

基于Nrf2/ARE信号通路探讨少腹逐瘀汤对寒凝血瘀证大鼠 血管内皮损伤的保护作用及机制

李凤金^{1,2}, 牛雯颖², 刘欣欣², 肖洪彬^{2*}, 王伟明^{1*}

(1. 黑龙江省中医药科学院 中药研究所, 哈尔滨 150047;

2. 黑龙江中医药大学 基础医学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:通过制备寒凝血瘀证大鼠模型,观察少腹逐瘀汤对寒凝血瘀证大鼠胸主动脉血管组织核转录因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路的影响,探讨少腹逐瘀汤对血管内皮损伤的保护作用及机制。方法:将50只SPF级大鼠随机分为少腹逐瘀汤高、中、低剂量组(4.8,2.4,1.2 g·kg⁻¹),模型组和空白组,每组10只。采用冰水浴联合皮下注射盐酸肾上腺素的方法建立寒凝血瘀证大鼠模型。造模的同时开始灌胃给药,连续给药28 d后,采用全自动血液流变仪检测血液流变学指标;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中一氧化氮(NO),内皮素-1(ET-1),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),细胞间黏附分子-1(ICAM-1),血管细胞黏附分子-1(VCAM-1),血管性血友病因子(vWF)水平;苏木素-伊红(HE)染色观察胸主动脉血管损伤情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胸主动脉血管组织Nrf2,血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测胸主动脉血管组织Nrf2,HO-1 mRNA的表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠全血黏度及血浆黏度均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),vWF,ICAM-1,VCAM-1含量显著升高($P<0.01$),NO,SOD,GSH-Px含量显著降低($P<0.01$),ET-1的含量显著升高($P<0.01$),胸主动脉血管组织Nrf2,HO-1 mRNA表达显著升高($P<0.01$),细胞核内的Nrf2蛋白表达明显升高($P<0.05$),细胞浆中Nrf2的蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),HO-1的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,少腹逐瘀汤高、中剂量组全血黏度(高、中切),血浆黏度均明显降低($P<0.05$);vWF,ICAM-1,VCAM-1,ET-1含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);NO,SOD,GSH-Px含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);胸主动脉血管内皮细胞增生、肿胀、脱落,内弹力膜断裂、平滑肌排列紊乱等病理变化有所改善;Nrf2,HO-1蛋白及mRNA表达水平显著升高($P<0.01$)。结论:少腹逐瘀汤对寒凝血瘀证大鼠胸主动脉血管内皮损伤有保护作用,作用机制与激活Nrf2/ARE信号通路增加抗氧化酶的表达,抑制黏附因子的表达有关。

[关键词] 少腹逐瘀汤; 内皮细胞损伤; 核转录因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE); 寒凝血瘀证

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5;R331.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)01-0031-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210136

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201030.1535.003.html>

[网络出版日期] 2020-10-30 16:11

Effect and Mechanism of Shaofu Zhuyutang on Endothelial Injury of Rats with Cold Coagulation and Blood Stasis Syndrome Based on Nrf2/ARE Signaling Pathway

LI Feng-jin^{1,2}, NIU Wen-ying², LIU Xin-xin², XIAO Hong-bin^{2*}, WANG Wei-ming^{1*}

(1. Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150047, China; 2. Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shaofu Zhuyutang on nuclear factor erythroid-2-related

[收稿日期] 20200810(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703981)

[第一作者] 李凤金,博士,从事中药复方药理作用及物质基础研究,E-mail:wklifengjin@163.com

[通信作者] *肖洪彬,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律及物质基础研究,E-mail:Hrbxiaohongbin@126.com;

*王伟明,教授,博士生导师,从事中药新药研发,E-mail:zyyjy@163.com

factor 2 (Nrf2) /antioxidant response element (ARE) signaling pathway in blood vessels by establishing the model of rats with cold coagulation and blood stasis syndrome, and to explore the protective effect and mechanism of Shaofu Zhuyutang on vascular endothelial injury. **Method:** The 50 SPF rats were randomly divided into high dose group ($4.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle dose group ($2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low dose group ($1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), model group and normal group (ten of each group). The rat model of cold coagulation and blood stasis syndrome was established by subcutaneous injection of epinephrine hydrochloride combined with ice bath. At the same time of modeling, the drug was administered by gavage. After 28 days of continuous administration, the hemorheology indexes were detected by automatic hemorheology instrument. Levels of nitric oxide (NO), endothelin (ET)-1, superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH-Px), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), von Willebrand factor (vWF) in serum were determined by ELISA. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the endothelial injury of vascular tissue of thoracic aorta. The protein expression of Nrf2 and HO-1 in vascular tissue of thoracic aorta was detected by Western blot. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to observe the expression of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA in vascular tissue of thoracic aorta. **Result:** Compared with the blank group, model group rats whole blood viscosity and plasma viscosity were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$), vWF, ICAM 1, VCAM 1 content increased significantly ($P < 0.01$), NO, SOD, gsh-px levels decreased significantly ($P < 0.01$), significantly increased the content of ET-1 ($P < 0.01$), thoracic aorta vascular tissue Nrf2, HO-1 mRNA expression was significantly increased ($P < 0.01$), Nrf2 protein expression in the cell nucleus increased significantly ($P < 0.05$), The protein expression level of Nrf2 in cytoplasm was significantly decreased ($P < 0.05$), while the protein expression level of HO-1 was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the whole blood viscosity (high and middle cut), plasma viscosity, were significantly reduced in high and meduim-dose Shaofu Zhuyutang groups ($P < 0.05, P < 0.01$). The levels of vWF, ICAM-1, VCAM-1 and ET-1 in serum were significantly reduced ($P < 0.05, P < 0.01$), NO, SOD and GSH-Px increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$). The pathological changes such as hyperplasia, swelling and shedding of endothelial cells of thoracic aorta, rupture of internal elastic membrane and disorder of smooth muscle arrangement were improved. The expression levels of Nrf2, HO-1 protein and gene were significantly increased in vascular tissue of thoracic aorta ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shaofu Zhuyutang has a protective effect on vascular endothelial injury in rats with cold coagulation and blood stasis syndrome. The mechanism of action is related to the activation of Nrf2/ARE signaling pathway, which leading to the increased expression of antioxidant enzymes and decreased the expression of adhesion factors.

[Key words] Shaofu Zhuyutang; endothelial cells injury; nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) /antioxidant response element (ARE); cold coagulation and blood stasis syndrome

少腹逐瘀汤源于清代医家王清任的《医林改错》，该方由小茴香、干姜、当归、肉桂、川芎、赤芍、延胡索、没药、蒲黄、五灵脂共10味中药组成，具有活血祛瘀，温经止痛的功效，主治少腹寒凝血瘀证，是治疗妇科类疾病，如月经不调、痛经、盆腔炎、子宫内膜异位症、卵巢囊肿等的代表方剂^[1-3]。近年来，该方还被用于治疗腹壁血栓性静脉炎、溃疡性结肠炎、糖尿病勃起功能障碍等病，并取得较好疗效^[4-6]。现代药理研究发现，少腹逐瘀汤具有明显的抗氧化应激损伤的作用。少腹逐瘀汤中含有丰富的芳香酸类成分，如阿魏酸、烟酸、香草酸、茴香酸、

咖啡酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸等，具有明显的抗氧化活性^[7]。少腹逐瘀汤可明显提高子宫异位症大鼠抗氧化能力，减轻卵巢组织氧化应激损伤，缩小异位病灶体积^[8]；可减轻低温诱导的内皮细胞氧化应激状态，从而抑制细胞凋亡^[9]。

氧化应激是机体在遭受有害刺激时，体内产生过多的活性氧(ROS)，超出细胞正常的清除能力，从而出现氧化系统和抗氧化系统失衡的状态^[10]。持续的高氧化应激可导致血管内皮细胞对血管活性物质如一氧化氮(NO)，血栓素 A_2 (TXA $_2$)等的分泌发生异常，最终引起血管内皮细胞功能紊乱和结构

损伤^[11]。核转录因子E2相关因子2(Nrf2)是氧化应激高敏性转录因子,通过核转位与细胞核内的抗氧化反应元件(ARE)结合,诱导多种Ⅱ相解毒酶如谷胱甘肽-S-转移酶、微粒体环氧化物水解酶,抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),血红素加氧酶-1(HO-1)等的转录表达,从而增加细胞抗氧化能力,在保护内皮细胞氧化应激损伤中至关重要^[12-13]。

近年来,少腹逐瘀汤对寒凝血瘀证大鼠血液氧化应激水平、炎性介质分泌等的研究虽有报道,均未涉及到对血管内皮损伤保护方面的具体机制研究。同时,检测手段仅局限于血清生化指标检测上,缺乏组织病理学验证及相关调控的分子机制研究。因此,本研究通过制备寒凝血瘀证大鼠模型,初步探讨了寒凝血瘀证导致的血管内皮损伤与Nrf2/ARE抗氧化应激信号通路的相关性。同时,验证了少腹逐瘀汤对寒凝血瘀证大鼠血管内皮损伤的保护作用,为少腹逐瘀汤对内皮损伤保护方面的科学研究提供一定的依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠,50只,雌雄各半,体质量230~280 g,购于亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号SCXK(吉)2018-0007。实验前分笼饲养,适应喂养1周。所有动物实验均获黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号2017101005。

1.2 试剂 盐酸肾上腺素(国药集团有限公司,批号61807261);SOD,GSH-Px,内皮素-1(ET-1),血管性血友病因子(vWF),细胞间黏附分子-1(ICAM-1),血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A001-3-2,A005-1-2,H093-1-2,H274-1-2,H065-1-2,H066-1-2);NO测定试剂盒(北京诚林生物技术有限公司,批号E30907);BCA蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,蛋白上样缓冲液,兔抗大鼠Nrf2抗体,兔抗大鼠HO-1抗体,山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白(Ig)G抗体,组蛋白(Histone)内参, β -肌动蛋白(β -actin)内参(沈阳万类生物有限公司,批号分别为WLA004,WLA013,WLA005,WL02135,WL02400,WLA023,WL0984a,WL01372);eCL高灵敏度发光试剂盒,TBST(北京康为世纪有限公司,批号分别为CW0094T,CW0043S);trizol,Super M-MLV反转录酶,2×Power Taq PCR MasterMix,SYBR Green(北京百泰克生物技术有限公司,批号分别为RP1001,

PR6502,PR1702,SY1020);苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号G1120)。

1.3 仪器 H-2050R型低温高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);LBY-N7500B型全自动血液流变仪(北京普利生仪器有限公司);BX43型光学显微镜(日本Olympus公司);Exicycler 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(韩国Bioneer公司);Amersham Imager 600凝胶成像系统(美国GE公司);Mini-Protean型电泳槽,Mini Trans-Blot型转印槽(美国Bio-Rad公司);DYY-7C型电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 少腹逐瘀汤药液制备 方中小茴香1.5 g,干姜3 g,当归9 g,肉桂3 g,川芎6 g,延胡索3 g,赤芍6 g,没药3 g,蒲黄9 g,五灵脂(炒)6 g,共10味中药,购自于黑龙江中医药大学附属第一医院,经黑龙江省中医药科学院王伟明教授鉴定,符合2015年版《中国药典》规定标准。全方共49.5 g,放入10倍体积的水中浸泡0.5 h。回流提取2次,合并2次水煎液后,浓缩至含生药浓度为 $4.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。临用时加入蒸馏水稀释成所需浓度。

2.2 寒凝血瘀证大鼠模型制备 SD大鼠,每天浸入直径40 cm,水深20 cm内壁光滑的塑料圆筒中,冰水浴温度为 $0 \sim 1 \text{ }^\circ\text{C}$,每天浸泡至大鼠全身僵直后取出,持续造模共4周。从第15天开始,大鼠给药后,隔天皮下注射盐酸肾上腺素,每天2次,给药剂量为 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($0.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每次间隔时间为4 h,并于2次之间将大鼠置于冰水中浸泡。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^[14]。

2.3 分组及给药 50只SD大鼠,按体质量和性别随机分为空白组,模型组,少腹逐瘀汤高、中、低剂量($4.8, 2.4, 1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,每组10只。实验动物给药剂量按照体表面积换算法折算,分别为人临床等效剂量的1,0.5,0.25倍。除空白组外,其余各组造模同时开始灌胃给药。连续给药4周。最后1次造模后禁食不禁水,并于次日给药1 h后,腹腔注射水合氯醛麻醉,腹主动脉采血及分离胸主动脉,进行各项指标测定。

2.4 血液流变学指标检测 腹腔注射5%水合氯醛($7 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,含肝素钠的采血管中收集全血4 mL,全自动血液流变仪测定 $10 \text{ s}^{-1}, 30 \text{ s}^{-1}, 200 \text{ s}^{-1}$ 切变率下全血黏度; $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,离心半径8.3 cm,分离血浆,测定血浆黏度。

2.5 血清生化指标检测 不含抗凝剂的真空采血管收集全血4 mL,低温高速离心机3 000 r·min⁻¹离心10 min,离心半径8.3 cm,分离血清,分装后冰箱冻存。酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒测定血清中NO, ET-1, vWF, VCAM-1, ICAM-1, SOD, GSH-Px水平,根据说明书要求进行操作。

2.6 HE染色观察胸主动脉血管组织病理学变化 末次给药后,分离胸主动脉,置于4%多聚甲醛缓冲液中,固定过夜。胸主动脉经常规石蜡包埋,切片,依次用二甲苯脱腊、无水乙醇脱水、苏木素染色、伊红染色、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。最后,置于光镜下观察胸主动脉内病理变化情况。

2.7 Real-time PCR检测胸主动脉血管组织Nrf2, HO-1 mRNA表达 称取大鼠胸主动脉组织5 mg,放入无RNA酶的玻璃匀浆器中,加入trizol 1 mL,充分匀浆后,室温静置5 min。按照trizol总RNA提取试剂盒说明书操作提取样本总RNA。紫外分光光度计测定总RNA在260 nm和280 nm波长下的吸光度A,以计算浓度。应用Super M-MLV反转录酶试剂盒进行cDNA合成。应用2×Power Taq PCR MasterMix试剂盒进行PCR反应。PCR反应体系为上下游引物各0.5 μL, 2×MasterMix 10 μL, cDNA模板1 μL, ddH₂O 8 μL。反应条件为预变性95 °C 5 min, 1个循环。变性95 °C 30 s;退火60 °C 20 s;延伸72 °C 30 s, 40个循环。以β-actin作为内参,采用2^{-ΔΔC_t}法分析目的mRNA相对表达水平。各引物由沈阳万类生物有限公司合成,引物序列见表1。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测胸主动脉血管组织Nrf2, HO-1蛋白表达 取胸主动脉血管组织50 mg,液氮速冻后,剪成碎块,置于遇冷的离心

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 TCTGACTCCGGCATTTCCT	161
	下游 TGTTGGCTGTGCTTTAGGTC	
HO-1	上游 CGAAACAAGCAGAACCCA	192
	下游 CACCAGCAGCTCAGGATG	
β-actin	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	155
	下游 GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT	

管中,加入加强型RIPA裂解液0.5 mL,冰浴中裂解30 min。12 000 r·min⁻¹离心10 min,离心半径8.5 cm,分离上清。采用BCA法测定总蛋白浓度。蛋白煮沸变性后,以每孔40 μg蛋白上样,进行SDS-PAGE凝胶电泳,分离目的蛋白。湿转法转膜。5%封闭奶粉室温封闭1 h后,一抗(Nrf2, HO-1, 1:500)4 °C孵育过夜。二抗(1:1万)室温孵育2 h后,滴加eECL发光试剂300 μL覆盖膜表面。置于在凝胶成像系统中,避光反应3 min,曝光成像。以β-actin为内参蛋白,应用Image J软件分析各条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与β-actin条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

2.9 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用One-way ANOVA, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血液流变学的影响 与空白组比较,模型组各切变率全血黏度及血浆黏度均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,少腹逐瘀汤高、中剂量组全血黏度(高、中切变率)及血浆黏度均明显降低($P < 0.05$),少腹逐瘀汤低剂量组有降低趋势,但与模型组比较差异无统计学意义。见表2。

表2 少腹逐瘀汤对各组大鼠血液黏度的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Shaofu Zhuyutang on blood viscosity of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	全血黏度			血浆黏度
		10 s ⁻¹	30 s ⁻¹	200 s ⁻¹	
空白		7.89±2.15	4.55±0.96	3.82±0.37	1.09±0.04
模型		10.06±2.27 ¹⁾	5.45±0.63 ²⁾	4.38±0.39 ²⁾	1.16±0.04 ²⁾
少腹逐瘀汤	4.8	8.92±1.96	4.91±0.48 ³⁾	4.03±0.26 ³⁾	1.10±0.02 ³⁾
	2.4	8.51±1.02	4.85±0.21 ³⁾	4.04±0.17 ³⁾	1.12±0.03 ³⁾
	1.2	9.94±2.87	5.26±0.63	4.16±0.31	1.14±0.02

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表3~6同)。

3.2 对各组大鼠血清中vWF, ICAM-1, VCAM-1含量的影响 与空白组比较,模型组vWF, ICAM-1,

VCAM-1含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,少腹逐瘀汤高、中、低剂量组vWF含量均明显降低

($P<0.05, P<0.01$), 高、中剂量组 ICAM-1, VCAM-1 含量均明显降低($P<0.05, P<0.01$), 低剂量组各指标有降低的趋势, 但与模型组比较, 差异无统计学意义。见表3。

表3 少腹逐瘀汤对各组大鼠血清中 vWF, ICAM-1, VCAM-1 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Shaofu Zhuyutang on levels of vWF, ICAM-1, VCAM-1 in serum of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	vWF/U·L ⁻¹	ICAM-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	VCAM-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白		293.68±20.09	92.71±25.95	22.76±2.79
模型		356.93±38.20 ²⁾	133.79±20.34 ²⁾	28.95±2.64 ²⁾
少腹逐瘀汤	4.8	311.89±32.27 ⁴⁾	111.35±18.72 ³⁾	24.09±2.35 ⁴⁾
	2.4	322.91±38.35 ³⁾	114.52±18.99 ³⁾	26.46±2.16 ³⁾
	1.2	324.06±35.46 ³⁾	119.38±23.61	27.11±0.18

3.3 对各组大鼠血清中 NO, SOD, GSH-Px, ET-1 水平的影响 与空白组比较, 模型组 NO, SOD, GSH-Px 水平显著降低($P<0.01$), ET-1 的含量显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 少腹逐瘀汤各组 NO,

SOD, GSH-Px 水平明显升高($P<0.05, P<0.01$), 少腹逐瘀汤高、中剂量组 ET-1 含量明显降低($P<0.05, P<0.01$), 低剂量组 ET-1 含量有降低的趋势, 但与模型组比较差异无统计学意义。见表4。

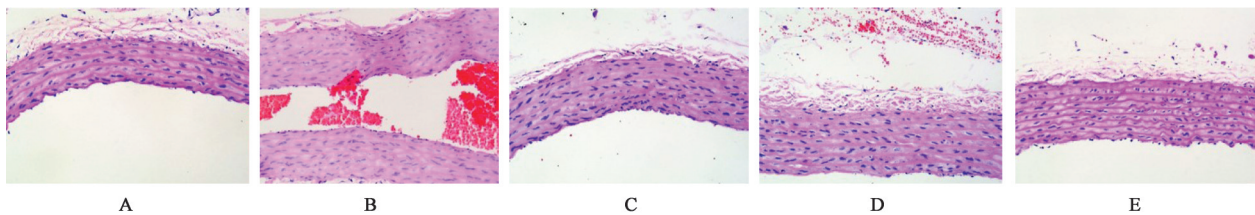
表4 少腹逐瘀汤对各组大鼠血清中 NO, SOD, GSH-Px, ET-1 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Shaofu Zhuyutang on levels of NO, SOD, GSH-Px, ET-1 in serum of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ET-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	GSH-Px/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白		1.76±0.46	199.86±27.23	3.63±0.84	36.93±7.57
模型		0.99±0.25 ²⁾	252.30±36.63 ²⁾	2.25±0.49 ²⁾	26.13±4.36 ²⁾
少腹逐瘀汤	4.8	1.59±0.60 ³⁾	208.09±25.93 ⁴⁾	3.35±0.87 ⁴⁾	34.63±6.32 ⁴⁾
	2.4	1.47±0.59 ³⁾	220.18±31.12 ³⁾	2.92±0.83 ³⁾	32.82±5.25 ⁴⁾
	1.2	1.30±0.46 ³⁾	224.12±33.72	2.81±0.63 ³⁾	31.11±6.20 ³⁾

3.4 对各组大鼠胸主动脉血管组织病理学变化的影响 光镜下空白组大鼠胸主动脉血管内膜光滑, 内膜下细胞排列整齐, 内弹力层和中间平滑肌层次分明。模型组大鼠胸主动脉血管染色不均, 内皮细胞

增生、肿胀、脱落, 内弹力膜断裂, 平滑肌排列紊乱。少腹逐瘀汤各给药组, 胸主动脉血管内皮细胞肿胀程度降低、脱落减少、平滑肌细胞排列有所改善, 病理损伤程度有所改善。见图1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 少腹逐瘀汤高剂量组; D. 少腹逐瘀汤中剂量组; E. 少腹逐瘀汤低剂量组(图2同)

图1 少腹逐瘀汤对各组大鼠胸主动脉血管组织的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Shaofu Zhuyutang on vascular tissue of thoracic aortic of rats in each group (HE, ×200)

3.5 对各组大鼠胸主动脉血管组织 Nrf2, HO-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠胸主动脉血管组织 Nrf2, HO-1 mRNA 表达显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 少腹逐瘀汤高、中剂量组的 Nrf2 mRNA 表达显著升高($P<0.01$), 高、中、低剂量组 HO-1 mRNA 的表达显著升高($P<0.01$)。见表5。

3.6 对各组大鼠胸主动脉血管组织 Nrf2, HO-1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组的细胞核内的 Nrf2 的蛋白表达显著升高($P<0.01$), 细胞浆中 Nrf2 的蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), HO-1 的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 少腹逐瘀汤高、中、低剂量组细胞核 Nrf2 的蛋白表达显著升高($P<0.01$), 细胞浆 Nrf2 的蛋白表达显著

表5 少腹逐瘀汤对各组大鼠胸主动脉血管组织 Nrf2, HO-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Shaofu Zhuyutang on expression of Nrf2 and HO-1 mRNA in vascular tissue of thoracic aortic of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2	HO-1
空白		1.00±0.05	1.00±0.06
模型		1.08±0.06 ²⁾	1.79±0.27 ²⁾
少腹逐瘀汤	4.8	1.23±0.10 ⁴⁾	4.44±0.34 ⁴⁾
	2.4	1.18±0.05 ⁴⁾	2.69±0.30 ⁴⁾
	1.2	1.12±0.08	2.20±0.31 ⁴⁾

降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),HO-1 蛋白表达显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见图2,表6。

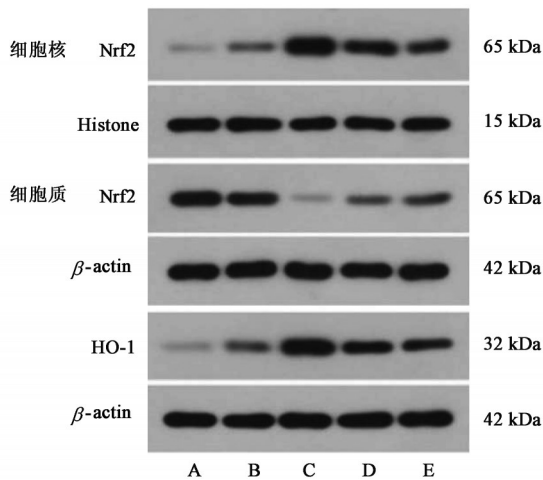


图2 各组大鼠胸主动脉血管组织 Nrf2, HO-1 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Nrf2 and HO-1 proteins expression in vascular tissue of thoracic aortic of rats in each group

表6 少腹逐瘀汤对各组大鼠胸主动脉血管组织 Nrf2, HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Shaofu Zhuyutang on expression of Nrf2 and HO-1 proteins in vascular tissue of thoracic aortic cells of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞核 Nrf2 /β-actin	细胞浆 Nrf2 /β-actin	HO-1 /β-actin
空白		1.01±0.05	1.00±0.04	1.00±0.03
模型		1.92±0.07 ²⁾	0.82±0.08 ¹⁾	2.07±0.17 ²⁾
少腹逐瘀汤	4.8	5.30±0.19 ⁴⁾	0.23±0.05 ⁴⁾	5.28±0.18 ⁴⁾
	2.4	3.90±0.14 ⁴⁾	0.45±0.09 ⁴⁾	3.32±0.23 ⁴⁾
	1.2	2.82±0.10 ⁴⁾	0.59±0.06 ⁴⁾	2.74±0.18 ⁴⁾

4 讨论

寒冷是一种常见的应激源和致病因素,能够使机体内氧化还原稳态失衡,产生大量的活性氧

(ROS),导致组织器官损伤^[15]。同时,寒冷应激还会刺激机体分泌大量的肾上腺素,使血管强烈收缩,引起血压升高、血液剪切应力增加,导致血管壁机械性损伤^[16]。当血管损伤时,受损组织会释放炎症因子和凝血酶组织因子,作用于炎症细胞产生炎症反应,激活纤维蛋白原和血小板,形成血栓。同时,内皮细胞损伤引起细胞因子释放、黏附因子大量分泌、血管通透性增加、血管平滑肌细胞增生,使血流阻力增加、血液流动性降低、血液呈高黏滞状态^[17]。本实验研究发现,寒凝血瘀证大鼠全血黏度、血浆黏度显著增高,血液呈现高黏状态。少腹逐瘀汤治疗后,各组大鼠全血黏度、血浆黏度显著降低。表明,少腹逐瘀汤具有降低寒凝血瘀证大鼠血黏度的作用,这与以往研究结果相一致^[18]。

血管内皮细胞不仅是血管和血液之间的屏障,还是一个分泌器官。其可以通过内分泌、旁分泌及外分泌的方式合成和释放多种的生物活性物质,参与不同的生理及病理过程。NO是一种血管舒张因子,能够在血管内皮细胞合成并释放,具有舒张血管平滑肌、抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制血小板黏附、聚集的作用^[19]。ET-1是最强的血管收缩活性物质,通过调节 Serine177 介导 Rab11A 磷酸化,抑制辅助β₁亚基转移,产生收缩血管作用^[20]。vWF是在内皮细胞 Weibel-Palade 小体中合成分泌的具有黏附功能的一种糖蛋白,其表达升高能够促进血小板在受损的血管内皮下黏附并聚集,诱发血栓的形成^[21]。ICAM-1, VCAM-1 是血管内皮细胞分泌具有细胞黏附功能的免疫球蛋白,参与调节炎症反应、免疫应答等过程、其高表达可促进白细胞和血管内皮间的黏附、浸润,使内皮细胞损伤进一步加重^[22]。本实验研究发现,模型组大鼠胸主动脉内皮细胞增生、肿胀、脱落,平滑肌排列紊乱。少腹逐瘀汤组大鼠胸主动脉内皮细胞肿胀程度降低、脱落减少、平滑肌细胞排列有所改善。同时,模型组大鼠血清中 ET-1, ICAM-1, VCAM-1 含量显著升高,NO 含量显著降低。少腹逐瘀汤组大鼠血清中 ET-1, ICAM-1, VCAM-1 含量显著降低,NO 含量显著升高。表明寒冷应激结合皮下注射肾上腺素能够造成血管内皮细胞损伤,而少腹逐瘀汤对血管内皮细胞损伤具有保护作用,作用机制与抑制黏附因子分泌有关。

当血管内皮细胞氧化应激损伤时,可通过不同途径激活细胞内各种抗氧化相关信号通路,修复氧化应激导致的细胞损伤,促进细胞存活。Nrf2是氧

化应激高敏感性转录因子,位于细胞骨架,与Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)相邻。在生理条件下,Nrf2通过DLG结构域与Keap1的Kelch结构域相互作用,形成异源二聚体,降低Nrf2的转录活性。氧化应激可导致Nrf2的IVR结构域诱导构象变化,Nrf2与Keap1分离进入细胞核与ARE结合,从而转录翻译Ⅱ相代谢酶和抗氧化酶等相关靶基因,发挥抗氧化损伤功能^[23-24]。本实验研究发现,与模型组比较,少腹逐瘀汤组大鼠胸主动脉Nrf2和HO-1 mRNA表达量上调,Nrf2(细胞核)和HO-1蛋白表达升高、血清中SOD,GSH-Px水平显著升高。表明,少腹逐瘀汤可诱导Nrf2的细胞核转位,促进抗氧化酶SOD,GSH-Px,HO-1的转录表达,从而预防寒冷刺激联合肾上腺素导致的血管内皮损伤。

[参考文献]

[1] 赵海云,刘红英,衣萍. 少腹逐瘀汤加减治疗痛经36例[J]. 内蒙古中医药,2012,31(11):59.

[2] 凌娜,孟安琪. 少腹逐瘀汤治疗寒凝血瘀型内异症疗效观察[J]. 中华中医药学刊,2011,29(5):1188-1190.

[3] 丁海霞,彭凤娣,张小花,等. 少腹逐瘀汤加减联合郑氏“热补针法”治疗子宫腺肌病相关疼痛的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(15):142-147.

[4] 王子坪,许宏飞,梁健夫,等. 少腹逐瘀汤加减治疗溃疡性结肠炎49例[J]. 实用中医内科杂志,2010,24(11):59-60.

[5] 赵阳媚,渠冬青. 少腹逐瘀汤治疗腹壁血栓性静脉炎的疗效观察[J]. 湖南中医杂志,2014,30(9):75-76.

[6] 王智慧,赵红心. 少腹逐瘀汤加减治疗糖尿病勃起功能障碍60例[J]. 河北中医,2011,33(3):413-415.

[7] 唐于平,黄美艳,张彦华,等. 四物汤类方与组方药材及其所含主要芳香酸体外抗氧化活性比较与量效关系研究[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(1):643-67.

[8] 董建新,白素芬,谢伟,等. 少腹逐瘀汤对子宫内位症模型大鼠氧化应激状态的影响[J]. 四川中医,2018,36(6):63-66.

[9] 马宏跃,唐于平,段金庵,等. 内皮细胞的低温损伤及少腹逐瘀汤挥发油干预研究[J]. 中医药信息,2009,26(6):73-76.

[10] 胡流芳,王迎,任汝静,等. Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究

杂志,2016,43(1):146-152,166.

[11] GAMEZ-MENDEZ A M, VARGAS-ROBLES H, RIOS A, et al. Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice[J]. PLoS One, 2015,10(9):e0138609.

[12] 李慧,杨林. Nrf2抗氧化的分子调控机制[J]. 生物信息学,2018,16(1):1-6.

[13] 康桂兰,景增秀. 山奈酚通过调控AMPK/Nrf2/HO-1信号通路缓解ox-LDL介导的内皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(4):525-530.

[14] 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):53-54.

[15] VENDITTI P, BARI A, DI STEFANO L, et al. Vitamin E attenuates cold-induced rat liver oxidative damage reducing H₂O₂ mitochondrial release[J]. Int J Biochem Cell Biol,2007,39(9):1731-1742.

[16] ZHANG L C, HUANG Z, LI P B, et al. Diazoxide protects rat vascular endothelial cells against hypoxia and cold-induced damage[J]. Exp Ther Med,2017,13(6):3257-3266.

[17] 李苗,王丽丽,常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2019,27(8):730-736.

[18] 牛雯颖,纪博硕,尤艳芳,等. 少腹逐瘀汤对寒凝血瘀模型大鼠红细胞膜组分的影响[J]. 上海中医药杂志,2014,48(1):81-84.

[19] 曾中三,秦旭平,李洁. 一氧化氮对心血管疾病中血管平滑肌细胞的作用研究进展[J]. 湘南学院学报:医学版,2017,19(1):75-78.

[20] ZHAI X, LEO M D, JAGGAR J H. Endothelin-1 stimulates vasoconstriction through Rab11A serine 177 phosphorylation[J]. Circ Res,2017,121(6):650-661.

[21] 石磊,张力辉. 血管性血友病因子、血小板颗粒膜蛋白140与糖尿病肾病[J]. 临床荟萃,2010,25(1):84-86.

[22] 郎平平,林秋月,白洁,等. ICAM-1在心血管疾病中的作用[J]. 生理科学进展,2020,51(1):57-60.

[23] 覃玉娥,刘朝奇. Nrf2及其相关抗氧化基因的miRNA调控研究进展[J]. 生物技术通报,2013,doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2013.09.005.

[24] 李全,张源,梁跃伟,等. Nrf2抗氧化应激保护内皮细胞损伤的研究进展[J]. 昆明理工大学学报:自然科学版,2017,42(2):77-81.

[责任编辑 孙丛丛]