

· 经典名方 ·

# 补阳还五汤对多因素诱导急性血瘀证模型大鼠血小板功能及相关炎症因子的影响

王紫艳, 李磊, 刘建勋\*, 孟红旭, 史跃, 马彦雷, 王奥奥, 尤越

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 国家中医心血管病临床医学研究中心,  
中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

**[摘要]** 目的:探究补阳还五汤对急性血瘀证模型大鼠的血小板功能及炎症因子的影响。方法:运用冰水浴复合注射肾上腺素的方法建立SD大鼠急性血瘀证模型,大鼠随机分为4组,分别为正常组、模型组、补阳还五汤组(3.2 g·kg<sup>-1</sup>)、阿司匹林组(60 mg·kg<sup>-1</sup>)。造模同时持续给药7 d,第8天皮下注射盐酸肾上腺素。观察中医证候宏观评价指标舌象、脉象,检测血液流变学、大鼠凝血功能、血小板聚集率等西医凝血系统评价指标,酶联免疫吸附测定法检测血清炎症性及黏附因子相关指标[细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)]。结果:与正常组比较,模型组大鼠脉搏幅度显著降低( $P<0.01$ ),补阳还五汤较模型组可显著改善血瘀证大鼠脉象( $P<0.01$ ),模型组舌象呈现紫暗的血瘀证特点,舌底脉络瘀紫,舌面红(R)、绿(G)、蓝(B)值较正常组显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤可显著改善血瘀证大鼠舌象R、G、B值( $P<0.01$ );与正常组比较,模型组血液黏度在高、中、低切剪应力下及血浆黏度检测值均明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与模型组比较,补阳还五汤可以明显改善高、中、低切剪应力下的全血黏度及血浆黏度( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );凝血四项结果显示,模型组较正常组凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT)明显缩短( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),纤维蛋白原(FIB)含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤可显著改善血瘀证大鼠TT、FIB指标( $P<0.01$ );模型组大鼠血小板聚集率(花生四烯酸、二磷酸腺苷诱导)也显著高于正常组大鼠( $P<0.01$ ),与模型组比较,补阳还五汤可显著降低血瘀证大鼠血小板聚集率( $P<0.01$ );扫描电镜结果显示,与正常组比较,模型组血小板过度活化,伪足伸出明显,血小板之间聚集现象增多;与模型组比较,补阳还五汤组少见血小板活化和聚集现象。与正常组比较,模型组大鼠血清中炎症因子MMP-9和黏附因子ICAM-1含量显著升高( $P<0.01$ ),与模型组比较,补阳还五汤可明显降低血瘀证大鼠血清中MMP-9、ICAM-1含量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:冰水浴复合盐酸肾上腺素诱导的SD大鼠急性血瘀证血小板功能及形态存在明显改变,并存在炎症及细胞黏附功能异常,补阳还五汤治疗大鼠急性血瘀证的机制可能是通过减少炎症及细胞黏附因子过表达,改善血小板形态及功能,进而减少血栓形成,改善血液浓黏凝聚状态。

**[关键词]** 血瘀证; 证候; 补阳还五汤; 血小板; 活化功能; 炎症因子

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0001-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221309

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220628.1636.004.html>

**[网络出版日期]** 2022-07-01 8:48

## Effect of Buyang Huanwutang on Platelet Function and Inflammatory Cytokine in Rat Model of Acute Blood Stasis Induced by Multiple Factors

WANG Ziyan, LI Lei, LIU Jianxun\*, MENG Hongxu, SHI Yue, MA Yanlei, WANG Aoao, YOU Yue  
(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences,  
Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Buyang Huanwutang (BYHWT) on platelet function

**[收稿日期]** 2022-04-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(82030124);国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者项目;中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04609)

**[第一作者]** 王紫艳,在读硕士,从事中药药理学研究,Tel:010-62835608,E-mail:18618235698@163.com

**[通信作者]** \*刘建勋,博士,研究员,从事中药药理学研究,E-mail:liujx0324@sina.com

and inflammatory cytokines in the rat model of acute blood stasis. **Method:** The model of acute blood stasis was established with SD rats by ice water bath combined with injection of epinephrine. Rats were randomly assigned into four groups: normal group, model group, BYHWT ( $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group, and aspirin ( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group. The rats were injected with epinephrine hydrochloride on day 8 after 7 days of modeling. The macroscopic indexes of traditional Chinese medicine (TCM) syndrome including tongue manifestation and pulse manifestation were observed, while hemorheological indexes, blood coagulation, and platelet aggregation were detected. The serum levels of the inflammatory cytokine matrix metalloprotein-9 (MMP-9) and the adhesion factor intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The pulse distention of rats in the model group was lower than that in the normal group ( $P < 0.01$ ), while BYHWT improved the pulse distention of the rats with the syndrome of blood stasis ( $P < 0.01$ ). In the model group, the tongue showed the characteristics of blood stasis syndrome, with dark purple veins at the tongue bottom and lower values of R, G, B on the tongue surface than those in the normal group ( $P < 0.01$ ), which, however, can be recovered by BYHWT ( $P < 0.01$ ). The blood viscosity at high, medium, and low shear stress and the plasma viscosity in the model group were higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with the model group, BYHWT restored the whole blood viscosity under high, medium and low shear stress and plasma viscosity ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The model group had shorter prothrombin time (PT), shorter thrombin time (TT), and higher fibrinogen (FIB) than the normal group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). BYHWT improved the TT and reduced the FIB in the rats with blood stasis syndrome ( $P < 0.01$ ). The platelet aggregation rate induced by arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP) in the model group was higher than that in normal group ( $P < 0.01$ ) and BYHWT decreased the platelet aggregation rate of the rats with blood stasis syndrome ( $P < 0.01$ ). The results of scanning electron microscopy showed that the model group exhibited excessive platelet activation, obvious pseudopodia, and increased aggregation of platelets compared with the normal group, while platelet activation and aggregation were rare in the BYHWT group. The serum levels of MMP-9 and ICAM-1 in the model group were higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ), which were decreased in the BYHWT group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The SD rats with the syndrome of acute blood stasis induced by ice water bath combined with injection of epinephrine demonstrate obvious changes in platelet function and morphology, inflammation, and abnormal cell adhesion. In the treatment of acute blood stasis in rats, BYHWT may reduce thrombosis and improve blood consistency and cohesion by mitigating inflammation, down-regulating cell adhesion factor overexpression, and improving platelet shape and function.

**[Keywords]** blood stasis; syndrome; Buyang Huanwutang; platelet; activation; inflammatory cytokine

血瘀证是指体内血流不畅,经脉受阻,血液瘀滞所引起的证候,是中医临床中常见的基本证候<sup>[1]</sup>。血瘀证与气血理论一直是历代医家关注的热点,现代医学研究发现,血瘀证会导致血液呈现浓、黏、凝、聚的病理状态,而血小板功能异常激活与该状态息息相关,血小板的黏附、活化和聚集是维持血栓形成和出血之间平衡的重要环节<sup>[2-3]</sup>。血瘀证主要与血液循环和微循环障碍、血液高粘滞状态、血小板活化和粘附聚集、血栓形成、免疫功能障碍等多种病理生理改变有关<sup>[4-8]</sup>。

补阳还五汤始载于清代名医王清任的《医林改错》,其组方由黄芪(生)、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁7味中药组成,具有益气活血、祛瘀通络

等功效,中医临床常用于治疗气虚血瘀证<sup>[9]</sup>。目前研究发现,补阳还五汤能够通过抗炎、抗氧化应激等途径预防治疗血瘀证,其主要有效活性成分为黄芪甲苷、芍药苷、苦杏仁苷、山柰素、红花黄色素和羟基红花黄色素、川芎嗪、阿魏酸等,具体与抑制核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路、炎症因子表达、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、调节一氧化氮(NO)产生,抗脂质过氧化反应、上调沉默信息调节因子1(SIRT1)表达水平等有关<sup>[10-12]</sup>。中药复方具有多靶点多通路作用的特点,但目前针对血小板自身靶点的药效研究机制还不明确<sup>[13-14]</sup>。本实验从血小板功能改变及血小板与炎症因子相互作用的角度,探讨补阳还五汤治疗急性血瘀证,改善血小

板聚集功能及活化后激活物质释放情况,为治疗血小板证候实质提供新的研究思路和实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物与分组** 选取SPF级鼠龄相同(5~6周龄)、体质量200~250 g的雄性SD大鼠60只。大鼠随机分为4组(正常组、模型组、补阳还五汤组、阿司匹林组),每组15只。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2021-0006。本实验经中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批通过,编号2018XLC003-2。

**1.2 药物** 龙芪溶栓肠溶胶囊(补阳还五汤原方,济宁华能制药厂有限公司,批号14000206164);阿司匹林(拜耳医疗保健制造有限公司,批号J20171021)。

**1.3 试剂与仪器** 盐酸肾上腺素注射液(天津金耀药业有限公司,批号H12020526);异氟烷(100 mL/瓶,鲁南贝特制药有限公司,批号H20020267);戊巴比妥钠(德国进口分装,北京化学试剂公司提供,批号020402);凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)测定试剂(上海太阳生物技术有限公司,批号分别为211201300、211208100、21125002、211206900);大鼠基质金属蛋白酶-9(MMP-9)试剂盒、大鼠细胞间黏附分子-1(ICAM-1)试剂盒(北京九邦生物技术有限公司,批号分别为QZ-24191、QZ-24700);血小板聚集诱导剂二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)(法国HYPHEN BioMed公司,批号分别为F2000702、FA0394);加样针清洗维护液(规格4 L,北京赛科希德科技股份有限公司,批号SAWZ-20211204);戊二醛固定液(北京索莱宝科技有限公司,批号CR2202015);四氧化钨(美国Polysciences公司,批号33376);叔丁醇(国药集团化学试剂有限公司,批号20170425)。

**1.4 仪器** 血小板功能检测样品杯(江苏英诺华医疗技术有限公司);D90型数码单镜反光相机(日本尼康公司);比色卡(日本Bear Medic公司);PL-12型血小板聚集仪(江苏英诺华医疗技术有限公司);LBY-N6C型血液流变学检测仪(北京普利生仪器有限公司);Synergy4型多功能酶标仪(美国BioTek公司);IEC-CL31R型离心机(美国Thermo公司);DW-3000S型双通道小动物呼吸机(安徽正华生物仪器设备有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模及给药

**2.1.1 造模** 适应性喂养3 d后,根据前期文献研

究条件<sup>[15]</sup>,开始造模。下午15:00开始冰水浴,将等量碎冰放入3个圆桶中。圆桶规格一致,为直径40 cm内壁光滑的塑料桶。然后在3个桶里注入自来水直至水深15 cm。待冰水温度至0~1 °C,将除空白组外大鼠放入圆桶,10 min后,将全身僵直大鼠取出,毛巾擦干,放回笼中,再给食物正常饲养。每天按照上述造模方法造模,连续造模7 d。第8天下午大鼠皮下注射盐酸肾上腺素0.8 mL·kg<sup>-1</sup>,共2次,间隔4 h。2次之间将大鼠置于冰水中浸泡5 min;空白组按体质量注射生理盐水。造模结束后,大鼠出现血黏度显著升高,并伴有弓背竖毛、进食量减少、毛色枯槁等体征,证明模型制备成功。

**2.1.2 给药** 补阳还五汤组和阿司匹林组(60 mg·kg<sup>-1</sup>)于每天上午9:00进行灌胃给药(按照10 mL·kg<sup>-1</sup>的剂量),根据前期结果选择最佳生药量为3.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[16]</sup>,连续灌胃8 d,正常组和模型组给予等体积生理盐水。

### 2.2 中医证候评价指标

**2.2.1 脉象** 大鼠用2%~3%异氟烷吸入麻醉。大鼠左侧卧位,头戴呼吸面罩维持麻醉,用探头夹子轻轻夹住大鼠右后足,红外感受器在足掌侧。应用MouseOx型小动物无创脉搏血氧仪对大鼠脉搏进行检测,此时应注意探头避光,待脉搏曲线稳定后,记录数据。

**2.2.2 舌象** 固定光照条件:色温5 500 K,照度1 000~1 500 lx,45°侧光。调整拍摄条件为60 mmf/2.8 G微距镜头,M档,ISO400,光圈F8,快门1/80 s。大鼠麻醉状态取仰卧位。用镊子轻轻将大鼠的舌头拉出,确保舌面平整,尽量保持自然状态。将标准比色卡与舌面置于同一平行面进行拍照,记录大鼠舌象。照片利用Adobe photoshop CS6图像处理软件,读取比色卡灰色中间点及舌面的红(R)、绿(G)、蓝(B)值。舌面选取固定三点,取平均值。按照公式: $X_{\text{相对}} = 128 / X_{\text{比色卡}} \times X_{\text{舌面}}$ (X=R、G、B),用绝对中性灰度值将读取值标准化,得到相对值,最后统计分析各组R、G、B相对值。

**2.2.3 血液流变学** 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,每只肝素管内装血液3 mL,轻轻颠倒混匀,上机检测。全血黏度检测条件为低切(5 s<sup>-1</sup>),中切(60 s<sup>-1</sup>),高切(150 s<sup>-1</sup>);血浆黏度检测条件100 s<sup>-1</sup>。

### 2.3 血小板活化功能指标检测

**2.3.1 血小板聚集率** ①诱导剂的制备:AA样品为白色粉末,用纯水溶解,移液枪吸取纯水0.5 mL

注入样本瓶中,配制成母液,分装为100 μL的微型离心管中,放置于冰上,待用。ADP样品为白色粉末,用纯水溶解,移液枪吸取0.5 mL纯水注入样本瓶中,配制成母液,实验时取母液100 μL,加入生理盐水300 μL稀释成10×溶液,放置于冰上,待用。②血样的采集:大鼠用戊巴比妥钠麻醉,取仰卧位,腹主动脉取血,3.8%枸橼酸钠抗凝,静置30 min。采用PL-12型全自动血小板聚集仪,按流程进行检测。

**2.3.2 血小板电镜** 大鼠用戊巴比妥钠按照10 mL·kg<sup>-1</sup>的标准进行腹腔注射麻醉。腹主动脉取血2 mL,3.8%枸橼酸钠抗凝。200×g室温离心10 min,取上层富血小板血浆(PRP)10 μL。将PRP轻柔地均匀涂抹于玻片上,静置10 min。吸去多余的PRP,倒入预冷的戊二醛溶液。4 °C固定至少1 h。PBS清洗样品3次。1%四氧化锇固定1 h。PBS清洗样品3次。乙醇按照50%、70%、90%、100%的浓度梯度脱水,每次15 min。99.9%的叔丁醇脱水,30 min。冷冻干燥2 h。用导电的双面碳带将玻片固定在样品台上。喷涂纳米金颗粒。用S-3400N型扫描电子显微镜上机观察。

**2.4 大鼠血清炎性及黏附因子含量检测** 大鼠腹

主动脉取血,血清管静置30 min以上。4 °C下3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径6 cm)分离血清,-80 °C冻存待检测。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行,检测相关指标含量。

**2.5 统计学方法** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学处理,计量资料使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,若数据符合正态分布方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验反之用Tamhane's T2检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对急性血瘀证大鼠舌象的影响** 舌象结果显示,正常组大鼠舌面和舌底都呈淡红色,舌面有少量薄白苔。与正常组比较,血瘀证模型组大鼠舌面和舌底的舌色明显偏紫暗,舌面舌底R、G、B值有明显降低( $P<0.05$ ),阿司匹林组可改善模型组大鼠舌色暗紫的情况,对舌底R值和舌底G、B值及舌面R、G、B值都有明显改善( $P<0.05, P<0.01$ )。补阳还五汤组可有效改善模型组大鼠舌象,使舌面和舌底的R、G、B值均显著升高( $P<0.01$ )。本实验还测定了深麻醉和浅麻醉条件下的大鼠舌底与舌面的R、G、B值,比较发现,不同麻醉状态未见大鼠舌色有明显差异。见表1、图1和图2。

表1 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠舌象的影响( $\bar{x}\pm s, n=13$ )

Table 1 Effect of Buyang Huanwutang (BYHWT) on tongue of acute blood stasis syndrome in rats ( $\bar{x}\pm s, n=13$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	舌底			舌面		
		R	G	B	R	G	B
正常组		135.31±9.49	71.74±10.24	91.69±10.16	141.05±4.88	92.18±6.93	109.10±8.59
模型组		119.00±8.42 <sup>1)</sup>	57.74±5.46 <sup>1)</sup>	76.33±6.65 <sup>1)</sup>	121.56±6.41 <sup>1)</sup>	80.46±8.88 <sup>1)</sup>	96.54±8.10 <sup>1)</sup>
阿司匹林组	0.06	126.82±7.64 <sup>3)</sup>	64.48±5.57 <sup>4)</sup>	85.12±6.64 <sup>4)</sup>	136.09±5.94 <sup>4)</sup>	93.52±6.20 <sup>4)</sup>	112.27±5.71 <sup>4)</sup>
补阳还五汤组	3.2	135.47±4.72 <sup>4)</sup>	68.11±5.72 <sup>4)</sup>	87.75±5.53 <sup>4)</sup>	139.19±6.71 <sup>4)</sup>	90.50±8.62 <sup>4)</sup>	108.03±10.50 <sup>4)</sup>

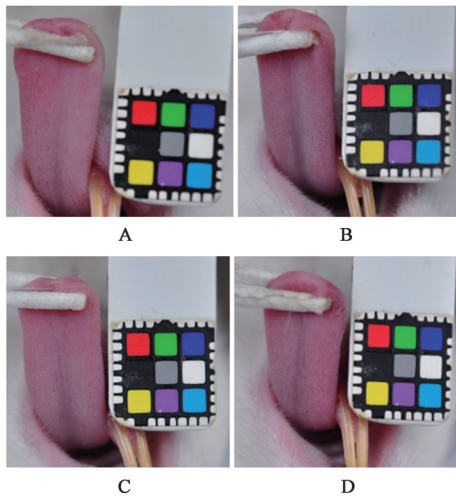
注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2-表7同)

**3.2 对急性血瘀证大鼠脉象的影响** 脉象实验结果显示,正常组大鼠的脉象均匀有力,流畅平稳,节奏快且具有一致性。与正常组比较,血瘀证模型组大鼠脉搏幅度显著降低( $P<0.01$ ),从脉象图上来看,明显低、平,不够流畅等特点。与模型组比较,阿司匹林组对模型组大鼠脉象有改善作用( $P<0.05$ ),而补阳还五汤组能显著改善模型组大鼠的脉象( $P<0.01$ ),使脉搏幅度明显升高,脉象呈现流动性更好,节奏平稳有力等特点。见表2。

**3.3 对急性血瘀证大鼠血液流变学的影响** 与正常组比较,模型组血液黏度在高、低剪应力作用下均显著黏度升高( $P<0.01$ ),在中剪应力作用下也有明显增长( $P<0.05$ )。其血浆黏度与正常组比较有明

显增长( $P<0.05$ )。与模型组比较,阿司匹林组在低切、高切剪应力下,全血黏度显著下降( $P<0.01$ ),在中切条件下和血浆黏度也明显下降( $P<0.05$ )。与模型组比较,补阳还五汤组全血黏度在高切条件下显著下降( $P<0.01$ ),在低、中切条件下和血浆黏度检测中,明显下降( $P<0.05$ )。见表3。

**3.4 对急性血瘀证大鼠凝血功能的影响** 与正常组比较,模型组大鼠FIB水平显著升高( $P<0.01$ ),PT和TT明显缩短( $P<0.05, P<0.01$ ),APTT差异无统计学意义,提示血瘀证模型大鼠血液呈现高凝状态。与模型组比较,阿司匹林组大鼠血液的FIB明显降低( $P<0.05$ ),PT、TT明显增长( $P<0.05$ )。补阳还五汤组较模型组TT显著增长( $P<0.01$ ),FIB显著降低



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 补阳还五汤组; D. 阿司匹林组(图2和图3同)

图1 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠舌面的影响

Fig. 1 Effect of BYHWT on tongue of acute blood stasis syndrome in rats

( $P < 0.01$ )。见表3。

### 3.5 对急性血瘀证大鼠血小板聚集率的影响

**3.5.1 抗AA诱导的血小板聚集实验** 实验数据显示,与正常组比较,血瘀证模型组大鼠血小板最大聚集率(MAR)和平均聚集率(AAR)均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阿司匹林组显著改善作用( $P < 0.01$ )。与模型组比较,补阳还五汤组可明显降低由AA诱导的血瘀证模型大鼠的血小板MAR( $P < 0.05$ ),但对血瘀证大鼠血小板AAR的作用差异

表3 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠血液流变学的影响( $\bar{x} \pm s, n=13$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	低切( $5 s^{-1}$ )	中切( $60 s^{-1}$ )	高切( $150 s^{-1}$ )	血浆( $100 s^{-1}$ )
正常组		9.38±0.89	4.69±0.33	4.13±0.27	1.26±0.02
模型组		11.35±1.54 <sup>2)</sup>	5.58±0.80 <sup>1)</sup>	4.72±0.44 <sup>2)</sup>	1.40±0.11 <sup>1)</sup>
阿司匹林组	0.06	8.72±0.95 <sup>4)</sup>	4.81±0.44 <sup>3)</sup>	4.07±0.25 <sup>4)</sup>	1.42±0.19
补阳还五汤组	3.2	9.61±1.02 <sup>3)</sup>	4.99±0.59 <sup>3)</sup>	4.18±0.31 <sup>4)</sup>	1.29±0.05 <sup>3)</sup>

表4 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠凝血功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=13$ )

Table 4 Effect of BYHWT on coagulation function of acute blood stasis syndrome in rats ( $\bar{x} \pm s, n=13$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	PT/s	APTT/s	FIB/ $g \cdot L^{-1}$	TT/s
正常组		13.84±0.83	21.03±1.12	2.02±0.09	30.15±0.43
模型组		12.96±0.44 <sup>1)</sup>	20.85±0.86	4.32±0.17 <sup>2)</sup>	24.57±0.87 <sup>2)</sup>
阿司匹林组	0.06	13.90±1.17 <sup>3)</sup>	20.80±0.48	3.97±0.61 <sup>3)</sup>	25.40±1.10 <sup>3)</sup>
补阳还五汤组	3.2	12.72±0.75	20.30±0.44	3.93±0.34 <sup>4)</sup>	25.52±0.73 <sup>4)</sup>

**3.5.2 抗ADP诱导的血小板聚集实验** 实验数据显示,与正常组比较,血瘀证模型组大鼠血小板最大聚集率(MAR)和平均聚集率(AAR)均明显升高

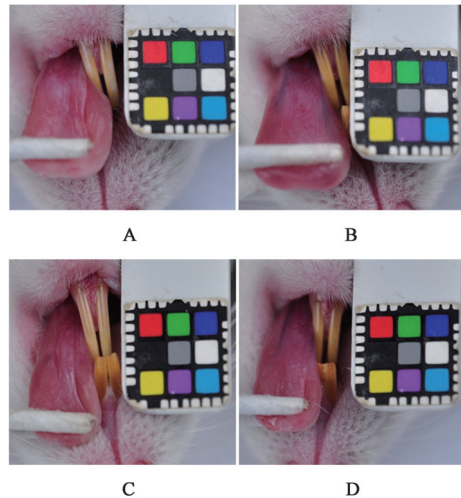


图2 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠舌底的影响

Fig. 2 Effect of BYHWT on sublingual of acute blood stasis syndrome in rats

表2 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠脉象的影响( $\bar{x} \pm s, n=13$ )

Table 2 Effect of BYHWT on pulse distention of acute blood stasis syndrome in rats ( $\bar{x} \pm s, n=13$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	脉搏幅度/ $\mu m$
正常组		42.82±12.03
模型组		18.84±1.72 <sup>2)</sup>
阿司匹林组	0.06	28.54±7.88 <sup>3)</sup>
补阳还五汤组	3.2	42.73±13.20 <sup>4)</sup>

无统计学意义。见表5。

( $P < 0.05$ )。与模型组比较,阿司匹林组对血瘀证模型MAR具有改善作用( $P < 0.05$ ),AAR显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,补阳还五汤组可明显降低由

表5 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠血小板聚集率的影响(AA诱导)( $\bar{x}\pm s, n=13$ )

Table 5 Effect of BYHWT on platelet aggregation rate of acute blood stasis syndrome in rats (induced by AA) ( $\bar{x}\pm s, n=13$ ) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MAR	AAR
正常组		81.6±9.4	65.5±10.9
模型组		87.7±1.8 <sup>2)</sup>	80.5±7.6 <sup>2)</sup>
阿司匹林组	0.06	81.7±6.3 <sup>4)</sup>	68.8±7.0 <sup>4)</sup>
补阳还五汤组	3.2	82.7±6.6 <sup>3)</sup>	74.3±8.9

ADP诱导的血瘀证模型大鼠的血小板AAR和MAR ( $P<0.01$ )。见表6。

表6 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠血小板聚集率的影响(ADP诱导)( $\bar{x}\pm s, n=13$ )

Table 6 Effect of BYHWT on platelet aggregation rate of acute blood stasis syndrome in rats (induced by ADP) ( $\bar{x}\pm s, n=13$ ) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MAR	AAR
正常组		72.2±9.0	56.5±12.8
模型组		85.3±3.7 <sup>1)</sup>	79.8±5.2 <sup>1)</sup>
阿司匹林组	0.06	76.5±10.0 <sup>3)</sup>	63.0±12.5 <sup>4)</sup>
补阳还五汤组	3.2	78.7±7.0 <sup>4)</sup>	65.7±13.2 <sup>4)</sup>

### 3.6 对急性血瘀证大鼠血小板显微结构的影响

扫描电镜下观察,正常组血小板轮廓较规整,外壁较圆滑,有零星轻度活化现象,但外型规整仍呈类圆形。血小板整体情况散在,呈现不聚团现象,伪足较少伸出。与正常组比较,模型组大鼠血小板的活化聚集情况明显,血小板间联结情况多发,伪足互相交错,聚集情况明显多发,细胞膜表面不平滑,细胞间膜融合现象明显。与模型组比较,阿司匹林组对血小板聚集率有明显改善作用,血小板表面伪足伸出情况明显减少,表面较为光滑,整体聚集情况减少。与模型组比较,补阳还五汤可明显抑制血瘀模型大鼠血小板的活化,使血小板表面轮廓较完整,伸出伪足较少,整体聚集现象明显改善,使血小板微血栓解聚。见图3。

3.7 对急性血瘀证大鼠血清中相关炎症因子表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中MMP-9和ICAM-1含量均显著增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,阿司匹林组MMP-9、ICAM-1表达水平显著下降( $P<0.01$ ),补阳还五汤组大鼠血清MMP-9、ICAM-1因子表达水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见表7。

## 4 讨论

血瘀证是多种原因造成的与血液循环障碍有

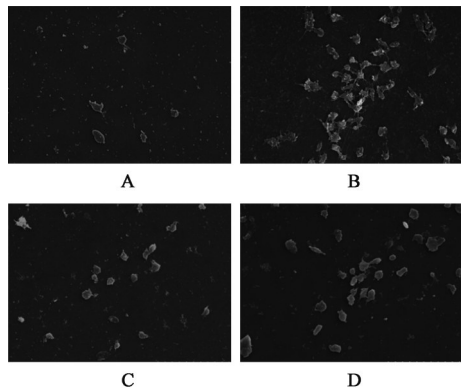


图3 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠血小板形态学的影响(透射电镜,×2 000)

Fig. 3 Effect of BYHWT on platelet morphology in rats with blood stasis syndrome of acute blood stasis (TEM, ×2 000)

表7 补阳还五汤对急性血瘀证大鼠炎症因子及黏附因子的影响( $\bar{x}\pm s, n=13$ )

Table 7 Effect of BYHWT on inflammatory factors and adhesions in rats with acute syndrome of blood stasis ( $\bar{x}\pm s, n=13$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MMP-9	ICAM-1
正常组		15.09±0.77	16.20±0.56
模型组		17.05±1.30 <sup>2)</sup>	17.61±0.78 <sup>2)</sup>
阿司匹林组	0.06	15.10±0.79 <sup>4)</sup>	16.54±0.37 <sup>4)</sup>
补阳还五汤组	3.2	15.70±0.90 <sup>4)</sup>	16.77±0.40 <sup>3)</sup>

关的诸多疾病,而形成血瘀后又可以引发多种更严重的病变<sup>[17]</sup>。传统中医理论认为,血瘀证的始发原因可因寒、因热、因气、因血。《黄帝内经》中记载有关“寒邪”入侵机体所导致的血瘀证内容为“血得温而行,逢寒则凝”,而这种寒可是六淫之“外寒”,也可是阳虚之“内寒”所致<sup>[18-19]</sup>。因此本课题选用“因寒所致”的急性血瘀证造模方法,通过冰水浴刺激模拟“寒邪”侵袭机体,注射盐酸肾上腺素模拟激动的情绪变化。现代血瘀证动物模型的研究显示,急性血瘀证候模型的造模表现为寒战、蜷缩少动、喜扎堆、爪尾紫暗、耳色暗红、舌质紫暗、舌下脉络增粗增长、毛色不荣、食少便溏等<sup>[20-21]</sup>。本实验研究发现,模型组大鼠的舌象与正常组比较,舌面呈瘀紫色,舌底脉络黑紫色且清晰明显,R、G、B值具有显著性差异,阳性药组有改善效果;而补阳还五汤组则更针对改善急性血瘀证大鼠的舌色及舌底脉络,其R、G、B值与模型组比较均有显著改善效果。脉象实验结果显示,模型组较正常组脉搏幅度显著下降,阳性药组大鼠脉搏较模型组有增长趋势,但补阳还五汤益气活血效果更为明显,表现在该组大鼠的脉搏幅度较模型组显著提升。

血瘀证与现代医学中的凝血、抗凝功能失常、微血栓形成有关,临床上常以血液流变性、凝血功能等作为血瘀证的客观评价指标,本实验除了中医证候指标外,还检测了血液流变学、凝血四项等西医临床指标<sup>[22]</sup>。结果显示,与正常组比较,模型组凝血功能明显受损,大鼠血液呈“浓黏凝聚”状态。血液流变学数据显示,模型组大鼠血液在高、中、低剪应力条件下血液黏度较正常组相比均显著上升,血浆黏度也显著上升。给予阳性药阿司匹林后与模型组比较大鼠血液黏度在高、中、低剪应力下均显著降低。补阳还五汤组大鼠相对模型组血液黏度在高、中、低剪应力下也有明显改善,其血浆黏度也显著降低。以上模型评价指标证明血瘀证模型大鼠造模成功,初步贴合人类发病情形。

血小板是来源于骨髓的具有生物活性的微小胞质,在止血、炎症反应及血栓形成等病理生理过程中均扮演了极其重要的角色,血小板的功能异常在血瘀证的发病与演化中发挥着重要作用,对其机理的阐释是研究血瘀证疾病及治疗方案的关键科学问题。临床研究显示,当血管内皮发生损伤后,会激活局部血小板进而导致大量血小板活化、黏附、聚集的发生<sup>[23]</sup>。动物实验研究显示,血瘀证大鼠与正常组比较,血小板具有活化功能亢进,颗粒释放增加的特点<sup>[13]</sup>。本实验大鼠血小板聚集率实验结果显示,与正常组比较,AA、ADP诱导的模型组大鼠血小板最大聚集率和平均聚集率均显著升高,说明血瘀证大鼠血小板可能已高度活化聚集。阿司匹林对于AA诱导的大鼠血小板最大聚集率和平均聚集率均有显著的降低作用,而补阳还五汤对于ADP诱导的大鼠血小板最大聚集率和平均聚集率均有显著的降低作用,考虑可能与作用的相关代谢通路有关<sup>[24]</sup>。为直观观察血小板聚集情况,本实验对大鼠血小板进行扫描电镜观察,结果显示与正常组相比模型组大鼠血小板高度活化,伪足伸出明显,聚集抱团情况多发;阿司匹林组和补阳还五汤组均能改善血小板过度聚集情况的发生。

有研究指出,血瘀证与炎症、ICAM-1存在相关性<sup>[25-26]</sup>,机体健康状态下很少表达ICAM-1。而炎症也可诱发血管内皮损伤引起血小板聚集,并产生一系列病理变化,如脂质沉积、白细胞黏附增强等,导致动脉粥样硬化斑块的形成;同时损伤内皮细胞的表面炎症受体被激活,使得促炎细胞因子如肿瘤坏死因子、白细胞介素-1、白细胞介素-6分泌增加,这些介质和细胞因子导致血管内皮损伤进一步加重,

形成恶性循环,导致斑块破裂、裂隙或者侵蚀,诱发血栓形成致缺血事件<sup>[27]</sup>。因此,炎症参与心血管事件链的全程。炎症引起局部血栓形成,血栓形成又放大炎症反应,血小板及其活化产物在其中起着关键性作用。

在血小板活化后,释放血小板源生长因子增加,而后者是MMPs分泌的刺激因子,可使MMPs水平升高。MMPs与白细胞和内皮细胞的相互作用,参与的炎症反应被认为是导致动脉粥样硬化斑块不稳定的重要因素<sup>[28]</sup>。多项研究证实,MMPs的水平与冠心病血瘀证患者发病率呈正相关<sup>[29-30]</sup>。MMP-9属于MMPs家族中的明胶酶,能降解细胞外基质中的胶原,影响平滑肌增殖等作用。研究显示,MMP-9过表达可刺激其他炎症因子的表达而促进冠状动脉粥样硬化斑块的形成或增加其不稳定性而破裂,导致不稳定型心绞痛发作<sup>[31]</sup>。在心血管相关疾病研究中,检测血清中MMP-9含量可评估心血管疾病患者与健康对照组体内炎症的差异。有研究表明,急性心肌梗死患者与健康对照组比较,血清MMP-9的水平显著升高<sup>[32]</sup>。有学者采用解毒通络合剂治疗冠心病PCI术后患者,与安慰剂组比较,血清MMP-9水平显著下降<sup>[33]</sup>。

ICAM-1是细胞间的黏附因子,其功能可介导细胞间黏附,当ICAM-1过表达时可诱导细胞异常增殖、迁移,进而导致动脉粥样硬化的发生,可作为心血管事件的独立靶向预测因子<sup>[34]</sup>。MMP-9作为炎性细胞因子,是降解胶原的主要酶类之一,在诱导炎症细胞迁移、血管重构、斑块不稳定性及其破裂中起着重要作用<sup>[30]</sup>。有实验证明多种炎性因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等可诱导机体内部巨噬细胞和中性粒细胞释放大量的MMP-9,局部MMP-9含量增多可能与炎症有关<sup>[35]</sup>。而活化的血小板通过释放活性颗粒因子来影响并促进血瘀证的发生和发展,其中血小板因子4(PF4)的含量最丰富,被认为是巨噬细胞成熟和血小板活化的标记<sup>[36]</sup>。有研究表明,PF4经TLR4上调巨噬细胞MMP-9表达,进而促进炎症和血瘀斑块不稳定性发生发展<sup>[37]</sup>。本实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清中MMP-9和ICAM-1含量均显著增加;与模型组比较,阿司匹林和补阳还五汤均可显著降低大鼠血清中的MMP-9和ICAM-1因子表达水平,以改善大鼠炎症以及血瘀斑块不稳定等问题,发挥药物抗炎、抗凝的作用。

炎症和血小板功能亢进贯穿整个血瘀证发生

发展过程,而调控这一过程是多通路多靶点共同作用的结果。其中发现,NF- $\kappa$ B途径激活与ICAM-1表达之间存在相关性,从而能够确定ICAM-1为这一炎症过程的关键参与者<sup>[38]</sup>。而多篇报道表明,通过激活NF- $\kappa$ B途径可诱导血管平滑肌细胞中的C反应蛋白(CRP)和MMP-9表达,从而加剧炎症反应<sup>[39-40]</sup>。推测通过抑制NF- $\kappa$ B途径,可能减轻血瘀证造成的炎症损伤,从而缓解炎症造成的血小板功能亢进,减轻血栓形成,达到活血化瘀的效果。补阳还五汤中含有黄芪甲苷、芍药苷、苦杏仁苷、山柰素等有效活性成分经试验证实可以入血分,具有多靶点协同、拮抗、整合、调节等作用特点,并且国内外多个实验证实该方具有抑制NF- $\kappa$ B信号通路的活化、抑制炎症因子的表达的作用<sup>[41-43]</sup>。

综上所述,本研究发现补阳还五汤具有活血化瘀、抗炎等作用,可用于治疗多因素诱导的大鼠急性血瘀证,其机制可能通过调节炎症从而抑制血小板过度活化聚集,改善大鼠血液凝血功能。血瘀证血小板活化功能异常是多通路多靶点共同作用的结果,其机制复杂难以正确调控成为目前治疗血瘀证的一大难题。改善血小板功能,以及在血小板蛋白上找到新型抗血栓药物的靶点,是未来治疗心血管事件的思路,望本文可为中医药学和现代医学活血化瘀的研究发展提供重要参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 曲文白,于林童,邹思畅,等. 廖家桢教授应用气血理论治疗冠心病心绞痛血瘀证的临床数据挖掘研究[J]. 中国中西医结合杂志,2020,40(7):868-871.

[2] 陈可冀,李连达,翁维良. 血瘀证与活血化瘀研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2005,1:1-2.

[3] WU D, KANDA A, LIU Y, et al. Involvement of Müller glial autoinduction of TGF- $\beta$  in diabetic fibrovascular proliferation via glial-mesenchymal transition [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(14):29.

[4] 胡元会,贾秋蕾,孟昊,等. 冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证与外周血血小板微粒膜蛋白表达的相关性[J]. 中医杂志,2017,58(4):321-324.

[5] 韩新民,陈正权,茅惠明,等. 血瘀证心脑血管疾病血小板聚集与释放功能的同步观察及其临床意义[J]. 中西医结合杂志,1991,11(6):334-336,323-324.

[6] 刘玥,殷惠军,陈可冀. 血小板蛋白质组学及其在血瘀证与活血化瘀中药研究中的探索应用[J]. 中国科学:生命科学,2013,43(8):619-625.

[7] 李雪峰,蒋跃绒,吴彩凤,等. 冠心病血小板功能蛋白与证候相关性研究[J]. 中国分子心脏病学杂志,2009,9(6):326-331.

[8] SAVAGE B, SALDÍVAR E, RUGGERI Z M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor[J]. Cell, 1996, 84(2):289-297.

[9] 吴明志.《医林改错》血瘀证制方用药特点[J]. 河北中医,2000,22(2):152-153.

[10] 裴可,张倩,杜孜玮,等. 黄芪甲苷对动脉粥样硬化炎症反应及周细胞生物学功能的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(5):2501-2506.

[11] 尤心怡,王文凤,徐霞,等. 补阳还五汤治疗动脉粥样硬化的物质基础及作用机制研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2021,32(10):1575-1581.

[12] KUNG Y L, LU C Y, BADREALAM K F, et al. Cardioprotective potential of amygdalin against angiotensin II induced cardiac hypertrophy, oxidative stress and inflammatory responses through modulation of Nrf2 and NF- $\kappa$ B activation [J]. Environ Toxicol, 2021,36(5):926-934.

[13] 史雅红,任建勋,刘建勋,等. 睡眠剥夺诱导的大鼠血瘀证对血小板活化影响的研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(16):3341-3345.

[14] 卞敬琦,牛雯颖,冯月男,等. 补阳还五汤对气虚血瘀模型血小板活化影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(2):43-46.

[15] 杨佳敏,沈小雨,张玲,等. 寒凝血瘀证动物模型制备方法的评价与选择[J]. 中医学报,2014,29(1):2.

[16] 王志飞,谢颖桢,谢雁鸣,等. 芪龙胶囊临床应用专家共识[J]. 中国中药杂志,2019,44(24):5287-5290.

[17] 徐浩,陈可冀. 实用血瘀证诊断标准[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(10):1163.

[18] 王洪图. 素问调经论[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:250-251.

[19] 成秀梅,杜惠兰,李丹. 寒凝血瘀证动物模型的创建[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(8):604-605.

[20] 刘校彤,吕光华,王巧稚,等. 血瘀证动物模型制备的研究进展[J]. 中国实验动物学报,2021,29(3):371-380.

[21] 张蕊,郝春华,孙双勇,等. 舒脑欣滴丸对寒凝气滞血瘀证大鼠血小板聚集和血液流变学指标的影响[J]. 现代药物与临床,2020,35(2):206-211.

[22] 黄修献,林泽辉,李海涛,等. 复方丹参滴丸对老年冠心病患者血流变学、血脂及炎症反应递质的影响[J]. 世界中医药,2020,15(16):2438-2442.

[23] 李荣军,张奎松. 丹参酮Ⅱ<sub>A</sub> 磺酸钠注射液对冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血小板活化功能的影响

- [J]. 中国药业, 2017, 26(10):63-66.
- [24] 王茹, 张磊, 李卫萍, 等. 基于PI3K/Akt/eNOS信号通路探讨补阳还五汤对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13):22-27.
- [25] 彭菊琴, 任钧国, 张艺楠, 等. 单核细胞/高密度脂蛋白胆固醇比值与冠心病血瘀证相关性研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(14):2157-2162.
- [26] MA C Y, LIU J H, LIU J X, et al. Relationship between two blood stasis syndromes and inflammatory factors in patients with acute coronary syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(11):845-849.
- [27] MUHLESTEIN J B, MAY H T, GALENKO O, et al. GlycA and hsCRP are independent and additive predictors of future cardiovascular events among patients undergoing angiography: The intermountain heart collaborative study[J]. Am Heart J, 2018, 202:27-32.
- [28] SORSA T, TERVAHARTIALA T, LEPPILAHTI J, et al. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines [J]. Pharmacol Res, 2011, 63(2):108-113.
- [29] 梁晓萍, 戴勇, 石丹, 等. 血清基质金属蛋白酶-9与冠心病相关性的临床研究[J]. 中国心血管杂志, 2002, 7(2):94-95.
- [30] 张涛, 李自成, 巫少荣. 基质金属蛋白酶-9和C反应蛋白与冠心病的相关性研究[J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(2):88-90.
- [31] BETON O, ARSLAN S, ACAR B, et al. Association between MMP-3 and MMP-9 polymorphisms and coronary artery disease[J]. Biomed Rep, 2016, 5(6):709-714.
- [32] 王宁, 马静. 基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9及sCD40L对急性冠脉综合征的影响[J]. 中国社区医师:医学专业, 2010, 12(15):163-164.
- [33] 魏陵博, 辛辉, 戎冬梅, 等. 解毒通络合剂对冠心病PCI患者MMP-9、ET-1、NO、hs-CRP的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21(12):1895-1896, 1906.
- [34] PATTAN V, SETH S, JEHangIR W, et al. Effect of atorvastatin and pioglitazone on plasma levels of adhesion molecules in non-diabetic patients with hypertension or stable angina or both[J]. J Clin Med Res, 2015, 7(8):613-619.
- [35] CHEN Q, JIN M, YANG F, et al. Matrix metalloproteinases: Inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling [J]. Mediators Inflamm, 2013, doi:10.1155/2013/928315.
- [36] GLEISSNER C A. Platelet-derived chemokines in atherogenesis: What's new?[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(5):563-569.
- [37] 赵战芝, 何钊, 唐雅玲, 等. 血小板因子4经Toll样受体4上调巨噬细胞基质金属蛋白酶9表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(8):769-773.
- [38] WU S, TENG M S, ER L K, et al. Association between NF- $\kappa$ B pathway gene variants and sICAM1 levels in taiwanese[J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0169516.
- [39] PENG N, LIU J T, GAO D F, et al. Angiotensin II -induced C-reactive protein generation: Inflammatory role of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2007, 193(2):292-298.
- [40] BROWATZKI M, LARSEN D, PFEIFFER C A, et al. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner[J]. J Vasc Res, 2005, 42(5):415-423.
- [41] LIU B, SONG Z, YU J, et al. The atherosclerosis-ameliorating effects and molecular mechanisms of BuYangHuanWu decoction[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123:109664.
- [42] 廖金明, 余梦黎, 秦莎莎, 等. 羟基红花黄色素A、芍药苷单用及联合对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织NF- $\kappa$ B及炎症因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3):51-55.
- [43] TANG X L, LIU J X, DONG W, et al. Protective effect of kaempferol on LPS plus ATP- induced inflammatory response in cardiac fibroblasts [J]. Inflammation, 2015, 38(1):94-101.

[责任编辑 周冰冰]