

· 临床 ·

从巨噬细胞角度探讨复方五凤草液 干预结核性溃疡的机制

钱佳燕, 黄子慧*, 孙佳玥, 许费昀, 王裕玲, 余洋
(南京中医药大学附属南京市中西医结合医院, 江苏 210014)

[摘要] 目的:探讨复方五凤草液治疗结核性溃疡的临床疗效及对巨噬细胞极化的影响。方法:①临床实验。将南京市中西医结合医院145例结核性溃疡患者按随机数字表法分为观察组、对照 I 组和对照 II 组。3组均予以基础抗结核化学治疗的同时,观察组予以复方五凤草液,对照 I 组予以康复新液,对照 II 组予以异烟肼液局部外用治疗,疗程4周。分别观察3组患者创面愈合总有效率、中医证候积分、创面组织病理学形态及创面组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶-1(Arg-1)的表达水平。②细胞实验。RAW264.7细胞在完全培养基DMEM(10%的胎牛血清,1%青-链霉素溶液)于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。经佛波酯(PMA)诱导后向巨噬细胞分化,分别用脂多糖(LPS)诱导成M1巨噬细胞、白细胞介素-4(IL-4)诱导成M2巨噬细胞,分别予康复新液、异烟肼液、复方五凤草液处理以上细胞模型36h,收集细胞上清液并离心,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、转化生长因子-β(TGF-β)、iNOS和Arg-1的蛋白量的表达,流式细胞术(FCM)检测药物对CD86、CD206表达的影响。结果:①临床实验。与对照 I 组[87.5%(42/48), $\chi^2=3.962, P<0.05$]和对照 II 组[83.3%(40/48), $\chi^2=6.162, P<0.05$]比较,复方五凤草液组的总有效率[98.0%(48/49)]明显较高;治疗28d后,与对照 I 组、对照 II 组比较,复方五凤草液组的中医证候积分明显降低($P<0.05$),复方五凤草液组创面组织病理学形态改善更为明显;免疫组化结果显示,治疗28d后,与对照 I 组、对照 II 组比较,复方五凤草液组局部病灶组织样本中的iNOS表达量明显降低($P<0.05$),Arg-1表达量显著升高($P<0.05, P<0.01$)。②细胞实验。Western blot实验结果显示,与M0组比较,LPS组中iNOS、TNF-α表达升高($P<0.01$)。与LPS组比较,LPS+异烟肼组、LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中iNOS、TNF-α表达下降($P<0.05$);与LPS+异烟肼组比较,LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中iNOS表达下降($P<0.05, P<0.01$),LPS+复方五凤草液组TNF-α水平显著下降($P<0.01$);与LPS+康复新液组比较,LPS+复方五凤草液组中TNF-α表达下降($P<0.05$)。与M0组比较,IL-4组中Arg-1、TGF-β表达升高($P<0.01$)。与IL-4组比较,IL-4+异烟肼组、IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中Arg-1、TGF-β表达升高($P<0.05, P<0.01$)。与IL-4+异烟肼组比较,IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中Arg-1、TGF-β表达升高($P<0.05, P<0.01$);与IL-4+康复新液组比较,IL-4+复方五凤草液组中Arg-1、TGF-β表达升高($P<0.05, P<0.01$)。流式细胞术结果显示,与M0组比较,LPS组CD86表达升高,IL-4组中CD206表达升高($P<0.01$)。与LPS组比较,LPS+异烟肼组、LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中CD86表达下降($P<0.01$);与LPS+异烟肼组比较,LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中CD86表达下降($P<0.01$);与LPS+康复新液组比较,LPS+复方五凤草液组中CD86表达下降($P<0.01$)。与IL-4组比较,IL-4+异烟肼组、IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中CD206表达升高($P<0.01$);与IL-4+异烟肼组比较,IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中CD206表达升高($P<0.05$)。结论:复方五凤草液能有效促进结核性溃疡愈合,其作用机制可能是通过抑制iNOS、TNF-α、CD86的表达并促进Arg-1、TGF-β、CD206的表达,从而调控M1/M2巨噬细胞极化平衡来完成。

[关键词] 复方五凤草液; 结核性溃疡; 巨噬细胞极化; 慢性创面

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0086-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202304091 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220630.2239.014.html>

[网络出版日期] 2022-07-01 15:09:44

[收稿日期] 2022-04-14

[基金项目] 江苏省中医药重点科技项目(ZD202105);南京市卫计委重点科技项目(ZKX18042);许芝银全国名中医专家工作室项目([No. 宁卫财务2019]26号);南京市卫计委科技发展项目(YKK21192);南京市卫健委青年人才项目(QRX17030)

[第一作者] 钱佳燕, 硕士, 从事中医外科研究, E-mail: 1027568052@qq.com

[通信作者] * 黄子慧, 主任中医师, 从事中医外科研究, E-mail: candy73zihui@sina.com

Therapeutic Effect of Compound Wufengcao Liquid on Tuberculous Ulcer from Perspective of Macrophages

QIAN Jiayan, HUANG Zihui*, SUN Jiayue, Xu Feiyun, Wang Yuling, Yu yang

(Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210016, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the clinical efficacy of compound Wufengcao liquid (CWL) on tuberculous ulcer and the influence on macrophage polarization. **Method:** ① Clinical experiment: A total of 145 patients with tuberculous ulcer who were treated in Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital were randomized into observation group, control group I, and control group II according to the random number table method. In addition to the basic anti-tuberculosis chemotherapy, CWL, Kangfuxin liquid, and isoniazid solution (local external application) were respectively used in the observation group, control group I, and control group II. The treatment lasted 4 weeks for each group. The total effective rate in wound healing, traditional Chinese medicine (TCM) syndrome score, and histopathological morphology of wound were observed and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase-1 (Arg-1) in wound tissue was measured. ② Cell experiment: RAW264.7 cells were cultured in DMEM (10% fetal bovine serum, 1% double-antibody solution) in a cell incubator (37 °C, 5% CO₂). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was used to induce the differentiation of RAW264.7 cells into macrophages. Lipopolysaccharide (LPS) was employed to stimulate polarization of macrophages into M1 type and interleukin-4 (IL-4) to induce the polarization into M2 type. Kangfuxin solution, isoniazid solution, and CWL were respectively applied to the above cell model for 36 h. The cell supernatant was collected and centrifuged. Western blot was used to detect the protein expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), iNOS, and Arg-1, and flow cytometry (FCM) to detect the expression of CD86 and CD206. **Result:** ① Clinical experiment: The total effective rate in the CWL group [98.0% (48/49)] was higher than that in the control group I [87.5% (42/48), $\chi^2=3.962$, $P<0.05$] and control group II [83.3% (40/48), $\chi^2=6.162$, $P<0.05$]. After 28 days of treatment, compared with control group I and control group II, CWL decreased the TCM syndrome score ($P<0.05$) and obviously improved the histopathological morphology of the wound. Immunohistochemistry results showed that the iNOS expression in local focus tissue was lower ($P<0.05$) and the expression of Arg-1 was higher ($P<0.05$, $P<0.01$) in the CWL group than in the control group I and control group II after 28 days of treatment. ② Cell experiment: Western blot assay showed that the expression of iNOS and TNF- α in LPS group increased compared with that in the M0 group ($P<0.01$) and the expression in the LPS+ isoniazid group, LPS+ Kangfuxin group, and LPS+CWL group was lower than that in the LPS group ($P<0.05$). The expression of iNOS in LPS+Kangfuxin group and LPS+ CWL group was lower than that in the LPS+isoniazid group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression of TNF- α in LPS+ CWL group was lower than that in LPS+isoniazid group ($P<0.01$). The expression of TNF- α in LPS+ CWL group decreased compared with that in the LPS+ Kangfuxin group ($P<0.05$). The expression of Arg-1 and TGF- β in IL-4 group was higher than that in the M0 group ($P<0.01$), and the expression in the IL-4+ isoniazid group, IL-4+Kangfuxin group, and IL-4+ CWL group was higher than that in the IL-4 group ($P<0.05$). The expression of Arg-1 and TGF- β in the IL-4+ Kangfuxin group and IL-4+CWL group was higher than that in the IL-4+isoniazid group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression was higher in the IL-4+CWL group than in the IL-4+Kangfuxin group ($P<0.05$, $P<0.01$). The FCM result showed that the expression of CD86 and CD206 in LPS group and IL-4 group was higher than that in M0 group ($P<0.01$). CD86

expression in LPS+isoniazid group, LPS+ Kangfuxin group, and LPS+CWL group was lower than that in the LPS group ($P<0.01$). The expression of CD86 in LPS+Kangfuxin group and LPS+ CWL group increased compared with that in the LPS+isoniazid group ($P<0.01$), and the expression was higher in the LPS+ CWL group than in the LPS+Kangfuxin group ($P<0.01$). CD206 expression in IL-4+ isoniazid group, IL-4+ Kangfuxin liquor group, and IL-4+ CWL group was increased compared with that in the IL-4 group ($P<0.01$). CD206 expression in IL-4+Kangfuxin liquid group and IL-4+ CWL group was decreased compared with that in the IL-4+isoniazid group ($P<0.01$). CD206 expression in IL-4+CWL group was lower than that in the IL-4+ Kangfuxin group ($P<0.05$). **Conclusion:** CWL can promote the healing of tuberculous ulcers, and the mechanism is that it inhibits the expression of iNOS, TNF- α , and CD86 and promotes the expression of Arg-1, TGF- β , and CD206, thereby regulating M1/M2 polarization balance.

[Keywords] Compound Wufengcao Liquid; tuberculous ulcer; macrophage polarization; chronic sore

结核性溃疡属于肺外结核,是临床最为常见的一类特异性感染性溃疡^[1]。临床表现为创周皮色暗红,肉芽苍白水肿,创面脓水淋漓,多伴有窦道及潜行性空腔,病程长,治疗难度大,易复发,属于慢性难愈性创面。因结核性溃疡创面中巨噬细胞极化受损并伴有过度的、持续性的炎症反应,局部血管新生受限,上皮化延缓和胶原沉积,致使疮面难以愈合,严重影响患者身心,给临床治疗带来了极大挑战^[2]。

巨噬细胞在宿主受到损伤、感染等威胁后的防御反应及恢复和维持体内平衡中发挥关键作用。其紧密参与和调节整个创面愈合的各个时期,即炎症期、增殖期和重塑期。其数量在炎症阶段增加,在组织形成阶段达到高峰,在成熟阶段逐渐减少。通常,巨噬细胞分为经典激活(M1)和替代激活(M2)表型。M1巨噬细胞吞噬病原体和坏死组织,同时分泌炎症因子,而M2巨噬细胞通过释放抗炎因子和生长因子来缓解创面炎症和促进创面内血管生成。随着创面的愈合,局部巨噬细胞群从主要的M1表型转变为M2表型。临床上难以愈合的结核性溃疡创面因无限期地处于炎症状态——促炎巨噬细胞过多而停滞,因此创面无法愈合。目前临床上治疗结核性溃疡疾病治疗主要以西医抗结核化学治疗为基础,配合局部治疗。而中医外治法的应用在结核性溃疡的局部治疗中发挥重要作用。

外用中药复方五凤草液为院内制剂,为南京市中西医结合医院瘰癧病科黄子慧主任自创,已应用于临床多年,取得了显著疗效。前期课题组观察了治疗过程中患者创面组织及血液中表型指标诱导型一氧化氮合酶/精氨酸酶-1的变化,从调控巨噬细胞极平衡角度对复方五凤草液治疗结核性溃疡的作用机制做了初步探索^[3]。课题组认为复方五凤草液

可能是通过抑制M1型巨噬细胞极化,并促进M2型巨噬细胞极化完成结核性溃疡的愈合。

因此本次研究为验证复方五凤草液治疗是否为针对结核性溃疡创面的一种重要的化学刺激,是否可在体内和体外调节巨噬细胞功能以促进局部疮面愈合,而开展了本次前瞻性实验研究。课题组在临床疗效观察的基础上,分别设立中药对照组、西药对照组,构建巨噬细胞模型,以Western blot、FCM方法检测药物干预过程中M1/M2相关细胞炎症因子及表型指标的变化,进一步基于巨噬细胞探讨复方五凤草液的作用机制及疗效优势。

1 临床研究

1.1 资料与方法

1.1.1 一般资料 本课题研究病例来源于2019年6月至2020年12月南京市中西医结合医院瘰癧病科收治的结核性溃疡患者。基于既往研究及相关文献报道,观察组的有效率为94.8%,中医对照组的有效率为84.5%,西医对照组的有效率为78.2%。设置检验水准 $\alpha=0.05$,检验效能 $1-\beta=0.80$,观察组与对照组样本量之比为1:1:1,考虑脱落因素,进行样本量15%的扩大,确定总样本量至少为143例。排除不符合入组标准的患者后,最终入组145例患者。男性68例,女性77例,年龄中位数38.6岁,平均病程(5.32 \pm 2.89)个月,平均创面面积(5.91 \pm 2.33)cm²;按随机数字表法分为观察组、对照I组和对照II组,观察组49例,对照I组48例,对照II组48例。3组患者性别、年龄、病程、创面面积等一般资料差异无统计学意义,资料具有可比性。本研究已通过南京市中西医结合医院伦理委员会的审查并备案(伦理批号201901001)。

1.1.2 诊断标准 西医诊断标准,参照《中西医结合疮疡病诊疗学》^[4]和《常见疾病的诊断与疗效判定

(标准)》^[5]的有关标准,①脓肿破溃后脓液稀薄,夹有败絮样物,疮口潜行,久不愈合;②病理证实为结核病,或脓液涂片找到抗酸杆菌;③可有肺结核病史或接触史;④伴有低热盗汗,神疲乏力消瘦等全身症状。

中医诊断标准,参照中华人民共和国中医药行业标准《中医病证诊断疗效标准》^[6]及《中西医结合疮疡病诊疗学》^[4]:局部创面脓水淋漓、肉色不鲜,肉芽组织颜色苍白,腐肉不脱,极难收口,形成空腔或窦道,经久不愈。患者神疲乏力,面色苍白,气短懒言,语声低微,常自汗,头晕目眩,心悸,舌质淡,苔薄白,脉细弱。

1.1.3 纳入标准 ①符合结核性溃疡中西医诊断标准的患者;②年龄18~65岁;③溃疡面积2~15 cm²;④患者知情同意,依从性良好。

1.1.4 排除标准 ①过敏体质或对本药过敏者;②合并有造血系统、肝、肾及心脑血管等严重原发性疾病及继发疾病者;③妊娠或哺乳期妇女;④精神病患者;⑤有免疫基础疾病患者;⑥活动性肺结核患者。

1.2 研究方法

1.2.1 治疗方法 所有患者均接受规范抗结核治疗。并根据分组使用不同的外用药物。

对照 I 组,康复新液(湖南科伦制药公司,国药准字 Z180609)。对照 II 组,异烟肼液(西南药液公司,国药准字 H50021470)。观察组,复方五凤草液(院协编号 20181026)。组成为泽漆 2 000 g(产自安徽,货号 180320)、猫爪草 400 g(产自河南,货号 180416)、白及 240 g(产自江西,货号 180731)。以上诸药,加水浸过药面,煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎液,滤过,药液浓缩,分装制成复方五凤草液备用。由南京市中西医结合医院制剂室提供,由该院药剂科徐德荣医生进行鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关规定。3 组外用药物的用量用法为根据创面面积、空腔范围以及窦道深浅,裁取相应大小无菌棉片,测量创面面积及窦道深度,1 mL·(4 cm)²的药液量浸湿棉片外敷,隔日换药 1 次,疗程为 4 周。

1.2.2 疗效评价 参照中华人民共和国中医药行业标准《中医病证诊断疗效标准》^[6]及国家中医药管理局“十一五”重点专科协作组瘰疬病诊疗方案。

总有效率。①有效,患者治疗 4 周后肿块结节消退、窦道愈合,全身相关症状消失;②好转,患者治疗 4 周后肿块缩小、脓水减少,全身相关症状改善;③无效,患者治疗 4 周后脓肿不消,窦道不愈,全

身相关症状无改善。总有效率=(显效例数+有效例数)/总例数×100%。

中医证候积分评价。以其局部体征为观察指标,参考以往课题组量化标准^[3]。重点观察局部溃疡创面面积、窦道长度、分泌物量、腐肉量、上皮组织量等指标。按照各指标轻重程度分为 5 级,分别计 0、1、2、3、4 分。于治疗前及给药后每周各观察记录 1 次,统计各时间点体征指标总积分情况。

1.2.3 创面大体观及组织病理学苏木素-伊红(HE)染色 患者在给药前、给药期间和给药 4 周后,比较患者创面大体观变化。同时在创面取新鲜肉芽组织标本,用 4% 多聚甲醛固定,经冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋后做常规石蜡切片,将处理后的组织石蜡切片用苏木素和伊红染色后脱水,最后用中性树脂封片。检测结果于 DM3000 型显微镜(德国徕卡微系统有限公司)400 倍视野下观察创面肉芽组织病理学变化。

1.2.4 组织病理学免疫组化实验 选择 iNOS 和 Arg-1 进行免疫组织化学分析。将石蜡包埋的组织切成 4 μm 厚,脱蜡,再水化。将组织切片放入装有柠檬酸(pH 6.0)抗原修复缓冲液(Servicebio 公司,批号 G1202)的盒子中。将组织切片置于 3% H₂O₂ 溶液(Servicebio 公司,批号 G0115)中以阻断内源性过氧化物酶活性。加入 3% 牛血清白蛋白(武汉 Servicebio 公司,批号 G5001)均匀覆盖组织切片,室温密封组织切片 30 min。将用一定稀释度的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 武汉 Servicebio 公司,批号 G0002)制备的一抗(1:2 000)加入组织切片,4 °C 孵育过夜。然后,将组织切片用来自相应种类的二抗(1:200, 武汉 Servicebio 公司,批号 GB23303)覆盖,并在室温下孵育 50 min。最后,组织切片用 DAB(武汉 Servicebio 公司,批号 G1211)显色并用苏木素(武汉 Servicebio 公司,批号 G1004)复染。用中性树脂密封组织切片后,对其进行扫描。

2 细胞实验

2.1 材料

2.1.1 细胞 RAW264.7 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),细胞传代 2 次。

2.1.2 试剂 佛波醇(PMA)、DMEM 培养基、脂多糖(美国 Sigma 公司,批号分别为 P21120、P0592、Sigma-L2880),白细胞介素-4(IL-4, 美国 PeproTech 公司,批号 214-14), PBS(美国 Gibco 公司,批号 C10010500BT),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)抗体、转化生长因子-β(TGF-β)抗体、iNOS 抗体、Arg-1 抗

体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,批号分别为11948S、2519S、13120S、93668S、12620S),CD86抗体(德国美天旎生物技术有限公司,批号130-102-506),CD206抗体[安迪生物科技(上海)有限公司,批号FAB25351G],HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为A0216、S0056)。

2.1.3 仪器 SpectraMax M3型多功能酶标仪(美国Molecular Devices有限公司),MIKRO220R型高速低温离心机(德国hettich公司),DK-S24型水浴锅(上海精宏公司),7S-1型水平摇床(海门市其林贝尔有限公司),DYCZ-40D型转膜仪、DYCZ-24DN型电泳仪(北京六一生物科技有限公司),SFPS-2448型高速匀浆机(中国BIOER公司),EZ Imager型凝胶成像图像分析系统(美国Bio-Rad公司),Biosciences Accuri C6型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司),IX53型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

2.2 方法

2.2.1 细胞的培养及诱导 RAW264.7细胞用完全培养基DMEM(10%的胎牛血清,1%的双抗溶液)于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。经100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA诱导后向巨噬细胞分化,可见大量细胞黏附在培养板底,并有一些细胞长出小的伪足,建立未活化型RAW264.7-M0细胞;分别用含有终质量浓度为100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS、20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IL-4的培养液处理未活化型RAW264.7-M0细胞,诱导RAW264.7-M0细胞向RAW264.7-M1细胞和RAW264.7-M2细胞极化。

2.2.2 CCK-8法检测细胞存活率 取对数期生长的U-937细胞以 4×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,加入PMA母液(使其终质量浓度为5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),每孔100 μL (2.5×10^4 个/孔),于37℃、5%CO₂培养箱中培养,用PMA诱导得到U937-M0细胞,分别用复方五凤草液(1.5 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 稀释比例为6.25、12.5、25、50、100、200、400、800、1 600)、康复新溶液(稀释比例为31.25、62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000、8 000)、异烟肼液(0.05 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 稀释比例为12.5、25、50、100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600)处理,空白组不加药物。继续培养24 h后,每孔加0.5% CCK-8(10 μL),4 h后吸弃上清,放入酶标仪中测定吸光度 A ,计算巨噬细胞存活率。根据CCK-8实验结果确定后续实验药物给药

浓度。

2.2.3 实验分组 细胞实验根据后续CCK-8结果,分为M0组、LPS组、LPS+复方五凤草液组、LPS+康复新液组、LPS+异烟肼组;M0组、IL-4组、IL-4+复方五凤草液组、IL-4+康复新液组、IL-4+异烟肼组。36 h后收集细胞。

2.2.4 Western blot检测 分组细胞中TNF- α 、TGF- β 、iNOS、Arg-1的蛋白表达 细胞按同样方式处理,收集处理后的细胞置于冰上,用PBS洗涤细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白,参照BCA试剂盒说明书进行蛋白定量,将蛋白上样到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶孔中,在100 V下电泳120 min,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,予5%脱脂牛奶进行室温封闭2 h,分别敷上TNF- α 、TGF- β 、iNOS、Arg-1 4种抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜4次(每次10 min)后二抗(1:1 000)孵育1 h,再予TBST洗膜4次(每次10 min)。以 β -actin为内参照,以ECL显影,扫描胶片并保存,并分析灰度值,并计算目标蛋白与 β -actin的比值。

2.2.5 FCM检测 分组细胞中CD86、CD206分子的表达 将RAW264.7巨噬细胞先予PMA处理24 h,再分别予LPS及IL-4诱导贴壁处理。加入含复方五凤草液、康复新、异烟肼药物的细胞抗菌生长液。放入37℃、5%CO₂的孵箱培养24 h。分别收集样本细胞(实验分组为①M0组,②LPS组,③LPS+复方五凤草液组,④LPS+康复新液组,⑤LPS+异烟肼组;①M0组,②IL-4组,③IL-4+复方五凤草液组,④IL-4+康复新液组,⑤IL-4+异烟肼组)。分别进行染色、孵育,再加入PE-CD86和PITC-CD206的流式抗体,室温避光孵育20 min,以PBS溶液清洗细胞2次,采用流式细胞仪进行检测。

2.3 统计学方法 临床实验部分采用SPSS 26.0软件进行统计分析,进行组间比较时,先进行正态性检验,若服从正态分布,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA LSD法),若数据为计数资料,使用 χ^2 检验或非参数检验。Western blot结果用Image J软件计算条带的灰度值,Graphpad prism软件进行数据分析和显著性差异分析, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 临床研究结果 病例完成情况:治疗期间患者无中途退出、无脱落。见图1。

3.1.1 3组患者总有效率比较 结果表明,观察组

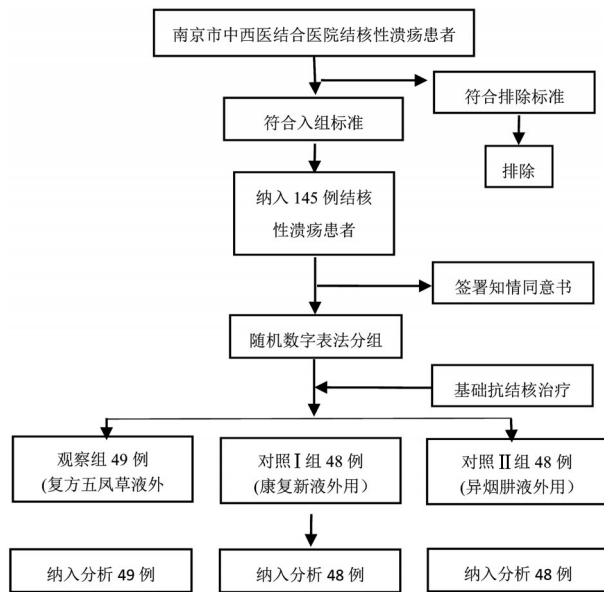


图1 病例流程

Fig. 1 Case flow chart

总有效率 98.0%(48/49), 对照 I 组总有效率 87.5%

表2 3组患者中医证候积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of traditional Chinese medicine syndrome scores among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第0天	第7天	第14天	第21天	第28天
观察组	49	11.35±4.64	9.24±1.75	7.85±2.18 ^{1,3)}	4.12±1.37 ^{1,3)}	1.62±0.67 ^{1,2,3)}
对照 I 组	48	11.31±4.76	9.88±1.66	8.25±2.36 ¹⁾	4.86±1.52 ¹⁾	2.48±0.78 ¹⁾
对照 II 组	48	11.33±4.79	9.95±1.82	9.12±2.41 ¹⁾	5.25±1.42 ¹⁾	2.79±0.91 ¹⁾

注:与本组治疗第0天比较¹⁾ $P < 0.01$;与同时点对照 I 组比较²⁾ $P < 0.05$;与同时点对照 II 组比较³⁾ $P < 0.05$

3.1.3 治疗期间典型病例创面观察比较 比较同一患者分别予以复方五凤草液、康复新液、异烟肼液局部处理后创面变化。治疗初起,3者创面均可以看到腐肉,伴有脓液分泌物;治疗第7天,腐肉量和渗出物渐减少,创面肉芽水肿明显;治疗第14天,复方五凤草液创面肉芽鲜活致密,无明显分泌物,康复新液创面腐肉脱净,肉芽苍白,异烟肼液创面仍有少量腐肉附着,创周皮色暗红;第21天复方五凤草液创面愈合,康复新液创面缩小明显,肉芽新鲜,异烟肼液创面无明显脓液,肉芽水肿;治疗第28天,康复新液创面愈合,异烟肼液创面创面缩小明显,肉芽新鲜,渐趋愈合。细见增强出版附加材料。

3.1.4 3组患者病理变化比较 镜下观察可见,第0天(给药前)3组均可见创面组织大量炎性细胞浸润,表皮大量坏死脱落,第14天仍有表皮坏死伴炎性细胞浸润,少量毛细血管形成,第28天,创面炎性细胞明显减少,肉芽组织基本形成。观察组可见类上皮细胞增生,右上角示干酪样坏死伴微脓肿形成,

(42/48), 对照 II 组总有效率为 83.3%(40/48), 观察组总有效率明显高于对照 I 组($\chi^2=3.962, P < 0.05$)和对照 II 组($\chi^2=6.162, P < 0.05$)。见表 1。

表1 3组患者临床疗效比较

Table 1 Comparison of total effective rate among 3 groups

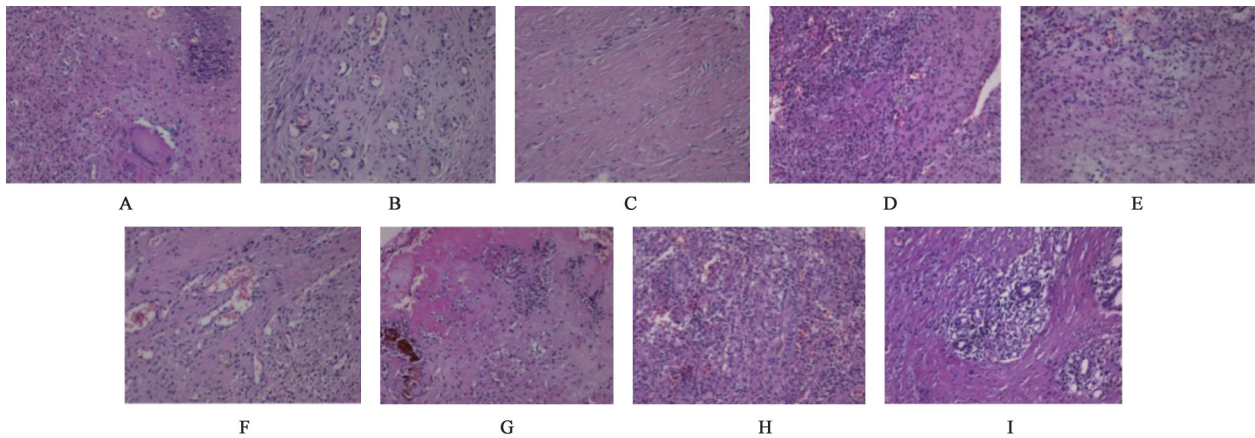
组别	例数	未愈/例	好转/例	治愈/例	总有效率/%
观察组	49	1	12	36	98.0 ^{1,2)}
对照 I 组	48	6	36	6	87.5
对照 II 组	48	8	39	1	83.3

注:与对照 I 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与对照 II 组比较²⁾ $P < 0.05$

3.1.2 3组患者中医证候积分比较 3组治疗过程中,中医证候积分均呈下降趋势。第14天开始,与本组治疗前比较,3组患者中医证候积分均显著降低($P < 0.01$)。与对照 I 组和对照 II 组治疗后比较,治疗后第28天观察组患者中医证候积分均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

见 Langhans 巨细胞(0 d);新生的毛细血管和纤维组织胶原化生(14 d);纤维性修复,成片的胶原组织和少量的纤维组织(28 d)。对照 I 组可见结核性肉芽肿,多量的类上皮细胞、淋巴细胞和散在的 Langhans 巨细胞(0 d);大量新生的毛细血管和类上皮细胞,伴少量的淋巴细胞和中性粒细胞浸润(14 d);新生的毛细血管和纤维组织胶原化生伴少量淋巴细胞浸润(28 d)。对照 II 组可见大片的干酪样坏死伴脓形成,成片的类上皮细胞(0 d);大量的类上皮细胞伴淋巴细胞和中性粒细胞浸润(14 d);纤维组织胶原化生伴多量的淋巴细胞和中性粒细胞等炎性细胞浸润(28 d)。见图 2。

3.1.5 3组患者 iNOS、Arg-1 水平比较 与本组第0天比较,治疗第28天观察组和对照 I 组患者 iNOS 水平显著降低($P < 0.01$),对照 II 组患者 iNOS 水平有降低趋势,但差异无统计学意义;与对照 I 组患者治疗第28天比较,观察组患者 iNOS 水平明显降低($P < 0.05$)。与本组第0天比较,治疗第28天观察组患者 Arg-1 显著升高($P < 0.01$);与对照 I 组

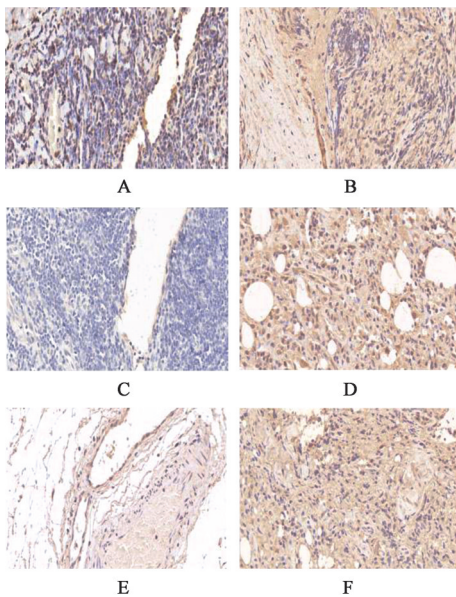


注: A~C. 观察组第0、14、28天; D~F. 对照 I 组第0、14、28天; G~I. 对照 II 组第0、14、28天

图2 不同药物处理后创面组织病理变化比较(HE, ×40)

Fig. 2 Comparison of pathological changes of wound tissue after different drug treatment (HE, ×40)

和对照 II 组患者治疗第28天比较, 观察组患者 Arg-1 明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图3、图4和表3。



注: A~B. 观察组治疗第0、28天; C~D. 对照 I 组治疗第0、28天; E~F. 对照 II 组治疗第0、28天(图4同)

图3 3组患者 iNOS 表达水平比较(免疫组化, ×40)

Fig. 3 Comparison of iNOS expression levels among three groups (IHC, ×40)

3.2 细胞实验结果

3.2.1 不同药物溶液浓度对巨噬细胞活力的影响

与空白组比较, 复方五凤草液(稀释比 1:1 600~1:6.25)组, 活力明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组比较, 康复新液(稀释比 1:31.25)组, 活力明显下降 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 异烟肼液组巨噬细胞活力差异无统计学意义。故本实验选择稀释400倍的复方五凤草液、稀释31.25倍的康复新液、稀释25倍的异烟肼液作为后续实验的浓度。见表4。

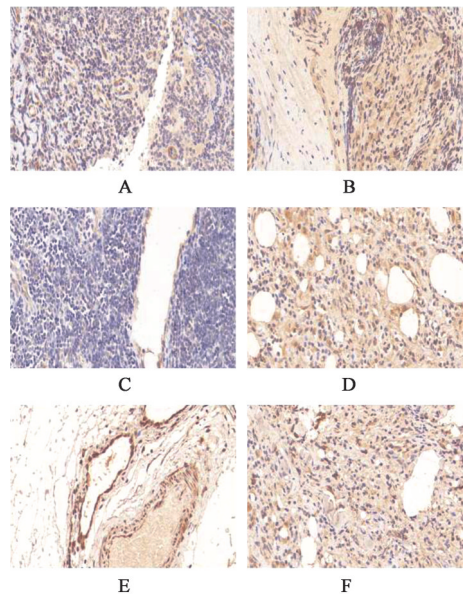


图4 3组患者 Arg-1 表达水平比较(免疫组化, ×40)

Fig. 4 Comparison of Arg-1 expression levels among 3 groups (IHC, ×40)

表3 3组患者 iNOS、Arg-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of iNOS and Arg-1 levels among 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	iNOS		Arg-1	
		第0天	第28天	第0天	第28天
观察组	49	1.24±0.45	0.30±0.28 ^{1,2)}	1.19±0.64	2.20±0.53 ^{1,2,4)}
对照 I 组	48	1.17±0.58	0.73±0.26 ¹⁾	1.18±0.64	1.47±0.43
对照 II 组	48	1.00±0.53	0.76±0.38	1.00±0.53	1.20±0.24

注: 与本组治疗第0天比较¹⁾ $P < 0.01$; 与同时时间点对照 I 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与同时时间点对照 II 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

3.2.2 对创面相关因子的蛋白表达水平的影响

结果显示与 M0 组比较, LPS 组中 iNOS、TNF- α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较, LPS+异烟肼组、LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草

表4 不同药物对RAW264.7巨噬细胞的活性影响 ($\bar{x} \pm s$)

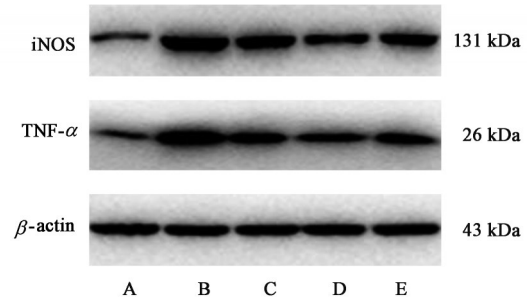
Table 4 Effect of different drugs on the activity of RAW264.7 macrophage ($\bar{x} \pm s$)

组别	稀释比例	细胞活性/%
空白组		101.23±0.12
复方五凤草液组	1:6.25	39.33±0.41 ²⁾
	1:12.5	23.49±4.63 ²⁾
	1:25	25.77±0.25 ²⁾
	1:50	22.73±0.58 ²⁾
	1:100	28.46±0.91 ²⁾
	1:200	45.12±1.65 ²⁾
	1:400	68.14±2.98 ²⁾
	1:800	78.54±8.577 ²⁾
	1:1600	96.02±11.98 ¹⁾
	空白组	
康复新液组	1:31.25	74.32±1.41 ¹⁾
	1:62.5	91.03±0.02
	1:125	87.04±3.39
	1:250	107.40±0.56
	1:500	84.64±2.26
	1:1000	85.61±20.04
	1:2000	99.41±0.56
	1:4000	101.01±11.86
1:8000	112.99±3.95	
空白组		101.03±0.12
异烟肼液组	1:12.5	87.04±1.13
	1:25	72.63±0.17
	1:50	100.19±2.43
	1:100	102.21±3.71
	1:200	103.81±6.16
	1:400	94.22±9.03
	1:800	80.17±1.81
	1:1600	90.23±3.39
1:3200	93.82±3.95	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

液组中 iNOS、TNF- α 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 与 LPS+异烟肼组比较, LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中 iNOS 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LPS+复方五凤草液组 TNF- α 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与 LPS+康复新液组比较, LPS+复方五凤草液组中 TNF- α 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。见图 5、表 5。

与 M0 组比较, IL-4 组 Arg-1、TGF- β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 IL-4 组比较, IL-4+异烟肼组、IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中



注: A.M0组; B.LPS组; C.LPS+异烟肼组; D.LPS+康复新液组; E.LPS+复方五凤草液组

图5 结核性溃疡巨噬细胞中 iNOS、TNF- α 蛋白电泳

Fig. 5 Electrophoresis of iNOS and TNF- α in macrophages of tuberculous ulcer

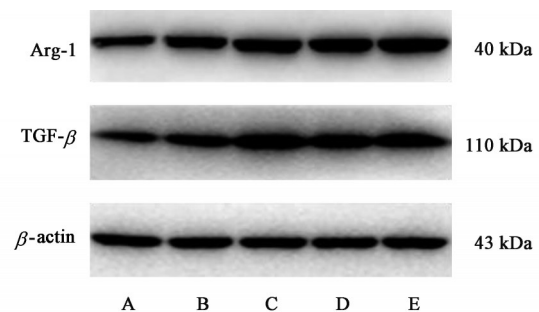
表5 复方五凤草液对结核性溃疡巨噬细胞中 iNOS、TNF- α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Fufang Wufengcao liquid on iNOS, TNF- α protein expression in tuberculous ulcer macrophage ($\bar{x} \pm s$)

组别	稀释比例	iNOS/ β -actin	TNF- α / β -actin
M0组		0.63±0.00	0.68±0.07
LPS组		1.33±0.03 ¹⁾	1.48±0.10 ¹⁾
LPS+异烟肼组	1:25	1.10±0.04 ²⁾	1.30±0.10 ²⁾
LPS+康复新液组	1:31.25	1.06±0.05 ^{2,3)}	1.21±0.02 ²⁾
LPS+复方五凤草液组	1:400	1.00±0.06 ^{2,4)}	1.01±0.07 ^{2,4,5)}

注:与 M0 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 LPS 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 LPS+异烟肼组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$; 与 LPS+康复新液组比较⁵⁾ $P < 0.05$

Arg-1、TGF- β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 IL-4+异烟肼组比较, IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中 Arg-1、TGF- β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 IL-4+康复新液组比较, IL-4+复方五凤草液组中 Arg-1、TGF- β 蛋白表达水平明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 6、表 6。



注: F.M0组; G.IL-4组; H.IL-4+异烟肼组; I.IL-4+康复新液组; J.IL-4+复方五凤草液组

图6 结核性溃疡巨噬细胞中 Arg-1、TGF- β 蛋白电泳

Fig. 6 Electrophoresis of Arg-1 and TGF- β in macrophages of tuberculous ulcer

表6 复方五凤草液对结核性溃疡巨噬细胞中Arg-1、TGF-β蛋白表达的影响(̄x±s)

Table 6 Effect of Fufang Wufengcao liquid on Arg-1, TGF-β protein expression in tuberculous ulcer macrophag (̄x±s)

组别	稀释比例	Arg-1/β-actin	TGF-β/β-actin
M0组		0.79±0.04	0.75±0.01
IL-4组		1.00±0.02 ¹⁾	1.00±0.02 ¹⁾
IL-4+异烟肼组	1:25	1.21±0.05 ²⁾	1.30±0.04 ³⁾
IL-4+康复新液组	1:31.25	1.25±0.02 ^{3,5)}	1.38±0.05 ^{3,4)}
IL-4+复方五凤草液组	1:400	1.35±0.08 ^{3,5,6)}	1.43±0.04 ^{3,5,7)}

注:与M0组比较¹⁾P<0.01;与IL-4组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与IL-4+异烟肼组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01;与IL-4+康复新液组比较⁶⁾P<0.05,⁷⁾P<0.01

3.2.3 对CD86⁺和CD206⁺ M2型巨噬细胞比例的影响 流式细胞术结果显示与M0组比较,LPS组中CD86表达比例升高(P<0.01)。与LPS组比较,LPS+异烟肼组、LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中CD86⁺表达比例下降(P<0.01);与LPS+异烟肼组比较,LPS+康复新液组、LPS+复方五凤草液组中CD86表达比例下降(P<0.01);与LPS+康复新液组比较,LPS+复方五凤草液组中CD86表达比例显著下降(P<0.01)。见表7。

表7 对刺激后CD86+M1型巨噬细胞比例的影响(̄x±s)

Table 7 Effects on the proportion of CD86+M1 macrophages after stimulation (̄x±s) %

组别	稀释比例	CD86 ⁺ M1型巨噬细胞
M0组		6.68±0.16
LPS组		38.05±0.07 ¹⁾
LPS+异烟肼组	1:25	21.25±1.77 ²⁾
LPS+康复新液组	1:31.25	19.65±0.49 ^{2,3)}
LPS+复方五凤草液组	1:400	18.75±0.35 ^{2,3,4)}

注:与M0组比较¹⁾P<0.01;与LPS组比较²⁾P<0.01;与LPS+异烟肼组比较³⁾P<0.01;与LPS+康复新液组比较⁴⁾P<0.01

与M0组比较,IL-4组CD206表达比例升高(P<0.01)。与IL-4组比较,IL-4+异烟肼组、IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中CD206表达比例显著升高(P<0.01);与IL-4+异烟肼组比较,IL-4+康复新液组、IL-4+复方五凤草液组中CD206表达比例升高(P<0.01);与IL-4+康复新液组比较,IL-4+复方五凤草液组中CD206表达比例明显升高(P<0.05)。见表8。

4 讨论

慢性创面愈合是一个复杂的过程,涉及多种细胞类型和各种细胞因子的协调以调节创面修复。

表8 对刺激后CD206+ M2型巨噬细胞比例的影响(̄x±s)

Table 8 Effects on proportion of CD206+ M2 macrophages after stimulation (̄x±s) %

组别	稀释比例	CD206 ⁺ M2型巨噬细胞
M0组		2.59±0.02
IL-4组		23.40±0.57 ¹⁾
IL-4+异烟肼组	1:25	34.60±0.56 ²⁾
IL-4+康复新液组	1:31.25	36.10±1.27 ^{2,3)}
IL-4+复方五凤草液组	1:400	38.45±2.47 ^{2,3,4)}

注:与M0组比较¹⁾P<0.01;与IL-4组比较²⁾P<0.01;与IL-4+异烟肼组比较³⁾P<0.01;与IL-4+康复新液组比较⁴⁾P<0.05

结核性溃疡创面是以长期的炎症状态为特征,表现为M1型巨噬细胞过度激活,促炎因子水平升高,M2表型激活不足,生长因子表达受损,创面组织再生受阻。此外随着全球耐药结核患者及糖尿病、人类免疫缺陷病毒(HIV)合并结核患者的增加,结核性溃疡疾病发病率及治疗难度亦随之增加。经过长期临床观察,课题组认为该疾病治疗适用于“创面床准备(WBP)”的概念^[7-9],即通过纠正可能延迟创面愈合的全身和局部因素,从而促进创面愈合的系统治疗方法。全身治疗以规范的抗结核药物的应用为基础,而在局部治疗中,选取复方外用中药,因其操作简便、疗效显著为临床及患者更易接受的特点。

中医将结核性溃疡列为“瘰疬”“骨癆”“乳癆”“子痰”“顽疮”等范畴。因机体受瘰疬邪毒外袭,局部气血凝滞,郁而化热,热盛灼阴,津液暗耗,虚火旺生,热盛酿脓,蕴蒸成疮,溃破成漏;病久腐肉郁结,脓水淋漓,耗气伤血,正气亏损,无力托毒外出,难以生新。概括病机特点为“毒腐郁结,气血不足”^[10]。复方五凤草液即根据此病因病机研制而成,方中五凤草^[11]行水杀虫,祛腐泄毒;白及^[12]敛疮消肿,生肌止血;猫爪草^[13]拔脓解毒,活血生新。诸药合用,共奏泄毒祛腐,活血生新之功。课题组前期开展的药理学研究,以超高效液相色谱-二极管阵列检测器法(UPLC-PDA)同时测定出复方五凤草液所含的7种体外化学成分,没食子酸、原儿茶素、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素^[14]。现代药理研究表明以上化学成分或有抗结核作用,或有促进创面愈合作用,从侧面证实了该复方外用中药的疗效:如原儿茶酸能直接杀灭结核分枝杆菌,促进宿主的抗结核免疫反应,减轻结核性炎症反应;槲皮素抑制炎症,促进伤口部位血管新生、胶原纤维沉积^[15-16];没食子酸可通过影响巨噬细胞相

关因子的表达而发挥抗炎作用^[17-18],有助于伤口愈合等。

因此,为进一步明确该复方中药的疗效及作用机制,本次研究分别选取临床应用较为成熟的康复新液^[19]及异烟肼液^[20]作为中药对照组、西药对照组,比较观察3组临床疗效,并基于巨噬细胞极化,探讨其是否是针对和纠正创面长期存在的炎症细胞和分子使其恢复到愈合状态的有效外用中药。

临床研究结果表明,3组在治疗过程中中医证候积分均呈下降趋势,观察组表现更为明显,与对照组比较差异有统计学意义,观察组总有效率97.9%,显著高于康复新液组(87.5%)、异烟肼液组(72.9%)。可见复方五凤草液组能更有效地促使创面腐肉脱落,减少渗液分泌,促进肉芽生长,加快创面上皮化,更快完成创面修复,镜下组织学观察则表示为炎性肉芽组织减少明显,新生毛细血管生长良好。创面组织中M1表型炎症因子明显下降,M2表型指标上高明显。

细胞实验研究课题组选取了M1/M2巨噬细胞炎症因子及表型指标TNF- α 、TGF- β 、iNOS、Arg-1、CD86、CD206作为观察指标。已知巨噬细胞是慢性创面愈合过程的关键调节剂,他们会随着创面愈合阶段而发挥不同的作用以确保适当、及时的愈合^[21-22]。结核性溃疡难以愈合是因巨噬细胞群向M2型极化受阻,抗炎因子和生长因子的分泌不足导致。TNF- α 是在患者的创面微环境中发现的重要M1型巨噬细胞表型之一,加速炎症的进程,抗TNF- α 的治疗对创面修复表现出积极作用^[23-24]。M2型巨噬细胞TGF- β 作为纤维化的重要调节剂^[25],可以直接减少炎症反应^[26],有助于促进上皮再生,胶原蛋白重塑,肉芽组织新生^[27],修复伤口愈合。CD86是活化的M1型巨噬细胞的表面标记物^[28],反映细胞在局部的活化及浸润,CD86表达水平的提高提示创面炎症因子的旺盛。CD206是一种由M2型巨噬细胞释放清道夫受体^[29],作为消除内源性分子,在调节巨噬细胞的细胞活化和转运方面起着至关重要的作用,将M2巨噬细胞募集到创面局部,升高CD206的表达,代表创面周围的炎症的减轻,促进了创面组织的新生。

本次实验选用小鼠腹腔巨噬细胞,观察LPS刺激下的M1型巨噬细胞显著增加^[30],用IL-4处理后显著增加稳定状态下M2型巨噬细胞转录物减少,再分别给予3组药物外用,3组M1型巨噬细胞表达水平均下降,M2型皆有提升,与同时点两组对照

组比较,观察组能够明显减弱LPS诱导巨噬细胞中的TNF- α 和iNOS的表达含量,增加TGF- β 、Arg-1的表达水平,这直接反映外用药中观察组作用的最强,提示复方五凤草液可以抑制炎症细胞的激活和炎症因子释放,从而抑制慢性创面组织损伤及炎症反应,通过上调创面肉芽组织中TGF- β 和Arg-1的表达水平,下调TNF- α 和iNOS的表达水平促进创面愈合,相对于另外两组有显著优势。细胞流式实验课题组观察了各组CD86、CD206的表达,结果显示复方五凤草液相对于另外两组,能够显著降低M1型细胞中CD86⁺的表达水平,上调CD206⁺的数值,表明其可能通过调控巨噬细胞的极化从而影响创面细胞的增殖、迁移和凋亡。CD86的下降和CD206的上调暗示结核性溃疡的有利预后因素,进一步强调了M1和M2巨噬细胞在结核性溃疡创面治疗和预后中的相反功能。

《外科启玄》提出“煨脓长肉”“祛腐生肌”以治疗慢性创面疾病,本课题组将其与结核性溃疡创面毒腐为标,正虚为本,标本夹杂,缠绵反复的特点相结合,总结出“泄毒生新”外治法^[31],通过祛腐拔毒促进脓液外泄,加快坏死组织的脱落,脓液又可以化生新的气血,激发创面组织新生,这与本实验现代医学解释不谋而合,都是通过给创面生长创造适宜的湿性环境来调控创周微环境,外用复方五凤草液调控炎症因子和细胞因子的分泌合成,促进修复细胞的增殖,改善创面血供,加速修复基质的代谢、丰富创面营养,从而促进组织修复再生。

因此,与异烟肼和康复新液外敷比较,外用复方五凤草液对于结核性溃疡的治疗和修复价值更高。复方五凤草液通过调节M1/M2型巨噬细胞之间的极化来影响结核性溃疡创面的修复。这表明巨噬细胞是结核性溃疡创面的治疗靶点,可能是通过调节炎症和细胞增殖在创面愈合过程中发挥重要作用。但如果M2型巨噬细胞停留时间过长,可能会形成过多的胶原蛋白,从而导致瘢痕形成,所以直接促进M2型是否完全有必要,或者,是否有可能仅通过减弱M1巨噬细胞,创面微环境将被重新编程以成功愈合?此外,M1型的长期存在可能并不是唯一导致伤口愈合中断的巨噬细胞相关问题。因此,后期需做更深入地探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 孙佳玥,黄子慧,钱佳燕,等. 泄毒生新法外治结核性

- 溃疡经验[J]. 中华中医药杂志, 2021(7): 4037-4040.
- [2] NISHIURA H, IMASAKA M, YAMANEGI K, et al. Immune aging and how it works for inflammation and fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2022, 12: 795508.
- [3] 钱佳燕. 复方五凤草液调控M1/M2巨噬细胞极化干预结核性溃疡的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [4] 刘万里, 黄子慧. 中西医结合疮疡病诊疗学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020.
- [5] 中华人民共和国国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1995.
- [6] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 127.
- [7] 田影, 马静, 李品川, 等. 创面床准备理论在下肢慢性重症溃疡中的应用[J]. 中医外治杂志, 2018, 27(5): 50-52.
- [8] 高琼, 薛晓东. 创面床准备的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(28): 194-196.
- [9] 张榜, 马海涛, 崔炎, 等. 基于“创面床准备”理论谈崔公让治疗脱疽经验[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(10): 1805-1808.
- [10] 孙佳玥, 黄子慧, 钱佳燕, 等. 泄毒生新法外治结核性溃疡经验[J]. 中华中医药杂志, 2021(7): 4037-4040.
- [11] 高帆, 牛玉季, 张亚茹, 等. 泽漆抗肿瘤抗炎作用及机制研究[J]. 河南大学学报: 医学版, 2021, 40(6): 391-399.
- [12] 范宝军, 杨卓. 白及多糖的药理研究进展及其治疗内镜下黏膜剥离术人工溃疡的作用探讨[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(3): 1-7.
- [13] 刘媛, 陈洁, 孙辉, 等. 基于网络药理学的猫爪草治疗结核病作用机制研究[J]. 山东科学, 2021, 34(6): 51-61.
- [14] 钱佳燕, 黄子慧, 陈肯, 等. UPLC-PDA法同时测定复方五凤草液中7种成分[J]. 中成药, 2020, 42(1): 37-40.
- [15] 谭鑫, 鲜维, 陈永锋, 等. 槲皮素治疗心力衰竭的分子机制: 基于网络药理学与分子对接方法[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(8): 1198-1206.
- [16] 刘文, 康凯, 张健楠, 等. 槲皮素对小鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 川北医学院学报, 2021, 36(7): 817-820, 825.
- [17] 毛赫新, 王琳源, 关宁, 等. 没食子酸对M1型巨噬细胞极化的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2021, 47(5): 1139-1145.
- [18] 张新. 用于糖尿病创面愈合的抗氧化、抗炎的自粘附没食子酸-明胶复合水凝胶的制备及性能研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- [19] 张敏, 高金县, 马静, 等. 康复新液对溃疡型肠结核患者疗效及血清EGF、IL-1、TNF- α 水平的影响[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(11): 74-77.
- [20] 汤玲玲. 异烟肼联合利福平用于49例颈部淋巴结结核伤口换药的效果观察[C]// 第四届上海国际护理大会论文汇编. [出版者不详], 2019: 528.
- [21] HAO Y, YANG L, LIU Y, et al. mmu-miR-145a-5p accelerates diabetic wound healing by promoting macrophage polarization toward the M2 phenotype [M]. *Front Med*, 2021, 8: 775523.
- [22] 张愨晨, 高伟成. 创面愈合过程中巨噬细胞调控机制的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2019, 15(3): 204-207.
- [23] XU F X, ZHANG C Y, GRAVES D T. Abnormal cell responses and role of TNF-alpha in impaired diabetic wound healing [J]. *Biomed Res Inter*, 2013, doi: 10.1155/2013/754802.
- [24] 朱克春, 马萍. 蒺藜总皂苷对LPS诱导的巨噬细胞分泌IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-2、NO的影响和机制[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(16): 1958-1963.
- [25] KHALIL N, BEREZNAVAY O, SPORN M, et al. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation [M]. *J Exp. Med*, 1989, 170, (3): 727-737.
- [26] IWATA Y, YOSHIZAKI A, KOMURA K, et al. CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(2): 649-660.
- [27] RODERO M P, KHOSROTEHRANI K. Skin wound healing modulation by macrophages [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3(7): 643-653.
- [28] 惠毅, 魏海梁, 闫曙光, 等. 血管活性肠肽对肺泡巨噬细胞M1/M2型极化及相关细胞因子的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2053-2059.
- [29] GARCIA-AGUILAR T, ESPINOSA-CUETO P, MAGALLANES-PUEBLA A, et al. The mannose receptor is involved in the phagocytosis of mycobacteria-induced apoptotic cells [J]. *J Immunol Res*, 2016, doi: 10.1155/2016/3845247.
- [30] 王璐, 杨瑞, 张莹莹, 等. Kir2.1在LPS或IL-4诱导的巨噬细胞M1/M2型极化中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(3): 385-393.
- [31] 高敏行, 黄子慧, 朱思洵, 等. 泄毒生新外治法治疗溃疡型淋巴结结核的临床疗效观察[J]. 现代中医临床, 2021, 28(5): 28-33.

[责任编辑 王鑫]