

补气活血通络方对大鼠创伤性深静脉血栓形成及血红素加氧酶-1 基因表达的影响

俞云飞¹ 胡钢^{1△} 蔡建平¹ 严松鹤¹

[摘要] 目的:观察补气活血通络方对大鼠创伤性深静脉血栓形成及血红素加氧酶-1(Hmox-1)基因表达的影响。方法:采用钳夹大鼠单侧股静脉并予后肢髌人字石膏固定法建立创伤性深静脉血栓模型。将 36 只 SD 大鼠随机分为造模组、低浓度中药组、高浓度中药组、阿司匹林组,造模 24 h 后分别使用生理盐水、补气活血通络方或阿司匹林肠溶片对大鼠灌服 3 d 后,检测股静脉血栓干、湿重。运用苏木精-伊红(HE)染色观察股静脉血管形态学改变及血栓情况,实时 PCR 检测 Hmox-1 基因的表达情况。结果:造模成功后肉眼可见股静脉血栓形成,HE 染色见股静脉管腔内血栓形成。与造模组相比,高浓度中药组和阿司匹林组股静脉中血栓质量明显降低($P<0.05$),HE 染色镜下也呈现相同趋势;而与造模组相比,低浓度和高浓度中药组中 Hmox-1 基因呈现浓度依赖性表达增高($P<0.05$),但阿司匹林组中 Hmox-1 基因表达低于两个中药组。结论:补气活血通络方可能通过促进 Hmox-1 基因表达来降低大鼠创伤性深静脉血栓形成。

[关键词] 补气活血通络方;血红素加氧酶-1;深静脉血栓

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)09-0005-05

Efficacy of Buqi Huoxue Tongluo Decoction on Traumatic Deep Vein Thrombosis and Hmox-1 Gene Expression in Rats

YU Yunfei¹ HU Gang^{1△} CAI Jianping¹ YAN Songhe¹

¹Wuxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214000, Jiangsu China.

Abstract Objective: To observe the efficacy of Buqi Huoxue Tongluo decoction on traumatic deep vein thrombosis (DVT) and Hmox-1 gene expression in rats. **Methods:** The rat model of traumatic DVT was established by clamping the unilateral femoral vein and fixing the posterior hip with herringbone plaster. 36 SD rats were randomly divided into model group, low-concentration Chinese medicine group, high-concentration Chinese medicine group and Aspirin group. 24 h after model establishment, the rats were given normal saline, Buqi Huoxue Tongluo decoction or Aspirin enteric-coated tablet for 3 d respectively, and the dry and wet weight of femoral vein thrombus were detected. The morphological changes of femoral vein vessels and thrombosis were observed by Hematoxylin-Eosin (HE) staining. The expression of Hmox-1 gene was detected by RT-PCR. **Results:** Femoral vein thrombosis could be seen by naked eyes after the model was successfully established, and intraluminal thrombosis of femoral vein was observed by HE staining. Compared with the model group, the mass of thrombosis in the femoral vein in the high-concentration Chinese medicine group and the Aspirin group was significantly decreased ($P<0.05$), and the same trend was observed under HE staining microscope. Compared with the model group, the expression of Hmox-1 gene in low and high concentration Chinese medicine groups were increased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$), but the expression of Hmox-1 gene in Aspirin group was lower than that in the two Chinese medicine groups. **Conclusion:** Buqi Huoxue Tongluo decoction may reduce traumatic DVT in rats by promoting Hmox-1 gene expression.

Keywords: Buqi Huoxue Tongluo decoction; Hmox-1; deep vein thrombosis

(Deep Vein Thrombosis, DVT)及血栓相关性并发症,对患者的疗效及预后有着十分重要的影响^[1]。因此,如何改善围手术期血栓前状态,避免 DVT 形成,是预防老年髋部骨折患者围手术期并发症的重要方法^[2]。笔者前期研究表明^[3],应用补气活血通络方可以有效改善气虚血瘀型老年髋部骨折围手术期血栓前状态,预防 DVT 的形成,临床疗效明确,但其作用机制尚不明确。因此,本研究采用大鼠创伤性深静脉血栓模型,探究补气活血通络方改善血栓前状态的作用机制,为中医药改善血栓前状态提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,体质量(215.8±22.4)g,中位数 215 g,动物均由扬州大学比较医学中心提供,动物合格证号为 SCXK(苏)2017-007。

1.2 实验药物及试剂

补气活血通络方:黄芪 30 g、当归 6 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g、党参 10 g、白术 10 g 等组成。中药由无锡市中医医院中药药房配制,临床使用剂量为每日 1 剂、双煎袋装,每袋 150 mL,共 2 袋 300 mL,分早晚 2 次服用。取 1 剂经煎煮、过滤、浓缩成生药含量为 0.75 g/mL 浓缩液,4℃保存备用。水合氯醛(上海山浦化工有限公司,中国),Bouin 氏液(金克隆生物技术有限公司,中国),实时 PCR 试剂盒(TOYOBO,中国)。

1.3 实验仪器

实时 PCR 试剂盒(TOYOBO,中国);实时 PCR 仪(RocheLightCycler480,德国);PCR 反应体系和反转录试剂盒(Fermentas,美国);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和 ECL 发光液(上海碧云天公司,中国)。高速冷冻离心机(湖南湘仪公司,中国);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国);石蜡切片机(Leica 公司,德国);显微镜拍照系统(奥林巴斯公司,日本);pH 仪(Orion model 公司,美国)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法^[4] 采用钳夹大鼠单侧股静脉联合髋部人字石膏固定,建立创伤性深静脉血栓模型。大鼠称重后腹腔注射 5%水合氯醛(5 mL/kg),麻醉、消毒、铺巾,取腹股沟内侧纵行切口,分离、显露并游离股静脉血管,用蚊式钳持续钳紧股静脉血管约 3 s,单侧股静脉分别处理邻近 3 个部位后缝合切口,术后行同侧髋人字石膏固定,并给予正常饮食。

1.4.2 分组方法 采用随机数字表法将 36 只雄性 SD 大鼠分为造模组、低浓度中药组、高浓度中药组和阿司匹林组,每组 9 只。

1.4.3 干预方法 造模组:采用钳夹大鼠单侧股静脉联合髋部人字石膏固定,建立创伤性深静脉血栓模型,造模 24 h 后给予等量生理盐水灌服。低浓度中药组:造模 24 h 后依据《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》计算实际大鼠灌药剂量,进行 2 次/d(1.5 g/d)、持续 3 d 的中药灌服。高浓度中药组:造模 24 h 后依次进行 2 次/d(3.0 g/d)、持续 3 d 的中药灌服。阿司匹林组(阳性对照组):将阿司匹林肠溶片碾碎、溶解后,于造模 24 h 后给予灌服,进行 2 次/d(200 mg/kg)、持续 3 d 的阿司匹林溶液灌服。所有大鼠实验前均进行适应性喂养 7 d,术前 12 h 禁食,术后不限饮食、饮水。

1.4.4 标本制作方法 造模并予药物干预后当天使用 5%水合氯醛麻醉后,切开、显露并剥离股静脉血管,截取大鼠造模侧 4.0~5.0 cm 股静脉血管。每条股静脉血管切取 0.5~1.0 cm,用甲醛固定保存,进行苏木精-伊红(HE)染色组织切片病理学检测。实验结束后采用颈椎脱臼法处死实验动物,并按江苏省动物管理委员会条例进行终末处理。

静脉血栓 HE 染色:股静脉标本使用波恩氏(Bouin)固定液固定、石蜡包埋,切片,厚约 5 μm。经过、脱水、脱蜡后使用苏木精染色、1%盐酸乙醇分化、1%氨水返蓝、1%伊红染色,酒精脱水,封片。

1.5 实验室指标测定

1.5.1 血栓检测 干预结束后当天使用 5%水合氯醛麻醉后,切开、显露并剥离股静脉血管,纵向剪开静脉管腔,使用滤纸吸取该段血管内血液,肉眼下观察血栓形成情况及形态。小心取出血栓后即刻称重为湿重,再用滤纸吸取表面血液后,置于 60℃干燥箱内 2 h,冷却后称重为干重。

1.5.2 Hmox-1 基因 mRNA 表达 使用静脉采血针采取大鼠心脏部位血液,每只大鼠 2~3 mL。经静置、离心、去上清后,使用 Trizol 一步法提取沉淀细胞的总 RNA。检索设计 Hmox-1 引物序列(见表 1),合成反转 cDNA 并反复扩增,再通过实时 PCR 检测 Hmox-1 mRNA 的表达情况,结果使用 2^{-ΔΔCt} 方法分析。

表 1 实时聚合酶链反应引物序列

引物	序列(5'→3')
Hmox-1	上游:CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCA
	下游:CTTCCCATTCTCAGCCTTGACT
GAPDH	上游:CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCA
	下游:CTTCCCATTCTCAGCCTTGACT

1.6 统计学方法

所有数据应用 SPSS 21.0 分析软件处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以

例数表示,比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中有 4 只大鼠死亡:造模组中 1 只造模时麻醉穿刺至肠道中导致死亡,低浓度组中 1 只建模时麻醉深度过深导致死亡,高浓度组 2 只在建模过程中刺破

股静脉导致失血死亡,上述大鼠死亡均与造模操作熟练度有关,再次补充购买大鼠后补齐每组大鼠数量。造模组和低浓度中药组大鼠患肢(左肢)肿胀,皮肤颜色暗红,直视下可见血管内明显暗红色条状物,血栓条较长,质地较韧;高浓度中药组和阿司匹林组患肢无明显肿胀,皮肤颜色红润,直视下可见血管内透明度较高,血栓条较短,质地较疏松(见图 1)。

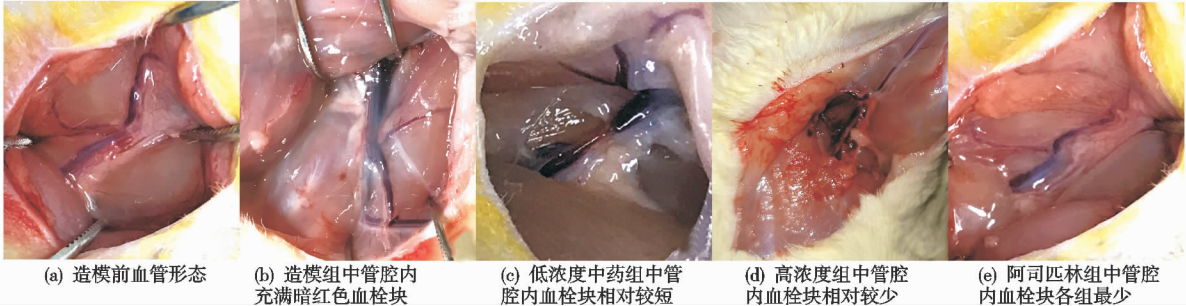


图 1 各组中血栓大体形成情况

各组血栓干、湿重结果:与造模组相比,其他 3 组血栓质量均呈现降低趋势,其中低浓度中药组虽有降低,但差异无统计学意义($P>0.05$),高浓度中药组和阿司匹林组均明显降低,且阿司匹林组最低,差异有统

计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.2 各组股静脉血管 HE 染色情况

表 2 各组大鼠血栓质量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数/只	湿重/mg	干重/mg
造模组	9	8.101±1.206	2.914±0.358
低浓度中药组	9	5.829±0.846	2.199±0.332
高浓度中药组	9	4.656±0.376 ¹⁾²⁾	1.432±0.169 ¹⁾²⁾
阿司匹林组	9	2.858±0.228 ¹⁾²⁾³⁾	0.891±0.142 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)与造模组相比, $P<0.05$;2)与低浓度中药组相比, $P<0.05$;3)与高浓度中药组相比, $P<0.05$ 。

显微镜(100 倍)下可见造模组和低浓度中药组中股静脉管内膜形态不规则、管腔扩张,血管壁组织水肿、增厚,腔内大量红细胞聚集、血栓形成,颜色呈现明显暗红色;高浓度中药组中股静脉管内膜形态不规则、管腔略扩张,腔内较多血栓形成,颜色呈现红色,血管壁组织疏松;阿司匹林组中股静脉管内膜形态相对规则、管腔略扩张,腔内较少血栓形成,颜色呈现红色,血管壁组织疏松(见图 2)。

2.3 Hmox-1 基因 mRNA 表达情况

与造模组相比,阿司匹林组中 Hmox-1 表达呈现增高趋势($P<0.05$),但低浓度和高浓度中药组中 Hmox-1 表达呈现浓度依赖性上调,且高于阿司匹林组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组 Hmox-1 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

组别	例数/只	mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)
造模组	9	1.008±0.025
低浓度中药组	9	3.190±0.726 ¹⁾³⁾
高浓度中药组	9	6.989±0.654 ¹⁾²⁾
阿司匹林组	9	1.358±0.165 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)与造模组相比, $P<0.05$;2)与低浓度中药组相比, $P<0.05$;3)与高浓度中药组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

中医学认为凡离经之血不能及时排除或消散,停留于体内或血行不畅,阻遏于经脉之内及瘀积于脏腑组织器官的均称为瘀血,凡瘀血内阻的病变均为血瘀证。老年人髌部骨折后,局部可出现肿胀、压痛、瘀斑等症状,其骨折本身引起的出血属于离经之血;若本身就存在肝肾不足、气血亏虚,加之骨折后出血、长期卧床,进一步损伤气血,“气为血帅”,气伤则运行不畅,气

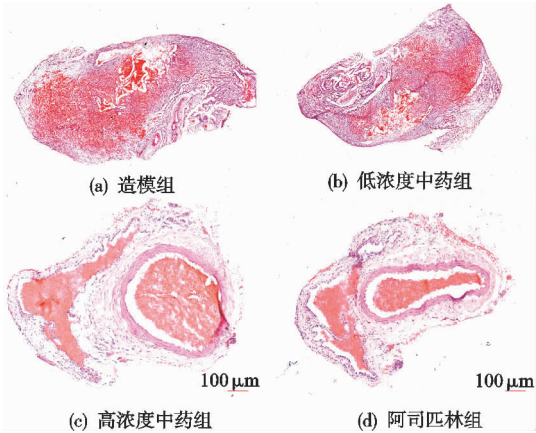


图 2 各组大鼠股静脉血管 HE 染色情况(100×)

不畅则血行滞缓,瘀血痹阻脉络,营血回流受阻,津液运化失常,水津外溢,停之肌肤则肿。因此,健脾益气、活血通络法是防止血栓形成的主要治法。

目前临床上深静脉血栓的预防措施包括药物预防和物理预防^[5],其中抗凝药物有凝血酶抑制剂、间接凝血酶抑制剂、维生素 K 拮抗剂、Xa 因子抑制剂以及中药制剂等。阿司匹林肠溶片是临床上应用最为广泛的抗血小板聚集药物,主要通过抑制 COX-1 活性,阻碍前列腺素、TxA₂ 合成,从而抑制血小板聚集;药物口服经胃肠道吸收后降解为水杨酸,从第 1 天开始逐步增加抑制 ADP 诱导的血小板聚集作用,且抑制作用在第 3 天开始稳定^[6],但长期服用往往导致消化道出血、牙龈出血等不良反应。活血化瘀中药在防治血栓栓塞性疾病方面亦取得了满意的疗效,中药可通过多途径、多环节来防止血栓形成,且不良反应少,显示良好的研究开发前景^[7]。本研究中使用的补气活血通络方采用健脾益气、活血通络的思路拟方而成,方中黄芪补气行血,扶正消瘀,为君药;当归尾活血和血,化瘀而不伤血,为臣药;党参、白术健脾益气,助脾统血,川芎、赤芍、桃仁、红花助当归尾活血祛瘀,地龙行散走窜、通经活络,均为佐药。笔者前期研究及既往研究表明^[3,8],应用补气活血通络方与低分子肝素钙比较,观察两组患者血液流变、凝血指标及下肢静脉彩超检查,得出该方可以改善老年髋部骨折围手术期血栓前状态,预防 DVT 的形成。虽然该方临床疗效确切,但其作用机制尚不明确,影响了该类方剂的应用与推广。因此,笔者设计实验探讨补气活血通络方对大鼠创伤性深静脉血栓形成的影响,研究结果表明:与造模组相比,使用高浓度中药方剂和阿司匹林灌服的大鼠患肢皮肤颜色相对红润,且静脉管腔内血栓形成更短、质地更韧,但低浓度中药组的大鼠患肢皮肤颜色较灰暗,且血栓形成的质量以及质地与造模组无明显差异。通过血管 HE 染色观察,进一步证实高浓度的补气活血通络方可以改善血管壁水肿及炎症细胞浸润情况,减少管腔内实质性血栓形成,提示高浓度补气活血通络方可以减少创伤性深静脉血栓形成,对深静脉血栓形成具有改善作用。

为探究补气活血通络方改善血栓形成的具体作用机制,笔者通过文献研究发现,深静脉血栓形成主要与血管内皮损伤后出现的炎症反应有关,内皮细胞损伤后导致一系列连锁炎症反应并释放大量炎症因素,改变局部与全身炎症反应情况,进一步激活凝血系统,导致局部血栓形成^[9-10]。血红素加氧酶是血红素氧化分解的限制酶^[11],具有 3 种亚型,包括 Hmox-1、Hmox-2、Hmox-3,其中 Hmox-1 也是热休克蛋白中的一种,可在多种刺激因素作用下高表达于血液、肌肉、脑等组织,可

以帮助内皮细胞避免细胞凋亡,也可以通过调节血管紧张系统,减轻血管过度紧张与炎症反应,是血栓形成调节网络中的重要因素^[12-14]。而本研究结果表明,补气活血通络方可以减轻大鼠深静脉创伤性损伤后肢体肿胀及血栓形成程度。在此基础上,笔者检测各组大鼠心脏血液中 Hmox-1 基因表达情况发现,低浓度和高浓度中药组中 Hmox-1 基因表达明显高于造模组,且呈现浓度依赖性增高,而阿司匹林组中 Hmox-1 基因表达相对较低,提示补气活血通络方可能是通过上调 Hmox-1 基因表达抑制创伤性深静脉血栓形成,但具体通过何种途径调节 Hmox-1 基因尚待进一步研究。

综上所述,补气活血通络方可以抑制大鼠创伤性深静脉血栓形成,该作用可能与诱导 Hmox-1 基因表达上调有关,为中医药治疗创伤性血栓性疾病提供一定理论依据和可能的研究方向。本研究仅初步探讨其可能的作用机制,对 Hmox-1 基因具体调节途径及与炎症反应的相互作用还有待进一步探究。

参考文献

- [1] ZHANG B F, WEI X, HUANG H, et al. Deep vein thrombosis in bilateral lower extremities after hip fracture: a retrospective study of 463 patients[J]. Clin Interv Aging, 2018, 13: 681-689.
- [2] 中华医学会骨科分会. 中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南[J]. 中华骨科杂志, 2016, 36(2): 65-71.
- [3] 胡钢, 严松鹤, 俞云飞, 等. 补气活血通络汤联合低分子肝素对气虚血瘀型老年髋部骨折患者血栓前状态的疗效观察[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 31-35.
- [4] 郑燕科, 李宏坤, 汤善华, 等. 创伤性深静脉血栓形成与血液中 Hmox-1 基因的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 291-295.
- [5] 孙亚萌, 刘智, 张建政. 创伤骨科患者术前下肢深静脉血栓及凝血功能动态变化规律的研究[J]. 北京医学, 2020, 42(8): 742-746.
- [6] HANKEY G J, HACKE W, EASTON J D, et al. Effect of clopidogrel on the rate and functional severity of stroke among high vascular risk patients: a prespecified substudy of the clopidogrel for high atherothrombotic risk and ischemic stabilization, management and avoidance (CHA-RISMA) trial[J]. Stroke, 2010, 41(8): 1679-1683.
- [7] 黄彭, 孟祥奇, 吴晨熙, 等. 中医药预防骨科大手术后深静脉血栓形成的研究进展[J]. 中国中医急症, 2020, 29(11): 2062-2065.
- [8] 靖金鹏, 张玥, 刘效敏, 等. 补阳还五汤预防骨科术后深静脉血栓形成的系统评价及试验序贯分析[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(20): 3267-3274.
- [9] 顾燕妮, 谢春毅. 深静脉血栓形成炎症信号通路研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(1): 113-118.
- [10] 李希玲, 李敏, 赵春花. 深静脉血栓患者血清炎症因子水平与血管损伤程度的关系[J]. 解放军预防医学杂志,

- 2018,36(10):1280-1282.
- [11] 高原,于文慧,张美君,等. Nrf2/HO-1 信号通路与缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020,26(4):776-778.
- [12] DULAK J, DESHANE J, JOZKOWICZ A, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis[J]. Circulation, 2008, 117(2): 231-241.
- [13] KIM Y M, PAE H O, PARK J E, et al. Heme oxygenase

in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 14(1): 137-167.

- [14] TAHA H, SKRZYPEK K, GUEVARA I, et al. Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells lesson from the promoter allelic variants[J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2010, 30(8): 1634-1641.

(收稿日期:2021-02-04)

(上接第 4 页)

- [15] 胡通,苑迎娇,李文静,等. BMP-2 对大鼠延迟再植牙牙周膜愈合影响的实验研究[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(12): 1411-1414.
- [16] 晋瑞,李嫚,雷喆,等. 转化生长因子- β 1 对 MC3T3-E1 小鼠成骨细胞骨形成的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(3): 378-381.
- [17] 张宇博,冯华明,黄笃,等. 老年髌部骨折患者骨密度与骨碱性磷酸酶、I 型胶原羧基端前肽、I 型胶原羧基端交联肽的相关性[J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(3): 20-23.
- [18] 才忠民,王欢,尚平,等. 前列腺素 E2 诱导大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 p38 MAPK 信号通路蛋白的表

达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2020, 55(1): 61-65.

- [19] IYYANAR P, THANGARAJ M P, EAMES B F, et al. Htra1 is a novel transcriptional target of Runx2 that promotes osteogenic differentiation[J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 53(5): 832-850.

- [20] BAGHERI L, PELLATI A, RIZZO P, et al. Notch pathway is active during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by pulsed electromagnetic fields[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(2): 304-315.

(收稿日期:2021-03-02)