

基于中性粒细胞胞外诱捕网探究补肾活血方对抗磷脂综合征的作用机制

徐 佳^{1,2}, 王 巧^{1,2}, 付丽霞^{1,2}, 陈 瑾^{1,2*}

1. 江西省妇幼保健院 中医科, 江西 南昌 337000

2. 江西省中西医结合女性生殖重点研究室, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 探究补肾活血方(BSHX)在抗磷脂综合征(APS)模型中的作用及其对中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的调控机制。**方法** 将小鼠随机分为5组:对照组、模型组、阿司匹林(阳性药, 0.585 mg·kg⁻¹)组和BSHX低、高剂量(5.8、11.60 g·kg⁻¹)组。除对照组外,采用β2糖蛋白I(β2GP-I)构建APS小鼠模型,连续ig给药15 d,每天2次;通过ELISA法测定血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6表达水平;采用全自动凝血测试仪检测血浆中活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)和凝血酶原时间(PT)。体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),60 μmol·L⁻¹ β2GP-I刺激制备APS模型,同时给予不同浓度BSHX孵育24 h;MTT法检测BSHX(40、80、120、160、200、240、280、320 μg·mL⁻¹)对细胞存活率的影响;荧光成像结合流式细胞术检测BSHX(80、120 μg·mL⁻¹)对活性氧(ROS)水平的影响;Transwell实验检测BSHX(120 μg·mL⁻¹)对细胞迁移能力的影响;免疫荧光及试剂盒法检测NETs的形成;Western blotting检测BSHX(120 μg·mL⁻¹)对炎症相关(IL-6、TNF-α)、细胞黏附相关[细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)]、凝血功能相关[组织因子(TF)、纤溶酶原激活抑制剂-1(PAI-1)]、NADPH氧化酶2(NOX2)、p38、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)蛋白表达水平;将HUVECs细胞分为对照组、模型组、BSHX(120 μg·mL⁻¹)组和MK-2206组(Akt抑制剂, 100 nmol·L⁻¹),Western blotting检测ERK、p47、JNK、p38及磷酸化蛋白表达。**结果** 与模型组比较,给予APS小鼠BSHX后,APTT、TT、PT均显著升高,TNF-α、IL-6表达水平被抑制($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),说明BSHX可缓解血液高凝状态、抗炎。与模型组比较,BSHX可显著改善APS模型HUVECs的细胞存活率,降低ROS水平和细胞迁移能力,抑制NETs的形成,抑制IL-6、TNF-α、ICAM-1、VCAM-1、TF、PAI-1、NOX2、p-JNK、p-ERK和p-p38蛋白表达($P<0.01$ 、 0.001);给予Akt通路抑制剂后p-ERK、p-p47、p-JNK、p-p38和NOX2蛋白表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。**结论** 补肾活血方可能通过调节Akt/ERK信号通路调控NETs的生成而发挥治疗APS作用。

关键词: 补肾活血方; 抗磷脂综合征; HUVECs; NETs; Akt/ERK 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)09-2483-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.09.010

Exploration of intervention effects of Bushen Huoxue Decoction on antiphospholipid syndrome based on neutrophil extracellular traps

XU Jia^{1,2}, WANG Qiao^{1,2}, FU Lixia^{1,2}, CHEN Jin^{1,2}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 337000, China

2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Female Reproduction in Jiangxi Province, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To explore the effect of Bushen Huoxue Decoction (BSHX) on antiphospholipid syndrome (APS) model and its regulatory mechanism on neutrophil extracellular traps (NETs). **Methods** Mice were randomly divided into five groups: control group, model group, aspirin (positive drug, 0.585 mg·kg⁻¹) group and BSHX low and high dose (5.8, 11.60 g·kg⁻¹) groups. Except for the control group, APS mouse models were established by β2 glycoprotein I (β2GP-I), and intragastric administration was given for 15

收稿日期: 2025-01-13

基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目(2023A0020); 江西省卫生健康委科技计划基金资助项目(202410072)

作者简介: 徐 佳(1994—), 女, 主治医师, 博士研究生, 主要从事中西医结合妇产科学的临床诊疗工作和相关机制研究。

E-mail: jiax1994@163.com

*通信作者: 陈 瑾, 博士, 副主任医师, 硕士生导师。E-mail: 314280835@qq.com

days, twice a day. The expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6 in serum were determined by ELISA. The activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and prothrombin time (PT) in plasma were detected by a fully automatic coagulation analyzer. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured *in vitro*, and APS models were prepared by stimulating with $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$. Different concentrations of BSHX were incubated for 24 hours. The effect of BSHX ($40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on cell survival rate was detected by MTT assay. The effect of BSHX ($80, 120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on reactive oxygen species (ROS) levels was detected by fluorescence imaging combined with flow cytometry. The effect of BSHX ($120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on cell migration ability was detected by Transwell assay. The formation of NETs was detected by immunofluorescence and kit method. The expression levels of inflammatory-related (IL-6, TNF- α), cell adhesion-related [intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)], coagulation function-related [tissue factor (TF), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)], NADPH oxidase 2 (NOX2), p38, extracellular regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) proteins were detected by Western blotting. HUVECs cells were divided into control group, model group, BSHX ($120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group and MK-2206 group (Akt inhibitor, $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), and the expression of ERK, p47, JNK, p38 and phosphorylated proteins was detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, after administration of BSHX to APS mice, APTT, TT and PT were significantly increased, and the expression levels of TNF- α and IL-6 were inhibited ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), indicating that BSHX can alleviate the hypercoagulable state of blood and anti-inflammation. Compared with the model group, BSHX could significantly improve the cell survival rate of HUVECs in APS models, reduce ROS levels and cell migration ability, inhibit the formation of NETs, and inhibit the expression of IL-6, TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, TF, PAI-1, NOX2, p-JNK, p-ERK and p-p38 proteins ($P < 0.01, 0.001$); after administration of Akt pathway inhibitor, the expression of p-ERK, p-p47, p-JNK, p-p38 and NOX2 proteins was significantly reduced ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** BSHX might exert therapeutic effects on APS by regulating the generation of NETs through the Akt/ERK signaling pathway.

Key words: Bushen Huoxue Decoction; antiphospholipid syndrome; HUVECs cell; NETs; Akt/ERK signaling pathway

抗磷脂综合征(APS)是一种自身免疫性疾病,临床常见表现为血栓形成^[1-2]、妊娠并发症和流产等^[3-4]。在患者妊娠期或产后初步表现为血管血栓形成或血栓性微血管病等产科并发症,甚至危及生命^[5-6]。临床常用预防与管理药物为阿司匹林(ASP)^[7-9]。APS的发病机制主要是抗磷脂抗体(APL)与 $\beta 2$ 糖蛋白 I ($\beta 2\text{GP-I}$)结合使得 $\beta 2\text{GP-I}$ 构象改变,增强其与内皮细胞、血小板和单核细胞等的结合。APL- $\beta 2\text{GP-I}$ 复合物与内皮细胞上的受体相互作用后激活内皮细胞,增加黏附分子和促炎细胞因子的表达,并增强白细胞黏附促使机体处于促血栓形成状态^[10-11]。APL 还可通过与血小板受体结合直接激活血小板,导致血小板聚集并释放促血栓形成介质,促进凝血级联反应和促炎因子白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等释放。这种复合物还会诱导中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的形成,NETs 可为血小板黏附和激活提供支架,从而促血栓形成,且含有组织因子(TF),进一步增强凝血^[12]。

NETs 是活化的中性粒细胞膜上突出的纤维网络,存在于多种疾病中,如感染、动脉粥样硬化和自身免疫性疾病等^[13-14]。研究表明,NETs 的形成过程(NETosis)与降解的失衡可能与自身免疫性疾病有关^[15];与健康人相比,APS 患者中性粒细胞显示

出活化表型,NETosis 增加且 NETs 清除受损。Yalavarthi 等^[16]发现,原发性 APS 患者的血浆和血清中髓过氧化物酶(MPO)-DNA 复合物浓度和游离 DNA 循环的 NETs 水平升高。经 APS 患者血浆刺激后,健康中性粒细胞也出现释放促凝血酶产生现象。Meng 等^[17]发现 APS 患者血栓中的瓜氨酸组蛋白 H3 (CitH3)相比对照组明显富集,进一步证明 APL 具有与中性粒细胞表面结合并触发 NETs 释放的能力,从而加速血栓形成^[18]。综上,MPO-DNA 复合物或 CitH3 和抗 NETs 自身抗体可作为 NETs 形成标志,NETs 可被视为 APS 期间免疫性血栓形成现象中的一个重要的生物标志物^[19]。

补肾活血方(BSHX)由寿胎丸与芎归汤配伍而成^[20-21]。该方有滋补肾气、活血行血之功,可改善子宫内环境,促进胚胎着床和生长,在中医临床中应用广泛^[22-23]。然而其干预 APS 的作用机制尚不明晰。因此,本研究拟通过体内外实验构建 APS 模型,探究 BSHX 对 APS 的作用机制,为 APS 的治疗提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 细胞株及动物

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)购自上海钰博生物科技有限公司(批号 YBC1263)。

C57BL/6 小鼠 36 只, 雌性, 体质量 (30±10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0011。饲养条件: 温度 (25±5) °C、12 h 明暗交替、相对湿度 (50±15) %。本动物实验经广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准 (批准号 TCMF1-2020023)。

1.2 药品与主要试剂

熟地黄、杜仲、桑寄生、山茱萸、茯苓、丹参、三七、白芍、炙甘草由江西省妇幼保健院提供, 经江西省妇幼保健院中医科主任陈晓勇教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 干燥块根, 杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser 的干燥带叶茎枝, 山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎, 五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎, 毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

ASP (批号 110130), 购自中国医药公司; 胎牛血清 (批号 10100147), 购自浙江天杭生物科技有限公司; DMEM/F12 培养基, 购自北京中生奥邦生物科技有限公司; MTT、青霉素/链霉素溶液, 购自上海生工生物科技有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 A610163), 购自普诺赛生命科技有限公司; 弗氏完全佐剂 (CFA, 批号 F5881) 和不完全弗氏佐剂 (IFA, 批号 F5506) 购自 Sigma-Aldrich; β 2GP-I (批号 PRO-552), 购自 ProSpec 公司; TNF- α (批号 60291-1-Ig) 抗体, 购自武汉三鹰生物技术有限公司; IL-6 抗体 (批号 22222), 购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 抗体 (批号 IPD-ANP8991), 购自艾普蒂生物公司; 血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 抗体 (批号 HM4006), 购自 Hycult 公司; TF、纤溶酶原激活抑制剂-1 (PAI-1)、NADPH 氧化酶 2 (NOX2)、p38、细胞外调节蛋白激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p47, 购自 Abcam 公司。

1.3 仪器

Orbitrap exploris 120 质谱仪、THM#3949 恒温培养箱、LYNX6000 高速离心机、Multiskan FC 酶

标仪 (赛默飞世尔科技有限公司); SF-8200C 全自动凝血测试仪 (北京赛科希德科技股份有限公司); UV-5800 紫外分光光度计 (上海元析仪器有限公司); BSA223S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); IX71 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); HG-9075A 高压蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械厂)。

2 方法

2.1 BSHX 制备

取熟地黄 9 g、杜仲 6 g、桑寄生 9 g、山茱萸 9 g、茯苓 9 g、丹参 6 g、三七 5 g、白芍 9 g、炙甘草 3 g, 用 500 mL 蒸馏水浸泡 30 min 后, 加热至小火微沸提取 30 min (2 次), 合并药液并用纱布滤过。浓缩、冻干, 得冻干粉, 于 -80 °C 冰箱保存备用。经紫外分光光度计法检测^[24], 冻干粉中总黄酮质量分数为 83.16 mg·g⁻¹, 总皂苷质量分数为 169.72 mg·g⁻¹。

2.2 动物模型构建及样本检测

将小鼠随机分为 5 组: 对照组、模型组、ASP (阳性药, 0.585 mg·kg⁻¹) 组和 BSHX 低、高剂量 (5.8、11.60 g·kg⁻¹) 组。除对照组外, 参考韩永梅等^[25]的造模方法, 采用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 β 2GP-I 抗原, 第 1 天给予 CFA 乳化, 配制 200 μ g·L⁻¹ β 2GP-I 抗原并 ip (初次免疫), 注射体积为 0.5 mL。第 8 天用 IFA 乳化, 配制 100 μ g·L⁻¹ 的 β 2GP-I 抗原并 ip (加强免疫), 注射体积为 1.0 mL, 分 2 点注射, 每侧 0.5 mL。随后 BSHX 组给予不同剂量 BSHX, 模型组和对照组给予 0.9% 氯化钠溶液, ASP 组给予用蒸馏水溶解的 ASP, 连续 ig 给药 15 d, 每天 2 次。初次免疫后第 9 天进行眼眶采血, 血液样本于 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 采用 ELISA 法检测血清中抗 β 2GP-I 抗体水平, 抗心磷脂抗体 (ACA) -IgG、ACA-IgM 和 ACA-IgA 水平, 进行模型评价。给药结束后进行眼眶采血, 部分血液样本于 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清, 通过 ELISA 法测定血清中 TNF- α 、IL-6 表达水平; 部分血液室温静置 30 min 后, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血浆, 采用全自动凝血测试仪检测血浆中活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶时间 (TT) 和凝血酶原时间 (PT)。

2.3 MTT 实验检测细胞存活率

2.3.1 β 2GP-I 造模浓度筛选 将对数生长期的 HUVECs 接种于 96 孔板 (约每孔 6×10^3 个), 加入培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素), 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 24 h。对照组吸出培养

液后, 更换为新鲜完全培养基, 不添加任何造模剂或药物; 模型组吸出培养液后加入含不同质量浓度 $\beta 2\text{GP-I}$ (10 、 20 、 40 、 60 、 80 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[26] 的完全培养基, 继续孵育 24 h , 每个条件设置 5 个复孔。孵育结束后吸出培养基, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ MTT ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 溶液, 孵育 4 h 后于 570 nm 处检测吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3.2 BSHX 对正常细胞存活率的影响 BSHX 给药前用完全培养基溶解, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜除菌。细胞接种及培养操作同“2.3.1”项, 对照组吸出培养液后, 更换为新鲜完全培养基, 不添加任何造模剂或药物; BSHX 组吸出培养液后加入含 40 、 80 、 120 、 160 、 200 、 240 、 280 、 $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSHX 的完全培养基, 继续孵育 24 h , 每个条件设置 5 个复孔。孵育结束后 MTT 法检测细胞存活率。

2.3.3 BSHX 对 $\beta 2\text{GP-I}$ 模型细胞存活率的影响 细胞接种及培养操作同“2.3.1”项, 对照组吸出培养液后, 更换为新鲜完全培养基, 不添加任何造模剂或药物; 模型组吸出培养液后加入 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$; BSHX 组吸出培养液后在加入 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$ 的同时, 分别加入不同质量浓度 BSHX (40 、 80 、 120 、 160 、 200 、 240 、 280 、 $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ASP 组吸出培养液后同时加入 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ASP。继续孵育 24 h , 每个条件设置 5 个复孔。孵育结束后 MTT 法检测细胞存活率。

2.4 荧光成像结合流式细胞术检测 ROS 水平

将 HUVECs 以每孔 3×10^5 个接种于 96 孔板中 24 h , 对照组吸出培养液后, 更换为新鲜完全培养基, 不添加任何造模剂或药物; 模型组吸出培养液后加入 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$; BSHX 组吸出培养液后在加入 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$ 的同时, 加入 80 、 $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSHX。继续孵育 24 h , 与 DCFH-DA 探针孵育 30 min , 收集细胞并用 PBS 洗涤, 用流式细胞仪检测 ROS。重复孵育探针操作, 用 Hoechst 33342 染色液标记活细胞, DCFH-DA 探针标记 ROS, 用显微镜观察 ROS 的分布情况。

2.5 细胞迁移能力检测

将 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液 (含 1×10^5 个细胞) 加入 Transwell 小室, 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 培养基培养。 24 h 后对照组吸出培养液, 更换为新鲜完全培养基, 不添加任何造模剂或药物; 模型组吸出培养液后加入 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$; BSHX 组吸出培养液后在加入

$60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\beta 2\text{GP-I}$ 的同时, 加入 $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSHX, ASP 组吸出培养液后同时加入 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ASP, 继续孵育 24 h 。取出小室, 固定细胞, 用结晶紫染色。PBS 清洗多余染料, 晾干。在显微镜下观察, 根据染色程度及分布情况评估细胞迁移能力。

2.6 Western blotting 检测

将 HUVECs 以每孔 5×10^6 个接种于 6 孔板中 24 h , 分组及给药同“2.5”项。收集 HUVECs 加入裂解液, 提取总蛋白测定蛋白浓度。制备蛋白样品, 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 将蛋白转印至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入抗 IL-6、TNF- α 、ICAM-1、VCAM-1、TF、PAI-1、NOX2、p38、ERK、JNK 一抗, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜后加入相应二抗, 室温孵育, 再次洗膜并用 ECL 曝光, 分析条带灰度值。

2.7 NETs 标志物检测

2.7.1 免疫荧光 细胞接种及给药同“2.6”项, 取 HUVECs (细胞数目 7×10^3 个) 接种于盖玻片上培养, 使用 4% 多聚甲醛固定 20 min , 加入免疫荧光封闭液封闭 1 h 后加入特异性一抗 ($1:200$), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。与相应二抗 ($1:500$) 孵育 1 h , 荧光显微镜下观察并记录图像。

2.7.2 上清液 MPO-DNA 水平检测 收集“2.6”项细胞培养上清, 在预先包被特异性抗体的 ELISA 板中孵育, 洗板后加入检测抗体, 再经孵育、洗板, 加入底物显色, 测定吸光度, 并计算 MPO-DNA 复合物的表达水平。

2.8 PI3K/Akt/ERK 通路抑制剂验证实验

细胞接种及培养方法同“2.6”项, 将 HUVECs 细胞分为对照组、模型组、BSHX ($120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组和 MK-2206 组 (Akt 抑制剂, $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 给药方法同“2.5”项。通过 Western blotting 检测 ERK、p47、JNK、p38 磷酸化蛋白及 NOX2 蛋白表达量。

2.9 数据统计分析

所有数据均采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用单因素 ANOVA 分析。

3 结果

3.1 BSHX 对 APS 小鼠模型的改善作用

3.1.1 APS 小鼠模型评价 经造模干预后, 与对照组比较, 模型组中抗 $\beta 2\text{GP-I}$ 抗体和 ACA-IgG、ACA-IgM、ACA-IgA 水平均显著提高 ($P < 0.01$), 说明小鼠体内产生了自身免疫反应, 模型构建成功。见表 1。

表 1 对照组与模型组血清中抗 B2GP-I 抗体水平与 ACA-IgG、ACA-IgM 和 ACA-IgA 水平比较 ($\bar{X} \pm s$, $n=6$)
Table 1 Comparison of anti-B2GP-I antibody levels and ACA-IgG, ACA-IgM, ACA-IgA levels in serum of control and model group ($\bar{X} \pm s$, $n=6$)

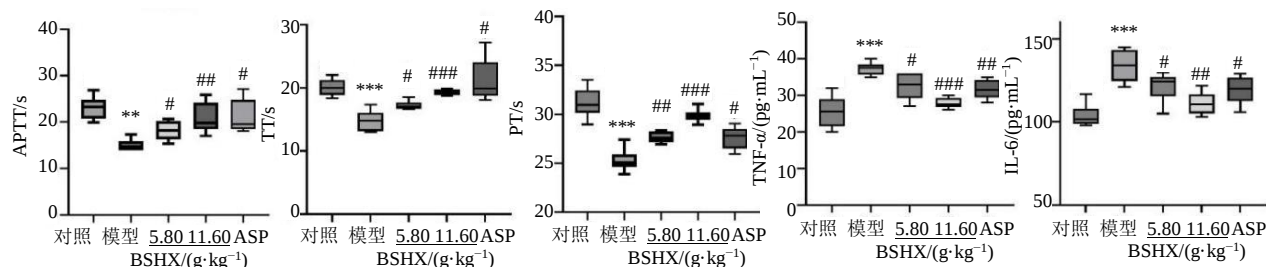
组别	抗 B2GP-I 抗体/(U·mL ⁻¹)	ACA-IgG/(RU·mL ⁻¹)	ACA-IgM/(RU·mL ⁻¹)	ACA-IgA/(RU·mL ⁻¹)
对照	19.263 ± 1.060	16.348 ± 1.691	7.857 ± 0.882	12.792 ± 1.967
模型	60.910 ± 1.130**	40.709 ± 1.727**	30.901 ± 1.865**	23.506 ± 1.436**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

3.1.2 BSHX 对 APS 小鼠模型的改善作用 与对照比较, 模型组 APTT、TT、PT 均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 给予 BSHX 后, APTT、TT、PT 均显著升高 ($P < 0.001$), 说明 BSHX 可缓解血

液高凝状态。与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6 表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 给予 BSHX 后, TNF- α 、IL-6 表达水平被抑制 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 说明 BSHX 具有抗炎作用。见图 1。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

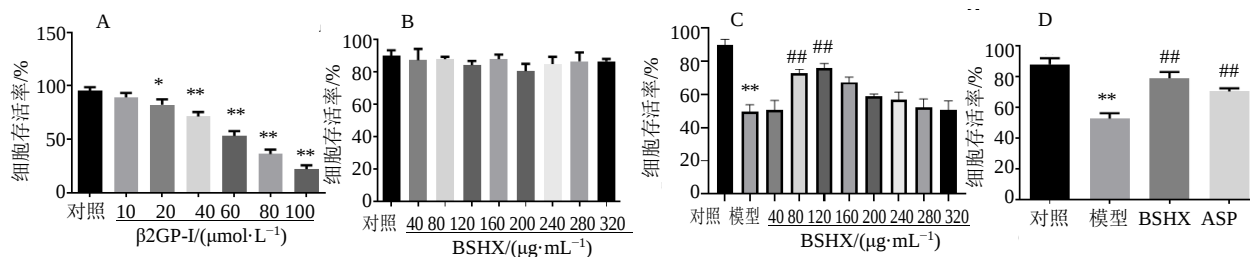
图 1 各组 APTT、TT、PT、TNF- α 、IL-6 测定结果 ($\bar{X} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Measurement results of APTT, TT, PT, TNF- α and IL-6 in each group ($\bar{X} \pm s$, $n=6$)

3.2 BSHX 对 HUVECs 模型的改善作用

3.2.1 细胞存活率结果 与对照组比较, 不同浓度 $\beta 2GP-I$ 干预 HUVECs 后, 细胞存活率均有不同程度下降, $20 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01); 当 HUVECs 暴露于 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\beta 2GP-I$ 时, 细胞存活率约下降到对照组的一半 (图 2-A), 因此, 选择 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 用于后续造模。与对

照组比较, BSHX ($40 \sim 320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对正常 HUVECs 存活率无明显影响 (图 2-B); 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 80 、 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BSHX 和 ASP 可显著增加 HUVECs 存活率 ($P < 0.01$) (图 2-C、D)。结果表明, BSHX 对模型 HUVECs 起到明显的保护作用。



A- $\beta 2GP-I$ 浓度筛选; B-BSHX 对 HUVECs 存活率的影响; C-不同浓度 BSHX 对模型 HUVECs 的存活率的影响; D-BSHX

($120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 ASP 对模型 HUVECs 的干预结果比较; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ 。

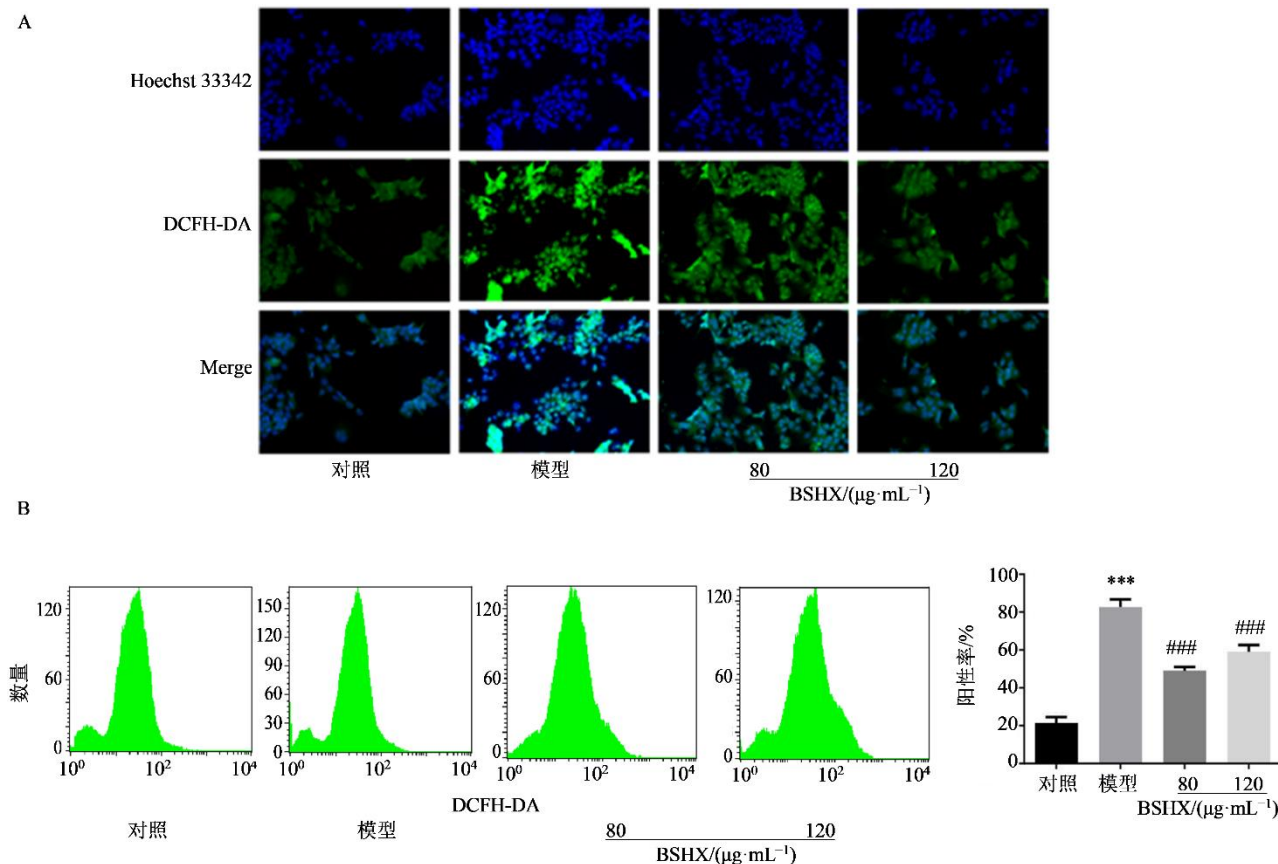
A-Dose screening of $\beta 2GP-I$; B-Effect of BSHX on survival rate of HUVECs; C-Effect of BSHX at different concentrations on survival rate of model HUVECs; D-Comparison of intervention results of BSHX ($120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and ASP on model HUVECs; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group.

图 2 细胞存活率测定结果 ($\bar{X} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Results of cell viability assay ($\bar{X} \pm s$, $n=3$)

3.2.2 荧光成像结合流式细胞术检测 ROS 水平
荧光成像结果表明,与对照组比较,模型组 ROS 释放显著增加;与模型组比较,80、120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSHX 均能够显著抑制 $\beta 2\text{GP-I}$ 诱导 HUVECs 的 ROS 释放。流式细胞术结果表明,与对照组比较,

模型组 ROS 释放显著增加 ($P<0.001$);与模型组比较,80、120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSHX 均能够显著抑制 $\beta 2\text{GP-I}$ 诱导 HUVECs 的 ROS 释放 ($P<0.001$)。结果见图 3。结合“3.2.1”项细胞存活率结果,后续研究中采用 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 BSHX 进行机制探究。



A-ROS 荧光成像图 ($\times 200$); B-ROS 荧光强度流式细胞术分析及结果可视化;与对照组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:### $P<0.001$ 。

A-ROS fluorescence imaging image ($\times 200$); B-ROS fluorescence intensity flow cytometry analysis and result visualization;*** $P<0.001$ vs control group;### $P<0.001$ vs model group.

图 3 不同组别 HUVECs 的 ROS 测定结果

Fig. 3 ROS measurement results of HUVECs in different groups

3.3 细胞功能检测结果

3.3.1 细胞迁移率检测 Transwell 结果显示(图 4、表 4),与对照组比较,模型组细胞大量穿过膜孔,迁移率显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,给药

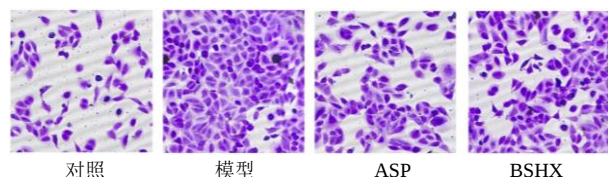


图 4 不同组 HUVECS 结晶紫染色代表图 ($\times 100$)

Fig. 4 Representative images of crystal violet staining in different groups of HUVECs ($\times 100$)

表 4 不同组 HUVECs 迁移能力 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Ermeability results of HUVECs in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	迁移率/%
对照	—	105.93 $\pm$ 3.16
模型	—	172.34 $\pm$ 5.15**
ASP	0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	118.42 $\pm$ 3.03##
BSHX	120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	117.62 $\pm$ 9.28##

与对照组比较: ** $P<0.01$;与模型组比较: ## $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group.

组穿过数量明显减少,迁移率显著降低 ($P<0.01$)。表明 BSHX 能够有效改善 APS 模型中的细胞屏障功能,抑制细胞迁移。

3.3.2 细胞炎症因子与细胞黏附因子表达水平检测 与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6 水平显著升高($P<0.001$); 与模型组相比, BSHX 组的 TNF- α 、IL-6 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), 表明 BSHX 能够通过调节炎症因子表达干预 APS。与对照组比较, 模型组中 ICAM-1、VCAM-1 表达水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001), 提示细胞黏附

因子异常活跃; 与模型组比较, BSHX 组 ICAM-1、VCAM-1 表达水平明显降低($P<0.05$ 、 0.01), 趋近于正常水平, 表明 BSHX 可能通过调节 ICAM-1 和 VCAM-1 表达, 对 APS 产生积极的干预作用。结果见图 5。

3.3.3 细胞凝血功能检测 TF 和 PAI-1 测定结果显示(图 6), 与对照组比较, 模型组中 TF 和 PAI-

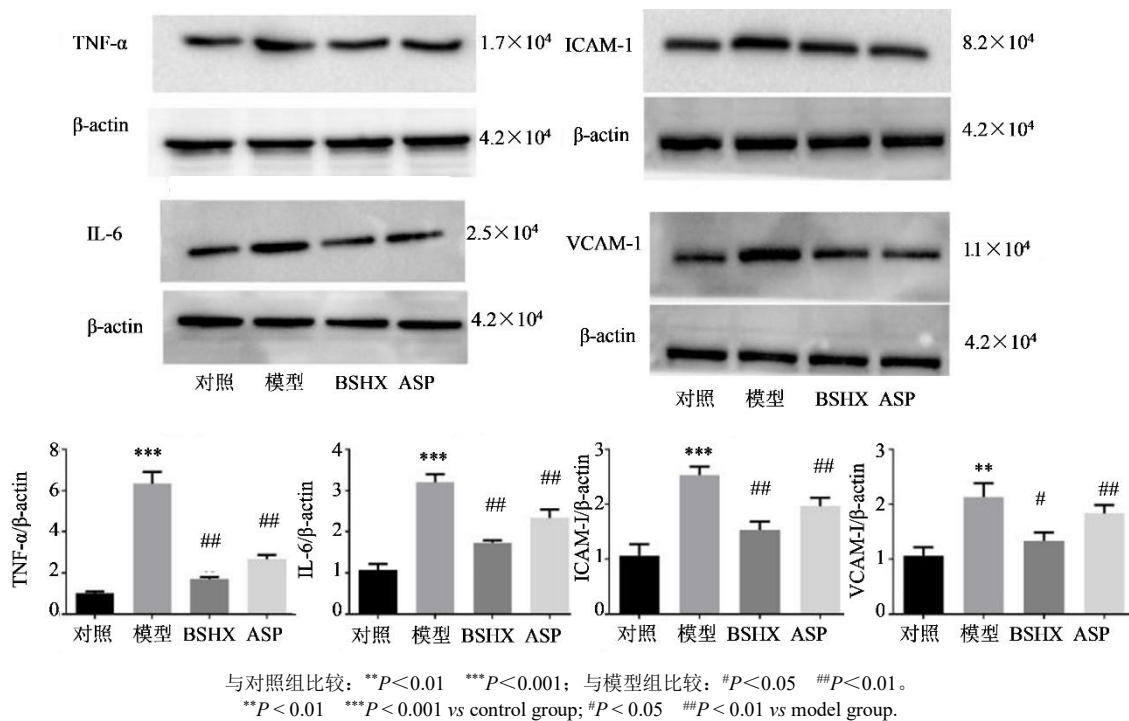


图 5 各组 HUVECs 的 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Protein expression level changes of TNF- α , IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 in various groups of HUVECS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

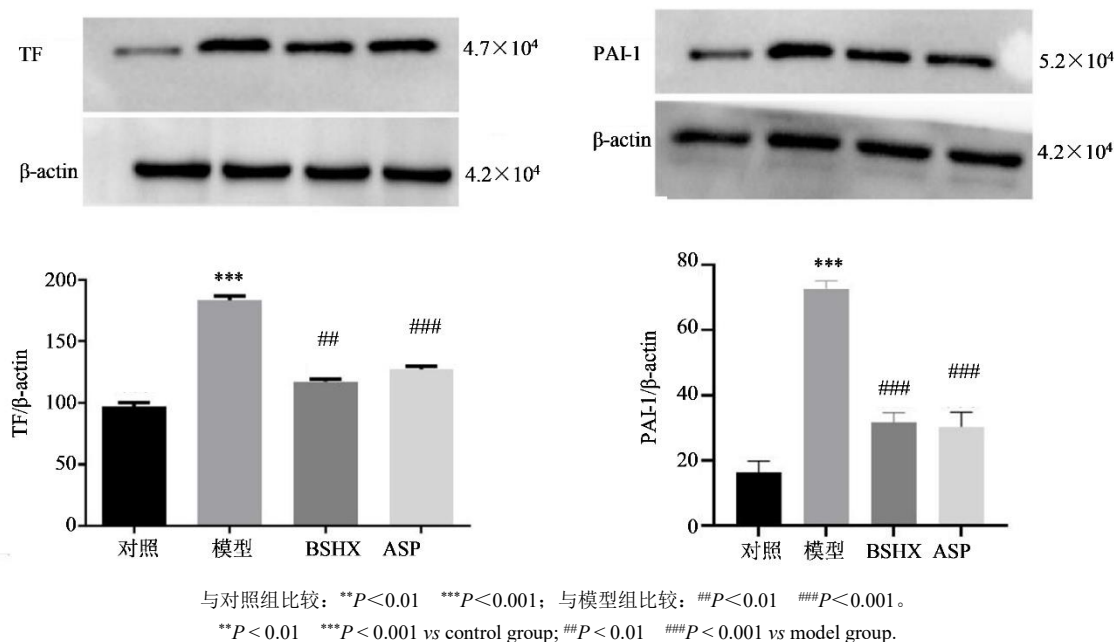
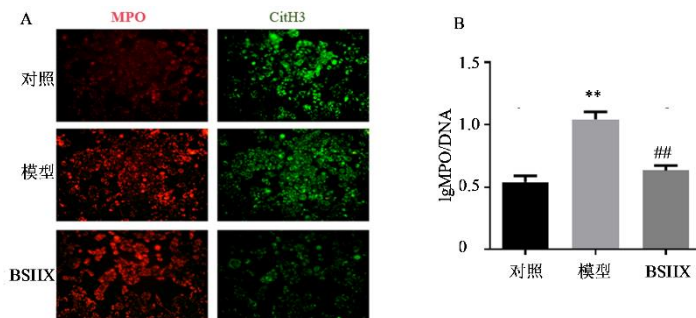


图 6 各组 HUVECS 细胞上清液中 TF 和 PAI-1 蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Relative expression levels of TF and PAI-1 proteins in supernatants of HUVECS cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1 呈高表达状态 ($P < 0.001$), 表明凝血与纤溶异常激活; 与模型组比较, 经 BSHX 干预后, TF 和 PAI-1 表达量显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001), 趋近于对照组水平; 这表明 BSHX 能够调控 TF 和 PAI-1 表达, 改善 APS 中凝血纤溶失衡状态, 进而发挥其干预作用。

3.3.4 NETs 标志物检测 免疫染色图像显示 (图



A-MPO-DNA (红色) 和 CitH3 (绿色) 的代表性免疫染色 ($\times 200$); B-MPO-DNA 复合物浓度; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ 。

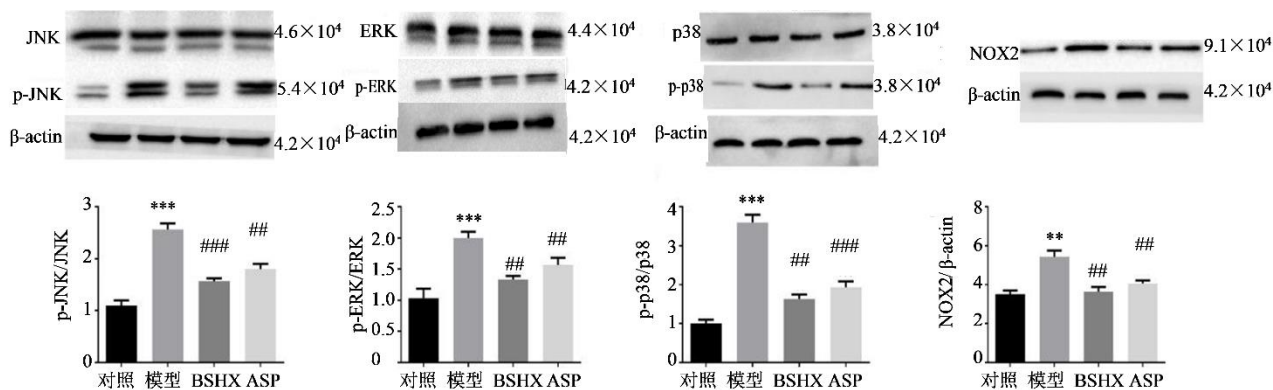
A-representative immunostaining images of MPO-DNA (red) and CitH3 (green, $\times 200$); B-concentration of MPO-DNA complexes; ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group.

图 7 NETs 标志物检测

Fig. 7 NETs marker detection

3.3.5 ERK/JNK 信号通路检测 如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组中 NOX2 蛋白表达水平显著升高, JNK、ERK、p38 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明相关信号通路被高度激活; 与模型组

比较, BSHX 干预后各蛋白表达显著回调 ($P < 0.01$ 、 0.001)。说明 BSHX 可能通过抑制 JNK、ERK、p38 蛋白磷酸化, 从而调控 NETs 相关信号通路。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 8 JNK、ERK、p38、NOX2 蛋白磷酸化水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Protein phosphorylation levels of JNK, ERK, p38, and NOX2 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.3.6 通路抑制剂验证实验 如图 9 所示, 与对照组相比, 模型组 p-ERK、p-p47、p-JNK、p-p38 及 NOX2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, BSHX 组与抑制剂组 p-ERK、p-p47、p-JNK、

p-p38 及 NOX2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

4 讨论

中药物物质基础决定其药效, BSHX 主要含有黄

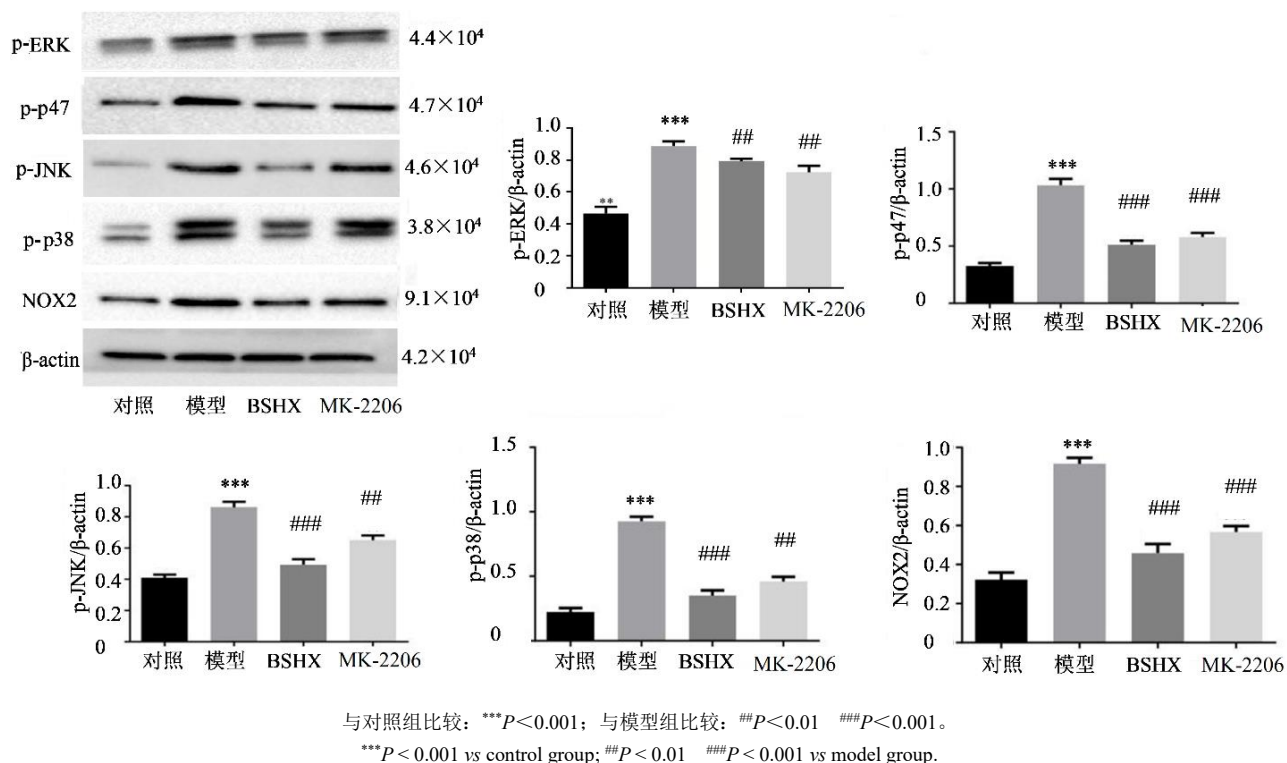


图 9 不同组 p-ERK、p-p47、p-JNK、p-p38 和 NOX2 蛋白磷酸化水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Protein phosphorylation levels of p-ERK, p-p47, p-JNK, p-p38 and NOX2 proteins in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

酮类及皂苷类, 已有研究表明, 人参皂苷及萜类成分在血栓形成预防与治疗及调节炎症因子等方面发挥关键作用^[27-28]。中药复方的优势是基于中医配伍原则实现多种有效成分协同作用, 实现更好的治疗效果。本研究结合体内外实验证明 BSHX 可通过调控 PI3K/Akt/ERK 通路调节 NETs 形成从而改善 APS。但并未阐明 BSHX 中活性成分在 APS 中的作用, 在后续的研究中将进一步探讨确认。

本研究主要通过体内外实验验证得出 BSHX 在 APS 模型中具有多靶点的干预作用。首先, BSHX 可下调 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达, 可能是通过调节免疫细胞功能实现的^[29]。还可下调 ICAM-1、VCAM-1 等黏附分子的表达保护血管内皮细胞, 减少白细胞与内皮细胞黏附, 进而抑制血栓形成的起始环节^[30]。此外, BSHX 可调节 TF 和 PAI-1 的表达, 使凝血与纤溶重新趋于平衡, 防止血液过度凝固或出血倾向。在 NETs 形成调控方面, BSHX 通过抑制 JNK、ERK、p38 等通路的过度激活, 减少 CitH3 和 MPO-DNA 的表达, 从而抑制 NETs 形成。这些信号通路可能在 NETs 的形成过程中起着关键的启动和调节作用, 而 BSHX 干预阻断了这一异常激活过程。同时, 细胞迁移能力的改善也进一步证

明了 BSHX 对血管内皮细胞功能的综合保护作用, 可能通过调节多种细胞因子和信号通路, 维持内皮细胞的紧密连接, 降低血管通透性。

已有研究报道 APS 与炎症反应、凝血异常以及 NETs 形成等密切相关^[31-32]。本研究基于 APS 模型进一步深入探讨了 BSHX 的作用机制, 不仅证实了其在调节炎症因子、凝血纤溶因子方面的作用, 还首次系统地研究了其对 NETs 相关指标及信号通路的调控作用, 丰富了研究者对 BSHX 干预 APS 的认识。与传统化学药治疗 APS 侧重于抗凝、免疫抑制等单一靶点不同, BSHX 体现了中医药多成分、多靶点的优势, 为 APS 的综合治疗提供了新思路^[33-34]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kolitz T, Shiber S, Sharabi I, et al. Cardiac manifestations of antiphospholipid syndrome with focus on its primary form [J]. Front Immunol, 2019, 10: 941.
- [2] Wahl D, Pengo V. Viewpoint: Provoked thrombosis in antiphospholipid syndrome [J]. Rheumatology, 2024, 63(SI): SI37-SI45.
- [3] Manning J E, Arachchillage D J. Dilemmas in the diagnosis and management of antiphospholipid syndrome

- [J]. *J Thromb Haemost*, 2024, 22(8): 2156-2170.
- [4] 史昱, 赵久良, 李梦涛, 等. 血栓性抗磷脂综合征相关血小板活性 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2020, 14(4): 392-396.
Shi Y, Zhao J L, Li M T, et al. Platelet activation in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome [J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2020, 14(4): 392-396.
- [5] Ware Branch D, Lim M Y. How I diagnose and treat antiphospholipid syndrome in pregnancy [J]. *Blood*, 2024, 143(9): 757-768.
- [6] Celia A I, Galli M, Mancuso S, et al. Antiphospholipid syndrome: Insights into molecular mechanisms and clinical manifestations [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(14): 4191.
- [7] Petri M. Antiphospholipid syndrome [J]. *Transl Res*, 2020, 225: 70-81.
- [8] Tohidi-Esfahani I, Mittal P, Isenberg D, et al. Platelets and thrombotic antiphospholipid syndrome [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(3): 741.
- [9] Paredes-Ruiz D, Martin-Iglesias D, Ruiz-Irastorza G. Thrombotic antiphospholipid syndrome: From guidelines to clinical management [J]. *Med Clin (Barc)*, 2024, 163(Suppl 1): S22-S30.
- [10] Arreola-Diaz R, Majluf-Cruz A, Sanchez-Torres L E, et al. The pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: A perspective from the blood coagulation system [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2022, 28: 10760296221088576.
- [11] Wu T, Huang W, Qi J P, et al. Research trends and frontiers on antiphospholipid syndrome: A 10-year bibliometric analysis (2012-2021) [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1035229.
- [12] Rand J H. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: A thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome [J]. *J Autoimmun*, 2000, 15(2): 107-111.
- [13] 王昭, 张军平, 杨颖溪. 中医药靶向中性粒细胞胞外捕获网干预疾病的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(2): 325-333.
Wang Z, Zhang J P, Yang Y X. Traditional Chinese medicines target neutrophil extracellular traps to treat diseases: A review [J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(2): 325-333.
- [14] Herre M, Cedervall J, Mackman N, et al. Neutrophil extracellular traps in the pathology of cancer and other inflammatory diseases [J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(1): 277-312.
- [15] Lee K H, Kronbichler A, Park D D, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(11): 1160-1173.
- [16] Yalavarthi S, Gould T J, Rao A N, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: A newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(11): 2990-3003.
- [17] Meng H, Yalavarthi S, Kanthi Y, et al. In vivo role of neutrophil extracellular traps in antiphospholipid antibody-mediated venous thrombosis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(3): 655-667.
- [18] Grayson P C, Kaplan M J. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(2): 253-264.
- [19] Zuo Y, Yalavarthi S, Gockman K, et al. Anti-neutrophil extracellular trap antibodies and impaired neutrophil extracellular trap degradation in antiphospholipid syndrome [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(12): 2130-2135.
- [20] 陆丽丹, 蔡奚梅, 张丽萍, 等. 补肾活血方联合常规西药治疗肾虚夹瘀型不明原因复发性流产临床效果 [J]. *中国医药*, 2023, 18(1): 107-111.
Lu L D, Cai X M, Zhang L P, et al. Effect of Bushenhuoxue recipe combined with conventional western medicine on the treatment of unexplained recurrent abortion with kidney deficiency and blood stasis syndrome [J]. *China Med*, 2023, 18(1): 107-111.
- [21] 韩永梅, 卫爱武. 补肾活血方对肾虚血瘀型复发性流产小鼠胚胎植入及子宫免疫微环境的影响 [J]. *中成药*, 2022, 44(3): 937-942.
Han Y M, Wei A W. Effect of Bushen Huoxue recipe on embryo implantation and uterine immune microenvironment in mice with recurrent abortion of kidney deficiency and blood stasis [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(3): 937-942.
- [22] 蒋晓梅, 李贺月, 益敏辉, 等. 基于网络药理学及动物实验探讨补肾活血方治疗多囊卵巢综合征的作用机制 [J]. *中成药*, 2024, 46(7): 2415-2422.
Jiang X M, Li H Y, Yi M H, et al. Based on network pharmacology and animal experiments, this paper discusses the mechanism of Bushen Huoxue recipe in treating polycystic ovary syndrome [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(7): 2415-2422.
- [23] 肖惠冬子, 卫爱武, 何东杰, 等. 补肾活血方在子宫动脉血流异常致复发性流产患者中的疗效研究 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(6): 1405-1407.
Xiao H D Z, Wei A W, He D J, et al. Study on the

- therapeutic effect of Bushen Huoxue recipe in patients with recurrent abortion caused by abnormal uterine artery blood flow [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(6): 1405-1407.
- [24] 孙云波, 张创峰. 连花清瘟胶囊中总黄酮、总皂苷和总多糖含量测定方法研究 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(15): 115-117, 122.
- Sun Y B, Zhang C F. Study on the determination method fortotal flavonoids, saponins, polysaccharides of Lianhua Qingwen Capsules [J]. China Med Her, 2023, 20(15): 115-117, 122.
- [25] 韩永梅, 刘蔚霞, 肖惠冬子, 等. 补肾活血方对抗磷脂综合征小鼠母胎界面 VEGF、HIF-1 α 、TGF- β 、sflt-1 蛋白表达影响研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(4): 475-479, 485.
- Han Y M, Liu W X, Xiao H, et al. Study on effect of Bushenhuoxue recipe on protein expression of VEGF/HIF-1 α /TGF- β /sflt-1 for fetomaternal interface of APS mice [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(4): 475-479, 485.
- [26] 李金霞, 付依敏, 许英姿, 等. 温心方含药血清对人脐静脉内皮细胞外泌体及人主动脉血管平滑肌细胞表型转化的影响 [J]. 中医杂志, 2023, 64(16): 1691-1699.
- Li J X, Fu Y M, Xu Y Z, et al. Effect of Wenxin formula(温心方) drug-containing serum on exosomes of human umbilical vein endothelial cells and phenotypic transformation of human aortic vascular smooth muscle cells [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(16): 1691-1699.
- [27] Xue Q Q, He N N, Wang Z B, et al. Functional roles and mechanisms of ginsenosides from *Panax ginseng* in atherosclerosis [J]. J Ginseng Res, 2021, 45(1): 22-31.
- [28] Lu Z Q, Ye Y X, Liu Y C, et al. Aqueous extract of *Paeoniae Radix Rubra* prevents deep vein thrombosis by ameliorating inflammation through inhibiting GSK3 β activity [J]. Phytomed, 2021, 92: 153767.
- [29] Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease [J]. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2012, 1(1): 60-74.
- [30] Velásquez M, Rojas M, Abrahams V M, et al. Mechanisms of endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome: Association with clinical manifestations [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1840.
- [31] Hubben A, McCrae K R. Emerging therapies in antiphospholipid syndrome [J]. Transfus Med Rev, 2022, 36(4): 195-203.
- [32] Chaturvedi S, Braunstein E M, Brodsky R A. Antiphospholipid syndrome: Complement activation, complement gene mutations, and therapeutic implications [J]. J Thromb Haemost, 2021, 19(3): 607-616.
- [33] Mendes G N N, Morais A B C G, Gioia L C, et al. Neurovascular complications of antiphospholipid syndrome: A narrative review [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2024, 82(12): 1-7.
- [34] Arachchillage D R J, Pericleous C. Evolution of antiphospholipid syndrome [J]. Semin Thromb Hemost, 2023, 49(3): 295-304.

[责任编辑 兰新新]