

引用:袁率财,孙绍裘,李益亮,何梦帆,曾祥晶,黄臻,刘威,姚金龙.桃红四物汤调控PI3K/Akt通路促进吻合血管存活[J].中医导报,2026,32(3):18-25.

桃红四物汤调控PI3K/Akt通路 促进吻合血管存活*

袁率财,孙绍裘,李益亮,何梦帆,曾祥晶,黄臻,刘威,姚金龙
(湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

[摘要] 目的:基于网络药理学与分子对接技术探讨桃红四物汤调控吻合血管存活的分子机制,并通过动物实验验证其关键信号通路。方法:基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库筛选桃红四物汤活性成分及靶点,结合血管吻合相关靶点获取93个交集基因,构建PPI网络筛选28个核心靶点,通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)/基因本体(GO)富集分析锁定PI3K/Akt为核心通路;通过分子对接明确β-谷甾醇、槲皮素、木犀草素与PI3K/Akt通路蛋白的结合能力;最后,建立大鼠尾部中动脉吻合模型,随机分为假手术组、空白组、桃红四物汤组及蒸馏水组(n=9),术后分别灌胃干预,于第2、8、15天苏木精-伊红(HE)染色检测血管内膜面积,蛋白质印迹(Western blotting)法检测PI3K/Akt通路及VEGF蛋白表达。结果:网络药理学预测桃红四物汤可能通过PI3K/Akt通路调控吻合血管存活,分子对接示β-谷甾醇、槲皮素、木犀草素与PI3K/Akt通路蛋白具有强结合能力;术后第1天,桃红四物汤组与蒸馏水组大鼠尾部血管充盈时间于术后第1天就达到峰值,并逐步于第6~7天恢复至正常水平,空白组与假手术组未进行血管吻合大鼠尾部血管充盈时间无明显差异;HE染色显示:干预第2天,桃红四物汤组血管内膜面积与其他组比较,差异有统计学意义(P<0.05)。Western Blotting结果显示,桃红四物汤组在术后第2天即显著上调VEGF、PI3K及Akt蛋白表达;至第8天,该组VEGF(P<0.05)、PI3K(P<0.05)及Akt(P<0.01)表达仍显著高于蒸馏水组;第15天时,桃红四物汤组PI3K(P<0.05)及Akt(P<0.01)表达仍显著高于蒸馏水组。结论:桃红四物汤可能通过促进PI3K/Akt信号轴相关蛋白表达,推动吻合血管存活。

[关键词] 桃红四物汤;吻合血管;血管再生;PI3K/Akt信号通路;网络药理学;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)03-0018-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2026.03.004

Mechanism of Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤) in Promoting Vascular Anastomosis Survival by Regulating the PI3K/Akt Signaling Pathway

YUAN Shuaicai, SUN Shaoqiu, LI Yiliang, HE Mengfan, ZENG Xiangjing,
HUANG Zhen, LIU Wei, YAO Jinlong

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410005, China)

[Abstract] Objective: To investigate the molecular mechanism by which Taohong Siwu Decoction (THSWD) promotes vascular anastomosis survival using network pharmacology and molecular docking, and to validate the key signaling pathway through animal experiments. Methods: Active components and corresponding targets of THSWD were screened from the TCMSP database. By intersecting with vascular anastomosis-related targets, 93 overlapping genes were obtained. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed to identify 28 core targets. KEGG and GO enrichment analyses pinpointed the PI3K/Akt pathway as a key pathway. Molecular docking was performed to evaluate the binding affinities of β-sitosterol, quercetin, and luteolin with PI3K/Akt pathway proteins. Finally, a rat tail artery anastomosis model was established. The rats were randomly divided into sham-operated group, blank group, THSWD group, and distilled water group (n=9). Postoperative interventions were administered by gavage. On days 2, 8, and 15 post-surgery, HE staining was used to measure the vascular intimal area, and Western blotting was used to detect the expression of PI3K/Akt pathway

*基金项目:湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(23B0367);第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目;湖南省中医药科研计划一般项目(B2024080);孙达武名老中医专家传承工作室项目;湖南省中医骨伤临床医学研究中心(2020SK4013)

通信作者:李益亮,男,副主任医师,研究方向为中医药防治骨伤科疾病

proteins and VEGF. Results: Network pharmacology predicted that THSWD might regulate vascular anastomosis survival through the PI3K/Akt pathway. Molecular docking indicated strong binding affinities of β -sitosterol, quercetin, and luteolin with PI3K/Akt pathway proteins. On postoperative day 1, the tail vascular filling time in both the THSWD group and the distilled water group peaked and then gradually returned to normal levels by days 6–7. There was no significant difference in tail vascular filling time between the blank group and the sham-operated group (rats without vascular anastomosis). HE staining showed that on day 2 of intervention, the vascular intimal area in the THSWD group was significantly different compared to the other groups ($P < 0.05$). Western blotting results showed that the THSWD group exhibited significantly up-regulated protein expression of VEGF, PI3K, and Akt as early as day 2 post-surgery. By day 8, the expression levels of VEGF ($P < 0.05$), PI3K ($P < 0.05$), and Akt ($P < 0.01$) in this group remained significantly higher than those in the distilled water group. On day 15, the expression of PI3K ($P < 0.05$) and Akt ($P < 0.01$) in the THSWD group was still significantly elevated compared to the distilled water group. Conclusion: Taohong Siwu Decoction may promote vascular anastomosis survival by up-regulating the expression of proteins in the PI3K/Akt signaling axis.

[Keywords] Taohong Siwu Decoction; vascular anastomosis; angiogenesis; PI3K/Akt signaling pathway; network pharmacology; rats

现代工业化背景下高能量创伤类疾病临床发生率逐年攀升,其中肢体离断作为高能量损伤的典型表现形式,已成为创伤外科领域的重要临床课题^[1]。作为创伤外科领域的重大挑战,肢体离断不仅造成肢体功能严重缺损,还易引发心理社会适应障碍。血管吻合(vascular anastomosis, VA)作为重建断肢血运的核心技术,其操作精度直接影响组织存活率,其中血管内膜修复质量、血流动力学稳态及远期通畅率是决定预后的关键参数^[2]。

在血管吻合术后康复方面,中医药展现出独特优势。血管吻合术后(postvascular anastomosis, PVA)属于中医学“金创”范畴,但根据其病因可知,各类高能量创伤导致的肢体经络损伤导致局部肢体离断,血离其经,术后经络不通,瘀血阻滞。《血证论》言“瘀血在经络脏腑之间,则周身作痛”,血管吻合术后早期局部肿胀、疼痛及血流不畅,属血瘀气滞之象。桃红四物汤作为经典活血化瘀方剂,其“养血行瘀”的组方理念与《血证论》所述“祛瘀生新”理论相契合。课题组前期研究已证实该方剂可显著改善术后吻合血管通畅,并通过调控Notch通路关键分子Delta样配体4(Delta-like ligand 4, DLL4)和Notch受体3(Notch3, NOTCH3),促进血管内皮细胞增殖^[3-5]。值得注意的是,越来越多中医药研究利用网络药理学(network pharmacology)方法进行方药与疾病的关键靶点分析与预测,其主要原因在于网络药理学方法系统生物学特征与中医药整体观高度契合。网络药理学通过构建“中药-成分-靶点-通路”多维网络,可系统解析复方多靶点协同机制,且分子对接技术可系统评估方剂有效成分与核心靶点的结合亲和力,并基于结合能定量分析明确其配体-受体相互作用关系^[6-8]。

本研究利用网络药理学和分子对接从桃红四物汤药物组成出发,探究其对吻合血管存活的核心通路,最后建立吻合血管存活大鼠模型进行核心通路蛋白表达验证,为吻合血管存活机制研究奠定基础。

1 材料与方剂

1.1 材料

1.1.1 主要药品与试剂 桃红四物汤由桃仁20 g,红花10 g,

熟地黄20 g,当归20 g,赤芍20 g,川芎10 g组成,剂型为颗粒剂,由天地恒一制药股份有限公司生产(批号分别为Z240037、Z240582、Z240619、Z240154、Z240796、Z240461)。注射用青霉素钠(成都倍特药业有限公司,80万IU/支,批号:220304);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,25 g/瓶,批号:20230621)。

柱式法蛋白质印迹(Western blotting)专用动物细胞和组织总蛋白提取试剂盒(批号:RS0024)、ACTIN单克隆抗体(批号:YM3028)、十二烷基硫酸钠(SDS)电泳缓冲液(批号:RS0025)、转移缓冲液(批号:RS0028)、10%SDS溶液(批号:RS0012)、TBST洗涤缓冲液(批号:RS0017)、一抗二抗去除液(批号:RS0022)、免疫组化抗体稀释液(批号:RS0001)均购自美国Immunoway公司;脱脂奶粉(美国BD公司,批号:232100);NC膜(美国Millipor公司,批号:HATF00010);血管内皮生长因子(VEGF)抗体(货号:AF5131)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抗体(货号:AF6241)、蛋白激酶B(Akt)抗体(货号:AF6261)均购自美国Affinity公司;DyLight 800-山羊抗兔IgG(H+L)(货号:B2001)、DyLight 680-山羊抗鼠IgG(H+L)(货号:B1001)均购自美国Immunoway公司。

1.1.2 主要仪器 骨科手术显微镜(东莞市淇麟科技有限公司,型号:MSD205-C);显微手术器械(泗洪美邦医疗器械有限公司);显微止血夹(苏州市苏强医疗器械有限公司,3 cm);带针缝合线(宁波医用缝针有限公司,11-0);荧光成像(LICOR,型号:Odyssey);酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:SpectraMax M5E);微量分光光度计(美国Thermo Fisher公司,型号:NanoDrop 2000);手掌离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:XK-400)。

1.2 网络药理学

1.2.1 桃红四物汤药物靶点筛选 本研究通过TCMSP(中药系统药理学数据库与分析平台)数据库(<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>)检索上述药材的活性成分,设定口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 与类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的获取潜在活性成分。将筛选得到的化合物通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询

其规范化SMILES标识符,随后将SMILES序列导入SwissTarget Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)平台进行靶点预测分析。

1.2.2 血管吻合核心靶点筛选 以“vascular anastomosis”为检索关键词,分别通过GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)筛选吻合血管存活相关靶基因。基于预设的相关性评分(relevance score ≥ 4 分)阈值筛选高置信度靶点,整合数据并去除冗余靶点后,最终确定吻合血管存活相关核心靶点集合。

1.2.3 桃红四物汤促进吻合血管存活潜在作用靶点预测 将桃红四物汤活性成分靶点与吻合血管存活核心靶点数据集输入微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>),通过其在线Venn分析工具进行靶点交集可视化。最终明确桃红四物汤调控吻合血管存活的关键潜在作用靶点。

1.2.4 PPI网络构建及网络拓扑分析 将筛选获得的潜在作用靶点导入STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>),设定物种参数为“Homo sapiens”,蛋白质相互作用置信度 ≥ 0.4 ,剔除游离节点后构建PPI网络。导出并保存网络拓扑数据为TSV格式及图形文件,继而采用Cytoscape 3.10.0软件(<https://cytoscape.org/>)进行网络可视化。通过CentriScaPe 2.2插件计算节点拓扑学特征参数,依据closeness值、betweenness值、degree值三者综合评分筛选核心靶点。最终综合文献验证与PPI网络拓扑分析,确定桃红四物汤调控吻合血管存活的关键作用靶点。

1.2.5 基因本体(GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 将筛选确定的核心靶点导入DAVID数据库(<https://davidbioinformatics.nih.gov/>),进行GO功能注释分析,涵盖生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)三大功能模块,并获取KEGG通路富集数据。基于所得注释及通路富集结果,通过微生信平台构建气泡图与柱状图实现多维数据可视化。

1.2.6 “疾病-靶点-有效成分-药物”网络构建 采用Cytoscape 3.10.0软件构建“疾病-靶点-有效成分-药物”网络,整合桃红四物汤活性成分、吻合血管存活核心靶点、KEGG通路及药物作用关系数据,并实现网络拓扑可视化,节点Degree值通过半径梯度映射量化,结合拓扑学分析筛选网络枢纽靶点,最终解析桃红四物汤调控吻合血管存活的多维作用机制。

1.2.7 分子对接 通过PubChem化学数据库获取目标活性成分的分子结构信息,并以标准SDF文件格式保存分子数据。从RCSB蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载靶蛋白的三维晶体结构原始文件保存为PDB格式。采用PyMOL 2.6.0分子可视化系统对原始蛋白结构进行预处理,包括去除结晶水分子及复合配体等操作,同时运用Getbox插件模块进行结合位点参数分析。使用AutoDock Tools 1.5.6软件分别对优化后的受体蛋白和配体分子进行电荷分配及原子类型定义,并将其转化为适用于分子对接的PDBQT格式文件。对接运算通过AutoDock Vina 1.1.2程序完成,采用基于格点的对接算法评估配体-受体结合模式。最后,利用PyMOL软件平台对分子对接结果进行三维可视化呈现,重点分析关键氨基酸残基与配

体分子间的相互作用模式。

1.3 动物实验验证

1.3.1 实验动物 本研究采用3个月龄SPF级SD雄性大鼠(36只,体质量200~250 g)作为实验对象。实验动物的标准化采购、屏障式饲养及实验操作均在湖南中医药大学实验动物中心SPF级设施内完成[动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004;动物质量合格证号:430727241100561114;动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009]。实验全程大鼠饲养在环境适温(22~26 ℃)、湿度适宜(40%~70%)、通气、清洁干燥,适当模拟昼夜更替,保证大鼠可自由获得专用饲料及水源。本研究方案已获湖南中医药大学实验动物中心动物实验伦理委员会批准(伦理审批号:HNUCM21-2403-15),实验全过程遵循3R原则并符合国际实验动物评估和认可委员会认证要求。

1.3.2 模型与分组

1.3.2.1 模型建立 本实验先造模后分组,造模18只大鼠,采用大鼠尾部中动脉血管吻合术法进行造模^[3-5],具体方法如下。血管吻合操作在10倍手术显微镜下完成,具体流程包括:(1)血管预处理。离断尾中段动脉后采用100 U/mL肝素钠溶液行管腔冲洗。(2)显微固定。使用显微血管夹维持断端间距(1.5±0.2)mm,轴向张力 ≤ 0.5 N。(3)无创吻合。应用11-0聚丙烯缝线实施改良“6-12点定位法”,前壁以针距0.3 mm、边距0.2 mm完成外翻式缝合,血管夹系统旋转180°后行后壁镜像缝合,根据血管直径于3/9点方位补加间断缝合。(4)通血验证。分级释放血管夹后,镜下观察血流方向及血管充盈度,确认无渗漏及血栓形成后逐层缝合皮肤。术后通过激光多普勒检测血流速度及血管搏动指数双重验证模型可靠性。造模术后实验动物于SPF级屏障系统内实施单笼管理,自由获取灭菌饲料及饮用水。为预防术后感染,所有术式组动物接受兽用青霉素80 000 IU/(kg·d)腹腔注射,连续3 d。术后密切观察大鼠尾部皮肤情况,无明显红肿为无临床感染。

1.3.2.2 分组 大鼠经7 d适应性喂养后,通过随机数字表法筛选符合标准个体分组:桃红四物汤组(THSWD组, $n=9$)、蒸馏水组(DW组, $n=9$)行显微血管吻合术,假手术组(Sham组, $n=9$)实施血管暴露但无吻合操作,空白对照组(Control组, $n=9$)保持正常生理状态。

1.3.2.3 干预 术后根据实验动物与人体用药量相等原则对药物使用量进行换算以及查阅文献,得出体质量200 g大鼠每日摄入量1.8 g,各组大鼠的灌胃量为1.0 mL/100 g,自造模后第2天开始给药,连续15 d。Control组:不造模,灌服等量蒸馏水,2次/d;Sham组:不进行血管吻合术,只是切开后直接缝合,灌服等量蒸馏水,2次/d;DW组:造模后第2天开始灌服等量蒸馏水,2次/d;THSWD组:造模后第2天开始灌服桃红四物汤,2次/d。

1.3.3 观察指标

1.3.3.1 一般情况观察 测量记录各个时间点实验大鼠尾部血管充盈时间,观察皮肤张力情况、皮肤颜色,防止吻合部位栓塞尾部坏死。

1.3.3.2 血管内膜面积测定 利用苏木精-伊红(HE)染色对血管吻合部位内膜面积进行观察。处死大鼠后,游离并截取

吻合段血管组织,立即用4%多聚甲醛固定。固定后的组织经PBS缓冲液漂洗,依次进行梯度乙醇脱水、无水乙醇终末脱水、二甲苯透明,再经二甲苯-石蜡混合液过渡后浸入纯石蜡浸蜡包埋。将石蜡包埋块轴向切片,展片、贴片并烘干。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,用苏木素染色15 min,流水冲洗,再用伊红染色15 s,流水冲洗。随后切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。最后,在电子显微镜下观察血管结构,扫描图像,并使用K-Viewer软件分析计算血管内膜面积。

1.3.3.3 Western blotting检测血管吻合区相关指标 采用Western blotting对血管吻合部位PI3K、Akt、VEGF蛋白进行检测,具体步骤如下:于冰上使用含蛋白酶抑制剂的预冷RIPA裂解液,将裂解混合物在4℃、12 000×g的条件下离心10~15 min,随后,小心吸取上清液(即为总蛋白提取物),分装并立即置于-80℃冻存,以备后续使用;采用BCA法进行蛋白定量,根据目标蛋白分子量配制分离胶与浓缩胶,上样20 μg蛋白进行梯度电泳,上样后80 V浓缩胶电泳,120 V分离胶电泳;电泳后依据分子量切胶,将激活的PVDF/NC膜与凝胶组装成“三明治”结构,置于含甲醇的转膜缓冲液中恒流转膜;转膜后用5%脱脂奶粉或3%牛血清白蛋白(BSA)的TBST溶液封闭;依次进行一抗4℃过夜和稀释于5%脱脂牛奶TBST的远红外荧光二抗,室温1 h,1:10 000孵育,每次抗体孵育后均用TBST充分洗涤;最后于暗室成像采集信号,并使用ImageJ软件分析目标蛋白条带表达量。

1.4 统计学方法 采用GraphPad Prism 9.5软件进行统计分析,计量资料用“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA),多重比较使用Tukey法,非正态分布或方差不齐数据采用Kruskal-Wallis H检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 桃红四物汤活性成分 将桃红四物汤成分导入TCMSP数据库,设置OB \geq 30%和DL \geq 0.18,最后得出64种有效化合物。(见表1~2)

表1 桃红四物汤中活性化合物的分布

药物	化合物数量/个	OB \geq 30%和DL \geq 0.18的化合物数量/个
桃仁	66	23
红花	189	22
熟地黄	76	2
赤芍	119	29
当归	125	2
川芎	189	7

表2 桃红四物汤部分有效化合物信息

编号	Mol ID	分子名称	OB/%	DL
TR3、HH8、DG1、SC9	MOL000358	β -谷甾醇(β -sitosterol)	36.91	0.75
HH17、SDH2、DG2、CS21	MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	43.83	0.76
SDH1、CS18、CX5	MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75

2.1.2 血管吻合相关作用靶点 经Genecards数据库获得334个靶基因,设置相关系数 \geq 4,最后得出240个疾病核心靶点。

2.1.3 桃红四物汤促进吻合血管存活核心靶点 将以上信息上传至微信生信平台绘制韦恩图(见图1),左为桃红四物汤核心靶点,右为血管吻合存活相关靶点,得出79个交集基因,即为桃红四物汤促进吻合血管存活的核心靶点。

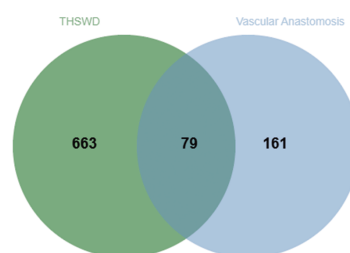


图1 桃红四物汤促进吻合血管存活核心靶点

2.1.4 PPI蛋白互作网络及核心靶点网络 基于STRING数据库构建桃红四物汤作用靶点的蛋白质互作网络,置信度阈值0.4,初始网络包含79个节点和915条相互作用边。通过Cytoscape 3.8.0软件对网络拓扑结构进行可视化分析,运用Centiscape 2.2插件计算节点中心性参数,设定筛选标准为: Closeness \geq 0.01、Betweenness \geq 61.70、Degree \geq 23.16。经多参数联合筛选获得22个核心靶点(198条互动边),网络拓扑学分析显示节点重要性与其颜色深度及面积大小呈正相关,提示这些靶点在促进血管再生中具有关键调控作用。(见图2)

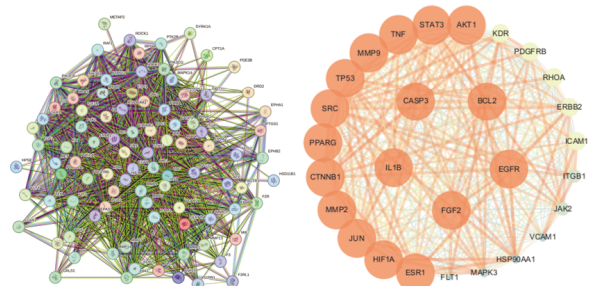


图2 PPI蛋白互作网络图以及核心靶点可视化图

2.1.5 GO功能注释及KEGG富集分析结果 GO功能富集分析显示,桃红四物汤促进吻合血管存活的核心靶点在生物过程中显著富集于炎症反应(inflammatory response)、细胞群体增殖的调控(regulation of cell population proliferation)、PI3K/Akt信号转导的正向调控(positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal transduction)、外源性刺激应答(response to xenobiotic stimulus)、细胞迁移的正向调控(positive regulation of cell migration),在细胞组分上显著富集于受体复合物(receptor complex)、细胞表面(cell surface)、质膜外侧(external side of plasma membrane)、胞外分泌体(extracellular exosome)、质膜(plasma membrane),分子功能主要富集于血小板衍生生长因子 β 受体活性(platelet-derived growth factor beta-receptor activity)、成纤维细胞生长因子受体活性(fibroblast growth factor receptor activity)、表皮生长因子受体活性(epidermal growth factor receptor activity)、血管内皮生长因子受体活性(vascular endothelial growth factor receptor activity)、跨膜ephrin受体活性(transmembrane-ephrin receptor activity)。(见图3)

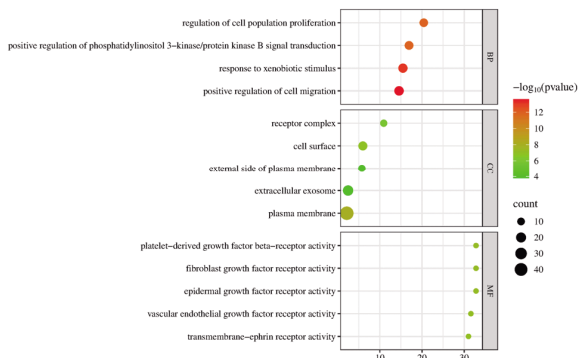


图3 桃红四物汤促吻合血管存活关键靶点 GO 功能注释富集分析

进一步通过KEGG通路富集分析发现,其作用机制与多条信号通路相关,根据富集基因数量、P值综合分析可得PI3K/Akt信号通路、TNF信号通路、cAMP信号通路、cGMP-PKG信号通路较为显著。(见图4)

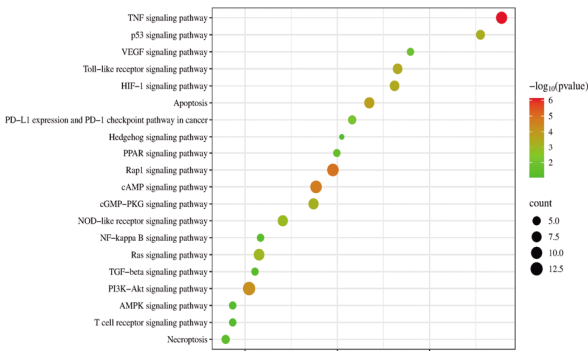


图4 桃红四物汤促吻合血管存活关键靶点 KEGG 通路富集分析

2.1.6 “疾病-靶点-有效成分-药物”网络 利用Cytoscape 3.10.0软件构建“疾病-靶点-有效成分-药物”网络(见图5),利用不同形状及颜色对不同类型节点进行标识,利用根据Network Analyze计算各节点度值,从高到低分别为木犀草素(luteolin, HH13)(度值16)、β-谷甾醇(beta-sitosterol, HH8)(度值15)、槲皮素(queracetin, HH16)(度值15)。

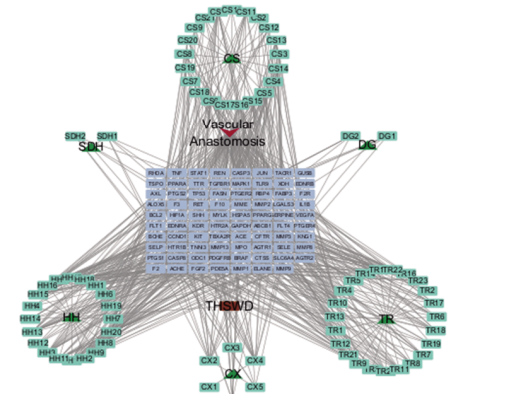


图5 “疾病-通路-靶点-有效成分-药物”网络

2.1.7 分子对接结果 查阅文献并结合前网络药理学结果^[9-10],将槲皮素(queracetin)、木犀草素(luteolin)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)和KEGG富集分析得到的PI3K/Akt通路相关蛋白进行分子对接,分子对接结合能见图6,分子对接图见图7。

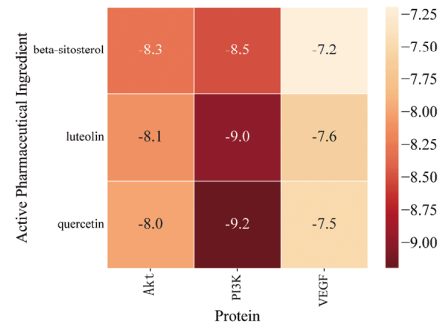


图6 PI3K/Akt 通路相关蛋白与部分活性成分结合能热图

2.2 动物实验结果

2.2.1 一般情况 造模后第1天开始记录大鼠尾部血管充盈时间,THSWD组与DW组术后第1天就达到峰值,并于第6天恢复正常,Control组与Sham组未进行血管吻合术,尾部血管充盈时间均值均无明显差异。(见图8)

造模成功大鼠第1~3天尾部轻度红肿,吻合区局部皮肤张力稍高;第8~15天吻合区皮肤颜色趋于正常,吻合区皮肤张力正常,尾部均无明显坏死、发紫、发黑等情况。

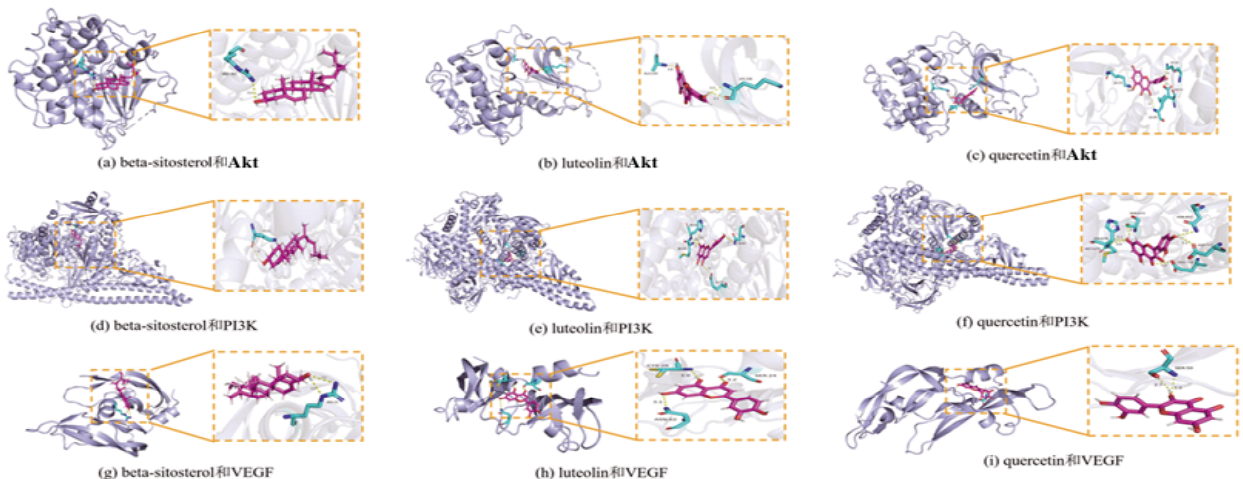


图7 PI3K/Akt 通路相关蛋白与部分活性成分分子对接

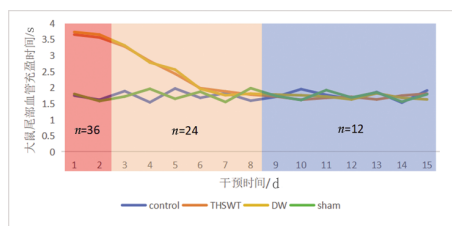


图8 大鼠尾部血管充盈时间变化折线图

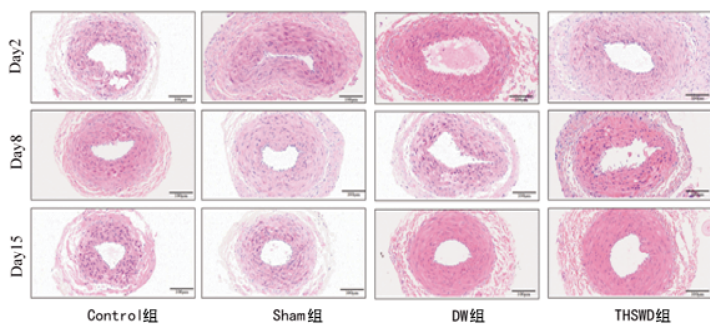
2.2.2 HE染色吻合血管病理改变以及内膜面积变化 各组大鼠尾部血管吻合处内膜面积均有不同程度的病理学改变。药物干预第2天,THSWD组血管内膜面积与其他组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);药物干预第8天,THSWD组血管内膜面积大于DW组、Sham组、Control组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);药物干预第15天,THSWD组血管内膜面积大于Sham组、Control组($P<0.01$),与DW组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图9)

2.2.3 桃红四物汤对大鼠吻合血管组织PI3K、Akt及VEGF蛋

白表达的影响 药物干预第2天、第8天,THSWD组VEGF、PI3K及Akt蛋白表达量均高于DW组、Control组和Sham组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);药物干预第15天,THSWD组PI3K、Akt蛋白表达量均高于DW组、Control组和Sham组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),VEGF蛋白表达量高于Control组和Sham组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图10)

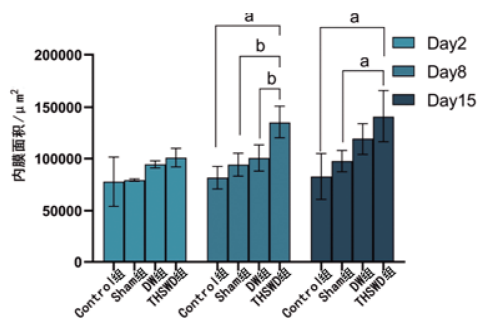
3 讨论

血管吻合术是断肢再植手术中的关键步骤,而吻合术后血管的存活是血管生物学中重要的病理生理过程,其核心机制及功能与血管再生相关通路存在显著重叠^[11-12]。血管吻合术与血管再生在分子网络层面深度偶联,这一偶联关系尤其体现在PI3K/Akt信号通路的枢纽性调控作用上。在吻合血管存活过程中,血管吻合术产生的机械牵张力通过整合素 $\beta 1$ 激活PI3K/Akt级联反应^[13]。一方面促进内皮细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)磷酸化增强NO生成,抑制血小板聚集及血栓形



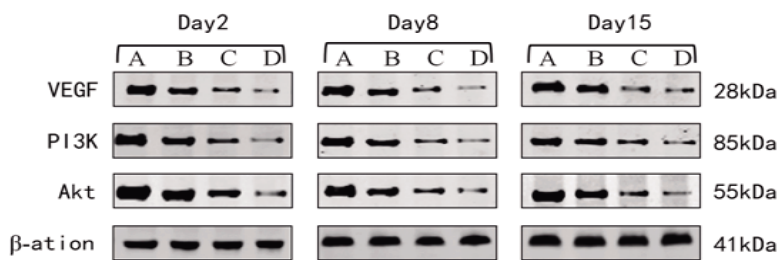
(a) 吻合血管HE染色切片($\times 200$)

注:与THSWD组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

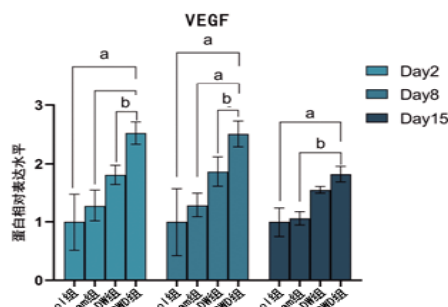


(b) 吻合血管内膜面积柱状图

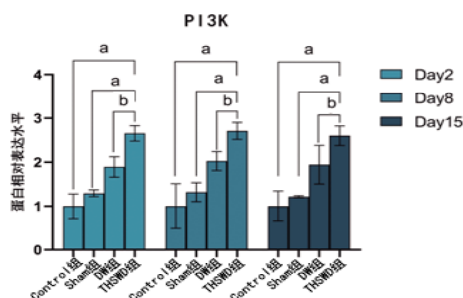
图9 大鼠吻合血管组织 HE 染色形态病理学改变



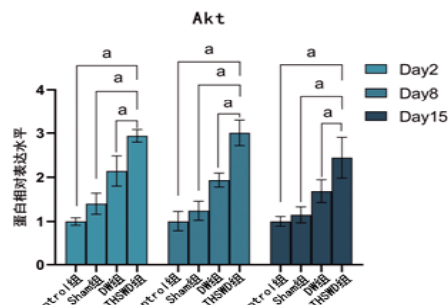
(a) VEGF、PI3K和Akt蛋白表达条带图



(b) VEGF蛋白相对表达量柱状图



(c) PI3K蛋白相对表达量柱状图



(d) Akt蛋白相对表达量柱状图

注:A.THSWD组,B.DW组,C.Sham组,D.Control组;与THSWD组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

图10 桃红四物汤对大鼠血管组织 VEGF、PI3K 和 Akt 蛋白表达的影响

成;另一方面通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTORC1)调控细胞周期进程,加速吻合口内皮层修复性增殖^[14]。值得注意的是,该通路 with 血管再生中的核心机制存在双向协同,Akt磷酸化可直接稳定缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)蛋白,放大VEGF自分泌效应,驱动内皮细胞顶端丝状伪足形成,促进管腔化进程^[15-16];同时通过抑制糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)活性解除 β -连环蛋白(β -catenin)降解,激活Wnt/ β -catenin通路,抑制细胞凋亡,实现血管再生与吻合修复的转录组协同^[17-18]。在细胞外基质层面,PI3K/Akt通路上调基质金属蛋白酶(MMP)-2/9表达的同时抑制组织金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1),精准调控基底膜降解、重塑平衡,既满足吻合术后血管适应性扩张的力学需求,又为血管新生提供迁移支架^[19]。上述研究不仅解释了两者在病理生理过程中的协同效应,更为论证桃红四物汤通过PI3K/Akt的促吻合血管修复疗法提供了理论依据。

血管吻合术作为现代创伤外科技术,其术后病理过程与中医学“血瘀气滞证”存在深刻的内在关联。从中医学理论视角,血管吻合术后属“金创”,直接损伤脉络导致血溢脉外而成离经之瘀血,《素问·缪刺论篇》“恶血留内”之论精准阐释了术后气血失和、瘀阻气滞的恶性循环,与《血证论》“气结则血凝”理论形成跨时空呼应。现代医学研究发现,术后血管内皮损伤激活凝血系统形成的高凝状态,与中医学“脉道涩滞”高度契合,而局部微循环障碍引发的组织缺氧,则与“瘀血不去,新血不生”的经典论述异曲同工^[20]。这种病理共鸣为中西医结合诊疗提供了理论支点,通过整合舌下络脉成像、微循环检测与血液流变学指标,构建“宏观辨证-微观辨靶”的多维模型,既传承中医气血理论精髓,又融合现代血管生物学进展,形成循证导向的术后康复路径^[21]。在经典方证对应层面,《医宗金鉴》桃红四物汤与术后血瘀证高度契合。该方针对“血离其经、瘀阻脉络”的核心病机,以桃仁、红花破瘀通络治标,当归、熟地黄滋阴养血固本,川芎、赤芍行气导滞调达气血,形成“通补兼施”的组方智慧。其配伍暗合《黄帝内经》“疏其血气”之旨:桃仁、红花直折瘀结以“血行肿消”,四物汤养血行气使“气畅血归”,既速祛瘀滞解急症,又顾护气血促新生,尤其契合术后气血骤伤、虚实夹杂的病候特征。现代研究证实,该方通过消瘀补虚双向调节,有效改善局部肿胀疼痛,促进新生血管形成,破解“瘀血阻滞生肌”的康复难题^[22-23]。临床应用可依据瘀血程度灵活化裁,既践行《血证论》“祛瘀为要”的治疗法则,又体现“异病同治”的辨证精髓——以破瘀为先导破除“干血”“死血”之患,辅以养血行气重建“血脉和利”之态,最终实现唐容川“瘀去新生”的终极治疗目标,彰显中医气血调和理论在现代外科康复中的独特价值。

本研究通过整合网络药理学、分子对接及动物实验验证,系统探讨了桃红四物汤促进吻合血管存活的分子机制及药效物质基础,揭示了其多成分、多靶点、多通路的协同作用特点。网络药理学部分通过TCMSP数据库筛选出64种有效活性成分,并发现 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、豆甾醇(stigmasterol)等植物甾醇类成分在多个药材中重复出现。通过对桃红四物汤与吻合血管存活的79个交集靶点进行PPT蛋白互作网络互

作,明确核心靶点主要集中在ACE、SERPINE1、IL-1 β 、PTGS2、MMP-9、TNF,随后GO及KEGG富集分析、“疾病-通路-靶点-有效成分-药物”网络可视化分析,笔者聚焦PI3K/Akt信号通路。因其核心调控血管内皮细胞存活、增殖、迁移、NO生成及血管生成,与吻合术后血管修复高度相关。在KEGG富集分析排除了泛癌通路及病理背景差异显著的病原体感染、慢性病,如AGE/RAGE等通路。虽然MAPK、Ras、HIF-1等通路也参与血管生成,但PI3K/Akt通路在直接调控促血管生成因子、强力抑制凋亡、并作为HIF-1的上游调控者方面作用更核心。因此,研究桃红四物汤调控PI3K/Akt通路,最能直接阐明其促进吻合血管内皮功能恢复以及吻合血管存活的分子机制。此外分子对接进一步验证了 β -谷甾醇、榭皮素、木犀草素与PI3K/Akt通路蛋白的强结合能力,提示其可能作为核心药效物质参与调控吻合血管再生。

本研究通过对大鼠吻合血管术后尾部情况观察发现,术后早期阶段,实验大鼠尾部血管为术后增生肿胀充血表现,毛细血管再充盈延迟1~2 s及组织肿胀度升高,符合急性创伤应激期炎症反应与内皮细胞功能增殖特征。值得注意的是,THSWD组在给药第8天即较DW组表现出显著的血管内膜修复效应,提示其可能通过早期抗炎调控加速血管再生。这一结果与HE染色观察到的病理演变趋势一致,进一步印证该方剂在创伤窗口期的治疗价值。第15天THSWD组与DW组HE染色比较,差异无统计学意义($P>0.05$),可能与术后自然修复进程或药物作用时效性相关。Western blotting结果显示,桃红四物汤能上调VEGF、PI3K及Akt蛋白表达,尤其在干预第2天即表现出显著差异,与KEGG富集分析及HE染色结果一致。同时通过研究结果笔者发现桃红四物汤干预吻合血管存活具有药物干预的时效性特征,至术后第15天,THSWD组与DW组血管内膜面积差异虽不显著,但VEGF、PI3K及Akt蛋白表达仍显著高于Control组,提示该方剂可能通过PI3K/Akt通路介导血管重塑的持续调节。该现象与临床吻合区皮肤张力恢复的时程特征一致,提示生物力学刺激与通路激活的时空偶联可能协同调控修复进程。Sham组与Control组检测指标始终无显著差异,有效排除手术操作对实验结果的潜在影响。

综上所述,本研究构建了桃红四物汤“疾病-通路-靶点-成分-药物”多维网络,揭示桃红四物汤通过促进PI3K/Akt信号轴相关蛋白促进吻合血管存活的系统机制。本研究仍有许多不足。首先,研究模型较为单一,结论仅基于大鼠体内实验,未通过体外血管损伤模型验证药物的直接作用。其次,机制解析深度不足:一方面,未检测PI3K/Akt通路下游关键磷酸化蛋白的激活状态,且未探索VEGF与Notch、Wnt/ β -catenin等通路的交互作用;另一方面,缺乏功能回复实验,如PI3K抑制剂阻断或VEGF受体拮抗,难以明确药物对靶通路的直接调控关系。未来的研究需构建体内加体外模型结合基因编辑技术明确活性成分的靶向性。

参考文献

[1] 吴文,梁志林,艾克白尔·吐逊.高能量创伤濒截肢肢体的保肢手术[J].中国骨科临床与基础研究杂志,2020,12

- (4):197-203.
- [2] WU J X, LEE J, JUNG J Y, et al. Less-suture vascular anastomosis: Development of alternative protocols with multifunctional self-wrapping, transparent, adhesive, and elastic biomaterials[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(36):e2301098.
- [3] 金成鹏.桃红四物汤对大鼠血管吻合模型Delta-like4表达及血管新生的影响[D].长沙:湖南中医药大学, 2018.
- [4] 彭志飞.桃红四物汤对大鼠血管吻合模型Notch3受体及VEC增殖影响的研究[D].长沙:湖南中医药大学, 2018.
- [5] 陈彦胜.桃红四物汤对大鼠显微吻合血管内皮修复及VEGF表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学, 2010.
- [6] ZHANG P, ZHANG D F, ZHOU W A, et al. Network pharmacology: Towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine[J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25(1):bbad518.
- [7] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309:116306.
- [8] 毋奥淳,蔡小平,魏征,等.基于整合药理学分子对接及实验验证探讨化痰解毒方调控PPAR γ /NF- κ B信号通路治疗肺癌的作用机制[J].*中医药导报*, 2025, 31(6):42-48.
- [9] 蔡伟良,蔡安烈.桃红四物汤治疗肾虚血瘀型绝经后骨质疏松症的基于网络药理学和分子对接技术的作用机制[J].*医学临床研究*, 2024, 41(9):1297-1300, 1304.
- [10] 罗长竹.运用网络药理学与分子对接分析桃红四物汤治疗冠心病稳定型心绞痛的机制[D].武汉:湖北中医药大学, 2024.
- [11] GAO Z H, YU Y M, DAI K, et al. Engineering neutrophil immunomodulatory hydrogels promoted angiogenesis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(35):39746-39758.
- [12] COXAM B, COLLINS R T, HU β MANN M, et al. Svp1 stabilises developmental vascular anastomosis in reduced flow conditions[J]. *Development*, 2022, 149(6):dev199858.
- [13] DENG S, LEONG H C, DATTA A, et al. PI3K/AKT signaling tips the balance of cytoskeletal forces for cancer progression[J]. *Cancers*, 2022, 14(7):1652.
- [14] PEI X L, ZHENG F X, LI Y, et al. Niclosamide ethanolamine salt alleviates idiopathic pulmonary fibrosis by modulating the PI3K-mTORC1 pathway[J]. *Cells*, 2022, 11(3):346.
- [15] CHEN H, NIO K, TANG H, et al. BMP9-ID1 signaling activates HIF-1 α and VEGFA expression to promote tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1475.
- [16] TANG A Q, ZHANG Y, WU L, et al. Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14:1180169.
- [17] PENG Y, CHI R, LIU G, et al. Aerobic exercise regulates apoptosis through the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway to improve cognitive impairment in Alzheimer's disease mice[J]. *Neural Plast*, 2022, 2022:1500710.
- [18] GHAFOURI-FARD S, BAHROUDI Z, SHOOREI H, et al. Disease-associated regulation of gene expression by resveratrol: Special focus on the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1):298.
- [19] ZHANG J, WANG J J, YUE K, et al. FAM83B promotes the invasion of primary lung adenocarcinoma via PI3K/AKT/NF- κ B pathway[J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1):32.
- [20] 赵国育,赵光辉,陈星,等.十七味归芍合剂治疗闭合性胫腓骨骨折术后气滞血瘀证临床观察[J].*中医药临床杂志*, 2025, 37(1):162-167.
- [21] 王晶,姜丽红,常天瀛,等.中医舌诊在冠心病中的应用进展[J].*实用心脑血管病杂志*, 2024, 32(3):99-102.
- [22] 卢粤霞,袁帅朋,张润顺.桃红四物汤现代临床应用及作用机制研究进展[J].*辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(10):77-82.
- [23] 苏登榜.桃红四物汤加减联合钢板螺钉内固定术治疗桡骨远端骨折(C型)的临床疗效观察[D].福州:福建中医药大学, 2023.

(收稿日期:2025-04-15 编辑:刘国华)