DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20260228.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.r.20260228.1403.004

基于巨噬细胞M2极化探讨四妙勇安汤改善糖尿病足溃疡愈合的机制研究

王 茜,刘 岐,王 烨,黄艳洪✉
(黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨 黑龙江 150040)

[摘要] **目的**:观察四妙勇安汤对信号素3C(semaphorin 3C,SEMA3C)/神经纤毛蛋白-2(neuropilin-2,NRP2)/Hedgehog通路介导的巨噬细胞M2极化及成纤维细胞功能的影响,从而阐明改善糖尿病足溃疡的分子机制。**方法**:采用高糖联合白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)诱导RAW264.7巨噬细胞建立体外糖尿病模型,并给予不同浓度四妙勇安汤含药血清干预。通过流式细胞术、ELISA、Western blot和RT-qPCR技术检测巨噬细胞M2极化标志物及SEMA3C/NRP2/Hedgehog通路关键分子表达。采用Transwell、CCK-8和Western blot法检测经巨噬细胞条件培养基处理的成纤维细胞迁移、增殖能力和细胞外基质相关蛋白的表达。**结果**:与模型组相比,四妙勇安汤含药血清显著提高了巨噬细胞CD206阳性率、Arg-1蛋白表达及IL-10分泌水平($P<0.01$),并剂量依赖性上调SEMA3C、NRP2和Gli1的mRNA和蛋白表达($P<0.01$)。此外,四妙勇安汤组条件培养基显著增强了成纤维细胞的增殖、迁移能力及α-SMA、Fibronectin、Laminin和MMP-2蛋白表达($P<0.01$)。**结论**:四妙勇安汤可能通过激活SEMA3C/NRP2/Hedgehog信号通路促进巨噬细胞M2极化,进而改善成纤维功能与细胞外基质重塑,从而加速糖尿病足溃疡愈合。

[关键词] 四妙勇安汤;糖尿病足溃疡;巨噬细胞极化;成纤维细胞;Hedgehog信号通路
[中图分类号] R259 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)21-1613-08

Mechanism of Simiao Yong'an Decoction in Improving Diabetic Foot Ulcer Healing by Promoting Macrophage M2 Polarization

WANG Qian, LIU Qi, WANG Ye, HUANG Yanhong✉
(*The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin* 150040, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Scientific Research Project of Traditional Chinese Medicine in Heilongjiang Province* (*ZHY*2024-241)
[*Author*]: *WANG Qian, Ph.D., E-mail*: 575669668@qq.com.
[*Correspondence to*]: *HUANG Yanhong, E-mail*: *moneymoremore*@126.com.
Received: 2025-11-20 *Revised*: 2026-02-05 *JHMU*, 2026;32(21):1613-1620

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the effects of Simiao Yong'an Decoction (SYD), which is a classic formula for promoting blood circulation and clearing heat, on macrophage M2 polarization mediated by the SEMA3C/NRP2/Hedgehog pathway and fibroblast function, thereby elucidating its molecular mechanism in improving diabetic foot ulcer (DFU). **Methods**: An in vitro diabetic model was established by inducing RAW264.7 macrophages with high glucose and interleukin-4 (IL-4), which were then treated with different concentrations of SYD-containing serum. The expression of M2 polarization markers and key molecules of the SEMA3C/NRP2/Hedgehog pathway was detected using flow cytometry, ELISA, Western blot, and RT-qPCR. The migration, proliferation, and extracellular matrix-related protein expression of fibroblasts treated with macrophage-conditioned medium were assessed using Transwell, CCK-8, and Western blot assays. **Results**: Compared with the model group, SYD-containing serum significantly increased the CD206-positive rate, Arg-1 protein expression, and IL-10 secretion level in macrophages ($P<$

[基金项目] 黑龙江省中医药科研项目(ZHY2024-241)
[作者简介] 王茜,博士,E-mail: 575669668@qq.com。
[通讯作者] 黄艳洪,E-mail: moneymoremore@126.com。
[收稿日期] 2025-11-20 [修回日期] 2026-02-05 网络出版时间:2026-02-28 16:54:52

0.01), and dose-dependently upregulated the mRNA and protein expression of SEMA3C, NRP2, and Gli1 ($P<0.01$). Furthermore, the conditioned medium from the SYD group significantly enhanced the proliferation and migration abilities of fibroblasts, which were accompanied by increased expression of α-SMA, Fibronectin, Laminin, and MMP-2 proteins ($P<0.01$). **Conclusion**: SYD may accelerate DFU healing by activating the SEMA3C/NRP2/Hedgehog signaling pathway, which promotes macrophage M2 polarization and subsequently improves fibroblast function and extracellular matrix remodeling.

[**Key words**] Simiao Yong'an decoction; Diabetic foot ulcer; Macrophage polarization; Fibroblasts; Hedgehog signaling pathway

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer,DFU)是糖尿病最严重和治疗成本最高的并发症之一,其病理特征主要表现为慢性炎症反应、组织修复功能障碍以及迁延不愈的皮肤缺损[1]。据统计,DFU已成为糖尿病患者住院的首要原因,全球成人糖尿病患者DFU的患病率高达6.3%,不仅严重影响患者的生活质量,还给全球医疗系统带来沉重的经济负担[2]。DFU的核心病理基础包括周围神经病变、缺血性血管病变和免疫功能异常,使得伤口微环境长期处于慢性炎症状态,难以顺利进入增殖期和重塑期,最终导致组织的进行性损伤和溃疡的持续性不愈,形成恶性循环[3]。

在伤口愈合的复杂过程中,巨噬细胞发挥着至关重要的免疫调控作用[4]。巨噬细胞具备高度可塑性,在不同的微环境刺激下可分化为不同表型[5]。其中M1型巨噬细胞通过分泌促炎因子,加剧炎症反应;而M2型巨噬细胞则通过分泌抗炎因子如白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)和转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β),促进血管生成、细胞增殖和细胞外基质重建,是推动伤口从炎症期向增殖期过渡的关键调节者。在糖尿病高糖病理环境下,巨噬细胞极化表现出明显的功能失衡,M1型表型过度活化而M2型极化受阻,导致伤口局部持续处于炎症状态,组织修复程序无法正常启动,最终造成慢性难愈性伤口的形成[6,7]。

四妙勇安汤是中医治疗脱疽的经典名方,源自《验方新编》,具有解毒清热、活血滋阴之功效。临床实践表明该方能有效改善DFU临床症状,促进溃疡愈合,然而机制尚不明确[8-11]。基于此,本研究通过观察四妙勇安汤对信号素3C(semaphorin 3C,SEMA3C)/神经纤毛蛋白-2(neuropilin-2,NRP2)/Hedgehog通路介导的巨噬细胞M2极化及成纤维细胞功能的影响,从而阐明改善糖尿病足溃疡的分子机制,为其临床推广应用提供坚实的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系(RAW264.7)和小鼠成纤维细胞系(PA317)均购于上海瑾原生物科技有限公司(货号分别为JY302和JY435)。细胞均采用含青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μg/mL)与10%胎牛血清的杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)培养基,于37 ℃、含5%CO_2及饱和湿度的培养箱中进行常规培养。取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2 动物

SPF级健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠20只(体重180~220 g)购自于赛业(固安)生物技术有限公司【动物生产许可证号:SCXK(冀)2021-003】。所有大鼠在SPF级动物房中适应性饲养1周,室温维持在22~25 ℃,自由摄食饮水,明暗交替周期为12 h。动物实验操作遵循国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.3 试剂

四妙勇安汤(组成金银花30 g、玄参30 g、当归10 g和甘草5 g)饮片购自北京同仁堂药业有限公司。以上加水煎煮两次,合并滤液,浓缩至生药浓度为2 g/mL浓缩液备用。胎牛血清(SH30084.03)与DMEM低糖培养基(SH30021.01)购自美国Hyclone公司;Trypsin-EDTA Solution(T1300)与双抗溶液(P1400)购自北京索莱宝科技有限公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)(CK04)购自日本同仁化学研究所;Transwell小室(3422)购自美国Corning公司;小鼠IL-10检测试剂盒(EMC005.96)购自上海酶联生物科技有限公司;藻红蛋白(Phycoerythrin,PE)标记的小鼠抗CD206抗体(141706)购自美国BioLegend公司。兔源SEMA3C(ab236469)、NRP2(ab185710)、胶质瘤相关癌基因同源蛋白1(glioma-associated oncogene homolog 1,Gli1)(ab49314)、精氨酸酶-1(arginase-1,Arg-1)(ab91279)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)(ab124964)、Fibronectin(ab2413)、Laminin(ab11575)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2)(ab92536)及内参β-actin(ab8227)一抗均购自美国Abcam公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗

兔二抗(A0208)、RIPA裂解液(P0013B)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(P0012A)及ECL化学发光液(P0018)均购自碧云天生物技术有限公司;TRIzol试剂(9109)、PrimeScript RT reagent Kit(RR037A)和SYBR Premix Ex Taq Ⅱ(RR820A)则购自日本TaKaRa公司。

1.4 含药血清制备

将20只SD大鼠随机分为2组:空白组(n=10)和四妙勇安汤组(n=10)。四妙勇安汤组大鼠按20 g/kg/d(按生药量计)的剂量灌胃,空白组灌胃等体积的蒸馏水,2次/d,连续7 d。在末次灌胃结束后1 h,通过腹主动脉采血,静置后通过离心分离得血清。分离后的血清经水浴灭活(56 ℃、30 min),以微孔滤膜(0.22 μm)过滤除菌后进行分装。

四妙勇安汤含药血清使用时稀释至10%,低、中、高剂量组分别含1%、5%、10%有效药物浓度。具体配置方法为:低剂量组取0.1 mL含药血清加9.9 mL培养基,中剂量组取0.5 mL含药血清加9.5 mL培养基,高剂量组取1 mL含药血清加9 mL培养基,确保各组血清浓度一致。

1.5 细胞分组与干预

1.5.1 巨噬细胞M2极化模型建立与分组 采用25 mmol/L的葡萄糖联合20 ng/mL的IL-4构建体外糖尿病M2极化模型。将细胞分为以下6组:(1)空白组:正常培养基培养+10%空白血清;(2)模型组:正常培养基+25 mmol/L葡萄糖+20 ng/mL IL-4培养+10%空白血清;(3)四妙勇安汤低剂量组:正常培养基+25 mmol/L葡萄糖+20 ng/mL IL-4+10%四妙勇安汤含药血清(含1%有效药物浓度);(4)四妙勇安汤中剂量组:正常培养基+25 mmol/L葡萄糖+20 ng/mL IL-4+10%四妙勇安汤含药血清(含5%有效药物浓度);(5)四妙勇安汤高剂量组:正常培养基+25 mmol/L葡萄糖+20 ng/mL IL-4+10%四妙勇安汤含药血清(含10%有效药物浓度);(6)SEMA3C组:正常培养基+25 mmol/L葡萄糖+20 ng/mL IL-4+100 ng/mL SEMA3C重组蛋白。各组均干预24 h后收集细胞及上清液进行检测。

1.5.2 成纤维细胞-巨噬细胞条件培养基共培养体系 收集上述各干预组巨噬细胞的条件培养基。将PA317成纤维细胞分为相应组别,分别用50%的各组条件培养基与50%新鲜DMEM培养基的混合培养基培养24 h,用于后续检测成纤维细胞功能。

1.6 指标检测

1.6.1 流式细胞术检测M2型巨噬细胞比例 收集各组RAW264.7细胞,用PBS重悬,加入PE标记的抗小鼠CD206抗体或同型对照抗体,避光孵育30 min。PBS洗涤后,上流式细胞仪进行检测,使用FlowJo V10软件分析CD206阳性细胞百分比。

1.6.2 酶联免疫吸附试验检测IL-10分泌水平 收集细胞上清,于酶标仪450 nm波长下测定OD值,随后依据标准曲线计算样本IL-10的浓度。实验步骤严格参照ELISA试剂盒说明书。

1.6.3 Western blot检测蛋白表达 提取各组细胞的总蛋白,使用BCA法测定蛋白的浓度。取等量蛋白进行SDS-PAGE电泳,转膜至PVDF膜。5%脱脂牛奶封闭后,分别加入SEMA3C、NRP2、Gli1、Arg-1、α-SMA、Fibronectin、Laminin、MMP-2及β-actin一抗,4 ℃孵育过夜。采用TBST洗涤,随后加入HRP标记的二抗,于室温环境下继续孵育1 h。使用ECL化学发光液显影,并通过Image J软件分析条带的灰度值,以目的蛋白与β-actin的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.6.4 RT-qPCR检测mRNA表达 采用TRIzol法提取细胞内总RNA,随后测定浓度与纯度。按试剂盒说明书,将1 μg RNA反转录为cDNA。以cDNA为模板,使用SYBR Green法进行实时荧光定量PCR。反应体系为20 μL。反应条件:95 ℃预变性30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,总共40个循环。采用GAPDH作为内参基因,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标基因(*SEMA3C*、*NRP2*、*Gli1*)mRNA的相对表达量。实验中引物序列见表1。

1.6.5 CCK8实验检测细胞增殖活力 将PA317细胞以每孔5×10^3个接种于96孔板中,按1.5.2方

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列	产物长度
SEMA3C	F:5′-TGACACAATGCCGAGGGTTC-3′ R:5′-CTGTGGAGACTTGGGAGCAC-3′	113 bp
NRP2	F:5′-TGGCTTCTCCGCACGTTACT-3′ R:5′-CATGGTTAGGAAGCGCAGGT-3′	241 bp
Gli1	F:5′-CTTGGAGAAGCCGAACCGAG-3′ R:5′-TAGGGTGGTGGGGATCGAAG-3′	186 bp
GAPDH	F:5′-CTGGAAAGCTGTGGCGTGAT-3′ R:5′-TTCCCGTTCAGCTCTGGGAT-3′	106 bp

法干预培养。每孔加入10 μL CCK-8溶液，继续培养2 h后，使用酶标仪于450 nm波长处测定各孔的吸光度。根据OD值的高低反映细胞增殖活性。

1.6.6　Transwell实验检测细胞迁移能力　将消化重悬后的PA317细胞接种于Transwell上室（200 μL，含5×10^4个细胞），下室中加入500 μL含有10% FBS的DMEM培养基。细胞培养24 h后，使用棉签轻轻擦去上室中未迁移的细胞。随后，用4%多聚甲醛溶液固定，并以0.1%结晶紫溶液染色。在显微镜下随机选取5个视野，统计迁移的细胞数，计算其平均值。

1.7　统计学处理

应用SPSS 26.0统计软件处理结果，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用LSD法。所有细胞实验每组设置3个复孔。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组巨噬细胞M2极化的比较

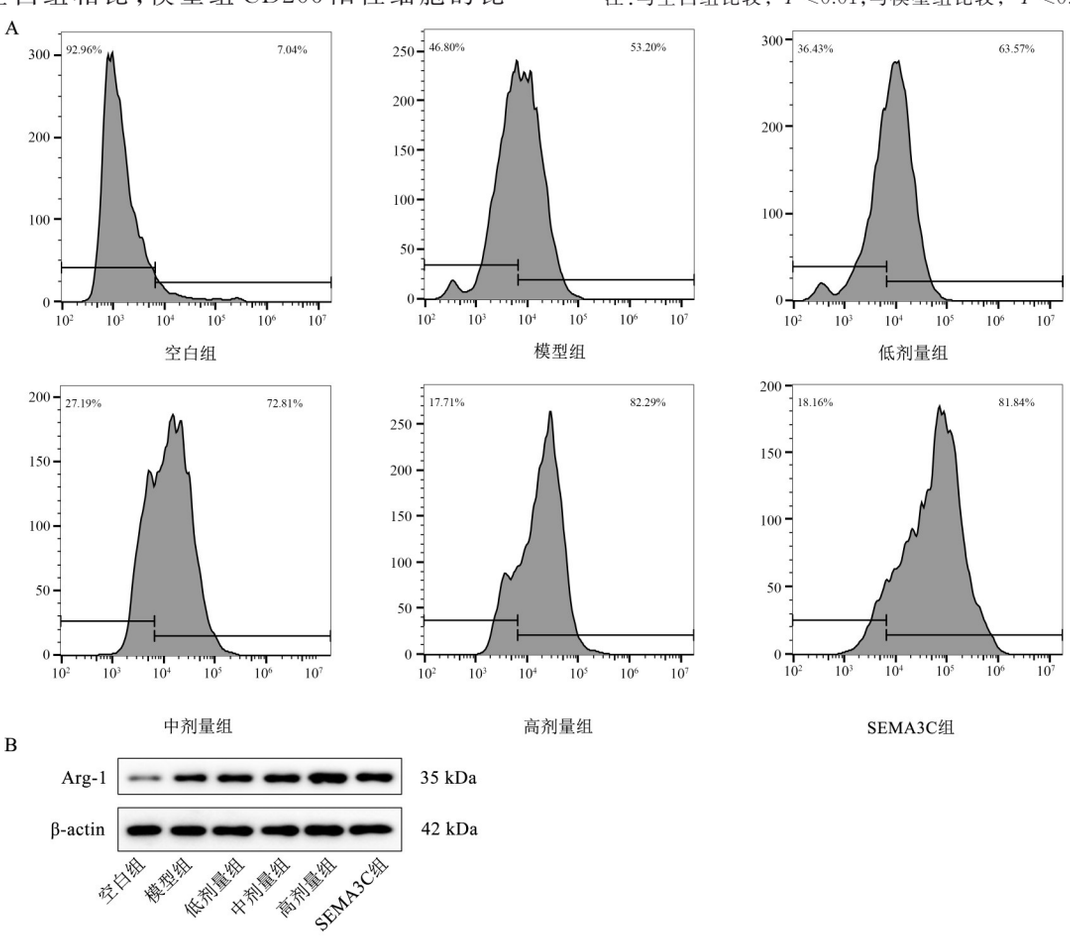
与空白组相比，模型组CD206阳性细胞的比例、Arg-1蛋白表达与上清中IL-10的浓度均显著增加，差异有统计学意义（$P<0.01$）。相较于模型组，四妙勇安汤低、中、高剂量和SEMA3C组巨噬细胞CD206阳性细胞的比例、Arg-1蛋白表达和IL-10的浓度进一步增加，且差异均有统计学意义（$P<0.01$）。见表2和图1。

表2　各组巨噬细胞M2极化的比较（n=3，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Comparison of M2 polarization of macrophages among groups（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	CD206（%）	Arg-1/β-actin	IL-10（pg/mL）
空白组	7.77±0.66	0.18±0.03	85.01±2.52
模型组	55.51±2.15**	0.40±0.03**	363.31±8.68**
低剂量组	64.41±1.02##	0.53±0.02##	578.10±13.26##
中剂量组	72.31±1.10##	0.65±0.04##	698.40±11.74##
高剂量组	85.58±1.40##	0.82±0.04##	917.83±8.44##
SEMA3C组	81.71±1.25##	0.74±0.04##	879.38±19.34##
F值	1 310.761	154.441	2 182.464
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，##$P<0.01$。



A. 流式细胞术检测巨噬细胞CD206的表达；B. Western blot检测巨噬细胞Arg-1蛋白的表达

图1　各组巨噬细胞CD206与Arg-1蛋白表达的比较

Fig 1　Comparison of CD206 and Arg-1 protein expression levels in macrophages among groups

2.2 各组巨噬细胞SEMA3C/NRP2/Hedgehog信号通路的比较

与空白组相比，模型组巨噬细胞中SEMA3C、NRP2和Gli1蛋白和mRNA的表达未见明显变化，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与模型组相比，四妙勇安汤低、中、高剂量组巨噬细胞中SEMA3C、NRP2和Gli1蛋白和mRNA的表达均明显上调，SEMA3C组巨噬细胞中SEMA3C表达明显下降，NRP2和Gli1蛋白和mRNA的表达均明显上调，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见表3、4及图2。

表3 各组巨噬细胞SEMA3C、NRP2和Gli1蛋白表达的比较（$n=3,\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Comparison of SEMA3C, NRP2, and Gli1 protein expression levels in macrophages among groups（$n=3,\bar{x}\pm s$）

组别	SEMA3C/β-actin	NRP2/β-actin	Gli1/β-actin
空白组	0.21±0.04	0.21±0.01	0.18±0.06
模型组	0.23±0.03	0.20±0.03	0.19±0.03
低剂量组	0.42±0.03##	0.42±0.03##	0.47±0.04##
中剂量组	0.66±0.06##	0.64±0.05##	0.59±0.07##
高剂量组	0.79±0.05##	0.85±0.02##	0.84±0.04##
SEMA3C组	0.78±0.09##	0.86±0.10##	0.84±0.06##
*F*值	69.426	110.436	101.691
*P*值	<0.001	<0.001	<0.001

注：与模型组比较，##$P<0.01$。

表4 各组巨噬细胞*SEMA3C*、*NRP2*和*Gli1* mRNA表达的比较（$n=3,\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Comparison of SEMA3C, NRP2, and Gli1 mRNA expression levels in macrophages among groups（$n=3,\bar{x}\pm s$）

组别	*SEMA3C* mRNA	*NRP2* mRNA	*Gli1* mRNA
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.00±0.03	1.08±0.14	1.01±0.14
低剂量组	1.84±0.03##	2.02±0.21##	1.84±0.15##
中剂量组	2.66±0.19##	3.41±0.27##	2.79±0.15##
高剂量组	3.44±0.32##	4.03±0.07##	3.35±0.23##
SEMA3C组	0.98±0.09	4.01±0.13##	3.38±0.11##
*F*值	130.793	226.338	168.210
*P*值	<0.001	<0.001	<0.001

注：与模型组比较，##$P<0.01$。

2.3 各组成纤维细胞增殖和迁移的比较

与空白组相比较，模型组中成纤维细胞的活性明显增强，差异有统计学意义（$P<0.05$）。相较于模型组，四妙勇安汤中、高剂量组及SEMA3C组中成纤维细胞的活性进一步增强，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。此外，与空白组相比较，模型组在成纤维细胞的迁移的数量与α-SMA蛋白的表达表现出明显增加，且差异有统计学意义（$P<0.01$）。进一步对比发现，四妙勇安汤低、中、高剂量组及SEMA3C组中成纤维细胞的迁移数量与α-SMA蛋白的表达水平均明显高于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。见表5和图3。

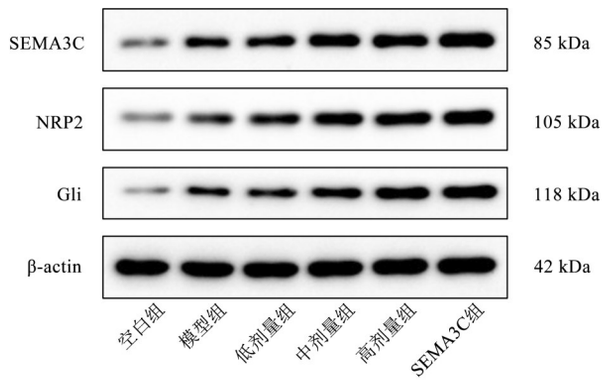


图2 各组巨噬细胞SEMA3C、NRP2和Gli1蛋白表达的比较

Fig 2 Comparison of SEMA3C, NRP2, and Gli1 protein expression in macrophages among groups

表5 各组成纤维细胞增殖、迁移和α-SMA表达的比较（$n=3,\bar{x}\pm s$）

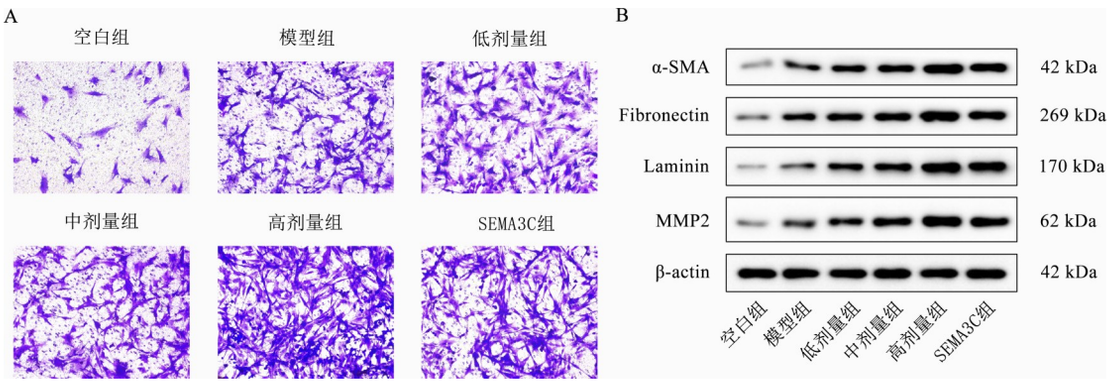
Table 5 Comparison of fibroblast proliferation, migration, and α-SMA expression among groups（$n=3,\bar{x}\pm s$）

组别	OD (450 nm)	迁移个数	α-SMA/β-actin
空白组	0.27±0.02	19.00±4.00	0.24±0.03
模型组	0.45±0.08*	59.67±5.13**	0.41±0.05**
低剂量组	0.53±0.09	79.67±7.02##	0.55±0.03##
中剂量组	0.65±0.06#	110.33±12.50##	0.67±0.07##
高剂量组	0.82±0.12##	145.67±7.24##	0.79±0.06##
SEMA3C组	0.77±0.14##	134.33±7.24##	0.74±0.03##
*F*值	14.631	119.766	51.910
*P*值	<0.001	<0.001	<0.001

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

2.4 各组成纤维细胞Fibronectin、Laminin和MMP-2蛋白表达的比较

与空白组相比，模型组成纤维细胞Fibronectin、Laminin和MMP-2蛋白的表达水平明显上调，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组比较，四妙勇安汤低、中、高剂量和SEMA3C组成纤维细胞Fi-



A. Transwell小室检测成纤维细胞迁移水平(结晶紫染色×100);B. Western blot检测成纤维细胞α-SMA、Fibronectin、Laminin和MMP-2蛋白的表达

图3 各组成纤维细胞迁移和α-SMA、Fibronectin、Laminin和MMP-2蛋白表达的比较

Fig 3 Comparison of fibroblast migration and protein expression of α-SMA, Fibronectin, Laminin, and MMP-2 among groups

bronectin、Laminin和MMP-2蛋白的表达水平明显上调,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见表6和图3。

表6 各组成纤维细胞Fibronectin、Laminin和MMP-2蛋白表达的比较($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab 6 Comparison of Fibronectin, Laminin, and MMP-2 protein expression levels in fibroblasts among groups($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	Fibronectin/β-actin	Laminin/β-actin	MMP2/β-actin
空白组	0.12±0.04	0.14±0.01	0.12±0.01
模型组	0.34±0.03**	0.33±0.02**	0.35±0.05**
低剂量组	0.45±0.03##	0.46±0.01##	0.42±0.09##
中剂量组	0.53±0.05##	0.58±0.04##	0.53±0.09##
高剂量组	0.84±0.06##	0.82±0.18##	0.80±0.12##
SEMA3C组	0.72±0.05##	0.82±0.12##	0.76±0.09##
F	100.949	28.023	27.952
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,**$P<0.01$;与模型组比较,##$P<0.01$。

3 讨论

巨噬细胞的M2型极化通过表达特定分子标志在糖尿病足溃疡伤口愈合中发挥重要的作用。CD206是一种C型凝集素受体,主要在M2型巨噬细胞表面高表达,通过识别并结合病原体表面的甘露糖和岩藻糖残基,参与病原体的吞噬和清除[12]。Arg-1是M2型巨噬细胞的关键代谢酶,催化精氨酸分解为鸟氨酸和尿素,促进细胞增殖和胶原合成,加速组织修复和纤维化过程[13]。此外,Arg-1的高表达抑制了炎症性NO的产生,从而减轻炎症反应。IL-10是一种重要的抗炎细胞因子,主要由M2型巨噬细胞分泌。IL-10通过抑制炎症反应,促进组织微环境向抗炎和修复方向转变[14]。本研究证实,在模拟糖尿病高糖微环境的模型中,通过外源性IL-4可诱导巨噬细胞的M2极化。四妙勇安汤含药血清能剂量依赖性地显著增加CD206阳性率、Arg-1表达和IL-10的分泌,从而进一步促进巨噬细胞的M2极化。

SEMA3C是一种分泌型蛋白,通过与NRP2结合,激活下游信号通路[15]。NRP2作为SEMA3C的受体,由胞外区、跨膜区和胞内区组成[16]。SEMA3C/NRP2的相互作用进一步激活了Hedgehog信号通路[17]。Gli1是一种锌指转录因子,包含N端的DNA结合结构域和C端的转录激活结构域。Gli1通过结合靶基因启动子区域的Gli结合位点,调控M2极化相关的基因转录[18]。本研究证实,外源性添加SEMA3C重组蛋白能够明显诱导巨噬细胞向M2型极化;而四妙勇安汤能够显著上调巨噬细胞中SEMA3C及其受体NRP2的表达,同时激活Hedgehog信号通路下游的关键转录因子Gli1。

伤口愈合作为一个高度协调的动态过程,其中基质细胞与免疫细胞间的交互作用至关重要[19]。在这一过程中,成纤维细胞作为核心的效应细胞,其大量增殖并迁移至伤口处,合成并分泌细胞外基质,为组织修复提供结构支架,是伤口愈合得以进行的细胞学基础。α-SMA作为肌成纤维细胞的标志性结构蛋白,其表达上调标志着成纤维细胞向具有收缩表型的肌成纤维细胞转分化,从而著增强了细胞的收缩能力,进而促进肉芽组织收缩和细胞外基质重塑[20]。Fibronectin是细胞外基质中的重要组

成部分，通过为细胞提供黏附支架，并介导细胞与基质间的信号传导，对肉芽组织的形成和稳定起着关键作用[21]。Laminin是基底膜的主要构成成分，对于上皮细胞的铺展、定向和最终的上皮化过程具有决定性影响[22]。同时，MMP-2作为一种重要的蛋白水解酶，通过精准降解受损或多余的细胞外基质成分，参与细胞外基质的重塑与更新[23]。本研究结果证实，四妙勇安汤能够通过巨噬细胞M2型极化，从而促进成纤维护细胞的增殖活性与迁移能力，并调控细胞外基质的合成与重塑。

DFU归属于中医“脱疽”、“消渴坏疽”范畴，其病机核心为“阴虚为本，瘀热为标”。消渴日久，耗伤阴液，致阴虚血少，血液凝滞，络脉瘀阻，四肢失养；加之瘀久化热或外感毒邪，热毒壅盛，肉腐成脓，发为溃烂。四妙勇安汤以金银花为君药，重用至三两，力专效宏，旨在清热解毒、疏散风热，其功擅清解深入营血之热毒，为治疗疮疡肿毒之要药，直接针对DFU“热毒为标”之病机，以消除腐肉。臣以玄参，既能辅助君药增强清热凉血解毒之力，又能滋阴润燥、软坚散结，针对阴虚燥热之本。佐以当归，具有活血化瘀、补血和营。甘草作为使药，一方面能清热解毒，助君臣药力；另一方面更能调和诸药，缓和金银花、玄参之寒凉特性，防止过寒伤中，并引导药效直达病所，使整个方剂协同作用更为平和持久。全方共奏清热解毒、活血滋阴之效。

综上所述，四妙勇安汤可能通过激活巨噬细胞中的SEMA3C/NRP2/ Hedgehog信号通路，促进其向修复性M2表型极化，进而通过改善伤口免疫微环境，增强成纤维细胞的增殖、迁移及细胞外基质合成与重塑功能，从而协同促进糖尿病足溃疡的愈合。这些发现不仅为四妙勇安汤的临床应用提供了详实的药理学依据，也为深入理解中医药调控组织修复的分子机制提供了新的思路。

作者贡献度说明：

王茜：研究设计、论文撰写；刘岐，王烨：实验操作；黄艳洪：数据分析、论文修订。

所有作者声明无利益冲突。

参考文献

1 Wang J, Yang X, Zhou T, et al. Understanding risk factors and prognosis in diabetic foot ulcers[J]. Open Life Sci, 2025, 20(1):20251137.

2 McDermott K, Fang M, Boulton AJM, et al. Etiology, epidemiology, and disparities in the burden of diabetic foot ulcers[J]. Diabetes Care, 2023,46 (1): 209-221.

3 Wang J, Yang X, Zhou T, et al. Microenvironment of diabetic foot ulcers: Implications for healing and therapeutic strategies[J]. J Res Med Sci, 2025, 30:19.

4 王继雪，杨稀瑞，周涛，等.基于miR-155/FGF7通路介导的巨噬细胞极化探讨顾步汤改善糖尿病足溃疡的分子机制[J].海南医科大学学报，2025，31(21)：1621-1629.
Wang JX, Yang XR, Zhou T, et al. Molecular mechanism of Gubu Decoction in improving diabetic foot ulcers based on miR‐155/FGF7 pathway‐mediated macrophage polarization [J]. J Hainan Med Univ, 2025, 31(21):1621-1629.

5 马玉龙，李亚龙，胡晓霞，等.糖尿病足溃疡巨噬细胞极化机制及其靶向治疗[J].中华医院感染学杂志，2025，35(09)：1429-1434.
Ma YL, Li YL, Hu XX, et al. Mechanism of macrophage polarization and its targeted therapy in diabetic foot ulcers [J]. Chin J Nosocomiol, 2025, 35 (9): 1429-1434.

6 杨俏丽，程亚清，牛少辉，等.从巨噬细胞极化探讨“瘀血不去，新血难生”理论在糖尿病足溃疡愈合中的临床应用价值[J].环球中医药，2024，17(11)：2286-2289.
Yang QL, Cheng YQ, Niu SH, et al. Exploring the clinical application value of the theory "if stagnant blood is not removed, new blood cannot be generated" in the healing of diabetic foot ulcers from the perspective of macrophage polarization [J]. Glob Tradit Chin Med, 2024, 17(11): 286-289.

7 李恒，张翠兰，段钰泽.CD137-CD137配体通路调控巨噬细胞表型转化影响糖尿病足溃疡创面愈合的研究[J].中国糖尿病杂志，2025，33(8)：610-616.
Li H, Zhang CL, Duan YZ. Study on the CD137‐CD137 ligand pathway regulating macrophage phenotype transformation and affecting wound healing in diabetic foot ulcers [J]. Chin J Diabetes, 2025, 33(8): 610-616.

8 李沛璘，陈笑吟，鲍新坤.四妙勇安汤治疗糖尿病足溃疡的研究进展[J].实用临床医药杂志，2025，29(13)：132-136.
Li PL, Chen XY, Bao XK. Research progress on Simiao Yong′an Decoction in the treatment of diabetic foot ulcers [J]. J Clin Med Pract, 2025, 29(13): 132-136.

9 张峰，张舟.四妙勇安汤辅助治疗湿热毒盛型糖尿病足溃疡效果观察[J].中国乡村医药，2024，31(9)：8-10.
Zhang F, Zhang Z. Observation on the effect of Simiao Yong′an Decoction as adjuvant therapy for diabetic foot ulcers of damp-heat toxin excess type [J]. Chin J Rural Med Pharm, 2024, 31(9): 8-10.

10 蔡祎晴，王晨璐，刘雪寒，等.四妙勇安汤在消渴病脱

疽中的应用探析[J].中华中医药杂志，2024，39(2)：618-621.
Cai YQ，Wang CL，Liu XH，et al. Analysis of the application of Simiao Yong′an Decoction in gangrene resulting from consumptive thirst [J]. China J Tradit Chin Med Pharm，2024，39(2)：618-621.

11 李晨阳，赵钢，李欣然，等.穴位注射结合四妙勇安汤辅助治疗糖尿病足溃疡临床效果观察[J].中国中西医结合外科杂志，2024，30(1)：18-23.
Li CY，Zhao G，Li XR，et al. Clinical observation on acupoint injection combined with Simiao Yong′an Decoction as adjuvant therapy for diabetic foot ulcers [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med，2024，30(1)：18-23.

12 崔昭，束雅婷，雷凡，等.柴胡皂苷A通过调控NF-κB和STAT6信号通路影响M1/M2型巨噬细胞的分化和功能[J].陆军军医大学学报，2025，47(18)：2197-2210.
Cui Z，Shu YT，Lei F，et al. Saikosaponin A affects the differentiation and function of M1/M2 macrophages by regulating NF-κB and STAT6 signaling pathways [J]. J Army Med Univ，2025，47(18)：2197-2210.

13 孙志东，高佳炜，杨柳欣，等.基于miR-495/FTO通路介导的巨噬细胞极化探讨芪参汤改善胰岛素抵抗治疗2型糖尿病的分子机制[J].海南医学院学报，2023，29(14)：1075-1081.
Sun ZD，Gao JW，Yang LX，et al. Molecular mechanism of Qishen Decoction in improving insulin resistance for type 2 diabetes mellitus based on miR-495/FTO pathway-mediated macrophage polarization [J]. J Hainan Med Univ，2023，29(14)：1075-1081.

14 何水净，丛妍，何秀，等.Raf/MEK/ERK及Ca^{2+}/CaN信号通路在双酚A影响巨噬细胞分泌IL-10中的作用[J].沈阳医学院学报，2023，25(6)：582-587＋597.
He SJ，Cong Y，He X，et al. Role of Raf/MEK/ERK and Ca^{2+}/CaN signaling pathways in bisphenol A affecting IL-10 secretion in macrophages [J]. J Shenyang Med Coll，2023，25(6)：582-587，597.

15 Zhang Y，Zuo A，Ba Y，et al. Cancer-associated fibroblast-derived SEMA3C facilitates colorectal cancer liver metastasis via NRP2-mediated MAPK activation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2025，122(21)：e2423077122.

16 Tsai YC，Kuo MC，Huang JC，et al. Single-cell transcriptomic profiles in the pathophysiology within the microenvironment of early diabetic kidney disease [J]. Cell Death Dis，2023，14(7)：442.

17 Yang Y，Zhang B，Yang Y，et al. FOXM1 accelerates wound healing in diabetic foot ulcer by inducing M2 macrophage polarization through a mechanism involving SEMA3C/NRP2/Hedgehog signaling [J]. Diabetes Res Clin Pract，2022，184：109121.

18 Yan X，Yang Y，Guan H，et al. Exosomal LINC00958 maintains ovarian cancer cell stemness and induces M2 macrophage polarization via Hedgehog signaling pathway and GLI1 protein [J]. Int J Biol Macromol，2024，279(Pt 1)：135080.

19 Sharma S，Kishen A. Dysfunctional crosstalk between macrophages and fibroblasts under LPS-infected and hyperglycemic environment in diabetic wounds [J]. Sci Rep，2025，15(1)：17233.

20 顾潇枫，焦扬，张晓梅，等.肺纤方对VEGFR2介导的肺成纤维细胞α-SMA、ColⅠ表达的影响[J].中华中医药杂志，2020，35(11)：5460-5464.
Gu XF，Jiao Y，Zhang XM，et al. Effect of Feixian Recipe on expression of α-SMA and Col Ⅰ in lung fibroblasts mediated by VEGFR2 [J]. China J Tradit Chin Med Pharm，2020，35(11)：5460-5464.

21 Wang Y，Ping Z，Gao H，et al. LYC inhibits the AKT signaling pathway to activate autophagy and ameliorate TGFB-induced renal fibrosis [J]. Autophagy，2024，20(5)：1114-1133.

22 Karamanos NK，Theocharis AD，Piperigkou Z，et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix [J]. FEBS J，2021，288(24)：6850-6912.

23 杰辉，卢维，刘雪琴，等.MEBO对糖尿病溃疡大鼠创面组织中MMP-9、MMP-2、TIMP-1、TIMP-2动态表达的影响[J].中国烧伤创疡杂志，2021，33(1)：1-7.
Jie H，Lu W，Liu XQ，et al. Effect of MEBO on dynamic expressions of MMP-9，MMP-2，TIMP-1 and TIMP-2 in wound tissue of diabetic ulcer rats [J]. Chin J Burns Wounds Surface Ulcers，2021，33(1)：1-7

［本文编辑］ 刘斯静