

消瘀止血方对迁延期下肢深静脉血栓形成患者非活性菱形蛋白 2/解离素金属酶 17 信号通路表达的影响

马陈^{1*} 帅波^{1*} 沈霖^{1△} 卢芙蓉¹ 杨艳萍¹ 徐晓娟¹ 廖奕¹

[摘要] 目的:研究迁延期下肢深静脉血栓患者非活性菱形蛋白 2(iRhom2)/解离素金属酶 17(ADAM17)信号通路相关分子的表达变化及消瘀止血方的疗效及作用机制。方法:67 例迁延期下肢静脉血栓患者均服用消瘀止血方,另选健康体检者 50 人作为正常对照组,治疗周期均为 60 d。观察治疗前后症状、体征变化,彩色多普勒检查股静脉、腘静脉及小腿静脉丛再通情况。采用 Western Blot 法检测患者治疗前后及正常对照组的 iRhom2/ADAM17 信号通路相关分子蛋白表达水平。结果:迁延期下肢深静脉血栓形成患者 iRhom2,ADAM17 蛋白表达水平明显高于正常组($P<0.01$);pro-ADAM17 与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。消瘀止血方治疗 60 d 后,患者疼痛、皮肤色泽、肿胀及浅静脉怒张均有明显改善;iRhom2 及 ADAM17 蛋白表达明显下降,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:促炎信号通路 iRhom2/ADAM17 参与了迁延期下肢深静脉血栓形成的病理过程;消瘀止血方治疗迁延期下肢深静脉血栓形成的疗效机理之一,可能是通过调节 iRhom2/ADAM17 信号通路异常表达,降低患者血小板黏附功能这一关键靶点而实现的。

[关键词] 下肢静脉血栓形成;非活性菱形蛋白 2;解离素金属酶 17;消瘀止血方;血小板黏附

[中图分类号] R543.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)01-0011-04

Effect of Xiaoyu Zhixue Decoction on iRhom2/ADAM17 Signal Pathway Expression in Patients with Delayed Lower Extremity DVT

MA Chen^{1*} SHUAI Bo^{1*} SHEN Lin^{1△} LU Furong¹
YANG Yanping¹ XU Xiaojuan¹ LIAO Yi¹

¹ Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China.

Abstract Objective: To study the expression changes of iRhom2/ADAM17 signal pathway related molecules in patients with delayed deep venous thrombosis (DVT) of lower extremity and the efficacy and mechanism of Xiaoyu Zhixue decoction. **Methods:** 67 patients with delayed lower extremity DVT were treated with Xiaoyu Zhixue decoction, and 50 healthy persons were selected as normal control group. The treatment cycle was 60 d. The changes of symptoms and signs were observed before and after treatment, and the recanalization of femoral vein, popliteal vein and calf venous plexus were examined by color Doppler. Western Blot method was used to detect the expression of iRhom2/ADAM17 signal pathway related molecular proteins in patients before and after treatment and in normal control group. **Results:** The expression levels of iRhom2 and ADAM17 protein in patients with delayed lower extremity DVT were significantly higher than those in normal group ($P<0.01$); there was no significant difference of pro-ADAM17 compared with normal group ($P>0.05$). After 60 d of Xiaoyu Zhixue decoction treatment, the pain, skin color, swelling and superficial vein engorgement of patients were significantly improved; the expression of iRhom2 and ADAM17 protein were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion:**

The inflammatory signal pathway iRhom2/ADAM17 is involved in the pathological process of delayed lower extremity DVT; one of the therapeutic mechanisms of Xiaoyu Zhixue decoction in treating delayed DVT of lower extremity may be achieved through regulating the abnormal expression of iRhom2/ADAM17 signal pathway and inhibiting platelet adhesion function.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81673761, 81974546, 82004201)

¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科(武汉, 430022)

*同等贡献,并列第一作者

△通信作者 E-mail: shenlinhb@sina.cn

Keywords: lower extremity deep venous thrombosis; inactive rhomboid-like protein 2; disintegrin and metalloprotease 17; Xiaoyu Zhixue decoction; platelet adhesion

下肢深静脉血栓形成(Lower Extremity Deep Venous Thrombosis, LDVT)属于中医“股肿”“脉痹”等证,就其病机,乃血瘀滞塞脉道所致。笔者前期研究表明^[1],消瘀止血方治疗 LDVT 慢性期疗效较好,其机理之一与该方可明显降低患者血清肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)及解离素金属酶 17(a Disintegrin and Metalloprotease, ADAM17)表达水平有关。近年来研究发现,非活性菱形蛋白 2(Inactive Rhomboid-like Protein 2, iRhom2)是 ADAM17 关键的耦合子,并调控其释放促炎性细胞因子 TNF- α 的活性^[2-3]。为此,本文检测了迁延期下肢深静脉血栓形成患者 iRhom2/ADAM17 蛋白的表达变化,旨在探讨 iRhom2/ADAM17 信号通路是否参与了下肢深静脉血栓形成病理过程及消瘀止血方治疗本病的疗效机理,现报告如下。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 10 月至 2019 年 5 月本院中西医结合骨伤专科门诊确诊的迁延期下肢深静脉血栓形成患者 67 例作为治疗组,另选来本院体检中心经专科检查,下肢静脉及血小板聚集功能检测均无异常发现的体检者 50 人作为正常对照组。

1.2 诊断标准

按照中国中西医结合学会周围血管疾病专业委员会制定的下肢深静脉血栓形成诊断标准(2015 年修订稿)^[4]。

1.3 纳入标准

1)符合上述诊断标准;2)因胸腰椎骨折,下肢骨折后长期卧床者;3)旅行久坐交通工具者;4)原因不明的血小板聚集率升高者。所有纳入患者及其家属对本实验知情同意,并得到华中科技大学同济医学院伦理委员会的批准。

1.4 排除标准

入选患者均排除急性动脉栓塞、急性淋巴管炎、丹毒、原发性盆腔肿瘤、小腿损伤性血肿、小腿纤维组织炎等疾病。

1.5 方法

1.5.1 治疗方法 1)中药治疗 患者均给服消瘀止血方^[1]治疗。本方由黄芪 20 g,党参 20 g,当归 20 g,白芍药 10 g,桃仁 10 g,甘草 6 g 组成。由本院门诊中药房煎制,每天 1 剂,分 2 次服用。10 d 为 1 个疗程,治疗 6 个疗程后,观察疗效。中药治疗期间停用其他

溶栓、抗凝、祛聚和活血化瘀等功效的中、西药物。

2)弹力袜治疗 所有患者行走活动时均使用医用弹力袜(舒尔美 SOUERMEI,北京康达人和科技有限公司,二类注册证号为国械注许 20162640418 号)。

1.5.2 疗效评定方法 参照中国中西医结合学会周围血管疾病专业委员会制定的下肢深静脉血栓形成疗效标准(2015 年修订稿)^[4]评定近期疗效。

疾病疗效判定标准:痊愈为临床症状、体征消失或基本消失,证候积分减少 $\geq 90\%$;显效为临床症状、体征明显改善,证候积分减少 $\geq 70\%$ 且 $< 90\%$;有效为临床症状、体征均有好转,证候积分减少 $\geq 30\%$ 且 $< 70\%$;无效为临床症状、体征无明显改善,甚至加重,证候积分减少不足 30%。

单项症状疗效判定标准:临床痊愈为症状消失,积分降至 0 分;显效为症状明显改善,积分降低 2 个等级;有效为症状有所改善,积分降低 1 个等级;无效为症状无改善或加重,积分未减少或有所增加。

1.5.3 观察方法 观察治疗前后症状、体征变化,彩色多普勒检查股静脉、腘静脉及小腿静脉丛再通情况。

1.5.4 蛋白印迹法(Western Blot)检测 iRhom2 和 ADAM17 表达 主要抗体 iRhom2(货号 Ab116139)、ADAM17(货号 Ab39162)、pro-ADAM17(货号 Ab75181)均为 Abcam 公司产品;GAPDH(货号 2118)为 CST 公司产品;二抗(货号 PAB150011)为 BIOSWAMP 公司产品。真空采血管采集中、西药治疗前后患者及正常对照组的外周血后,加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,4℃裂解 30 min。以 1.2×10^4 r/min 离心 15 min 后,收集上清,使用 Bradford 法测定蛋白浓度,−80℃保存。上样前加入上样缓冲液,95℃煮沸 5 min。每个样本取 30 μ g 蛋白上样,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白并转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉常温封闭 30 min 后,加入 iRhom2,ADAM17 和 pro-ADAM17 一抗,4℃孵育过夜。洗涤后加入辣根过氧化物酶连接的二抗,室温下孵育 45 min。ECL-Plus 显影曝光,用图像分析软件将其扫描并测定灰度值。

1.6 统计学方法

采用 Excel 统计软件处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 一般资料

纳入治疗组研究的患者共 67 例,其中男 41 例,女 26 例;年龄 53~76 岁,平均(62.70 \pm 11.59)岁;病程

26~86 d,平均(44.87±29.23)d;左下肢 31 例,右下肢 28 例,双下肢 8 例。正常对照组共 50 例,男 30 例,女 20 例,平均年龄(58.38±13.51)岁。

2.2 临床疗效

治疗期间有 7 例患者违反方案,使用了迈之灵、三七皂甙、复方丹参片、丹红注射液等药物被剔除。实际参入临床疗效统计者共 58 例,其中治愈 12 例,显效 31 例,有效 9 例,无效 6 例,总有效率为 89.7%。

2.3 治疗前后单项症状、体征疗效

消瘀止血方治疗后,患者疼痛、皮肤色泽、肿胀及浅静脉怒张均有明显改善,见表 1。

表 2 治疗前后多普勒检测结果比较(例)

时间	股静脉			腘静脉			小腿静脉丛		
	完全 闭塞	小部 通畅	大部分 通畅	完全 闭塞	小部 通畅	大部分 通畅	完全 闭塞	小部 通畅	大部分 通畅
治疗前	18	19	5	23	24	7	4	11	8
治疗后	6	20	11	21	4	28	19	7	5

ADAM17蛋白表达水平明显高于正常组,差异有统计学意义($P<0.01$);pro-ADAM17 与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。消瘀止血方治疗 60 d 后,iRhom2 及 ADAM17 蛋白表达明显下降,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1。

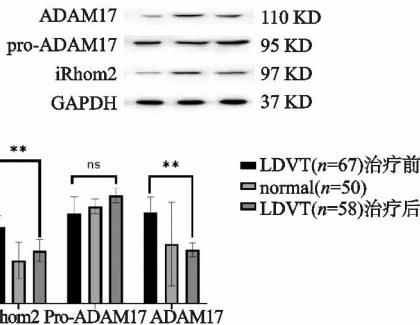


图 1 Western Blot 检测 LDVT 患者 iRhom2, ADAM17, pro-ADAM17 蛋白表达结果

3 讨论

下肢深静脉血栓形成临床上分为急性期、迁延期和后遗症期^[4]。急性期病程在 72 h 之内者可使用溶栓药物,甚至手术取栓治疗^[5]。迁延期为发病后 14 d~3 个月^[4],临床上多采用卧床休息,抬高患肢,穿着长统弹力袜;长期使用抗凝药如华法林等;辅助使用祛聚药物,如阿司匹林、潘生丁等,稀释血液、降低血液黏稠度,防止血小板凝集;对于疼痛肿胀和静脉炎者,使用迈之灵或非甾体消炎止痛药物,如吲哚美辛、双氯芬酸钠、吡罗昔康等。甚至消极等待血管再通,静脉瓣膜破坏后再进行瓣膜成形、瓣膜移植等治疗,往往错过最佳治疗时机从而导致患者后遗症期症状较重^[6]。本研究纳入病例多数已在本院骨外科及血管外

表 1 治疗前后单项症状、体征疗效(例)

症状与体征	例数	临床痊愈	显效	有效	无效	愈显率/%
患肢肿胀	58	16	25	11	6	70.69
患肢疼痛	58	36	16	4	2	89.67
皮肤色泽	41	21	14	5	1	85.37
浅静脉怒张	39	12	16	5	6	71.79

2.4 治疗前后多普勒检测结果

消瘀止血方治疗后,腘静脉完全闭塞的再通率最高(82.7%),其次为股静脉(66.7%),再次为小腿静脉丛(54.5%),见表 2。

2.5 治疗前后 iRhom2 和 ADAM17 蛋白表达变化

迁延期下肢深静脉血栓形成患者 iRhom2,

科住院或门诊治疗期间,经过系统溶栓、抗凝、祛聚等综合疗法;全部患者均先后使用过华法林、迈之灵、阿司匹林、血栓通、丹红注射液及川芎嗪注射液等药物,迁延未愈而要求用中药煎剂治疗。

近年来中医药治疗在改善迁延期下肢深静脉血栓患者临床症状、降低并发症方面取得了显著的疗效^[7]。中医认为迁延期下肢深静脉血栓形成的病机为气虚血瘀,此期热邪渐去,气虚运血无力,血行缓慢导致血瘀。气血运行不畅,瘀血阻络经脉,日久则致股肿。治宜益气活血,消瘀止血。本课题组拟定的消瘀止血汤由黄芪、党参、当归、白芍、桃仁、甘草 6 味中药组成,其中黄芪、党参健脾益气生血,当归、白芍养血活血,桃仁化瘀通脉,甘草调和诸药,诸药合用具有益气生血、化瘀通脉之功效。本研究结果显示用该方治疗本病,在患肢肿胀、疼痛、皮肤色泽及浅静脉怒张的症状或体征,恢复病变静脉再通率等方面均有明显改善。

ADAM17 又称 TNF-α 转化酶(Tumor Necrosis Factor-α Converting Enzyme, TACE),主要作用之一就是 TNF-α 的加工与释放^[8]。ADAM17 的上游分子伴侣 iRhom2 能够特异地调节 ADAM17 转运、活化及胞外段蛋白水解功能^[2-3]。iRhom2 首先在内质网与 ADAM17 前体蛋白(pro-ADAM17)直接结合,一起转运至高尔基体,pro-ADAM17 水解掉一段 N 端结构域,转化为成熟 pro-ADAM17,最后定位于细胞膜^[9]。ADAM17 可在巨噬细胞、淋巴细胞和单核细胞中合成的 TNF 前体(pro-TNF)的胞外段水解,切割成分泌型的全身性炎症因子 TNF-α,是多种疾病的病理性损害^[8]因素之一,包括下肢深静脉血栓形成^[1]。

为此,在前期研究^[1]显示下肢深静脉血栓形成慢

性期患者血清 ADAM17 和 TNF- α 高表达基础上,采用蛋白印迹法观察其上游促炎信号通路 iRhom2/ADAM17 在迁延期下肢深静脉血栓形成患者中的表达,并与正常体检者进行对照。结果显示迁延期下肢深静脉血栓形成患者 iRhom2 及 TACE 蛋白表达水平均明显高于正常人群,表明 iRhom2/ADAM17 信号通路异常表达参与了下肢深静脉血栓形成的病理过程。本实验迁延期下肢深静脉血栓形成患者和正常体检者 pro-ADAM17 差异无统计学意义,进一步提示迁延期下肢深静脉血栓形成患肢肿胀、疼痛发生或加重的机理之一,是 iRhom2 通过与无活性的 ADAM17 前体蛋白结合后,激活 iRhom2/ADAM17 信号通路,释放 TNF- α , 导致患肢炎性肿痛和深静脉炎。

此外,有研究表明^[10] ADAM17 还可介导血小板膜糖蛋白(Glycoprotein,GP)Ib-IV-V 及其亚基 GP I b α 的水解活性。GPIb-IV-V 作为凝血酶和血管性血友病因子(von Willebrand Factor,VWF)和共同受体一旦水解,可释放出可溶性 GP V 片段,使血小板在高速血流条件下,以滚动方式黏附与损伤血管内皮,诱发血栓形成^[11-12]。

本研究结果显示消瘀止血方治疗后患者 iRhom2/ADAM17 蛋白表达水平明显下降,这一方面有利于改善患肢炎性水肿对深静脉的压迫和静脉炎,有利于病变血管内皮及瓣膜的修复;另一方面,可降低患者异常的血小板活化和黏附,减少新的小血栓形成。这在一定程度上可以解释尽管本方没有溶栓功能,但有促进迁延期下肢深静脉血栓的再通作用。

值得指出的是本研究未设置对照组,究其原因因为下肢深静脉血栓形成有并发肺栓塞风险,如诊疗不及时会遗留血栓形成后综合征(post-Thrombotic Syndrome,PTS),发生小腿皮肤溃疡等。从伦理角度,本研究不宜设阳性药物对照组。由于本研究纳入的全部患者均先后使用了祛聚药物,迁延未愈而转诊要求用中药煎剂治疗,从患者依从性角度,设置阳性药物对照组在本研究中亦无临床可行性。

参考文献

[1] 凌家艳,沈霖,刘庆. 消瘀止血方治疗下肢深静脉血栓形

成慢性期临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志,2013,21(10):42-43.

- [2] XU M X,GE C X,QIN Y T,et al. Multicombination approach suppresses listeria monocytogenes-induced septicemia-associated acute hepatic failure; the role of iRhom2 signaling[J]. Adv Healthc Mater,2018,7(17):e1800427.
- [3] BADENES M,ADRAIN C. iRhom2 and TNF:partners or enemies? [J] Sci Signal,2019,12(605):eaaz 0444.
- [4] 中国中西医结合学会周围血管疾病专业委员会. 下肢深静脉血栓形成诊断及疗效标准(2015 年修订稿)[J]. 中国中西医结合外科学杂志,2016,22(5):520-521.
- [5] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南[J]. 中国血管外科杂志(电子版),2017,19(4):250-257.
- [6] 付赢,李义,郎彦波,等. 脉炎宁颗粒治疗下肢深静脉血栓形成迁延期疗效观察[J]. 山西中医,2016,32(7):21-24.
- [7] 回雪颖,郭伟光,滕林,等. 下肢深静脉血栓形成的中医研究进展[J]. 中医药学报,2020,48(5):66-69.
- [8] DUSTERHOFT J S,BABENDREYER A,GIESE A A,et al. Status update on iRhom and ADAM17:it's still complicated[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,2019,1866(10):1567-1583.
- [9] CAVADAS M,OIKONOMIDI I,GASPAR C J,et al. Phosphorylation of iRhom2 controls stimulated proteolytic shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE[J]. Cell Rep,2017,21(3):745-757.
- [10] MATTHEWS A L,NOY P J,REYAT J S,et al. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17:the emerging role of tetraspanins and rhomboids[J]. Platelets,2017,28(4):333-341.
- [11] DOBIE G,KURIRI F A,OMAR M,et al. Ibrutinib, but not zanubrutinib, induces platelet receptor shedding of GPIb-IV-V complex and integrin α II b β 3 in mice and humans[J]. Blood Adv,2019,3(24):4298-4311.
- [12] JANDROT-PERRUS M,HERMANS C,MEZZANO D. Platelet glycoprotein VI genetic quantitative and qualitative defects[J]. Platelets,2019,30(6):708-713.

(收稿日期:2020-07-13)

广告目次

1. 广东省医药进出口公司珠海公司

同息通 封三

2. 陕西盘龙药业集团股份有限公司

盘龙七片 封四