

本文引用:陆文洪,莫黎,王真权,刘丽芳.网络药理学结合实验验证探究芩柏四物合剂对坏死性筋膜炎术后小鼠炎症反应及高凝状态的影响[J].湖南中医药大学学报,2023,43(3):465-472.

网络药理学结合实验验证探究芩柏四物合剂对坏死性筋膜炎术后小鼠炎症反应及高凝状态的影响

陆文洪¹,莫黎¹,王真权¹,刘丽芳^{2*}

1.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙410005;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007

【摘要】目的 通过网络药理学及实验验证,探究芩柏四物合剂对坏死性筋膜炎(necrotizing fasciitis, NF)术后小鼠模型炎症反应及高凝状态的影响。**方法** 利用网络药理学方法对芩柏四物合剂-NF相关炎症反应及高凝状态的共同作用靶点进行GO及KEGG富集分析,获取芩柏四物合剂治疗NF的潜在作用机制。将48只小鼠随机分为空白组、芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组、模型组。芩柏四物合剂组以芩柏四物合剂水煎液灌胃,空白组和模型组予等体积的生理盐水灌胃,低分子肝素钠组以低分子肝素钠注射液经腹腔皮下注射给药。通过HE染色观察肉芽组织病理形态;利用血细胞分析仪检测全血中的凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、D二聚体(D-dimer, D-D)、血小板(platelet, PLT);ELISA检测血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)。**结果** 网络药理学预测发现芩柏四物合剂干预NF主要与IL-17信号通路、TNF信号通路、HIF-1信号通路等联系密切。体内验证试验表明,与空白组相比,在灌胃3、7 d后,模型组小鼠全血中PT、D-D、PLT升高($P < 0.01$);与模型组比较,芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组小鼠全血中PT、D-D、PLT下降($P < 0.01$);芩柏四物合剂组与低分子肝素钠组之间无明显差异($P > 0.05$);芩柏四物合剂组组内比较,PT、D-D、PLT含量在第7 d明显下降,与第3 d比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,与空白组相比,模型组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平下降($P < 0.01$);芩柏四物合剂组中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平明显低于低分子肝素钠组($P < 0.01$);芩柏四物合剂组组内比较,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量在第7天明显下降,与第3天比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 芩柏四物合剂能通过多成分、多通路改善NF小鼠模型炎症,缓解术后高凝状态,从而有效地改善术后并发症,控制病情。

【关键词】 芩柏四物合剂;坏死性筋膜炎;炎症反应;高凝状态;网络药理学;中医药

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.015

Effects of Qinbai Siwu Mixture on inflammatory response and hypercoagulability of necrotizing fasciitis mice after operation based on network pharmacology and experimental verification

LU Wenhong¹, MO Li¹, WANG Zhenquan¹, LIU Lifang^{2*}

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of Qingbai Siwu Mixture (QBSWM) on inflammatory response and hypercoagulability of mice after necrotizing fasciitis (NF) operation by establishing mice model after NF operation. **Methods** GO and KEGG

【收稿日期】2022-08-14

【基金项目】湖南省卫生健康委科研课题(202104010993);湖南中医药大学科研课题一般项目(2020XJJ057,2020XJJ060);湖南省普通高等学校教学改革研究项目(HNJG-2021-0586);湖南中医药大学教学改革立项项目(2020-JG042);湖南中医药大学校院联合基金教学改革研究重点项目(2022-LHJG003)。

【第一作者】陆文洪,男,博士研究生,主治医师,研究方向:中医外科疾病防治。

【通信作者】*刘丽芳,女,博士,主任医师,E-mail:Liulff@126.com。

enrichment analysis were carried out for QBSWM-NF related inflammatory response and hypercoagulable state by network pharmacology to identify the potential mechanism of QBSWM in treating NF. Forty-eight mice were randomized into blank group, QBSWM group, low molecular weight heparin sodium (LMWHS) group and model group. QBSWM group was given the decoction of QBSWM intragastrically, blank group and model group were given the same volume of normal saline, LMWHS group received subcutaneous injection of LMWHS through abdominal wall. HE staining was used to observe the morphology of granulation tissue, prothrombin time (PT), D-dimer (D-D) and platelets (PLT) in whole blood were detected by hematology analyzer, and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were detected by ELISA to evaluate the effects of QBSWM on inflammatory response and hypercoagulability in mouse after NF operation. **Results** Model group had significantly higher content of PT, D-D and PLT than blank group at 3, 7 d after intragastric administration ($P < 0.01$); while QBSWM group and LMWHS group showed significantly lower content of PT, D-D and PLT than model group ($P < 0.01$); no significant difference was found between QBSWM group and LMWHS group ($P > 0.05$) for the content of PT, D-D and PLT. In addition, compared with blank group, the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum of model group significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum of QBSWM group and LMWHS group significantly decreased ($P < 0.01$); the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the QBSWM group were significantly lower than those in LMWHS group ($P < 0.01$). **Conclusion** QBSWM can significantly reduce the inflammatory indicators of mice after NF operation, alleviate inflammatory response, relieve the postoperative hypercoagulability state, thus effectively improve the postoperative complications and control the disease.

[**Keywords**] Qinbai Siwu Mixture; necrotizing fasciitis; inflammatory reaction; hypercoagulability; network pharmacology; Chinese medicine

坏死性筋膜炎(necrotizing fasciitis, NF)是一种临床上少见的,以厌氧菌为主的混合菌感染,引起会阴部、阴囊、肛周,甚至腹壁皮下软组织筋膜层的快速坏死性危害病症。其病情凶险,进展迅猛,治疗棘手,可在数小时出现严重并发症而危及生命^[1]。近年来,该病发病率呈上升趋势,常好发于糖尿病、动脉硬化剂免疫力低下者^[2]。中西医结合的多学科救治可使 NF 患者获益最大^[3]。NF 的治疗原则为早期及时的彻底清创引流,而外科手术侵入常导致凝血平衡的改变,且疾病本身严重的炎性反应可引起血管内血栓形成。局部炎症的浸润促进血管内皮细胞的凋亡,损伤微血管,扰乱纤溶系统的平衡,致微循环障碍的发生^[4-6],故临床中 NF 常呈现术后机体的高凝状态。芩柏四物合剂由《医宗金鉴》名方“止痛如神汤”“桃红四物汤”化裁而来,临床实践中运用芩柏四物合剂内服可以改善 NF 术后的炎症反应及高凝状态。本实验建立 NF 术后小鼠模型,探讨芩柏四物合剂对 NF 术后炎性因子与高凝状态影响,以期对中药复方制剂对 NF 术后的治疗提供理论指导及实验依据。

近年来,随着系统生物学及计算机学科的高速发展,网络药理学应运而生,其主要用于研究药物与疾病之间的相互作用关系,建立“分子-靶点”的网

络模式,这与中医学“整体观念”的观念十分契合。本文运用网络药理学方法,构建“芩柏四物合剂-中药成分-靶点”调控网络及关键靶点生物功能及通路分析,为本课题组后期基础研究及临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 建立芩柏四物合剂活性成分及靶点数据库

利用 TCMS 平台 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 收集芩柏四物合剂中中药的化学成分,以口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 为条件筛选相关成分,将其作为候选成分并将其转化为官方名称。

1.2 建立靶点数据库

以“necrotizing fasciitis”“inflammation”“hypercoagulability”为检索词,通过人类基因数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 与人类孟德尔遗传数据库 OMIM (<https://www.omim.org/>) 进行检索,汇总、分析、去重后,得到 NF 相关炎性反应及高凝状态靶点数据库。

1.3 构建关键靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络

将活性成分的作用靶点与 NF 相关炎性反应及

高凝状态靶点进行映射,获得共同靶点,将其导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),获得 PPI 网络图。

1.4 调控网络分析与关键靶点基因生物功能及通路分析

将候选成分及关键靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件,获得“苓柏四物合剂-中药成分-靶点”调控网络。采用 Rversion 3.5.2 软件 ClusterProfile 富集分析包对筛选出来的基因进行 GO 及 KEGG 通路富集分析,获得苓柏四物合剂的潜在作用机制。

1.5 实验验证

1.5.1 动物来源 健康雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 48 只,8 周龄,体质量 20~25 g,均购自湖北省实验动物研究中心,许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。质量检测单位:湖北省疾病预防控制中心。饲养条件:12 h 明暗交替,室温 21~25 ℃,相对湿度 55%~65%,噪声 ≤ 50 dB。饲养于湖南中医药大学动物实验中心。湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查批准(编号:ZYFY20210627)。

1.5.2 药物制备方法 苓柏四物合剂由复方苓柏颗粒剂(湖南中医药大学附属第二医院药自制剂,药物组成:黄芩、黄柏、秦艽、桃仁、防风、泽泻、当归、制大黄、玄胡、生地黄、槟榔)12 g,桃红四物汤(桃仁 12 g,红花 9 g,当归 12 g,川芎 9 g,赤芍 9 g,生地黄 12 g)组成,然后在湖南中医药大学第二附属医院制剂科将药物用蒸馏水制成水煎液,混合后浓缩为含有生药量为 1.44 g/mL 的汤剂。低分子肝素钠注射液(0.3 mL:3200IU.aXa,批号:24419)由 Alfasigma S.p.A 提供。混合菌(革兰氏阳性的溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌),以 A 组链球菌为主(2:1),由武汉伯韬生物有限公司培养制备。

1.5.3 主要试剂 正丁醇(货号:10005218,批号:20190104)、无水乙醇(货号:100092683,批号:20190307)、二甲苯(货号:10023418,批号:20190719)均购于国药集团化学试剂有限公司;HE 染色液(北京兰杰柯科技有限公司,货号:BL700B,批号 70080020);Mus TNF- α ELISA Kit(货号:E-EL-M0049c,批号:NM0466H46632)、Mus IL-1 β ELISA Kit(货号:E-EL-M0037c,批号:NM356KL24586);Mus D2D ELISA Kit(货号:E-EL-M0400c,批号:NM64FHD34726)、小鼠 IL-6 酶联免

疫吸附测定试剂盒(货号:E-EL-R0016c,批号:NM564SR16485)均购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.5.4 主要仪器 脱水机(型号:JT-12J)、包埋机(型号:JB-L5)、组织摊片机(型号:JK-6)由武汉俊杰电子有限公司提供。病理切片机(上海徠卡仪器有限公司,型号:LEiCARM2016);微型高速离心机(美国 Labnet,型号:C2500-R-230V);电热恒温培养箱(日本 ASONE,型号:ICV-450);全自动酶标仪(Thermo scientific,型号:Multiskan MK3)。

1.5.5 造模方法 动物适应性饲养 1 周,采用随机数字表法将 48 只小鼠分为空白组、模型组、苓柏四物合剂组、低分子肝素钠组,每组 12 只。除空白组外,其他 3 组参照文献[7]制作 NF 模型,即将小鼠抓取固定好后,使用 1 mL 的注射器,针头轻轻刺入会阴部周围皮下,针头轻轻上挑。推入混合菌 (3×10^7 个菌落)100 μ L,退出针头后轻压针眼位置几秒,防止漏液。验证:造模 3 d 后,从各组中随机抽取一只处死并解剖,切开皮肤、皮下至筋膜层,观察筋膜层,出现肉眼可见组织缺血坏死,并有恶臭,病理检查发现炎性改变时,即 NF 造模成功。后行手术造模,用 0.3%戊巴比妥钠溶液给小鼠腹腔注射麻醉剂,待小鼠完全麻醉后,剔除病变周围毛发并消毒,在超净工作台中给小鼠施以手术:用无菌手术剪剪除全层皮肤及皮下组织,暴露筋膜组织,清除坏死组织,制造 NF 术后模型。

1.5.6 给药方法 造模成功后第 2 天开始灌胃。苓柏四物合剂组按照 0.4 mL/20 g 灌胃,每天 1 次。空白组和模型组予等体积的生理盐水灌胃,每天 1 次。低分子肝素钠组以低分子肝素钠注射液,每支原液体积 0.3 mL,用生理盐水稀释为 20 mL,按 366.43 IU/(kg·d),经腹壁皮下注射给药。

1.5.7 样本采集及处理 造模 3 d 后,从各组中随机抽取一只处死并解剖,切开皮肤、皮下至筋膜层,取创面肉芽组织及周边皮肤组织行 HE 染色检测。各组小鼠给药后 3、7 d 共 2 个时相点分别取血后,并采集创面肉芽组织及周边皮肤组织,于病变最明显处剖取标本。各组全血用血细胞分析仪检测 PT、D-D、PLT。各组血清用 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6。

1.5.8 观察指标

1.5.8.1 HE染色 制备合格标本后,按如下步骤行HE染色。(1)石蜡切片脱蜡至水:依次将石蜡切片放入二甲苯 I 20 min→二甲苯 II 20 min→无水乙醇 I 5 min→无水乙醇 II 5 min→75%乙醇 5 min 梯度脱蜡→水洗。(2)苏木素染色:切片入苏木素染 3~5 min,自来水洗净多余染液,1%盐酸水溶液分化数秒,自来水漂洗,然后 0.6%~0.7%氨水水溶液返蓝,流水冲洗数秒。(3)伊红染色:石蜡切片梯度乙醇(85%乙醇→95%乙醇)脱水,放入伊红染液中染色 5 min。(4)脱水封片:石蜡切片依次放入无水乙醇 I 5 min→无水乙醇 II 5 min→无水乙醇 III 5 min→正丁醇 5 min→二甲苯 I 5 min→二甲苯 II 5 min 透明,将切片从二甲苯拿出来稍晾干,中性树胶封片。(5)结果判读:细胞核为蓝色,细胞质为红色。

1.5.8.2 细胞分析仪检测各组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量 抽取静脉血,按照 9:1 比例加入到 3.8% (或 3.2%) 的枸橼酸钠抗凝管中,轻轻颠倒 10 次使之充分混匀,不得有凝块,不得形成泡沫,采样后应尽快分离血浆(60 min 内进行),将标本 3000 r/min 离心(半径:8.42 cm)10~15 min,使血浆分层,取上层血浆。分别测定各组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量。

1.5.8.3 ELISA 法测定各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量 实验开始前,各试剂均应平衡至室温;试剂或样品配制时,均需充分混匀,并尽量避免起泡。按照 ELISA 试剂盒说明书操作,使用酶标仪

在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值),通过标准曲线计算每个样品蛋白水平。

1.5.9 统计方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间数据比较采用方差分析,符合正态分布采用 *t* 检验,不符合正态分布采用参数检验,计数资料使用卡方检验,等级资料使用秩和检验,均以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芩柏四物合剂治疗 NF 相关炎症反应及高凝状态的物质基础

从 TCMSP 数据库检索、筛选后共获得芩柏四物合剂成分 935 个,其中黄柏 140 个、槟榔 8 个、秦艽 27 个、防风 173 个、大黄 92 个、生地黄 2 个、当归 125 个、桃仁 66 个、延胡索 77 个、黄芩 143 个、泽泻 46 个、赤芍 29 个、川芎 7 个。去重后共获得 247 个不同有效成分。通过 TCMSP 检索,并经 UniProt 校对名称,去重后获得相关靶点 236 个。在 GeneCard 与 OMIM 数据库中,共获得 NF 相关炎症反应及高凝状态相关靶点 59 个,汇总获得芩柏四物合剂治疗 NF 相关炎症反应及高凝状态关键靶点 20 个。关键靶点 PPI 分析结果见图 1。

2.2 芩柏四物合剂治疗 NF 相关炎症反应及高凝状态的调控网络、潜在作用机制

利用 R 语言对芩柏四物合剂-NF 相关炎症反应及高凝状态的共同靶点进行 GO 及 KEGG 分析。

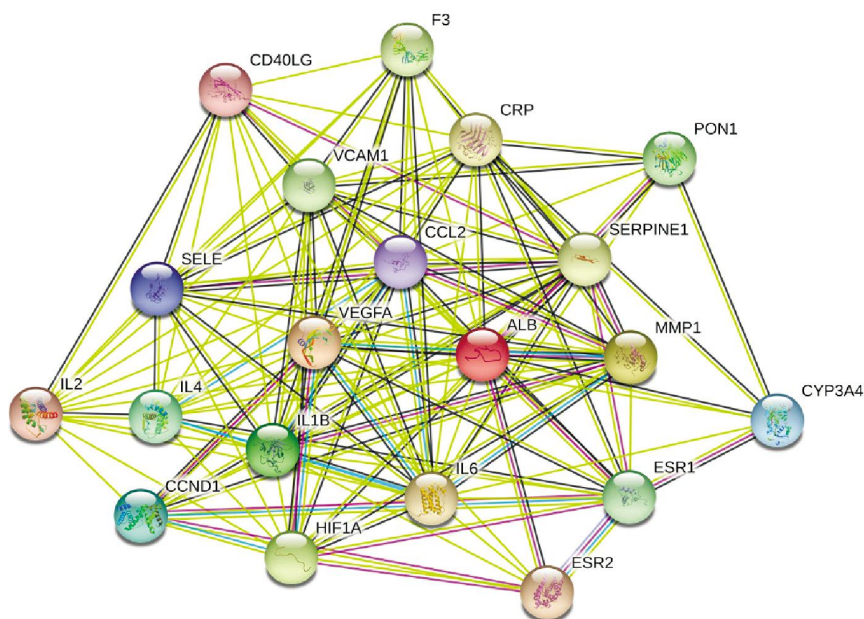


图 1 关键靶点 PPI 分析图

GO 富集结果显示,生物过程(BP)涉及 96 条,主要富集条目为正向调控 T 细胞增殖(positive regulation of T cell proliferation)、基因表达正调控(positive regulation of gene expression)、血管生成正调控(positive regulation of angiogenesis)等;细胞组成(CC)涉及 8 条,主要富集在胞外(extracellular space)、血小板 α 颗粒管腔(platelet alpha granule lumen)、细胞表面(cell surface)等;分子功能(MF)涉及 16 条,主要富集条目为细胞因子活性(cytokine activity)、类固醇结合(steroid binding)、酶结合(enzyme binding)等。KEGG 富集分析显示,芩柏四物合剂治疗 NF 相关炎症反应及高凝状态主要涉及 46 条相关通路,主要与 IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)等联系密切。详见图 2。

2.3 各组小鼠一般情况观察

空白组小鼠在治疗前后毛色柔润光泽,无皮肤感染、组织坏死情况,无体质量下降。模型组小鼠在造模成功后出现饮食减少、懒动、筋膜层出现肉眼可

见组织缺血坏死,并有恶臭;芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组治疗后小鼠饮食及饮水量增加,活动频繁,筋膜层肉眼可见组织逐渐鲜活,无异味。其中模型组一只鼠因感染而死亡。

2.4 各组小鼠肉芽组织形态学观察

光镜下观察发现,模型组小鼠皮下肉芽组织出现明显黏膜损伤,大量炎性细胞浸润,组织结构层次排列紊乱,筋膜层病变明显。芩柏四物合剂组及低分子肝素钠组肉芽组织病理改变不同程度恢复,组织结构层次排列较整齐,筋膜层病变减轻,炎性浸润减轻。空白组组织结构层次清晰,无炎性浸润。详见图 3。

2.5 各组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量比较

在 3、7 d 不同时相点对比中,与空白组相比,模型组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量明显降低($P < 0.01$),芩柏四物合剂组与低分子肝素钠组之间无明显差异($P > 0.05$)。芩柏四物合剂组组内比较,PT、D-D、

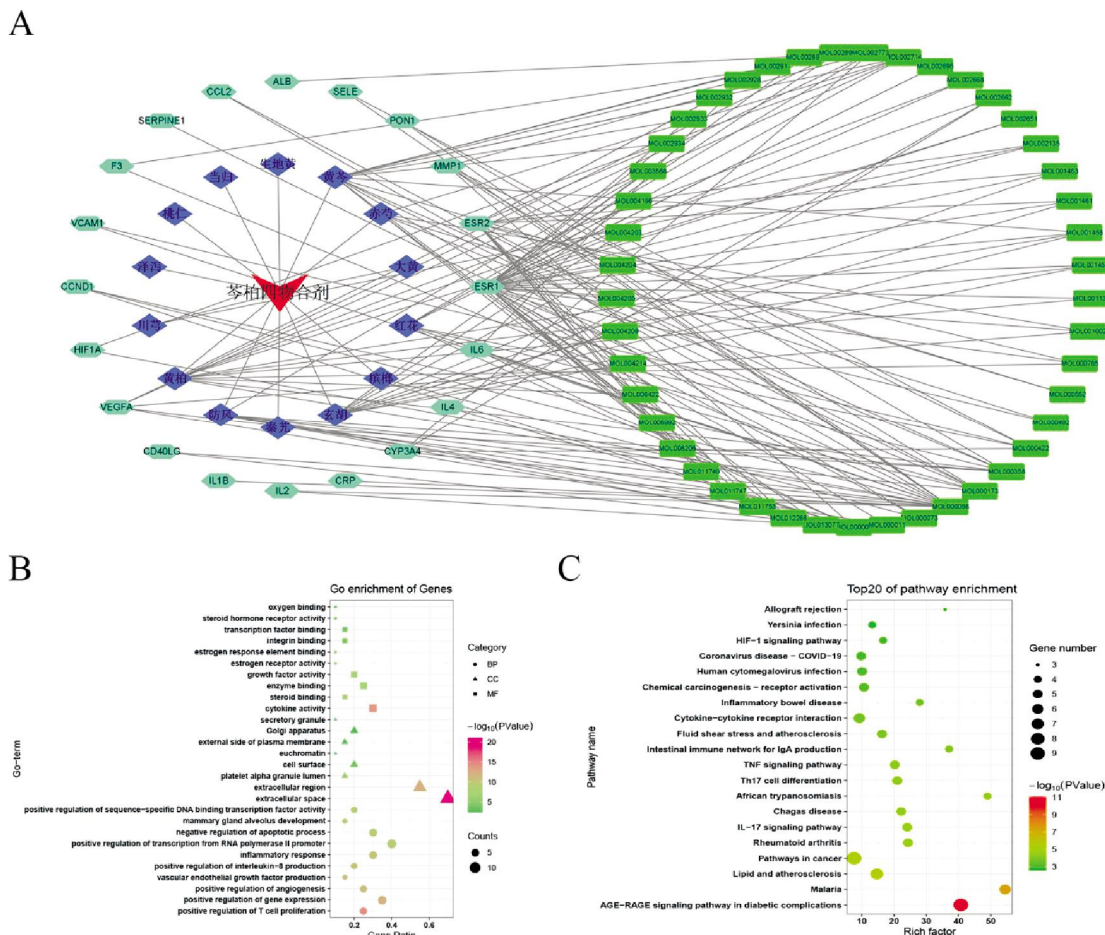


图 2 芩柏四物合剂治疗 NF 相关炎症反应及高凝状态的调控网络及作用机制注:A.“芩柏四物合剂-中药成分-靶点”调控网络;B. GO 富集结果;C. KEGG 富集结果。

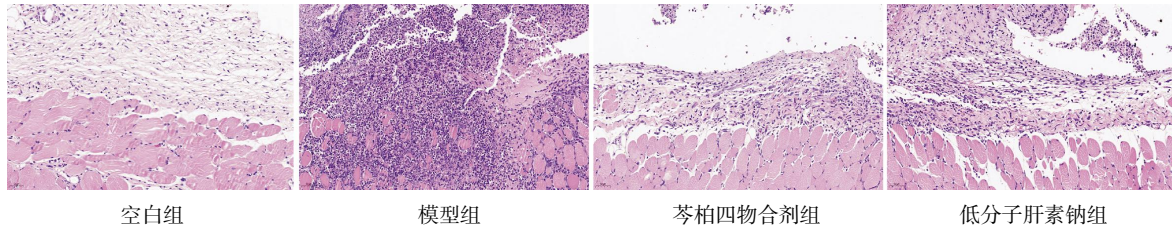


图 3 各组小鼠肉芽组织形态学观察

表 1 各组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量比较($\bar{x}\pm s$)

时相点	组别	n	PT/s	D-D/(ng·mL ⁻¹)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
3 d	空白组	12	14.70±0.60	6426.48±883.94	448.64±102.37
	模型组	10	17.90±0.20 [#]	12698.33±942.55 [#]	832.43±187.51 [#]
	芩柏四物合剂组	11	14.27±0.51 [*]	7943.13±637.64 [*]	655.29±173.67 [*]
	低分子肝素钠组	11	13.61±0.63 [*]	7638.17±762.81 [*]	627.57±161.92 [*]
7 d	空白组	12	14.97±0.80	9953.27±789.99	446.61±117.15
	模型组	10	17.20±0.90 [#]	12698.32±1006.35 [#]	791.23±189.87 [#]
	芩柏四物合剂组	11	12.57±0.57 [*]	6339.43±561.67 [*]	565.33±125.73 [*]
	低分子肝素钠组	11	13.87±0.85 ^{*△}	7942.99±861.72 ^{*△}	576.95±138.61 ^{*△}

注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;组间比较,与第 3 天比较,[△] $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量比较($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

时相点	组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-6
3 d	空白组	12	195.41±32.27	126.80±32.34	276.58±16.77
	模型组	10	396.32±28.57 [#]	327.30±21.76 [#]	393.47±21.32 [#]
	芩柏四物合剂组	11	213.97±24.63 ^{▲*}	181.64±20.98 ^{▲*}	315.74±27.67 ^{▲*}
	低分子肝素钠组	11	220.06±21.84 [*]	201.93±19.06 [*]	318.62±19.02 [*]
7 d	空白组	12	196.32±32.08	127.30±31.75	282.21±12.67
	模型组	10	290.97±28.59 [#]	261.91±22.28 [#]	384.47±20.15 [#]
	芩柏四物合剂组	11	153.87±25.34 ^{▲*△}	104.71±21.08 ^{▲*△}	291.52±28.77 ^{▲*△}
	低分子肝素钠组	11	213.97±20.99 [*]	181.59±18.60 [*]	329.57±18.92 [*]

注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;与低分子肝素钠组比较,[▲] $P<0.01$;组间比较,与第 3 天比较,[△] $P<0.05$ 。

PLT 含量在第 7 天明显下降,与第 3 天比较差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 1。

2.6 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量比较

在 3、7 d 不同时相点对比中,与空白组相比,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显降低($P<0.01$)。芩柏四物合剂组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显低于低分子肝素钠组($P<0.01$)。芩柏四物合剂组组内比较,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量在第 7 天明显下降,与第 3 天比较差别有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

3 讨论

NF 归属于中医学“肛疽”“坏疽”“烂疔”等范畴。

早在《诸病源候论·疔疮病诸候》中就有记载:“亦有肉突起,如鱼眼之状,赤黑,惨痛彻骨,久结皆变至烂成疮,疮下深孔如大针穿之状。”^[8]中医学认为,本病多正气内虚、外伤染毒、火毒炽盛,以致毒聚肌肤,气血凝滞,热盛肉腐,气分传变营血,火毒内陷,以致亡阳劫阴。后世医家主张内外合治,外以切开引流,中药清洗创面,并用中药散剂煨脓长肉,祛腐生肌;中药内服早期介入对控制病情,预防并发症及缩短病程具有确切的临床疗效^[9]。

NF 作为一种病死率较高的临床急危重症,具有起病急、发展迅速、破坏力强、病死率高等特点。若发病未及时予以有效的救治,感染极易发展到会阴部、腹部,危及全身,常死于脓毒血症、感染性休克和多器官功能衰竭^[10-11]。本病病理特点为皮下组织及筋

膜的广泛坏死,其病理改变是皮下组织水肿和坏死,包括邻近的筋膜,筋膜内支配皮肤的血管内有血栓形成,皮下血管闭塞,导致覆盖区域缺血和化脓性感染,镜下为明显的白细胞浸润,皮下小动脉和小静脉常完全闭塞^[12]。此外有研究表明,多种混合菌在人体内产生的胶原酶和肝素酶,诱导血小板的聚集和补体沉积,进而导致皮下组织及筋膜的微血管血栓形成,阻碍血运和淋巴回流,加速了组织的缺血和坏死^[13]。同时,感染过程中产生大量的炎性介质,介导全身瀑布样的炎性反应,导致多系统器官功能衰竭而死亡^[14]。故 NF 本身呈现出严重的炎症与高凝状态,临床中一旦确诊为 NF,必须进行及时的手术清创和全身治疗^[15-16]。在感染的急性期,除及时切开引流外,常需运用抗凝剂与足量的广谱抗生素。然而,手术创伤所致术后高凝状态已被研究证实^[17-19],因手术侵入导致的凝血平衡的改变,由于凝血机制的激活,对围手术期安全性构成严重威胁,且 NF 本身的高炎症反应可引起血管内血栓形成,阻塞血运,致大面积皮肤及皮下浅深筋膜坏死^[20],炎症反应与凝血系统之间有着密切的联系。炎症反应时,机体的炎症细胞受到过度的刺激,释放出促炎因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等,引起内皮细胞损伤,可以导致凝血机制异常,并抑制纤维蛋白溶解,引起纤溶亢进,致微循环障碍的发生^[21-22]。加之术后患者伤口疼痛、行动不便,卧床时间长,更易致高凝状态。术后高凝状态不但影响伤口愈合,还可引起静脉血栓形成致下肢深静脉血栓栓塞或肺栓塞,而这也是导致 NF 术后患者死亡的重要因素之一。

本研究中,通过网络药理学建立 NF 相关炎症反应及高凝状态靶点数据库,在 GeneCard 与 OMIM 数据库中,共获得 NF 相关炎症反应及高凝状态相关靶点 59 个,汇总获得芩柏四物合剂治疗 NF 相关炎症反应及高凝状态关键靶点 20 个。此外,利用 R 语言对芩柏四物合剂-NF 相关炎症反应及高凝状态的共同靶点进行 GO 及 KEGG 分析显示:生物过程主要富集条目为正向调控 T 细胞增殖、基因表达正调控、血管生成正调控、血小板 α 颗粒管腔、细胞因子活性等。主要涉及 46 条相关通路,主要与 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等联

系密切。实验验证过程中,在灌胃 3、7 d 时,与空白组相比,模型组小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组小鼠血清中小鼠全血中 PT、D-D、PLT 含量明显降低($P<0.01$),芩柏四物合剂组与低分子肝素钠组之间无明显差异($P>0.05$)。说明芩柏四物合剂能有效地改善 NF 术后高凝状态,且与低分子肝素钠组治疗效果相当。其作用机制可能通过介导 NF 相关炎症反应及高凝状态关键靶点 PPI 网络而发挥作用。此外,与空白组相比,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,芩柏四物合剂组、低分子肝素钠组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显降低($P<0.01$)。表明模型组中呈现一致的高炎症反应状态,芩柏四物合剂能有效降低 NF 术后小鼠的相关炎症指标,对延缓和阻击 NF 病情的进展恶化具有重要意义。其作用机制可能通过抑制 TNF 等炎症相关信号通路的活化,减少炎症因子的生成而发挥抗炎作用。

芩柏四物合剂由复方芩柏颗粒合桃红四物汤加减而成,复方芩柏颗粒剂是由《医宗金鉴》名方“止痛如神汤”化裁并改变剂型而成。药物组成为黄芩、黄柏、熟大黄、延胡索、泽泻、生地黄、防风等 11 味中药。诸药合用,共奏清热燥湿、行气活血、止血、镇痛之功。复方芩柏颗粒治疗 NF 有显著的抗炎、灭菌、止痛促愈的疗效^[23]。桃红四物汤出自《医宗金鉴》,由当归、赤芍、生地黄、川芎、桃仁、红花组成,桃红四物汤在四物汤补血养血的基础上,加入活血祛瘀的桃仁及活血通经的红花,使此方养血而不滞血,活血而不破血,补中有行,破中有收,诸药合用,达到活血行气、扶正祛邪之功效。NF 术后多兼有气滞血瘀之症状,这与 NF 术后的高凝状态和高炎症反应十分契合。故临床中和动物实验中能收到一致的治疗效果。

综上所述,本实验研究发现,芩柏四物合剂对 NF 小鼠的高凝状态及炎症指标均有明显改善作用,早期以中药内服介入 NF,能有效地控制病情,改善术后并发症。目前,国内缺乏 NF 的实验研究,且术后高凝状态及其机制的研究极少,故探讨 NF 术后高

凝状态的机制有着重要意义,进一步为临床指导用药奠定研究基础。

参考文献

- [1] 中国医师协会肛肠医师分会临床指南工作委员会. 肛周坏死性筋膜炎临床诊治中国专家共识(2019年版)[J]. 中华胃肠外科杂志, 2019, 22(7): 689-693.
- [2] 寇怀琳, 范新春, 张青, 等. 坏死性筋膜炎患者预后不良的危险因素[J]. 山东医药, 2022, 62(7): 68-70.
- [3] RABBANI A Y, KIM S, GOSSNER G, et al. Clinical outcome of multidisciplinary treatment of vulvar necrotising fasciitis[J]. Journal of Wound Care, 2022, 31(Sup7): S20-S29.
- [4] 何涛宏, 侯艳梅, 康健. 肛周坏死性筋膜炎并发血小板增高1例[J]. 中国肛肠病杂志, 2020, 40(9): 78.
- [5] 冯犁, 王敏, 杜志成, 等. 会阴部坏死性筋膜炎合并糖尿病的临床特点及治疗(附48例临床病例总结)[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 26(1): 72-76.
- [6] 翁建豪, 许杰, 张应彬, 等. 关节置换术后高凝状态的动态变化分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(5): 395-400.
- [7] TARNUTZER A, ANDREONI F, KELLER N, et al. Human polypeptide immunoglobulin attenuates group A streptococcal virulence factor activity and reduces disease severity in a murine necrotizing fasciitis model[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2019, 25(4): 512.
- [8] 许建成, 李凤盛, 宋易华, 等. 紫榆膏“煨脓长肉”换药法促进肛周坏死性筋膜炎术后愈合的临床研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2021, 5(10): 101-103.
- [9] 沈瑞红, 王嘉欣, 葛东旭, 等. 肛周坏死性筋膜炎术后促愈的中西医结合治疗研究进展[J]. 中国医药导报, 2022, 19(7): 47-50.
- [10] 朱倩, 朱桂松, 许颺. 坏死性筋膜炎的中西医结合治疗进展[J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(3): 138-141.
- [11] CHEN F, LIU C Q. Application of negative pressure sealing drainage technology combined with silver ion sterilization nursing solution in the nursing of necrotizing fasciitis[J]. Pakistan Journal of Medical Sciences, 2022, 38(5): 1150-1154.
- [12] 柳瑞瑞, 曹永清, 姚一博. 肛周坏死性筋膜炎的中西医治疗进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(2): 382-385.
- [13] 李启明. 急性坏死性筋膜炎的临床诊治体会[J]. 中国实用医药, 2010, 5(22): 77-78.
- [14] 余斌. 肛周急性坏死性筋膜炎的诊疗体会[J]. 中国医药指南, 2018, 16(3): 31-32.
- [15] 郭聪颖, 李帅军. 仙方活命饮口服联合双氧水冲洗对肛周坏死性筋膜炎创面愈合疗效观察[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(12): 168-171.
- [16] PUTRI A I W, NOVIDA H. Necrotizing fasciitis in Indonesian adult with diabetes mellitus: Two case and review article[J]. International Journal of Surgery Case Reports, 2022, 92: 106890.
- [17] 方汉钦. 结肠癌中医证型与血液高凝状态的相关性研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.
- [18] 王辉, 谢荣俊, 李峰, 等. 腹腔镜结直肠癌手术对患者高凝状态及免疫功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(27): 103-106.
- [19] 刘凌. vWF水平对骨肉瘤细胞增殖迁移及骨科大手术后血液高凝状态的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [20] FUKUDA M, NOBEYAMA Y, ASAHINA A. Precritical abnormalities in routine blood parameters in necrotizing fasciitis[J]. The Journal of Dermatology, 2022, 49(6): 637-641.
- [21] 陈庆荣. 身痛逐瘀汤对老年股骨转子间骨折PFNA术后凝血功能影响的临床观察[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [22] PANNUCCI C J, KOVACH S J, CUKER A. Microsurgery and the hypercoagulable state: A hematologist's perspective[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 2015, 136(4): 545e-552e.
- [23] 王伟. 复方芩柏颗粒冲洗肛周坏死性筋膜炎术后创面愈合疗效观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.

(本文编辑 苏维)