

# 参黄合剂对大鼠瘻管创面血管内皮细胞信号通路的影响

王传思, 谢贻祥, 姚 磊, 黄鸿武, 王永森

(安徽医科大学附属六安医院结直肠肛门外科, 安徽 六安 237005)

**[摘要]**目的 观察参黄合剂对大鼠瘻管创面组织中血管内皮细胞信号通路 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 蛋白及其 mRNA 的影响。**方法** 将 180 只雄性 SD 大鼠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, 每组 30 只。采用弹簧纱条埋置于大鼠颈背部并加混合菌液的方法复制体表瘻管模型。术后 1、7、14 d, 分别采用 Western blot 法、RT-PCR 法检测各组大鼠创面组织中 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 蛋白及其 mRNA 表达水平。**结果** 除空白对照组外, 其余 5 组大鼠创面 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 蛋白及其 mRNA 表达水平均随术后时间的延长而明显升高; 术后 14 d, 其余 5 组上述指标(除高锰酸钾组 PIP2 mRNA 外)表达水平显著高于术后 1 d ( $P < 0.05$ )。术后 1、7、14 d, 高锰酸钾组和参黄合剂组 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 蛋白及其 mRNA 表达水平均高于空白对照组、模型对照组和生理盐水组; 术后 7、14 d, 参黄合剂组 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 蛋白及其 mRNA 表达水平均显著高于空白对照组、模型对照组和生理盐水组 ( $P < 0.05$ ), 部分指标表达水平显著高于高锰酸钾组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 参黄合剂对大鼠瘻管创面组织中血管内皮细胞信号通路相关因子的表达具有促进作用, 从而促进血管新生, 加速创面愈合。

**[关键词]**参黄合剂; 瘻管; 血管内皮细胞; 信号通路

**[中图分类号]**R266 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2019.01.018

肛瘻是临床常见病、多发病, 手术是其主要治疗方法, 但创面修复缓慢<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。本课题组通过前期临床实验研究发现, 中药参黄合剂能明显减轻肛瘻术后疼痛, 减少出血, 促进创面愈合<sup>[3]</sup>。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激活作用最强的细胞因子, 前期临床研究亦发现参黄合剂对内痔患者 VEGF 具有很好的调控作用<sup>[4]</sup>。目前, 国内外尚无公认的肛瘻术后模型, 笔者通过对污染性创面进行改良, 模拟肛瘻术后局部微环境, 建立大鼠体表瘻管模型, 发现参黄合剂能够促进创面血管生成及微循环改善<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨不同时段参黄合剂熏洗对大鼠体表瘻管创面血管内皮细胞信号通路的影响, 为参黄合剂的进一步开发和研究提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 180 只, 清洁级, 2 月龄, 体质量 (200 ± 30) g, 购于安徽医科大学动物实验

中心 [生产许可证号为 SCXK(皖)2014-0005]。

1.2 试剂和药物 参黄合剂 (由苦参、黄柏、孩儿茶、五倍子、乌头、樟脑、冰片、制乳香、制没药组成, 安徽医科大学附属六安医院中药房提供并制备) 按 4:4:2:1:2:2:3:3 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, 4 ℃ 保存, 给药前复温。生理盐水 (国药准字 H20113297); 山东齐鲁药业有限公司。高锰酸钾 (国药准字 H37022233); 山东省济南康福生制药有限公司。抗  $\alpha$ -SMA 单抗、抗鼠 IgG 2 $\alpha$ -过氧化物酶、DAB 显示液; 武汉博士德生物工程有限公司; RT-PCR 试剂盒: Promega 公司; 混合菌液 (金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 批号 ATCC25922) 和大肠埃希菌 (批号 ATCC25912); 安徽医科大学附属六安医院检验中心。

1.3 仪器 荧光定量 PCR 仪: Thermo PIKOREAL 96; MV2CP410 摄像机、100 倍光学显微镜、MetaMorph 显微图像分析系统; 北京科创锐新生物科技有限公司; 酶标仪: 赛百盛 GoldView; UV-754 紫外分光光度计: 浙江省杭州晶格科学仪器有限公司。

## 2 方法

2.1 模型复制、分组及给药 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 按随机数字法分为 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, 每组各 30 只, 按文献<sup>[5]</sup>的方法用弹簧纱条埋

**基金项目:** 安徽省卫生计生委中医药科研课题项目 (2014zy53); 安徽省卫生计生委科研计划项目 (全科医学临床科研课题) (2016QK056)

**作者简介:** 王传思 (1974-), 男, 硕士, 主任医师

置于SD大鼠颈背部并加混合菌液 $1 \times 10^{10}$  CFU/L,制成体表瘻管模型。20 d后拆除大鼠颈背部弹簧纱条,见瘻口有脓性分泌物者为模型复制成功。空白对照组正常喂养,不作造瘻处理;空白模型组仅作造瘻术而不做瘻管切开挂线术;模型对照组仅作瘻管切开挂线术(使瘻管形成一个急性、开放、渗血、感染的创面,形成类似于临床肛瘻术后创面),不用任何药物处理;生理盐水组、高锰酸钾组、参黄合剂组于瘻管切开挂线术后第1天开始,分别用生理盐水纱条、高锰酸钾溶液(1:5 000)纱条、参黄合剂纱条湿敷创面30 min,每次治疗前0.5 h在创面上滴加大肠埃希菌,每日上午、下午各1次,总疗程14 d。

2.2 标本采集 第1、7、14天从每组中随机取10只大鼠,立即腹腔注射水合氯醛麻醉,拉脱颈椎法处死,取创面修复部位 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小肉芽组织,空白对照组取相同部位正常组织。标本于甲醛溶液中固定24 h后,脱水,石蜡包埋, $4 \mu\text{m}$ 石蜡切片, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤24 h。

2.3 免疫组织化学法检测 fms 样酪氨酸激酶插入嵌合受体/胎肝激酶-1(fms-like tyrosine kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1,FLK-1/KDR)、4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 4,5-diphosphate,PIP2)、3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate,PIP3)表达水平 步骤:取蜡片,用二甲苯浸泡脱蜡,无水乙醇水化,PBS冲洗并阻断,进行抗原修复,滴加正常山羊血清封闭液封闭,滴加一抗、二抗、链霉亲和素-过氧化物酶,PBS多次冲洗,DAB显色,苏木精复染,常规脱水、透明、封片、镜检,每张切片选择5个高倍镜视野,应用图像分析系统进行灰度扫描后定量分析。

2.4 RT-PCR法检测 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 mRNA表达水平 各组大鼠麻醉后脱颈椎处死,取创面边缘至创面中心宽约0.5 cm的创面边缘修复肉芽组织, $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 大小,于预冷的乳钵中,加入1.0 mL变性液,迅速研磨成匀浆,用皮试针头抽吸15~20次,使之成乳糜状。采用RT-PCR方法检测。PCR引物及内参照由Invitrogen公司合成。各检测指标引物:

① $\beta$ -actin 荧光定量引物序列:正向引物5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',反向引物5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3',产物长度:150 bp。

②FLK-1/KDR引物序列:正向引物5'-CACACATCATCTTCTGTCCCAA-3',反向引物5'-

CTCTTCTCCCCTTTCCTTCTTA-3',产物长度144 bp。

③PIP2引物序列:正向引物5'-GGTGTG-GTCTTTCGTCCTTCTTA-3',反向引物5'-GT-CATCTGTCTCTGTGCTTCTTGA-3',产物长度152 bp。

④PIP3引物序列:正向引物5'-GGTGTGCT-GTTTCCTCGTTCTTA-3',反向引物5'-GT-CATCTGTCTCTGTGCTGTTGA-3',产物长度150 bp。

先从肉芽组织匀浆中提取RNA,置于PCR反应管中逆转录cDNA, $\beta$ -actin和目的基因体外扩增后通过1%琼脂糖凝胶电泳( $5 \text{ V/cm} \times 30 \text{ min}$ )分析PCR产物,检测目的片段和 $\beta$ -actin加内参片段相应条带的吸光度。吸光度的计算公式: $A = \lg(I_0/I) = -\lg T$ 。式中A为吸光率,T为透光率, $I_0$ 为入射光强,I为透过光强。靶基因mRNA相对表达量=靶基因吸光度值/ $\beta$ -actin吸光度值。

2.5 统计学方法 应用SPSS 12.0进行统计学分析。连续型变量采用“均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )”进行统计学描述。采用两因素混合设计的重复测量数据的方差分析。采用双侧检验,显著性水准为 $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

除了空白对照组,其余5组大鼠创面PIP2、PIP3、FLK-1/KDR蛋白及其mRNA表达水平均随术后时间的延长而明显升高;术后14 d,其余5组上述指标(除高锰酸钾组PIP2 mRNA外)表达水平显著高于术后1 d( $P < 0.05$ )。术后1、7、14 d,高锰酸钾组和参黄合剂组FLK-1/KDR、PIP2、PIP3蛋白及其mRNA表达水平均高于空白对照组、模型对照组和生理盐水组;术后7、14 d,参黄合剂组PIP2、PIP3、FLK-1/KDR蛋白及其mRNA表达水平均显著高于空白对照组、模型对照组和生理盐水组( $P < 0.05$ ),部分指标表达水平显著高于高锰酸钾组( $P < 0.05$ )。见表1、图1。

### 4 讨论

肛瘻占中国肛门直肠疾病总发病率的1.67%~3.60%,多是肛周脓肿溃后或切开引流排脓后,脓腔得以修复,由新生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瘻道,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<sup>[7]</sup>。手术是目前国内外治疗肛瘻的主要方法,不管何种手术方式,均可造成创伤,从而形成一个开放、急性、渗血的肛瘻创面<sup>[8]</sup>。

表1 各组大鼠创面 FLK-1/KDR、PIP2、PIP3 蛋白及其 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	FLK-1/KDR			PIP2		
		术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照	10	13.77±2.18	15.24±1.70 <sup>a</sup>	15.92±1.92 <sup>ab</sup>	10.88±2.70	10.50±1.61	11.66±1.60
空白模型	10	15.43±1.71	20.41±1.98 <sup>a</sup>	26.76±1.87 <sup>*ab</sup>	10.55±1.44	15.48±1.48 <sup>a</sup>	20.55±1.94 <sup>ab</sup>
模型对照	10	14.06±2.28	20.55±2.66 <sup>a</sup>	29.28±2.66 <sup>*ab</sup>	9.36±2.98	14.53±2.40 <sup>a</sup>	18.13±2.83 <sup>ab</sup>
生理盐水	10	15.09±3.37	24.50±6.91 <sup>a</sup>	22.56±6.92 <sup>a</sup>	9.66±4.36	13.56±5.89 <sup>a</sup>	20.27±6.19 <sup>ab</sup>
高锰酸钾	10	15.85±9.56	22.48±12.81 <sup>a</sup>	32.39±18.82 <sup>ab</sup>	12.06±6.09	20.27±9.53 <sup>△△a</sup>	24.20±16.63 <sup>ab</sup>
参黄合剂	10	17.76±15.05	49.51±24.48 <sup>△△□a</sup>	41.73±19.56 <sup>△△□a</sup>	12.89±7.50	21.30±9.70 <sup>△△a</sup>	35.40±18.52 <sup>△△□a</sup>
组别	n	PIP3			FLK-1/KDR mRNA		
		术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照	10	9.98±1.35	10.97±1.93	11.07±1.58	4.27±0.75	4.95±0.72	5.05±0.62
空白模型	10	8.77±2.18	12.28±1.43 <sup>a</sup>	18.79±2.05 <sup>*ab</sup>	4.04±0.97	7.87±1.07 <sup>a</sup>	8.93±0.68 <sup>a</sup>
模型对照	10	8.74±3.07	14.24±2.55 <sup>a</sup>	20.65±3.52 <sup>*ab</sup>	4.96±2.84	8.29±3.27 <sup>a</sup>	7.71±3.01 <sup>a</sup>
生理盐水	10	10.04±3.51	13.08±6.19 <sup>a</sup>	17.64±7.21 <sup>ab</sup>	4.72±3.52	5.41±2.90	8.93±5.76 <sup>ab</sup>
高锰酸钾	10	15.83±11.06 <sup>△△</sup>	20.42±11.47 <sup>△△a</sup>	21.14±13.03 <sup>a</sup>	5.65±4.03	13.80±7.29 <sup>△△a</sup>	15.04±8.76 <sup>△△a</sup>
参黄合剂	10	14.12±5.96 <sup>△△</sup>	27.68±13.18 <sup>△△□a</sup>	32.48±10.43 <sup>△△□a</sup>	6.82±4.70	12.23±7.50 <sup>△△a</sup>	15.64±7.91 <sup>△△□a</sup>
组别	n	PIP2 mRNA			PIP3 mRNA		
		术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照	10	3.36±1.11	3.39±0.97	3.64±0.75	3.66±1.10	3.44±0.69	3.58±0.70
空白模型	10	3.03±0.64	6.39±1.20 <sup>a</sup>	9.09±0.76 <sup>*ab</sup>	3.53±1.03	6.30±1.43 <sup>a</sup>	8.75±0.95 <sup>*ab</sup>
模型对照	10	4.89±3.22	6.21±2.74 <sup>a</sup>	7.81±3.28 <sup>ab</sup>	5.83±3.17	7.22±3.59	9.72±3.86 <sup>*ab</sup>
生理盐水	10	6.48±3.86	6.91±3.93	7.56±4.67 <sup>ab</sup>	5.25±4.15	5.27±3.98	8.57±4.37 <sup>ab</sup>
高锰酸钾	10	9.79±7.27 <sup>△△</sup>	10.91±6.60 <sup>△△</sup>	12.36±8.86	8.42±4.88 <sup>△△</sup>	9.94±6.45 <sup>△△</sup>	14.01±7.87 <sup>△△</sup>
参黄合剂	10	6.28±3.62	14.50±8.09 <sup>△△a</sup>	19.45±8.11 <sup>△△□a</sup>	6.49±4.18	15.24±8.77 <sup>△△□a</sup>	19.80±8.50 <sup>△△□a</sup>

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与空白模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与模型对照组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与生理盐水组比较,<sup>◇</sup> $P < 0.05$ ;与高锰酸钾组比较,<sup>□</sup> $P < 0.05$ ;与术后 1 d 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与术后 7 d 比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

临床研究发现,肛瘘术后多见湿热内蕴、经络瘀阻证,应治以清热祛湿、活血消肿法。既往研究表明,参黄合剂应用于混合痔患者,可促进炎症消退,减轻术后肿痛,缩短术后创面愈合时间<sup>[9]</sup>。参黄合剂可明显缩短肛周脓肿、肛瘘术后患者的疗程,促进创面组织修复和创面愈合<sup>[10]</sup>。

脓肿形成瘘管是一个慢性过程,采用长 3 cm、外径 0.4 cm 的弹簧内置纱条置入大鼠肌层内,再注入细菌,既可以使细菌与周围组织广泛接触,又不会在拔除纱条时破坏管壁组织。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,炎性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<sup>[6]</sup>。

有关创面修复的研究表明,VEGF 分泌是创面修复时血管内皮细胞激活的第一步。VEGF 是目前所知作用最强的唯一特异性作用于血管内皮细胞的促血管生成的细胞因子,是一种高度特异的血管内

皮细胞有丝分裂原。FLK-1/KDR 是 VEGF 发挥促血管生成作用的主要功能性受体,具有明显趋化性和促分裂活性。研究发现,纯合子动物编码 FLK-1/KDR 基因突变会减少已有的血管内皮细胞以出芽方式生成的血管及其功能,而不影响间质原细胞分化为成血管细胞和血细胞生成<sup>[11]</sup>,这提示 KDR 是血管形成的主要调控因子。VEGF 促血管生成的功能主要由其受体 FLK-1/KDR 介导,促进 FLK-1/KDR 的活化可有效促进 VEGF 的信号传导,从而达到促进血管生成、促进肉芽组织生长的目的。VEGF 通过细胞膜上 KDR 将细胞外信号传递至细胞内,激活下游磷脂酶 C- $\gamma$ -蛋白激酶 C-快速加速纤维肉瘤-丁酮-有丝分裂原活化蛋白激酶(phospholipase C- $\gamma$ -protein kinase C-rapidly accelerated fibrosarcoma-methyl ethyl ketone-mitogen-activated protein kinase, PLC- $\gamma$ -PKC-Raf-MEK-MAPK) 信号通路,将信号传递至核内激活 DNA 的合成,促进内皮细胞的增殖<sup>[12]</sup>。KDR 可以活化磷脂酶 C- $\gamma$  (phospholipases C- $\gamma$ , PLC- $\gamma$ ),随后激活 PKC 信号通路。KDR 的 C 端 Tyr1175 磷酸化后可与 PLC- $\gamma$  结合,使其磷酸化,增强催化活性。PLC- $\gamma$  水解



Essential role of Flk-1(VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice [J]. Proc Natl

Acad Sci USA, 2005, 102(4):1076-1081.

(收稿日期:2018-04-11;编辑:张倩)

## Effect of Shenhuang Mixture on the Signaling Pathways in Vascular Endothelial Cells in the Wound of Fistula in Rats

WANG Chuan-si, XIE Yi-xiang, YAO Lei, HUANG Hong-wu, WANG Yong-sen

(Department of Colorectal and Anal Surgery, Lu'an Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Lu'an 237005, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of Shenhuang Mixture on the protein and mRNA expression of FLK-1/KDR, PIP2, and PIP3 in vascular endothelial cells in the wound tissue of fistula in rats.

**Methods** A total of 180 male Sprague-Dawley rats were divided into blank control group, blank model group, model control group, normal saline group, potassium permanganate group, and Shenhuang Mixture group using a random number table, with 30 rats in each group. A rat model of surface fistula was established by embedding spring gauze at the back of the neck and adding a mixed bacterial solution. On days 1, 7, and 14 after surgery, Western blot and RT-PCR were used to measure the protein and mRNA expression of FLK-1/KDR, PIP2, and PIP3 in wound tissue. **Results** All groups except the blank control group had significant increases in the protein and mRNA expression of FLK-1/KDR, PIP2, and PIP3 in wound tissue over time after surgery; all indices except the mRNA expression of PIP2 in the potassium permanganate group increased significantly from day 1 to day 14 after surgery ( $P < 0.05$ ). On days 1, 7, and 14 after surgery, the potassium permanganate group and the Shenhuang Mixture group had significantly higher protein and mRNA expression of FLK-1/KDR, PIP2, and PIP3 than the blank control group, the model control group, and the normal saline group; on days 7 and 14 after surgery, the Shenhuang Mixture group had significantly higher protein and mRNA expression of FLK-1/KDR, PIP2, and PIP3 than the blank control group, the model control group, and the normal saline group ( $P < 0.05$ ), and some of these indices in the Shenhuang Mixture group were significantly higher than those in the potassium permanganate group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Shenhuang Mixture can increase the expression of related factors of the signaling pathways in vascular endothelial cells in the wound of fistula in rats and thus promote angiogenesis and wound healing.

**[Key words]** Shenhuang Mixture; Fistula; Vascular endothelial cell; Signaling pathway