

托里消毒散通过调控 NF- κ B 信号通路对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤的影响

陈浩¹, 张天琦¹, 马骁², 付秋悦¹, 张杉¹, 严肃¹, 陈刚¹

(1. 南京中医药大学附属医院/江苏省中医院整形外科, 江苏 南京 210029; 2. 宜兴市中医院整形外科, 江苏 宜兴 214200)

摘要:目的 探讨托里消毒散对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤的影响及其潜在机制。方法 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(Model 组)、托里消毒散高剂量组(MDX-H 组)和托里消毒散低剂量组(MDX-L 组), 每组 10 只。大鼠背部皮瓣模型构建成功后, 立即给予药物灌胃处理, 每日 1 次, 连续 14 d。观察术后各组大鼠皮瓣变化情况, 并于术后第 14 天测定各组大鼠皮瓣成活率; HE 染色观察大鼠皮瓣组织病理学变化; Western blot 检测大鼠皮瓣组织 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达; ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 细胞因子的表达情况; 通过 Ki67 和 CD31 免疫组化染色观察表皮基底层细胞增殖及血管再生情况。结果 与 Model 组相比, MDX-H 组与 MDX-L 组术后 14 d 出现少量水肿, 有少量炎性液体渗出, 脱痂时间提前, 皮瓣缺血坏死情况得到明显改善, 皮瓣坏死面积显著减少, 大鼠皮瓣成活率明显提高($P < 0.01$)。此外, 托里消毒散可明显改善大鼠背部皮瓣缺血再灌注损伤组织病理形态, 降低 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达($P < 0.001$), 降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子水平($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$)。Ki67 和 CD31 的差异也提示托里消毒散治疗加快了缺血皮瓣损伤后的再上皮化和血管的形成。结论 托里消毒散通过调控 NF- κ B 信号通路, 加速上皮化和血管生成, 发挥改善皮瓣缺血再灌注损伤的作用。

关键词:托里消毒散; 缺血再灌注损伤; 皮瓣; NF- κ B 信号通路; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2024)01-0061-07

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2024.0061

引文格式: 陈浩, 张天琦, 马骁, 等. 托里消毒散通过调控 NF- κ B 信号通路对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(1): 61-67.

Effects of Tuoli Xiaodusan on Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Skin Flaps by Regulating NF- κ B Signaling Pathway

CHEN Hao¹, ZHANG Tianqi¹, MA Xiao², FU Qiuyue¹, ZHANG Shan¹, YAN Su¹, CHEN Gang¹

(1. Department of Plastic Surgery, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Department of Plastic Surgery, Yixing Hospital of Chinese Medicine, Yixing 214200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of Tuoli Xiaodusan (MDX) on ischemia-reperfusion injury of rat skin flaps and its potential mechanism. **METHODS** Rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), Model group, MDX high-dose group (MDX-H group) and MDX low-dose group (MDX-L group), with 10 rats in each group. After the rat back skin flap model was successfully constructed, the drug was administered by gavage immediately, once a day for 14 consecutive days. The changes of rat skin flaps in each group after surgery were observed, and the survival rate of rat skin flaps in each group was measured on the 14th day after surgery; the histopathological changes of rat skin flaps were observed by HE staining; the protein expression of p-p65 and p-I κ B α in the rat skin flap tissue was detected by Western blot; ELISA method was used to detect the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 cytokines; Ki67 and CD31 immunohistochemical staining were used to observe epidermal basal layer cell proliferation and vascular regeneration. **RESULTS** Compared with Model group, MDX-H group and MDX-L group had a small amount of edema and inflammatory fluid exudation after surgery, and the scab removal time was advanced; the ischemic necrosis of the skin flap was significantly improved, the area of skin flap necrosis was significantly decreased, and the survival rate of rat skin flaps was significantly increased ($P < 0.01$). In addition, MDX could significantly improve the pathological morphology of ischemia-reperfusion injury in rat back skin flaps, reduce the expression of p-p65 and p-I κ B α proteins ($P < 0.001$), and decrease the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 inflammatory factor levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$). The differences in Ki67 and CD31 also suggested that treatment with MDX accelerate re-epithelialization and blood vessel formation after ischemic flap injury. **CONCLUSION** MDX plays a role in improving ischemia-reperfusion injury of skin flaps by regulating the NF- κ B signaling pathway and accelerating epithelialization and angiogenesis.

KEYWORDS: Tuoli Xiaodusan; ischemia-reperfusion injury; skin flap; NF- κ B signaling pathway; inflammatory response

收稿日期: 2023-06-04

基金项目: 南京中医药大学自然科学基金(XZR2020009)

第一作者: 陈浩, 男, 硕士研究生, E-mail: ch19981030@163.com

通信作者: 陈刚, 男, 主任医师, 主要从事皮瓣缺血再灌注损伤研究, E-mail: njcg110@163.com

皮瓣移植作为修复创面和皮肤缺损的重要手段^[1],在整形外科、血管外科、显微外科及骨科等领域应用广泛,而其最常见的并发症——缺血再灌注损伤,常常会引起皮瓣坏死,给患者及其家庭造成一定经济和心理负担。在临床上,术后发生皮瓣缺血再灌注损伤的患者往往体衰无力,局部难以温养,而其局部紫暗、刺痛等特点,满足血瘀的表现,故将其病理特点概述为“气虚血瘀”。针对其特点,我们运用补托法代表方——托里消毒散对出现皮瓣缺血再灌注损伤的患者进行治疗,发现该方可有效防治皮瓣缺血再灌注损伤。托里消毒散出自《外科正宗》^[2],由人参、川芎、白芍、黄芪、白术、茯苓、当归、金银花、白芷、甘草、桔梗、皂角刺组成。但目前针对托里消毒散治疗机制方面的研究报道较少。NF- κ B 作为防治皮瓣缺血再灌注损伤的经典通路,在皮瓣缺血再灌注损伤过程中发挥着重要作用。因此本研究拟在构建大鼠背部任意皮瓣缺血再灌注损伤模型的基础上,通过分析皮瓣的成活率、检测 NF- κ B 通路的 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白指标, TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 炎症因子的表达情况和皮瓣表皮 Ki67 及 CD31 表达,探讨托里消毒散对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤的保护作用及其机制,为托里消毒散治疗皮瓣缺血再灌注损伤的临床应用提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体质量 (250 \pm 20)g,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,实验动物许可证号:SCXK(苏)2020-0009。饲以条杆状动物饲料,自由饮水,环境保持 20~25 $^{\circ}$ C、恒湿 (50 \pm 5)% ,自然采光。动物实验规程经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (ACU210127)。

1.2 实验药品和试剂

NF- κ B p65 抗体 (货号:AF1234)、p-NF- κ B p65 (Ser276) 抗体 (货号:AF5875)、I κ B α 抗体 (货号:AF1282)、p-I κ B α (Ser32) 抗体 (货号:AF1870)、Ki67 抗体 (货号:C2312S)、CD31 抗体 (货号:AG5142) 购自于碧云天;大鼠血清 TNF- α (货号:MTA00B-1)、IL-6 (货号:SM6000B) 和 IL-1 β (货号:DY401) ELISA 检测试剂盒购自 R&D System。

1.3 主要仪器及设备

超低温冰箱 (捷盛,型号:DW-86W208);酶标仪 (美国伯乐,型号:680);显微镜 (德国宝视德,型号:88-55008);水浴锅 (泰斯特,型号:DK-98-II);

超净工作台 (博科,型号:BBS-DDC);实时荧光定量 PCR 仪 (优云谱,型号:YP-PC)。

1.4 模型制备

参照改良 McFarlane^[3]皮瓣模型的方法在大鼠背部制备任意皮瓣:以大鼠尾侧两髂嵴连线为蒂、大鼠背脊为中轴线,在大鼠背部设计 2 cm \times 8 cm 的矩形皮瓣。异氟烷吸入麻醉后,沿既定设计线切开皮肤及皮下组织,彻底分开皮下及皮下肉膜层组织,阻断皮瓣与皮下组织的血运联系,由颅侧向尾侧掀起皮瓣,彻底止血后,使用 0 号丝线原位缝合,术后 6 h 出现不同程度的缺血损伤,视为造模成功。Sham 组大鼠背部皮瓣形成后,立刻缝合。见图 1。



图 1 大鼠背部皮瓣缺血再灌注模型制备

Fig. 1 Preparation of rat dorsal flap ischemia-reperfusion model

1.5 分组

大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、模型组 (Model 组) 和托里消毒散高剂量组 (MDX-H 组) 和托里消毒散低剂量组 (MDX-L 组),每组 10 只。

1.6 实验步骤

托里消毒散由人参 3 g,黄芪 3 g,当归 3 g,川芎 3 g,白芍 3 g,白术 3 g,茯苓 3 g,金银花 1.5 g,白芷 1.5 g,甘草 1.5 g,桔梗 1.5 g,皂角刺 1.5 g 组成,药材均购自南京中医药大学附属医院,采用传统机器水煎法提取后将其浓缩,制成生药含量为 5 g \cdot mL⁻¹ 的溶液,冷却后储存于 2~6 $^{\circ}$ C 备用。给药前,将托里消毒散药液分别稀释为高剂量 2.5 g \cdot mL⁻¹ 和低剂量 1.25 g \cdot mL⁻¹。

MDX-H 组与 MDX-L 组在术后当天起,予以 2 mL 托里消毒散药液灌胃给药,Sham 组和 Model 组大鼠灌胃等体积生理盐水。每日 1 次,连续用药 14 d,观察皮瓣情况。

术后第 14 天将大鼠用异氟烷麻醉后脱颈处死,裁剪皮瓣组织并使用液氮保存,待送检。

1.7 计算皮瓣成活率

术后第 14 天用数码照相机拍摄皮瓣情况,用 Image-J 软件分析系统计算皮瓣成活面积和总面积,皮瓣成活率=皮瓣成活面积/总面积 \times 100%。

1.8 HE 染色观察皮瓣组织

皮瓣标本经 10% 中性缓冲甲醛固定后脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚 4 μ m,HE 染色,采用显微镜观察各组动物皮瓣组织病理变化。

1.9 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 水平

在第 14 天通过尾静脉采血法采集必要血样,使用低温离心机 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,分离各组大鼠血清 2 mL。按照试剂盒说明书步骤,采用 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 水平。

1.10 Western blot 检测 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达

用匀浆器将冷冻组织磨碎后,于低温环境中加入组织裂解液,提取背部皮瓣组织总蛋白,并用紫外分光光度计测定总蛋白浓度,绘制蛋白浓度标准曲线;取蛋白上样与聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液混匀后,沸水加热进行蛋白变性,后置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存;在聚丙烯酰胺凝胶中加入等体积蛋白上样,100 V 恒压电泳、250 mA 恒流转膜、封闭后,加入 1:1 000 比例稀释的一抗置于 4 $^{\circ}$ C 环境下孵育过夜;一抗孵育后,PBST 洗膜 3 次,然后加入 1:3 000 比例稀释的二抗,室温下孵育 60 min;二抗孵育后,PBST 洗膜 3 次,并曝光显影;最后,使用 Image J 图像分析软件分析 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达。

1.11 检测 Ki67 和 CD31 表达

通过 Ki67 和 CD31 标记来观察皮肤基层细胞及组织血管化程度。将孔板中的细胞悬液加入流式管中,随后加入配制好的固定/破膜液作用 30 min。加入 Ki67 抗体,置于室温避光处理 30 min,后用 1% 多聚甲醛溶液固定,上机分析。加入一抗(CD31)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温避光孵育 1 h,经 DAB 显色剂显色,封片后使用显微镜下拍照并记录内皮细胞标志蛋白质 CD31 的表达情况。

1.12 统计学方法

采用 SPSS21.0 统计软件对所有计量数据进行统计分析,计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组之间比较采用 *t* 检验,多组之间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 托里消毒散对大鼠背部任意皮瓣缺血再灌注损伤成活率的影响

Model 组术后水肿明显,有较多炎性液体渗出,皮瓣边缘坏死严重,14 d 后仍未见脱痂,且毛发生长不良。与 Model 组相比,MDX-H 组与 MDX-L 组术后出现少量水肿,有少量炎性物质渗出,脱痂时间提前,14 d 后皮瓣缺血坏死情况得到明显改善,皮瓣坏死面积显著减少。见图 2。

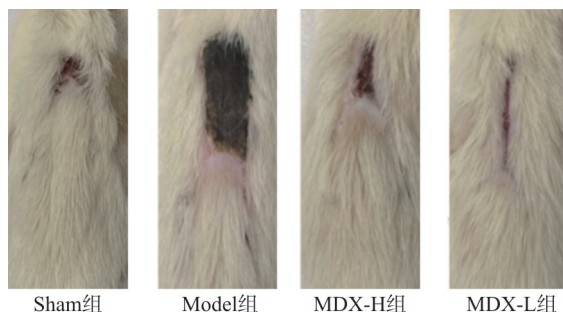


图 2 大鼠第 14 天皮瓣观察情况比较

Fig. 2 Comparison of flap observations in rats on 14th day

与 Model 组比较,14 d 后 MDX-H 组、MDX-L 组大鼠皮瓣成活率增加(表 1),差异具有统计学意义($P<0.05$),但 MDX-H 组与 MDX-L 组比较,皮瓣成活率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠皮瓣成活率比较($\bar{x}\pm s$,%, $n=10$)

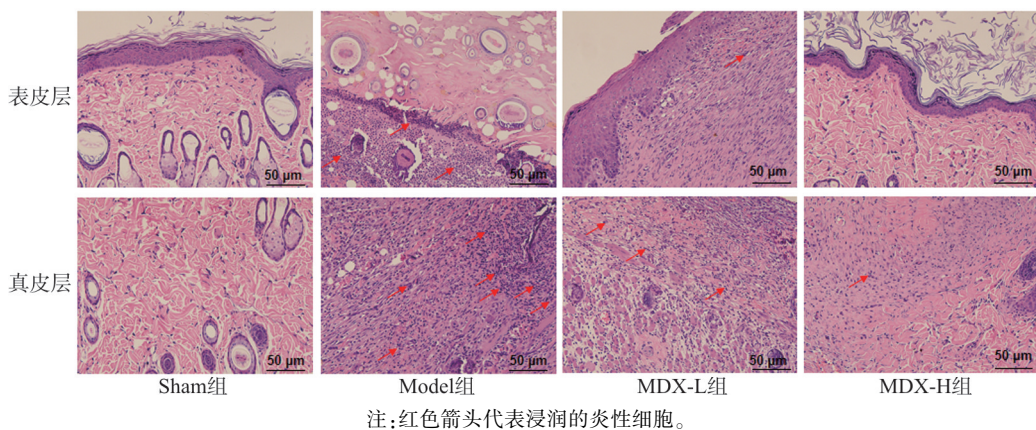
Table 1 Comparison of the survival rate of rat flaps in each group ($\bar{x}\pm s$,%, $n=10$)

组别	成活率
Sham 组	94.55 \pm 3.31
Model 组	59.66 \pm 4.73**
MDX-H 组	89.96 \pm 2.34 [#]
MDX-L 组	86.52 \pm 3.22 [#]

注:与 Sham 组比较,** $P<0.01$;与 Model 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 托里消毒散对大鼠背部任意皮瓣缺血再灌注损伤组织病理变化的影响

据皮瓣上缘的组织 HE 染色结果显示,相比于 Sham 组正常的皮肤结构,Model 组的皮瓣表面覆盖由坏死组织和炎性渗出物形成的厚痂,痂皮内侧可见少量的颗粒细胞层,棘细胞层细胞偏小,排列稍松散且不完整;可见有肉芽组织及浸润的炎性细胞。相比于 Model 组,MDX-H 组和 MDX-L 组治疗后可有效改善缺血皮瓣组织的病理特征,组织切片上可见完整的表皮层和真皮层,同时可见初步形成的毛囊结构,炎性细胞浸润数量明显减少。与 MDX-L 组比较,MDX-H 组组织结构更完整,水肿及炎性浸润程度更轻。见图 3。



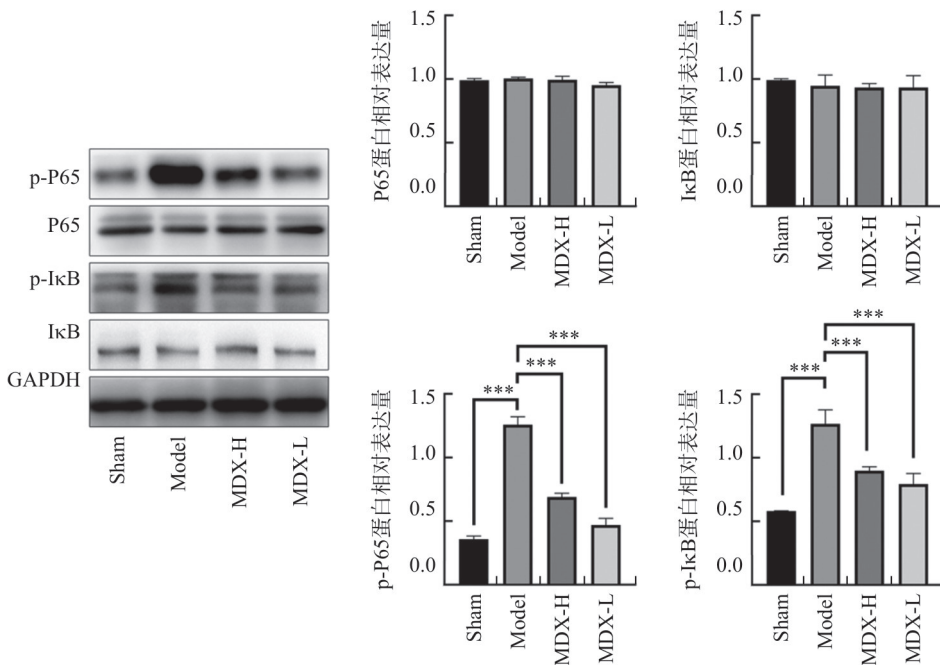
注:红色箭头代表浸润的炎性细胞。
图 3 各组大鼠皮瓣组织病理变化 (×100)

Fig. 3 Histopathological changes in rat flaps in each group (×100)

2.3 托里消毒散对大鼠背部任意皮瓣缺血再灌注损伤皮瓣组织中 NF-κB 信号通路的影响

与 Sham 组比较, Model 组大鼠皮瓣组织中 p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达显著增高 ($P < 0.001$); 与

Model 组比较, MDX-H 组和 MDX-L 组大鼠皮瓣组织中 p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。见图 4。



注:与 Model 组比较, *** $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

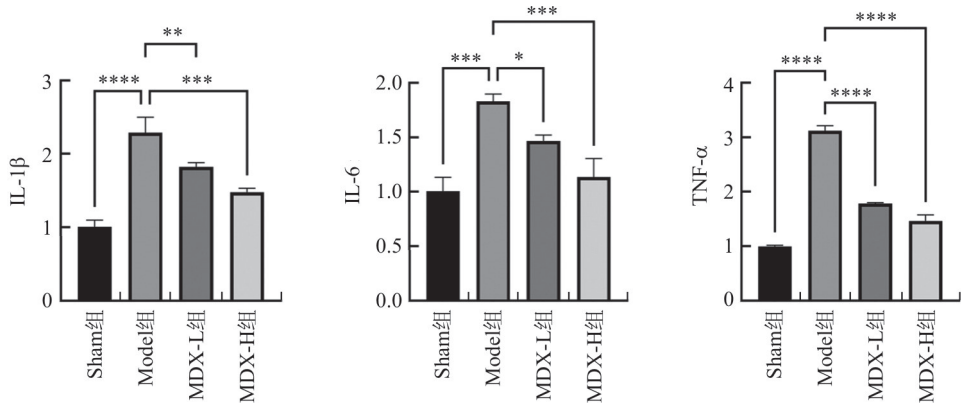
图 4 各组大鼠皮瓣组织中 p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达比较

Fig. 4 Comparison of p-p65 and p-IκBα protein expression in flap tissue of rats in each group

2.4 托里消毒散对大鼠血清炎性因子的影响

与 Sham 组相比, Model 组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达水平显著升高 ($P < 0.001, P < 0.0001$); 与 Model 组相比, MDX-H 组和 MDX-L

组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001, P < 0.0001$)。见图 5。



注:与 Model 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

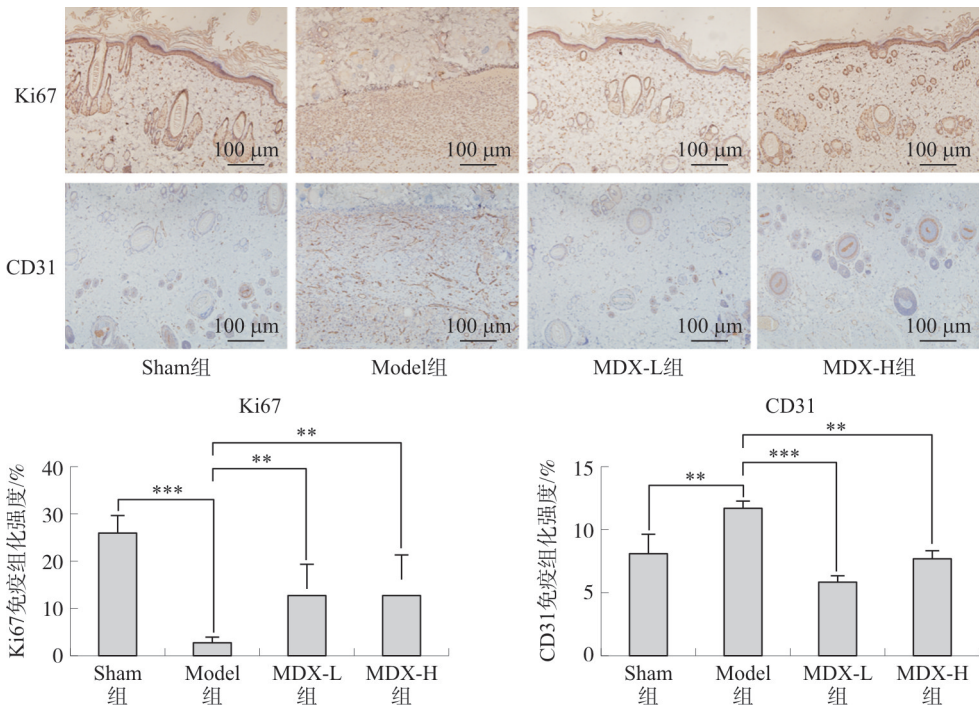
图 5 各组大鼠血清炎症因子水平比较

Fig. 5 Comparison of inflammatory factor levels in serum of rats in each group

2.5 托里消毒散对大鼠背部任意皮瓣缺血再灌注损伤皮瓣组织上皮化与血管形成的影响

在 Sham 组皮瓣组织中, Ki67 在表皮和毛囊细胞均有表达。 Model 组缺血再灌注损伤皮瓣组织伤口下没有形成完整的表皮结构, 并且未见新生毛囊组织。 MDX-H 组和 MDX-L 组表皮基层层细胞中有较高 Ki67 的表达, 真皮层可见新生毛囊组织, 提示给药治疗后加快了皮瓣组织损伤后的再上皮化。

CD31 是一种内皮细胞标志物, 可用于免疫组织化学染色以确认组织血管化程度。 相比于 Sham 组, Model 组皮瓣尚有较强的 CD31 的染色, 提示 Model 组尚处在血管分化和生长阶段, 但其并没有形成相对完整的血管结构; 而 MDX-H 组和 MDX-L 组血管化程度相对较高, 与 Sham 组在结构上更为接近, 提示 MDX-H 组和 MDX-L 组的皮瓣发生缺血再灌注损伤后, 血管的分化和生长速度加快。 见图 6。



注:与 Model 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 各组大鼠皮瓣组织中 Ki67 与 CD31 表达 ($\times 50$)

Fig. 6 Expression of Ki67 and CD31 in flap tissue of rats in each group ($\times 50$)

3 讨论

皮瓣移植技术作为治疗以皮肤缺损为主要表现

的开放性损伤的主要手段, 在整形外科、显微外科及骨科等领域广泛应用^[4-7]。而皮瓣缺血再灌注损伤

可导致皮瓣坏死,给家庭和社会造成了一定的负担^[5]。临床上仍缺乏安全有效、成本低且可耐受的防治皮瓣缺血再灌注损伤的治疗方法。

通过外科手术技巧预防皮瓣缺血坏死经过多年研究,尚无突破性进展;各种改善微循环的药物、生长因子、血管活性药物、局部红外线照射、外用辅料^[4]等,都有其副作用及局限性。故建立具有针对性的辅助治疗措施,以期减少皮瓣缺血再灌注损伤引起的皮瓣坏死,是目前研究的重点。

中医学并无“皮瓣缺血再灌注损伤”这一病名,近现代医家总结其临床病理变化集中表现为血瘀之证^[8],即血液运行郁滞,形成瘀积。病人表现为局部色黑色暗,痛有定处,甚至形成肿块,触之较硬。查体亦可发现,病人常见唇舌紫暗甚至舌有瘀点、瘀斑,皮瓣周遭往往肌肤甲错,皆为血瘀之象。皮瓣缺血再灌注损伤的病理表现为局部血液循环受阻或血管再生障碍以及血栓形成等,与血瘀之病机不谋而合。亦有研究表明^[8-10],运用活血化瘀、补气行血等法,可提高大鼠皮瓣的生存面积。故将皮瓣缺血再灌注损伤归类为血瘀范畴。患者年老气虚或术后体虚而血运无力,瘀阻经脉,蕴结为浊毒,久而化热,败坏肌表,发而为病。本课题组认为其病机为“气虚血瘀,浊瘀侵损”。

陈实功言:“托里消毒散治胃气虚弱或因克伐不能溃散,服之未成即消,已成即溃,腐肉自去新肉自生。”^[2]本方重用人参、黄芪,取其甘温益气之性,旨图托疮生肌之效。当归、川芎二药养血活血行气,与人参、黄芪相配,俾气旺血充,以期生肌长肉。白芷、甘草、金银花在扶正透脓之中,兼能透解热毒;白芍、白术、白茯苓三白相配,补气健脾、养血调经;皂角针、桔梗消肿托脓外排,以辅生肌。

李玉珠^[11]研究发现,托里消毒散四种中药提取物均可促进细胞的增殖;李依洋等^[12]则猜测,托里消毒散精简方中黄酮、皂苷、香豆素、甾体类等成分可能为该方主要的药效物质,这些成分可能通过调节免疫、抗炎、促血管新生等作用进而促进糖尿病大鼠创面的愈合。刘建等^[13]发现托里消毒散联合化腐生肌膏能够有效促进老年髌髌部IV度褥疮患者疮口愈合,降低证候积分;刘慧等^[14]用托里消毒散内服联合九华膏外用治疗非哺乳期乳腺炎溃后期,发现在缩小创面、改善创面脓腐情况且减轻疼痛症状等方面,优于其他治疗方案。王飞等^[15]研究发现,黄芪甲苷可通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路发挥抗

炎作用,能明显降低皮瓣缺血再灌注大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达水平和组织过氧化反应,提高抗氧化酶 SOD 活性;马红伟等^[16]研究发现,人参皂苷通过提高生长因子含量,下调 Wnt/ β -catenin 信号通路内相关蛋白表达加速创面愈合。

NF- κ B 家族^[17]作为炎症反应的核心,也是皮瓣缺血再灌注损伤的主要致病因素,该信号通路是机体病理改变过程中的关键,在介导炎症分子表达中非常重要。研究发现,该信号通路在脑^[18]、肾^[19]等实质器官,以及创面、皮瓣^[20]的缺血再灌注损伤已有一定研究。缺血再灌注损伤还可以引起组织内产生并释放出大量的炎症因子(如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α)^[5],直接诱导皮肤细胞的凋亡与坏死。而本研究结果显示,通过检测 NF- κ B 通路的 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白指标以及大鼠血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平,可以在一定程度上证明托里消毒散治疗可抑制 NF- κ B 通路介导的组织炎症反应,减轻缺血皮瓣的炎症情况,缓解大鼠皮瓣缺血再灌注损伤。

Ki67 是细胞增殖活性的标志物,通常高表达于皮肤表皮的基底细胞^[21]。此外,血管生成在缺血皮瓣的损伤修复过程中至关重要,血管为其修复提供祖细胞、氧气和营养物质,以维持缺血皮瓣中各种细胞的增殖和重塑。CD31 常用于免疫组织化学染色以确认组织血管化程度^[22]。而本研究所见的表皮基底细胞 Ki67 的表达,提示托里消毒散给药治疗后加快了皮瓣组织损伤后的再上皮化,CD31 的标记也提示托里消毒散治疗加快了损伤后的末梢血管的再生。

综上,托里消毒散可能通过调控 NF- κ B 信号通路、抑制炎症反应、加速缺血再灌注损伤组织上皮化和血管生成等方面,从而发挥改善皮瓣缺血再灌注损伤的作用。同时,本文的样本量较小,高、低剂量组结果较为接近,且中药复方具有的多成分、多通路、多靶点等特点也要求我们进一步探索。因此,之后的研究计划中将考虑扩大样本量并探索该方剂最佳剂量及浓度,同时研究其具体成分、其他潜在通路及相关靶点,以期更好地为托里消毒散治疗皮瓣缺血再灌注损伤的临床应用提供最佳的指导意见。

参考文献:

- [1] LI Y, ZHU Y R, HU F, et al. Procyanidin B2 regulates the Sirt1/Nrf2 signaling pathway to improve random-pattern skin flap survival [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(9): 3913-3925.

- [2] 陈实功. 外科正宗[M]. 张印生, 韩学杰, 点校. 北京: 中医古籍出版社, 1999:33-34.
CHEN S G. Orthodox lineage of external medicine[M]. ZHANG Y S, HAN X J, schooled. Beijing: Publishing House of Ancient Chinese Medical Books, 1999:33-34.
- [3] USTUN G G, OZTURK S, KOCER U. Standardization of the rat dorsal random pattern (McFarlane) flap model and evaluation of the pharmacological agents aiming to salvage partial flap necrosis: A systematic review and a meta-analysis[J]. *Ann Plast Surg*, 2021, 87(6): e145-e152.
- [4] AFROOGHE A, DAMAVANDI A R, AHMADI E, et al. The Current state of knowledge on how to improve skin flap survival: A review[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2023, 82: 48-57.
- [5] LENG X F, FAN Y L, WANG Y T, et al. Treatment of ischemia-reperfusion injury of the skin flap using human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) transfected with F-5 gene[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 2751-2764.
- [6] TIWARI S K, SIVASAILAM A, MALIAKKAL R T, et al. Quantitative analysis of apoptosis and necrosis in live cells using flow cytometry[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2543: 57-69.
- [7] HARMAN D. About Origin and evolution of the free radical theory of aging: A brief personal history, 1954-2009[J]. *Biogerontology*, 2009, 10(6): 783.
- [8] 杨德龙, 宋渊, 赵继荣, 等. 中医药防治皮瓣修复术后血管危象的研究现状[J]. *西部中医药*, 2014, 27(12): 144-146.
YANG D L, SONG Y, ZHAO J R, et al. Research status of preventing and treating vascular crisis after flap repair operation by TCM[J]. *West J Tradit Chin Med*, 2014, 27(12): 144-146.
- [9] 欧阳波, 刘晓丹, 杨筱倩, 等. 冰片配伍黄芪甲苷和三七总皂苷通过 Notch 信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤模型的神经保护作用[J]. *中草药*, 2020, 51(23): 5990-5997.
OUYANG B, LIU X D, YANG X Q, et al. Neuroprotective effect of borneol combined with astragaloside IV and *Panax notoginseng* saponins in cerebral ischemia reperfusion injury rat model through Notch signaling pathway[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(23): 5990-5997.
- [10] WANG J Z, WANG H Y, MOU X D, et al. The advances on the protective effects of ginsenosides on myocardial ischemia and ischemia-reperfusion injury[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(16): 1610-1618.
- [11] 李玉珠. 托里消毒散对糖尿病创面血管生成的影响及机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2016.
LI Y Z. Study on the effect and mechanism of Tuoli Xiaodu Powder on angiogenesis of diabetic wound[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2016.
- [12] 李依洋, 杨珍, 张晓娜, 等. 基于分子对接及网络药理学的托里消毒散精简方促糖尿病创面愈合作用机制研究[J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3298-3308.
LI Y Y, YANG Z, ZHANG X N, et al. Mechanism of simplified formula of Tuoli Xiaodu Powder in promoting of diabetic wound healing based on molecular docking and network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(14): 3298-3308.
- [13] 刘建, 黄凯, 郭峭峰, 等. 内服托里消毒散配合外用化腐生肌膏治疗老年骶骶部IV度褥疮 26 例[J]. *浙江中医杂志*, 2018, 53(4): 261.
LIU J, HUANG K, GUO Q F, et al. Treatment of 26 cases of iv decubitus ulcer of hip and sacrum in the elderly with oral Tori Xiaodu Powder and external application of Huayu Shengji ointment[J]. *Zhejiang J Tradit Chin Med*, 2018, 53(4): 261.
- [14] 刘慧, 李鑫, 周亮, 等. 托里消毒散联合九华膏治疗非哺乳期乳腺炎溃后期病变的临床疗效与安全性评价[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 2404-2407.
LIU H, LI X, ZHOU L, et al. Clinical efficacy and safety evaluation of Tuoli Xiaodu Powder combined with Jiuhua Ointment in the treatment of late lesions of non-lactation mastitis[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(4): 2404-2407.
- [15] 王飞, 田阳, 徐晓然, 等. 黄芪甲苷通过调控 TLR-4/NF- κ B 信号通路对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2021, 35(5): 497-503.
WANG F, TIAN Y, XU X R, et al. Effect of astragaloside on ischemia-reperfusion injury in rat skin flap by regulating TLR-4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin J Dermatovenereol*, 2021, 35(5): 497-503.
- [16] 马红伟, 刘攀云, 张雅琼. 人参皂苷诱导骨髓间充质干细胞干预糖尿病大鼠皮肤溃疡的愈合及 Wnt/ β -catenin 信号表达[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(33): 5300-5306.
MA H W, LIU P Y, ZHANG Y Q. Ginsenoside-induced bone marrow mesenchymal stem cell intervention can affect healing and Wnt/ β -catenin signaling in rats with diabetic skin ulcer[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2019, 23(33): 5300-5306.
- [17] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF- κ B signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [18] RAN Y Y, QIE S Y, GAO F H, et al. Baicalein ameliorates ischemic brain damage through suppressing proinflammatory microglia polarization via inhibiting the TLR4/NF- κ B and STAT1 pathway[J]. *Brain Res*, 2021, 1770: 147626.
- [19] REN Q, GUO F, TAO S B, et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109772.
- [20] MENG Z, WANG K, LAN Q, et al. Saxagliptin promotes random skin flap survival[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110364.
- [21] MILLER I, MIN M W, YANG C, et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1105-1112.
- [22] ANDREATA F, SYVANNARATH V, CLEMENT M, et al. Macrophage CD31 signaling in dissecting aortic aneurysm[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(1): 45-57.