

· 药理 ·

## 基于JNK信号通路探讨五首活血化瘀方对心血瘀阻证 新西兰兔内皮细胞的保护作用差异

郑彩杏<sup>1</sup>, 周小青<sup>1,2,3\*</sup>, 李金霞<sup>1,2,3</sup>, 赖丽娜<sup>1</sup>, 李玲<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医诊断学科, 长沙 410208;  
3. 中医诊断学湖南省重点实验室, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:探讨五首活血化瘀方对心血瘀阻证新西兰兔主动脉内皮细胞的保护作用差异。方法:将80只新西兰兔随机分为正常组(10只)和造模组(70只),造模组采用“饥饿+高脂饲料+肾上腺素法”复制新西兰兔心血瘀阻证模型,造模成功后随机分为模型组、血府逐瘀汤组(3.55 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、桃红四物汤组(2.66 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、丹参饮组(1.962 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、活络效灵丹组(2.80 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、失笑散组(0.56 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂组(SP600125, 5 μg·kg<sup>-1</sup>),其中正常组和模型组灌胃等量蒸馏水,五首活血化瘀方组灌胃相应复方,SP600125组注射SP600125二甲基亚砷稀液0.5 mL。治疗结束后取出主动脉,原位末端标记法(TUNEL)检测主动脉内皮细胞凋亡情况;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测主动脉组织JNK、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测主动脉组织JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达水平。结果:五首活血化瘀方均可不同程度地改善主动脉内皮细胞凋亡,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤效果最好,活络效灵丹次之,失笑散稍弱,丹参饮、SP600125最差(P<0.05, P<0.01)。五首活血化瘀方均可明显降低TNF-α、IL-6含量(P<0.05, P<0.01),下调JNK、p-JNK、Bax、Caspase-9、Caspase-3蛋白表达水平(P<0.05, P<0.01),下调JNK、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达水平(P<0.05, P<0.01),上调Bcl-2蛋白及mRNA表达水平(P<0.05, P<0.01)。结论:五首活血化瘀方均可减轻心血瘀阻证新西兰兔主动脉内皮细胞凋亡,但作用强度存在差异,这可能与五首活血化瘀方对JNK信号通路的作用不同有关。

**[关键词]** 血瘀证; 内皮细胞; c-Jun氨基末端激酶(JNK); 活血化瘀方

**[中图分类号]** R22; R242; R285.5; R2-031; R966; R256.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0062-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220595

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220119.1032.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-20 8:18

## Differences in Protective Effect of Five Formulas for Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis on Endothelial Cells of New Zealand Rabbits with Heart Blood Stasis Syndrome Through JNK Signaling Pathway

ZHENG Cai-xing<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-qing<sup>1,2,3\*</sup>, LI Jin-xia<sup>1,2,3</sup>, LAI Li-na<sup>1</sup>, LI Ling<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. The Key Subject of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine (TCM) in Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Hunan Province Key Laboratory of Diagnostics of TCM, Changsha 410208, China)

**[收稿日期]** 2021-06-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(82104775);湖南省自然科学基金青年基金项目(2021JJ40399);中央引导地方科技发展专项(2019XF5062);湖南中医药大学中医诊断学国家重点学科开放基金项目(2021ZYX12)

**[第一作者]** 郑彩杏,博士,从事中医诊断学方面研究, E-mail: 947726363@qq.com

**[通信作者]** \*周小青,博士,教授,博士生导师,国家重点学科湖南中医药大学中医诊断学学科带头人,从事中医诊断学方面研究, E-mail: 1470128077@qq.com

**[Abstract] Objective:** To explore the differences in the protective effects of five formulas for promoting blood circulation and removing blood stasis on the aortic endothelial cells of New Zealand rabbits with heart blood stasis syndrome. **Method:** Eighty New Zealand rabbits were randomly divided into a normal group ( $n=10$ ) and an experimental group ( $n=70$ ). The heart blood stasis syndrome model was induced by starvation combined with a high-fat diet and adrenaline in the rabbits of the experimental group. Subsequently, the model rabbits were randomly divided into a model group, a Xuefu Zhuyutang group ( $3.55 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a Taohong Siwutang group ( $2.66 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a Danshenyin group ( $1.962 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a Huoluo Xiaolingdan group ( $2.80 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a Shixiaosan group ( $0.56 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and a c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) group. The normal group and the model group received the same amount of distilled water. The rabbits in five Chinese medicine groups were treated correspondingly by gavage, and those in the SP600125 group were injected with 0.5 mL of SP600125-dimethyl sulfoxide diluent. After the treatment, the aorta was collected, and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was used to detect the apoptosis of aortic endothelial cells. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6). Western blot was used to detect the protein expression of JNK, phosphorylated JNK (p-JNK), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate-specific protease-9 (Caspase-9), and cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) in aortic tissues. Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA levels of JNK, Bcl-2, Bax, Caspase-9, and Caspase-3 in aortic tissues. **Result:** Five formulas could improve the apoptosis of aortic endothelial cells to varying degrees. To be specific, Xuefu Zhuyutang and Taohong Siwutang were optimal in efficacy, followed by Huoluo Xiaolingdan, Shixiaosan, and Danshenyin, and SP600125 was the worst ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Five formulas could reduce the content of TNF- $\alpha$  and IL-6 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), down-regulate the protein expression levels of JNK, p-JNK, Bax, Caspase-9, and Caspase-3 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), decrease the mRNA expression levels of JNK, Bax, Caspase-9, and Caspase-3 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and up-regulate the protein and mRNA expression levels of Bcl-2 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Five formulas can all reduce the apoptosis of aortic endothelial cells in New Zealand rabbits with heart blood stasis syndrome with different efficacies. It may be related to the different effects of five formulas on the JNK signaling pathway.

**[Keywords]** blood stasis syndrome; endothelial cell; c-Jun N-terminal kinase (JNK); formula for promoting blood circulation and removing blood stasis

心血瘀阻证乃心脉受阻,血液运行不畅所引起的证候,为胸痹、心悸、厥心痛等严重疾病的主要证型<sup>[1-2]</sup>。经古籍记载及现代研究表明,血府逐瘀汤、桃红四物汤、丹参饮、活络效灵丹、失笑散均可有效治疗胸中血瘀或心胸刺痛之症。《医林改错》中以血府逐瘀汤治胸痹心痛等疾<sup>[3]</sup>;桃红四物汤不仅为“妇科心法要诀调经门”,现亦广泛应用于心脑血管疾病的治疗<sup>[4]</sup>;丹参饮乃中医临床治疗“心腹诸痛”等疾病的常用经典名方<sup>[5]</sup>;《医学衷中参西录》中记载活络效灵丹可用于“气血凝滞,痲痹痲瘕,心腹疼痛,腿疼臂疼”<sup>[6]</sup>;失笑散最早见于宋代《太平惠民和剂局方》,书中言“治产后心腹痛欲死,百药不效,服此顿愈”<sup>[7]</sup>。但五首方存在功效、程度与作用机制的差异,其功效有行气活血、补气活血、温经活血、活

血止血等方面的不同,程度则有和血、活血、破血、攻血之分。如丹参饮以丹参为主药,药性平和以和血<sup>[8]</sup>;活络效灵丹应用乳香、没药,长于散瘀消肿<sup>[9]</sup>;失笑散使用蒲黄、五灵脂,长于化瘀止痛<sup>[10]</sup>;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<sup>[11]</sup>;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,进一步增强其活血化瘀之功<sup>[12]</sup>。

故课题组选取丹参饮、血府逐瘀汤、失笑散、活络效灵丹、桃红四物汤五首方作为研究对象,并通过前期实验证明五首活血化瘀方均可有效降低血脂、改善血液流变性、减轻血瘀病理状态,但作用强度大小不同<sup>[13-15]</sup>,在抑制高脂喂养家兔动脉粥样硬化(心血瘀阻证病理模型)形成方面有显著的多种

差异<sup>[16]</sup>,提示五首活血化瘀方治疗心血瘀阻证的分子机制和作用强度存在差异,但具体机制尚不清楚。因此本实验研究五首活血化瘀方临床常用剂量对心血瘀阻证新西兰兔主动脉组织 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路相关指标的影响,进一步探讨五首活血化瘀方临床保护主动脉内皮细胞的机制及作用强度大小差异,明确五首活血化瘀方治疗心血瘀阻证的功效和机制差异,为心血瘀阻证临床选方用药提供实验数据参考。

## 1 材料

**1.1 动物** 新西兰兔,80只,雄性,体质量(2.0±0.5)kg,3月龄,购自湖南太平生物科技有限公司,合格证号 SCXK(湘)2020-0005,饲养于湖南中医药大学动物实验中心,独笼饲养,温度(20±2)℃,湿度(65±5)%。动物实验过程经湖南中医药大学医学伦理委员会批准,伦理编号 LLBH-202006020001。

**1.2 药物及制剂** 高脂饲料(中国北京科澳协力饲料有限公司,批号 D12461B);肾上腺素(中国上海陶素生化科技有限公司,批号 20190128);JNK 抑制剂 SP600125(中国上海陶素生化科技有限公司,批号 A4604);血府逐瘀汤(桃仁 12g、红花 9g、当归 9g、生地黄 9g、川芎 5g、赤芍 6g、牛膝 9g、柴胡 3g、桔梗 5g、枳壳 6g、甘草 3g),桃红四物汤(熟地黄 12g、当归 15g、白芍 9g、川芎 6g、桃仁 9g、红花 6g),丹参饮(丹参 30g、檀香 6g、砂仁 6g),活络效灵丹(当归 15g、丹参 15g、生明乳香 15g、生明没药 15g),失笑散(五灵脂 6g、蒲黄 6g),以上药物饮片均按文献[17]剂量购于湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学药食同源食品工程中心鉴定合格。制备煎煮液,浸泡 30 min 后煎煮 2 次,头煎加入 10 倍清水,煮沸时间为 2 h,第 2 次加入 5 倍清水,煮沸时间为 1 h,将 2 次煎煮滤液混合后浓缩:丹参饮浓缩质量浓度 0.5 g·mL<sup>-1</sup>;血府逐瘀汤浓缩质量浓度 1 g·mL<sup>-1</sup>;失笑散浓缩质量浓度 0.25 g·mL<sup>-1</sup>;活络效灵丹浓缩质量浓度 1 g·mL<sup>-1</sup>;桃红四物汤浓缩质量浓度 1 g·mL<sup>-1</sup>,经灭菌后置 4℃ 冰箱保存备用。

**1.3 试剂** 原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(中国上海翊圣生物公司,批号 40306ES50);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(中国南京建成公司,批号分别为 202009、202010);JNK、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(p-JNK)抗体(中国北京博奥森公司,批号分别为 bs-10562R、bs-1640R);B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗

体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)兔抗人单克隆抗体、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG(美国 Proteintech 公司,批号分别为 12789-1-AP、50599-2-Ig、50599-2-Ig、66009-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2);半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9)抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab32539、ab4051);mRNA 逆转录试剂盒、微 RNA(miRNA)逆转录试剂盒(中国北京康为世纪公司,批号分别为 CW2569、CW2141)。

**1.4 仪器** H1650R 型台式冷冻离心机(中国湖南湘仪公司);DYY-6C 型电泳仪,DYCZ-24DN 型电泳槽,DYCZ-40D 型转膜仪(中国北京六一公司);BioPrep-24 型生物样品均质仪(中国杭州奥盛公司);PIKOREAL96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time RCP)仪、SPL0960 型荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司);BA400 型显微镜(中国麦克奥迪实业集团公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备** 将 80 只新西兰兔随机分为 2 组,正常组 10 只,造模组 70 只。实验采用“饥饿+高脂饲料+肾上腺素”方法制备心血瘀阻证模型<sup>[18]</sup>。适应性喂养 7 d,计算平均采食量。造模期共 40 d,正常组饲喂足量的普通饲料,造模组饲喂高脂饲料,为平均采食量的 2/3。造模组于实验第 2 天开始隔日皮下注射肾上腺素(0.1 mg·kg<sup>-1</sup>),正常组皮下注射等剂量生理盐水,共 20 次。造模期间每 7 d 称量 1 次体质量,并根据体质量变化调整肾上腺素、生理盐水注射量。造模期结束后进行球结膜微循环、血液流变性检测,当红细胞聚集、全血黏度、还原黏度、球结膜循环形态积分和总积分明显增高则为造模成功。

**2.2 分组及给药** 造模期间新西兰兔死亡 7 只,成模 63 只,将其随机分为 7 组,分别为模型组、血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、丹参饮组、活络效灵丹组、失笑散组、SP600125 组,每组 9 只。各复方组根据人与动物体表面积折算中药灌胃剂量,相当于临床用量 3.72 倍<sup>[19]</sup>。正常组、模型组灌胃等体积蒸馏水;血府逐瘀汤组含生药 3.55 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;桃红四物汤组含生药 2.66 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;丹参饮组含生药 1.962 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;活络效灵丹组含生药 2.80 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;失笑散组含生药 0.56 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;SP600125 组皮下注射 SP600125(5  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup>)二甲基亚砷稀释液 0.5 mL。

每日1次,连续给药30 d。给药期间死亡率28.6%,故每组取6只动物进行后续实验检测。

**2.3 检测指标及方法** 末次灌胃24 h后空气栓塞处死动物,取出主动脉,置于4%多聚甲醛中液氮冻存。

**2.3.1 TUNEL检测细胞凋亡情况** 每组随机选取3个主动脉组织样本,包埋切片后进行TUNEL及CD31免疫荧光双重染色,步骤如下:①60℃烤片12 h;②切片脱蜡至水,先将切片置于二甲苯中20 min,3次,然后依次在100%、95%、85%和75%乙醇,每级放置5 min,再用蒸馏水浸洗5 min;③热修复抗原,将切片浸入枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),电炉或微波炉加热至沸腾后断电,连续煮23 min后,冷却23 min后拿出,冷却至室温,冷却后 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.6)洗涤3 min×3次;④切片置于硼氢化钠溶液中室温下30 min,水漂洗5 min;⑤切片置于苏丹黑染液中室温下5 min,水冲洗3 min;⑥10%正常血清/5%BSA封闭60 min;⑦按1:5的比例用去离子水稀释5×Equilibration buffer,每个样本滴加1×Equilibration buffer 100 μL使其全部覆盖待检样本区域,室温孵育10~30 min;⑧按照双蒸水34 μL、5×Equilibration buffer 10 μL、FITC-12-dUTP Labling Mix 5 μL、Recombinant TdT Enzyme 1 μL比例配置所需TdT酶孵育缓冲液;⑨在平衡后的区域周围用吸水纸洗掉1×Equilibration buffer 100 μL中的大部分,然后在待检测组织上加入TdT孵育缓冲液50 μL;⑩孵育一抗,滴加适当稀释的一抗(CD31 1:50),4℃过夜,PBS冲洗5 min×3次;⑪孵育二抗,滴加山羊抗小鼠IgG荧光抗体50~100 μL,37℃孵育90 min,PBS冲洗5 min×3次;⑫DAPI工作液37℃染核10 min,PBS冲洗5 min×3次;⑬缓冲甘油封片,到荧光显微镜下观察。

**2.3.2 ELISA试剂盒检测血清中TNF- $\alpha$ , IL-6的含量** 按试剂盒操作,取血清原液100 μL加试剂一200 μL混匀,加试剂二100 μL,旋涡充分混匀后静置10 min,3 500~4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径10 cm),取上清液160 μL操作。空白孔加入双蒸水160 μL,标准孔加入亚硝酸钠标准液160 μL,测定孔加入上清液160 μL,各孔分别加入显色液80 μL,混匀,静置15 min,波长550 nm,酶标仪测定各孔积分吸光度 $I_A$ 。

**2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测主动脉组织JNK、p-JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3**

蛋白表达水平 用冰预冷PBS洗涤细胞1次,刮取细胞,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径12 cm)后收集细胞沉淀,加入RIPA裂解液200 μL,超声破碎1.5 min,冰上裂解10 min,4℃条件下12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径12 cm)提取蛋白;BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;制胶后取蛋白上清180 μL,加入5×Loading buffer 45 μL混匀,沸水煮7 min,放入冰盒中速冷备用,根据蛋白定量的结果,第1孔点入Marker 2.6 μL,其他每孔上样已变性蛋白10~20 μL,电泳恒定电压78 V,时间150 min;转膜300 mA恒定电流,JNK、p-JNK约75 min,Bax约35 min,Bcl-2约50 min,Caspase-9、 $\beta$ -actin约60 min;5%脱脂奶粉室温封闭120 min;加入一抗稀释液(1:5 000),室温放置90 min,孵育结束,1×PBST洗3次,每次10 min;加入二抗稀释液(1:6 000),室温孵育60 min,孵育结束,1×PBST洗3次,每次10 min;使用ECL化学发光液与膜孵育1 min,用滤纸吸尽液体,用塑封膜将膜包裹交膜,在暗盒内与X胶片曝光5~120 min;显影冲洗。

**2.3.4 Real-time PCR检测主动脉组织JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达水平** 在NCBI上搜索目的基因的序列,运用Primer 5软件设计引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。按照试剂盒说明书提取RNA,测定RNA浓度( $500 \sim 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )计算加样量;以总RNA为模板,使用Invitrogen反转录试剂盒进行cDNA合成;依次加入反转录产物1 μL,各基因上游与下游引物各0.5 μL,PCR反应Mix 12.5 μL,用双蒸水补足体积至25 μL,混匀后进行Real-time PCR扩增(95℃预变性2 min,1个循环;95℃PCR反应15 s;63℃退火30 s;72℃延伸30 s,35个循环);PCR产物琼脂糖电泳,在凝胶成像系统下观察PCR产物的电泳带,并拍照存档;在Real-time PCR仪上获取溶解曲线程序,以基因 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量。引物序列见表1。

**2.4 统计学方法** 采用SPSS 25.0软件进行统计分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布且方差齐时,组间比较使用ANOVA方差分析,方差不齐时运用非参数检验进行比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 五首活血化瘀方对心血瘀阻证新西兰兔主动脉组织内皮细胞凋亡的影响** 正常组未见内皮细胞凋亡;与正常组比较,模型组阳性细胞数量显著

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
JNK	上游 AGCACATTGGAATTCATGACC	176
	下游 AGAGGCTAGTGTATTTCAACCTT	
Bcl-2	上游 GACGACTTCTCCCGCGCTA	171
	下游 ACACATGACCCACCGAAC	
Bax	上游 GTCGCCCTGTTTTACTTTGCC	90
	下游 CGTCCAGCCATAATAGTCCT	
Caspase-9	上游 CTTCTTTCCTGCGAGCCAGT	111
	下游 CTGTCGGCTTCTCTGGTTGG	
Caspase-3	上游 ACGTGAAGAAATCATGGAACTCA	95
	下游 CATCACCGTGGCTTAGAATCACA	
$\beta$ -actin	上游 TGGCCGAGGACTTTGATTGT	170
	下游 TTACACAAATGCGATGCTGCC	

增多,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组阳性细胞均显著减少( $P<0.01$ ),各组间比较差异具有统计学意义,其强度为血府逐瘀汤

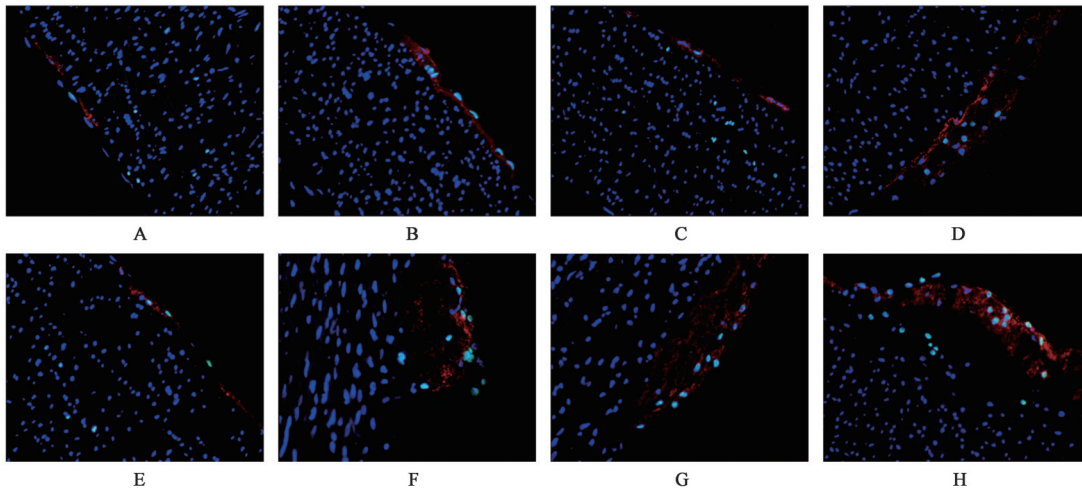
组、桃红四物汤组>活络效灵丹组>失笑散组>丹参饮组、SP600125组( $P<0.05, P<0.01$ )。见表2和图1。

表2 五首活血化癥方对新西兰兔主动脉血管内皮细胞凋亡数量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of five recipes for promoting blood circulation and removing blood stasis on number of aortic endothelial cell apoptosis in New Zealand rabbits ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	内皮细胞凋亡数/个
正常组		0.23±0.11
模型组		18.43±1.45 <sup>1)</sup>
血府逐瘀汤组	3.55	1.42±1.21 <sup>2)</sup>
桃红四物汤组	2.66	1.96±0.42 <sup>2,3)</sup>
丹参饮组	1.962	6.51±1.16 <sup>2,3,4)</sup>
活络效灵丹组	2.80	3.41±0.74 <sup>2,3,4,5)</sup>
失笑散组	0.56	4.81±1.13 <sup>2,3,4,5,6)</sup>
SP600125组	$5\times 10^{-6}$	6.71±0.89 <sup>2,3,4,7,8)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与血府逐瘀汤组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与桃红四物汤组比较<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与丹参饮组比较<sup>5)</sup> $P<0.01$ ;与活络效灵丹组比较<sup>6)</sup> $P<0.05, ^7)P<0.01$ ;与失笑散组比较<sup>8)</sup> $P<0.01$



注:阳性信号为CD31(红)+TUNEL(绿)色荧光,蓝色为核染信号;A. 正常组;B. 模型组;C. 血府逐瘀汤组;D. 桃红四物汤组;E. 丹参饮组;F. 活络效灵丹组;G. 失笑散组;H. SP600125组(表2同)

图1 各组新西兰兔主动脉内皮细胞凋亡情况(TUNEL,  $\times 400$ )

Fig. 1 Apoptosis of aortic endothelial cells in New Zealand rabbits in each group (TUNEL,  $\times 400$ )

3.2 五首活血化癥方对心血瘀阻证新西兰兔血清TNF- $\alpha$ 、IL-6含量的影响 与正常组比较,模型组TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );各组作用强度大小存在差异, TNF- $\alpha$ 水平,丹参饮组、血府逐瘀汤组>SP600125组、活络效灵丹组( $P<0.05, P<0.01$ ),桃红四物汤组、失笑散组与其他组比较差异无统计学意义;IL-6水平,丹参饮组、血府逐瘀汤组>SP600125组、活络效灵丹组、桃红四

物汤组、失笑散组( $P<0.05, P<0.01$ )。见表3。

3.3 五首活血化癥方对心血瘀阻证新西兰兔主动脉组织JNK、p-JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组JNK、p-JNK、Bax、Caspase-9、Caspase-3蛋白表达水平显著上调( $P<0.01$ ), Bcl-2蛋白表达显著下调( $P<0.01$ )。JNK水平,与模型组比较,血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组、失笑散组JNK蛋白表达水平均显著下调( $P<0.01$ ),组间比较差异无

表3 五首活血化瘀方对新西兰兔血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影  
( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of five recipes for promoting blood circulation and removing blood stasis on serum TNF- $\alpha$  and IL-6 levels of New Zealand rabbits ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-6
正常组		2.70±0.83	2.81±0.20
模型组		4.86±0.30 <sup>1)</sup>	4.68±0.10 <sup>1)</sup>
血府逐瘀汤组	3.55	2.80±0.29 <sup>3)</sup>	2.66±0.30 <sup>3)</sup>
桃红四物汤组	2.66	3.13±0.26 <sup>3)</sup>	3.29±0.15 <sup>3,5)</sup>
丹参饮组	1.962	2.59±0.64 <sup>3)</sup>	2.88±0.27 <sup>3,6)</sup>
活络效灵丹组	2.80	3.70±0.46 <sup>2,4,8)</sup>	3.55±0.11 <sup>3,5,8)</sup>
失笑散组	0.56	3.20±0.51 <sup>3)</sup>	3.16±0.25 <sup>3,5,7,9)</sup>
SP600125组	5×10 <sup>-6</sup>	3.52±0.24 <sup>3,4,7)</sup>	3.54±0.29 <sup>3,5,8)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与血府逐瘀汤组比较<sup>4)</sup>P<0.05,<sup>5)</sup>P<0.01;与桃红四物汤组比较<sup>6)</sup>P<0.05;与丹参饮组比较<sup>7)</sup>P<0.05,<sup>8)</sup>P<0.01;与活络效灵丹组比较<sup>9)</sup>P<0.05

统计学意义;丹参饮组、SP600125组有下降趋势,但差异无统计学意义。p-JNK水平,与模型组比较,各

给药组 p-JNK 蛋白表达水平显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为桃红四物汤组、血府逐瘀汤组>活络效灵丹组、失笑散组>SP600125组>丹参饮组。Bcl-2水平,与模型组比较,各给药组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著上调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组、失笑散组>SP600125组、丹参饮组。Bax水平,与模型组比较,各给药组 Bax 蛋白表达水平均显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、丹参饮组>活络效灵丹组、失笑散组、SP600125组。Caspase-9水平,与模型组比较,各组 Caspase-9 蛋白表达水平均显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组>失笑散组、SP600125组、丹参饮组。Caspase-3水平,与模型组比较,各组 Caspase-3 蛋白表达水平均显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组>失笑散组、丹参饮组、SP600125组。见表4和图2。

表4 五首活血化瘀方对新西兰兔主动脉组织 JNK、p-JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达水平影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of five recipes for promoting blood circulation and removing blood stasis on expression level of JNK, p-JNK, Bcl-2, Bax, Caspase-9, Caspase-3 protein in aorta tissue of New Zealand rabbits ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	JNK/ $\beta$ -actin	p-JNK/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin	Caspase-9/ $\beta$ -actin	Caspase-3/ $\beta$ -actin
正常组		43.71±4.17	13.29±2.69	73.28±13.98	17.97±8.78	12.98±4.64	16.56±7.93
模型组		85.02±3.99 <sup>1)</sup>	65.97±7.08 <sup>1)</sup>	15.88±7.06 <sup>1)</sup>	78.04±7.99 <sup>1)</sup>	79.25±8.39 <sup>1)</sup>	80.83±9.31 <sup>1)</sup>
血府逐瘀汤组	3.55	71.19±8.25 <sup>2)</sup>	25.63±8.31 <sup>2)</sup>	51.38±10.59 <sup>2)</sup>	28.8±10.03 <sup>2)</sup>	27.57±10.2 <sup>2)</sup>	32.25±5.54 <sup>2)</sup>
桃红四物汤组	2.66	74.51±5.43 <sup>2)</sup>	23.97±6.75 <sup>2)</sup>	46.49±15.28 <sup>2)</sup>	33.37±5.69 <sup>2)</sup>	27.74±8.48 <sup>2)</sup>	34.33±7.49 <sup>2)</sup>
丹参饮组	1.962	78.39±5.42	55.88±5.97 <sup>2,4,6)</sup>	21.57±6.12 <sup>2,4,6)</sup>	37.5±5.50 <sup>2)</sup>	51.32±14.26 <sup>2,6)</sup>	43.67±11.92 <sup>2,3)</sup>
活络效灵丹组	2.80	66.52±11.0 <sup>2)</sup>	40.59±7.32 <sup>2,4,6,8)</sup>	40.01±6.42 <sup>2)</sup>	41.08±5.63 <sup>2,4)</sup>	36.29±8.05 <sup>2)</sup>	36.78±8.86 <sup>2)</sup>
失笑散组	0.56	72.71±8.24 <sup>2)</sup>	41.09±5.02 <sup>2,4,6,8)</sup>	43.93±8.38 <sup>2)</sup>	42.27±8.03 <sup>2,4,5)</sup>	40.06±8.06 <sup>2,4)</sup>	41.39±7.98 <sup>2,3)</sup>
SP600125组	5×10 <sup>-6</sup>	81.92±8.50	50.15±9.82 <sup>2,4,6,7,9,10)</sup>	34.23±8.17 <sup>2,4,5)</sup>	41.92±7.49 <sup>2,4)</sup>	46.27±8.41 <sup>2,6)</sup>	45.32±5.74 <sup>2,3,5)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01;与血府逐瘀汤组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01;与桃红四物汤组比较<sup>5)</sup>P<0.05,<sup>6)</sup>P<0.01;与丹参饮组比较<sup>7)</sup>P<0.05,<sup>8)</sup>P<0.01;与活络效灵丹组比较<sup>9)</sup>P<0.05;与失笑散组比较<sup>10)</sup>P<0.05

3.4 五首活血化瘀方对心血瘀阻证新西兰兔主动脉组织 JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达水平的影响 研究结果显示,与正常组比较,模型组 JNK、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达水平显著上调,Bcl-2 mRNA 表达水平显著下调,差异具有统计学意义(P<0.01)。JNK水平,与模型组比较,血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组、失笑散组 mRNA 表达水平显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组>活络效灵丹组、失笑散组;丹参饮组、SP600125组有下降趋势,但差异无统计学意义。

Bcl-2水平,与模型组比较,血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组、失笑散组、SP600125组 Bcl-2 mRNA 表达水平显著上调(P<0.01),各组间比较差异无统计学意义;丹参饮组有上升趋势,但差异无统计学意义。Bax水平,与模型组比较,各给药组 Bax mRNA 表达水平均显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组、活络效灵丹组>失笑散组>丹参饮组、SP600125组;Caspase-9水平,与模型组比较,各给药组 Caspase-9 mRNA 水平均显著下调(P<0.01),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红

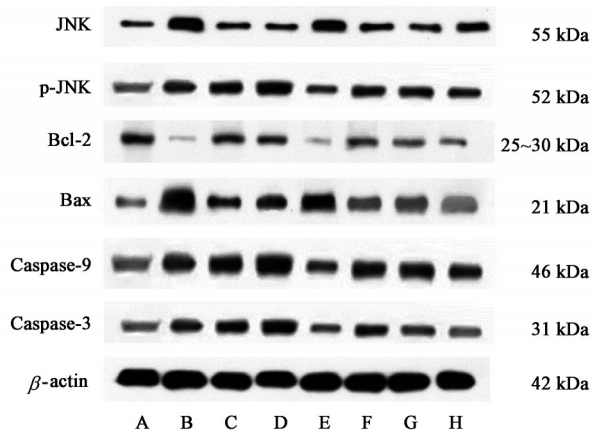


图2 新西兰兔主动脉组织 JNK、p-JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of JNK, p-JNK, Bcl-2, Bax, Caspase-9, and Caspase-3 in aorta tissues of New Zealand rabbits

四物汤组>活络效灵丹组>失笑散组>丹参饮组、SP600125组; Caspase-3水平,与模型组比较,各给药组Caspase-3 mRNA水平均显著下调( $P<0.01$ ),作用强度大小存在差异,依次为血府逐瘀汤组、桃红四物汤组>活络效灵丹组>失笑散组>丹参饮组、SP600125组。见表5。

#### 4 讨论

现代研究表明,血瘀证的发生与血管的内皮细胞功能受损密切相关<sup>[20-21]</sup>。一旦血管内皮细胞受损,各种调控机体的活性物质如血凝-纤溶及血管舒缩功能因子的正常水平必然受到影响,导致机体容易出血或形成血栓<sup>[22]</sup>,因此保护和改善血管内皮细胞功能对预防和治疗血瘀证有着重要的意义<sup>[23]</sup>。本研究显示,各组药物均能显著减少实验动物主动脉的内皮细胞凋亡,但作用强度存在差异,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤效果最好,活络效灵丹次之,

失笑散稍弱,丹参饮、SP600125最差。提示五首活血化瘀方均可减轻心血瘀阻证新西兰兔的内皮细胞凋亡情况。

而JNK信号通路在内皮细胞损伤中发挥重要作用,在TNF- $\alpha$ 、IL-6等细胞因子或应激状态的刺激下,JNK被磷酸化,活化的JNK移动至线粒体膜附近,磷酸化调节Bcl-2家族成员的活性,介导线粒体途径的内皮细胞凋亡<sup>[24]</sup>。Bcl-2家族在线粒体途径介导的细胞凋亡中发挥着重要作用,现已识别了至少20种Bcl-2因子,其中Bax是JNK诱导的主要介导者<sup>[25]</sup>。活化的JNK能够直接磷酸化激活Bax,活化的Bax转位至线粒体外膜,使其通透性增加而释放细胞色素C(Cyt C)、Caspase激活剂(Smac)/DIABLO和凋亡诱导因子等促凋亡线粒体蛋白,其中Cyt C与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)结合,形成凋亡小体,并活化Caspase-9,Caspase-9继而激活下游Caspase,引起Caspase的级联反应<sup>[26]</sup>,从而导致血管内皮细胞的凋亡<sup>[27]</sup>。因此,调控JNK信号通路相关指标的异常表达,进而改善内皮细胞凋亡,对治疗血瘀证有着重要意义。故本研究应用五首活血化瘀方干预心血瘀阻证新西兰兔,观察五首活血化瘀方调控JNK信号通路相关指标异常表达的差异,以明确五首活血化瘀方在保护动脉血管内皮细胞上的作用强度大小、功效层次差异。

本研究显示,五首活血化瘀方在降低TNF- $\alpha$ 、IL-6含量方面存在差异。各组药物在降低均能明显降低TNF- $\alpha$ 的含量,其中丹参饮、血府逐瘀汤优于SP600125、活络效灵丹,桃红四物汤、失笑散与其他方效果相当;各组药物均能明显降低IL-6的含量,其中丹参饮、血府逐瘀汤优于SP600125、活络效灵

表5 五首活血化瘀方对新西兰兔主动脉组织JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of five recipes for promoting blood circulation and removing blood stasis on mRNA expression levels of JNK, Bcl-2, Bax, Caspase-9 and Caspase-3 in aorta tissues of New Zealand rabbits ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	JNK	Bcl-2	Bax	Caspase-9	Caspase-3
正常组		1.17±0.16	0.91±0.16	1.05±0.11	1.01±0.20	0.89±0.09
模型组		4.76±0.97 <sup>1)</sup>	0.22±0.08 <sup>1)</sup>	6.61±1.54 <sup>1)</sup>	8.43±1.45 <sup>1)</sup>	4.92±0.33 <sup>1)</sup>
血府逐瘀汤组	3.55	1.60±0.20 <sup>2)</sup>	0.70±0.10 <sup>2)</sup>	1.44±0.36 <sup>2)</sup>	1.25±1.16 <sup>2)</sup>	1.10±0.01 <sup>2)</sup>
桃红四物汤组	2.66	1.58±0.24 <sup>2)</sup>	0.60±0.11 <sup>2)</sup>	1.34±0.10 <sup>2)</sup>	1.86±0.35 <sup>2,4)</sup>	1.23±0.18 <sup>2,4)</sup>
丹参饮组	1.962	4.04±1.31	0.33±0.12	4.88±1.30 <sup>2,4,6)</sup>	6.73±0.89 <sup>2,4,6)</sup>	3.96±0.18 <sup>2,4,6)</sup>
活络效灵丹组	2.80	2.75±0.75 <sup>2,3,5)</sup>	0.53±0.14 <sup>2)</sup>	2.35±0.40 <sup>2,7)</sup>	3.31±0.86 <sup>2,4,6,7)</sup>	1.89±0.17 <sup>2,4,6,7)</sup>
失笑散组	0.56	3.05±0.72 <sup>2,4,6)</sup>	0.65±0.33 <sup>2)</sup>	3.25±0.75 <sup>2,4,6,7)</sup>	4.64±1.05 <sup>2,4,6,7,8)</sup>	2.61±0.415 <sup>2,4,6,7,9)</sup>
SP600125组	5×10 <sup>-6</sup>	4.61±1.29	0.59±0.27 <sup>2)</sup>	5.09±1.52 <sup>2,4,6,9,10)</sup>	6.92±0.94 <sup>2,4,6,9,10)</sup>	3.72±0.05 <sup>2,4,6,9,10)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与血府逐瘀汤组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与桃红四物汤组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ ,<sup>6)</sup> $P<0.01$ ;与丹参饮组比较<sup>7)</sup> $P<0.01$ ;与活络效灵丹组比较<sup>8)</sup> $P<0.05$ ,<sup>9)</sup> $P<0.01$ ;与失笑散组比较<sup>10)</sup> $P<0.01$

丹、桃红四物汤、失笑散。

本研究显示,五首活血化瘀方在调控 JNK、p-JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达水平方面存在差异。血府逐瘀汤、桃红四物汤、活络效灵丹、失笑散能显著下调 JNK 蛋白表达水平,各组效果相当,丹参饮、SP600125 则无明显改善效果;各组药物均能显著下调 p-JNK 蛋白表达水平,效果依次为桃红四物汤>血府逐瘀汤>活络效灵丹、失笑散>SP600125>丹参饮;各组药物均能显著上调 Bcl-2 蛋白表达水平,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤、活络效灵丹、失笑散效果较好,SP600125 效果次之,丹参饮效果最弱;各组药物均能显著下调 Bax 蛋白表达水平,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤、丹参饮效果优于活络效灵丹、失笑散、SP600125;各组药物均能显著下调 Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达水平,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤、活络效灵丹优于失笑散、SP600125、丹参饮。

本研究显示,各组药物在调控 JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达水平方面存在差异。血府逐瘀汤、桃红四物汤、活络效灵丹、失笑散四者能显著降低 JNK mRNA 表达水平,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤效果优于活络效灵丹、失笑散;丹参饮、SP600125 则无明显改善作用;血府逐瘀汤、桃红四物汤、活络效灵丹、失笑散均能显著上调 Bcl-2 mRNA 表达水平,作用强度大小无明显差异,丹参饮、SP600125 则无明显改善作用;血府逐瘀汤、桃红四物汤、丹参饮、活络效灵丹、失笑散、SP600125 均能显著降低 Bax mRNA 表达水平,其中血府逐瘀汤、桃红四物汤、活络效灵丹效果最佳,失笑散次之,丹参饮、SP600125 最弱;各组药物均能显著下调 Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达水平,作用强度大小依次为血府逐瘀汤、桃红四物汤>活络效灵丹>失笑散>丹参饮、SP600125。

综上所述,五首活血化瘀方均可通过减轻主动脉内皮细胞凋亡而治疗心血瘀阻证,但作用强度存在差异,其机制可能与调节 TNF- $\alpha$  和 IL-6 生成,调控 JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 蛋白及其基因表达有关。本课题组曾提出“证候层次”的概念<sup>[28]</sup>:即在临床中,同一名称的证,虽然病理性质相同,但仍存在病理轻重、浅深或阶段、范围、因果的不同层次,即有证的轻重、浅深、范围等“量”的差异性。如血瘀证,可有血行不畅,血络瘀阻等量的差异,因此选方用药也应更加精准。通过本次实验研究,五首活血化瘀方治疗心血瘀阻证的作用强度大

小及机制差异进一步明确,有助于提高其选方用药的针对性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 李艳娟,王凤荣,陈星,等. 冠心病心绞痛中医证候规范及心血瘀阻证计量研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(3):63-66.
- [2] 王阶,熊兴江,邢雁伟,等. 冠心病血瘀证标准规范、生物学基础及循证评价——基于病证结合的“证候”研究思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):1-6.
- [3] 王清任. 医林改错[M]. 新1版. 上海:上海科学技术出版社,1966.
- [4] 聂欣,成颜芬,王琳,等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(4):226-234.
- [5] 陈修园. 时方歌括[M]. 福州:福建科学技术出版社,1984.
- [6] 邓茹月,房玉涛. 活络效灵丹治疗心血管疾病的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报,2014,36(3):142-144.
- [7] 太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 刘景源,点校. 北京:人民卫生出版社,1985.
- [8] 孔令雷,杜冠华. 丹参饮的现代研究进展[J]. 中药药理与临床,2019,35(3):197-200.
- [9] 曾淑惠. 活络效灵丹对高脂饮食致兔动脉粥样硬化实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
- [10] 王晓帆. 失笑散治疗高脂血症的药效物质基础研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2015.
- [11] 刘立,段金赓,宿树兰,等. 用于妇科血瘀证痛经的四物汤类方——桃红四物汤的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):814-821.
- [12] 宁天一,程嘉艺,王婷婷. 血府逐瘀汤对不可预见性刺激致血瘀的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(4):110-114.
- [13] 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(3):148-150.
- [14] 周小青,罗尧岳,谢小兵,等. 五首活血化瘀方对实验性动脉粥样硬化家兔血脂、载脂蛋白变化的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(4):29-31.
- [15] 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,2003,23(1):9-12.
- [16] 罗尧岳,周小青,沈剑刚,等. 活血化瘀类方对心血瘀病理影响的定性定量研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(2):509-512.
- [17] 李冀,连建伟. 方剂学[M]. 10版. 北京:中国中医药

- 出版社,2018.
- [18] 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. .
- [19] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2010.
- [20] 潘祥龙,郝二伟,谢金玲,等. 活血化瘀中药调节血瘀证的分子机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(24):227-234.
- [21] LI X, LI D Y, CHEN W N, et al. Effect of ASO blood stasis syndrome serum on vascular endothelial cell injury and regulation of Taohong siwu decoction on it [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2015, 35 (11) : 1373-1377.
- [22] 胡小勤. 血瘀证与血管内皮细胞损伤研究进展[J]. 中华中医药杂志,2012,27(1):156-158.
- [23] LIU X, ZHANG M, LI Y, et al. Effects of levistilide A on hemorheology and endothelial cell injury in rats with blood stasis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021 ,doi: 10. 1155/2021/6595383.
- [24] 武丽娜. P38MAPK 和 ERK1/2 信号通路在内毒素性休克诱发急性肺损伤大鼠肺组织 HO-1 表达过程中的作用[D]. 天津:天津医科大学,2013.
- [25] MARKOVIĆ D, ĐORĐEVIĆ V. Apoptosis regulation by inhibitors of programmed cell death [J]. J Med Biochem, 2013, 32(3) :207-213.
- [26] LI P, NIJHAWAN D, BUDI HARDJO I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91(4) :479-489.
- [27] 何辉霞,郑维银. P38MAPK 信号通路在血管内皮细胞凋亡作用中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(20):9317-9319.
- [28] 周小青,陈喜容,刘建新,等. 论证候的病理范围、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.

[责任编辑 王鑫]