化瘀消肿汤对深静脉血栓形成大鼠炎症反应的影响Δ

麦　叶*，林道斌，刘海林，林瑶瑶，许青青，顾　勇#（海南省中医院重症医学科，海口　570203）

中图分类号　R965；R543.6　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）14-1697-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.14.07

摘　要　目的　探讨化瘀消肿汤（HXD）对深静脉血栓形成（DVT）大鼠炎症反应的影响。**方法**　将雄性SD大鼠分为对照组（CK组）、模型组（Model组）、HXD低剂量组（HXD-L组，HXD 10.86 mg/kg）、HXD中剂量组（HXD-M组，HXD 21.71 mg/kg）、HXD高剂量组（HXD-H组，HXD 32.57 mg/kg）、阳性对照组（LMWHS组，低分子量肝素钠600 IU/kg）、沉默信息调节因子2（SIRT2）抑制剂组（AK-7组，AK-7 20 mg/kg）、HXD-M联合AK-7组（HXD-M+AK-7组，HXD 21.71 mg/kg+AK-7 20 mg/kg），每组12只。除CK组外，其余组大鼠均采用Reyers法构建DVT大鼠模型；建模后，各药物组分别灌胃/腹腔注射相应药液，每天1次，持续2周。末次给药24 h后，检测大鼠凝血功能指标[活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶时间（TT）、凝血酶原时间（PT）、纤维蛋白原（FIB）]和血清、下腔静脉组织中炎症指标[白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（TNF-α）]，观察其血栓形成情况并称定血栓湿重、干重，检测下腔静脉组织中组织因子（TF）、SIRT2蛋白的表达情况和核因子κB（NF-κB）p65的磷酸化、乙酰化水平。**结果**　与CK组比较，Model组大鼠的APTT、TT、PT均显著缩短（$P<0.05$）；FIB含量，IL-1β、IL-6、TNF-α水平，静脉血栓湿重、干重，TF蛋白染色评分，NF-κB p65蛋白的磷酸化、乙酰化水平均显著升高（$P<0.05$）；下腔静脉血管内充满血栓，SIRT2蛋白的表达水平显著降低（$P<0.05$）。与Model组比较，HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组和LMWHS组大鼠上述指标均显著改善，且HXD-M组、HXD-H和LMWHS组的效果显著优于HXD-L组（$P<0.05$）；AK-7组大鼠上述指标的变化趋势与之相反，且AK-7可减弱中剂量HXD对模型大鼠炎症反应的抑制作用（$P<0.05$）。**结论**　HXD可能通过激活SIRT2/NF-κB信号通路来抑制DVT大鼠的炎症反应。

关键词　化瘀消肿汤；深静脉血栓形成；炎症反应；沉默信息调节因子2/核因子κB信号通路

Influence of Huayu xiaozhong decoction on inflammatory response in rats with deep vein thrombosis

MAI Ye, LIN Daobin, LIU Hailin, LIN Yaoyao, XU Qingqing, GU Yong (Intensive Care Unit, Hainan Traditional Chinese Medicine Hospital, Haikou 570203, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the influence of Huayu xiaozhong decoction (HXD) on inflammatory response in rats with deep vein thrombosis (DVT). **METHODS** The male SD rats were divided into control group (CK group), model group (Model group), HXD low-dose group (HXD-L group, HXD 10.86 mg/kg), HXD medium-dose group (HXD-M group, HXD 21.71 mg/kg), HXD high-dose group (HXD-H group, HXD 32.57 mg/kg), positive control group (LMWHS group, low molecular weight heparin sodium 600 IU/kg), silent information regulator 2 (SIRT2) inhibitor group (AK-7 group, AK-7 20 mg/kg), HXD-M+AK-7 group (HXD 21.71 mg/kg+AK-7 20 mg/kg), with 12 rats in each group. Except for the CK group, the DVT rat was induced by the Reyers method in other groups; after modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically/intraperitoneally, once a day, for consecutive 2 weeks. Twenty-four hours after the last medication, the coagulation function indexes [activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), prothrombin time (PT), fibrinogen (FIB)] and inflammatory indexes in serum and inferior vena cava tissue [interleukin-1β (IL-1β), IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α)] of rats were detected. The formation of thrombus was observed, and the wet and dry masses of the thrombus were weighed. The protein expressions of tissue factor (TF) and SIRT2 as well as the phosphorylation and acetylation levels of nuclear factor kappa B (NF-κB) p65 in inferior vena cava tissue were detected. **RESULTS** Compared with CK group, APTT, TT and PT of rats in Model group were shortened significantly ($P<0.05$); the content of FIB, the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α, wet weight and dry weight of venous thrombus, TF protein staining score, the phosphorylation and acetylation levels of NF-κB p65 protein increased significantly ($P<0.05$); the inferior vena cava was full of thrombus, and the protein expression of SIRT2 decreased ($P<0.05$). Compared with Model group, above indexes of HXD-L group, HXD-M group, HXD-H group and LMWHS group were improved, while the improvement effects of HXD-M group, HXD-H group and LMWHS group were significantly better than those of HXD-L group ($P<0.05$). The trends of the corresponding indicators in AK-7 group were opposite to the above ($P<0.05$); AK-7 attenuated the inhibitory effect of medium-dose HXD on the inflammatory response in model rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** HXD may inhibit the inflammatory response of DVT rats by activating SIRT2/NF-κB signaling pathway.

Δ **基金项目**　海南省自然科学基金高层次人才项目（No. 820RC773）；海南省卫生计生行业科研项目（No.20A200342）

＊**第一作者**　副主任医师，硕士。研究方向：急危重症医学。E-mail：maiye136@163.com

＃**通信作者**　副主任医师，博士。研究方向：脑缺血损伤与保护。E-mail：18089866688@163.com

KEYWORDS Huayu xiaozhong decoction; deep vein thrombosis; inflammatory response; silent information regulator 2/nuclear transcription factor kappa B signaling pathway

深静脉血栓形成（deep vein thrombosis，DVT）是常见的静脉血栓栓塞性疾病之一，治愈率低，术后复发率高。研究指出，DVT可涉及上肢和下肢，其中下肢DVT常导致肢体功能丧失和异常栓塞、肺栓塞发生，或进一步引发血栓后综合征[1]。目前，DVT的治疗以抗凝为主，然而临床实践显示，抗凝剂导致患者严重出血的风险较高[2]。既往研究表明，炎症在DVT的形成中具有重要作用[3]。因此，开发抑制DVT过程中炎症反应的新型药物具有重要意义。

化瘀消肿汤（Huayu xiaozhong decoction，HXD）为海南省中医院的传统院内方，可预防人工股骨头置换术患者术后下肢DVT的发生[4]，但具体机制尚未可知。相关研究显示，上调沉默信息调节因子1（silent information regulator-1，SIRT1）表达、抑制核因子κB（nuclear transcription factor kappa B，NF-κB）蛋白核转移均可改善DVT大鼠的炎症反应[5]；同时，在血栓性卒中小鼠恢复期间，其体内SIRT2表达水平明显升高[6]。考虑到SIRT2与SIRT1同为SIRT家族成员，而HXD能否通过调控SIRT2/NF-κB信号通路来改善DVT大鼠的炎症反应尚不明确，因此，本研究拟初步探讨HXD对DVT大鼠炎症反应的影响及潜在机制，以期为DVT的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

RAC-030型全自动凝血分析仪购自上海玉研科学仪器有限公司；E100型光学显微镜购自日本Nikon公司；SPL-318C型酶标仪购自昆明诺金科技有限公司；DYCZ-24DH型双板垂直电泳仪购自北京六一生物科技有限公司；XR型凝胶成像分析系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

HXD由海南省中医院药剂科提供，全方含三七15 g、桃仁10 g、红花10 g、川芎10 g、赤芍10 g、牛膝15 g、炮穿山甲15 g、茜草10 g、大黄5 g、当归15 g、杜仲15 g、茯苓15 g、乳香8 g、没药8 g、木瓜10 g、桂枝10 g[上述药材用水500 mL煎煮并浓缩至200 mL，再加水300 mL煎煮并浓缩至200 mL，过滤，收集滤液，即得（每1 mL药液相当于生药总量0.9 g）]，临用前用生理盐水稀释至所需浓度。

低分子量肝素钠（low molecular weight heparin sodium，LMWHS）注射液（阳性对照药物，批号20220406，规格0.2 mL∶2 500 IU）购自齐鲁制药有限公司；AK-7（SIRT2抑制剂）对照品（批号20220811，纯度99.59%）购自江西江蓝纯生物试剂有限公司；大鼠白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为20220204、20220215、20220217）均购自上海广锐生物科技有限公司；大鼠组织因子（tissue factor，TF）免疫组化试剂盒（批号20220706）购自上海圻明生物科技有限公司；兔源SIRT2、磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）、NF-κB p65、乙酰化NF-κB p65[NF-κB p65（acetyl K310）]、β-肌动蛋白（β-actin）抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为ab211033、ab239882、ab207297、ab19870、ab8226、ab6721）均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠96只，6周龄，体重为210～220 g，购自广东省医学实验动物中心，生产许可证号为SCXK（粤）2022-0002。本研究方案经实验所在单位实验动物伦理委员会审核通过，批件号为2022001203。

2 方法

2.1 分组与给药

按照随机数字表法将SD大鼠分为对照组（CK组）、模型组（Model组）、HXD低剂量组（HXD-L组）、HXD中剂量组（HXD-M组）、HXD高剂量组（HXD-H组）、阳性对照组（LMWHS组）、SIRT2抑制剂组（AK-7组）、HXD-M联合AK-7组（HXD-M+AK-7组），每组12只。所有大鼠适应性喂养1周后，除CK组外，其余组大鼠均采用Reyers法构建DVT模型：大鼠以2%戊巴比妥钠麻醉，保持仰卧位并于腹部正中间切口，游离左肾静脉与下腔静脉交会处，以4-0线结扎左肾静脉下面的下腔静脉，5-0线结扎此下腔静脉主要属支，缝合伤口4 h后，拆开腹部缝线，若观察到股静脉管腔变粗、呈紫黑色且其中存在深色物质即表明造模成功[7]。造模24 h后，各组大鼠进行如下处理：HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组大鼠分别灌胃HXD 10.86、21.71、32.57 mg/kg（以生药总量计）[8]，并同时腹腔注射等体积生理盐水；LMWHS组、AK-7组大鼠分别腹腔注射LMWHS 600 IU/kg[9]、AK-7 20 mg/kg[10]，并同时灌胃等体积生理盐水；HXD-M+AK-7组大鼠灌胃HXD 21.71 mg/kg（以生药总量计），并同时腹腔注射AK-7 20 mg/kg；CK组、Model组大鼠均灌胃和腹腔注射等体积生理盐水，每天1次，持续2周。

2.2 标本收集

末次给药24 h后，麻醉各组大鼠，腹腔取血，用于凝血功能指标和炎症因子的检测。采集血样后，处死各组大鼠，收集血栓形成处的下腔静脉组织（CK组大鼠取相同位置的下腔静脉组织），其中一部分（含每组6只大鼠的下腔静脉组织）固定于4%多聚甲醛中，用于苏木精-

伊红（HE）染色和免疫组化实验；另一部分（含每组另6只大鼠的下腔静脉组织）保存于－80 ℃冰箱中，用于ELISA、Western blot检测。

2.3 大鼠凝血功能指标的检测

取“2.2”项下各组大鼠血样适量，经抗凝处理后得血浆样品，使用全自动凝血分析仪检测其活化部分凝血活酶时间（activated partial thromboplastin time，APTT）、凝血酶时间（thrombin time，TT）、凝血酶原时间（prothrombin time，PT）、纤维蛋白原（fibrinogen，FIB）。

2.4 大鼠血清和下腔静脉组织中炎症指标的检测

采用ELISA法进行检测。取“2.2”项下各组大鼠血样适量，于4 ℃下以10 000 r/min离心15 min，收集上层血清，严格按照试剂盒说明书操作，以酶标仪检测血清中IL-1β、IL-6、TNF-α水平。取“2.2”项下冻存的各组大鼠下腔静脉组织适量，研磨得组织匀浆，以10 000 r/min离心20 min，收集上清液，严格按照试剂盒说明书操作，以酶标仪检测匀浆上清液中IL-1β、IL-6、TNF-α水平。

2.5 大鼠下腔静脉血栓形成的观察

采用HE染色法进行观察。取“2.2”项下固定（24 h）于4%多聚甲醛中的各组大鼠下腔静脉组织适量，洗涤，常规石蜡包埋后切片（厚度5 μm），经HE染色后，使用光学显微镜观察其下腔静脉组织的病理变化。观察后，取出大鼠血栓并立即称重，得血栓湿重；用滤纸吸干其表面液体，于60 ℃下干燥2 h后再次称重，得血栓干重。

2.6 大鼠下腔静脉组织中TF蛋白表达的检测

采用免疫组化染色法进行检测。取“2.5”项下各组大鼠的病理切片，经脱蜡、水化后，置于3%过氧化氢中并加入柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复，再加入TF一抗（稀释度1∶2 000），在4 ℃下孵育过夜；再加入相应二抗（稀释度1∶2 000），共同孵育1.5 h；经二氨基联苯胺显色、苏木精复染后，使用光学显微镜观察下腔静脉组织中TF蛋白的表达情况，并按如下标准进行评分——染色程度：未染色为0分，浅黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐黄色为3分；染色面积占比：≤5%为0分，6%～25%为1分，26%～50%为2分，51%～75%为3分，＞75%为4分；上述2项评分的乘积≤3分代表染色不明显，＞3分代表染色明显[11]。

2.7 大鼠下腔静脉组织中SIRT2/NF-κB通路相关蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.2”项下冻存的各组大鼠下腔静脉组织适量，用放射免疫沉淀法裂解并提取其总蛋白。总蛋白经定量、电泳、转膜、封闭后，与一抗SIRT2（稀释度1∶2 000）、p-NF-κB p65（稀释度1∶2 000）、NF-κB p65（acetyl K310）（稀释度1∶2 000）、NF-κB p65（稀释度1∶2 000）、β-actin（稀释度1∶1 000）混合并在4 ℃下孵育过夜；随后，加入相应二抗（稀释度1∶2 000），在室温下孵育2 h；以ECL显色后，于凝胶成像分析系统下成像。分别以β-actin（对应SIRT2）为内参，以NF-κB p65[对应p-NF-κB p65、NF-κB p65（acetyl K310）]为参照，采用Image J软件分析SIRT2蛋白的表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化、乙酰化水平。

2.8 统计学方法

使用SPSS 15.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布且方差齐的数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 HXD对各组大鼠凝血功能指标的影响

与CK组比较，Model组大鼠的APTT、TT、PT均显著缩短，FIB含量显著升高（$P<0.05$）；与Model组比较，HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠的APTT、TT、PT均显著延长，FIB含量均显著降低，AK-7组大鼠上述指标的变化趋势与之相反（$P<0.05$）；与HXD-L组比较，HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠的APTT、TT、PT均显著延长，FIB含量均显著降低（$P<0.05$）；与HXD-M组比较，HXD-M+AK-7组大鼠的APTT、TT、PT均显著缩短，FIB含量显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 HXD对各组大鼠凝血功能指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	APTT/s	TT/s	PT/s	FIB/(g/L)
CK组	18.25±0.83	35.56±1.62	12.28±0.55	2.21±0.14
Model组	14.15±0.68[a]	28.84±1.35[a]	8.26±0.34[a]	5.35±0.22[a]
HXD-L组	15.72±0.61[b]	30.36±1.44[b]	9.39±0.41[b]	4.01±0.24[b]
HXD-M组	17.83±0.81[bc]	34.42±1.56[bc]	11.72±0.43[bc]	2.82±0.13[bc]
HXD-H组	17.86±0.80[bc]	34.45±1.54[bc]	11.74±0.45[bc]	2.81±0.12[bc]
LMWHS组	17.87±0.83[bc]	34.51±1.58[bc]	11.76±0.42[bc]	2.85±0.10[bc]
AK-7组	12.32±0.42[b]	24.45±1.05[b]	7.05±0.22[b]	7.07±0.29[b]
HXD-M+AK-7组	15.86±0.64[d]	31.22±1.36[d]	9.75±0.36[d]	3.77±0.15[d]

a：与CK组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与HXD-L组比较，$P<0.05$；d：与HXD-M组比较，$P<0.05$。

3.2 HXD对各组大鼠血清和下腔静脉组织中炎症指标的影响

与CK组比较，Model组大鼠血清和下腔静脉组织中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）；与Model组比较，HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠血清和下腔静脉组织中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著降低，AK-7组大鼠上述指标的变化趋势与之相反（$P<0.05$）；与HXD-L组比较，HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠血清和下腔静脉组织中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$）；与HXD-M组比较，HXD-M+AK-7组大鼠血清和下腔静脉组织中IL-1β、IL-6、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　HXD对各组大鼠血清和下腔静脉组织中IL-1、IL-6、TNF-α水平的影响（$\bar{x}\pm s$，pg/mL）

组别	血清（n=12）			下腔静脉组织（n=6）		
	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-6	TNF-α
CK组	15.58±0.67	27.72±1.26	146.65±6.28	10.23±0.45	21.12±1.05	52.26±2.34
Model组	44.69±2.35^{a}	61.72±3.08^{a}	319.92±13.35^{a}	35.57±1.68^{a}	43.36±2.77^{a}	158.83±6.78^{a}
HXD-L组	36.68±1.72^{b}	53.24±2.45^{b}	285.57±12.22^{b}	30.12±1.43^{b}	36.68±1.78^{b}	115.56±6.33^{b}
HXD-M组	19.89±1.05^{bc}	31.15±1.42^{bc}	163.35±7.29^{bc}	16.67±0.73^{bc}	26.63±1.34^{bc}	82.46±4.15^{bc}
HXD-H组	19.91±1.03^{bc}	31.22±1.45^{bc}	164.42±7.18^{bc}	16.59.±0.72^{bc}	26.58±1.32^{bc}	83.38±4.22^{bc}
LMWHS组	19.93±1.04^{bc}	31.18±1.44^{bc}	165.02±7.09^{bc}	16.64±0.68^{bc}	26.67±1.35^{bc}	84.11±3.93^{bc}
AK-7组	56.67±2.18^{b}	76.69±3.82^{b}	365.57±15.58^{b}	41.43±2.17^{b}	57.72±2.64^{b}	206.59±10.44^{b}
HXD-M+AK-7组	34.47±1.66^{d}	49.96±2.55^{d}	244.46±10.54^{d}	28.26±1.39^{d}	32.27±1.63^{d}	96.68±4.98^{d}

a：与CK组比较，P<0.05；b：与Model组比较，P<0.05；c：与HXD-L组比较，P<0.05；d：与HXD-M组比较，P<0.05。

3.3　HXD对各组大鼠下腔静脉血栓形成的影响

CK组大鼠下腔静脉血管内无明显血栓形成；Model组大鼠下腔静脉血管内充满血栓，且组织内存在大量炎症细胞；HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠下腔静脉血管内有少量血栓形成，且可见少量炎症细胞。与Model组比较，AK-7组大鼠下腔静脉血管内血栓形成增多；与HXD-M组比较，HXD-M+AK-7组大鼠下腔静脉血管内血栓形成增多。结果见图1。

与CK组比较，Model组大鼠的静脉血栓湿重、干重均显著升高（P<0.05）；与Model组比较，HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠的静脉血栓湿重、干重均显著降低，AK-7组大鼠上述指标的变化趋势与之相反（P<0.05）；与HXD-L组比较，HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠的静脉血栓湿重、干重均显著降低（P<0.05）；与HXD-M组比较，HXD-M+AK-7组大鼠的静脉血栓湿重、干重均显著升高（P<0.05）。结果见表3。

3.4　HXD对各组大鼠下腔静脉组织中TF蛋白表达的影响

与CK组比较，Model组大鼠下腔静脉组织中TF蛋白染色明显，染色评分显著升高（P<0.05）；与Model组比较，HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠下腔静脉组织中TF蛋白染色有所减弱，染色评分均显著降低，AK-7组大鼠上述指标的变化趋势与之相反（P<0.05）；与HXD-L组比较，HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠下腔静脉组织中TF蛋白染色评分均显著降低（P<0.05）；与HXD-M组比较，HXD-M+AK-7组大鼠下腔静脉组织中TF蛋白染色评分显著升高（P<0.05）。结果见表3、图2。

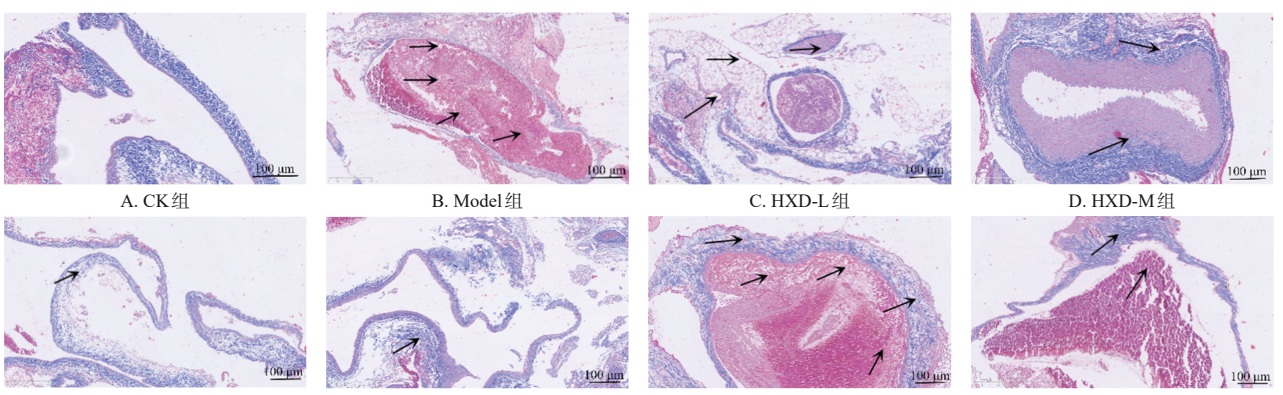
表3　HXD对各组大鼠静脉血栓干、湿重和下腔静脉组织中TF蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	血栓湿重/mg	血栓干重/mg	TF蛋白染色评分/分
CK组	0	0	0.23±0.02
Model组	18.25±0.72^{a}	4.26±0.21^{a}	7.56±0.31^{a}
HXD-L组	15.47±0.48^{b}	3.51±0.15^{b}	6.12±0.22^{b}
HXD-M组	4.69±0.21^{bc}	1.16±0.02^{bc}	2.56±0.14^{bc}
HXD-H组	4.70±0.23^{bc}	1.17±0.02^{bc}	2.58±0.13^{bc}
LMWHS组	4.72±0.22^{bc}	1.19±0.03^{bc}	2.57±0.15^{bc}
AK-7组	22.54±1.32^{b}	5.72±0.24^{b}	9.77±0.43^{b}
HXD-M+AK-7组	12.28±0.58^{d}	3.01±0.14^{d}	5.65±0.21^{d}

a：与CK组比较，P<0.05；b：与Model组比较，P<0.05；c：与HXD-L组比较，P<0.05；d：与HXD-M组比较，P<0.05。

3.5　HXD对各组大鼠下腔静脉组织中SIRT2/NF-κB通路相关蛋白表达的影响

与CK组比较，Model组大鼠下腔静脉组织中SIRT2蛋白的表达水平显著降低，NF-κB p65蛋白的磷酸化、乙酰化水平均显著升高（P<0.05）；与Model组比较，HXD-L组、HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠下腔静脉组织中SIRT2蛋白的表达水平均显著升高，NF-κB p65蛋白的磷酸化、乙酰化水平均显著降低，AK-7组大鼠上述指标的变化趋势与之相反（P<0.05）；与HXD-L组比较，HXD-M组、HXD-H组、LMWHS组大鼠下腔静脉组织中SIRT2蛋白的表达水平均显著升高，NF-κB p65蛋白的磷酸化、乙酰化水平均显著降低（P<0.05）；与HXD-M组比较，HXD-M+AK-7组大鼠下腔静脉组织中SIRT2蛋白的表达水平显著降低，NF-κB p65蛋白的磷酸化、乙酰化水平均显著升高（P<0.05）。结果见表4、图3。

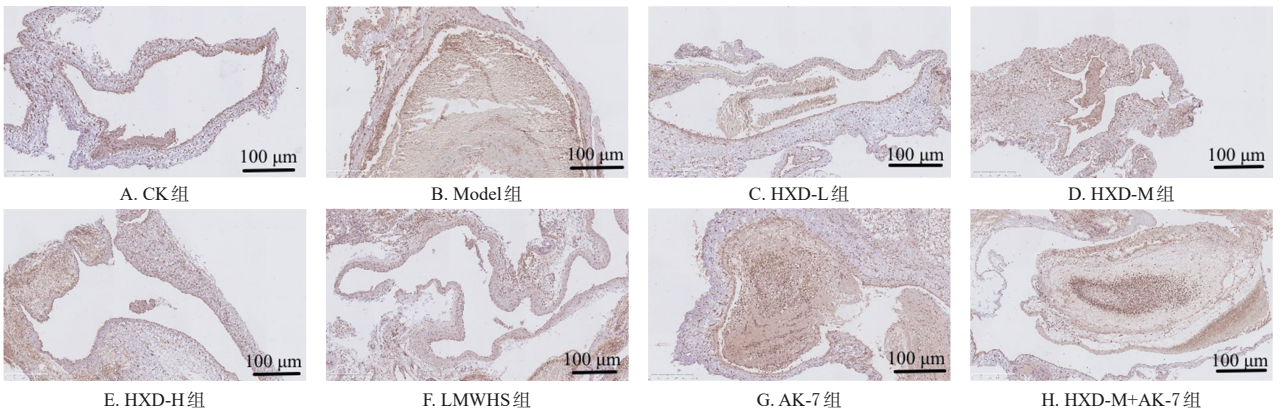


A. CK组　B. Model组　C. HXD-L组　D. HXD-M组

E. HXD-H组　F. LMWHS组　G. AK-7组　H. HXD-M+AK-7组

→：炎症细胞。

图1　各组大鼠下腔静脉组织病理变化的显微图（HE染色法）



A. CK组　B. Model组　C. HXD-L组　D. HXD-M组

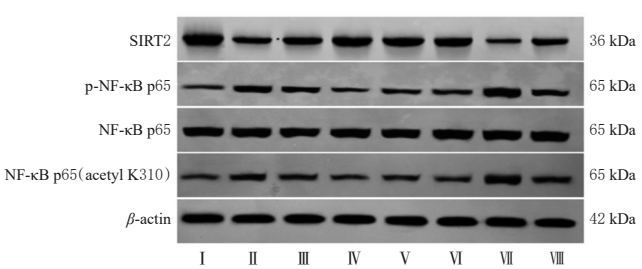
E. HXD-H组　F. LMWHS组　G. AK-7组　H. HXD-M+AK-7组

图2　各组大鼠下腔静脉组织中TF蛋白表达的显微图（免疫组化法）

表4　各组大鼠下腔静脉组织中SIRT2/NF-κB通路相关蛋白的表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	SIRT2蛋白表达水平	NF-κB p65蛋白磷酸化水平	NF-κB p65蛋白乙酰化水平
CK组	1.56±0.11	0.18±0.01	0.25±0.02
Model组	0.42±0.03[a]	0.72±0.06[a]	0.64±0.05[a]
HXD-L组	0.69±0.05[b]	0.54±0.04[b]	0.45±0.03[b]
HXD-M组	1.28±0.10[bc]	0.25±0.01[bc]	0.29±0.01[bc]
HXD-H组	1.30±0.11[bc]	0.23±0.01[bc]	0.27±0.02[bc]
LMWHS组	1.31±0.12[bc]	0.24±0.02[bc]	0.28±0.01[bc]
AK-7组	0.21±0.02[b]	0.95±0.05[b]	0.88±0.07[b]
HXD-M+AK-7组	0.78±0.06[d]	0.46±0.03[d]	0.41±0.04[d]

a：与CK组比较，$P<0.05$；b：与Model组比较，$P<0.05$；c：与HXD-L组比较，$P<0.05$；d：与HXD-M组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：CK组；Ⅱ：Model组；Ⅲ：HXD-L组；Ⅳ：HXD-M组；Ⅴ：HXD-H组；Ⅵ：LMWHS组；Ⅶ：AK-7组；Ⅷ：HXD-M+AK-7组。

图3　各组大鼠下腔静脉组织中SIRT2/NF-κB通路相关蛋白表达的电泳图

4　讨论

下肢DVT患者的临床症状包括下肢局部疼痛、压痛和肿胀，严重影响其正常生活，给患者家庭和社会造成严重的经济负担[12]。本研究采用Reyers法构建DVT动物模型，结果显示，与CK组比较，Model组大鼠的APTT、TT、PT均显著缩短，FIB含量显著升高；同时，大鼠下腔静脉血管内充满血栓，静脉血栓湿重、干重均显著升高，提示DVT大鼠构建成功。

作为炎症级联反应的起始因子，TNF-α可促进巨噬细胞释放IL-6、IL-1β等炎症因子，从而诱导巨噬细胞、淋巴细胞和其他细胞的活化，这些活化的细胞可作用于血管内皮细胞，损害内皮功能并诱发DVT[13]。TF是凝血系统中唯一在细胞表面表达的跨膜糖蛋白，可启动体内主要的外源性凝血途径，当血管受损时，内皮细胞和受损血管内皮成纤维细胞均可表达TF以启动凝血过程[14]。炎症是血栓性疾病的重要环节，可诱导内皮细胞和单核细胞表达TF，后者可进一步合成和释放各种黏附分子、炎症因子和趋化因子，从而扩大炎症反应，最终促进血栓形成[15]。由此可见，IL-1β、IL-6、TNF-α、TF的变化可作为评估机体炎症反应及凝血功能的重要依据。本研究结果显示，与CK组比较，Model组大鼠IL-1β、IL-6、TNF-α水平和TF蛋白染色评分均显著升高，表明DVT大鼠存在炎症反应且凝血功能异常。

HXD由三七、桃仁、红花、川芎、赤芍、牛膝、炮穿山甲、茜草、大黄、当归、杜仲、茯苓、乳香、没药、木瓜、桂枝组成。现代药理学研究表明，方中部分药材可通过多种生物学途径来防治DVT：三七中的三七总皂苷可保护血管内皮细胞，降低血液黏稠度，抑制血小板活化和聚集[16]；桃仁和红花均有改善血液动力学指标的作用[17]；川芎主要成分川芎内酯Ⅰ具有抗血小板聚集和抗凝血的作用[18]。据报道，HXD可预防髋膝关节置换术患者术后下肢DVT的形成，临床效果显著[4]。但关于HXD能否抑制DVT过程中的炎症反应及潜在机制鲜有报道。本研究结果显示，HXD可抑制DVT大鼠的炎症反应，且中、高剂量HXD和LMWHS的抑制作用优于低剂量HXD，可为HXD防治DVT提供实验依据。

SIRT2是SIRT家族成员，可参与新陈代谢、细胞周期、炎症、肿瘤等众多生理病理过程，可通过p65 Lys310的去乙酰化途径来参与NF-κB信号通路的调控[19]。据报道，SIRT2抑制剂AK-7可通过增加NF-κB的乙酰化和核转移来上调其靶基因表达，从而导致促炎性细胞因子的释放，最终加重创伤性脑损伤[20]。而SIRT2/NF-κB信号通路是否参与了DVT大鼠的炎症反应尚不可知。本研究结果显示，HXD可抑制DVT大鼠下腔静脉组织中NF-κB p65蛋白的磷酸化和乙酰化，上调SIRT2蛋白的表达，推测该方抑制DVT大鼠炎症反应的作用可能与激活SIRT2/NF-κB信号通路有关。为进一步验证上述结果，同时考虑到中、高剂量HXD的炎症抑制作用相当，本研究以中剂量HXD联合SIRT2抑制剂AK-7共同

干预DVT大鼠，结果显示，AK-7减弱了中剂量HXD对DVT大鼠炎症反应的抑制作用，初步证实了HXD的炎症抑制作用与激活SIRT2/NF-κB信号通路有关。此外，SIRT2是去乙酰化酶，可通过调节NF-κB的乙酰化水平来影响其功能[20]。本研究通过Western blot法检测了NF-κB p65蛋白的乙酰化和磷酸化水平，结果显示，用AK-7抑制SIRT2蛋白表达后，HXD对DVT大鼠下腔静脉组织中NF-κB p65蛋白乙酰化和磷酸化的抑制作用均明显减弱，但NF-κB p65蛋白磷酸化水平的变化是否与SIRT2蛋白的表达有关仍有待进一步验证。

综上所述，HXD可能通过激活SIRT2/NF-κB信号通路来抑制DVT大鼠的炎症反应，该研究可为HXD防治DVT提供理论依据。然而，本研究尚未探讨HXD炎症抑制作用的其他通路机制，后续将予以完善。

参考文献

[1] YANG B C, ZHANG Z X. Suppression of long intergenic non-protein coding RNA 1123 constrains lower extremity deep vein thrombosis via microRNA-125a-3p to target interleukin 1 receptor type 1[J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 13452-13461.

[2] JIN F M, WANG M, WU X M, et al. Effects of wasp venom on venous thrombosis in rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2022, 25(7): 822-826.

[3] ZHANG T S, LI Q, WANG L J, et al. Expression variations and clinical significance of MMP-1, MMP-2 and inflammatory factors in serum of patients with deep venous thrombosis of lower extremity[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 181-186.

[4] 宋晓东，于彬. 化瘀消肿汤预防人工股骨头置换术后下肢深静脉血栓形成（DVT）的疗效及凝血功能的对比研究[J]. 中国伤残医学，2021，29(9)：16-17.

[5] YAO X L, CHEN W P, LIU J, et al. Deep vein thrombosis is modulated by inflammation regulated via sirtuin 1/NF-κB signalling pathway in a rat model[J]. Thromb Haemost, 2019, 119(3): 421-430.

[6] DEMYANENKO S, GANTSGORN E, RODKIN S, et al. Localization and expression of sirtuins 1, 2, 6 and plasticity-related proteins in the recovery period after a photothrombotic stroke in mice[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(10): 105152.

[7] 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-κB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.

[8] 陈美雄，林业武，周理，等. 化瘀消肿汤预防人工股骨头置换术后下肢深静脉血栓形成的围手术期临床效能[J]. 广州中医药大学学报，2015，32(6)：1011-1016.

[9] 谢义松，袁万福，刘晓岚，等. 血府逐瘀汤对大鼠深静脉血栓预防作用的实验研究[J]. 湖南中医杂志，2019，35(9)：137-139.

[10] YANG L, YU X F, ZHANG Y J, et al. Proteomic analysis of the effects of caffeine in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic white matter damage[J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(7): 1019-1032.

[11] 兴成娟，陈素贤，李伦，等. 结直肠癌中HMGA2表达的意义与微卫星不稳定性的关系[J]. 中国老年学杂志，2019，39(2)：285-289.

[12] ZHANG Y H, ZHANG Z, WEI R, et al. IL(interleukin)-6 contributes to deep vein thrombosis and is negatively regulated by miR-338-5p[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(2): 323-334.

[13] ZENG S, YI R K, TAN F, et al. *Lactobacillus plantarum* HFY05 attenuates carrageenan-induced thrombosis in mice by regulating NF-κB pathway-associated inflammatory responses[J]. Front Nutr, 2022, 9: 813899.

[14] 么秀洁，赵志梅，夏天. 炎症与血栓形成[J]. 血栓与止血学，2015，21(3)：190-192.

[15] HANTRAKOOL S, KUMFU S, CHATTIPAKORN S C, et al. Effects of particulate matter on inflammation and thrombosis: past evidence for future prevention[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(14): 8771.

[16] JIN Z X, GAO L, ZHANG L, et al. Antimicrobial activity of saponins produced by two novel endophytic fungi from *Panax notoginseng*[J]. Nat Prod Res, 2017, 31(22): 2700-2703.

[17] ZHANG Z Q, SONG J Y, JIA Y Q, et al. Buyanghuanwu decoction promotes angiogenesis after cerebral ischemia/reperfusion injury: mechanisms of brain tissue repair[J]. Neural Regen Res, 2016, 11(3): 435-440.

[18] ZHU M, TANG Y P, DUAN J A, et al. Roles of paeoniflorin and senkyunolide Ⅰ in SiWu decoction on antiplatelet and anticoagulation activities[J]. J Sep Sci, 2010, 33(21): 3335-3340.

[19] WU Z Y, LI H, TANG Y J. Effect of simvastatin on the SIRT2/NF-κB pathway in rats with acute pulmonary embolism[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 511-518.

[20] YUAN F, XU Z M, LU L Y, et al. SIRT2 inhibition exacerbates neuroinflammation and blood-brain barrier disruption in experimental traumatic brain injury by enhancing NF-κB p65 acetylation and activation[J]. J Neurochem, 2016, 136(3): 581-593.

（收稿日期：2022-12-12　修回日期：2023-05-19）

（编辑：张元媛）