

消栓通脉颗粒对深静脉血栓形成大鼠静脉壁 NF- κ B, I κ B 表达的影响

刘政*, 张玥, 郝清智, 侯玉芬

(山东中医药大学附属医院周围血管病科, 济南 250011)

[摘要] 目的:探讨中药消栓通脉颗粒治疗深静脉血栓形成的机制。方法:72 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组:假手术组、血栓模型组、复方丹参片组(0.23 g·kg⁻¹, ig)、消栓通脉颗粒组(32 g·kg⁻¹, ig)。连续给药 5 d 后采用下腔静脉结扎法制备血栓模型,造模后 4 h 连续给药,动态监测各组大鼠术后不同时间点静脉壁核因子 κ B mRNA (NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA), 抑制因子 κ B mRNA (I κ B α mRNA) 表达水平。结果:同一时间点,中药治疗组静脉壁 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达水平显著低于模型组($P < 0.01$),而 I κ B α mRNA 明显增高($P < 0.01$);各组静脉壁 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达随手术天数的延长呈现先增强后减弱的趋势,术后 3 d 达到高峰,而 I κ B α mRNA 的表达呈先下降后升高的规律,术后 3 d 降到低谷;与复方丹参片组比较,在同一时间点,消栓通脉颗粒剂组 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$),而 I κ B α mRNA 表达显著增高($P < 0.01$)。结论:消栓通脉颗粒剂可能通过调控 NF- κ B / I κ B 信号传导通路,减轻其介导的静脉壁炎症反应,保护血管内皮细胞功能,发挥抗血栓作用。

[关键词] 深静脉血栓;核因子 κ B;抑制因子 κ B;炎症反应;消栓通脉颗粒

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0210-04

Effect of Xiaoshuan Tongmai Granules on Level of NF- κ B and I κ B in Vein Wall in Rats with in Deep Venous Thrombosis

LIU Zheng*, ZHANG Yue, HAO Qing-zhi, HOU Yu-feng

(Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the interventional mechanism of Chinese herbs Xiaoshuan Tongmai Granules(XSTM) on deep venous thrombosis (DVT) in rats. **Method:** Seventy two Wistar rats were randomly divided into 4 groups: sham group, DVT model group, XSTM group, Fufang Danshen tablets(DS) group. Venous thrombosis was induced by inferior vena caval occlusion by ligature just below the level of the renal veins. The levels of NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA and I κ B α mRNA in vein wall of all rats were dynamic detected at 1, 3,

[收稿日期] 2011-07-07

[基金项目] 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2008BS03056)

[通讯作者] *刘政,副主任医师,博士,从事中西医结合周围血管疾病研究, Tel:15553111587, E-mail:lz2000jn@163.com

Med, 1998, 158(6):1936.

[2] 贾天明, 乔俊英, 栾斌, 等. 大鼠哮喘模型气道重塑中细胞增殖和凋亡的变化[J]. 郑州大学学报, 2004, 39(3):449.

[3] 张维溪, 戴欢, 贺孝良, 等. 糖皮质激素调控哮喘大鼠气道重塑中 TGF-13/Smad 信号通路的研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(9):1142.

[4] 姜云志, 沈以红, 代方银. Smad 介导 TGF-13 信号转导[J]. 蚕学通讯, 2008, 28(3):20.

[5] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-13/Smad signaling system [J]. EMBO, 2000, 19(8):1745.

[责任编辑 何伟]

6 days after model built. **Result:** At the same time, the levels of NF- κ B p50 mRNA and NF- κ B p65 mRNA in Chinese herbs treatment groups were significant lower than those in model group ($P < 0.01$), while the level of I κ B α mRNA was significantly higher ($P < 0.01$). The levels of NF- κ B p50 mRNA and NF- κ B p65 mRNA were increased the decreasing trend after model induced, and reached the peak at 3rd day after ligation ($P < 0.01$) in all groups. But the levels of I κ B α mRNA were decreased the increasing trend after model induced, and reached the low at 3rd day after ligation ($P < 0.01$) in all groups. At the same time, the levels of NF- κ B p50 mRNA and NF- κ B p65 mRNA in XSTM group were significantly lower than those in DS group ($P < 0.01$), while the level of I κ B α mRNA in XSTM group was significantly higher ($P < 0.01$). **Conclusion:** It suggested that XSTM could intervene the system of NF- κ B p / I κ B to suppress inflammatory reaction and thrombosis.

[**Key words**] deep venous thrombosis; NF- κ Bp; I κ B; inflammatory reaction; Xiaoshuan Tongmai Granules

深静脉血栓形成 (deep venous thrombosis, DVT) 是常见的周围血管疾病, 已成为影响人类健康的重要疾病^[1]。炎症与 DVT 密切相关^[2], 而核转录因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是目前所认识的参与炎症、免疫等多种生理、病理过程基因调控的关键性的核转录因子。消栓通脉颗粒剂是第四批全国名老中医侯玉芬教授治疗 DVT 的经验方, 前期研究证实具有良好的抗血栓作用^[3], 但其干预机制尚需进一步深入研究。本实验通过对 DVT 大鼠静脉壁 NF- κ B、抑制因子 κ B (inhibitory kappa B, I κ B) 表达的动态观察, 探讨 DVT 的病理生理过程和消栓通脉颗粒的治疗机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠, 72 只, 200 ~ 250 g, SPF 级, 购自山东大学试验动物中心, 许可证号 SCXK (鲁) 20090001。常规饲养 1 周后开始实验。

1.2 药物 消栓通脉颗粒, 含生药 $3.2 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, 为院内制剂, (鲁药制字 Z0120030051), 由山东中医药大学附属医院药剂科提供。药物组成: 茵陈、金银花、赤小豆、桃仁、黄柏、红花、赤芍、栀子、水蛭、苍术, 用蒸馏水制成悬浊液 (含消栓通脉颗粒 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 复方丹参片, 江西南昌桑海制药厂, 药物组成: 丹参、三七、冰片, 将片剂研为细末, 用蒸馏水制成悬浊液 (含片剂 $0.023 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.3 试剂与仪器 Trizol, $5 \times$ 逆转录 buffer, $5 \times$ SYBR Green I PCR buffer, dNTPs, MMLV, Taq 酶。ABI 3900 型台式高通量 DNA 合成仪, 科大创新; HC-3018R 型高速冷冻离心机; ABI 9700 型 PCR 仪; ABI 7500 型全自动荧光定量 PCR 仪; NF- κ B p65, NF- κ B p50, I κ B α 探针 (广州达安基因股份有限公司生产)。

2 方法

2.1 模型制作 参考文献[4]改进, 10% 水合氯醛按 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 行腹腔麻醉, 腹中部去毛, 沿腹白线开腹, 分离下腔静脉, 于左肾静脉下方用粗丝线结扎下腔静脉及该段下腔静脉的主要属支, 缝合腹壁, 建立大鼠深静脉血栓形成模型。

2.2 分组及给药 将 72 只大鼠随机分为 4 组, 即假手术组 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水)、血栓模型组 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水)、复方丹参片组 ($0.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、消栓通脉颗粒组 ($32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 24 只。造模前 ig, 5 d, 1 次/d。造模术 4 h 后继续给药, 分别于术后 1, 3, 6 d 在给药 2 h 后腹腔麻醉、开腹、取下腔静脉标本。

2.3 检测指标及方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 NF- κ B p50, NF- κ B p65, I κ B α 的 mRNA。按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。进行定量 PCR, 在 $50 \mu\text{L}$ 反应体系中进行, 反应条件 $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, 然后 $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s, 共 40 循环。引物及荧光探针序列见表 1。根据标准曲线, 仪器自动计算出标本中 NF- κ B p50, NF- κ B p65, I κ B α 的拷贝数。每个样品的靶基因的相对 mRNA 表达水平用以下公式计算:

相对 mRNA 表达 = $H1$ (目的基因) / $H2$ (内参基因), $H =$ 拷贝数 / μL cDNA

2.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组下腔静脉 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达变化 术后同一时间点, 模型组较假手术组 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达显著增强 ($P < 0.01$), 两给药组较模型组 NF- κ B p50

表 1 引物及荧光探针序列

基因	引物序列
NF-κBp50	上游引物: 5'- GCTTACGGTGGGATTGCATT -3'
	下游引物: 5'- GGCACAATCTCTAGGCTCGTTT -3'
	探针: 5'- CATCCCGGAGCCACTAAATCCAACACA -3'
NF-κBp65	上游引物: 5'- TAACCGTGCCCCAACACT -3'
	下游引物: 5'- TGCACTTGTGACACAGCAAGA -3'
	探针: 5'- CGAGCTCAAGATCTGCCGAGTAAACCG -3'
IκBα	上游引物: 5'- TTGGTGACTTTGGGTGCTGAT -3'
	下游引物: 5'- GCGAGACCAGGTCAGGATTC -3'
	探针: 5'- CAACGCTCAGGAGCCCTGTAATGGC -3'
GAPDH	上游引物: 5'- AACTTGCCGTGGGATGAGTCA -3'
	下游引物: 5'- CGAGACCAGGTCAGGATTC -3'
	探针: 5'- CCATCAACGACCCCTTCATTGACCTC -3'

mRNA, NF-κB p65 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); 消栓通脉颗粒组与复方丹参片组比较, NF-κB p50 mRNA, NF-κB p65 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$)。各组血管壁 NF-κB p50 mRNA、NF-κB p65 mRNA 表达水平随着手术后时间延长呈先增强后减弱的动态变化趋势, 术后 3 d 达到高峰。见表 2, 3。

表 2 消栓通脉颗粒对血管壁 NF-κB p50 mRNA

表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\times 10^3$

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 6 d
假手术	16.01 ± 2.23 ¹⁾	18.11 ± 1.69 ¹⁾	17.06 ± 1.96 ¹⁾
模型	36.33 ± 2.15	78.01 ± 1.24 ³⁾	56.17 ± 2.18 ⁴⁾
复方丹参	28.28 ± 1.49 ¹⁾	63.45 ± 2.39 ^{1,3)}	44.34 ± 2.05 ^{1,4)}
消栓通脉	21.65 ± 1.95 ^{1,2)}	40.85 ± 2.51 ^{1,2,3)}	36.44 ± 2.31 ^{1,2,4)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与复方丹参组比较²⁾ $P < 0.01$; 与术后 1 d 比较³⁾ $P < 0.01$; 与术后 3 d 比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 3 消栓通脉颗粒对血管壁 NF-κB p65 mRNA

表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\times 10^3$

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 6 d
假手术	46.89 ± 2.52 ¹⁾	48.72 ± 3.86 ¹⁾	48.06 ± 3.01 ¹⁾
模型	93.13 ± 2.21	150.20 ± 3.43 ³⁾	121.57 ± 4.79 ⁵⁾
复方丹参	84.28 ± 1.83 ¹⁾	111.26 ± 2.75 ^{1,3)}	99.71 ± 2.41 ^{1,5)}
消栓通脉	53.76 ± 2.45 ^{1,2)}	80.92 ± 4.52 ^{1,2,3)}	77.27 ± 2.34 ^{1,2,4)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与复方丹参组比较²⁾ $P < 0.01$; 与术后 1 d 比较³⁾ $P < 0.01$; 与术后 3 d 比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 各组下腔静脉 IκBα mRNA 表达变化 术后同一时间点, 模型组较假手术组 IκBα mRNA 表达显著

减弱 ($P < 0.01$), 两给药组较模型组 IκBα mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 消栓通脉颗粒组与复方丹参片组比较, IκBα mRNA 表达明显增强 ($P < 0.01$)。各组血管壁 IκBα mRNA 表达水平随着手术后时间延长呈先减弱后增强的动态变化规律, 术后 3 d 达到低谷。见表 4。

表 4 消栓通脉颗粒对血管壁 IκBα mRNA

表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\times 10^3$

组别	术后 1 d	术后 3 d	术后 6 d
假手术	331.35 ± 12.13 ¹⁾	329.55 ± 18.74 ¹⁾	330.80 ± 15.13 ¹⁾
模型	212.70 ± 15.09	172.91 ± 12.16 ³⁾	198.69 ± 16.98 ⁴⁾
复方丹参	248.54 ± 13.77 ¹⁾	195.55 ± 10.64 ^{1,3)}	223.46 ± 8.19 ^{1,4)}
消栓通脉	312.72 ± 19.41 ^{1,2)}	242.56 ± 13.82 ^{1,2,3)}	276.03 ± 8.37 ^{1,2,4)}

4 讨论

当前, DVT 的确切病因尚不清楚, 血流缓慢、血液高凝和血管损伤仍是公认的三大发病因素。近年来, 研究表明炎症与血栓形成之间存在着密切的联系, 现已公认体内炎症-凝血之间存在网络关系^[5]。炎症可以引起血栓, 血栓也可以刺激静脉壁发生显著的炎症反应, 形成放大效应。NF-κB 起始了组织因子、黏附分子 (VCAM-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子等多种在炎症中起重要作用的蛋白的表达, 而上述的细胞因子已被证实与血栓形成密切相关^[6-7]。NF-κB^[8] 的主要形式是 p50 和 p65 组成的二聚体。作为 IκB 家族重要成员的 IκBα, 与 p50/p65 异源二聚体具有高亲和力, 是 NF-κB 的主要调控蛋白, 严格调控 NF-κB 的活性^[9]。NF-κB 与 IκB 共同构成信号传导通路。动物实验表明, 抑制 NF-κB p50 可以明显抑制大鼠深静脉血栓的形成^[10]。本实验显示: 同一时间点, 与假手术组比较, 血栓模型组静脉壁 NF-κB p50 mRNA 和 NF-κB p65 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$), IκBα mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), 说明 NF-κB / IκB 信号传导通路介导的血管壁炎症反应确与血栓形成密切相关。随着术后时间的延长, 静脉壁 NF-κB p50 mRNA 和 NF-κB p65 mRNA 的表达出现先升高后下降的趋势, 以术后 3 d 表达最高; 而 IκBα mRNA 的表达呈现先减弱后增强的动态变化, 以术后 3 d 表达最弱。

下肢深静脉血栓形成属中医学“股肿”、“脉痹”、“瘀血流注”等范畴, 多由感受湿热之邪、外伤、久劳、久卧等所致。其主要病理特点为湿、热、瘀相互为患, 脉络血瘀湿阻为主要病机。消栓通脉颗粒

以茵陈、赤小豆清热利湿、行血消肿共为君,辅以清热祛湿、活血破瘀的赤芍、水蛭、黄柏为臣,以清热燥湿、活血止痛的金银花、栀子、苍术、桃仁、红花为佐使,诸药合用,共奏清热利湿、祛瘀通络、消肿止痛之功效,使湿化、热清、瘀祛,脉络通畅,以达疾病痊愈之目的。本实验采用临床常用的活血化瘀药物复方丹参片作为对照,旨在揭示中药对 DVT 模型的 NF- κ B / I κ B 信号传导通路的干预机制。结果表明中药治疗组静脉壁 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达水平明显低于血栓模型组 ($P < 0.01$), 而 I κ B α mRNA 表达水平明显高于模型组 ($P < 0.01$), 说明中药治疗组可以显著调控 NF- κ B / I κ B 信号传导通路介导的血管壁炎症反应, 维持血管内皮细胞功能, 从而发挥血管内皮细胞抗栓作用, 这也是中药治疗 DVT 的疗效机制之一。而消栓通脉颗粒组较复方丹参组静脉壁 NF- κ B p50 mRNA, NF- κ B p65 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), I κ B α mRNA 表达水平明显增高 ($P < 0.01$), 说明该药物的组方功用比单一活血化瘀的治则更适合于 DVT 急性期的治疗, 为临床治疗 DVT 取得满意疗效提供了实验依据。但是, NF- κ B / I κ B 信号传导通路介导的炎症反应是一个复杂的网络体系, 其在 DVT 发病中的影响及中药的干预作用, 还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Prakash Saha, Julia Humphries, Bijan Modarai, et al. Leukocytes and the natural history of deep vein

thrombosis: current concepts and future directions[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31:506.

- [2] Jose Antonio Diaz. Inflammation and acute venous thrombosis[J]. US Oncology & Hematology, 2011, 7(1):68.
- [3] 刘政, 侯玉芬, 周涛, 等. 消栓通脉颗粒剂对深静脉血栓形成模型大鼠血浆 t-PA, PAI 的影响[J]. 中医药学刊, 2006, 12(10):1846.
- [4] Reyers I, Mussoni L, Donati M B, et al. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats[J]. Thromb Res, 1980, 18(5):669.
- [5] 张卉, 贺蓉, 贺石林. 炎症与血栓形成[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(9):784.
- [6] Li Q, Verma I M. NF- κ B regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 10:725.
- [7] Thomas W W, Daniel D M, Peter K H. Mechanisms of venous thrombosis and resolution [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28:387.
- [8] Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, et al. NF- κ B regulation in human neutrophils by nuclear I κ B α : correlation to apoptosis[J]. J Immunol, 2002, 169(7):3947.
- [9] 刘达, 姚智. NF- κ B 及其活化的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(1):139.
- [10] Li Y D, Ye B Q, Zheng S X, et al. NF- κ B transcription factor p50 critically regulates tissue factor in deep vein thrombosis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(7):4473.

[责任编辑 何伟]