作用机制是利用温热效应,改善局部组织血液循环,控制痉挛收缩,消炎止痛,达到有效的目的。而参黄合剂疗法的作用机制则更为广泛,熏洗疗法可使药物直达创面,加之温热刺激可使创面的微血管扩张,血循环加快,改善回流,同时增强白细胞释放蛋白溶解酶,加速去除病灶处坏死组织。温热还能降低痛觉神经的阈值,使组织松弛,达到消炎止痛,减少出血,促进组织修复,使术后创面愈合时间明显缩短。

本次实验表明,参黄合剂对大鼠瘘管创面组织修复过程中的血管生成的促进作用均优于高锰酸钾,参黄合剂较好地抑制了创面肉芽组织中血管内皮细胞的凋亡,从而调节了创面肉芽组织中 VEGF 的表达。研究发现,参黄合剂可以减轻创面损伤对内皮细胞的影响,降低其凋亡率,降低内皮细胞内钙离子的浓度,促进内皮细胞分泌扩血管、抗凝血功能的血管活性物质,提高 VEGF 和 eNOS 的表达,并显著提高 t-PA/PAI 和 NO/ET 的比值。其可能机制是: VEGF 与 VEGF 受体 VEGFR 结合后,激活了介导的下游信号传导通路:蛋白激酶 C、一氧化氮合酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、鸟苷酸结合蛋白等,从而起到促进细胞增殖、迁移,抗凋亡等作用^[16]。研究中发现,手术损伤的内皮细胞 VEGF 表达降低,而参黄合剂可以提高 VEGF 的表达量,由于 VEGF 的表达增多,下游的 eNOS、NO 的表达也相应增加,因而可以增强内皮细胞的扩张血管能力。参黄合剂还可以抑制细胞内钙离子浓度的增高,发挥钙离子拮抗剂的作用,因此可能通过抑制钙离子浓度增高而诱导的细胞凋亡。VEGF 还可以诱导内皮细胞分泌 t-PA 等,以此降解细胞外基质,介导内皮细胞迁移和浸润,诱导新生血管形成^[17]。在促进慢性难愈性创面的修复方面,起着重要作用。他人的研究成就以及我们以往的工作积累启发我们得出这样的结论:传统中医中药应用于肛瘘术后开放性创面,可以提高创面的血管生成,而且这种调节功能的实现是从调控 VEGF 基因表达和抑制细

胞凋亡开始,进而实现对细胞和分子的调控。

但是参黄合剂对创面修复的影响是多系统多途径的,是各种因素综合作用的结果,我们仅仅从增殖途径加以验证,其他方面,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王晓云,陈玉林.创面愈合的免疫调控[J].现代康复,2001,5(2):64-65.
- [2] 中华中医药学会肛肠分会.肛瘘临床诊治指南(2006版)[J].中国中西医结合杂志,2014,36(2):520-524.
- [3] 王传思,谢贻祥.熏洗 I 号方治疗肛瘘术后疗效观察[J].陕西中医,2011,32(4):450-452.
- [4] 王传思,谢贻祥,郑学海,等.参黄合剂对内痔组织血管内皮细胞生长因子表达的影响[J].中国肛肠病杂志,2013,33(7):7-9.
- [5] 王传思,谢贻祥,郑学海,等.熏洗 I 号对大鼠肛瘘术后创面组织血管生成、微循环的调控[J].中华实验外科杂志,2017,34(9):1516-1518.
- [6] 王琛,曹永清,郭修田,等.体表瘘管大鼠模型的建立[J].上海中医药大学学报,2007,21(6):62-65.
- [7] 张东岳,刘佃温.中西医结合肛肠病学[M].北京:中国文联出版社,2004:653.
- [8] 郑雪平,许慧琴,丁义江,等.复方珠黄霜对兔背部人粪污染创面愈合的实验研究[J].中国中西医结合外科杂志,2002,8(5):361-364.
- [9] 高玲,王传思,李先元,等.熏洗 I 号方在湿热下注型混合痔术后的作用[J].中国中西医结合外科杂志,2008,23(4):56-59.
- [10] 王传思,谢贻祥.熏洗 I 号方治疗肛周脓肿术后疗效观察[J].四川中医,2011,29(12):91-92.
- [11] Zhang L, Lin X, Wang W, et al. Circulating level of vascular endothelial growth factor in differentiating hemangioma from vascular malformation patients[J]. Plast Reconstr Surg, 2017, 16(1): 200-204.
- [12] 刘文忠,付小兵,程颺,等.深 II 度烫伤大鼠创面血管内皮细胞增殖与凋亡的变化在创伤修复中的作用[J].中国临床康复,2015,6(24):3674-3676.
- [13] Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing[J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 2016, 5(13): 40-46.
- [14] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis[J]. Kidney Int, 1999, 56(3): 794-814.
- [15] 郭修田,董青军,曹永清.温和灸对大鼠肛瘘术后创面组织修复中血管生成及微循环的影响[J].中西医结合学报,2009,7(12):1154-1158.
- [16] McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis[J]. Oncologist, 2016, 5(1): 3-10.
- [17] Carmeliet P, Cohen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 297(2): H2091-H2104.

(收稿:2017-11-02 修回:2018-12-17)

(责任编辑:王丰)