

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.05.003

象皮生肌膏对肛瘻术后创面修复及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 *

尹园缘¹ 余 炼¹ 刘 颖¹ 黄静雯¹ 邹巍莹¹ 程 扬¹ 宾东华^{2Δ}

(1 湖南中医药大学 湖南 长沙 410208; 2 湖南中医药大学第一附属医院 肛肠科 湖南 长沙 410007)

摘要 目的:探究象皮生肌膏对肛瘻切除术后大鼠创面的治疗作用及其与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的相关性。**方法:**将 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、象皮生肌膏组、湿润烧伤膏组,共 4 组,每组 10 只。4 组均采用 0 号钢丝制造肛瘻模型,造模成功后,除假手术组外,均在麻醉下行肛瘻切除术,创面保持开放,使之形成“开放、渗血、渗液、有脓性分泌物”的感染性肛瘻术后创面,假手术组保留瘻管,不予换药,模型组予以生理盐水冲洗、络合碘消毒后不予换药,治疗组分别予以相应药物进行创面换药,共 10 天。10 天后采用常规面积检测法比较模型组、象皮生肌膏组、湿润烧伤膏组大鼠肛瘻术后创面的创面愈合率及创面肉芽组织覆盖率;HE 染色观察各组大鼠肛周组织病理情况;ELISA 检测各组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的表达水平,WB 检测比较各组大鼠肛周肉芽组织中 PI3K、Akt、mTOR、p70 S6K、p-PI3K(S473)、p-AKT(S473)、p-mTOR(Ser2448)、p-p70 S6K 的蛋白表达水平。**结果:**与模型组比较,治疗第 3、7、10 天象皮生肌膏组和湿润烧伤膏组的创面愈合率及创面肉芽组织填充率显著升高($P < 0.01$)。病理切片显示,假手术组炎性细胞浸润较少,其余各组均可见不同程度的炎性细胞浸润,且创面区可见不同程度炎性修复型肉芽组织增生、胶原纤维新生及血管扩张;其中模型组病理切片显示大量炎性细胞浸润,血管扩张明显,并有明显的血管出血;象皮生肌膏组病理切片显示炎性细胞较少,成纤维细胞成熟且分布整齐,真皮层内胶原纤维丰富且排列整齐,可见血管新生,无明显血管扩张及出血;湿润烧伤膏组病理切片显示少量炎性细胞浸润及血管扩张,真皮层内可见成纤维细胞生成。ELISA 检测结果显示,与假手术组比较,模型组血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,象皮生肌膏组血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量显著升高($P < 0.01$),湿润烧伤膏组大鼠血清中 EGF、VEGF 的含量显著升高($P < 0.01$)。WB 检测结果显示,与假手术组比较,模型组肛周组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,象皮生肌膏组肛周组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。**结论:**象皮生肌膏能有效促进肛瘻术后创面修复,减轻肛瘻术后创面炎症反应,促进创面肉芽生长,其促愈机制可能与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达有关,其通过上调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,进而加快创面修复进程。

关键词:PI3K/Akt/mTOR 信号通路;象皮生肌膏;肛瘻;创面修复

中图分类号:R-33; R657.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)05-813-09

Exploring the Mechanism of Xiangpi Shengji Ointment Promoting Wound Repair after Anal Fistula Based on PI3K/Akt Pathway*

YIN Yuan-yuan¹, YU Lian¹, LIU Ying¹, HUANG Jing-wen¹, ZOU Wei-ying¹, CHENG Yang¹, BIN Dong-hua^{2Δ}

(1 Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410208, China;

2 The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Anorectal, Changsha, Hunan, 410007, China)

ABSTRACT Objective: To explore the therapeutic effect of Xiangpi Shengji Ointment on the wounds of rats after anal fistula resection and its correlation with PI3K/Akt/mTOR pathway. **Methods:** SD male rats were randomly divided into four groups: sham operation group, model group, Xiangpi Shengji ointment group, and MEBO group, with 10 rats in each group. All four groups were used to create an anal fistula model using No. 0 steel wire. After successful modeling, except for the sham operation group, anal fistula resection was performed under anesthesia, and the wound was kept open to form an infectious anal fistula postoperative wound that was "open, oozing blood, oozing fluid, and purulent secretion." The sham operation group retained the fistula without changing the dressing. The model group was rinsed with physiological saline and disinfected with complex iodine without changing the dressing. The treatment group was given corresponding drugs to change the dressing for the wound, respectively, A total of 10 days. After 10 days, the wound healing rate and granulation tissue coverage rate of rats in the model group, the Xiangpi Shengji ointment group, and the MEBO group

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81603634);湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51416;2020SK51404);

湖南省中医药管理局重点课题(C2022019);长沙市自然科学基金项目(Kq2202458);

湖南中医药大学校级课题重点项目(2019XJJ034);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放课题重点项目(2020ZXYJH05);

湖南中医药大学中西医结合一流学科开放课题一般项目(2020ZXYJH57);

2022 年湖南中医药大学校级研究生创新课题(2022CX161;2022CX140)

作者简介:尹园缘(1997-),在读博士研究生,主要研究方向:肛肠疾病创面修复研究,E-mail: 742886957@qq.com

Δ 通讯作者:宾东华(1983-),硕士生导师,教授,主要研究方向:肛肠疾病创面修复研究,E-mail: bindonghua@163.com

(收稿日期:2023-10-04 接受日期:2023-10-27)

after anal fistula surgery were compared using conventional area detection methods; HE staining was used to observe the pathological changes of perianal tissues of rats in each group; The expression levels of bFGF, EGF, and VEGF in serum of rats in each group were detected by ELISA, and the protein expression levels of PI3K, Akt, mTOR, p70 S6K, p-PI3K (S473), p-AKT (S473), p-mTOR (Ser2448), and p-p70 S6K in perianal granulation tissue of rats in each group were compared by WB detection. **Results:** Compared with the model group, the wound healing rate and granulation tissue filling rate of the Xiangpi Shengji Ointment group and the MEBO group significantly increased on the 3rd, 7th, and 10th day of treatment ($P<0.01$); Pathological sections showed that in the sham operation group, there was less inflammatory cell infiltration, while in the other groups, there were different degrees of inflammatory cell infiltration, and different degrees of inflammatory repair type granulation tissue proliferation, collagen fiber regeneration, and vascular dilation were visible in the wound area. Pathological sections of the model group showed a large amount of inflammatory cell infiltration, significant vascular dilation, and significant vascular bleeding. Pathological sections of the Xiangpi Shengji Paste group showed fewer inflammatory cells, Fibroblasts are mature and evenly distributed, and collagen fibers are abundant and neatly arranged in the dermis. Angiogenesis is visible, without significant vasodilation and bleeding. Pathological sections in the MEBO group show a small amount of inflammatory cell infiltration and vasodilation, and fibroblasts are visible in the dermis. The results of ELISA showed that the levels of bFGF, EGF, and VEGF in the serum of the model group were significantly lower than those of the sham operation group ($P<0.01$); Compared with the model group, the content of bFGF, EGF, and VEGF in the serum of the Xiangpi Shengji Ointment group was significantly increased ($P<0.01$), while the content of EGF, VEGF in the serum of the rats in the MEBO group was significantly increased ($P<0.01$). The WB test results showed that compared with the sham operation group, the expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, and p-p70 S6K protein in the perianal tissue of the model group was significantly decreased ($P<0.01$); Compared with the model group, the expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, and p-p70 S6K protein in perianal tissue in the Xiangpi Shengji ointment group was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Xiangpi Shengji Ointment can effectively promote wound repair after anal fistula surgery, alleviate inflammatory reactions on the wound after anal fistula surgery, and promote the growth of wound granulation. Its healing mechanism may be related to the expression of PI3K/Akt/mTOR signal pathway related proteins, which can accelerate the process of wound repair by upregulating PI3K/Akt/mTOR signal pathway related proteins, activating PI3K/Akt/mTOR signal pathway.

Key words: PI3K/Akt/mTOR pathway; Xiangpi Shengji ointment; Anal fistula; Wound repair

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R657.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)05-813-09

前言

肛瘻多见于肛门和直肠周围脓肿自行破溃或行切开引流术后,也可能由肛周损伤所致,其形成后可触及自肛管或直肠通向肛周皮肤的一条异常的通道^[1]。肛瘻患者主要为 30-40 岁的成年人,男性肛瘻的发病率高于女性^[2]。临床表现多见肛门部外瘻口反复流脓性分泌物、按压有疼痛,长期流脓导致肛周瘙痒等,查体时沿外瘻口可触及或探及条索状瘻管通向肛管内,早期炎症未控制时还可见发热、体重减轻等全身症状。肛瘻形成后若不予治疗基本无法自愈,因为肛瘻的发病部位特殊,瘻管长期受粪便污染,且臀部肌肉较厚,脂肪组织疏松,病灶容易向四周扩散。肛瘻术后创面通常不予缝合,粪便、创面及肠腔分泌物长期反复刺激创面容易造成创面修复时间长。故如何缩短肛瘻术后创面修复时间、提高创面修复的质量是目前临床工作中急需解决的问题。根据肛瘻术后创面修复特点可将创面恢复期分为以下三个时期:炎症反应期、肉芽生长期、组织重塑期。既往肛瘻术后创面的研究重点在减轻创面炎症、水肿等方面,但肉芽生长期作为创面修复关键时期,直接影响创面修复的质量和速度,值得进一步研究^[3,4]。

中医称肛瘻为“肛漏”,中医学治疗肛漏的历史悠久,有较完善的理论体系及特色疗法,对于缩短术后创面的修复时间、减少术后并发症具有一定的优势。象皮生肌膏是根据肛瘻术后创面特点、病机而选方用药组成,本方出自张山雷的《疡科纲

要》,主要临床功效为清除湿热、活络止痛、活血散瘀、收敛疮疡、去腐生肌,同时,该药具有对使用部位无疼痛感、无皮肤刺激、无皮肤腐蚀等特点,并且有较强的祛腐生肌长皮的功效,临床应用较广^[5]。

磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路调节细胞代谢、生长、迁移,有研究表明该通路还与血管生成相关,是血管生成的候选治疗靶点^[6]。PI3K 磷酸化位于细胞膜上的脂磷酰肌醇家族,从而激活 Akt,当 Akt 被激活后,进一步激活其下游的 mTOR, PI3K/Akt/mTOR 信号通路在正常血管的形成和发展中扮演着重要角色^[7]。

本课题组前期临床研究已经证实象皮生肌膏能有效缩短肛瘻术后创面恢复时间,降低患者术后的疼痛感及创面水肿程度,前期动物实验证实其治疗机制可能是通过提高大鼠肛瘻模型创面组织中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)的表达水平,降低大鼠创面中促炎因子、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)等蛋白表达,促进肉芽组织生长以及表皮形成^[8-10]。前期研究从减轻创面炎症反应的角度解释象皮生肌膏治疗肛瘻的部分作用机制,但中药复方对疾病的治疗机制并非单一。肉芽生长期作为创面修复的关键时期,在促进创面修复中极为重要,有研究表明 PI3K/Akt/mTOR 通路与修复损伤血管以及促进血管新生有密切关系^[11]。鉴于

此,本次研究选择使用大鼠作为研究载体、构建肛瘘术后创面模型,并给予象皮生肌膏、湿润烧伤膏进行干预,探究象皮生肌膏对肛瘘切除术后大鼠创面的治疗作用及其与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的相关性,为象皮生肌膏的临床推广提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

购入 SPF 级成年雄性大鼠,品系为 SD 大鼠,数量为 40 只,体重为 200 ± 10 g,饲养于温度 20-25℃,湿度 60%-80% 的湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心,均自由摄食及饮水,适应性喂养 3d。本次实验符合动物伦理委员会标准(伦理号:ZYFY20220226-04)。

1.2 实验药物与试剂

象皮生肌膏药物组成:象皮、当归、地黄、炉甘石、血余炭、石膏等(湖南中医药大学第一附属医院制剂室制备,湘药制字 Z20070276,生产批号 20211212);湿润烧伤膏(汕头市美宝制药有限公司,国药准字 Z20000004,生产批号 2103403A);p-p70 S6K 抗体 /p70 S6K 抗体 /mTOR 抗体 /p-mTOR(湖南艾方生物科技有限公司,AF00277/AF03354/AF02824/AF00658);p-PI3K 抗体(AFFINITY,AF3241);PI3K 抗体 /ATK 抗体 /p-AKT 抗体 / β -actin (PROTEINTECH,60225-1-Ig/60203-2-Ig/66444-1-Ig/60004-1-Ig);Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody, Peroxidase-Labeled(KPL,074-1506);Anti-Mouse IgA + IgG + IgM (H+L) Antibody, Human Serum Adsorbed and Peroxidase-Labeled(KPL,074-1807);戊巴比妥钠(Sigma Corporation of America,P3761);多聚甲醛(北京白鲨易科技有限公司,BL539A);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,P0013B);苏木素-伊红染色液(Wexis,2500 mL);中性树胶(中国上海标本模型厂,100 g);无水乙醇(湖南汇虹试剂有限公司,塑 AR2500 mL);二甲苯(湖南汇虹试剂有限公司,AR500 mL);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,P0012);ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,P0018S);PVDF 膜(Merck Millipore,IPVH00010);大鼠表皮生长因子 / 大鼠碱性成纤维细胞生长因子 / 大鼠血管内皮生长因子 ELISA KIT(LCS)(96T)(厦门仑昌硕生物科技有限公司,ED30236/ED30506/ED30908)。

1.3 实验仪器

生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司,JK-6);光学显微镜(德国莱卡公司,DM2000LED);电泳仪电源(北京六一生物科技有限公司,DYY-7C);双垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司,DYCZ-24DN);快速转膜仪(金斯瑞生物科技,e-Bolt);水平脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司,TS-8);酶标仪(BioTek,ELX800);化学发光仪(上海勤翔科技仪器有限公司,ClinxChemiScope 6000);超净工作台(苏州集团安泰空气技术有限公司,BBS-SDC);微量移液器(德国 Eppendorf 公司,Q37553);电热恒温鼓风干燥箱(常州中诚仪器制造有限公司,101-2A);电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司,TP2200);-80℃超低温冰箱(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,ULTS1368);高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限

公司,H2100R)。

1.4 肛瘘术后创面大鼠模型的建立

参照 Adriana de Souza R^[2] 等人的肛瘘造模方法,制造肛瘘动物模型。所有大鼠使用提前配置好的戊巴比妥钠(2%)按 5 mg/100g 腹腔注射进行麻醉。麻醉成功后,用 0 号钢丝制造肛瘘模型:首先使用 50 mL 注射器针头由大鼠肛门内进入,插入左侧齿状线中,穿过肛门括约肌,从左侧肛缘外侧约 1 cm 处穿出,随后取走 50 mL 注射器针头,将 0 号钢丝沿相同路径穿出,随后将 0 号钢丝头和尾扭转固定,放置 30 天,期间正常给与水和食物,30 天后在麻醉状态下取出大鼠臀部的 0 号钢丝(假手术组保留 0 号钢丝),可触及条索状病理性管道以及脓性分泌物为肛瘘造模成功。造模成功后立即行瘘管切除术,术后采用无菌纱布压迫伤口 5 min 止血,创面不缝合,保持开放。当形成“开放、渗血、渗液、有脓性分泌物”的感染性肛瘘术后创面,此时为肛瘘术后创面大鼠模型造模成功。本次造模过程中无大鼠死亡,造模成功率为 100%。

1.5 动物分组、给药方法及标本采集

随机分组及编号,40 只 SD 大鼠被分为 4 组,A 组:假手术组,B 组:模型组,C 组:象皮生肌膏组,D 组:湿润烧伤膏组,每组 10 只。所有大鼠均自由饮水进食,适应性喂养 3 天后制造肛瘘模型(详见 2.1),造模成功后除假手术组外均立即行肛瘘切除术(假手术组仅取出 0 号钢丝),肛瘘术后创面大鼠模型造模成功后开始进行创面换药。于停药后的第 2 天处死所有动物,收集各组大鼠肛周组织及血清进行指标检测。

给药方法:A 组制造肛瘘大鼠模型成功后,不行肛瘘切除术,不给药;B 组制造肛瘘术后创面大鼠模型成功后,予以生理盐水冲洗创面,络合碘消毒,不给药;C、D 组制造肛瘘术后创面大鼠模型成功后,予以生理盐水冲洗创面,络合碘消毒,C 组大鼠使用等面积及 1 mm 厚的象皮生肌膏纱条覆盖创面,无菌纱布固定;D 组大鼠使用等面积及 1 mm 厚的湿润烧伤膏纱条覆盖创面,无菌纱布固定。每天换药两次,连续 10 天。

肛瘘术后创面大鼠模型造模成功后,分别于 1d、3d、7d、10d 记录模型组、象皮生肌膏组、湿润烧伤膏组大鼠创面愈合率及肉芽组织填充率。停药后第 1 天在麻醉成功后取各组肛周组织及血清。

肛周组织:假手术组大鼠取瘘管下组织,厚约 0.2 cm,大小约 1×1.5 cm,其余各组取大鼠肛周创面组织。部分组织冻存于 -80℃冰箱待测,剩余组织浸泡于 4%多聚甲醛中常温保存待测。血清:心脏采血,离心后取上清液,存于 -20℃冰箱待测。取材结束后处死所有大鼠。

1.6 实验指标检测

1.6.1 创面愈合率 采用无菌透明方格纸(爱孚贴)(规格:0.5 cm×0.5 cm)测量术后第 1 天(1d)、治疗第 3 天(3d)、治疗第 7 天(7d)、治疗第 10 天(10d)的创面面积,计算创面愈合率=(初始创面面积-治疗后创面面积)/初始创面面积×100%。

1.6.2 创面肉芽组织填充率 采用无菌透明方格纸(爱孚贴)(规格:0.5 cm×0.5 cm)测量术后第 1 天(1d)、治疗第 3d、治疗第 7d、治疗第 10d 的创面颗粒状肉芽组织面积,计算创面颗粒状肉芽组织填充率=肉芽组织面积/测量当天创面面积×100%。

1.6.3 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)观察取材的肛周组织病理改变情况 经连续 10 天治疗,在停药后第 1 天取各组大鼠肛周组织,脱水,包埋,连续切片,每张切片厚度 4 μm ,烘干后脱蜡,苏木精染色,再次脱水后使用二甲苯透明,封片。光学显微镜下观察各组肛周组织病理变化。

1.6.4 ELISA 检测各组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量 使用双抗体夹心法,用抗大鼠 bFGF、EGF、VEGF 抗体包被于酶标板上,再结合过程中样品或标准品中的 bFGF、EGF、VEGF 与复合物结合,洗去多余表面杂质之后,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体,最终形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,如果存在有在复合物之外的游离试剂成分,则需要洗去,最后加入显色底物(TMB),用酶标仪在 450 nm 波长处测 OD 值,大鼠炎症因子浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正比,通过绘制标准曲线计算出样品中炎症因子的浓度。

1.6.5 蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)观察各组大鼠肛周组织中白介素 17(IL-17)、PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt 蛋白的表达及象皮生肌膏的干预作用 剪取适量肛周组织,研磨匀浆, PBS 洗涤后加入 RIPA 裂解液,于生物样品均质仪中充分研磨后至于冰上裂解 30 min; 12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后取上清。BCA 试剂盒法检测各样本蛋白浓度。SDS 变性并调整每组蛋白浓度一致, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。制胶上样, 每孔上样量保持一致 (10-30 μg)。浓缩胶电压为 80 V, 40 min, 分离胶电压 120 V, 30-50 min。溴酚蓝跑至胶底即可终止电泳, 进行转膜; 恒压 100V, 0.45/0.22 μm PVDF 膜; 将 PVDF 膜完全浸没在 5% milk-PBST 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 5% BSA-PBST 稀释一抗 (IL-17, 1 : 500; PI3K, 1 : 500; p-PI3K, 1 : 1000; Akt(S473), 1 : 1000; p-Akt (S473), 1 : 2000; β -actin, 1 : 1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 次日取出 PVDF 膜, PBST 洗膜 5 次, 每次 6 min; PBST 稀释二抗 (Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody, Peroxidase-Labeled, 1 : 5000; Anti-Mouse IgA + IgG + IgM (H+L) Antibody, Human Serum, 1 : 5000), 室温孵育 60 min; PBST 洗膜 5 次, 每次 6 min; 曝光后保存图片并导出图片, 使用 Quantity One 专业灰度分析软件进行分析。

1.7 统计学分析

计量资料使用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。进行正态性检验及方差齐性检验。若方差齐, 采用单因素方差分析法检验, 并开展组间多重比较; 若方差不齐, 采用非参数秩和检验比较总的差异及组间比较。采用 SPSS27.0 统计软件处理数据, 以 $P<0.05$ 判定显著性。

2 结果

2.1 象皮生肌膏对肛瘻大鼠术后创面愈合率的影响

观察造模后各组大鼠状态, 所有大鼠活动均较前较少, 部分大鼠蜷缩扎堆、耸毛、毛发乱。与假手术组相比, 其余各组笼内清洁度较差。实验期间无大鼠死亡, 创面情况如图 1 所示。测定 B、C、D 组大鼠不同时间节点创面愈合率, 如表 1、图 2 所示, 组间分析结果如下: 与 B 组比较, 术后第 3d、7d、10d C 组、D 组大鼠创面愈合率明显增加, 差异性具有统计学意义 ($P<0.01$); 由此得出: 象皮生肌膏及湿润烧伤膏能促进大鼠创面的修复。

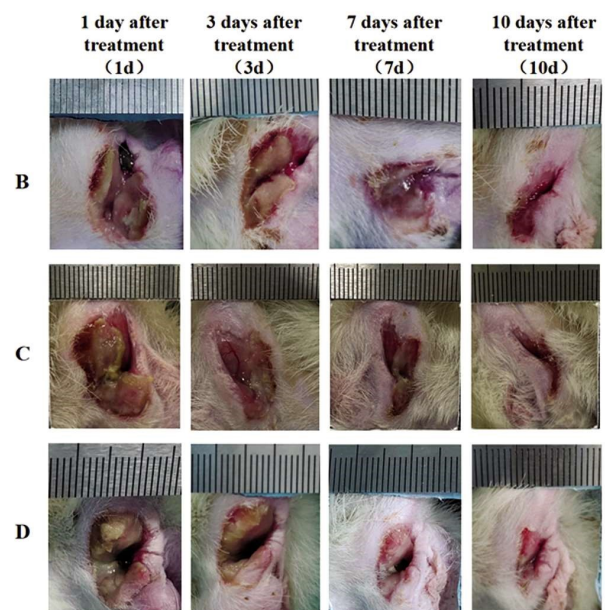


图 1 各组大鼠不同时间段创面情况

Fig. 1 Wound situation of rats in different time periods in each group

注: B. 模型组; C. 象皮生肌膏组; D. 湿润烧伤膏组

Note: B. Model group; C. Xiangpi Shengji ointment group;

D. MEBO Group

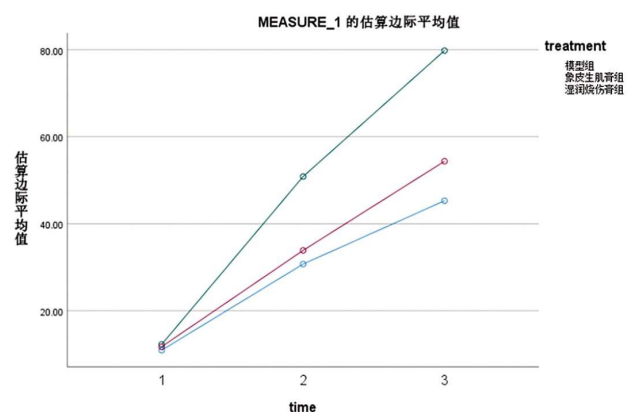


图 2 时间与组别关于创面愈合率的交互效应轮廓图

Fig. 2 Outline of the interaction effect between time and group on wound healing rate

2.2 象皮生肌膏对肛瘻大鼠术后创面肉芽组织填充率的影响

如先前所述, 肉芽生长期是创面愈合的关键期, 创面肉芽组织填充率的增加可提示创面愈合进程较快。药物治疗后测定 B、C、D 组大鼠不同时间节点创面肉芽组织填充率, 如表 2、图 3 所示, 组间结果如下: 与 B 组比较, 术后第 3d、7d、10d C、D 组大鼠创面肉芽组织填充率明显增加, 差异性具有统计学意义 ($P<0.01$); 由此得出: 象皮生肌膏及湿润烧伤膏能促进大鼠创面肉芽组织生长。

2.3 HE 染色观察肛周组织病理改变情况

根据 HE 染色观察到大鼠肛周组织中肉芽组织增生情况、炎性细胞浸润情况、成纤维细胞分布情况、胶原纤维排列情况及新生血管情况等。实验结果显示, 假手术组有少量炎性细胞浸润, 成纤维细胞及真皮层内胶原纤维排列整齐, 无血管扩张及出血, 表皮细胞全覆盖; 其余各组均可见不同程度的炎性细

表 1 各组大鼠的创面愈合率比较(%, $\bar{x}\pm s$)Table 1 Comparison of wound healing rates among different groups of rats(%, $\bar{x}\pm s$)

Goups	n	3 days after treatment	7 days after treatment	1 days after treatment
Sham operation group	10	/	/	/
Model group	10	10.94±1.71	30.74±2.78	45.29±2.88
Xiangpi Shengji ointment group	10	12.28±3.03 ^{▲▲▲}	50.86±2.83 ^{▲▲▲}	79.80±3.25 ^{▲▲▲}
MEBO Group	10	11.75±2.79 ^{▲▲▲}	33.88±2.40 ^{▲▲▲}	54.37±2.04 ^{▲▲▲}

Note: $F_{\text{Interaction}}=82.785$, $P_{\text{Interaction}}<0.001$; $F_{\text{Time main effect}}=2713.323$, $P_{\text{Time main effect}}<0.001$; $F_{\text{Inter group main effect}}=677.55$, $P_{\text{Inter group main effect}}<0.001$;

Compared to the model group, ^{▲▲▲} $P<0.01$.

胞浸润,且创面区可见不同程度炎性修复型肉芽组织增生、胶原纤维生长以及血管扩张,其中模型组大鼠创面可见炎性细胞浸润、明显的血管扩张及血管出血,象皮生肌膏组大鼠创面炎性细胞较少,成纤维细胞成熟且分布整齐,真皮层内胶原纤维丰富且排列整齐,可见新生血管,无明显血管扩张及出血,湿润烧伤膏组大鼠创面可见少量炎性细胞浸润及血管扩张,真皮层内可见成纤维细胞生成。结果见图4。

2.4 ELISA 法检测各组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量

结果显示:对比假手术组,模型组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量显著降低($P<0.01$);对比模型组,象皮生肌膏组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量显著升高($P<0.01$),湿润烧伤膏组大鼠血清中 EGF、VEGF 的含量显著升高($P<0.01$)。结果见表3,图5。

2.5 象皮生肌膏对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响

结果显示,对比假手术组,模型组大鼠肛周组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 蛋白表达显著降低($P<0.01$);对比模型组,象皮生肌膏组大鼠肛周组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。如图6、图7、表4所示。

3 讨论

肛漏因其患病部位特殊、愈合周期长、病情易反复等特征,自古以来都属于难治性疾病范畴。中医学对肛漏的研究已有很长的历史^[13]。中医学认为肛漏最常见病因为肛痈破溃后久不收口,体内湿热余毒长期下注臀部所致,或肛裂损伤日久染毒、瘡虫侵袭致脏腑亏虚^[14]。肛漏形成后可以触及肛周硬结、脓水反复经破溃口外溢,出现疼痛、肛周潮湿瘙痒等局部临床表现,或

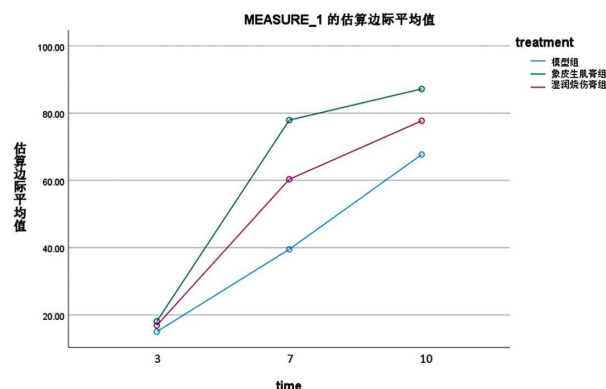


图3 时间与组别关于创面肉芽组织填充率的交互效应轮廓图

Fig. 3 Outline of the interaction effect between time and group on wound granulation tissue filling rate

发热、乏力等全身表现临床表现。中医学对于肛漏的非手术治疗包括中药内服及中药熏洗、中药外敷等,这些治疗方式有助于减轻早期肛漏患者的临床症状、减缓疾病进展、控制病变范围。肛漏彻底治愈仍需手术治疗,如肛漏挂线术、切开术等。中医学认为肛漏患者术后机体经络受损,术后肛门每日排便,湿热未尽,创面营养不足,新肉不生,则创面迁延不愈,因此中医中药干预创面在肛漏术后创面修复中占有非常重要的地位。现代医学亦认为肛瘻的形成与肛门直肠周围脓肿相关,脓流尽后脓腔壁纤维化,肛管内部与肛周皮肤相通形成管道即为肛瘻。肛瘻术后创面完全愈合一般需要40天左右,虽然能进行一般日常活动,但每日换药及创面疼痛、渗出以及感染的风险,导致患者治疗时间长,生活质量下降,故如何缩短创面修复时间、提高创面修复质量是目前肛瘻研究的重点^[15]。

象皮生肌膏出自张山雷的《疡科纲要》,中药组成包括:象皮、当归、血余炭、地黄、石膏、炉甘石等,我院在其原方基础上

表 2 各组大鼠的创面芽组织填充率比较(%, $\bar{x}\pm s$)Table 2 Comparison of wound bud tissue filling rates among different groups of rats(%, $\bar{x}\pm s$)

Groups	n	3 days after treatment	7 days after treatment	1 days after treatment
Sham operation group	10	/	/	/
Model group	10	15.03±1.31	39.51±2.65	67.7±2.99
Xiangpi Shengji ointment group	10	18.1±0.98 ^{▲▲▲}	77.93±1.62 ^{▲▲▲}	87.21±2.87 ^{▲▲▲}
MEBO Group	10	16.89±0.32 ^{▲▲▲}	60.33±3.18 ^{▲▲▲}	77.72±2.04 ^{▲▲▲}

Note: $F_{\text{Interaction}}=177.295$, $P_{\text{Interaction}}<0.001$; $F_{\text{Time main effect}}=6230.597$, $P_{\text{Time main effect}}<0.001$; $F_{\text{Inter group main effect}}=524.785$, $P_{\text{Inter group main effect}}<0.001$; Compared to the model group, ^{▲▲▲} $P<0.01$.

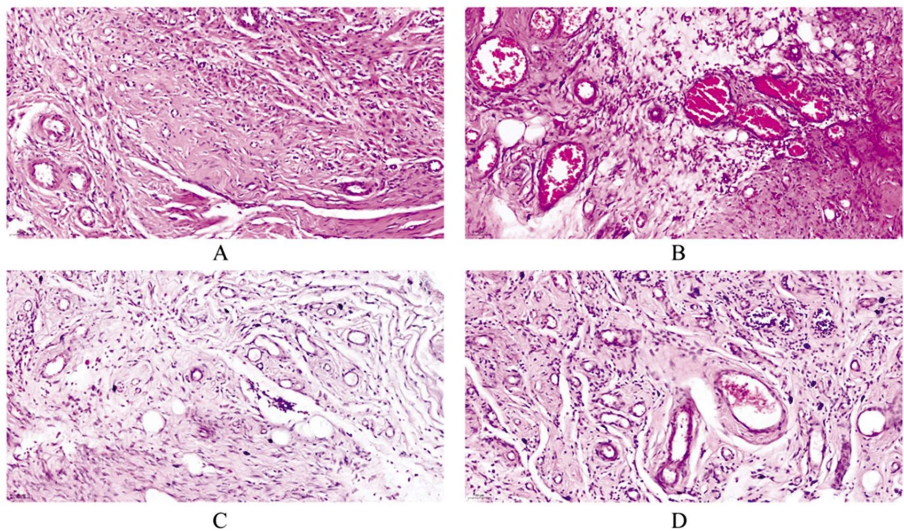


图 4 象皮生肌膏对大鼠创面组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 4 The effect of Xiangpi Shengji ointment on the histopathology of rat wound tissue(HE,×200)

注:A.假手术组;B.模型组;C.象皮生肌膏组;D.湿润烧伤膏组

Note: A.Sham operation group;B. Model group; C. Xiangpi Shengji ointment group; D. MEBO Group

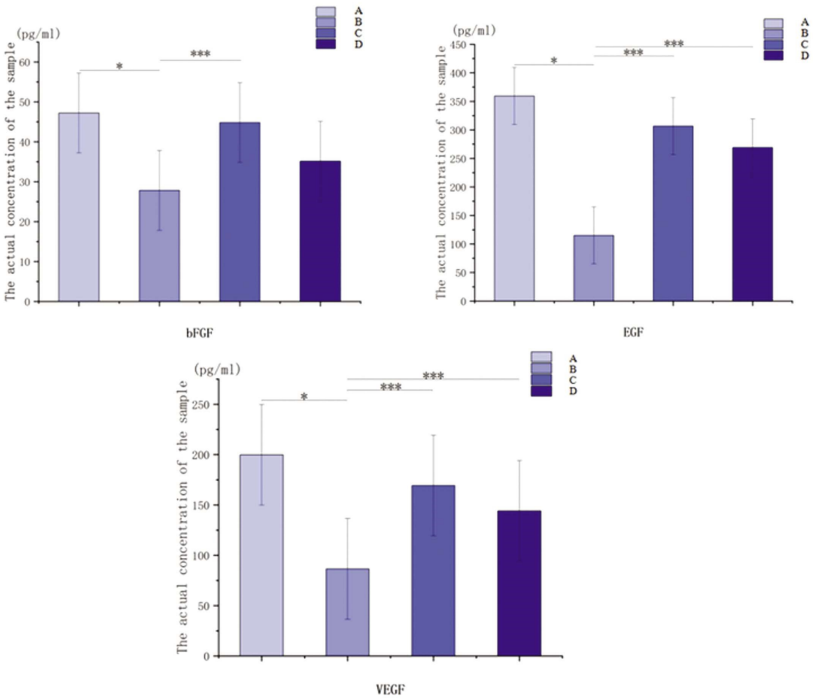


图 5 各组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 表达水平的柱状图($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Histogram of the expression levels of bFGF,EGF, and VEGF in the serum of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

注: *: $P < 0.01$; ***: $P < 0.01$ 。

Note: *: $P < 0.01$; ***: $P < 0.01$.

表 3 各组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Levels of bFGF、EGF、 and VEGF in the serum of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	bFGF	EGF	VEGF
Sham operation group	10	47.23±3.32	359.36±17.26	199.77±21.92
Model group	10	27.85±1.58*	155.05±22.80*	86.48±11.37*
Xiangpi Shengji ointment group	10	44.83±3.68***	306.63±18.71***	169.28±38.20***
MEBO Group	10	35.16±1.50	269.05±34.04***	144.09±19.43***

Note: Compared with the sham surgery group, * $P < 0.01$; Compared with the model group, * * * $P < 0.01$.

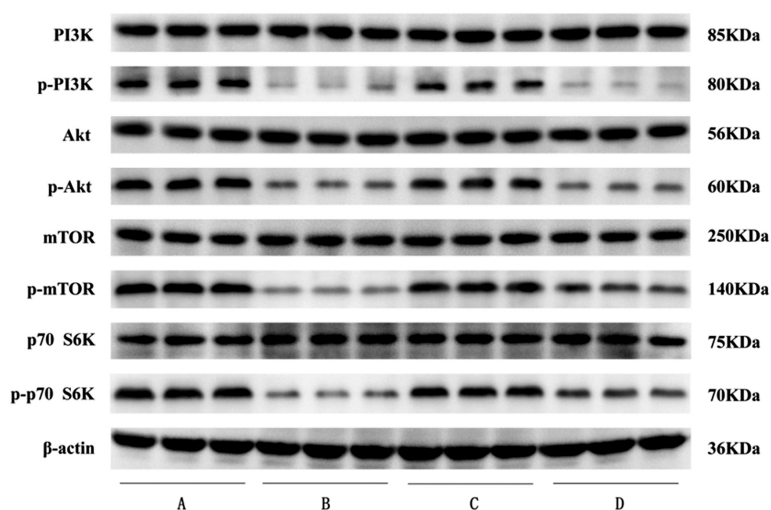


图 6 各组大鼠创面组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related proteins expression in wound tissues of rats in each group

注: A.假手术组; B.模型组; C.象皮生肌膏组; D.湿润烧伤膏组

Note: A. Sham operation group; B. Model group; C. Xiangpi Shengji ointment group; D. MEBO Group

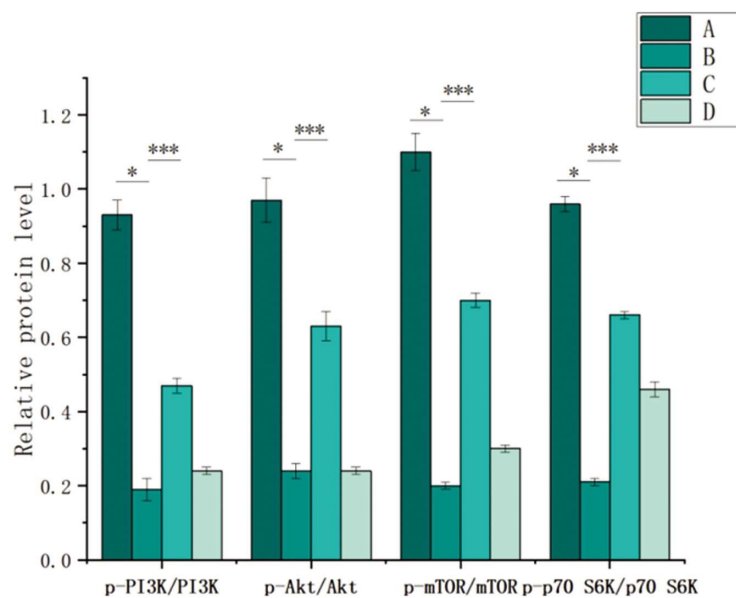


图 7 各组大鼠创面组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达柱形图

Fig. 7 Histogram of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related protein expression in wound tissue of rats in each group

注: A.假手术组; B.模型组; C.象皮生肌膏组; D.湿润烧伤膏组

与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, *** $P < 0.01$

Note: A. Sham operation group; B. Model group; C. Xiangpi Shengji ointment group; D. MEBO Group

Compared with the sham surgery group, * $P < 0.01$; Compared with the model group, *** $P < 0.01$.表 4 象皮生肌膏对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of Xiangpi Shengji Cream on the Expression of PI3K/Akt/mTOR Signal Pathway Related Proteins ($\bar{x} \pm s$)

Groups	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR	p-p70 S6K/p70 S6K
Sham operation group	0.93±0.04	0.97±0.06	1.1±0.05	0.96±0.02
Model group	0.19±0.03*	0.24±0.02*	0.2±0.01*	0.21±0.01*
Xiangpi Shengji ointment group	0.47±0.02***	0.63±0.04***	0.7±0.02***	0.66±0.01***
MEBO Group	0.24±0.01	0.24±0.01	0.3±0.01	0.46±0.02

Note: Compared with the sham surgery group, * $P < 0.01$; Compared with the model group, *** $P < 0.01$.

结合临床研究结果及现代工艺化裁成中医外科常用药品。象皮生肌膏作为纯中药制剂具有无刺激、无腐蚀、无疼痛的特点,祛腐生肌长皮的功效较强,方中象皮(制)具有止血、敛疮生肌的功效,当归具有补血活血、散瘀止痛、补血生肌的功效,血余炭发挥其止血、消散瘀毒、收敛疮漏的功效,配伍地黄清热凉血、止血、养阴,石膏清热泻火、消解瘀毒,炉甘石收湿止痒、解毒敛疮。诸药合用,即能平气分交争,又能协调卫分固外,同时助营血再生,从卫、气、营、血角度发挥减轻创面炎症、缓解创面水肿及疼痛、促进肉芽组织生长的作用^[16]。罗浩铭^[17]等研究表明象皮中的象皮粉外用可刺激毛细血管再生从而改善创面组织血供、促进肉芽组织再生,雷宇等^[18]研究表明象皮粉可能通过减少炎症因子的产生,减少创面组织渗液,加速肉芽化进程,适用于创伤的修复;当归具有抗炎镇痛的效果,能促血小板聚集、减少创面渗出的作用^[19];血余炭对于出凝血时间和出血量均有影响,能够治疗多种出血,并有一定的抗菌作用^[20];地黄具有提高免疫能力、调节代谢的作用^[21];石膏具有解热抗炎的作用,还可促进成纤维细胞和毛细血管的生成^[22];炉甘石能改善创面血供、抑菌,加速创面代谢及肉芽组织增生^[23]。现代药理研究表明,象皮生肌膏有一定的促进上皮组织再生及坏死组织脱落的功效,其治疗机制可能通过调控创面炎症反应、促进创面肉芽组织生长、增快创面组织细胞增殖而发挥药物疗效,以达到创面修复的目的^[24]。因此,有关象皮生肌膏的研究多集中于难愈性创面的治疗,如糖尿病皮肤溃疡、肛肠术后创面、慢性难愈性皮肤溃疡及压疮等。

创面修复是一个复杂且漫长的过程,尤其在慢性难愈性创面中,多种因素导致创面修复过程缓慢。在创面修复过程中,蛋白质翻译被激活是必要环节之一,创面合成大量与创面修复相关的蛋白质有助于加速创面修复,蛋白质翻译的调控、促进血管生成、细胞增殖与分化的调节由多种信号通路传导,任何一个环节出现问题均可致创面修复时间延长,甚至经久不愈^[25]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是细胞内非常重要的信号转导途径之一,与该信号通路相关的研究很多,由于其具有调控核酸转录、蛋白质翻译等作用,现有研究多集中在各类肿瘤疾病方向^[26]。随着科学研究的深入,有研究表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与调节新生血管生成,可调节血管平滑肌细胞的增殖、自噬等活动,影响血管疾病的发生与发展^[27]。因此,本研究推测大鼠肛肠术后创面修复与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路具有一定的相关性。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路的传导过程较为复杂,其中 PI3K 是一种异二聚体蛋白,是由催化亚基 p110 和调节亚基 p85 两种亚基构成,同时具有丝氨酸/苏氨酸激酶与磷脂酰肌醇激酶的活性,参与调节细胞的增殖、凋亡与分化等生理过程。PI3K 的激活通常由生长因子、氨基酸和营养物等作用细胞表面受体或支架蛋白产生^[28]。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸(Serine/Threonine, Ser/Thr) 激酶, Akt 的激活通常经由自身 Ser473 和 Thr308 位点的磷酸化而产生, Akt 作为 PI3K 的下游底物可以保证多种生长因子通过 PI3K/Akt 信号通路的传导发挥其作用与功能^[29]。活化的 Akt 通过结节性硬化复合物(Tuberous sclerosis complex, TSC) 1/2 进一步激活其下游分子 mTOR 复合

物 1(mTORC1), mTOR 作为一种 Ser/Thr 激酶,是细胞生长和增殖的重要调节因子之一^[30]。其中 mTOR 复合物 2(mTORC2) 的一个表征功能是 Akt 在 Ser473 处的磷酸化,这增强了 Akt 对特定底物的激酶活性,并且 mTORC2 可以通过磷酸化蛋白激酶 C(Phosphorylated protein kinase C, PKC) 家族成员来调节血管生成、线粒体活性、脂质合成以及葡萄糖、氨基酸和核苷酸代谢^[31]。

VEGF 作为常见的血管新生的诱导因子之一具有促进血管内皮细胞的增殖及新生血管的形成的功效,有研究表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能促进 VEGF 信号的转导,而 VEGFR 能激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路^[32]。VEGF 在调控内皮细胞和血管生成的过程中, Akt 起着至关重要的作用,活化的 Akt 促使内源性一氧化氮的产生,一氧化氮作为血管舒张因子对血管的内皮恢复及重塑起重要作用^[33]。EGF 是机体的一种小分子多肽,可刺激上皮细胞和内皮细胞生长,促使胶原及胶原酶合成,调节胶原纤维, bFGF 也是形态发生和分化的诱导因子,其生物学功能主要有促进内皮细胞的游走和修复损伤的内皮细胞、平滑肌细胞的增殖、促进血管新生、促进创伤愈合与组织修复等^[34]。在感染性创面恢复过程当中,生长因子与其受体之间的作用作为一种重要的信号传递路径直接参与创面修复。在 VEGF 的作用下,血管内皮细胞增殖速度加快,推动血管的新生, EGF 也是参与创面修复过程的信号传递分子之一,促进表皮细胞核酸转录复制及蛋白合成等一系列进程^[35]。EGF 还可以与对应的细胞膜受体特异性结合,加速创面上皮化^[36]。

本课题研究 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肛肠术后创面修复中的作用,揭示象皮生肌膏对肛肠大鼠术后创面愈合率、炎症反应、肉芽生长情况及生长因子水平的影响,将象皮生肌膏应用于肛肠大鼠术后创面,进行 10 天干预,结果显示:在建立大鼠肛肠术后创面模型后,所有大鼠精神及大便等一般情况较差,与模型组比较,治疗第 3、7、10 天象皮生肌膏组和湿润烧伤膏组的创面愈合率及创面肉芽组织填充率显著升高($P < 0.01$);比较各组创面病理学改变,模型组大鼠创面可见大量炎性细胞浸润,有明显的血管扩张及血管出血,象皮生肌膏组大鼠创面炎性细胞较少,成纤维细胞成熟且分布整齐,真皮层内胶原纤维丰富且排列整齐,可见新生血管,无明显血管扩张及出血,湿润烧伤膏组大鼠创面可见少量炎性细胞浸润及血管扩张,真皮层内可见成纤维细胞生成。与假手术组比较,模型组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量显著降低($P < 0.01$),肛周组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,象皮生肌膏组大鼠血清中 bFGF、EGF、VEGF 的含量显著升高($P < 0.01$),肛周组织中 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p-p70 S6K 蛋白表达显著升高($P < 0.05$),湿润烧伤膏组大鼠血清中 EGF、VEGF 的含量显著升高($P < 0.01$)。提示象皮生肌膏对大鼠创面 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活有明显的促进作用。

综上所述,本次实验研究结果证明象皮生肌膏对肛肠术后创面修复有一定的促进作用,主要表现为加快创面修复速度,促进创面血管新生、肉芽生长及成纤维细胞生成,减轻创面炎性细胞浸润,增加 bFGF、EGF、VEGF 的含量。其促愈机制可能

与调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达有关,其通过上调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白,激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,减轻肛瘘术后创面炎症反应,促进创面肉芽生长,加快创面愈合进程。同时,象皮生肌膏的应用有助于缩短患者治疗周期,节约医疗成本,提高患者生活质量,降低患者对肛瘘手术的恐惧感,避免延误病情,产生较大的社会效益及经济效益。

参考文献(References)

- [1] 程凯, 张謙, 金仲群, 等. 超声造影谐波成像在老年肛瘘患者术前评估中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(4): 850-852.
- [2] Yamana T. Japanese practice guidelines for anal disorders II [J]. Anal fistula J Anus Rectum Colon, 2018, 3(2): 103-109.
- [3] Xiaojie W, Banda J, Qi H, et al. Scarless wound healing: Current insights from the perspectives of TGF- β , KGF-1, and KGF-2 [J]. Cytokine & growth factor reviews, 2022, 66: 26-37.
- [4] Scopelliti F, Cattani C, Dimartino V, et al. Platelet Derivatives and the Immunomodulation of Wound Healing [J]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(15): 8370.
- [5] 孙旭, 朱朝军, 徐强, 等. 中医理论指导下的橡皮生肌膏临床合理应用[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(6): 613-616
- [6] Basile M, Cavalli E, McCubrey J, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway: A potential pharmacological target in COVID-19 [J]. Drug discovery today, 2021, 27(3): 848-856.
- [7] Sasore T, Kennedy B. Deciphering combinations of PI3K/AKT/mTOR pathway drugs augmenting anti-angiogenic efficacy in vivo [J]. PloS one, 2014, 9(8): e105280.
- [8] 宾东华, 李逵, 熊家青. 象皮生肌膏治疗糖尿病型肛瘘疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(1): 131-134.
- [9] 曹晖, 宾东华, 王爱华, 等. 象皮生肌膏对大鼠肛瘘创面修复中 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(19): 2065-2067.
- [10] 曾婷婷, 宾东华, 罗翌, 等. 象皮生肌膏对肛瘘术后模型大鼠创面中白介素-8、肿瘤坏死因子- α 蛋白表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(4): 634-637.
- [11] Shi Jia, Lv Hongbin, Tang Chen, et al. Mangiferin inhibits cell migration and angiogenesis via PI3K/AKT/mTOR signaling in high glucose and hypoxia induced RRCECs [J]. Molecular medicine reports, 2021, 23(6): 473.
- [12] Adriana de S, Santos C, Dourado D, et al. CAN Stryphnodendron adstringens EXTRACT IMPROVE THE RESULTS OF FISTULOTOMY FOLLOWED BY PRIMARY SPHINCTEROPLASTY IN THE TREATMENT OF TRANSSPHINCTERIC FISTULAE?[J]. Arq Bras Cir Dig, 2020, 33: e1540.
- [13] 周彬, 赵高斯, 黄生辉, 等. 肛瘘的中西医诊疗研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(1): 170-172.
- [14] 郭高正, 王怡明, 郑雪平. 高位复杂性肛瘘术后复发危险因素分析 [J]. 上海医学, 2022, 45(2): 99-104.
- [15] 徐向, 王琛, 陆金根. 中药治疗肛瘘术后创面愈合的机制研究进展 [J]. 中医药导报, 2020, 26(12): 167-170.
- [16] 陈凯迪, 严建, 曹晖, 等. 基于"卫气营血"理论探讨象皮生肌膏在肛瘘术后创面中的应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(12): 1978-1980+1994.
- [17] 罗浩铭, 魏子人, 白钦钦, 等. 象皮粉治疗烧伤后慢性瘢痕溃疡 1 例[J]. 中南药学, 2022, 20(10): 2448-2450.
- [18] 雷宇, 周忠志, 兰宏伟, 等. 象皮生肌膏对糖尿病皮肤溃疡修复的效果及其机理探究[J]. 中国美容医学, 2022, 31(1): 89-92.
- [19] 向璐, 张巧艳, 赵琦明, 等. 黄芪-当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2196-2213.
- [20] 王洪云, 李婵娟, 刘衡, 等. 血余炭炮制历史沿革及研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(17): 63-67.
- [21] 杜珂, 高晓霞, 王锋, 等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(06): 1477-1484.
- [22] 皮雯敏, 韩娜娜, 袁枝花, 等. 基于"干法+湿法实验"和"配位化学"探讨石膏解热配伍规律及物质基础 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1471-1482.
- [23] 张晓倩, 王巍, 贾茹, 等. 炉甘石炮制前后治疗大鼠湿疹作用比较研究[J]. 广东化工, 2022, 49(2): 31-32+40.
- [24] 张新燕, 韦东, 胡明, 等. 象皮生肌膏对肛瘘术后模型大鼠炎症因子、p38/MK2 信号通路和创面组织 VEGF、bFGF 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(17): 3242-3246.
- [25] Ho S, Marçal H, Foster LJR. Towards scarless wound healing: a comparison of protein expression between human, adult and foetal fibroblasts[J]. BioMed research international, 2014: 676493.
- [26] Xu F, Na L, Li Y. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. Cell & bioscience, 2020, 10(1): 54.
- [27] Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis [J]. Frontiers in molecular neuroscience, 2011, 4: 51.
- [28] Duan Y, Haybaeck J, Yang Z. Therapeutic Potential of PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastrointestinal Stromal Tumors: Rationale and Progress[J]. Cancers, 2020, 12(10): 2972.
- [29] Luo Q, Du R., Liu W. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway: Role in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Regulatory Mechanisms and Opportunities for Targeted Therapy [J]. Frontiers in oncology, 2022, 12: 852383.
- [30] Mercurio L, Albanesi C, Madonna S. Recent Updates on the Involvement of PI3K/AKT/mTOR Molecular Cascade in the Pathogenesis of Hyperproliferative Skin Disorders [J]. Frontiers in medicine, 2021, 8: 665647.
- [31] Zhao B, Peng Q, Poon E H L, et al. Leonurine Promotes the Osteoblast Differentiation of Rat BMSCs by Activation of Autophagy via the PI3K/Akt/mTOR Pathway [J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2021, 9: 615191.
- [32] Ling M, Quan L, Lai X, et al. VEGFB Promotes Myoblasts Proliferation and Differentiation through VEGFR1-PI3K/Akt Signaling Pathway [J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(24): 13352.
- [33] El-Hanboshi S M, Helmy M W, Abd-Alhaseeb M M. Catalpol synergistically potentiates the anti-tumour effects of regorafenib against hepatocellular carcinoma via dual inhibition of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B and VEGF/VEGFR2 signaling pathways[J]. Molecular biology reports, 2021, 48(11): 7233-7242.
- [34] 石佳勇, 严巧婧, 毛玲娟, 等. 中医药治疗对肛瘘术后创面愈合相关生长因子的影响[J]. 西部中医药, 2021, 34(2): 142-145.

- [7] Floege J, Rauen T, Tang SCW. Current treatment of IgA nephropathy [J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(5): 717-728.
- [8] Selvaskandan H, Gonzalez-Martin G, Barratt J, et al. IgA nephropathy: an overview of drug treatments in clinical trials [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2022, 31(12): 1321-1338.
- [9] Cao Y, Han X, Wang Z, et al. TLR4 knockout ameliorates streptozotocin-induced osteoporosis in a mouse model of diabetes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 546(2): 185-191.
- [10] Wang J, Chen J, Zhang B, et al. IL-6 regulates the bone metabolism and inflammatory microenvironment in aging mice by inhibiting Setd7[J]. *Acta Histochem*, 2021, 123(5): 151718.
- [11] Wu H, Zhang D, Xia H, et al. SDH5 down-regulation mitigates the damage of osteoporosis via inhibiting the MyD88/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 45(3): 317-327.
- [12] Xie H, Cao L, Ye L, et al. The miR-1906 mimic attenuates bone loss in osteoporosis by down-regulating the TLR4/MyD88/NF-kappaB pathway [J]. *Physiol Int*, 2021, 107(4): 469-478.
- [13] 邹迪,张守琳,张洪宝,等. 基于 TLR4 信号通路探讨补肾利咽方治疗 IgA 肾病作用机制 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2023, 11(4): 1-8.
- [14] 陈沛,吕继成. IgA 肾病 2022 年循证医学研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43(03): 177-182.
- [15] Takiguchi R, Nishi S, Goto S, et al. Effect of Bisphosphonate and Active Vitamin D Analog on Glucocorticoid-induced Osteoporosis in Patients with IgA Nephropathy: A Retrospective Observational Study [J]. *Kobe J Med Sci*, 2023, 69(1): E9-E15.
- [16] Nazario E, Lasa J, Schill A, et al. IgA Deficiency Is Not Systematically Ruled Out in Patients Undergoing Celiac Disease Testing[J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(4): 1238-1243.
- [17] Galli G, Carabotti M, Conti L, et al. Comparison of Clinical, Biochemical and Histological Features between Adult Celiac Patients with High and Low Anti-Transglutaminase IgA Titer at Diagnosis and Follow-Up[J]. *Nutrients*, 2023, 15(9): 2151.
- [18] Qiu J, Lu C, Zhang L, et al. Osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis is associated with serum immune regulatory cellular factors [J]. *Clin Rheumatol*, 2022, 41(9): 2685-2693.
- [19] 史婧儒,王雨荷,赵宏艳,等. 糖尿病性肾病与糖尿病性骨质疏松症微血管病变的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(06): 844-847.
- [20] 郭乐乐,侯月洁,徐文靖. 糖皮质激素对阿霉素肾病大鼠肾沟液中 IL-6 及 TNF- α 的影响 [J]. *医学理论与实践*, 2022, 35(24): 4144-4147.
- [21] 欧阳媚,孔薇. 补肾壮骨法防治肾病综合征患者激素性骨质疏松的 Meta 分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2022, 23(09): 792-796.
- [22] 刘明明,王磊,华臻,等. 糖尿病肾病继发骨质疏松的病因病机[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(23): 5451-5454.
- [23] Takiguchi R, Nishi S, Goto S, et al. Effect of Bisphosphonate and Active Vitamin D Analog on Glucocorticoid-induced Osteoporosis in Patients with IgA Nephropathy: A Retrospective Observational Study [J]. *Kobe J Med Sci*, 2023, 69(1): 9-15.
- [24] Liu MM, Lv NN, Geng R, et al. Uncovering the Key miRNAs and Targets of the Liuwei Dihuang Pill in Diabetic Nephropathy-Related Osteoporosis based on Weighted Gene Co-Expression Network and Network Pharmacology Analysis [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022, 22(3): 274-289.
- [25] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [26] Hong R, Xie J, Zhang F, et al. Identification of association between rs1057317 polymorphism in TLR4 3'-untranslated region and the susceptibility to osteoporosis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13765-13774.
- [27] Qi MY, He YH, Cheng Y, et al. Icariin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy through suppressing the TLR4/NF- κ B signal pathway[J]. *Food Funct*, 2021, 12(3): 1241-1251.
- [28] Yu YF, Yao PQ, Wang ZK, et al. MiR-137 promotes TLR4/NF- κ B pathway activity through targeting KDM4A, inhibits osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and aggravates osteoporosis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 444-446.
- [29] Zhang Y, Zhao Q. AEG-1 deletion promotes cartilage repair and modulates bone remodeling-related cytokines via TLR4/MyD88/NF- κ B inhibition in ovariectomized rats with osteoporosis [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(20): 1298-1300.
- [30] 陈明,闫晓明,王海艳,等. 基于 TLR4/BAFF/APRIL 信号通路探讨肾炎止血丸对 IgA 肾病大鼠的作用机制 [J]. *中国中医药科技*, 2023, 30(06): 1061-1066.

(上接第 821 页)

- [35] Ruiz S, Zhao H, Chandakkar P, et al. Correcting Smad1/5/8, mTOR, and VEGFR2 treats pathology in hereditary hemorrhagic telangiectasia models [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2020, 130(2): 942-957.
- [36] Lee Y-H, Hong Y-L, Wu T-L. Novel silver and nanoparticle-encapsulated growth factor co-loaded chitosan composite hydrogel with sustained antimicrobial and promoted biological properties for diabetic wound healing [J]. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2020, 118: 111385.