

# 乌药挥发油对寒凝气滞血瘀证大鼠血液流变学及 NO-sGC-cGMP 信号通路的影响

欧阳林旗<sup>1,2</sup>, 蒋司晨<sup>1</sup>, 陈镇<sup>1</sup>, 王胜玫<sup>1,2</sup>, 何阳<sup>1</sup>, 邓桂明<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院 药学部, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

**摘要:** **目的** 探讨乌药挥发油对寒凝气滞血瘀证大鼠中医证候积分、血液流变学及一氧化氮 (nitric oxide, NO)-可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylate cyclase, sGC)-环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 信号通路的影响。**方法** 将 48 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组、模型组及乌药挥发油高、中、低剂量 (3.76、1.88、0.94 g/kg) 组和复方丹参片 (1.20 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余组大鼠采用 sc 肾上腺素加冰水浴双因素复合刺激 14 d 制备寒凝气滞血瘀证模型。从造模第 15 天开始, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积 2% 聚山梨酯-80 溶液, 1 次/d, 连续 7 d; 在给药过程中间隔 2 d 给予 1 次造模条件, 维持大鼠血瘀证表现。末次给药后的第 2 天对各组大鼠进行中医证候评分, 测定各组大鼠血液流变学及血浆 NO、内皮素 (endothelin, ET) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察胸主动脉组织形态; 采用 ELISA 法检测胸主动脉组织中环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 和 cGMP 水平; 采用 Western blotting 法检测胸主动脉组织磷酸二酯酶 5A (phosphodiesterase 5A, PDE5A) 和 sGC 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠中医证候积分、血液流变学 (全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数、纤维蛋白原)、血浆 ET 含量、胸主动脉 cAMP、cGMP 含量、PDE5A 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 血浆 NO 含量和胸主动脉 sGC 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 乌药挥发油组大鼠血液流变学指标和胸主动脉 PDE5A 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 血浆 NO 含量、胸主动脉 cAMP 和 cGMP 水平、sGC 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。大鼠胸主动脉 HE 染色显示, 模型组大鼠血管内膜损伤明显、血管内皮细胞不完整、血管平滑肌细胞呈螺旋收缩样改变; 乌药挥发油组大鼠血管内膜和血管内皮细胞损伤、血管平滑肌收缩显著改善。**结论** 乌药挥发油能有效改善寒凝气滞血瘀证大鼠中医证候评分、血液流变学, 发挥血管内皮细胞保护、改善血液高凝状态的作用, 其机制与调控 NO-sGC-cGMP 信号通路有关。

**关键词:** 乌药; 挥发油; 气滞血瘀证; 血液流变学; 磷酸二酯酶 5A; 一氧化氮-可溶性鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷信号通路  
**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)15-4730-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.016

## Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on hemorheology and NO-sGC-cGMP signaling pathway in rats with *qi* stagnation and blood stasis syndrome

OUYANG Lin-qi<sup>1,2</sup>, JIANG Si-chen<sup>1</sup>, CHEN Zhen<sup>1</sup>, WANG Sheng-mei<sup>1,2</sup>, HE Yang<sup>1</sup>, DENG Gui-ming<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To observe the effect of volatile oil from Wuyao (*Linderae Radix*) on hemorheology and nitric oxide (NO)-soluble guanylate cyclase (sGC)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in rats with cold *qi* stagnation and blood stasis syndrome (QSBSS). **Methods** Forty-eight SD male rats were randomly divided into control group, model group, volatile oil from *Linderae Radix* high-, medium-, low-dose (3.76, 1.88, 0.94 g/kg) groups and Fufangdanshen tablets (1.2 g/g) group, with eight rats in each group. Except control group, rats of QSBSS model were prepared by two-factor stimulation of sc adrenaline plus ice water bath for 14 d. Starting from the 15th day of modeling, each administration group was ig corresponding drug, control group and model

收稿日期: 2022-04-04

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2018JJ6040, 2020JJ5434); 湖南省中医药科研计划项目 (201986, 2021016); 湖南省教育厅重点项目 (19A372); 湖南中医药大学药学院一流学科开放基金资助项目 (2018YX05)

作者简介: 欧阳林旗 (1985—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事临床中药学研究。Tel: (0731)85369137 E-mail: oylq03@163.com

\*通信作者: 邓桂明, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药理与临床中药学研究。E-mail: guimingd1004@163.com

group were ig 2% tween-80 solution, once a day for 7 d. During the administration process, the modeling condition was given once at an interval of 2 d to maintain the manifestation of blood stasis in rats. On the 2nd day after the last administration, rats in each group were scored for TCM syndromes, and hemorheology, plasma NO and endothelin (ET) levels of rats in each group were determined; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphology of thoracic aorta; Levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cGMP in thoracic aortic tissues were determined by ELISA; Phosphodiesterase 5A (PDE5A) and sGC protein expressions in thoracic aortic tissues were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, TCM syndrome score, blood rheology (whole blood viscosity, plasma viscosity, erythrocyte aggregation index, fibrinogen), plasma ET level, PDE5A protein expression in thoracic aorta were significantly higher in model group ( $P < 0.01$ ), plasma NO levels, cAMP and cGMP contents, sGC protein expression in thoracic aorta were significantly lower ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, rats in volatile oil from *Linderae Radix* group showed lower TCM syndrome score, blood rheological indexes, plasma ET levels, PDE5A protein expression in thoracic aorta ( $P < 0.05, 0.01$ ), while significantly higher plasma NO levels, cAMP and cGMP contents, sGC protein expression in thoracic aorta ( $P < 0.05, 0.01$ ). HE staining of rat thoracic aorta showed that vascular intima of rats in model group was significantly damaged, vascular endothelial cells were incomplete, and vascular smooth muscle cells showed spiral contraction-like changes. The damage of vascular intima and vascular endothelial cells, contraction of vascular smooth muscle were significantly improved in volatile oil from *Linderae Radix* group. **Conclusion** Volatile oil from *Linderae Radix* can effectively improve the TCM syndrome score and blood rheology in rats with QSBSS, and exert the effect of vascular endothelial cell protection and improving blood hypercoagulation, and its mechanism is related to the regulation of NO-sGC-cGMP signaling pathway.

**Key words:** *Linderae Radix*; volatile oil; qi stagnation and blood stasis syndrome; hemorheology; phosphodiesterase 5A; NO-sGC-cGMP signaling pathway

血瘀证是中医临床常见证候之一，是体内血行迟滞或血溢脉外而停蓄体内，以疼痛、肿块、出血、舌紫、脉涩等为主要表现的证候<sup>[1]</sup>。内伤、外感双重刺激因素中，寒凝、气滞是形成血瘀证的主要原因，行气活血是血瘀证的重要治则，临床遣方用药常以活血化瘀为主，配伍理气止痛、温中散寒中药<sup>[2]</sup>。血瘀证的生物学基础研究主要着眼于血流动力学、血液流变学、血管内皮细胞及神经内分泌功能、血脂及炎症标志物、细胞化学成分含量（酶、蛋白、小分子）等方面的改变，为阐释中药防治血瘀证的科学内涵提供了支撑<sup>[3-4]</sup>。

乌药为樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根，为临床常用理气药，有行气止痛、温肾散寒的功效，配伍用于血瘀证的中医治疗。乌药主要化学成分有挥发油、异喹啉类生物碱及呋喃倍半萜、黄酮类等<sup>[5-6]</sup>，具有抗炎、镇痛、抗风湿、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、调脂护肝、治疗胃肠疾病等多种药理活性<sup>[7-10]</sup>。研究表明，乌药可影响凝血-纤溶系统中凝血酶与纤维蛋白原结合，延长体外凝血时间<sup>[11]</sup>；降低血浆去甲肾上腺素水平，抑制血管平滑肌细胞收缩，降低大鼠血压<sup>[12]</sup>；乌药叶中的槲皮苷具有良好的抗氧化和活血祛瘀作用，可显著降低急性血瘀大鼠全血黏度<sup>[13]</sup>；乌药中的 2 个倍半萜内酯衍生物显示出中等抗凝活性<sup>[14]</sup>。本课题组前期采用网络药理学方法探讨乌药

药理作用，发现异瑟模环烯醇、 $\beta$ -律草烯、母菊萹等挥发油成分可影响凝血系统，调节钙离子平衡，并改善心血管功能<sup>[7]</sup>。本研究通过观察乌药挥发油对寒凝气滞血瘀证模型大鼠中医证候积分、血液流变学及一氧化氮（nitric oxide, NO）-可溶性鸟苷酸环化酶（soluble guanylate cyclase, sGC）-环磷酸鸟苷（cyclic guanosine monophosphate, cGMP）信号通路的影响，探讨乌药防治血瘀证的作用机制，为临床配伍用药及治疗心血管疾病的开发应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180~220 g，6~8 周龄，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物许可证号 SCXK（湘）2016-0002。动物于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心适应性饲养 1 周，温度 25 ℃，湿度 45%~65%，自由进食饮水。动物实验经湖南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 ZYFY20181027）。

### 1.2 药材

乌药（产地湖南）由湖南中医药大学第一附属医院药学部提供，经湖南中医药大学第一附属医院药学部张志国教授鉴定为樟科植物乌药 *L. aggregata* (Sims) Kosterm. 干燥块根，符合《中国药

典》2020年版规定。

### 1.3 药品与试剂

复方丹参片(批号 20180303, 0.32 g/片)购自湖南时代阳光药业有限公司;盐酸肾上腺素注射液(批号 1801209)购自远大医药有限公司;聚山梨酯-80(批号 T8360)购自北京索莱宝科技有限公司;环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ELISA 试剂盒(批号 CE20180728013)、cGMP ELISA 试剂盒(批号 CG20180725015)、内皮素(endothelin, ET) ELISA 试剂盒(批号 ET20180728002)购自上海晶天生物有限公司;NO 检测试剂盒(批号 S0021S)购自上海碧云天生物有限公司;磷酸二酯酶 5A(phosphodiesterase 5A, PDE5A)抗体(批号 22624-1-AP)、sGC 抗体(批号 19011-1-AP)购自武汉三鹰有限公司; $\beta$ -actin 抗体(批号 AH03275734)、HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体(批号 bs-0293G-HRP)购自北京博奥森生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 SH255495)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;PIPA 裂解液(批号 20238)购自北京康为世纪生物科技有限公司;PVDF 膜(批号 AS1023)、ECL 化学发光试剂盒(批号 AS1059-2)购自武汉阿斯本生物技术有限公司。

### 1.4 仪器

Rotary Microtome 石蜡切片机(美国 Reichert 公司);SA9000 型全自动血液流变测试仪(北京赛科希德公司);elx800 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);BA410 型生物显微镜(厦门 Motic 公司);1645050 型水平电泳仪、1704486 型电泳槽、Trans-Blot Turbo 转膜仪、Gel Doc EZ 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);L-90K 型高速离心机(美国 Beckman 公司);5415R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);HZ-9211K 型恒温摇床(江苏易晨仪器公司)。

## 2 方法

### 2.1 乌药挥发油的制备

本课题组前期采用气相色谱-质谱(GC-MS)法对湖南产乌药挥发油化学成分进行定性定量分析,共鉴定了 68 个挥发性成分,主要为单萜类物质,其具体含量见文献报道<sup>[5]</sup>。称取乌药 200 g,粉碎后,加入 12 倍量水,浸泡 12 h,采用水蒸气蒸馏法提取,药材经 8 h 加热直至挥发油不再增加。挥发油用 2%聚山梨酯-80 助溶,配制成质量浓度为 0.5 g/mL 的溶液(以生药量计)。

### 2.2 造模、分组与给药

SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机取 40 只大鼠采用双因素复合刺激制备寒凝气滞血瘀证大鼠模型:大鼠 sc 0.1%肾上腺素(0.8 mL/kg),2 次/d,2 次注射间隔 4 h;第 1 次注射肾上腺素后 2 h,将大鼠放置 0~4 °C 的冰水中游泳 4~8 min,连续 14 d。取 8 只大鼠作为对照组,将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组及乌药挥发油(3.76、1.88、0.94 g/kg)组和复方丹参片(1.2 g/kg)组,每组 8 只。从造模第 15 天开始,各给药组大鼠 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积的 2%聚山梨酯-80 溶液,1 次/d,连续 7 d;在给药过程中间隔 2 d 给予 1 次造模条件,维持大鼠气滞血瘀证表现。

### 2.3 乌药挥发油对模型大鼠证候评分的影响

造模前后及实验结束后,参考文献中血瘀证症状和体征量化积分表<sup>[6]</sup>,由同一观察者在固定角度及光线下观察各组动物的症状及体征表现,记录各组动物的症状及体征并予以评分。

### 2.4 乌药挥发油对模型大鼠血液流变学及血浆 NO、ET 表达的影响

末次给药 24 h 后,大鼠 ip 水合氯醛(3 mL/kg)深度麻醉,腹主动脉取血 5 mL,置肝素化抗凝试管进行全血黏度(低切变率 1 s<sup>-1</sup>、中切变率 30 s<sup>-1</sup>、高切变率 200 s<sup>-1</sup>)和红细胞聚集指数测定;测定完成后全血经 25 °C、3000 r/min 离心 10 min,取血浆测定血浆黏度及纤维蛋白原,所有样本在 4 h 内检测完毕。另取 1 mL 全血于枸橼酸钠真空采血管中静置 1 h 后,4 °C、3000 r/min 离心 15 min,分离上层血浆,按试剂盒说明书分别采用硝酸还原酶法和 ELISA 法分别检测血浆中 NO、ET 水平。

### 2.5 乌药挥发油对模型大鼠胸主动脉组织形态的影响

取大鼠胸主动脉 3~5 mm 组织,于 4%多聚甲醛中固定 48 h,经脱水、透明、包埋、切片、贴片、烤片后,进行脱蜡、苏木素-伊红(HE)染色,置于显微镜下观察各组大鼠胸主动脉的细胞形态。

### 2.6 乌药挥发油对模型大鼠胸主动脉 cAMP、cGMP 含量的影响

称取大鼠胸主动脉组织 50 mg,加入 2 mL 醋酸缓冲液(pH 4.75),冰浴下组织匀浆,加入 2 mL 无水乙醇,混合均匀,静置 5 min,3500 r/min 离心 15 min,取上清液;加入 2 mL 75%乙醇洗沉淀,匀浆分散后,3500 r/min 离心 15 min,合并 2 次离心后

的上清液,置于烘箱中 60 °C 烘干,留取残渣,4 °C 保存,测量时用 0.5 mL 醋酸缓冲液溶解,按 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠胸主动脉组织中 cAMP、cGMP 含量。

### 2.7 乌药挥发油对模型大鼠胸主动脉 PDE5A 和 sGC 蛋白表达的影响

称取大鼠胸主动脉组织,用液氮迅速充分研磨,加入预冷的 RIPA 裂解液,静置 1 h,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,100 °C 加热变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂牛奶,室温封闭 60 min; 分别加入 PDE5A 抗体 (1:1000)、sGC 抗体 (1:1000) 和  $\beta$ -actin 抗体 (1:5000),4 °C 孵育过夜;加入 HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体 (1:1000),室温孵育 60 min;加入 ECL 化学发光液显影,采用 Image J 软件分析条带。

### 2.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。先将各组数据进行正态性、方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者用 LSD 检验;方差不齐者用 Dunnett's T3 检验。

## 3 结果

### 3.1 乌药挥发油对模型大鼠证候评分的影响

大鼠适应性喂养时,各组大鼠毛发光泽,精神状态良好,活泼好动,饮食及二便均正常,舌质红润,耳廓红白相间,爪甲光泽有力,尾部淡红。实验结束后,与对照组比较,模型组大鼠均出现蜷缩不动、弓背竖毛的症状,进食量明显减少、体质量增长缓慢,毛色枯槁,垫料需每天更换,大便增多、质地软、不成形,并出现明显舌质暗紫,口唇、耳廓及尾部青紫、暗紫及暗红等体征,如表 1 所示,证候积分显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各

表 1 乌药挥发油对气滞血瘀证大鼠证候量化积分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on quantitative integral table of symptoms and signs in rats with qi stagnation and blood stasis syndrome ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	量化积分	严重程度
对照	—	0.00 ± 0.00	无
模型	—	17.50 ± 0.53 <sup>##</sup>	重度
乌药挥发油	3.76	7.38 ± 0.74 <sup>**</sup>	轻度
	1.88	11.63 ± 0.52 <sup>**</sup>	中度
	0.94	12.75 ± 1.75 <sup>**</sup>	中度
复方丹参片	1.20	11.50 ± 1.60 <sup>**</sup>	中度

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 下表同

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group, same as below tables

给药组大鼠证候积分明显降低 ( $P < 0.01$ ),其中乌药挥发油高剂量组证候积分改善最为明显。

### 3.2 乌药挥发油对模型大鼠血液流变学及血浆 NO 和 ET 水平的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠血液流变学指标全血黏度(高、中、低切变率)、血浆黏度、血浆纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)和红细胞聚集指数显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,乌药挥发油高剂量组大鼠血液流变学指标均显著降低 ( $P < 0.01$ );乌药挥发油中剂量组大鼠低切变率、血浆黏度、FIB 和红细胞聚集指数显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );乌药挥发油低剂量组大鼠低切变率、FIB 和红细胞聚集指数显著降低 ( $P < 0.05$ );复方丹参片组大鼠全血黏度、FIB 降低和红细胞聚集指数显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。如图 1 所示,与对照组比较,模型组血浆 NO 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),血浆 ET 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组血浆 NO 水平均显著增高,ET 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表 2 乌药挥发油对气滞血瘀证大鼠血液流变学的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on hemorheology in rats with qi stagnation and blood stasis syndrome ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	全血黏度 (切变率 s <sup>-1</sup> )			血浆黏度/ (mPa·s)	FIB/(g·L <sup>-1</sup> )	红细胞聚集 指数
		高切 (200 s <sup>-1</sup> )	中切 (30 s <sup>-1</sup> )	低切 (1 s <sup>-1</sup> )			
对照	—	4.35 ± 0.40	6.32 ± 0.36	15.01 ± 0.79	3.38 ± 0.19	7.44 ± 0.38	4.62 ± 0.58
模型	—	6.74 ± 0.79 <sup>##</sup>	9.22 ± 0.82 <sup>##</sup>	19.64 ± 0.98 <sup>##</sup>	4.06 ± 0.29 <sup>##</sup>	9.14 ± 0.74 <sup>##</sup>	8.50 ± 1.46 <sup>##</sup>
乌药挥发油	3.76	4.58 ± 0.72 <sup>**</sup>	7.20 ± 1.60 <sup>**</sup>	15.82 ± 1.03 <sup>**</sup>	3.57 ± 0.32 <sup>**</sup>	7.51 ± 1.48 <sup>**</sup>	6.32 ± 0.82 <sup>**</sup>
	1.88	5.89 ± 0.63	8.86 ± 1.45	16.46 ± 1.15 <sup>**</sup>	3.73 ± 0.27 <sup>*</sup>	8.09 ± 0.77 <sup>*</sup>	6.88 ± 0.89 <sup>**</sup>
	0.94	6.40 ± 2.57	8.47 ± 1.54	17.42 ± 1.57 <sup>*</sup>	3.89 ± 0.34	8.14 ± 0.71 <sup>*</sup>	6.96 ± 1.95 <sup>*</sup>
复方丹参片	1.20	5.23 ± 0.45 <sup>*</sup>	7.67 ± 1.32 <sup>*</sup>	16.56 ± 3.79 <sup>**</sup>	3.78 ± 0.43	7.97 ± 1.25 <sup>*</sup>	6.46 ± 0.75 <sup>**</sup>

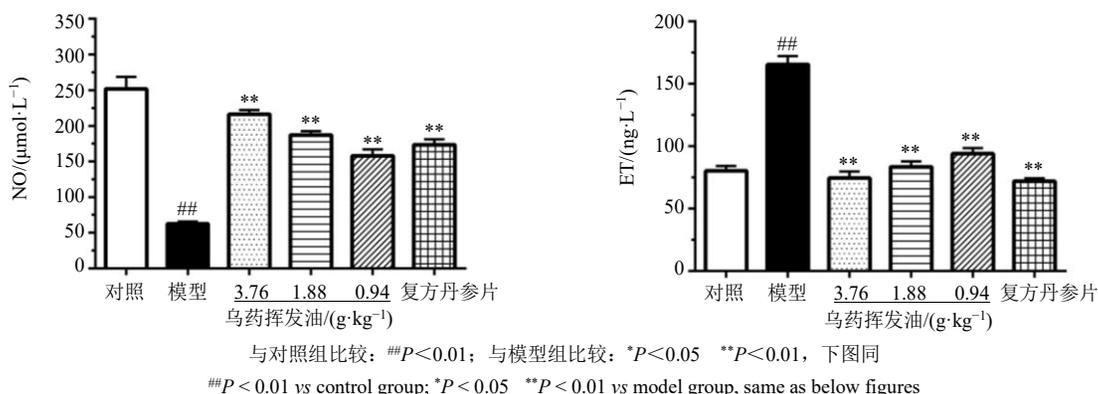


图1 乌药挥发油对气滞血瘀证大鼠血浆 NO 和 ET 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on plasma NO and ET levels in rats with *qi* stagnation and blood stasis syndrome ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 3.3 乌药挥发油对模型大鼠胸主动脉组织病理变化的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组大鼠动脉内膜凹凸不平、血管内皮细胞脱落严重,血管平滑肌细胞呈螺旋收缩样改变,提示动脉血管存在持续收缩状态;与模型组比较,乌药挥发油高剂量组大鼠血管内膜、血管内皮细胞受损状态恢复,血管平滑肌细胞明显舒张;乌药挥发油低、中剂量组大鼠血管内膜、血管内皮细胞损伤部分恢复,血管平滑

肌细胞舒张;复方丹参片组大鼠血管内皮细胞损伤状态基本恢复,血管平滑肌细胞舒张。

### 3.4 乌药挥发油对模型大鼠胸主动脉 cAMP 和 cGMP 含量的影响

如图3所示,与对照组比较,模型组大鼠胸主动脉组织中 cAMP 和 cGMP 含量显著降低 (*P*<0.01)。与模型组比较,乌药挥发油高剂量组和复方丹参片组大鼠胸主动脉 cAMP 和 cGMP 含量显著升高 (*P*<0.01);乌药挥发油中剂量组大鼠胸主动脉

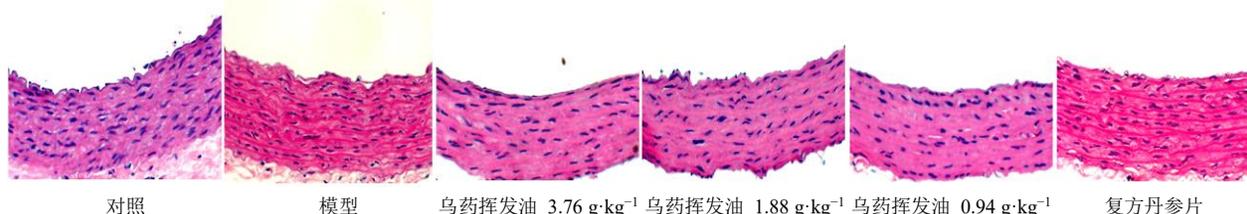


图2 乌药挥发油对气滞血瘀证大鼠胸主动脉组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on thoracic aorta histological changes in rats with *qi* stagnation and blood stasis syndrome (HE, × 100)

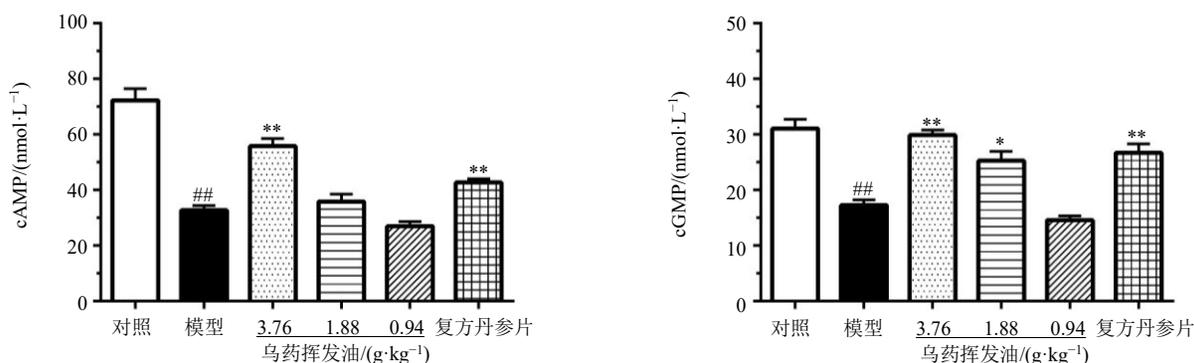


图3 乌药挥发油对气滞血瘀证大鼠胸主动脉组织 cAMP 和 cGMP 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on cAMP and cGMP contents of thoracic aorta in rats with *qi* stagnation and blood stasis syndrome ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

cGMP 含量显著升高 ( $P < 0.05$ )。

### 3.5 乌药挥发油对模型大鼠胸主动脉 PDE5A 和 sGC 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠胸主动脉组织 PDE5A 蛋白表达水平显著升高 ( $P <$

0.01), sGC 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 乌药挥发油中、高剂量组和复方丹参片组大鼠 PDE5A 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 乌药挥发油高剂量组和复方丹参片组大鼠 sGC 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

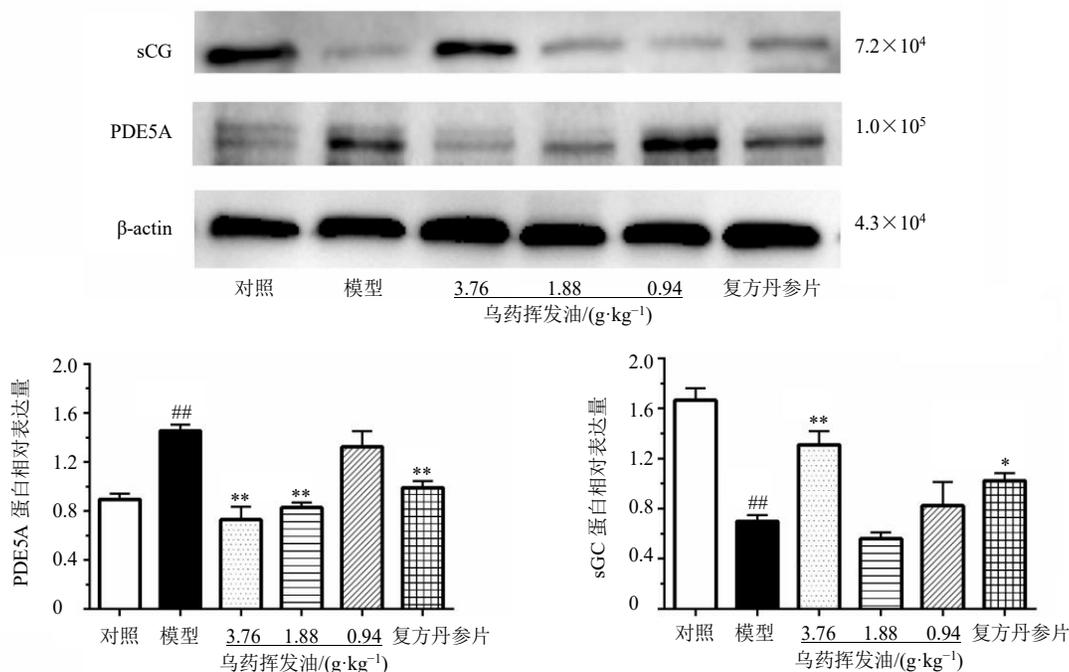


图 4 乌药挥发油对气滞血瘀证大鼠胸主动脉组织 PDE5A 和 sGC 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of volatile oil from *Linderae Radix* on PDE5A and sGC protein expressions of thoracic aorta in rats with qi stagnation and blood stasis syndrome ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

## 4 讨论

血瘀证常夹杂多种证候出现, 造模时需将病因病机与证候结合, 常选择多因素复合刺激复制血瘀证模型<sup>[17]</sup>。寒凝、气滞均是形成血瘀证的主要原因, 采用注射肾上腺素及冰水浴双因素复合刺激, 模拟精神因素和“寒邪”侵袭共同作用, 可体现血瘀证患者血液流变学的黏、浓、凝、聚的特性, 模型动物均观察到血液流变学、组织形态等明显变化<sup>[18-19]</sup>。周华妙等<sup>[16]</sup>提出注重血瘀证模型的外部表征(症状和体征特点), 总结了寒凝血瘀证的证候群, 并将其量化评分, 评价寒凝血瘀小鼠的证候程度。本研究中模型大鼠血瘀证症状典型, 符合相关文献报道<sup>[17-19]</sup>; 参考上述症状和体征量化评分表, 比较各组大鼠中医证候积分, 乌药挥发油可显著改善寒凝气滞血瘀证大鼠证候积分, 提示其对血瘀证具有防治作用。文献报道的血瘀证研究, 绝大多数在造模成功后停止“肾上腺素+冰水浴”双因素的造模条件刺激, 再给予药物等干预因素, 基本排除造模因素对实验

的影响。本研究在停止造模因素后给予乌药挥发油干预, HE 染色结果显示, 乌药挥发油可改善大鼠胸主动脉血管内皮细胞损伤状态、舒张血管平滑肌。Shimomura 等<sup>[12]</sup>发现乌药可降低血浆去甲肾上腺素水平, 降低收缩压, 改善自发性高血压大鼠心脏功能, 由此推测乌药挥发油是否通过降低血浆或胸主动脉组织中去甲肾上腺素水平发挥舒张胸主动脉血管平滑肌的作用, 仍有待进一步实验证实。

血瘀证的生物学基础研究重点关注其引起血液流变学、生化以及组织形态学方面的改变<sup>[3,20]</sup>。临床也常将血液流变学作为血瘀证的一种客观评价指标, 其中全血黏度越高, 流动性越小, 低切变率 ( $1 \text{ s}^{-1}$ ) 下的全血黏度反映红细胞聚集能力, 高切变率 ( $200 \text{ s}^{-1}$ ) 下的全血黏度反映红细胞变形能力; 两者比值为红细胞聚集指数, 聚集指数越高, 血液流动性越小<sup>[21]</sup>。血浆黏度主要取决于血浆纤维蛋白原等生物大分子物质的水平变化, 两者呈正相关, 血浆黏度增加反映瘀血存在。本实验中, 模型大鼠

出现明显血液流变学异常,全血黏度、血浆黏度、FIB、红细胞聚集指数显著升高,乌药挥发油可显著改善血液流变学指标,说明乌药挥发油可通过抑制血细胞聚集、降低血浆中纤维蛋白原等生物大分子物质水平,从而起到抑制血液“浓”和“黏”的作用,并对红细胞变形能力也有明显影响。

血管内皮细胞在维持血管壁完整性方面起着重要作用,血瘀证与血管内皮细胞功能障碍具有相关性,其合成、释放多种活性物质如ET、NO,参与血管舒缩、血栓形成等过程的调节<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,乌药挥发油可显著增加血浆NO含量,降低ET含量,提示其可调节血管内皮细胞功能,维持血管舒张/收缩平衡,改善血瘀证大鼠“血流瘀阻”,保持正常血液流动。cAMP、cGMP可调节血小板内钙离子浓度,影响血小板聚集,与血液高凝状态和微循环障碍密切相关,cAMP生成减少或cGMP生成增多时,促进血小板聚集,反之抑制血小板聚集<sup>[23]</sup>。本研究在模型大鼠胸主动脉组织中观察到cAMP、cGMP含量均显著下降,高剂量乌药挥发油可显著增加两者含量,提示模型大鼠胸主动脉组织中cGMP作用相较于cAMP强,对血小板聚集可能发挥主要作用,改善血液高凝状态。血浆NO进入血管平滑肌细胞中与sGC结合,促进cGMP转化,并在细胞中被PDE水解<sup>[24]</sup>,NO-sGC-cGMP信号通路是血管内皮功能的关键调节通路,与血管损伤修复密切相关<sup>[25-26]</sup>。因此,本研究进一步观察了胸主动脉组织中sGC、PDE5A蛋白表达变化,结果显示高剂量乌药挥发油显著增加sGC蛋白表达水平,降低PDE5A蛋白表达水平。乌药挥发油可显著提高血浆中NO和胸主动脉中cGMP含量,通过增加sGC蛋白表达提高cGMP含量,同时减少其通过PDE5A的降解,提示乌药挥发油可能通过调控NO-sGC-cGMP信号通路,发挥血管内皮细胞保护作用。

综上所述,本研究发现乌药挥发油能够改善寒凝气滞血瘀证模型大鼠中医证候积分、胸主动脉组织形态、血液流变学指标,增加血浆NO含量、降低ET含量,提高胸主动脉cAMP、cGMP含量,调控NO-sGC-cGMP信号通路相关蛋白表达,改善寒凝气滞血瘀大鼠血管舒缩功能、保护血管内皮细胞、改善血液高凝状态,证实了理气药乌药配伍用于血瘀证的科学内涵,为其在血瘀证中医防治方面的应用提供了基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 王庆国. 以血瘀证为切入点进行中医证候规范及其生物学基础研究 [J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(5): 5-10.
- [2] 高嘉良, 陈光, 何庆勇, 等. 治疗气滞血瘀证中成药组方规律分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 187-191.
- [3] 金妍, 田思胜, 王栋先. 血瘀证的病理机制研究近况 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(1): 145-148.
- [4] 何浩强, 陈光, 高嘉良, 等. 气滞血瘀证生物学基础研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4167-4171.
- [5] 邢梦雨, 田崇梅, 夏道宗. 乌药化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2147-2151.
- [6] 海萍, 高原, 李蓉涛, 等. 乌药的化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 872-875.
- [7] 邓桂明, 向彪, 肖小芹, 等. 基于网络药理学的乌药主要化学成分药效作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5125-5133.
- [8] Lou Z H, Wang J W, Chen Y J, et al. *Linderae Radix* ethanol extract attenuates alcoholic liver injury via attenuating inflammation and regulating gut microbiota in rats [J]. *Revista Brasileira De Pesquisas Med E Biol*, 2019, 52(6): e7628.
- [9] Lai H M, Yang Z B, Lou Z H, et al. Root extract of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. modulates the Th17/Treg balance to attenuate DSS-induced colitis in mice by IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 615506.
- [10] Jiang T, Xu C Y, Liu H F, et al. *Linderae Radix* ethanol extract alleviates diet-induced hyperlipidemia by regulating bile acid metabolism through gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 627920.
- [11] 欧兴长, 丁家欣, 张玲. 100多味中药和复方抗凝血酶作用的实验观察 [J]. 中西医结合杂志, 1988, 8(2): 102.
- [12] Shimomura M, Ushikoshi H, Hattori A, et al. Treatment with *Lindera strychnifolia* reduces blood pressure by decreasing sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(3): 561-568.
- [13] 韩昊特. 乌药叶榭皮苷治疗心血管疾病药效学评价及作用机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [14] Wen S S, Wang Y, Xu J P, et al. Two new sesquiterpenoid lactone derivatives from *Lindera aggregata* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, doi: 10.1080/14786419.2021.1939332.
- [15] 邓桂明, 向彪, 肖小芹, 等. 基于GC-MS和UPLC-ESI-MS/MS法研究乌药化学成分 [J]. 中药材, 2016, 39(10): 2229-2236.
- [16] 周华妙, 郭勇. 寒凝血瘀证小鼠动物模型的建立及评

- 价 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(1): 1-2.
- [17] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- [18] 陈常莲, 舒昀, 程娜, 等. 血瘀证动物模型研究现状及评价分析 [J]. 江西中医药大学学报, 2020, 32(6): 116-120.
- [19] 贾丹兵, 于淼, 李乃民, 等. 寒凝气滞血瘀证大鼠动物模型的建立及评价 [J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 75-77.
- [20] 王海丽, 肖林焱, 陈毅, 等. 茜草炭不同提取物对急性血瘀模型大鼠的影响比较研究 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1351-1356.
- [21] 张蕊, 郝春华, 孙双勇, 等. 舒脑欣滴丸对寒凝气滞血瘀证大鼠血小板聚集和血液流变学指标的影响 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 206-211.
- [22] 马欣, 李运伦. 从血管内皮细胞损伤研究冠心病血瘀证病理基础 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 117-120.
- [23] 王辉, 朱科燕, 林琳, 等. 丹酚酸浸膏粉对气虚血瘀大鼠血管内皮的保护作用 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(6): 774-779.
- [24] 潘洁, 钟方芳, 王红艳, 等. 可溶性鸟苷酸环化酶介导 NO 信号转导的结构基础及其分子机制研究 [J]. 中国科学: 化学, 2014, 44(4): 572-585.
- [25] Zhao L Y, Li J, Huang X Q, *et al.* Xyloketal B exerts antihypertensive effect in renovascular hypertensive rats via the NO-sGC-cGMP pathway and calcium signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(5): 875-884.
- [26] Evora P R, Evora P M, Celotto A C, *et al.* Cardiovascular therapeutics targets on the NO-sGC-cGMP signaling pathway: A critical overview [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(9): 1207-1214.

[责任编辑 李亚楠]