

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.16.012

实验研究

消肿止痛合剂对糖尿病足溃疡模型大鼠创面组织血管生成及 Dll4/Notch1 信号通路的影响

韩潇¹, 刘涛²✉, 宋渊², 陈杰², 沈稼轩², 乔靖³, 王恒杰¹, 吴乐文¹, 赵亚洲¹

1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市城关区定西东路35号, 730030; 2. 甘肃省中医院; 3. 包头市蒙医中医医院

[摘要] **目的** 探讨消肿止痛合剂治疗糖尿病足溃疡的可能作用机制。**方法** 将50只SD大鼠随机分为空白组、模型组、消肿止痛合剂组、抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组, 每组10只。除空白组外, 其余各组大鼠采用高糖高脂高胆固醇饲料喂养、腹腔注射链脲佐菌素和皮肤缺损法构建糖尿病足溃疡大鼠模型。造模成功后, 消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组给予消肿止痛合剂1 ml/(100 g·d)灌胃, 空白组、模型组、抑制剂组均给予等体积0.9%氯化钠注射液灌胃, 灌胃30 min后抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组再腹腔注射Notch1抑制剂DAPT 5 mg/(kg·d), 均每天灌胃1次。各组干预14天后, 取空白组大鼠足背部皮肤组织及其余各组大鼠创面组织, 采用HE染色法检测皮肤/创面组织病理学变化; 免疫组化染色法检测皮肤/创面组织中微血管密度(MVD); RT-PCR法和Western Blot法分别检测皮肤/创面组织中Notch 1同源蛋白(*Notch1*)、Delta样配体4(*Dll4*)、血管内皮生长因子A(*VEGFA*)、血管生成素2(*Ang-2*) mRNA表达及蛋白水平。**结果** 病理学结果显示, 空白组大鼠足背部正常皮肤组织中表皮结构完整; 模型组创面组织中表皮组织呈现角化过度现象, 胞质呈现空泡化状态, 组织中存在大量炎症细胞浸润; 消肿止痛合剂组创面组织中可见表皮层形成大量痂皮, 未见明显炎症细胞浸润, 成纤维细胞数量明显增多; 消肿止痛合剂+抑制剂组和抑制剂组创面组织中可见表皮层部分痂皮形成, 有少量炎症细胞浸润。与空白组比较, 模型组创面组织中MVD升高, *Notch1*、*Dll4* mRNA表达及蛋白水平升高, *VEGFA*、*Ang-2* mRNA表达及其蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组创面组织中MVD升高, *Notch1*、*Dll4* mRNA表达及蛋白水平降低, *VEGFA*、*Ang-2* mRNA表达及蛋白水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与消肿止痛合剂组比较, 抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组创面组织中MVD降低, *Notch1*、*Dll4* mRNA表达及蛋白水平升高, *VEGFA*、*Ang-2* mRNA表达及蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 消肿止痛合剂能有效促进糖尿病足溃疡模型大鼠创面愈合, 其作用机制可能与抑制创面组织中Dll4/Notch1信号通路, 从而促进血管生成相关。

[关键词] 糖尿病足; 溃疡; 血管生成; 创面组织; 消肿止痛合剂; Delta样配体; Notch 1同源蛋白

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcers, DFU)是糖尿病最常见和严重的并发症之一, DFU病情严重时会进展至肢端坏疽阶段, 甚至产生截肢风险^[1]。据统计, DFU患者的五年死亡率约为30%, 因DFU而大截肢的患者五年死亡率超过70%^[2]。因此, 如何抑制DFU进展、加速创面愈合, 是目前亟需解

决的问题。研究^[3]表明, DFU创面愈合困难, 与肉芽组织内微血管再生能力衰退、血管生成不足导致的营养输送匮乏密切相关。血管生成是一个复杂的过程, 由多种细胞因子共同参与完成, 其中血管内皮生长因子(VEGF)是一种刺激血管生成的蛋白质^[4], 血管生成素2(Ang-2)则是促进血管形成的重要因子, 其能与血管内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体结合, 进而影响血管的稳定性, 且与VEGF密切相关^[5]。另有研究^[6]发现, Delta样配体4/Notch同源蛋白1(Dll4/Notch1)信号通路对于

基金项目: 甘肃省自然科学基金(23JRRA1244, 22JR5RA620, 25JRRA275, 25JRRA269); 甘肃省卫生健康科研行业项目(GWSKY2024-65, GWSKY2024-15))

✉ 通讯作者: 1216294256@qq.com

血管的成熟和稳定发挥着关键作用,其通过抑制血管内皮细胞的过度增殖和迁移,促使血管分支形成更加有序和成熟的血管网络。

消肿止痛合剂是甘肃省中医院院内制剂,具有活血消肿、行气止痛的功效。前期研究证实,消肿止痛合剂联合抗生素骨水泥治疗在促进 DFU 湿热阻滞证患者创面愈合、减轻炎症反应及氧化应激方面具有显著优势,且安全性良好^[7];其还能够修复糖尿病溃疡模型大鼠受损创面,减轻炎症反应,并促进糖尿病溃疡的创面愈合^[8]。本研究采用消肿止痛合剂及信号通路抑制剂对 DFU 模型大鼠进行干预,观察消肿止痛合剂对 DFU 模型大鼠血管生成的调控作用及其对 Dll4/Notch1 信号通路的影响,以期为该合剂后续的研究工作和临床应用提供参考依据。本研究已通过甘肃中医药大学动物实验伦理委员会审批(批件号:2023-513)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 200~220 g,8 周龄,购自甘肃中医药大学,实验动物生产许可证号:SCXK(甘)2020-0001。所有动物饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障实验室,温度 20~24℃,湿度 45%~60%,每天光照 12 h,自由饮水、进食,实验前适应性喂养 1 周。

1.2 药物

消肿止痛合剂组成:当归 10 g,川芎 15 g,桃仁 10 g,红花 10 g,赤芍 9 g,生地黄 9 g,三七 6 g,木香 6 g,青皮 6 g,泽兰 6 g,甘草 6 g。由甘肃省中医院制剂中心制备,注册文号:甘卫普制准字(1997)-202-04,批号:Z04000844,规格:250 ml/瓶。

1.3 主要试剂与仪器

高糖高脂高胆固醇饲料(胆固醇 12%,猪油 15%,蔗糖 20%,胆酸钠 0.2%,基础饲料 63%,酪蛋白 0.6%,批号:D200225),上海益同生物科技有限公司;普通饲料(批号:1710210103),北京华阜康生物科技股份有限公司;链脲佐菌素(批号:271423)、Notch1 抑制剂 DAPT(批号:539457),美国 MedChemExpress 公司;苏木素染液(批号:G1004)、牛血清(BSA,批号:GC305010)、HRP 标记山羊抗兔(批号:GB22303),武汉塞维爾生物科技有限公司;伊红染液(批号:YE2080),合肥博美生物科技有限责任公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0009),上海碧云天生物技术有

限公司; β -肌动蛋白(β -actin,批号:AC026)抗体、Ang-2 抗体(批号:A0698),武汉爱博泰克生物科技有限公司;ECL 发光液(批号:17046),成都正能生物技术有限公司;CD31 抗体(批号:1075935-37),英国 Abcam 公司;DAB 试剂盒(批号:ZL1-9018),北京中杉金桥生物技术有限公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(批号:S0001)、Dll4 抗体(批号:DF13221)、血管内皮生长因子 A(VEGFA,批号:AF5131)抗体,上海起发实验试剂有限公司;Notch1 抗体(批号:20687-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司;细胞/组织总 RNA 提取试剂盒(批号:19221ES50),翌圣生物科技股份有限公司;逆转录试剂盒(批号:RR047A)、PCR 扩增试剂盒(批号:RR820A),宝日生物技术有限公司;RIPA 蛋白裂解液(批号:BL509A),兰杰柯科技有限公司;戊巴比妥钠(批号:860901),佛山市化工实验厂。

数字切片扫描仪(型号:Pannoramic 250),3DHISTECH(Hungary)公司;转轮式切片机(型号:徕卡-2016),德国徕卡仪器有限公司;掌上离心机(型号:S1010E),美国 SCILOGEX 公司;实时荧光定量 PCR 仪(型号:QuantStudio TM3),美国 ThermoFisher 仪器有限公司;数码三目摄像显微摄像系统(型号:BA400Digital),麦克奥迪实业集团有限公司。

1.4 动物造模方法

将 50 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法分为造模组 40 只和空白组 10 只。参考既往研究^[9]构建 DFU 大鼠模型:造模组大鼠给予高糖高脂高胆固醇饲料喂养 4 周,隔夜禁食不禁水 12 h 后,每只腹腔注射链脲佐菌素 40 mg/kg,7 天后进行空腹血糖监测,若大鼠连续 3 天随机血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 表示糖尿病大鼠造模成功;若血糖检测未达上述标准,需再次等剂量注射链脲佐菌素后检测血糖值,直至糖尿病大鼠造模成功。大鼠造模成功后继续给予高糖高脂高胆固醇饲料喂养,以维持连续 4 周大鼠血糖值 ≥ 16.7 mmol/L。随后将 40 只造模成功的大鼠给予 2% 戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,碘伏消毒,在大鼠足背部建立 0.5 cm $\times$ 1.0 cm 的全层皮肤切除模型,创面深度要求到达筋膜层,24 h 内将蘸满 50% 冰醋酸的棉球分 3 次涂抹于糖尿病模型大鼠的创面,以刺激创口,使用 3 cm $\times$ 3 cm 的 4 层纱布进行包扎固定,并将大鼠单笼饲养。观察经过冰醋酸刺激后,待创面出现

糜烂、坏死、破溃等现象，即可判定 DFU 大鼠造模成功^[10]。空白组大鼠同时给予普通饲料喂养，不作其他干预措施。

1.5 动物分组与干预方法

造模组 40 只大鼠全部造模成功，采用随机数字表法分为模型组、消肿止痛合剂组、抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组，每组 10 只。根据人和大鼠体表面积换算法^[11]，按 70 kg 成人每日用药量折算成大鼠等效剂量，给予消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组消肿止痛合剂 1 ml/（100 g·d）灌胃，每天 1 次；空白组、模型组、抑制剂组均给予等体积 0.9% 氯化钠注射液灌胃，每天 1 次；另抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组在灌胃 30 min 后还需腹腔注射 Notch1 抑制剂 DAPT 5 mg/（kg·d），每天 1 次^[12]。各组均干预 14 天，干预期间大鼠进行单笼饲养，继续高糖高脂高胆固醇饲料喂养，自由进食、饮水。

1.6 观察指标及方法

干预结束后次日，用 2% 戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后，空白组切取足背部正常皮肤组织，其余各组采用无菌手术操作切取造模区创面组织，取一部分组织置于冻存管，液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱中保存备用；剩余组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定。采用随机数字表法每组选取 6 只大鼠的皮肤/创面组织，进行 HE 染色、免疫组化染色。各组剩余大鼠采用随机数字表法选取 3 只大鼠的皮肤/创面组织进行 RT-PCR 法和 Western Blot 法检测。

1.6.1 HE 染色法检测皮肤/创面组织的病理学变化 选取浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定的皮肤/创面组织，进行脱水、石蜡包埋、切片，用苏木素、伊红染色，封片后于显微镜下观察组织病理学变化。每组内每张切片随机挑选至少 3 个 400 倍视野进行拍照，采用数字切片扫描仪对切片进行图像采集，并观察单位面积成纤维细胞及毛细血管数量。

1.6.2 免疫组化染色法检测皮肤/创面组织中微血管密度（MVD） 石蜡切片常规脱蜡脱水后浸入修复液，微波炉修复 20 min，PBS 冲洗 3 次、每次间隔 5 min，将切片放入 3% 双氧水室温避光孵育 25 min，PBS 洗涤 3 次，滴加 BSA，室温孵育 20 min，加入 CD31（稀释比例为 1：800）一抗，4℃ 孵育 24 h，加入 HRP 标记山羊抗兔二抗（稀释比例为 1：100），孵育 30 min，PBS 洗 3 次，DAB 显色、冲洗、终止显色、透明、封片，显微镜下观察细胞核中有

棕黄色颗粒者为 CD31 阳性细胞。CD31 阳性表达在血管内皮细胞，以 Image pro plus 6.0 软件计数 MVD，即单位面积内的阳性血管数。

1.6.3 RT-PCR 法检测皮肤/创面组织中 *Notch1*、*Dll4*、*VEGF*、*Ang-2* mRNA 表达 取 -80℃ 冻存的大鼠皮肤/创面组织 20 mg，Trizol 试剂在液氮中研磨，按试剂盒说明提取总 RNA，逆转录合成 cDNA。PCR 反应条件：95℃ 预变性 30 s，95℃ 变性 5 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，45 个循环。逆转录后，内参基因为 β -actin，检测基因为 *Notch1*、*Dll4*、*VEGF*、*Ang-2*，通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 mRNA 相对表达量。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1 大鼠皮肤/创面组织中 *Notch1*、*Dll4*、*VEGF*、*Ang-2* 引物序列

Table 1 Primer sequences of *Notch1*, *Dll4*, *VEGF*, and *Ang-2* in the skin/wound tissue of rats

引物名称	引物序列	产物长度/bp
<i>Notch1</i>	上游：AGACAGGCAACACTGAGGAAGAAG	147
	下游：TGGCAGCATCTGAACGAGAGTATC	
<i>Dll4</i>	上游：AGAATAGCGGCAGTGCTCGTAAC	82
	下游：GCTTGGATGTTGAGTGAGAAGGTTTC	
<i>VEGFA</i>	上游：AGAGGGGAGAAAGAGAAGGAAGAGG	113
	下游：GCGGCTGGAGCACTGTCTC	
<i>Ang-2</i>	上游：GACCACTGGGCATCGCTACG	135
	下游：CCTGTGAGTCCTGTAAGGTGAATCC	
β -actin	上游：GGGAAATCGTGCGTGACATT	76
	下游：GCGGCAGTGGCCATCTC	

注：*Notch1*，Notch 同源蛋白 1；*Dll4*，Delta 样配体 4；*VEGFA*，血管内皮生长因子 A；*Ang-2*，血管生成素 2； β -actin， β -肌动蛋白。

1.6.4 Western Blot 法检测皮肤/创面组织中 *Notch1*、*Dll4*、*VEGFA*、*Ang-2* 蛋白水平 取 -80℃ 冻存的大鼠创面组织，解冻后研磨匀浆，RIPA 蛋白裂解液进行裂解，BCA 法测定蛋白浓度，上样、电泳、转膜、5% 脱脂奶粉封闭，加入一抗 *Ang-2*、*Dll4*、*Notch1*、*VEGFA*、 β -actin（稀释比例分别为 1：2000、1：2000、1：1000、1：2000、1：50 000），4℃ 过夜。加入二抗（稀释比例为 1：50 000）孵育，TBST 清洗 3 次，ECL 发光液显影。采用 Tanon 荧光图像分析系统 V2.0 软件对蛋白条带进行曝光，以 Gel-Pro analyzer 4 软件扫描曝光结果，获得曝光图片。采用 ImageJ 1.8.0 软件分析灰度值，以 β -actin 为内参，以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.7 统计学方法

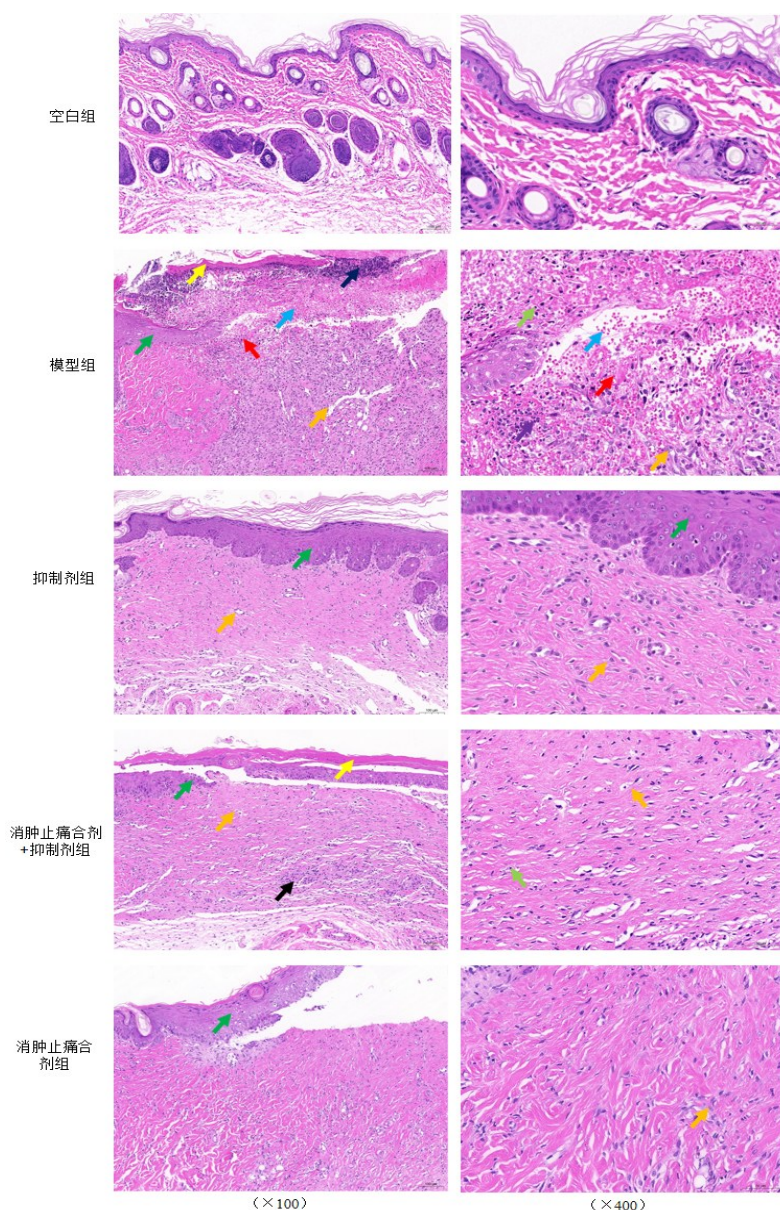
采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料均符合正态分布, 采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐者两组间比较采用 LSD 检验, 方差不齐者两组间比较采用 Dunnett's 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠皮肤/创面组织病理学变化比较

图 1 示, 空白组大鼠皮肤组织中表皮结构完整

且清晰可辨, 扁平角质细胞排列紧密有序呈叠瓦状, 真皮层内胶原纤维排列规整呈网状分布。模型组大鼠创面组织中表皮层组织呈现角化过度现象, 角质层明显增厚, 部分棘细胞出现变性, 胞质呈现空泡化状态; 真皮层内少量胶原纤维发生坏死, 可见大量炎症细胞浸润, 其中以中性粒细胞和淋巴细胞居多, 真皮浅层存在出血情况, 可见红细胞渗出。抑制剂组大鼠创面组织中表皮层可见结痂; 真皮层内纤维组织增生, 可见细胞核呈长椭圆形的成纤维细胞数量增多, 出现炎症细胞浸润且以杆状分



注: 红色箭头指示真皮坏死; 蓝色箭头指示出血; 绿色箭头指示表皮增厚; 浅绿色箭头指示淋巴细胞; 黄色箭头指示角化过度; 橘色箭头指示纤维组织增生伴有血管增生; 黑色箭头指示炎症细胞浸润。

图 1 各组大鼠皮肤/创面组织病理学变化图 (HE 染色)

Figure 1 Histological changes in the skin/wound tissue of rats from each group (HE staining)

叶核的中性粒细胞为主。消肿止痛合剂+抑制剂组大鼠创面组织中表皮层部分痂皮形成，表皮层角化，棘层轻度增厚；真皮层内胶原纤维在不同方向上纵横交错，成纤维细胞增多，血管内皮细胞增生，可见少量炎症细胞浸润。消肿止痛合剂组大鼠创面组织中表皮层大量痂皮形成，且表皮层可见不同程度的增厚现象；真皮层内胶原纤维呈交错排列状态，成纤维细胞明显增多，未见明显炎症细胞浸润，细胞体积增大，细胞核大而淡染、核仁明显，可见新生毛细血管。

2.2 各组大鼠皮肤/创面组织中 MVD 比较

表 2 示，与空白组比较，模型组大鼠创面组织中 MVD 升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组、抑制剂组大鼠创面组织中 MVD 均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与消肿止痛合剂组比较，抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组大鼠创面组织中 MVD 均降低 ($P<0.01$)。各组大鼠创面组织中 CD31 阳性表达见图 2。

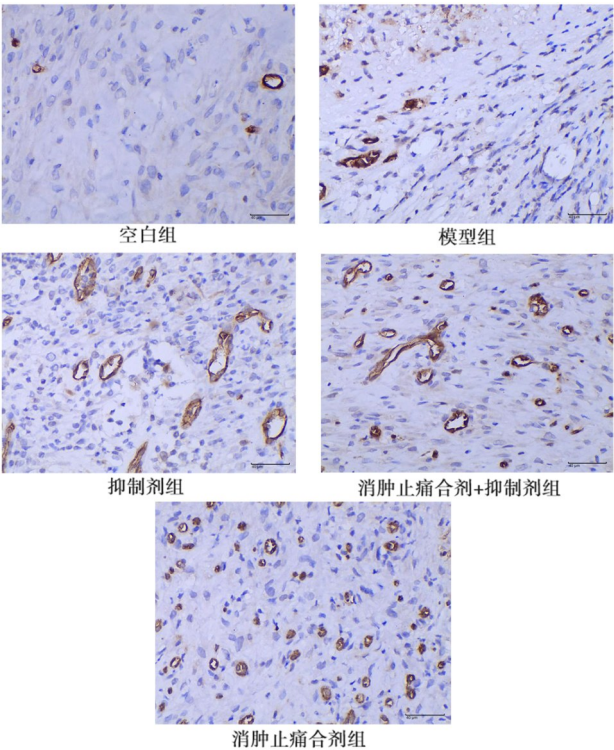
表 2 各组大鼠皮肤/创面组织中 MVD 比较
Table 2 Comparison of MVD in the skin/wound tissue of rats from each group (个/高倍视野, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MVD
空白组	6	6.00±1.32
模型组	6	10.50±1.32 ^{a)}
消肿止痛合剂组	6	33.67±1.76 ^{b)}
抑制剂组	6	14.83±1.53 ^{c) d)}
消肿止痛合剂+抑制剂组	6	23.33±1.26 ^{b) d)}

注：MVD，微血管密度。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与消肿止痛合剂组比较， $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠皮肤/创面组织中 *Notch1*、*Dll4*、*VEGFA*、*Ang-2* mRNA 表达比较

表 3 示，与空白组比较，模型组大鼠创面组织中 *Notch1*、*Dll4* mRNA 表达升高，*VEGFA*、*Ang-2*



注：图中棕黄色颗粒为阳性细胞。
图 2 各组大鼠皮肤/创面组织中 CD31 的微血管密度表达 (免疫组化, $\times 400$)
Figure 2 Expression of CD31 microvessel density in the skin/wound tissue of rats from each group (Immunohistochemistry, $\times 400$)

mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组、抑制剂组大鼠创面组织中 *Notch1*、*Dll4* mRNA 表达降低，*VEGFA*、*Ang-2* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与消肿止痛合剂组比较，抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组大鼠创面组织中 *Notch1*、*Dll4* mRNA 表达升高，*VEGFA*、*Ang-2* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组大鼠创面组织中 *Notch1*、*Dll4*、*VEGFA*、*Ang-2* mRNA 表达比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠皮肤/创面组织中 *Notch1*、*Dll4*、*VEGFA*、*Ang-2* mRNA 表达比较
Table 3 Comparison of *Notch1*, *Dll4*, *VEGFA*, and *Ang-2* mRNA expression in the skin/wound tissue of rats from each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	<i>Notch1</i>	<i>Dll4</i>	<i>VEGFA</i>	<i>Ang-2</i>
空白组	3	1.010 0±0.185 2	1.020 0±0.245 2	1.013 3±0.197 6	1.006 7±0.106 9
模型组	3	6.023 3±0.488 4 ^{a)}	3.966 7±0.338 3 ^{a)}	0.323 3±0.035 1 ^{a)}	0.620 0±0.036 1 ^{a)}
消肿止痛合剂组	3	1.603 3±0.231 6 ^{b)}	1.230 0±0.195 2 ^{b)}	3.620 0±0.250 6 ^{b)}	1.846 7±0.081 4 ^{b)}
抑制剂组	3	3.833 3±0.223 7 ^{b) c)}	2.470 0±0.199 7 ^{b) c)}	1.833 3±0.151 8 ^{b) c)}	1.250 0±0.045 8 ^{b) c)}
消肿止痛合剂+抑制剂组	3	2.816 7±0.234 6 ^{b) c)}	1.893 3±0.151 8 ^{b) c)}	2.566 7±0.228 1 ^{b) c)}	1.556 7±0.109 7 ^{b) c)}

注：*Notch1*，Notch 同源蛋白 1；*Dll4*，Delta 样配体 4；*VEGFA*，血管内皮生长因子 A；*Ang-2*，血管生成素 2。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与消肿止痛合剂组比较， $P<0.01$ 。

表4 各组大鼠皮肤/创面组织中 Notch1、Dll4、VEGFA、Ang-2 蛋白水平比较

Table 4 Comparison of Notch1, Dll4, VEGFA, and Ang-2 protein levels in the skin/wound tissue of rats from each group

(/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)

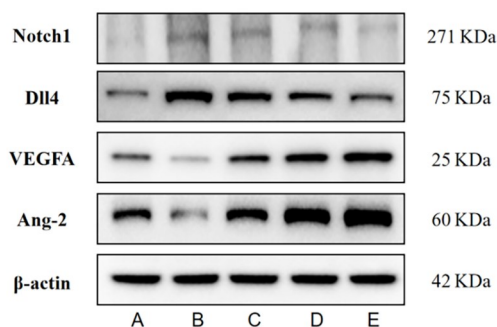
组别	鼠数	Notch1	Dll4	VEGFA	Ang-2
空白组	3	1.023 3 $\pm$ 0.035 2	0.681 9 $\pm$ 0.036 6	1.158 6 $\pm$ 0.006 3	1.555 0 $\pm$ 0.018 1
模型组	3	1.416 6 $\pm$ 0.011 4 ^{a)}	2.991 9 $\pm$ 0.058 3 ^{a)}	0.468 1 $\pm$ 0.014 7 ^{a)}	0.511 9 $\pm$ 0.011 9 ^{a)}
消肿止痛合剂组	3	1.050 7 $\pm$ 0.007 3 ^{b)}	1.389 6 $\pm$ 0.031 5 ^{b)}	2.818 7 $\pm$ 0.039 3 ^{b)}	2.748 4 $\pm$ 0.055 5 ^{b)}
抑制剂组	3	1.227 2 $\pm$ 0.039 7 ^{b) c)}	2.475 1 $\pm$ 0.087 8 ^{b) c)}	1.520 5 $\pm$ 0.032 9 ^{b) c)}	1.946 9 $\pm$ 0.037 4 ^{b) c)}
消肿止痛合剂+抑制剂组	3	1.116 2 $\pm$ 0.022 6 ^{b) d)}	1.836 8 $\pm$ 0.067 0 ^{b) c)}	2.364 0 $\pm$ 0.028 4 ^{b) c)}	2.174 0 $\pm$ 0.026 7 ^{b) c)}

注: Notch1, Notch 同源蛋白 1; Dll4, Delta 样配体 4; VEGFA, 血管内皮生长因子 A; Ang-2, 血管生成素 2。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与消肿止痛合剂组比较, $P<0.01$; d) 与消肿止痛合剂组比较, $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠皮肤/创面组织中 Notch1、Dll4、VEGFA、Ang-2 蛋白水平比较

表4示,与空白组比较,模型组大鼠创面组织中 Notch1、Dll4 蛋白水平升高, VEGFA、Ang-2 蛋白水平降低 ($P<0.01$);与模型组比较,消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组、抑制剂组大鼠创面组织中 Notch1、Dll4 蛋白水平降低, VEGFA、Ang-2 蛋白水平升高 ($P<0.01$);与消肿止痛合剂组比较,消肿止痛合剂+抑制剂组、抑制剂组大鼠创面组织中 Notch1、Dll4 蛋白水平升高, VEGFA、Ang-2 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。抑制剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组大鼠创面组织中 Notch1、Dll4、VEGFA、Ang-2 蛋白水平比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠皮肤/创面组织中 Notch1、Dll4、VEGFA、Ang-2 蛋白电泳图见图3。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 消肿止痛合剂组; D, 抑制剂组; E, 消肿止痛合剂+抑制剂组; Notch1, Notch 同源蛋白 1; Dll4, Delta 样配体 4; VEGFA, 血管内皮生长因子 A; Ang-2, 血管生成素 2。

图3 各组大鼠皮肤/创面组织中 Notch1、Dll4、VEGFA、Ang-2 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis image of Notch1, Dll4, VEGFA, and Ang-2 proteins in the skin/wound tissue of rats from each group

3 讨论

依据 DFU 发病部位及临床表现等特征,可将其归属于中医学“痈疽”“脱疽”范畴。DFU 病机为本虚标实,久病正虚为内在根本缘由,血脉瘀阻是发病的外在关键因素^[13]。消肿止痛合剂方中当归、川芎为君药,能够活血化瘀、行散气滞,以助缓解疼痛;桃仁、红花、泽兰为臣药,具有活血通经、化瘀止痛、祛瘀消痛的功效;佐以三七、赤芍、生地黄以凉血活血、化瘀止痛,木香、青皮行气止痛;甘草缓急止痛、调和诸药,为使药。诸药合用,共奏活血消肿、行气止痛之功。前期研究^[14]证实,消肿止痛合剂能够减少 DFU 模型大鼠创面组织中炎症因子的表达,从而减轻炎症反应,促进创面愈合。

DFU 发展进程中,以足部皮肤破损、溃疡难以愈合、感染迁延不愈为主要临床症状,这与血管生成障碍引起的局部组织缺血、缺氧,营养物质供应不足密切相关^[15]。研究^[16]表明,血管内皮细胞功能异常、血管生成相关因子表达失衡、炎症微环境紊乱、细胞外基质重塑异常均为 DFU 中血管生成障碍的关键发病机制。血管生成受多种血管生长因子和调节剂的表达调控, VEGF 家族是其中表达最广泛和最关键的因子^[17]。 VEGF 是一种作用于动脉、静脉以及淋巴管内血管内皮细胞的有丝分裂原,能够刺激内皮细胞的增殖、迁移和存活,在血管生成和维持血管稳态过程中发挥着关键作用^[18]。其中 VEGFA 是血管形成和通透性的主要调节因子,能够增加血管的通透性,使更多营养物质和免疫细胞进入创面部位,有助于创面修复和愈合^[19]。此外,在内皮细胞的血管生成激活时 Ang-2 水平会明显上调, Ang-2 可促进血管内皮细胞的增殖、迁移及血管出芽,与 VEGFA 共同推动血管生成过程^[20]。

Notch1 受体与 Dll4 配体构成了调控血管生成与

成熟的关键机制,在生物体的多个系统中,Notch1 发挥着血管生成的主要调节作用,其通过调控血管内皮细胞的增殖、迁移及分化,确保血管网络的有序构建与稳定^[6]。Dll4 作为 Notch1 的跨膜配体,是血管形态发生的核心调控因子,尤其在控制内皮尖端细胞的出现上起着决定性作用,这些尖端细胞是引导血管分支形成的关键细胞^[21-22]。在病理状态下,过度活化的 Dll4/Notch1 信号通路会抑制血管生成因子的表达与活性,导致血管新生障碍^[23-24]。因此,深入探究 Dll4/Notch1 信号通路对于 DFU 的防治具有重要意义,本研究设置了 Notch1 抑制剂干预,以对照探讨消肿止痛合剂的可能作用机制。

本研究 HE 染色结果显示,与模型组比较,消肿止痛合剂组明显改善了创面表皮层过度角化和角质层异常增厚,使棘细胞的形态和功能趋于正常,减少了胶原纤维的坏死,显著减轻了炎症反应;且成纤维细胞增多、血管内皮细胞增生表明消肿止痛合剂能够促进成纤维细胞和血管内皮细胞的增殖,有助于肉芽组织的形成和血管新生,对创面的修复和愈合具有积极意义。同时免疫组化结果显示,消肿止痛合剂能够增加大鼠创面组织 CD31 阳性血管数,创面 MVD 增加,有助于改善创面微循环,增强组织修复能力。上述结果表明,消肿止痛合剂作用于 DFU 模型大鼠创面时,可在一定程度上推动 DFU 创面的愈合进程,促使创面状况实现显著好转,与既往研究结果^[12]一致。

Western Blot 法及 RT-PCR 法检测结果表明,与空白组比较,模型组大鼠创面组织中 VEGFA、Ang-2 蛋白水平及 mRNA 表达均降低,表明大鼠 DFU 造模后高血糖环境引发一系列病理变化,进而导致促血管生成相关因子表达降低,佐证了血管新生障碍是创面难愈合的关键机制。在使用消肿止痛合剂干预后,消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组大鼠创面组织中 VEGFA、Ang-2 蛋白水平及 mRNA 表达均升高,证实消肿止痛合剂能够促进血管新生从而发挥促进创面愈合的治疗作用。此外,相较于空白组,模型组大鼠创面组织内 Notch1、Dll4 蛋白水平及 mRNA 表达均升高,表明 DFU 模型大鼠创面组织 Dll4/Notch1 信号通路被激活。而消肿止痛合剂组、消肿止痛合剂+抑制剂组、抑制剂组大鼠创面组织中 Notch1、Dll4 蛋白水平及 mRNA 表达均降低,且以消肿止痛合剂组的改善最明显,表明消肿止痛合剂能够抑制创面组织 Dll4/Notch1 信号通路。病理学结果显示,消肿止痛合剂组较消

肿止痛合剂+抑制剂组、抑制剂组大鼠创面组织中炎症细胞浸润减少,成纤维细胞、血管内皮细胞增多,MVD 增加,进一步证实了消肿止痛合剂抑制 Dll4/Notch1 信号通路是治疗 DFU 的重要机制。

综上,消肿止痛合剂可以通过抑制 Dll4/Notch1 信号通路,改善创面组织病理学形态,促进血管生成,从而改善局部微循环,加快溃疡创面愈合。本研究未能设置多重剂量组对消肿止痛合剂展开精准的定量与定性分析,故而难以全面评价该合剂在治疗 DFU 时的具体药理作用机制。在后续研究中,需借助现代科学技术手段,同时开展高质量的细胞分子实验,进一步探究其具体的分子生物学机制,为该合剂的临床应用提供更坚实的理论基础。

参考文献

- [1]MORBACH S, ECKHARD M, LOBMANN R, et al. Diabetic foot syndrome [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2023,131(1/2):84-93.
- [2]ARMSTRONG DG, TAN TW, BOULTON AJM, et al. Diabetic foot ulcers: a review[J]. JAMA, 2023,330(1): 62-75.
- [3]RAI V, MOELLMER R, AGRAWAL DK. Stem cells and angiogenesis: implications and limitations in enhancing chronic diabetic foot ulcer healing [J]. Cells, 2022, 11 (15):2287.
- [4]MELINCOVICI CS, BOSCA AB, SUSMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF): key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018,59(2):455-467.
- [5]SAHARINEN P, EKLUND L, ALITALO K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017,16(9):635-661.
- [6]TIEMEIJER LA, FRIMAT JP, STASSEN OMJA, et al. Spatial patterning of the Notch ligand Dll4 controls endothelial sprouting in vitro[J]. Sci Rep, 2018,8(1):6392.
- [7]魏晓涛,何志军,刘涛,等. 消肿止痛合剂联合抗生素骨水泥治疗糖尿病足溃疡湿热阻滞证患者 35 例随机对照试验[J]. 中医杂志,2025,66(7):704-709.
- [8]魏晓涛,何志军,刘涛,等. 消肿止痛合剂对糖尿病溃疡模型大鼠创面愈合的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2023,39(5):902-909.
- [9]邓品. 复方血竭粉治疗糖尿病足溃疡的临床观察及其主要成分的机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2023.
- [10]张彬彬. 湿润烧伤膏外用对糖尿病小鼠皮肤溃疡创面愈合及细胞凋亡抑制作用研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2021.

- [11]章元沛. 药理学实验[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:238.
- [12]YANG JY, SHEN DY, WANG J, et al. DAPT attenuates cadmium-induced toxicity in mice by inhibiting inflammation and the Notch/HES-1 signaling axis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 902796. doi: 10.3389/fphar.2022.902796.
- [13]中国中西医结合学会周围血管病专业委员会. 中西医结合防治糖尿病足中国专家共识(精简版)[J]. 北京中医药, 2019, 38(11): 1078-1087.
- [14]乔靖, 宋渊, 沈稼轩, 等. 消肿止痛合剂调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对糖尿病足溃疡大鼠细胞自噬的影响[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(9): 2099-2103.
- [15]LIN B, CHANG C, TSENG Y, et al. Using wireless near-infrared spectroscopy to predict wound prognosis in diabetic foot ulcers[J]. Adv Skin Wound Care, 2020, 33(1): 1-12.
- [16]POTENTE M, GERHARDT H, CARMELIET P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. Cell, 2011, 146(6): 873-887.
- [17]PANDYA NM, DHALLA NS, SANTANI DD. Angiogenesis: a new target for future therapy[J]. Vascu Pharmacol, 2006, 44(5): 265-274.
- [18]SHAW P, DWIVEDI SKD, BHATTACHARYA R, et al. VEGF signaling: role in angiogenesis and beyond[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2024, 1879(2): 189079.
- [19]ZENG Y, FU BM. Angiogenesis and microvascular permeability[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2025, 15(1): a041163.
- [20]AUGUSTIN HG, KOH GY, THURSTON G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-tie system[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(3): 165-177.
- [21]CHEN W, XIA P, WANG H, et al. The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis[J]. J Cell Commun Signal, 2019, 13(3): 291-301.
- [22]PITULESCU ME, SCHMIDT I, GIAIMO BD, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(8): 915-927.
- [23]HU Y, LI H. DLL4/Notch blockade disrupts mandibular advancement-induced condylar osteogenesis by inhibiting H-type angiogenesis[J]. J Oral Rehabil, 2024, 51(4): 754-761.
- [24]CHA S, KIM H, JANG H, et al. Steppogenin suppresses tumor growth and sprouting angiogenesis through inhibition of HIF-1 α in tumors and DLL4 activity in the endothelium[J]. Phytomedicine, 2023, 108: 154513. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154513.

Effects of Xiaozhong Zhitong Mixture (消肿止痛合剂) on Angiogenesis and the Dll4/Notch1 Signaling Pathway in Wound Tissue of Diabetic Foot Ulcer Model Rats

HAN Xiao¹, LIU Tao², SONG Yuan², CHEN Jie², SHEN Jiaxuan², QIAO Jing³, WANG Hengjie¹, WU Lewen¹, ZHAO Yazhou¹

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000; 2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. Baotou Mongolian and Traditional Chinese Medicine Hospital

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of Xiaozhong Zhitong Mixture (消肿止痛合剂, XZM) in the treatment of diabetes foot ulcer (DFU). **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into blank group, model group, XZM group, inhibitor group, XZM plus inhibitor group (combination group), with 10 rats in each group. Except for the blank group, rats were fed with high-sugar, high-fat, high-cholesterol diet, intraperitoneally injected with streptozotocin, and subjected to skin defect to establish DFU model. After successful modeling, the XZM group and the combination group were given 1 ml/(100 g·d) of XZM by gavage, while the blank group, model group, and inhibitor group were all given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage. Thirty minutes later, the inhibitor group and the combination group were intraperitoneally injected with 5 mg/(kg·d) of Notch1 inhibitor DAPT. All groups were treated once a day. After 14 days of administration, the skin tissue from the dorsal foot of the blank group rats and wound tissue from the other groups were collected. The pathological changes of granulation tissue in the wound were detected using hematoxylin eosin (HE) staining. The microvascular density (MVD) in wounds was detected through immunohistochemical staining. Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of Notch1 homolog (Notch1), Delta-like ligand 4 (Dll4), Delta-like ligand 4 (VEGF), and angiopoietin 2 (Ang-2), respectively.

Results Histological results showed that the epidermal structure in the dorsal foot skin tissue of the rats in the blank group was intact. In the wound tissue of the model group, the epidermis exhibited excessive keratinization, vacuolar cytoplasm, and a large number of inflammatory cells infiltrating the tissue, while in the XZM group, a large amount of scab formation was observed in the epidermis, with no significant inflammatory cell infiltration and a noticeable increase in fibroblasts. In the combination group and the inhibitor group, partial epidermal scab formation was observed in the wound tissue with a small amount of inflammatory cell infiltration. Compared to those in the blank group, the MVD in the wound tissue increased in the model group, as well as the mRNA expression and protein levels of Notch1 and Dll4, while VEGFA and Ang-2 mRNA expression and protein levels significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the MVD in the wound tissue of all medication groups significantly increased, and the mRNA and protein levels of Notch1 and Dll4 decreased, while VEGFA and Ang-2 mRNA expression and protein levels increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the XZM group, the inhibitor group and the combination group showed decreased MVD in wound tissue, increased Notch1 and Dll4 mRNA and protein levels, and decreased expression of VEGFA and Ang-2 mRNA and proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** XZM can effectively promote wound healing in DFU rats, and its mechanism of action may be related to the inhibition of Dll4/Notch1 signaling pathway in the wound tissue, thereby promoting angiogenesis.

Keywords Diabetic foot; ulcer; angiogenesis; wound tissue; Xiaozhong Zhitong Mixture (消肿止痛合剂); Delta-like ligand; Notch1 homolog

(收稿日期: 2025-02-23; 修回日期: 2025-06-13)

[编辑: 邓媛]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632 联系人: 杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘) 480 元

1987—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘) 260 元

1995—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘) 280 元

2005—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘) 300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号