三七总皂苷对肛瘘术后大鼠创面愈合的影响及机制Δ

王鑫民[1*]，刘亚坤[2]，李　刚[3]，刘　娟[2]，徐会志[2]，张靖杰[4]，李民路[4]，牛静亚[2]，张丙贵[2,5#]（1.河北中医药大学研究生学院，石家庄　050200；2.河北省第八人民医院普外肛肠科，石家庄　050024；3.石家庄市中医院肛肠科，石家庄　050011；4.石家庄市藁城人民医院普外肝胆科，石家庄　052160；5.河北中医药大学中西医结合临床学院，石家庄　050200）

中图分类号　R285.5；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）06-0695-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.06.10

摘　要　目的　探究三七总皂苷（PNS）调节缺氧诱导因子1α（HIF-1α）/血管内皮生长因子（VEGF）/血管内皮生长因子受体2（VEGFR2）信号通路对肛瘘术后大鼠创面愈合的影响及潜在机制。**方法**　以SD大鼠为对象，采用大肠埃希菌液感染创面的方法复制肛瘘术后大鼠模型，并将其随机分为模型组，PNS低、高剂量组（15、30 mg/cm^2），PNS高剂量+2-甲氧基雌二醇（2ME2）组（PNS 30 mg/cm^2+HIF-1α抑制剂2ME2 4 mg/kg），每组10只；另选10只正常大鼠，仅进行背部脱毛处理，作为对照组。各药物组大鼠肌内或（和）腹腔注射相应药液，每天1次，持续3周。末次给药后，检测各组大鼠的创面愈合率（对照组除外），创面组织微血管密度（MVD）和胶原蛋白Ⅰ（collagen Ⅰ）、纤维连接蛋白（FN）阳性表达情况，血清中血管生成相关因子[VEGF、血管生成素Ⅰ（Ang-Ⅰ）、Ang-Ⅱ]水平和血清、创面组织中炎症因子[白细胞介素6（IL-6）、IL-2]水平，以及创面组织中HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路相关蛋白的表达情况。**结果**　模型组大鼠创面组织MVD及collagen Ⅰ、FN表达水平，血清及创面组织中IL-6、IL-2水平均较对照组显著升高（$P<0.05$），血清中VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平均较对照组显著降低（$P<0.05$）。PNS低、高剂量组大鼠创面愈合率，创面组织MVD，血清中VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平，创面组织中collagen Ⅰ、FN表达水平和HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白的表达水平均较模型组显著升高（$P<0.05$），血清及创面组织中IL-6、IL-2水平均较模型组显著降低（$P<0.05$），且高剂量PNS的作用更强（$P<0.05$）；2ME2可减弱PNS对肛瘘术后大鼠上述指标的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　PNS可促进血管生成相关因子产生并抑制促炎因子生成，从而促进肛瘘术后大鼠创面的愈合，上述作用与激活HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路有关。

关键词　三七总皂苷；肛瘘；缺氧诱导因子1α/血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体2信号通路；创面愈合

Effect and mechanism of *Panax notoginseng* saponins on wound healing after anal fistula surgery in rats

WANG Xinmin[1], LIU Yakun[2], LI Gang[3], LIU Juan[2], XU Huizhi[2], ZHANG Jingjie[4], LI Minlu[4], NIU Jingya[2], ZHANG Binggui[2,5]（1. Graduate School, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Dept. of General Surgery and Proctology, the Eighth People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050024, China; 3. Dept. of Proctology, Shijiazhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China; 4. Dept. of General Hepatobiliary Surgery, Gaocheng People's Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 052160, China; 5. Clinical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on wound healing after anal fistula surgery in rats by regulating the hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)/vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) signaling pathway. **METHODS** SD rats were selected to establish a postoperative rat model of anal fistula by infecting wound with *Escherichia coli*. The model rats were randomly grouped into model group, PNS low-dose and high-dose groups (15, 30 mg/cm^2), high-dose of PNS+2-methoxyestradiol (2ME2) group (PNS 30 mg/cm^2+HIF-1α inhibitor 2ME2 4 mg/kg), with 10 rats in each group. Another 10 normal rats were selected for back hair removal treatment as the control group. Each drug group was injected with the corresponding drug solution intramuscularly or (and) intraperitoneally, once a day, for 3 weeks. After the last administration, the wound healing rate (excluding the control group), microvascular density (MVD), the expression of collagen Ⅰ and fibronectin (FN) in the wound tissue were detected in each group; the levels of angiogenic factors [VEGF, angiopoietin-Ⅰ (Ang-Ⅰ), Ang-Ⅱ] in serum, the levels of inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6) and IL-2] in serum and wound tissue as well as the expressions of the related

Δ **基金项目**　河北省中医药管理局中医药类科研计划课题（No. 2019175）

＊ **第一作者**　医师，硕士研究生。研究方向：肛肠疾病诊治。E-mail：842710813@qq.com

通信作者　主任医师，博士。研究方向：肛肠疾病诊治。E-mail：binggui7183@163.com

proteins of HIF-1α/VEGF/VEGFR2 signaling pathway in the wound tissue of rats were also detected in each group. **RESULTS** The MVD, the expression of collagen Ⅰ and FN in the wound tissue, and the levels of IL-6 and IL-2 in serum and wound tissue of rats increased significantly in the model group, compared to the control group ($P<0.05$), while the serum levels of VEGF, Ang-Ⅰ and Ang-Ⅱ decreased significantly ($P<0.05$). The wound healing rate, the MVD in wound tissue, the serum levels of VEGF, Ang-Ⅰ and Ang-Ⅱ, the expressions of collagen Ⅰ and FN in the wound tissue, and protein expressions of HIF-1α, VEGF and VEGFR2 in the PNS low-dose and high-dose groups increased significantly, compared to the model group ($P<0.05$), while the levels of IL-6 and IL-2 in serum and wound tissue decreased significantly ($P<0.05$); the high-dose PNS had a stronger effect ($P<0.05$). 2ME2 could weaken the effect of PNS on above indicators of rats after anal fistula surgery ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** PNS can promote the production of angiogenic factors and inhibit the production of pro-inflammatory factors, thereby promoting wound healing in rats after anal fistula surgery. The above effects are related to the activation of HIF-1α/VEGF/VEGFR2 signaling pathway.

KEYWORDS *Panax notoginseng* saponins; anal fistula; HIF-1α/VEGF/VEGFR2 signaling pathway; wound healing

肛瘘可引发患者肛周疼痛、瘙痒、流脓等，难以治愈且复发率较高。目前，手术是肛瘘临床治疗的主要手段，但由于其是开放式操作，创面易被粪便污染而导致愈合困难，给患者造成极大的痛苦和生活上的不便，因此促使肛瘘患者术后创面尽快愈合非常重要。研究指出，影响肛瘘术后创面愈合的关键是改善创面血液运行和炎症反应，促进血管形成并抑制炎症可有效促使创面血液循环和表皮修复，加快肛瘘患者术后创面愈合速度[1-2]。缺氧诱导因子1α（hypoxia-inducible factor-1α，HIF-1α）作为一种炎症调控因子，可通过调控血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）/血管内皮生长因子受体2（vascular endothelial growth factor receptor-2，VEGFR2）信号通路来调节炎症发生和血管形成过程，在创面愈合中发挥重要作用；此外，HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路受阻可导致糖尿病患者创面愈合延迟，而激活该信号通路则可通过发挥促血管生成、抗菌、抗氧化和抗炎等作用来加快糖尿病模型动物皮肤创面愈合[3-4]。由此本课题组推测，激活HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路可能是改善肛瘘患者术后创面愈合的重要途径。

三七总皂苷（*Panax notoginseng* saponins，PNS）是中药三七的主要活性成分，具有良好的抗炎作用，可促进成纤维细胞增殖和血管生成，提升人脐静脉内皮细胞活力和成管能力，并可通过减少炎症细胞浸润、促炎因子释放和促进新表皮形成来加快糖尿病性皮肤溃疡模型动物的创面愈合[5-6]。考虑到HIF-1α是三七皂苷的潜在作用靶点之一[7]，本研究拟构建肛瘘术后大鼠模型，以PNS和HIF-1α抑制剂2-甲氧基雌二醇（2-methoxyestradiol，2ME2）为干预物，探究PNS对模型大鼠创面愈合的影响，并基于HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路探讨其潜在机制，旨在为寻找促进肛瘘患者术后创面愈合的新方法提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本文所用主要仪器包括SP-Max2300A2型全自动酶标仪（上海酶联生物科技有限公司），AST560-580型冷冻切片机（常州市郝思琳医用仪器有限公司），HG13-XSP-BM-1C型生物显微镜（北京北信创展自动化技术有限公司），TE62型全湿电转印仪、EPS1001型电泳仪电源、SE400型垂直电泳仪、LAS600型凝胶成像分析系统（美国Amersham Pharmacia GE公司）等。

1.2 主要药品与试剂

PNS（即血塞通注射液，批号86905729000952，规格2 mL∶100 mg）购自云南植物药业有限公司；2ME2对照品（批号HB1684026，纯度＞98%）购自上海惠诚生物科技有限公司；大鼠VEGF、血管生成素Ⅰ（angiopoietin-Ⅰ，Ang-Ⅰ）、Ang-Ⅱ、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-2酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒均购自上海研尊生物科技有限公司；兔源CD31、纤维连接蛋白（fibronectin，FN）、VEGF、VEGFR2、HIF-1α、胶原蛋白Ⅰ（collagen Ⅰ）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）一抗和辣根过氧化物酶标记的小鼠抗兔IgG二抗（批号分别为77699、44800、50661、9698、14179、91144、2118、5127）均购自美国CST公司；通用SP免疫组织化学试剂盒（批号SP0041）购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验菌株和动物

大肠埃希菌[编号CMCC（B）44102]购自南京便诊生物科技有限公司。SPF级健康SD大鼠，雄性，体重200～240 g，购自河北省实验动物中心[动物生产许可证号SCXK（冀）2021-002]。所有大鼠均饲养于标准动物饲养笼内（每笼不超过5只），饲养条件如下：屏障环境，温度21～25 ℃，相对湿度50%～60%，每12 h明暗交替。本研究方案经河北省第八人民医院医学伦理委员会批准，编号为（2021）科伦审第（24）号。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

参照文献方法[8]建立大鼠肛瘘术后模型：取SD大鼠，腹腔注射戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉后，去除背部毛发并消毒备皮，剪一直径为1 cm的圆形创面，止血后滴加3×10^8 cfu/mL的大肠埃希菌菌液（以无菌生理盐水制备）0.1 mL，缝合创面；48 h后，拆除缝线，若创面有脓性分泌物即为造模成功。将造模成功的大鼠分为模型组、

PNS低剂量组、PNS高剂量组、PNS高剂量+2ME2组，每组10只；另选10只正常SD大鼠，仅进行背部脱毛处理，作为对照组。PNS低、高剂量组大鼠分别于创面组织处肌内注射15、30 mg/cm^{2}的PNS（取血塞通注射液，以生理盐水稀释，制成25、50 mg/mL的药液，注射量均为0.6 mL/cm^2，下同）[6]，同时腹腔注射10 mL/kg的生理盐水；PNS高剂量+2ME2组大鼠于创面组织处肌内注射30 mg/cm^{2}的PNS，同时腹腔注射4 mg/kg的2ME2（取2ME2，以生理盐水稀释，制成0.4 mg/mL的药液，注射量为10 mL/kg）[7]；模型组、对照组大鼠于创面（或脱毛处）组织处肌内注射0.6 mL/cm^{2}的生理盐水，同时腹腔注射10 mL/kg的生理盐水。各组大鼠均于每天早上8:00－9:00给药1次，持续3周。

2.2 大鼠创面愈合率检测与标本采集

分别于造模成功时和末次给药结束24 h时观察各组大鼠（除对照组外）的创面并拍照，使用Image J软件进行定量后再按下式计算创面愈合率：创面愈合率＝末次给药结束24 h时大鼠创面面积/造模成功时大鼠创面面积×100%。

采集各组大鼠尾静脉血，于4 ℃下以500×g离心10 min，收集血清，于－20 ℃下保存，备用。随后，大鼠经麻醉后断颈处死，剪下其创面组织（对照组大鼠剪下背部脱毛处的皮肤组织，下同），其中一部分冻存于液氮中，备用；剩余部分经包埋后以液氮迅速冷冻，取出后切片，备用。

2.3 大鼠创面组织的微血管密度和collagen Ⅰ、FN表达检测

采用免疫组织化学法检测。取“2.2”项下各组大鼠的创面组织切片，于预冷丙酮中固定10 min；取出，用水漂洗后以3%过氧化氢孵育5 min；加入CD31、collagen Ⅰ、FN一抗（稀释比例分别为1∶200、1∶100、1∶150），于4 ℃下孵育13 h；经DAB染色后，用水漂洗，封片，使用显微镜观察并拍摄。使用Image J软件定量分析创面组织中微血管[以单个CD31阳性表达细胞（呈棕色或深棕色，下同）或多个CD31阳性表达细胞聚成的细胞簇为1个微血管]数量和视野切片面积，按下式计算微血管密度（microvascular density，MVD）：MVD＝微血管数量/视野切片面积；同时，使用Image J软件定量分析创面组织中collagen Ⅰ、FN阳性表达细胞（呈棕色或深棕色）的光密度值，用以表示两者的表达水平。

2.4 大鼠血清中血管生成相关因子、血清及创面组织中炎症因子水平检测

采用ELISA法检测。取“2.2”项下各组大鼠冻存的创面组织适量，剪碎，与RIPA裂解液混合后，于冰水浴中高速研磨；所得匀浆液于4 ℃下以500×g离心10 min，收集上清液，以BCA法测定蛋白浓度后，使用ELISA法以酶标仪测定创面组织中炎症因子（IL-6、IL-2）水平。取“2.2”项下各组大鼠的血清样品，使用ELISA法以酶标仪测定血清中血管生成相关因子（VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ）和炎症因子（IL-6、IL-2）水平。上述检测均严格按照相应试剂盒说明书进行。

2.5 大鼠创面组织中HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下各组大鼠剩余的创面组织适量，同法匀浆、离心、定量。取变性（沸水浴处理）蛋白适量，经电泳分离后以湿法转膜，用5%脱脂奶粉封闭2.5 h；加入HIF-1α、VEGF、VEGFR2、GAPDH一抗（稀释比例分别为1∶1 000、1∶2 000、1∶2 500、1∶1 000），于摇床上孵育3 h（4 ℃）；洗膜3次后，加入相应二抗（稀释比例均为1∶1 000），在摇床上孵育2 h（室温）；洗膜3次后，以化学发光法显色，并使用凝胶成像分析系统成像。以Image J软件定量分析各目的蛋白的条带灰度值，按下式计算其相对表达量：目的蛋白相对表达量＝目的蛋白条带灰度值/内参蛋白（GAPDH）条带灰度值。

2.6 统计学方法

使用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两组间比较采用SNK-q检验。检验水准α＝0.05。

3 结果

3.1 PNS对大鼠创面愈合率的影响

PNS低、高剂量组大鼠创面愈合率均较模型组显著升高（P＜0.05），且PNS高剂量组显著高于低剂量组（P＜0.05）；PNS高剂量+2ME2组大鼠创面愈合率较PNS高剂量组显著降低（P＜0.05）。结果见表1。

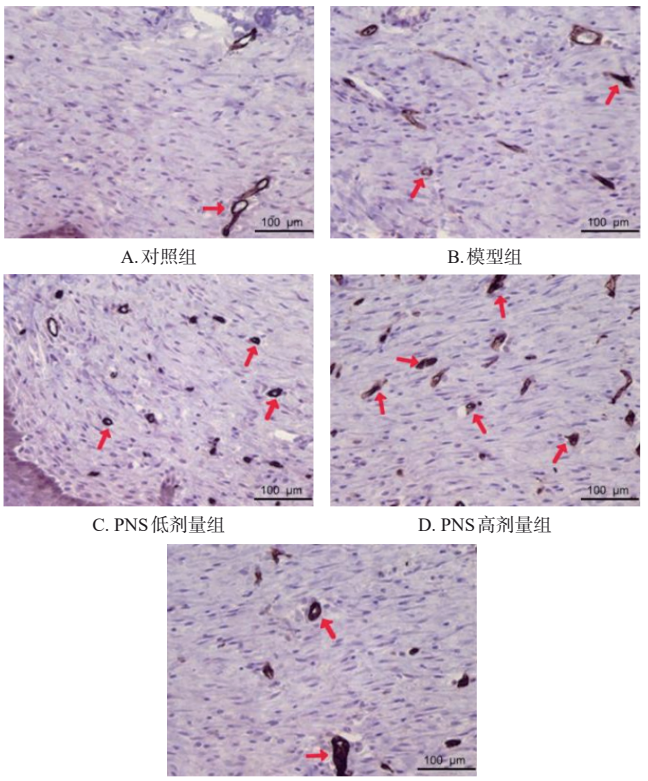
表1 各组大鼠创面愈合率、MVD比较（$\bar{x}\pm s$，n＝10）

组别	创面愈合率/%	MVD/（个/mm^2）
对照组	－	3.46±0.58
模型组	43.01±4.30	5.10±0.73[a]
PNS低剂量组	65.83±5.17[b]	9.21±0.92[b]
PNS高剂量组	83.92±5.84[bc]	13.95±1.04[bc]
PNS高剂量+2ME2组	46.13±4.52[d]	5.36±0.97[d]

a：与对照组比较，P＜0.05；b：与模型组比较，P＜0.05；c：与PNS低剂量组比较，P＜0.05；d：与PNS高剂量组比较，P＜0.05。

3.2 PNS对大鼠创面组织MVD和collagen Ⅰ、FN表达的影响

模型组大鼠创面组织中微血管明显，MVD较对照组显著升高（P＜0.05）；PNS低、高剂量组大鼠创面组织中微血管明显增加，MVD均较模型组显著升高（P＜0.05），且PNS高剂量组显著高于低剂量组（P＜0.05）；PNS高剂量+2ME2组大鼠创面组织MVD较PNS高剂量组显著降低（P＜0.05）。结果见表1、图1。



A. 对照组　B. 模型组

C. PNS低剂量组　D. PNS高剂量组

E. PNS高剂量+2ME2组

红色箭头：CD31阳性表达细胞或细胞簇。

图1　各组大鼠创面组织中微血管的显微图（免疫组织化学法）

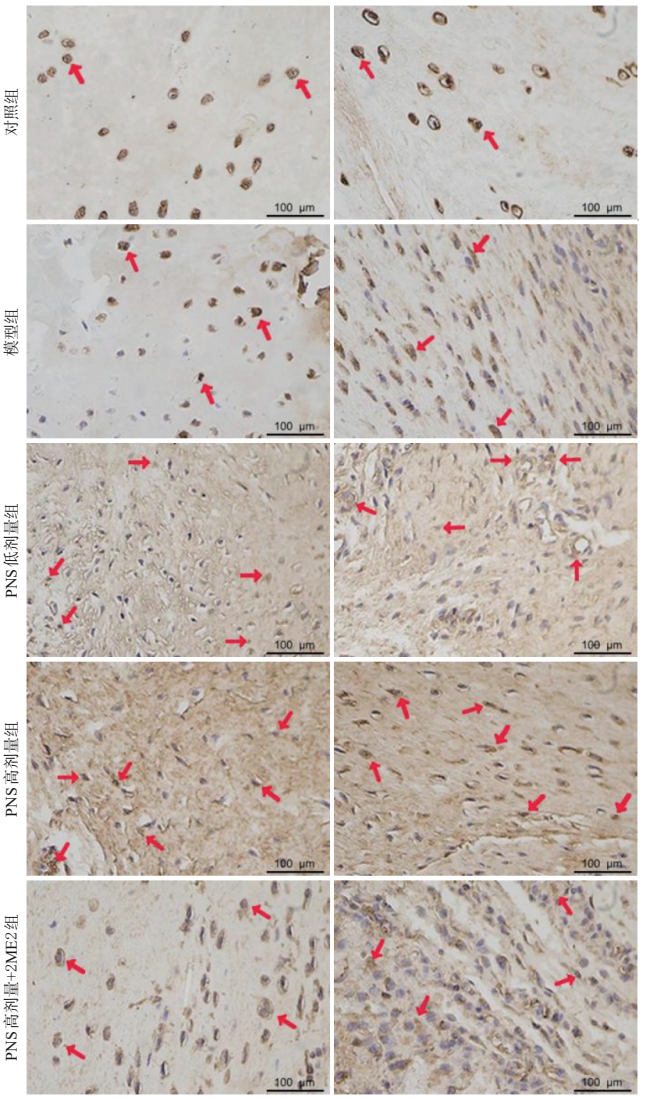
模型组大鼠创面组织中collagen Ⅰ、FN阳性表达细胞增加，两者表达水平均较对照组显著升高（$P<0.05$）；PNS低、高剂量组大鼠创面组织中collagen Ⅰ、FN阳性表达细胞均有所增加，两者表达水平均较模型组显著升高（$P<0.05$），且PNS高剂量组显著高于低剂量组（$P<0.05$）；PNS高剂量+2ME2组大鼠创面组织中collagen Ⅰ、FN阳性细胞均有所减少，两者表达水平均较PNS高剂量组显著降低（$P<0.05$）。结果见图2、表2。

3.3　PNS对大鼠血清中血管生成相关因子水平的影响

模型组大鼠血清中VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平均较对照组显著降低（$P<0.05$）；PNS低、高剂量组大鼠血清中VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平均较模型组显著升高（$P<0.05$），且PNS高剂量组显著高于低剂量组（$P<0.05$）；PNS高剂量+2ME2组大鼠血清中VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平均较PNS高剂量组显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

3.4　PNS对大鼠血清及创面组织中炎症因子水平的影响

模型组大鼠血清及创面组织中IL-6、IL-2水平均较对照组显著升高（$P<0.05$）；PNS低、高剂量组大鼠血清及创面组织中IL-6、IL-2水平均较模型组显著降低（$P<0.05$），且PNS高剂量组显著低于低剂量组（$P<0.05$）；PNS高剂量+2ME2组大鼠血清及创面组织中IL-6、IL-2水平均较PNS高剂量组显著升高（$P<0.05$）。结果见表4。



A. collagen Ⅰ　B. FN

红色箭头：collagen Ⅰ或FN阳性表达细胞。

图2　各组大鼠创面组织中collagen Ⅰ、FN表达的显微图（免疫组织化学法）

表2　各组大鼠创面组织中collagen Ⅰ、FN表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	collagen Ⅰ	FN
对照组	6.02±0.75	6.43±0.67
模型组	7.81±0.81[a]	8.02±0.74[a]
PNS低剂量组	10.75±0.96[b]	10.98±0.83[b]
PNS高剂量组	13.49±0.97[bc]	13.43±0.92[bc]
PNS高剂量+2ME2组	8.22±0.81[d]	8.59±0.79[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与PNS低剂量组比较，$P<0.05$；d：与PNS高剂量组比较，$P<0.05$。

3.5　PNS对大鼠创面组织中HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路相关蛋白表达的影响

模型组大鼠创面组织中HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白的表达水平虽较对照组稍有升高但差异均无统计学意义（$P>0.05$）；PNS低、高剂量组大鼠创面组织中HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白的表达水平均较模型组显著升高（$P<0.05$），且PNS高剂量组显著高于低剂量组（$P<$

表3　各组大鼠血清中血管生成相关因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	VEGF/（pg/mL）	Ang-Ⅰ/（ng/mL）	Ang-Ⅱ/（ng/L）
对照组	206.32±24.16	11.31±1.72	1.29±0.20
模型组	82.45±15.73[a]	3.46±0.64[a]	0.51±0.11[a]
PNS低剂量组	140.38±17.32[b]	7.05±0.76[b]	0.82±0.12[b]
PNS高剂量组	198.76±20.60[bc]	11.03±1.35[bc]	1.21±0.14[bc]
PNS高剂量+2ME2组	90.14±16.02[d]	3.69±0.68[d]	0.56±0.10[d]

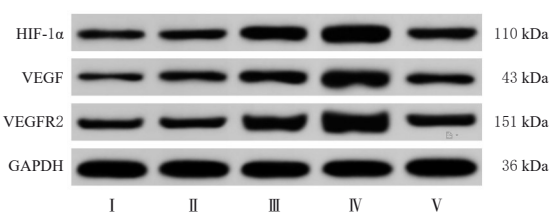
a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与PNS低剂量组比较，$P<0.05$；d：与PNS高剂量组比较，$P<0.05$。

表4　各组大鼠血清及创面组织中炎症因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

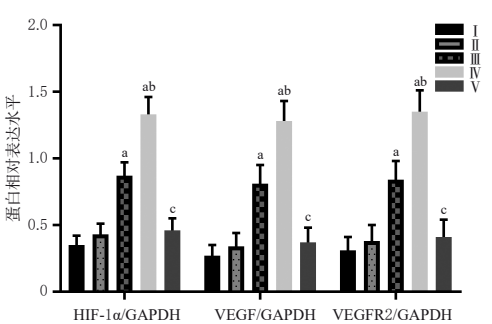
组别	血清		创面组织	
	IL-6/（pg/mL）	IL-2/（pg/mL）	IL-6/（ng/g）	IL-2/（ng/g）
对照组	22.46±6.54	76.59±15.53	35.12±8.22	118.23±13.25
模型组	84.73±13.20[a]	168.43±22.21[a]	117.34±15.62[a]	213.39±21.63[a]
PNS低剂量组	55.98±9.32[b]	123.12±18.13[b]	78.15±12.20[b]	168.12±17.06[b]
PNS高剂量组	25.76±7.61[bc]	81.75±16.40[bc]	39.81±9.84[bc]	124.78±15.31[bc]
PNS高剂量+2ME2组	80.15±10.61[d]	161.94±20.12[d]	109.67±13.22[d]	206.24±18.67[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与PNS低剂量组比较，$P<0.05$；d：与PNS高剂量组比较，$P<0.05$。

0.05）；PNS高剂量+2ME2组大鼠创面组织中HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白的表达水平均较PNS高剂量组显著降低（$P<0.05$）。结果见图3。



A.蛋白表达电泳图



B.蛋白表达柱形图（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：PNS低剂量组；Ⅳ：PNS高剂量组；Ⅴ：PNS高剂量+2ME2组；a：与模型组比较，$P<0.05$；b：与PNS低剂量组比较，$P<0.05$；c：与PNS高剂量组比较，$P<0.05$。

图3　各组大鼠创面组织中HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白的表达水平比较

4　讨论

随着医学技术的发展，促进肛瘘患者术后创面愈合的手段已呈多样化，但部分患者的愈合效果仍然不佳，故尚需探寻更有效的创面愈合手段。血管形成和炎症反应是影响患者术后创面愈合的关键，增强血管形成能力、减少创面组织炎症刺激可有效促进皮肤发育修复，从而促使创面愈合[9-10]。PNS是可减少创面瘢痕形成并加速其愈合的候选药物之一，可抑制成纤维细胞增殖，从而对小鼠皮肤创面愈合发挥有益作用；同时，PNS也具有一定的抗炎、抗氧化作用[11-12]，可通过促进内皮细胞增殖、侵袭、迁移和血管生成来促进高血糖大鼠的创面愈合[13]。可见，PNS可能是促使肛瘘患者术后创面愈合的潜在药物。本研究通过大肠埃希菌液感染大鼠背部皮肤创面的方法构建肛瘘术后大鼠模型，结果显示，模型大鼠创面愈合率为（43.01±4.30）%，创面组织MVD和collagen Ⅰ、FN阳性表达水平均较对照组显著升高，提示大鼠创面有部分愈合，表明大鼠肛瘘术后创面不做处理也可自然愈合，但愈合不完全；同时，模型大鼠血清及创面组织中促炎因子IL-6、IL-2水平均较对照组显著升高，同时血清中血管生成相关因子VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平均较对照组显著降低，表明大鼠肛瘘术后炎症水平升高且促血管生成相关因子表达水平降低，推测这可能是创面愈合不完全的主要原因。肛瘘术后大鼠经PNS干预后，其血清及创面组织中促炎因子IL-6、IL-2水平均较模型组显著降低，血清中血管生成相关因子VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平均较模型组显著升高，表明PNS可在减少促炎因子生成的同时促进血管生成相关因子产生，进而抑制肛瘘术后大鼠炎症反应；同时，PNS还可提升肛瘘术后大鼠的创面愈合率、创面组织MVD和collagen Ⅰ、FN阳性表达水平，表明该成分可增强肛瘘术后大鼠创面胶原合成和血管生成，进而促进其创面愈合。

HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路在细胞凋亡和迁移、炎症反应发生、血管形成、血液循环等方面有着广泛的调节作用，上调HIF-1α、VEGF的表达水平可起到促血管生成和抗炎的作用，进而减轻心肌缺血再灌注小鼠心肌炎症损伤和心功能障碍[14]，激活HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路可通过下调炎症因子、减弱氧化应激、促进血管生成、诱导再上皮化和抑制瘢痕形成来促进糖尿病性创面愈合[3-4,15]。本研究结果显示，PNS可升高肛瘘术后大鼠创面组织中HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白的表达水平，表明HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路可能参与了PNS促进创面愈合的过程；而PNS联合2ME2可升高肛瘘术后大鼠血清及创面组织中促炎因子IL-6、IL-2水平，降低血清中血管生成相关因子VEGF、Ang-Ⅰ、Ang-Ⅱ水平，表明2ME2可减弱PNS对大鼠促炎因子生成的抑制作用及对血管生成相关因子产生的促进作用；另外，PNS联合2ME2可降低肛瘘术后大鼠创面愈合率，创面组织MVD和collagen Ⅰ、FN阳性表达水平以

及HIF-1α、VEGF、VEGFR2蛋白表达水平，表明2ME2可削弱PNS对HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路的激活作用，减弱其对大鼠创面胶原合成和血管生成的增强作用，进而逆转PNS对肛瘘术后大鼠创面愈合的促进作用，揭示了PNS促进大鼠肛瘘术后创面愈合是通过激活HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路实现的。

综上所述，PNS可促进血管生成相关因子产生并抑制促炎因子生成，从而促进肛瘘术后大鼠创面愈合，上述作用与激活HIF-1α/VEGF/VEGFR2信号通路有关。但PNS的上述作用是否涉及其他信号通路尚有待后续深入探讨。

参考文献

[1] SCHOUTEN W R, ARKENBOSCH J H C, VAN DER WOUDE C J, et al. Efficacy and safety of autologous adipose-derived stromal vascular fraction enriched with platelet-rich plasma in flap repair of transsphincteric cryptoglandular fistulas[J]. Tech Coloproctol, 2021, 25(12): 1301-1309.

[2] PORWAL A, KUNDU G C, BHAGWAT G, et al. Polyherbal formulation Anoac-H suppresses the expression of RANTES and VEGF for the management of bleeding hemorrhoids and fistula[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(4): 736.

[3] ZHU Y, WANG Y M, JIA Y C, et al. Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1α/VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats [J]. Wound Repair Regen, 2019, 27(4): 324-334.

[4] YOUNIS N S, MOHAMED M E, EL SEMARY N A. Green synthesis of silver nanoparticles by the cyanobacteria *Synechocystis* sp.: characterization, antimicrobial and diabetic wound-healing actions[J]. Mar Drugs, 2022, 20(1): 56.

[5] MA X N, ZHANG X, KONG Y H, et al. Therapeutic effects of *Panax notoginseng* saponins in rheumatoid arthritis: network pharmacology and experimental validation[J]. Bioengineered, 2022, 13(6): 14438-14449.

[6] DU Y Q, CHEN W J, LI Y S, et al. Study on the regulatory effect of *Panax notoginseng* saponins combined with bone mesenchymal stem cell transplantation on IRAK1/TRAF6-NF-κB pathway in patients with diabetic cutaneous ulcers[J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 80.

[7] LI Q Q, LIANG X Y, YANG Y F, et al. *Panax notoginseng* saponins ameliorate cisplatin-induced mitochondrial injury via the HIF-1α/mitochondria/ROS pathway[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(1): 118-126.

[8] 王孝，丁博文，郑薇，等. 扶正生肌油纱对大鼠肛瘘术后瘢痕抑制作用及对血清TGF-β1表达的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报，2022，43(19)：1806-1810.
WANG X, DING B W, ZHENG W, et al. Inhibitory effect of Fuzheng shengji oil gauze on postoperative scarring in rats with anal fistula and its effect on the expression of serum TGF-β1[J]. J Qiqihar Med Univ, 2022, 43(19): 1806-1810.

[9] QU Y, ZHANG Z J, LU Y F, et al. RNA sequencing reveals the wound repair mechanism of cuyuxunxi prescription in surgical patients with anal fistulas[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2022, 25(8): 1284-1293.

[10] LITTA F, PAPAIT A, LUCCHETTI D, et al. The pathogenesis of cryptoglandular anal fistula: new insight into the immunological profile[J]. Colorectal Dis, 2022, 24(12): 1567-1575.

[11] MEN S Y, HUO Q L, SHI L, et al. *Panax notoginseng* saponins promotes cutaneous wound healing and suppresses scar formation in mice[J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19(2): 529-534.

[12] KANG Z N, XIAO Q, WANG L L, et al. The combination of astragaloside Ⅳ and *Panax notoginseng* saponins attenuates cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats through ferroptosis and inflammation inhibition via activating Nrf2[J]. J Pharm Pharmacol, 2023, 75(5): 666-676.

[13] LEI T, GAO Y, DUAN Y H, et al. *Panax notoginseng* saponins improves healing of high glucose-induced wound through the GSK-3β/β-catenin pathway[J]. Environ Toxicol, 2022, 37(8): 1867-1877.

[14] YANG J T, TANG L H, ZHANG F J, et al. Sevoflurane preconditioning promotes mesenchymal stem cells to relieve myocardial ischemia/reperfusion injury via TRPC6-induced angiogenesis[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 584.

[15] WANG Y Y, ZHU J Y, CHEN J, et al. The signaling pathways induced by exosomes in promoting diabetic wound healing: a mini-review[J]. Curr Issues Mol Biol, 2022, 44(10): 4960-4976.

（收稿日期：2023-08-31　修回日期：2024-01-23）
（编辑：张元媛）