

· 基础研究 ·

五首活血化癥方改善血癥证家兔内皮细胞功能差异

唐诗洋¹ 李金霞^{1,2} 郑彩杏¹ 张林子¹ 杨怡¹ 李一凡¹

摘要 **目的** 观察五首活血化癥方改善血癥证家兔内皮细胞功能的作用机制及疗效差异。**方法** 选择清洁级新西兰兔 70 只, 其中正常组 6 只, 余下 64 只应用饥饿+高脂+肾上腺素复合造模方法构建兔血癥证模型, 造模成功的家兔按随机数字表法分为模型组 (9 只), 血府组 (10 只), 桃红组 (10 只), 丹参组 (9 只), 活络组 (10 只), 失笑组 (9 只)。使用光镜观察主动脉病理学变化, 电镜观察主动脉内皮细胞超微结构, 血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31) 和 TUNEL 双染检测主动脉内皮细胞凋亡, ELISA 法检测血清内皮细胞损伤相关因子一氧化氮 (NO)、内皮素-1 (ET-1)、血管内皮细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、血管假血友病因子 (vWF)、活性氧 (ROS)、白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, RT-PCR 法检测 ERK5、MEK5、NRF2、KLF2 基因表达。**结果** 与模型组比较, 五首活血化癥方组主动脉及血管内皮细胞结构均有所改善, 内皮细胞凋亡数减少 ($P<0.01$); 除活络组外, 其余 4 组 NO 水平较模型组升高, ET-1 水平均较模型组降低 ($P<0.05$), 五首活血化癥方均可降低 vWF、VCAM-1、ROS 水平 ($P<0.05$), 失笑组、血府组 IL-1、TNF- α 水平同时降低, 丹参组、桃红组 IL-1 水平降低, 活络组 TNF- α 水平降低 ($P<0.05$); 五首方均可有效降低 ERK5、MEK5、NRF2、KLF2 基因表达水平 ($P<0.01$), 但对不同基因表达水平的影响有差异 ($P<0.05$)。**结论** 五首活血化癥方均可能通过调控 MEK/ERK 信号通路, 改善血癥证家兔血管内皮细胞功能, 五首活血化癥方在保护血管内皮细胞的作用力及作用靶点不同。

关键词 血癥证; 活血化癥; 内皮细胞; 差异研究; 中医

Differences of Five Blood-activating and Stasis-resolving Prescriptions on Endothelial Cell Function in Rabbits with Blood Stasis Syndrome TANG Shi-yang¹, LI Jin-xia^{1, 2}, ZHENG Cai-xing¹, ZHANG Lin-zi¹, YANG Yi¹, and LI Yi-fan¹ 1 School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208); 2 Hunan Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Diagnostics, Changsha (410208)

ABSTRACT **Objective** To observe the mechanism and different effects of five blood-activating and stasis-resolving prescriptions on endothelial cell function in rabbit with blood stasis syndrome. **Methods** Seventy New Zealand rabbits were selected and 6 in which as control group, the remaining 64 were given hunger+hyperlipidemia+adrenaline method to establish blood stasis syndrome. The successfully established model rabbits were divided into model group ($n=9$), Xuefu group ($n=10$), Taohong group ($n=10$), Danshen group ($n=9$), Huoluo group ($n=10$) and Shixiao group ($n=9$) according to a random number table. The pathological changes of aorta was observed by light microscope, the morphology of aortic endothelial cells was observed by electron microscope, the apoptosis of aortic endothelial cells was detected by CD31 and TUNEL double staining, and the levels of nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), von Willebrand factor (vWF), reactive oxygen species (ROS), interleukin-1 (IL-1) and TNF- α were analyzed by ELISA, the expressions of ERK5, MEK5, NRF2 and KLF2 genes were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the model group, the aorta and the structure

基金项目: 湖南省大学生创新创业训练计划项目 (No.S202210541120, No.S202110541013X); 湖南省自然科学基金青年项目 (No.2021JJ40399); 国家自然科学基金青年基金项目 (No.82104775); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金重点项目 (No.2021ZYX12)

作者单位: 1. 湖南中医药大学中医学 (长沙 410208); 2. 中医诊断学湖南省重点实验室 (长沙 410208)

通讯作者: 李金霞, Tel: 0731-88459433, E-mail: 531249042@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230724.022

of vascular endothelial cells in five blood-activating and stasis-resolving prescriptions groups were all improved, and the numbers of apoptosis of endothelial cells were significantly reduced ($P < 0.01$). Except for the Huoluo group, the levels of NO in the other four groups were higher and the levels of ET-1 were lower than that in the model group ($P < 0.05$). The five blood-activating and stasis-resolving prescriptions could reduce the levels of vWF, VCAM-1 and ROS ($P < 0.05$). The levels of IL-1 and TNF- α in Shixiao group and Xuefu group decreased at the same time, the levels of IL-1 in Danshen group and Taohong group decreased, and TNF- α in Huoluo group decreased ($P < 0.05$). All the five prescriptions could effectively reduce the expression levels of ERK5, MEK5, NRF2 and KLF2 genes ($P < 0.01$), but the curative effects of the five prescriptions on gene expression levels were different ($P < 0.05$). **Conclusion** The five blood-activating and stasis-resolving prescriptions could all regulate the MEK/ERK signaling pathway and improve the function of vascular endothelial cells in rabbits with blood stasis syndrome. However, the five prescriptions have different curative effects and different targets on the protection of vascular endothelial cells.

KEYWORDS blood stasis syndrome; blood-activating and stasis-resolving; endothelial cells; difference study; Chinese medicine

血瘀证是动脉粥样硬化、冠心病等人类重大心血管疾病的主要证型，常贯穿疾病始终^[1]。为了探究不同活血化瘀方剂治疗血瘀证的疗效区别与联系，课题组邀请方剂学专家论证，选取临床活血化瘀常用的丹参饮、血府逐瘀汤、失笑散、活络效灵丹、桃红四物汤作为研究对象，动物实验发现，五首活血化瘀方改善家兔血瘀状态的疗效存在差异^[2, 3]。网络药理学研究发现，流体切应力是五首方的共同作用机制^[4]。流体切应力 (fluid shear stress, FSS) 是血流作用于血管壁表面产生的平行于血管壁的切线摩擦阻力，直接作用于血管壁表面内皮细胞 (endothelial cells, ECs)^[5]，在心动周期内由于血管狭窄和分叉造成的血流二次流区域内会一直保持低流速和低切应力的状态，导致病变诱因易在此处的血管内膜组织上黏附和沉淀^[6]，促使血瘀证形成。随着流体切应力作用强度的增加，细胞增生受到抑制、还原^[7]。低 FSS 可促进 ECs 增殖^[8]，持续高剪切应力层流则可上调 ECs 基因和蛋白的表达^[9]，减轻血瘀程度。五首活血化瘀方是否通过差异化调控 ECs，从而发挥不同疗效？这是本研究需要解决的科学问题。

本研究应用饥饿 + 高脂 + 肾上腺素复合造模法构建兔血瘀证模型，以五首活血化瘀方分别进行干预，观察干预后家兔主动脉及血管内皮细胞病理学变化，双重荧光染色观察 ECs 凋亡情况，ELISA 法及 RT-PCR 法检测流体切应力引起 ECs 损伤关键蛋白及基因表达，以观察五首活血化瘀方保护 ECs 的作用差异，揭示血瘀证证治内涵，为临床精准选方提供实验依据。

材料与方

1 动物 同批次清洁级新西兰兔 70 只，雄性，

8~10 周龄，体重 2.0~2.5 kg，购自湖南太平生物科技有限公司，质量合格证号：1107302011000864。饲养于湖南中医药大学实验动物中心，设施使用证号：110730207062367744。单笼饲养，室温 (20 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 (60 ± 10)%，自由饮水，每隔 12 h 开灯照明。动物实验过程经湖南中医药大学医学伦理委员会批准 (No.LLBH-202006020001)。

2 实验药品及主要试剂 高脂饲料：60% 正常饲料，10% 蛋黄粉，5% 猪油，1% 胆固醇，0.2% 丙基硫氧嘧啶 (批号：2020091101)，北京科澳协力饲料有限公司。肾上腺素 (批号：P0038)，上海陶素生化科技有限公司；TUNEL 试剂盒 (批号：40306 ES50)，上海翊圣生物公司。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒、内皮素 -1 (endothelin-1, ET-1) 试剂盒、血管内皮细胞黏附分子 -1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 试剂盒、血管假血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒、白细胞介素 -1 (interleukin-1, IL-1) 试剂盒、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (批号分别为：A013-2、A024-1、A019-1、A057-1、A143-2、A117-2、A118-2)，南京建成生物科技有限公司。山羊抗小鼠二抗 (批号：SA00013-3)，美国 Proteintech 公司。血小板 - 内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 抗体 (批号：LS-C358009-100)，美国 LSBio 公司。mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒、DM2000 Plus DNA Marker (批号分别为：CW2569、CW2141、CW0632)，北京康为世纪公司。

中药煎剂制备：丹参饮：丹参 30 g (山东)、檀香 6 g (云南)、砂仁 6 g (广东)；血府逐瘀汤：桃仁

12 g (河北)、红花 9 g (河南)、当归 9 g (甘肃)、生地黄 9 g (河南)、川芎 5 g (四川)、赤芍 6 g (四川)、牛膝 9 g (河南)、柴胡 3 g (江苏)、桔梗 5 g (安徽)、枳壳 6 g (江西)、甘草 3 g (内蒙古); 失笑散: 五灵脂 6 g (河北)、蒲黄 6 g (江苏); 活络效灵丹: 当归 15 g (甘肃)、丹参 15 g (山东)、生明乳香 15 g (埃塞俄比亚)、生明没药 15 g (埃塞俄比亚); 桃红四物汤: 熟地 12 g (河南)、当归 15 g (甘肃)、白芍 9 g (浙江)、川芎 6 g (四川)、桃仁 9 g (河北)、红花 6 g (河南), 以上药物均按文献剂量^[10]购于湖南中医药大学第一附属医院。制备煎煮液: 冷水浸泡 30 min 后煎煮 2 次, 头煎煮沸时间为 2 h, 第二次为 1 h, 将两次煎煮滤液混合后浓缩: 丹参饮 0.5 g/mL; 血府逐瘀汤 1 g/mL; 失笑散 0.25 g/mL; 活络效灵丹 1 g/mL; 桃红四物汤 1 g/mL, 4 °C 冰箱保存备用。

3 主要仪器设备 酶标仪, Multiskan MK3, 美国 Thermo Scientific 公司; 超声波细胞粉碎机, JY92-II, 宁波新芝科器研究所; 台式高速冷冻离心机, TGL-20 M, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 电热恒温培养箱, SKP-02.600, 黄石市恒丰医疗器械有限公司; 显微镜; BA400, 厦门麦克奥迪实业集团公司; 透射电镜: JEM-1400, 日本 JEOL 公司; 摄像装置, Moticom 2306, 厦门麦克奥迪实业集团公司; 分光光度计, UV-2100, 上海尤尼柯仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪, PIKOREAL96, 美国 Thermo Scientific 公司; 荧光 PCR 板, SPL0960, 美国 Thermo Scientific 公司。

4 模型制备 依据随机数字表法, 将家兔分为正常组 6 只, 处理组 64 只。采用“饥饿+高脂+肾上腺素”方法^[11]制备家兔血瘀证模型。适应性喂养 1 周后, 正常组饲喂普通饲料, 处理组饲喂高脂饲料 90 g/d, 共 40 天。从实验第 2 天开始处理组进行隔日皮下注射肾上腺素 (0.1 mg/kg), 共 20 次, 每 7 天称量 1 次体重, 并根据体重变化调整肾上腺素注射量。第 40 天进行血瘀体征观察及血脂、血液流变学检测, 处理组指标较正常组明显增高则为造模成功。造模期间死亡 7 只, 成模 57 只, 成模率 89.1%。

5 分组及给药方法 造模成功的动物随机分为模型组 9 只, 血府组 10 只, 桃红组 10 只, 丹参组 9 只, 活络组 10 只, 失笑组 9 只。各复方组的灌胃剂量根据人与动物体表面积折算, 相当于临床等效剂量^[4, 12], 即血府组含生药 3.55 g/(kg·d); 桃红组含生药 2.66 g/(kg·d); 丹参组含生药 1.962 g/(kg·d); 活络组含生药 2.80 g/(kg·d);

失笑组含生药 0.56 g/(kg·d), 连续灌胃 30 天, 正常组、模型组灌胃同等剂量生理盐水。

6 样品采集 末次灌胃 24 h 后, 所有家兔以 40 mg/kg 戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉, 腹主动脉取血 20 mL, 空气栓塞处死。血液常温放置 1 h 后 4 °C, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -20 °C 保存。取主动脉组织, 部分置于液氮中冻存, 部分 PBS 涮洗后置于冷的 2.5% 戊二醛中固定, 之后进行醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, 待测电镜; 剩余部分主动脉, 经 PBS 涮洗后置于 4% 多聚甲醛溶液固定 12~24 h, 进行石蜡包埋、切片。

7 ELISA 法检测血清 NO、ET-1、VCAM-1、vWF、ROS、IL-1、TNF- α 水平 检测按照试剂盒说明书进行。

8 HE 染色观察主动脉病理学变化 取家兔胸主动脉样本, 石蜡包埋后制成 5 μ m 厚切片, 行常规 HE 染色: 烤片后脱蜡、水化, 苏木素染液染色后脱水、透明, 中性树胶封片, 200 倍显微镜下观察各样品病理变化。

9 电镜观察主动脉内皮细胞形态 各组随机选取 1 个主动脉组织样本进行 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 于 JEOL JEM-1400 透射电镜观察下观察血管内皮细胞超微结构并拍照。

10 CD31 和 TUNEL 双染检测主动脉内皮细胞凋亡 每组随机选取 3 个主动脉组织样本, 石蜡包埋切片 (5 μ m) 后进行 TUNEL 及 CD31 免疫荧光双重染色, 切片脱蜡水化后, 浸入枸橼酸盐缓冲液微波炉加热至沸腾后断电, 冷却 23 min, PBS 洗涤 3 min \times 3 次; 硼氢化钠溶液孵化 30 min, 水漂洗 5 min; 苏丹黑染液孵化 5 min, 水冲洗 3 min; 5% BSA 封闭 60 min; 滴加 100 μ L 1 \times Equilibration Buffer, 室温孵育 10~30 min; 50 μ L TdT 孵育缓冲液 37 °C 避光孵育 60 min, 避光漂洗; 滴加 1:50 CD31 一抗, 4 °C 过夜, PBS 冲洗; 滴加 100 μ L 抗-小鼠-IgG 标记荧光抗体, 37 °C 孵育 90 min, PBS 冲洗; DAPI 工作液 37 °C 染核 10 min, PBS 冲洗; 缓冲甘油封片, 荧光显微镜 400 倍镜下观察, 计数凋亡的内皮细胞数量。

11 RT-PCR 法检测 ERK、MEK、NRF2、KLF2 基因表达 从美国国家生物技术中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站获得目的基因 mRNA 的全长序列, 利用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计引物序列。经过 Blast 分析, 引物序列具有特异性。所用的引物及内参引物

如表 1 所示。TRIzol 提取样本总 RNA，紫外分光光度计测定其浓度跟纯度，以总 RNA 为模板，按照说明书使用 invitrogen 反转录试剂盒进行 cDNA 合成，随后进行荧光定量 PCR，依次加入 2 μL cDNA、1 μL primer F (10 μmol/L)、1 μL primer R (10 μmol/L)、15 μL 2×Mi× Sybr Green I、11 μL ddH₂O，每个样本每个指标 3 个孔，混匀后立即置 PCR 仪中，95 °C 预变性 10 min，95 °C 变性 15 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，共 40 循环，自动获取熔解曲线，并在程序结束后进行分析。目的基因的倍数改变使用相对定量来计算：基因数量 = 2^{-ΔΔCt}，ΔΔCt = ΔCt_{处理} - ΔCt_{对照组}，ΔCt = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}。

表 1 实验引物信息

引物名称	引物信息 (5'-3')	片段长度 (bp)
MEK5	F: CCGACTCACTTCCAAGCAAT	137
	R: TTTGTAGACTGTGCCTCCGTT	
ERK5	F: CCAATGCCAAACGGACCCTC	150
	R: GGTGCTCTCCATCAGGTCT	
NRF2	F: ACGTGAAGAAATCATGGAActCA	95
	R: CATCACCGTGGCTTAGAATCACA	
KLF2	F: TGCCAGAACCCAAAATCATCG	111
	R: TATGAGGTCCTGCTTTGTCCTT	

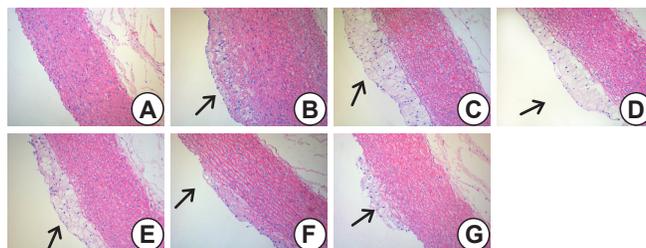
12 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 19.0 进行统计处理，各组计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析法考查显著性，方差齐时组间两两比较采用 LSD 检验，方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组家兔一般情况 正常组家兔精神良好，食欲佳，毛色平整有光泽，大便柔软成型，无稀便情况；造模期间出现精神倦怠嗜睡，毛发色黄无光泽，稀疏脱落，个别出现皮下肿块，甚至溃烂，进食减少，造模期间死亡 7 只；给药期间由于家兔性情胆小易惊，脆弱敏感，灌胃对其刺激较大，精神状态未见明显改善，给药期间死亡 13 只，总死亡率 28.57%，最终剩余 44 只，其中数量最少的失笑组为 6 只，为保证数量一致性，故每组选择 6 只家兔进行统计分析。

2 五首活血化瘀方对血瘀证家兔主动脉病理改变的影响 (图 1) 正常组主动脉结构正常，内膜、中膜、外膜结构清晰，内皮细胞完整，内弹力板光滑、连续、平滑，中膜中的弹性膜平行排列，层次清晰，平滑肌细胞及弹性纤维形态一致，排列规则。模型组

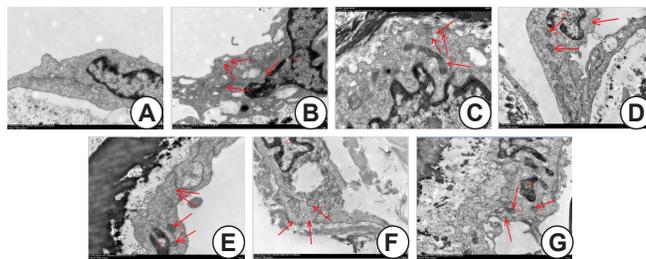
纤维帽突出管腔，内有大量炎性细胞浸润，中膜大量胶原纤维及平滑肌增生，排列紊乱，中膜弹力膜大量缺失、断裂，外膜结缔组织增生。各干预组壁结构较为清晰，见大量胶原纤维及平滑肌增生，厚薄不一，内皮细胞紊乱，炎性浸润较模型组减少，斑块突出程度较轻，弹力膜缺失断裂较少。



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为血府组；D 为丹参组；E 为活络组；F 为失笑组；G 为桃红组；图 2 同，图中箭头所示为不同组胶原纤维及平滑肌增生情况，从 B~G 增生情况不同程度减少

图 1 各组家兔主动脉病理损伤情况 (HE, ×200)

3 五首活血化瘀方对血瘀证家兔主动脉血管内皮细胞超微结构的影响 (图 2) 正常组内皮细胞呈梭形，单层排列，紧密有序，连接清晰，细胞核染色质均匀，细胞器无明显变性，内质网和线粒体结构正常，核糖体丰富。模型组内膜表面可见多个内皮细胞局部胞质向血管腔突起，局部出现内皮细胞脱落，核不规则，异染色质大多聚集于核膜下，部分核孔扩张，内皮细胞肿胀，细胞膜呈虫蚀样变，线粒体肿胀变形，脊溶解、断裂、消失，出现大量自噬小体。各干预组内皮细胞肿胀，但大部分内皮完整，较少脱落，内膜表现光滑，细胞质透亮，细胞核染色质较为均匀，线粒体肿胀，嵴结构完整，可见自噬小体形成。



注：图中箭头所示为不同组内皮细胞肿胀、线粒体肿胀、自噬小体情况，B~G 内皮细胞及线粒体肿胀、自噬小体形成情况不同程度减少

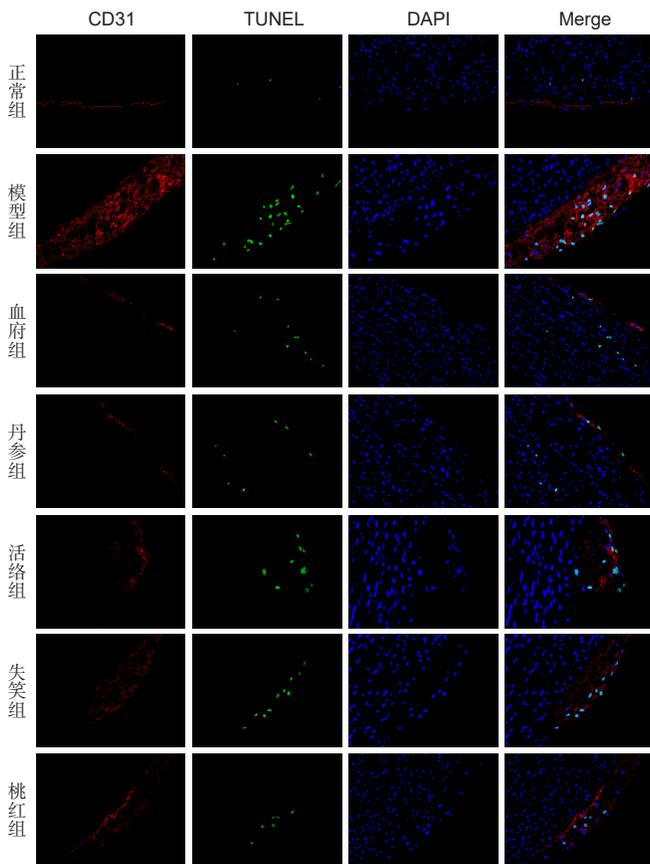
图 2 各组家兔主动脉血管内皮细胞超微结构 (×12 000)

4 五首活血化瘀方对血瘀证家兔主动脉血管内皮细胞凋亡的影响 (表 2, 图 3) 免疫荧光结果显示，正常组仅见个别内皮细胞凋亡。与正常组比较，模型组内皮细胞凋亡数显著增加 (P<0.01)。与模型组比较，五首活血化瘀方组内皮细胞凋亡数减少

表 2 各组家兔主动脉血管内皮细胞凋亡数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	内皮细胞凋亡数
正常	6	0.33 ± 0.31
模型	6	19.67 ± 7.23*
血府	6	3.00 ± 1.00 [△]
丹参	6	3.00 ± 1.00 [△]
活络	6	7.67 ± 4.04 [△]
失笑	6	6.33 ± 4.04 [△]
桃红	6	5.67 ± 0.58 [△]

注:与正常组比较,*P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.01



注:血管内皮细胞被 CD31 抗体染成红色,凋亡细胞核被 TUNEL 法染成绿色,DAPI 核染信号为蓝色,三者重合即可观察凋亡的内皮细胞

图 3 各组家兔主动脉血管内皮细胞凋亡情况 (CD31 及 TUNEL 荧光双染, × 400)

表 3 各组家兔内皮细胞损伤相关因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO (μmol/L)	ET-1 (ng/L)	vWF (U/L)	VCAM-1 (μg/L)	IL-1 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	ROS (ng/mL)
正常	6	43.51 ± 19.80	90.25 ± 13.78	317.09 ± 30.64	122.04 ± 14.34	132.70 ± 13.90	585.05 ± 55.45	13.75 ± 0.77
模型	6	10.70 ± 1.40*	111.97 ± 7.81*	447.43 ± 31.20*	199.66 ± 16.09*	191.15 ± 16.42*	818.30 ± 59.43*	18.66 ± 0.64*
血府	6	29.65 ± 19.62 [△]	74.60 ± 13.62 [△]	352.09 ± 57.77 [△]	136.41 ± 13.00 [△]	157.00 ± 20.18 [△]	631.70 ± 164.56 [△]	15.41 ± 1.97 [△]
丹参	6	24.35 ± 12.47 [△]	68.35 ± 15.67 [△]	369.42 ± 59.00 [△]	149.64 ± 48.29 [△]	163.10 ± 23.47 [△]	714.95 ± 179.52	16.08 ± 2.68 [△]
活络	6	11.07 ± 1.56 [▲]	98.08 ± 19.30	379.07 ± 63.32 [△]	147.85 ± 13.74 [△]	175.95 ± 6.49	659.85 ± 141.74 [△]	15.26 ± 2.20 [△]
失笑	6	20.68 ± 9.52 ^{▲▲}	82.91 ± 23.22 [△]	372.04 ± 50.95 [△]	145.48 ± 13.32 [△]	144.57 ± 20.04 [△]	655.03 ± 91.93 [△]	15.09 ± 2.50 [△]
桃红	6	27.05 ± 12.11 [△]	84.43 ± 15.76 [△]	354.05 ± 74.16 [△]	141.52 ± 24.72 [△]	154.91 ± 18.87 [△]	689.21 ± 93.12	16.01 ± 1.50 [△]

注:与正常组比较,*P<0.01;与模型组比较,[△]P<0.01;与血府组比较,[▲]P<0.05

(P<0.01), 五首活血化癥方组间比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。

5 各组家兔内皮细胞损伤相关因子水平比较 (表 3) 与正常组比较, 模型组家兔血清中 ET-1、vWF、VCAM-1、ROS 升高, NO 降低 (P<0.01)。除活络组外, 其余 4 个用药组 NO 水平较模型组升高, ET-1 水平均较模型组降低 (P<0.05), 其中血府组最佳, 与失笑组比较, NO 差异有统计学意义 (P<0.05); 五首活血化癥方均可降低 vWF、VCAM-1、ROS 水平 (P<0.05), 组间比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。与正常组比较, 模型组 IL-1 及 TNF-α 升高 (P<0.01)。与模型组比较, 失笑组、血府组 IL-1、TNF-α 水平同时降低, 丹参组、桃红组 IL-1 水平降低, 活络组 TNF-α 水平降低 (P<0.05)。

6 各组家兔 ERK5、MEK5、NRF2、KLF2 mRNA 表达比较 (表 4) 与正常组比较, 模型组 ERK5、MEK5、NRF2、KLF2 基因表达水平升高 (P<0.01)。与模型组比较, 五首活血化癥方均可降低 ERK5、MEK5、NRF2、KLF2 水平 (P<0.01)。各干预组之间比较发现, 在降低 ERK5、MEK5 水平的程度上, 排序依次为: 血府组、桃红组、活络组、失笑组、丹参组, 在降低 NRF2、KLF2 水平的程度上, 排序依次为: 血府组、桃红组、活络组、失笑组、丹参组 (P<0.05)。

讨 论

血癥证是临床常见病证, 血癥证研究一直是中医药学术研究最有活力、最见成效、最受国内外关注的领域。应用活血化癥制剂可有效缓解心血管疾病临床症状、延缓疾病进程、预防急性心血管事件发生、减少病死率^[13]。然而血癥证可因病因、病理程度、部位等不同形成许多亚型证^[14]; 现代理化检查如血液流变性、凝血、纤溶、微循环等也成为血癥证的诊断手段之一^[1], 但狭窄程度、血栓成分、血黏度等也存在

表 4 各组家兔 ERK5、MEK5、NRF2、KLF2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MEK5	ERK5	NRF2	KLF2
正常	6	0.99 ± 1.06	0.91 ± 0.17	1.16 ± 0.16	1.01 ± 0.20
模型	6	7.05 ± 1.00*	5.92 ± 1.60*	4.76 ± 0.97*	8.43 ± 1.45*
血府	6	1.19 ± 0.18 [△]	1.07 ± 0.17 [△]	1.60 ± 0.20 [△]	1.25 ± 0.16 [△]
丹参	6	5.01 ± 0.72 ^{△△△}	4.53 ± 1.06 ^{△△△}	4.03 ± 1.31 ^{△△}	6.73 ± 0.90 ^{△△△}
活络	6	2.00 ± 0.50 ^{△△△}	1.99 ± 0.19 ^{△△△}	2.76 ± 0.75 [△]	3.32 ± 0.86 [△]
失笑	6	3.22 ± 0.94 [△]	3.08 ± 1.08 [△]	3.05 ± 0.72 [△]	4.64 ± 1.05 [△]
桃红	6	1.37 ± 0.27 [△]	1.34 ± 0.11 [△]	1.58 ± 0.25 ^{△[○]}	1.87 ± 0.35 ^{△^{○○}}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与失笑组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与活络组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$

量的差异。由此可见,“血瘀证”其中仍存在不同病理阶段、层次以及证的轻重、深浅、范围等差异。在治法上活血化瘀存在和血、活血、破血、逐瘀等作用程度之别,还有行气活血、益气活血、温经活血、活血止痛、活血止血等法,体现出功效的差异,因此不同的活血化瘀制剂可能通过不同的作用强度、不同的作用环节,共同发挥干预血瘀证的作用。然而复杂的证治关系网不利于临床精准选方,因此有必要对这些方剂进行生物学定义,理清其作用机制及作用力差异,从认识病证病机、选方用药多环节出发,提高血瘀证临床处方用药针对性。

课题组前期针对这一现象,邀请方剂学专家论证,选取临床常用的五首活血化瘀方剂——血府逐瘀汤、丹参饮、活络效灵丹、失笑散、桃红四物汤作为研究对象。为重点比较这五首方剂之间对血瘀证的疗效差异及其机制的差异,每种方剂均只选用了临床等效剂量组即中剂量组。五首方均可专注于发挥活血化瘀作用,且其活血化瘀作用又略有层次的不同,具有较好的可比性:丹参饮以丹参为主药,配合檀香、砂仁行气,药性平和以和血;活络效灵丹以丹参、当归佐以乳香、没药,长于散瘀消肿止痛,为伤科要药;失笑散使用蒲黄、五灵脂,长于化瘀止痛;桃红四物汤在养血和血的四物汤基础上加以桃仁、红花,破血逐瘀;血府逐瘀汤又在桃红四物汤基础上合四逆散,破血的同时辅以行气,进一步增强活血化瘀之功。本实验在经典血栓形成模型基础上进行改进,采用“饥饿+高脂+肾上腺素”复合方法制备家兔血瘀证模型,其中饥饿模拟气虚基础,高脂模拟痰湿因素,在气虚不能推动血液运行的基础上,加上痰湿阻滞,以此构建本虚标实的病理基础,从病机+病理角度确保血瘀证成模。动物实验发现五首活血化瘀方均可有效减轻AS家兔粥样硬化程度,但功效存在量的差异^[2,3]。进一步的网络药理学研究发现,五首方均可作用于流体切应力,发挥抗动脉粥样硬化作用,揭示了五首方

干预血瘀证的共同机制^[4]。

FSS导致的内皮细胞损伤是血瘀证发生的重要机制之一^[15]。FSS影响内皮细胞功能与MEK/ERK途径有关,在紊乱的流体切应力下,损伤的内皮细胞MEK5被激活,ERKS去磷酸化,从而引起KLF2和Nrf2的释放,此时一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthetase, eNos)分泌减少,NO合成减少,其反向调节物ET-1分泌增多^[16,17]。NO与ET-1是一对内皮损伤标志物,NO由ECs分泌,它是一种强大的内源性血管扩张剂,具有平衡ET-1的作用。NO释放是ECs保护血管的重要机制。NO在ECs增殖、白细胞黏附和血管生成中起着重要作用^[18];而ET是目前发现最强的缩血管物质,ET-1释放增加,血管收缩增强,促进平滑肌增生,引起粥样斑块形成或扩大^[19]。损伤的内皮细胞可释放ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、vWF等黏附因子,促进炎症细胞黏附,聚集的白细胞释放氧自由基、炎性介质、细胞因子等直接损伤内皮细胞,从而加重炎症反应^[20]。前期网络药理学结果显示,五首活血化瘀方均可靶向KLF2、NRF2、MAP3K、MAPK1^[4],由此推测五首方干预血瘀证的疗效差异可能是通过差异性调节MEK/ERK信号通路、保护血管内皮细胞实现的。

本研究发现,五首方均可有效改善血瘀证家兔主动脉及ECs超微结构损伤,减少ECs凋亡;各干预组ET-1水平均较模型组降低,除活络组外,其余4组NO水平较模型组升高;五首活血化瘀方均可降低血瘀证家兔vWF、VCAM-1、ROS水平;失笑组、血府组能使IL-1、TNF- α 水平同时降低,丹参组、桃仁组使IL-1水平降低,活络组使TNF- α 水平降低;与模型组比较,五个干预组ERK5、MEK5、NRF2、KLF2水平均降低。以上实验结果说明五首活血化瘀方均可能通过调节MEK/ERK途径改善血瘀证家兔ECs的功能,但五首方在作用程度上存在一定差异,

在不同指标上表现出的改善能力不同,且方与方之间比较,差异有统计学意义^[21];在调控炎症因子方面,失笑组及血府组最为全面;在改善血管内皮损伤相关因子方面,血府逐瘀汤作用最佳,与失笑散差异有统计学意义;在调控 MEK/ERK 信号通路方面,血府组及桃红组最佳,与其余组比较,差异有统计学意义。本研究仅关注了五首活血化瘀方对内皮细胞的保护作用差异,下一步仍需从基因、分子等多角度全面阐释、分析五首方疗效作用差异。

由此可知,五首活血化瘀方作用于同一病理环节,即调控 MEK/ERK 信号通路,保护血管内皮细胞,来共同起到干预血瘀证的作用,从分子层面揭示了“活血化瘀”机制;但五首活血化瘀方在保护血管内皮细胞的作用力及作用方面不同,活血化瘀的疗效也存在差异^[21],部分阐明了“活血化瘀”复杂证治机制,也为临床精准选方提供实验依据。

利益冲突: 本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 常莹莹,任杰.从血瘀论治心血管疾病理论探讨[J].中国社区医师(医学专业),2012,14(35):193.
- [2] 周小青,罗尧岳,谢小兵,等.五首活血化瘀方对高脂饮食所致兔动脉粥样硬化保护作用的研究[J].中国中医药科技,2004,11(3):148-150.
- [3] 罗尧岳,周小青,谢小兵,等.活血化瘀类方对动脉粥样硬化家兔血脂、血液流变学变化的影响[J].湖南中医学院学报,2003,25(1):9-12.
- [4] Li JX, Zhou XQ, Zheng CX, et al. Comparison of mechanisms and effects of five promoting circulation and removing stasis formulas in treating blood stasis[J]. Digital Chin Med, 2021, 4(4): 150-164.
- [5] 张蒙,龚觉晓,毛晨晗,等.基于机械敏感性阳离子通道 Piezo1 的黄芪丹参药物血清对低流体切应力诱导的人内皮细胞功能紊乱的影响[J].中国中医药信息杂志,2022,29(2):68-73.
- [6] 鹿晔.基于血流动力学的动脉粥样硬化病变机理分析及临床应用研究[D].济南:山东大学,2020.
- [7] 段素娟,崔雯雯,柳星,等.流体切应力对人脐带血管间充质干细胞形态、黏附及增生能力的影响[J].中华实验眼科杂志,2019,20(11):870-875.
- [8] 姜晓华.流体切应力对血管内皮细胞和平滑肌细胞迁移与增殖的影响及其机制[D].上海:上海交通大学,2011.
- [9] Zhou J, Li YS, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(10): 2191-2198.
- [10] 李冀,左铮云主编.方剂学[M].11版.北京:中国中医药出版社,2021:145.
- [11] 杨洪雁,张香东,刘可园,等.水蛭对血瘀证家兔血脂代谢及相关基因表达的影响[J].中国现代应用药学,2013,30(9):959-963.
- [12] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用量换算[J].畜牧兽医科技信息,2010,5(5):52-53.
- [13] 张倩.近现代山东医家活血化瘀法治疗心系疾病学术经验的挖掘及应用研究[D].济南:山东中医药大学,2021.
- [14] 周小青,陈喜蓉,刘建新.论证候的而病理范围、轻重、阶段、因果、浅深层次与治疗[J].中国中医基础医学杂志,1997,3(1):17-19.
- [15] Kivi AR, Sedaghatizadeh N, Cazzolato BS, et al. Fluid structure interaction modelling of aortic valve stenosis: effects of valve calcification on coronary artery flow and aortic root hemodynamics[J]. Comput Methods Programs Biomed, 2020, 196(11): 105647.
- [16] Huang J, Pu Y, Zhang H, et al. KLF2 mediates the suppressive effect of laminar flow on vascular calcification by inhibiting endothelial BMP/SMAD1/5 signaling[J]. Circ Res, 2021, 129(4): e87-e100.
- [17] Psefteli PM, Kitscha P, Vizcay G, et al. Glycocalyx sialic acids regulate Nrf2-mediated signaling by fluid shear stress in human endothelial cells[J]. Redox Biol, 2021, 38(11): 101816.
- [18] Nasoni MG, Benedetti S, Crinelli R, et al. 3 β -hydroxy-5 β -hydroxy-B-norcholestane-6 β -carboxaldehyde (SEC-B) induces proinflammatory activation of human endothelial cells associated with nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase/caveolin-1 dysregulation[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(6): 1148.
- [19] Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, et al. Endothelin[J]. Pharmacol Rev, 2016, 68(2): 357-418.
- [20] Vestweber D. Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability[J]. Ann NY Acad Sci, 2012, 1257(6): 184-92.
- [21] 康健颖,李金霞,郑彩杏,等.基于五首活血化瘀方治疗血瘀证家兔疗效差异探讨血瘀证“同证异方”[J].中医药信息,2022,39(8):35-43.

(收稿:2023-03-21 在线:2023-09-04)

责任编辑:赵芳芳