

香丹注射液和清开灵注射液联合用药对急性炎症血栓模型大鼠脏器的保护作用

李春英, 易艳, 赵雍, 张宇实, 韩佳寅, 刘素彦, 梁爱华*

(中国中医科学院中药研究所中药鉴定与安全性检测评估北京市重点实验室,
创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:基于血栓变化、炎性指标、脏器功能和病理改变等考察香丹注射液(Xiangdan injection, XDI)和清开灵注射液(Qingkailing injection, QKLI)联合用药在炎症血栓动物模型的治疗上是否具有协同增效作用。方法:100只雄性SD大鼠,根据体质量随机分为正常组,炎症血栓模型组,XDI组(2.5, 5 mL·kg⁻¹),QKLI组(5, 10 mL·kg⁻¹),XDI+QKLI组[(2.5+5) mL·kg⁻¹, (2.5+10) mL·kg⁻¹, (5+5) mL·kg⁻¹, (5+10) mL·kg⁻¹,每组10只大鼠。各组均腹腔注射给与相应注射液,每天1次,共4 d,正常组和模型组注射生理盐水。给药第2天,除正常组外,其余各组大鼠均造模,即先采用25 mg·kg⁻¹角叉菜胶腹腔注射入大鼠体内,16 h后大鼠再尾静脉注射50 μg·kg⁻¹脂多糖(LPS)。注射LPS 24 h后,各组大鼠测定肝脏指数、肾脏指数,测定血小板(PLT)数量,测量血栓长度,全自动生化分析仪测定各项肝肾功能天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),碱性磷酸酶(ALP),肌酐(Crea)及尿素氮(BUN),酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测炎性因子白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量,苏木素-伊红(HE)染色观察心、肝、肺、肾脏组织病理学变化,以及观察脏器病变分级情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠PLT数量显著下降,大鼠尾部血栓长度显著增加,肝脏指数显著升高,肝肾功能ALT,ALP,BUN含量明显升高,IL-6和TNF-α含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),肝、肺、肾脏组织出现明显病理损伤($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,XDI 5 mL·kg⁻¹组明显降低大鼠血清ALT和ALP含量($P<0.05$, $P<0.01$),QKLI 5, 10 mL·kg⁻¹组大鼠血清ALT,ALP和TNF-α含量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),XDI 5 mL·kg⁻¹和QKLI 10 mL·kg⁻¹单独用药均对LPS引起的肺脏病变损伤有明显减轻作用($P<0.05$);XDI和QKLI合用后,明显降低大鼠的ALT,AST,ALP和TNF-α含量,尤其是XDI和QKLI合用(5+10) mL·kg⁻¹组效果最为明显($P<0.05$, $P<0.01$),并且大鼠尾部血栓长度明显缩短($P<0.05$),肺脏病变程度也减轻($P<0.05$)。与部分相同剂量XDI或QKLI单用组比较,两药合用后,大鼠血清ALT,BUN,TNF-α含量和肝脏指数都明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:XDI和QKLI单独用药对炎症血栓模型大鼠的脏器功能和器质损害及炎症反应有一定改善作用和抑制作用。两者合用后相对于单独用药,对于减少静脉血栓长度,改善肝肾功能,降低炎性因子,保护肺、肝、肾等脏器结构都有一定协同增效作用。

[关键词] 香丹注射液;清开灵注射液;炎症;血栓;联合用药

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0080-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212302

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211015.1614.004.html>

[网络出版日期] 2021-10-18 10:24

Synergistic Effect of Xiangdan Injection and Qingkailing Injection on Organ Injury Caused by Acute Inflammation and Thrombosis in Rats

LI Chun-ying, YI Yan, ZHAO Yong, ZHANG Yu-shi, HAN Jia-yin, LIU Su-yan, LIANG Ai-hua*

(Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety of Chinese Medicine, State Key Laboratory of Innovative Natural Medicine and Traditional Chinese Medicine Injections, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 20210719(006)

[基金项目] 中国中医科学院基金项目(C12021A04801,ZZ-13-035-10,GH201919);中国中医科学院中药研究所基金项目(ZXKT20022,ZXKT19014);中国中医科学院中医药“一带一路”合作专项(GH201919)

[第一作者] 李春英,副主任技师,从事中药药理学与毒理学研究,E-mail:cyli@icmm.ac.cn

[通信作者] *梁爱华,研究员,博士生导师,从事中药药理学与毒理学研究,E-mail:ahliang@icmm.ac.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the synergistic effect of Xiangdan injection (XDI) and Qingkailing injection (QKLI) in the treatment of inflammation and thrombosis animal model based on changes of thrombus, inflammatory indexes, organ function, and pathological changes. **Method:** A total of 100 male SD rats were randomly divided into a normal control group, a model group, XDI groups (2.5, 5 mL·kg⁻¹), QKLI groups (5, 10 mL·kg⁻¹), and XDI + QKLI groups [(2.5+5) mL·kg⁻¹, (2.5+10) mL·kg⁻¹, (5+5) mL·kg⁻¹, and (5+10) mL·kg⁻¹] according to the body weight, with 10 rats in each group. Rats were treated correspondingly by intraperitoneal injection once a day for 4 days. The normal control group and the model group received normal saline. On the second day of administration, the model was induced in rats except those in the normal control group. Specifically, 25 mg·kg⁻¹ carrageenan was injected intraperitoneally into the rats, followed by an injection of 50 μg·kg⁻¹ lipopolysaccharide (LPS) through the tail vein 16 hours later. Twenty-four hours after LPS injection, the rats were detected for liver index, kidney index, the number of platelets (PLT), thrombus length, and biochemical indicators such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), creatinine, and blood urea nitrogen (BUN). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the content of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of heart, liver, lung, and kidney, as well as the grading of organ injury. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed decreased PLT, lengthened thrombus in the tail, increased liver index, elevated content of ALT, ALP, BUN, IL-6, and TNF-α ($P<0.05$, $P<0.01$), and damaged liver, lung, and kidney tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the conditions in the model group, XDI at 5 mL·kg⁻¹ reduced serum ALT and ALP in rats ($P<0.05$, $P<0.01$), QKLI at 5 and 10 mL·kg⁻¹ reduced serum levels ALT and ALP, and TNF-α content ($P<0.05$, $P<0.01$). XDI at 5 mL·kg⁻¹ or QKLI at 10 mL·kg⁻¹ relieved the LPS-induced lung injury ($P<0.05$), the combination of XDI and QKLI decreased the levels of ALT, AST, ALP, and TNF-α, and the effect was predominant in the combination of XDI and QKLI at 5 and 10 mL·kg⁻¹ ($P<0.05$, $P<0.01$). Additionally, the length of the tail thrombus was significantly shortened ($P<0.05$), and the degree of lung injury was also reduced ($P<0.05$). The serum levels of ALT and BUN, TNF-α content, and liver index of rats were reduced after the combination of XDI and QKLI as compared with those in the single drug groups at the same dose ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** XDI or QKLI can improve or inhibit organ function, organ injury, and inflammatory response in the rat model of inflammation and thrombosis. The combination of the two drugs shows a synergistic effect in reducing the length of venous thrombus, improving liver and kidney function, inhibiting inflammatory factors, and protecting lung, liver, kidney, and other organs.

[Keywords] Xiangdan injection; Qingkailing injection; inflammation; thrombus; drug combination

脂多糖(LPS)和角叉菜胶诱导的炎症血栓模型^[1-2],主要由炎症诱发弥散性血管内凝血(DIC),同时促进血栓形成。炎症与血栓具有互相促进的关系。已证明炎症介质可通过多种途径促进凝血过程,最终导致凝血级联反应的活化^[3],加速血栓的形成,而血栓形成后又会导致炎症反应的进一步放大^[4-5],上述事件最终会造成体内多种脏器结构和功能的损害。香丹注射液(Xiangdan injection, XDI)是丹参和降香经提煉制取的中药复方制剂,具有活血化瘀、通脉养心的功效,既往主要用于心血管疾病方面的治疗,近年来发现其对急性胰腺炎^[6]、过敏性紫癜^[7]等疾病也发挥了较好的临床疗效,研究表明

其具有抗炎、抗凝、抗缺氧、抗凋亡等多种生物学作用。清开灵注射液(Qingkailing injection, QKLI)是临床应用最广泛的中药注射剂之一,其药理作用广泛^[8],具有清热解毒、醒神开窍、镇惊安神、化痰通络的功效,前期研究也证实其具有明显的抗炎性因子和血栓的作用^[9]。由于上述二者中药注射剂均具有抗炎和抑制血栓形成的作用,但两样合用后是否在抑制机体炎症血栓反应、保护脏器功能方面具有协同作用,目前还没有相关报道,本研究大鼠炎症血栓模型,考察XDI和QKLI单独及联合应用对炎症反应,血栓形成及器官损伤的影响及其可能机制,为进一步明确XDI和QKLI各自和联合对抗炎抗血

栓,保护脏器功能的作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 药品和试剂 XDI(河南龟山神草药业有限公司,批号011115),QKLI(神威药业有限公司,批号03101711)。角叉菜胶,LPS来源于大肠杆菌*Escherichia coli* O111:B4,伊红(美国Sigma公司,批号分别为12H1227,97H1048,STBG5385V);白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国BD公司,批号分别为65663,66816);血细胞计数分析所用的稀释液、溶血剂(烟台三得科技有限责任公司,批号03072500);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),肌酐(Crea),尿素氮(BUN)生化指标分析试剂(北京北化康泰临床试剂有限公司,批号分别为030917,030818,070261,030917,030918);苏木素染液(北京雷根生物技术有限公司,批号0118A16)。

1.2 动物 100只SD大鼠,雄性,体质量180~200g,SPF级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0001。动物实验经中国中医科学院中药研究所伦理委员会批准。大鼠于实验前适应性饲养1d,温度20~23℃,相对湿度40%~70%,12h明暗周期照明。动物自由饮用纯净水,喂饲大小鼠颗粒饲料(北京市科奥协力饲料有限公司)。

1.3 仪器 MEK-6318K型全自动血球计数仪(日本光电株式会社);VarioskanFlash型多功能酶标仪(美国Thermo Scientific公司);TP1020型全自动脱水机,RM2135型切片机,Humanlyser 2000型生化分析仪(德国Leica公司);BX53型显微镜及图像分析系统(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 药物剂量设置 根据说明书,XDI临床最大剂量20 mL·d⁻¹,QKLI临床最大剂量40 mL·d⁻¹。人按平均体质量65 kg计,则XDI最高给药剂量为0.31 mL·kg⁻¹,QKLI最高给药剂量为0.62 mL·kg⁻¹。根据徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中人和动物间体表面积折算的等效剂量比值,则XDI最大给药剂量的大鼠等效剂量为2 mL·kg⁻¹(0.31×6.3),本次实验中XDI剂量设置分别为2.5,5 mL·kg⁻¹;QKLI最大给药剂量的大鼠等效剂量为4 mL·kg⁻¹(0.62×6.3),QKLI剂量设置分别为5,10 mL·kg⁻¹;QKLI和XDI的给药剂量都相当于临床最高剂量的1.25和2.5倍。

2.2 动物分组及造模给药 雄性SD大鼠按体质量随机分为10组,每组10只大鼠。各组分别为正常组,模型组,XDI 2.5,5 mL·kg⁻¹组,QKLI 5,10 mL·kg⁻¹,XDI 2.5 mL·kg⁻¹+QKLI 5 mL·kg⁻¹组,XDI 2.5 mL·kg⁻¹+QKLI 10 mL·kg⁻¹组,XDI 5 mL·kg⁻¹+QKLI 5 mL·kg⁻¹组,XDI 5 mL·kg⁻¹+QKLI 10 mL·kg⁻¹组。

造模前,各组动物均先每日上午腹腔注射XDI,QKLI或XDI+QKLI 1次,连续给药4d,正常组和模型组注射生理盐水。给药第2天除正常组外,其余各组大鼠均腹腔注射角叉菜胶25 mg·kg⁻¹,16h后,除正常组外,各组均经尾静脉注射LPS 50 μ g·kg⁻¹[12]。

2.3 样本收集和各项指标检测 注射LPS后24h,大鼠腹腔注射50 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠溶液进行麻醉后,腹主动脉取血,之后摘取主要脏器(包括心脏、肝脏、肺、肾脏)并将这些脏器称重(脏器指数=脏器质量/体质量)后,浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定。部分血液用EDTA-K₂抗凝后用全自动血细胞计数仪测定外周血PLT数目;部分血液不抗凝,3 500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm)后,分离血清,用全自动生化分析仪测定各项肝肾功能指标,包括AST,ALT,ALP,Crea,BUN;根据说明书用ELISA试剂盒测定血浆炎症因子TNF- α 和IL-6含量。用游标卡尺测量尾部血栓(黑尾)长度。

2.4 组织形态学观察 各脏器组织固定后,常规脱水、透明,石蜡包埋切片并进行HE染色,光学显微镜下观察其病理形态学改变。各器官病理学诊断标准见表1。

2.5 统计学处理 采用SPSS 20.0统计软件对实验数据进行分析。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,各组织脏器病理学分级采用非参数秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对炎症血栓模型大鼠外周血PLT及肝肾功能的影响 给予LPS造模后,与正常组比较,模型组大鼠在给予LPS后24h外周血中的PLT显著下降($P<0.01$),血清中ALT,BUN和ALP都明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,QKLI 5 mL·kg⁻¹组明显升高PLT数目($P<0.05$),XDI 5 mL·kg⁻¹组明显降低大鼠血清ALT和ALP含量($P<0.05$, $P<0.01$),QKLI 5,10 mL·kg⁻¹组显著降低大鼠血清ALT,AST含量($P<0.01$),QKLI 5 mL·kg⁻¹组显著降低大鼠血清ALP含量($P<0.01$),差异有显著统计学

表1 心、肝、肺、肾脏器病变分级标准

Table 1 Grading standard for pathological changes of heart, liver, lung and kidney

分级	心	肝	肾	肺
—	正常,无明显病变	同前	同前	同前
+	部分心肌组织肿胀	少部分动物肝细胞轻度肿胀,胞质疏松,胞核浓染,有单个细胞的嗜酸性变	肾曲管有片状上皮细胞肿胀,未见有上皮脱落	肺间质有轻度炎症,有1~2个小静脉内有血栓
++	心肌组织肿胀,血管内有轻度瘀血	部分动物肝窦扩张,中央静脉周围的肝细胞有浊肿,胞质疏松,有灶状炎症细胞浸润,汇管区胆管增生	肾曲管上皮有不同程度肿胀,个别肾集合管有少量炎症,管内有少量蛋白管型	肺间质有以淋巴细胞或中性粒细胞为主的炎症细胞浸润
+++	心肌细胞肿胀,间质渗出,充血,血管内有血栓	大部分肝中央静脉扩张,周围有大面积肝细胞肿胀,有大片状炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主,有片状肝细胞核浓染,并有坏死形成,失去正常肝小叶结构,个别汇管区胆管增生	部分肾间质有轻度炎症,近、远曲小管上皮有肿胀,个别肾集合管有少量蛋白颗粒,管腔内未见有脱落	肺间质或细支气管内有明显炎症,血管内渗出及有血栓形成

意义;XDI和QKLI联合用药后,明显降低大鼠的ALT,AST,ALP含量,尤其是XDI和QKLI合用5+

10 mL·kg⁻¹组效果最为明显($P<0.05$, $P<0.01$),差异有明显统计学意义。见表2。

表2 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠外周血PLT数目及肝肾功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on PLT content in peripheral blood, liver and kidney function of endotoxemia rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	PLT/ $\times 10^9$ 个/L	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	Crea/mg·dL ⁻¹	BUN/mg·dL ⁻¹
正常模型		569.11±206.11	57.87±5.51	260.27±34.45	37.38±10.94	14.87±3.99	16.52±3.06
		228.22±82.84 ²⁾	71.73±7.95 ²⁾	258.48±34.44	49.13±8.78 ¹⁾	15.23±2.64	27.58±9.67 ²⁾
XDI	2.5	285.83±122.65	61.35±15.83	229.38±39.80	41.20±9.95	17.64±3.80	39.73±19.62
	5	229.08±96.96	53.53±13.94 ⁴⁾	392.46±580.21	38.54±10.19 ³⁾	17.59±4.12	38.42±22.09
QKLI	5	323.42±104.39 ³⁾	61.92±8.27 ⁴⁾	195.39±38.62 ⁴⁾	33.81±12.19 ⁴⁾	18.84±4.26 ³⁾	31.92±15.33
	10	237.82±105.87	54.41±14.40 ⁴⁾	206.60±42.10 ⁴⁾	47.29±14.11	16.67±3.34	35.15±19.60
XDI+QKLI	2.5+5	302.45±158.83	51.74±12.59 ^{4,8)}	209.49±41.39 ⁴⁾	43.13±14.86	18.49±2.55 ³⁾	26.15±9.25 ⁵⁾
	2.5+10	271.92±131.74	61.13±33.01	196.76±56.73 ⁴⁾	44.64±18.62	17.28±2.52	29.97±12.96
	5+5	302.18±113.03	49.01±6.55 ^{4,8)}	179.65±18.73 ⁴⁾	42.88±12.27	18.48±4.62	20.35±5.73 ^{5,7)}
	5+10	296.18±140.98	53.82±11.42 ³⁾	177.07±23.81 ⁴⁾	35.68±7.42 ^{4,7)}	17.49±1.88 ³⁾	23.57±14.61

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与同剂量XDI组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与同剂量QKLI组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$ (表3~5同)。

3.2 对炎症血栓模型大鼠尾部血栓长度及肝肾质量指数的影响 与正常组比较,模型组血栓长度和肝脏指数显著增加($P<0.01$);与模型组比较,联合用药XDI+QKLI (2.5+5) mL·kg⁻¹组和(5+5) mL·kg⁻¹组明显降低血栓长度($P<0.05$),联合用药XDI+QKLI (2.5+5) mL·kg⁻¹组和(5+10) mL·kg⁻¹组明显降低肝脏指数($P<0.05$)。见表3。

3.3 对炎症血栓模型大鼠血清TNF- α 和IL-6含量的影响 与正常组比较,模型组IL-6和TNF- α 含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,联合用药XDI+QKLI (2.5+5) mL·kg⁻¹组和(2.5+10) mL·kg⁻¹组明显降低IL-6含量($P<0.05$),QKLI

5 mL·kg⁻¹组和10 mL·kg⁻¹组明显降低TNF- α 含量($P<0.05$),联合用药XDI+QKLI (2.5+10) mL·kg⁻¹组,(5+5) mL·kg⁻¹组和(5+10) mL·kg⁻¹组明显降低TNF- α 含量($P<0.05$)。见表4。

3.4 对炎症血栓模型大鼠心、肝、肺、肾脏组织病理学变化的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝、肺、肾脏组织病理变化分级标准明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),差异有明显统计学意义;与模型组比较,XDI 5 mL·kg⁻¹组和QKLI 10 mL·kg⁻¹,以及联合用药组XDI+QKLI (2.5+10) mL·kg⁻¹组,(2.5+10) mL·kg⁻¹组和(5+10) mL·kg⁻¹组明显降低大鼠肺脏组织病理变化分级标准($P<0.05$)。见表5,图1~4。

表3 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠尾部血栓长度及肝肾质量指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on liver and kidney index of endotoxemia rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	血栓长度/cm	肝脏指数	肾脏指数
正常		0	3.42±0.35	0.93±0.05
模型		7.37±4.52 ²⁾	4.25±0.52 ²⁾	1.01±0.13
XDI	2.5	5.60±5.31	4.18±0.20	1.04±0.11
	5	3.79±6.06	4.15±0.34	1.02±0.08
QKLI	5	3.32±3.46	3.95±0.28	1.00±0.13
	10	3.37±3.72	3.91±0.38	1.05±0.14
XDI+QKLI	2.5+5	2.33±3.84 ³⁾	3.74±0.37 ^{3,6)}	0.91±0.30
	2.5+10	5.27±5.50	4.03±0.33	1.03±0.12
	5+5	2.28±3.99 ³⁾	3.93±0.36	1.02±0.089
	5+10	5.12±7.19	3.78±0.21 ^{3,6)}	0.99±0.06

表4 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠血清TNF-α和IL-6含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on TNF-α and IL-6 contents in endotoxemia rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) μg·L⁻¹

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	IL-6	TNF-α
正常		0.005±0.015	0.031±0.049
模型		4.696±4.022 ²⁾	0.561±0.531 ¹⁾
XDI	2.5	4.562±4.359	0.341±0.212
	5	3.969±2.858	0.363±0.317
QKLI	5	1.182±1.208	0.135±0.110 ³⁾
	10	1.299±2.014	0.051±0.058 ³⁾
XDI+QKLI	2.5+5	1.828±2.046 ³⁾	0.189±0.170
	2.5+10	3.570±2.655 ³⁾	0.134±0.121 ³⁾⁵⁾
	5+5	2.413±3.210	0.114±0.138 ³⁾⁵⁾
	5+10	1.694±1.975	0.093±0.102 ³⁾⁵⁾

4 讨论

现代研究认为,体内炎症—凝血存在密切关系,一方面炎症促进血液高凝状态,易导致血栓形成;另一方面血栓形成中的物质也可引起炎症。病原微生物本身及其某些组份(如内毒素)可激活如单核细胞、血管内皮细胞等,使其释放多种炎性介质如IL-6, TNF-α等,从而产生一系列炎症反应;另外病原微生物及其组份也可直接和(或)间接促使上述效应细胞上调组织因子(TF)表达,TF的作用主要是在凝血发生时将凝血酶原转化为凝血酶,从而启动凝血过程,引起血栓形成。并且,炎症反应引起的补体激活、凋亡和坏死亦可为凝血的启动和扩大提供途径,从而使机体处于高凝状态。此外,炎症介质不仅可以通过凝血来形成血栓,并且能够

抑制抗凝血酶、组织因子途径抑制物和蛋白C系统等抗凝物质的表达和功能来促进血栓形成。另一方面,凝血酶能刺激内皮细胞释放血小板活化因子(PAF),后者是中性粒细胞的强激活剂。凝血酶活化血小板后,可使其释放CD40配体,促进白细胞释放组织因子及炎性介质等,另外凝血级联反应生成的纤维蛋白单体也可以调控炎症的某些因素。综上所述,炎症物质能够促进凝血,凝血过程中的丝氨酸蛋白酶又可以促进炎症^[10-11]。

炎症的促凝作用及凝血—炎症网络的相互作用所导致的恶性循环,已成为血栓形成的重要机制。本研究中,模型大鼠出现了明显的PLT下降,炎性因子(IL-6, TNF-α)升高,尾部血栓形成,以及肝脏、肺部和肾脏出现了一定的功能下降和器质受损,以上均符合大鼠炎症血栓形成的病理状态。XDI又称复方丹参注射液,研究表明丹参及其中水溶性成分具有抗炎、抑制血小板聚集,抗凝,防止血栓形成的作用^[12-14]。本研究中,对上述大鼠运用XDI预防并治疗3d后,大鼠在炎症和血栓方面改善不明显(包括PLT,细胞因子,血栓长度等都没有明显变化),但对其肝脏功能和各器官器质损害上有一定改善,表现为对肝脏生化指标和肺部病变都有改善作用。QKLI则是由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板蓝根、黄芩苷、金银花等多种中药制成的复方制剂,其中栀子、板蓝根、黄芩苷、金银花等都具有抗炎抗血栓作用,临床上广泛用于脑血管病、呼吸系统感染性疾病等多种疾病的治疗^[15]。本实验中,QKLI对炎症血栓模型大鼠显示了明显的抗炎(抑制IL-6和TNF-α分泌),提升血小板,保护脏器损伤的作用(缓解肝、肺、肾病变),但

表5 XDI与QKLI各自及联合用药后致炎症血栓模型大鼠脏器病理变化分级的影响(n=10)

Table 5 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on classification of pathological changes in endotoxemia rats (n=10)

组别	剂量 /mL·kg ⁻¹	心/只数				肝/只数				肺/只数				肾/只数			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常		10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
模型		9	0	1	0	4	4	1	1 ¹⁾	3	2	5	0 ²⁾	4	5	1	0 ¹⁾
XDI	2.5	9	1	0	0	8	2	0	0	5	4	1	0	9	1	0	0
	5	10	0	0	0	7	3	0	0	6	4	0	0 ³⁾	7	3	0	0
QKLI	5	9	1	0	0	7	3	0	0	6	3	1	0	8	2	0	0
	10	9	1	0	0	5	5	0	0	8	1	1	0 ³⁾	8	1	1	0
XDI+QKLI	2.5+5	10	0	0	0	5	4	1	0	8	2	0	0 ³⁾	5	4	1	0
	2.5+10	10	0	0	0	8	2	0	0	8	2	1	0 ³⁾	8	2	0	0
	5+5	10	0	0	0	6	4	0	0	6	3	1	0	6	3	1	0
	5+10	10	0	0	0	6	3	1	0	6	4	0	0 ³⁾	7	1	1	0

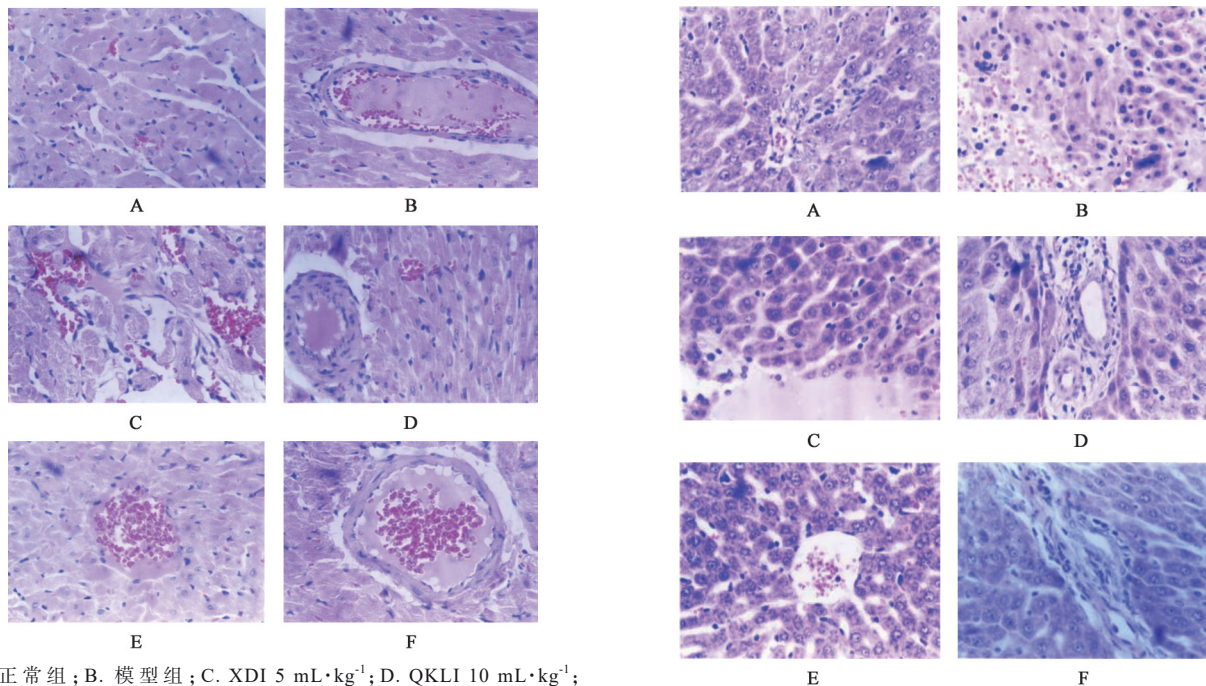


图1 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠心脏组织病理学变化的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on histopathological changes of heart in endotoxemia rats (HE, ×400)

对血栓抑制作用不显著。两药合用后,则在抑制血栓形成,抑制炎症因子分泌(特别是TNF-α),提升肝脏功能,保护脏器损伤(尤其是肺部病变)等作用方面都比两药单用尤其是XDI单用明显,具有一定协同增效作用。

对于两个注射剂在脏器保护、抗炎尤其是抗血栓方面的协同增效的具体作用机制和靶点,后期还

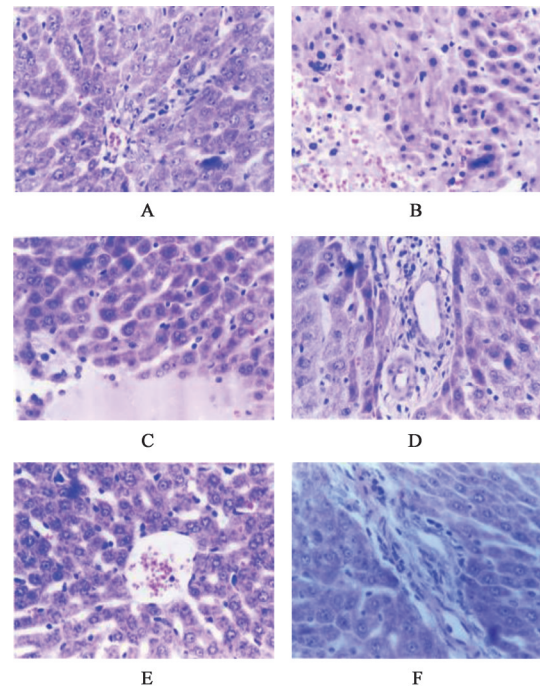


图2 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠肝脏组织病理学变化的影响(HE,×400)

Fig. 2 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on histopathological changes of liver in endotoxemia rats (HE, ×400)

有待进一步深入研究。有研究表明,XDI能抑制胰腺炎大鼠核转录因子-κB(NF-κB)信号通路激活^[16],QKLI有效组分也能通过拮抗NF-κB活化进而抑制其诱导的炎症因子的表达^[17]。NF-κB信号通路介导了组织因子(TF)表达,也参与了内皮细胞和血小板活化、聚集等过程,以上均与血栓形成有关^[18-19]。过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(PPAR-γ)/NF-κB信号转导在血小板活化和高凝状态炎症免疫应答机制中起重要作用^[20],此信号通路相关的酶及炎症

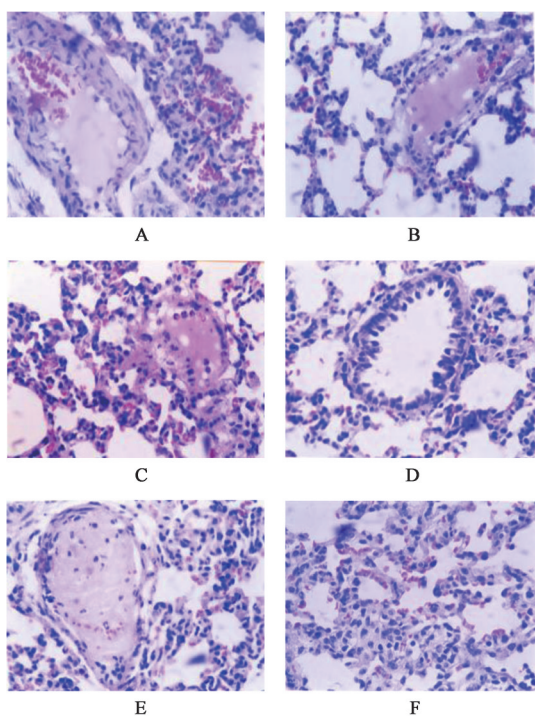


图3 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠肺脏组织病理学变化的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on histopathological changes of lung in endotoxemia rats (HE, ×400)

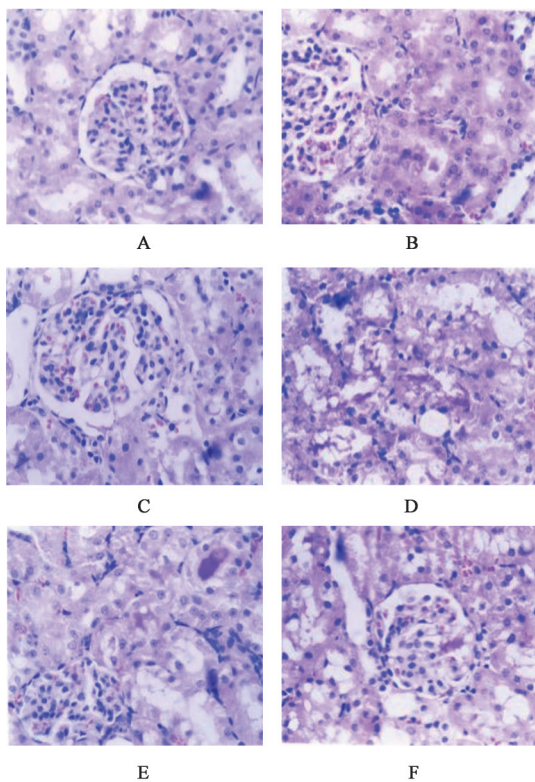


图4 XDI与QKLI及联合用药对炎症血栓模型大鼠肾脏组织病理学变化的影响(HE, ×400)

Fig. 4 Effect of XDI and QKLI alone and in combination on histopathological changes of kidney in endotoxemia rats (HE, ×400)

介质可能成为治疗炎症血栓疾病的靶点。另外,在炎症性和感染性疾病中,抑制NF- κ B信号传导是一个潜在预防TLR2和TLR4触发血小板活化的治疗靶点^[21]。综上,笔者认为XDI和QKLI对炎症血栓模型大鼠抗炎、抗血栓和器官保护的协同作用可能与他们共同作用于NF- κ B信号通路有关。另外,TLR,炎症小体,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),转录激活因子3(STAT3),雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTORC1)等多条炎症信号通路在血栓的形成中均有重要作用,后期可从这些通路研究入手,深入分析XDI和QKLI联合用药对炎症血栓抑制作用的主要机制,以为阐明上述中药注射剂的药理作用提供科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MAJUMDAR S, CHATTOPADHYAY P, MUKHERJEE A K. *In vivo* anticoagulant and thrombolytic activities of a fibrinolytic serine protease (brevithrombolase) with the k-carrageenan-induced rat tail thrombosis model[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2016, 22(6): 594-599.
- [2] 梁爱华,刘婷,李春英,等.一种热毒诱导的血栓形成动物模型的建立[J].中国中药杂志,2008,33(18): 2124-2128.
- [3] BUDNIK I, BRILL A. Immune factors in deep vein thrombosis initiation [J]. Trends Immunol, 2018, 39(8): 610-623.
- [4] ONG S B, S HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ, CRESPO-AVILAN G E, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. Pharmacol Ther, 2018, 186: 73-87.
- [5] YANG T, CHANG P, LU S. L5-LDL from ST-elevation myocardial infarction patients induces IL-1 beta production via LOX-1 and NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 312(2): 265-274.
- [6] 余琳,武晓灵.香丹注射液联合乌司他丁治疗重症急性胰腺炎的疗效及对血液流变学和血清SOD、CRP、IL-6水平的影响[J].中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(6): 421-425.
- [7] 黄国淳,孙艳娜,陆桂宁.雷公藤多苷联合清热止血方和香丹注射液治疗小儿紫癜性肾炎疗效观察[J].现代中西医结合杂志, 2018, 27(5): 527-529, 546.
- [8] 马维娜,孟拥军.清开灵的作用机制及临床应用进展[J].医学综述, 2016, 22(23): 4664.

- [9] 曹春雨,梁爱华,赵雍,等. 清开灵注射液的抗血栓作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(12):1549-1552.
- [10] YE S, MAO B, YANG L, et al. Thrombosis recanalization by paeoniflorin through the upregulation of urokinase-type plasminogen activator via the MAPK signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6):4853-4858.
- [11] BORGEL D, BIANCHINI E, LASNE D, et al. Inflammation in deep vein thrombosis: a therapeutic target[J]. Hematology, 2019, 24(1):742-750.
- [12] 王梦梦,吉兰芳,崔树娜. 丹参功效的物质基础研究进展[J]. 中医学报,2019,34(5):944-949.
- [13] 栗意,陈敏,徐超,等. 丹参素对缺血/再灌注损伤器官保护作用机制研究进展[J]. 海峡药学,2020,32(10):1-5.
- [14] 李跃文,刘志强,赵越,等. 香丹注射液治疗冠心病主要活性成分-靶点-通路的网络分析[J]. 中国药学杂志,2018,53(22):1927-1935.
- [15] 郭文胜. 清开灵注射液抗感染基础及临床研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2015,8(3):168-171.
- [16] 马丹,包先丽,叶霜,等. 复方丹参注射液对重症急性胰腺炎肺损伤大鼠CYLD/NF- κ B信号的影响[J]. 中国中医急症,2018,27(12):2019-2102.
- [17] 卢志刚,刘芸,易继龙. 清开灵注射液对自发性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛患者SOCS-3,TNF- α 和IL-6的影响[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(2):141-144.
- [18] CIMMINO G, CIRILLO P. Tissue factor: newer concepts in thrombosis and its role beyond thrombosis and hemostasis [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2018, 8(5):581-593.
- [19] STOJKOVIC S, KAUN C, BASILIO J, et al. Tissue factor is induced by interleukin-33 in human endothelial cells: a new link between coagulation and inflammation[J]. Sci Rep, 2016, 6:1-4.
- [20] SUN Y, WANG J, YU L, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ /nuclear factor- κ B transduction pathway on coagulation disorders induced by sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27(6):520-524.
- [21] YANG J, ZHOU X, FAN X, et al. mTORC1 promotes aging-related venous thrombosis in mice via elevation of platelet volume and activation[J]. Blood, 2016, 128(5):615-624.

[责任编辑 周冰冰]