

· 基础研究 ·

人参四逆汤对兔骨折血管内皮细胞的影响[△]

伊晓倩^{1,2}, 鹿洪秀², 赵启东², 商卫勋², 祝永驰², 李 阳², 苏 帆^{2*}

(1. 山东中医药大学 2016 级博士研究生, 山东济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 山东济南 250014)

摘要: [目的] 探究人参四逆汤对兔骨折血管内皮细胞的影响。[方法] 老龄兔 72 只随机分为 6 组。空白组、模型组、肝素组予生理盐水灌胃, 三个人参四逆汤组分别按低、中、高剂量组予中药灌胃, 连续 3 d。空白组外的 5 组兔建立骨折模型。低、中、高剂量组和肝素组予低分子肝素皮下注射, 连续 7 d。检测血清皮质醇 (COR)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、内皮素 (ET-1)、一氧化氮 (NO) 水平; HE 法观察股静脉病理变化; 电镜观察血管内皮细胞变化; RT-PCR、Western blot 检测 NF- κ B 通路相关因子表达。[结果] 与模型组比较, 中、高剂量组静脉血栓发生率明显降低, 术后 1、3、7 d COR、TNF- α 、IL-6 水平明显减低, 术后 7 d ET1 水平明显降低, NO 水平明显升高 ($P < 0.05$)。HE 染色显示, 模型组内皮细胞不同程度脱落, 管腔可见血栓、白细胞浸润, 人参四逆汤可改善上述变化。电镜下中剂量组内皮细胞线粒体肿胀减轻, 粗面内质网轻度扩张。低、中、高剂量组 TLR4、MyD88、NF- κ B P65 mRNA 及蛋白表达较模型组、肝素组明显降低 ($P < 0.05$)。[结论] 人参四逆汤能够降低兔术后应激反应, 改善血管内皮细胞形态与功能, 抑制 NF- κ B 通路相关因子表达。

关键词: 人参四逆汤, 血管内皮细胞, 深静脉血栓, NF- κ B 信号通路

中图分类号: R683 文献标志码: A 文章编号: 1005-8478 (2023) 04-0351-06

Effect of Ginseng Sinitang on vascular endothelial cells in rabbits with fracture // YI Xiao-qian^{1,2}, LU Hong-xiu², ZHAO Qi-dong², SHANG Wei-xun², ZHU Yong-chi², LI Yang², SU Fan². 1. Postgraduate School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250014, China

Abstract: [Objective] To explore the effect of Ginseng Sinitang (GS) on vascular endothelial cells in rabbits with fracture. [Methods] A total of 72 elderly rabbits were randomly divided into 6 groups. Of them, the animals in the blank group, model group and heparin group were given normal saline intragastrically, and those in the 3 GS groups were given the drug in low-dose, medium-dose and high-dose respectively for 3 days. Subsequently, femoral fracture was established in 5 groups of rabbits except the blank group. Low molecular weight heparin was given subcutaneously for 7 days in the low, medium and high-dose groups as well as the heparin groups. Serum levels of cortisol (COR), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), endothelin (ET-1) and nitric oxide (NO) were detected. The pathological changes of femoral vein were observed by HE staining, while the ultrastructure change was seen by transmission electron microscope. The expressions of factors related to NF- κ B pathway were detected by RT-PCR and Western blot. [Results] The incidence of deep vein thrombosis was significantly decreased in medium-dose and high-dose groups compared with model group ($P < 0.05$). The levels of COR, TNF- α and IL-6 were significantly decreased in medium-dose and high-dose groups at 1, 3 and 7 days postoperatively with significantly change of ET1 and NO 7 days postoperatively ($P < 0.05$). HE staining showed that endothelial cells in the model group were shed in different degrees with thrombus and leukocyte infiltration in the lumen, while GS did relieve the above changes. Under electron microscope, the mitochondrial swelling of endothelial cells was reduced and the rough endoplasmic reticulum was slightly expanded in the medium-dose group. The mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- κ B P65 in low, medium and high dose groups were significantly decreased compared with those in model group and heparin group ($P < 0.05$). [Conclusion] GS does reduce postoperative stress reaction, improve the morphology and function of vascular endothelial cells, and inhibit the expression of NF- κ B pathway related factors in elderly rabbits.

Key words: Ginseng Sinitang, vascular endothelial cell, deep vein thrombosis, NF- κ B pathway

深静脉血栓 (deep vein thrombosis, DVT) 属于围术期发生率较高的严重并发症, 不仅延缓术后恢复,

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2023.04.13

[△]基金项目: 山东省自然科学基金项目 (编号: ZR2014HZ005)

作者简介: 伊晓倩, 主治医师, 博士研究生, 研究方向: 围术期中医药应激调控与器官保护, (电话) 15098816736, (电子信箱) xqbluebell@163.com

* 通信作者: 苏帆, (电话) 13806412112, (电子信箱) boatsail@126.com

增加治疗费用,还可能并发栓子脱落形成肺栓塞,威胁生命^[1]。有研究表明,高龄、术前高凝状态、手术大小与部位等均为术后 DVT 的危险因素^[2]。目前 DVT 的预防与治疗以低分子肝素、利伐沙班等抗凝药物为主^[3]。越来越多的研究表明炎症免疫应答与 DVT 的发生发展存在着密切联系^[4-6]。应激反应是由于麻醉手术等一系列伤害性刺激,引起大量应激激素及炎症因子释放,造成血管内皮损伤、高凝状态及免疫功能紊乱,是术后深静脉血栓等诸多并发症发生的重要病理生理学基础^[7]。

肾元气血理论认为,应激反应过程就是肾气调动、损耗的过程,围术期禁食水、手术、创伤、失血等因素均会耗损肾气,造成肾气不足,术后常伴胃肠功能紊乱、肺功能降低,气虚大于血虚,并引起气血失衡导致气虚血瘀,导致 DVT 等一系列术后并发症^[8]。作者团队前期实验研究表明,术前人参四逆汤(加山萸肉)联合术后补中益气汤(去陈皮加桂枝)可以调控老龄兔术后应激反应^[9]。现阶段本课题组通过对 DVT 模型老龄兔术前灌服人参四逆汤,观察对兔术后应激反应、股静脉内皮细胞功能及形态的影响,并通过 NF- κ B 信号通路探讨其作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

新西兰老龄兔 72 只,兔龄 3.0 岁左右,雌雄不限。购于山东济南西岭角养殖繁育中心,实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)20150001。1 周适应性喂养后随机分为六组:空白组、模型组、肝素组、人参四逆汤低、中、高剂量组,每组 12 只。本实验通过山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(批件号:2021-57)。

1.2 骨折模型建立

除空白组,其余 60 只老龄兔均参照文献^[10, 11]建立 DVT 模型。老龄兔在异氟醚吸入麻醉下,取仰卧位固定于操作台,右下肢及腹股沟区备皮消毒后,沿股骨走行方向行手术切口,于膝关节上 2 cm 处钝性分离肌肉至股骨,线锯切断股骨。骨折处大体复位后逐层缝合肌肉及皮肤。无菌敷料覆盖切口后石膏固定右下肢于屈髋屈膝位,保证右髋部活动自如,俯卧位将绷带固定于兔躯体后 1/3 部位,直到绷带定型。

1.3 药物干预

人参四逆汤加山萸肉(原方出自张仲景《伤寒论》,最终成方:附子 15 g、干姜 20 g、炙甘草 30

g、人参 9 g、山萸肉 12 g)购于山东中医药大学附属医院中药房,由煎药室熬制成 1 g/ml 药液。根据人与动物体表面积换算公式,换算得出兔相应的中药使用剂量。术前,人参四逆汤低剂量组(1.8 ml/kg)、中剂量组(3.7 ml/kg)、高剂量组(7.4 ml/kg)分别给予相应剂量中药灌胃;空白组、模型组、肝素组给予 3.7 ml/kg 生理盐水灌胃,连续 3 d。术后,低、中、高组和肝素组给予 200 IU/kg 低分子肝素皮下注射,连续 7 d。

1.4 取材料与检测

1.4.1 大体形态观察

观察老龄兔术后进食水、活动情况。于术后第 7 d,去除石膏后检查兔下肢,根据兔造模侧下肢的血栓程度进行区分,分为肿胀、青紫、坏死,并使用超声检查各组 DVT 发生情况。

1.4.2 血清标志物检测

干预前、术后第 1、3、7 d 每组随机选取 6 只老龄兔进行耳缘静脉采血,离心制备血清,采用酶联免疫吸附法测定兔血清皮质醇(COR)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、内皮素(ET-1)水平,放射免疫法测定血清一氧化氮(NO)水平。

1.4.3 血管形态观察

术后第 7 d,每组随机选 8 只老龄兔麻醉后沿原手术切口切开皮肤,分离、切取 2 cm 左右股静脉。2 只兔静脉组织放入 4%多聚甲醛固定液中 4℃保存,脱水后石蜡包埋,制作约 4 μ m 厚切片,HE 染色后置于光镜下,观察股静脉病理学变化。2 只兔静脉组织放入 2.5%戊二醛固定液中室温固定 2 h 后 4℃保存,1%的锇酸·0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PB (PH7.4)室温(20℃)固定 2 h,0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PB (PH7.4)漂洗 3 次,酒精丙酮梯度脱水后渗透包埋,切成 60~80 nm 超薄切片,铀铅双染色后透射电镜下观察。每组余 4 只兔静脉组织放入液氮中,立即转移至-80℃冰箱保存,用于 RT-PCR、Western blot 检测。

1.4.4 RT-PCR 检测

取出-80℃保存 1 周内的各组静脉组织,Trizol 法提取组织总 RNA,电泳并测定 mRNA 浓度后,按照逆转录试剂盒操作先于 42℃,3 min 去除基因组 DNA,再于 42℃ 15 min 合成 cDNA。参照荧光定量 PCR 试剂盒操作方法,配制 TLR4、MyD88、NF- κ B P65 目的基因和内参基因的荧光定量 PCR 反应体系,完成荧光定量 PCR 仪反应程序并获得相应 Ct

值, 参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算分析目的基因的相对表达量差异, 重复测量 3 次。

1.4.5 Western blot 检测

取出 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 1 周内的各组静脉组织, 匀浆后提取各组总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 用含蛋白酶抑制剂的裂解液抽提组织蛋白并进行 BCA 定量, SDS-PAGE 电泳, 对比蛋白 Marker 找到对应分子量蛋白, 湿转后对 PVDF 膜进行封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、ECL 发光液曝光, 并用化学发光仪进行成像, 扫描灰度后进行数据分析。

1.5 主要试剂与仪器

兔血清 ELISA 检测试剂盒, 武汉华美生物工程有限公司; SuperReal 荧光定量预混试剂, 天根生化科技(北京)有限公司; TLR4、NF- κ B P65、MyD88 一抗(货号: 19811-1-AP、10745-1-AP, Proteintech; ab133739, Abcam); DM IL LED 型荧光倒置显微镜, 德国 Leica 公司; HT7700 型透射电子显微镜, 日本 HITACHI 公司; LightCycler96 型荧光定量

PCR 仪, 瑞士 Roche 公司; Tanon-4600 型化学发光仪器, 北京原平皓生物技术有限公司。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 资料呈正态分布时采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。计数资料采用 Fisher 精确检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

各组老龄兔于术后 7 d 撤除石膏观察患肢外观, 并进行超声血栓筛查, 结果见表 1。六组肿胀、青紫、坏死发生率的差异无统计意义 ($P > 0.05$); 与模型组比, 低剂量组 DVT 发生率差异无统计学意义 ($P = 0.066$), 中、高剂量组 DVT 发生率均明显降低 (P 值为 0.041、0.041); 与肝素组比, 低、中、高剂量组 DVT 发生率差异无统计学意义 (P 值为 1.000、0.569、0.569)。

表 1 六组动物大体观察结果 [例 (%)] 与比较

指标	空白组 (n=8)	模型组 (n=8)	肝素组 (n=8)	低剂量 (n=8)	中剂量 (n=8)	高剂量 (n=8)	P 值
肿胀	0 (0.0)	5 (62.5)	2 (25.0)	2 (25.0)	1 (12.5)	2 (25.0)	0.126
青紫	0 (0.0)	2 (25.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.684
坏死	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
DVT	0 (0.0)	6 (75.0)	3 (37.5)	2 (25.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	0.015

2.2 血清标志物检测

六组老龄兔 COR、TNF- α 、IL-6、ET-1、NO 检测结果见表 2。术前六组的标志物水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。除空白组, 其余五组术后的 COR、TNF- α 、IL-6、ET-1 水平均呈现先升高后降低的趋势, 术后 1 d 达峰, 组内变化具有统计学意义 ($P < 0.05$); NO 水平均呈现先降低后升高的趋势, 术后 1 d 降至最低, 组内变化具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

术后 1 d, 与模型组比, 中剂量组 COR、TNF- α 、IL-6 水平明显降低 (P 值为 0.023、0.009、 < 0.001), 高剂量组 COR、TNF- α 、IL-6 水平明显降低 (P 值为 0.037、0.015、0.001); 与肝素组比, 中剂量组 COR、IL-6 水平明显降低 (P 值为 0.046、0.001), 高剂量组 IL-6 水平明显降低 ($P = 0.016$)。

术后 3 d, 与模型组比, 中剂量组 COR、TNF- α 、IL-6 水平明显降低 (P 值为 < 0.001 、0.006、0.003), 高剂量组 COR、TNF- α 、IL-6 水平明显降低 (P 值为 < 0.001 、0.026、0.005); 与肝素组比, 中剂量组 COR、TNF- α 、IL-6 水平明显降低 (P 值为 < 0.001 、0.040、

0.011), 高剂量组 COR、IL-6 水平明显降低 (P 值为 < 0.001 、0.021)。

术后 7 d, 与模型组比, 中剂量组 COR、TNF- α 、IL-6、ET-1 水平明显降低 (P 值为 0.003、0.023、0.006、0.030), NO 水平明显升高 ($P = 0.012$), 高剂量组 COR、TNF- α 、IL-6、ET-1 水平明显降低 (P 值为 0.014、0.038、0.032、0.045), NO 水平明显升高 ($P = 0.016$); 与肝素组比, 中剂量组 NO 水平明显升高 ($P = 0.040$)。

2.3 血管形态观察

六组兔术后 7 d 血管形态结果见图 1。HE 染色情况显示: 空白组内皮细胞排列整齐, 管内未见血栓及炎症细胞; 模型组管壁厚薄欠均匀, 内膜中内皮细胞脱落, 管腔内可见血栓、白细胞和不溶性纤维蛋白; 肝素组管腔内可见血凝块与红细胞, 内皮细胞脱落; 低、中、高剂量组管壁和管腔结构均有一定的改善: 低剂量组管壁较平整, 偶见散在小血栓与白细胞, 管壁内膜中内皮细胞脱落; 中剂量组管壁厚薄较均匀, 管腔内未见血栓, 内皮细胞排列较整齐; 高剂量组管

壁厚薄较均匀，管腔内散布不溶性纤维蛋白，血管内皮细胞排列较整齐，偶见脱落。

透射电镜结果显示：空白对照组血管内皮细胞整体结构较好；模型组损伤程度最高，血管内皮细胞增生，趋于脱落，细胞核多处凹陷，异染色质少量边集，核周隙增宽，线粒体严重肿胀，基质溶解，嵴大多断裂减少，个别空泡化，粗面内质网中度扩张、滞

留，脱颗粒；肝素组与人参四逆汤低剂量组内皮细胞损伤程度相对较高；人参四逆汤高剂量组损伤程度居中，线粒体中度肿胀，粗面内质网中度扩张、滞留；人参四逆汤中剂量组内皮细胞损伤程度相对较低，内皮细胞呈长梭形，表面较平滑，线粒体轻度肿胀，粗面内质网少量轻度扩张。

表 2 六组动物血清标志物检测结果 ($\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	时间点	空白组 (n=6)	模型组 (n=6)	肝素组 (n=6)	低剂量 (n=6)	中剂量 (n=6)	高剂量 (n=6)	P 值
COR (pg/mg)	术前	137.9±6.2	139.0±7.9	135.8±5.8	132.5±8.4	137.7±6.8	132.0±6.8	0.539
	术后 1 d	135.9±6.1	272.6±6.9	271.5±8.0	265.0±6.0	263.4±6.6	264.2±6.4	<0.001
	术后 3 d	143.5±6.4	218.6±7.6	213.3±5.3	211.7±6.4	179.8±6.8	184.8±6.2	<0.001
	术后 7 d	135.5±6.7	169.4±4.4	161.9±5.9	162.8±9.1	156.6±5.6	159.2±7.8	<0.001
	P 值	0.146	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
TNF-α (pg/mg)	术前	51.1±8.9	54.2±9.8	46.8±10.2	48.4±8.6	46.9±8.0	49.0±10.0	0.807
	术后 1 d	51.1±9.0	82.3±5.8	76.9±5.0	77.2±8.3	71.6±5.2	72.5±5.1	<0.001
	术后 3 d	54.6±9.4	72.4±7.4	69.5±5.1	66.1±4.8	61.7±5.3	63.9±4.3	<0.001
	术后 7 d	49.4±6.9	67.1±4.7	62.4±5.3	61.0±5.6	58.4±8.5	59.2±5.7	0.002
	P 值	0.770	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
IL-6 (pg/mg)	术前	15.4±2.8	15.7±2.7	17.5±2.6	15.0±2.7	15.3±3.3	15.2±2.8	0.684
	术后 1 d	15.8±3.1	41.8±5.3	38.2±6.2	37.2±6.3	27.4±4.2	30.4±5.7	<0.001
	术后 3 d	16.3±3.7	26.5±5.4	25.1±4.5	22.8±4.7	18.6±3.2	19.2±3.0	0.014
	术后 7 d	13.2±3.4	19.0±3.7	17.0±4.0	18.6±2.8	12.8±3.9	14.3±3.9	0.015
	P 值	0.398	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ET-1 (pg/mg)	术前	7.7±3.2	7.1±2.7	6.9±2.6	8.2±3.3	8.6±2.8	7.6±2.4	0.924
	术后 1 d	8.6±3.1	15.9±5.7	14.9±6.4	14.9±3.4	15.2±2.4	14.5±5.4	0.003
	术后 3 d	7.4±3.1	13.4±4.4	12.1±5.2	12.4±4.3	11.4±3.8	11.7±4.4	0.168
	术后 7 d	7.9±3.3	12.6±3.7	10.8±2.8	10.0±3.2	8.4±2.7	8.8±3.6	0.273
	P 值	0.922	0.014	0.041	0.024	0.003	0.037	
NO (μmol/mg)	术前	16.7±2.8	15.7±3.5	16.2±3.5	17.9±3.5	17.0±3.2	15.2±3.3	0.825
	术后 1 d	15.8±2.8	8.1±2.4	8.3±2.1	8.7±2.0	8.7±1.8	8.2±2.5	<0.001
	术后 3 d	16.4±2.6	8.5±3.8	9.5±2.8	9.8±2.7	10.7±2.5	10.9±3.9	0.007
	术后 7 d	17.1±3.9	9.2±4.2	10.4±5.2	11.3±2.3	15.1±3.3	14.8±3.5	0.029
	P 值	0.896	0.004	0.006	<0.001	<0.001	0.005	

2.4 RT-PCR 结果比较

术后 7 d 六组老龄兔 NF-κB 通路相关分子 mRNA 表达见表 3，结果显示：与空白组比，其余五组术后 NF-κB 通路相关分子表达量均有不同程度增加，组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比，低、中、高剂量组 TLR4mRNA、MyD88mRNA、NF-κB P65mRNA 表达明显降低 ($P<0.001$)；与肝素组比，低、中、高剂量组的 TLR4mRNA、MyD88mRNA、NF-κB P65mRNA 表达明显降低 ($P<0.001$)。

2.5 Western blot 结果比较

术后 7 d 六组老龄兔 NF-κB 通路相关蛋白表达见表 4，结果显示：与空白组比，其余五组术后 NF-κB 通路相关蛋白表达量均有不同程度增加，组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比，中、高剂量组的 TLR4 蛋白表达明显降低 (P 值为 <0.001 、 <0.001)，MyD88 蛋白表达明显降低 (P 值为 <0.001 、 <0.001)，NF-κB P65 蛋白表达亦明显降低 (P 值为 <0.001 、 <0.001)；与肝素组比，中、高剂量组的 TLR4

蛋白表达明显降低 (P 值为 <0.001 、 0.004)，MyD88 蛋白表达明显降低 (P 值为 <0.001 、 <0.001)，NF- κ B P65

蛋白表达亦明显降低 (P 值为 <0.001 、 0.011)。

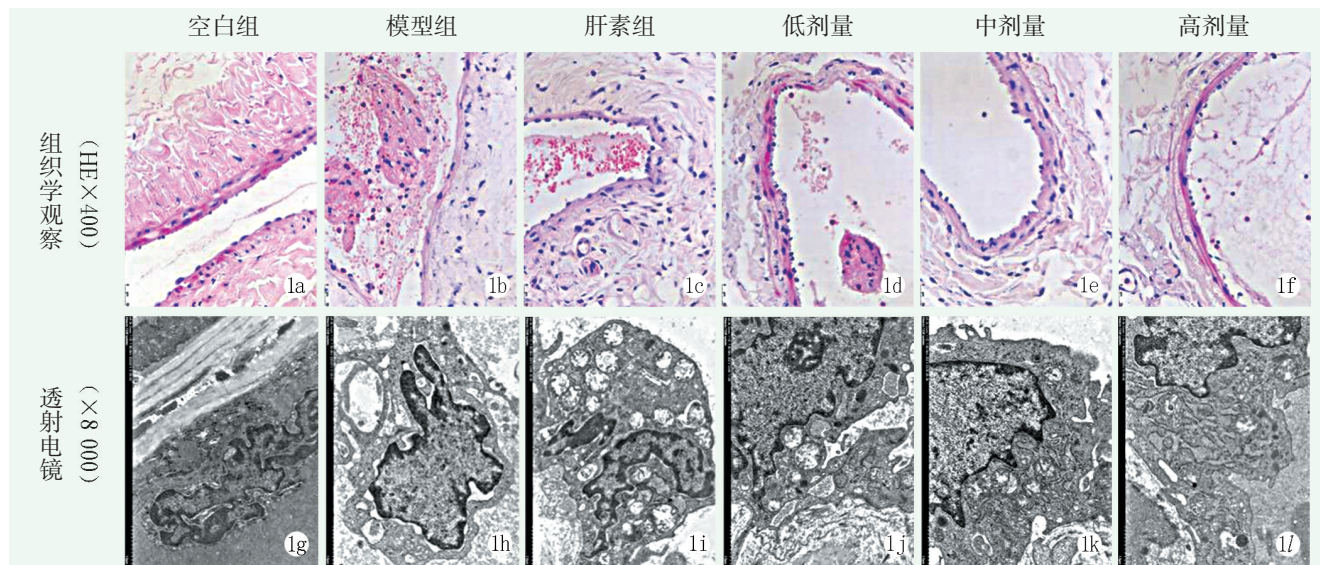


图 1 六组动物术后 7 d 血管形态观察 1a: 空白组, 内皮细胞排列整齐, 管腔未见血栓 1b: 模型组, 内皮细胞脱落, 管腔见血栓和白细胞 1c: 肝素组, 内皮细胞脱落, 管腔见血凝块 1d: 低剂量组, 偶见内皮细胞脱落和小血栓 1e: 中剂量组, 内皮细胞排列较整齐, 管腔未见血栓 1f: 高剂量组, 内皮细胞排列较整齐, 管腔散在不溶性纤维蛋白 1g: 空白组, 内皮细胞呈梭形, 整体结构好 1h: 模型组, 内皮细胞趋于脱落, 线粒体严重肿胀, 粗面内质网脱颗粒 1i: 肝素组, 内皮细胞形态不规则, 线粒体肿胀明显 1j: 低剂量组, 内皮细胞形态欠规则, 线粒体肿胀明显 1k: 中剂量组, 内皮细胞形态规整, 线粒体肿胀轻 1l: 高剂量组, 内皮细胞损伤较轻, 线粒体中度肿胀

表 3 术后 7 d 六组动物 NF- κ B 通路标志物 mRNA 表达测结果 (Δ CT 值, $\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	空白组 (n=4)	模型组 (n=4)	肝素组 (n=4)	低剂量 (n=4)	中剂量 (n=4)	高剂量 (n=4)	P 值
TLR4	7.0 \pm 0.1	5.2 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	5.9 \pm 0.2	6.8 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	<0.001
MyD88	7.9 \pm 0.1	6.3 \pm 0.1	6.6 \pm 0.2	7.0 \pm 0.1	7.8 \pm 0.2	7.4 \pm 0.1	<0.001
NF- κ B P65	7.9 \pm 0.1	6.5 \pm 0.2	7.0 \pm 0.1	7.4 \pm 0.2	7.9 \pm 0.3	7.5 \pm 0.2	<0.001

表 4 术后 7 d 六组动物 NF- κ B 通路标志物蛋白表达测结果 (相对表达量, $\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	空白组 (n=4)	模型组 (n=4)	肝素组 (n=4)	低剂量 (n=4)	中剂量 (n=4)	高剂量 (n=4)	P 值
TLR4	1.0 \pm 0.2	3.2 \pm 0.3	3.0 \pm 0.3	2.7 \pm 0.5	1.7 \pm 0.3	2.1 \pm 0.4	<0.001
MyD88	1.0 \pm 0.0	3.0 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.0	2.0 \pm 0.2	2.3 \pm 0.1	<0.001
NF- κ B P65	1.0 \pm 0.1	3.3 \pm 0.4	3.0 \pm 0.4	2.8 \pm 0.5	1.7 \pm 0.5	2.2 \pm 0.5	<0.001

3 讨论

年老体弱者基础疾病多、手术创伤大、失血多等原因, 均会增加术后死亡率^[12]。本研究选用的人参四逆汤出自于《伤寒论》, 主要由制附子、人参、甘草、干姜等组成, 是临床上常用的回阳救逆之方。方药中, 附子具有回阳救逆、补火助阳及散寒止痛功效; 人参中富含人参苷, 能提高抗应激作用; 干姜具有温中散寒、回阳通脉、温肺化饮功效; 甘草则能调和诸药, 发挥不同药物功效; 加山萸肉收敛固本, 可防虚阳外泄。诸药共奏, 能发挥补中益气、升阳固表

功效^[13]。

在多数人群中, 炎症随着年龄的增长而增加, 炎症损伤对多个系统和器官产生有害影响^[14], 有研究证实了老年炎症与血液黏度变化和凝血风险升高之间的关系^[15], 炎症可能引发凝血是其直接机制^[16], 进而发生血栓栓塞性事件。

在本研究中, 作者发现模型组老龄兔术后 1、3、7 d 的 COR、TNF- α 、IL-6 水平显著上升, 而人参四逆汤的术前应用能降低上述指标水平。COR 是一种与疼痛、炎症相关的激素^[17]; TNF- α 不仅降低内皮细胞中血栓调节蛋白的转录及表达水平, 还能诱导收缩血管物质的表达, 引起血管收缩^[18]; TNF-

α 、IL-6 均能诱导单核细胞表达组织因子, 暴露的组织因子将激活凝血因子 VII, 启动外源性凝血系统继而形成血栓^[19]。上述结果表明人参四逆汤可能通过调节老龄兔术后应激反应, 抑制炎症因子表达来降低术后 DVT 的发生率, 且以中、高剂量四逆汤效果更佳。

血管内皮细胞能够分泌 ET-1 收缩血管平滑肌, 产生血管性血友病因子、组织因子、血栓素 A2 等促凝因子, 还能促进血小板活化, 在血栓形成中发挥重要作用^[20]。NO 合成减少和 ET-1 升高是血管内皮功能障碍的标志^[21]。本研究表明, 中、高剂量组术后 7 d 的 ET-1 水平较模型组明显降低, NO 水平明显升高, 改善了血管内皮功能, 与既往研究结论一致^[21, 22]。从 HE 切片和透射电镜结果还可以看出, 人参四逆汤术前干预能够改善老龄兔骨折血管内皮细胞的形态, 维持其完整性。

本研究还发现人参四逆汤能够降低老龄兔术后 TLR4、MyD88、NF- κ B P65mRNA 及蛋白表达, 作者推测其改善家兔血管内皮功能的机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路有关。NF κ B 通路作为一条重要的炎症信号通路, 在 DVT 形成的病理过程中发挥一定作用^[23], 这也是诸多药物抑制深静脉血栓形成的途径^[24-26]。

综上所述, 术前应用人参四逆汤不仅能够抑制兔骨折术后的炎症应激反应, 还能改善股静脉血管内皮细胞的形态和功能, 从而降低下肢深静脉血栓的发生, 其作用机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路的表达有关。本实验为深静脉血栓的临床治疗提供新的途径, 提高中药治疗深静脉血栓的科学性及有效性。

参考文献

- [1] Khan F, Tritschler T, Kahn SR, et al. Venous thromboembolism [J]. *Lancet*, 2021, 398 (10294): 64-77.
- [2] 潘品, 宋凯, 姚尧, 等. 复杂全髋置换术后下肢深静脉血栓的相关因素 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (14): 1249-1253.
- [3] 刘大伟, 王忠正, 王宇钊. 创伤性下肢骨折后发生下肢深静脉血栓的发病率和部位及相关危险因素的研究进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2021, 27 (1): 159-164.
- [4] Omar HR, Mirsaedi M, Rashad R, et al. Association of serum albumin and severity of pulmonary embolism [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56 (1): 26.
- [5] Wang Z, Zhou Q, Liu H, et al. Association between monocyte count and preoperative deep venous thrombosis in older patients with hip fracture: a retrospective study [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2022, 28: 10760296221100806.
- [6] 徐荣良, 刘林, 许铁, 等. 血常规参数对骨折术后深静脉血栓形成的预测价值 [J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37 (2): 363-365.
- [7] Goodwin CM, Hoffman JA. Deep vein thrombosis and stress ulcer prophylaxis in the intensive care unit [J]. *J Pharm Pract*, 2011, 24 (1): 78-88.
- [8] 苏帆. 从气血理论探讨围术期应激反应调控及相关并发症防治 [D]. 山东中医药大学, 2013.
- [9] 鹿洪秀, 吕文学, 赵启东, 等. 中药对老龄兔术后早期反应的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (18): 1690-1694.
- [10] 张英, 贾丙申, 周建强, 等. 髋部骨折后下肢深静脉血栓形成家兔模型的建立 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15 (28): 5210-5212.
- [11] 何飞, 胡敏, 王兵, 等. 构建创伤性肢体深静脉血栓动物模型及其应用评价 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9 (22): 112-113.
- [12] 王成刚, 麻彬, 施静, 等. 老年髋部骨折术后死亡的危险因素 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (4): 289-293.
- [13] 雷国奇. 四逆汤类方证治规律及临床应用研究 [D]. 湖北中医药大学, 2010.
- [14] Teissier T, Boulanger E, Cox LS. Interconnections between inflammation and immunosenescence during ageing [J]. *Cells*, 2022, 11 (3): 359.
- [15] Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation [J]. *Br J Haematol*, 2005, 131 (4): 417-430.
- [16] Branchford BR, Carpenter SL. The role of inflammation in venous thromboembolism [J]. *Front Pediatr*, 2018, 6: 142.
- [17] Khanna R, Slovacek H, Liles J, et al. Regulation of cortisol in patients undergoing total joint arthroplasty [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2021, 27: 1076029621987614.
- [18] 张语澎, 王欢, 薛文池, 等. 氧化应激-炎症-血栓之恶性交互网络研究新进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38 (9): 983-994.
- [19] Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor [J]. *Circulation*, 2004, 109 (21 Suppl 1): H2-H10.
- [20] 李文, 胡继红, 李兴国, 等. KLF6 通过上调 TGF- β 1 诱导静脉内皮细胞 endoglin, P-selectin 表达, 引发血小板粘附、聚集, 促进 TDVT 形成的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19 (16): 1365-1368.
- [21] 葛迎春, 马天舒, 刘平, 等. 四逆汤提取物对家兔血管内皮细胞释放 PGI2 的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27 (3): 1-3.
- [22] 刘平, 葛迎春, 马天舒, 等. 低氧条件下四逆汤及组方药提取物对大鼠血管内皮细胞释放 PGI₂, TXA₂ 和 NO 的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29 (10): 63-67.
- [23] 顾燕妮, 谢春毅. 深静脉血栓形成炎症信号通路研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36 (1): 113-118.
- [24] 简功辉. 消栓饮对创伤性深静脉血栓兔静脉壁核因子 NF- κ B 表达的影响 [D]. 湖南中医药大学, 2017.
- [25] Liu H, Li P, Lin J, et al. Danhong Huayu Koufuye prevents venous thrombosis through antiinflammation via Sirtuin 1/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111975.
- [26] 刘青云, 黄振华, 刘亚坤, 等. 乳脂球表皮生长因子 8 通过调控 Toll 样因子受体 4/核因子- κ B 信号通路抑制深静脉血栓形成 [J]. *中华实验外科杂志*, 2022, 39 (2): 250-253.

(收稿:2022-11-10 修回:2022-12-05)
(同行评议专家: 赵丕新 程 红)
(本文编辑: 宁 桦)