• 药理与临床 •

经典名方桃红四物汤抗血栓药效作用及其机制研究

马　川，吴彦欣，李敏敏，何小芳，李如萍，何　瑶*，杜克群*

西南特色中药资源国家重点实验室，成都中医药大学药学院，四川 成都　611137

摘　要：目的 探讨桃红四物汤（Taohong Siwu Decoction，THSWD）抗血栓形成的药理作用及机制。**方法** 通过 ip 卡拉胶溶液（10 mL/kg）建立小鼠血栓模型，将小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药组和 THSWD 低、中、高剂量（7.74、15.48、30.96 g/kg）组，观察小鼠黑尾长度，检测血清和肝脏中相关因子；同时，进行凝血酶诱导血小板激活和脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cell，HUVECs）损伤体外实验，检测血小板和内皮细胞中相关因子，观察 THSWD 对血小板和内皮细胞黏附作用的影响。**结果**　与模型组比较，THSWD 各剂量组可显著减少小鼠体内的血栓并显著降低小鼠肝脏中高迁移率族蛋白 B1（high mobility group box 1 protein，HMGB1）的水平（$P<0.01$）和血清白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）的水平（$P<0.01$）；显著升高小鼠血清中组织型纤溶酶原激活剂（tissue plasminogen activator，TPA）的水平（$P<0.01$）；此外，THSWD 各剂量组还可显著降低肝脏中核因子-κB（nuclear factor-κB，*NF-κB*）和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3，*NLRP3*）的 mRNA 表达（$P<0.05$、0.01）。体外实验发现，THSWD 可升高血小板中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）的水平（$P<0.05$）、抑制血小板凝块收缩、降低细胞外调节蛋白激酶 1/2（extracellular-regulated kinase 1/2，ERK1/2）和 HMGB1 的蛋白表达（$P<0.05$）、有降低蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）蛋白表达的趋势；THSWD 能显著降低 LPS 诱导的 HUVECs 损伤过程中活性氧（reactive oxygen species，ROS）的水平（$P<0.01$）、抑制相关黏附因子血管细胞黏附分子-1（vascular cell adhesion molecule-1，VCAM-1）和细胞间黏附分子-1（intercellular cell adhesion molecule-1，ICAM-1）的表达（$P<0.05$、0.01）、减少 HUVECs 与血小板的黏附（$P<0.05$）。**结论**　THSWD 可通过抑制炎症反应、促进纤维蛋白酶原激活剂生成、抑制氧化应激反应、抑制血小板激活、抑制内皮细胞损伤及与血小板的黏附发挥抗血栓作用。

关键词：经典名方；桃红四物汤；抗炎；氧化应激；抗血栓；地黄苷 D；阿魏酸；芍药苷；苦杏仁苷；羟基红花黄色素 A

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)23 - 8035 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.011

Antithrombotic effect and mechanism of classic famous prescription Taohonng Siwu Decoction

MA Chuan, WU Yanxin, LI Minmin, HE Xiaofang, LI Ruping, HE Yao, DU Kequn

School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective　To explore the pharmacological effect and mechanism of antithrombosis in Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤, THSWD). **Methods**　The thrombus model was prepared by intraperitoneal injection of carrageenan. Mice were randomly divided into control group, model group, positive group and THSWD treatment groups (7.74, 15.48, 30.96 g/kg), observing the mice black-tail length, associated factors in the serum and liver were tested. Performing thrombin-induced platelet activation and

收稿日期：2024-06-01

基金项目：四川省自然科学基金项目（2024NSFSC0696）

作者简介：马　川，硕士研究生，主要从事新制剂、新剂型、新工艺研究。E-mail: mc984705612@163.com

***通信作者：**何　瑶，教授，主要从事中药新制剂、新剂型、新工艺研究。E-mail: heyao2010@cdutcm.edu.cn

杜克群，硕士研究生，主要从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。E-mail: 751250966@qq.com

lipopolysaccharide (LPS) induced injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro*, using the benchmark sample of THSWD to administration, testing and analyzing related indicators, and observing the effect of THSWD on the adhesion of platelets and endothelial cells. **Results** Compared to the model group, each dose group of the THSWD can significantly reduce the thrombosis in mice ($P < 0.01$). High mobility group box 1 protein (HMGB1) in the liver and the levels of interleukin-1β (IL-1β), IL-6, and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the serum of the molded mice were significantly decreased ($P < 0.01$). THSWD significantly increased the level of tissue plasminogen activator (TPA) in serum ($P < 0.01$). In addition, THSWD can also significantly reduce nuclear faction-κB (NF-κB) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing (NLRP3) mRNA expressions in liver ($P < 0.05$, 0.01). The results of *in vitro* experiments indicated that THSWD could increase the level of superoxide dismutase (SOD) in platelets ($P < 0.05$), suppress platelet clot contraction, reduce the expression of extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and HMGB1 ($P < 0.05$), and exhibit a tendency to decrease protein kinase B (Akt) protein expression. In addition, THSWD can significantly reduce reactive oxygen species (ROS) levels during injury to HUVECs induced by LPS ($P < 0.01$), inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) ($P < 0.05$, 0.01), and reduce HUVECs adhesion to platelets ($P < 0.05$). **Conclusion** THSWD can inhibit inflammation, promote the production of fibrinogen activator, inhibit oxidative stress response, inhibit platelet activation, inhibit endothelial cell injury and adhesion to platelets, and play an antithrombotic role.

Key words: classical famous prescription; Taohong Siwu Decoction; anti-inflammation activity; oxidative stress; anti-thrombosis; rehmannioside D; ferulic acid; paeoniflorin; amygdalin; hydroxysafflor yellow A

血栓性疾病是由血栓形成后栓塞所引起的一类疾病，其发病率高居各种疾病之首，且近年来发病率呈现逐渐攀升之势，严重威胁人类生命健康。因此，血栓性疾病已成为当代医学研究的重点与热点之一。血栓的形成及栓塞与炎症反应、胶凝反应、血小板功能受损或异常、血小板与内皮细胞的黏附等因素密切相关，而这些反应的诱发因素主要包括炎症因子，如高迁移率族蛋白 B1（high mobility group box 1 protein，HMGB1）、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）、核因子-κB（nuclear factor- κB，NF-κB）和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3，NLRP3）等或凝血酶反应性的表达增加、内皮细胞和血小板的过度激活，以及纤维蛋白溶解减少或组织型纤溶酶原激活剂（tissue plasminogen activator，TPA）减少等[1-3]。在临床中，血栓性疾病多采用溶栓药物进行治疗，但由于溶栓药物易引起出血等副作用，因此开发其他安全有效的治疗药物是必要的。中医理论认为瘀血互结互化、气机气化失常、痰湿等，是血栓性疾病的发病基础，气血、脉络不通，是其必然结果。

桃红四物汤（Taohong Siwu Decoction，THSWD）出自清·柴得华所著《妇科冰鉴》，由酒洗生地黄、酒洗当归、酒炒白芍、燀桃仁、川芎及酒洗红花组成，功效为养血、活血、逐瘀，主治血虚血瘀证[4]。课题组前期研究发现，THSWD 在中医临床中是活血化瘀代表方剂，在治疗血瘀证疾病方面，应用历史悠久且临床适用证广泛。已有相关研究表明，THSWD 可降低血液黏度、抑制血小板聚集和改善纤维蛋白溶解[5]，THSWD 可加快下肢深静脉血栓患者体内 *D*-二聚体、纤维蛋白/纤维蛋白原降解产物下降速度，利于下肢深静脉血栓的溶解[6]，也可改善心血瘀阻型稳定性冠心病患者的中医证候和生活质量[7]。但目前尚无对其抗血栓作用机制的深入研究报道。因此，本研究通过卡拉胶溶液诱导小鼠血栓模型，同时采用体外血小板与内皮细胞的黏附反应，探究 THSWD 对小鼠血栓形成的影响和机制，为 THSWD 临床治疗血栓性疾病奠定实验基础。

1 材料

1.1 动物

7 周龄雄性 ICR 小鼠，体质量（30±3）g，购自成都恩斯维尔生物科技有限公司，实验动物许可证号 SCXK（湘）2019-0004。小鼠饲养于成都中医药大学动物实验中心，温度（23±2）℃、相对湿度（50±5）%、12 h 光暗交替的环境下，饲养期间给予小鼠正常饮水及饮食。本动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号 2024110）。

1.2 细胞

人类血液来自于 1 名健康的献血者，人类血小板研究方案按照世界医学协会的伦理规范制定，并经成

都中医药大学附属医院临床伦理委员会批准（批准号2024110）。人血小板通过加入 PGE1（1 μmol/L），孵育 10 min，然后在室温下 7 000 r/min 离心 10 min。将血小板清洗并在悬浮缓冲液（10 mmol/L HEPES、pH 7.4、140 mmol/L 氯化钠、3 mmol/L 氯化钾、0.5 mmol/L 氯化镁、5 mmol/L 碳酸氢钠、10 mmol/L 葡萄糖）中重新悬浮得血小板重悬液。

人脐静脉血管内皮细胞（HUVECs）购自浙江美森细胞科技有限公司，在含有 5%胎牛血清、1%内皮细胞生长因子和 1%青霉素/链霉素的 ECM 培养基中培养。

1.3 药品与试剂

生地黄（批号 20073101～20073115）购自河南省焦作市武陟县，当归（批号 20091501～20091515）购自青海省西宁市大通县，白芍（批号 20100101～20100115）购自四川省德阳市中江县，川芎（批号 20073101～20073115）购自四川省都江堰市，桃仁（批号 20120501～20120515）购自陕西省宝鸡市千阳县，红花（批号 20091601～20091615）购自新疆省伊犁州霍城县，经成都中医药大学裴瑾教授鉴定，各药材均符合《中国药典》2020 年版一部“性状”项下的规定，鉴定结果分别为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的干燥块根，伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根，伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎，蔷薇科桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch.的干燥成熟种子，菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L.的干燥花。按照国家发布的“THSWD 关键信息”结合课题组前期研究确定的饮片炮制工艺[8]，制备酒地黄、酒当归、酒白芍、川芎生品、煨桃仁、酒红花。

阿司匹林（批号 BJ63086，国药准字 J20171021）购自拜耳集团；HMGB1（批号 GB11103）抗体购自赛维尔生物科技有限公司；IL-1β 超敏试剂盒（批号 E-MSEL-M0003）、IL-6 超敏试剂盒（批号 E-MSEL-M0001）、TNF-α 超敏试剂盒（批号 E-MSEL-M0002）、TPA 试剂盒（批号 E-EL-M00917c）均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；PBS 缓冲液（批号 G4202）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；纤维蛋白原和凝血酶购自美国 Sigma-Aldrich 公司；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD，批号 E-BC-K020-M）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；0.45 μm PVDF 膜（批号 IPVH00010）购自德国 Merck Millipore 公司；脱脂奶粉（批号 1172GR500）购自德国 Biofroxx 公司，超敏 ECL 化学发光底物（批号 BL523B）均购自德国 Biofroxx 公司；TBS 缓冲液（批号 G0001-2L）购自赛维尔生物科技有限公司；脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）购自美国开曼化学公司；磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde phosphate dehydrogenase，GAPDH，批号 GB15004）、细胞外调节蛋白激酶 1/2（extracellular-regulated kinase 1/2，ERK1/2，批号 GB12087）购自武汉赛维尔生物科技有限公司、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt，批号 YT0185）抗体购自美国 ImmunoWay 生物科技公司；山羊抗兔二抗-HRP（批号 GAR0072）、山羊抗鼠二抗-HRP（批号 GAM0072）购自杭州联科生物技术股份有限公司；5(6)-羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 [5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester，CFSE，sc-214315] 购自美国 Santa Cruz 生物技术公司；DMEM 培养基（批号 D5796）、胎牛血清（批号 F8687）购自德国 Merck 公司，活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（批号 S0033M）购自碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

FTS-10A型陶瓷煎药锅（潮州市一壶百饮电器实业有限公司）；N-1100 型旋转蒸发仪（上海泉杰仪器有限公司）；DZF6020 型真空干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；D3024 型台式高速微量离心机（美国SCILOGEX公司）；D3024R型台式高速冷冻离心机（美国SCILOGEX公司）；KZ-III-F型高速低温组织研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司）；3DESK/MIDI/250/100 型全景切片扫描仪（匈牙利 3DHISTECH公司）；SLAN-96S型全自动医用PCR分析系统（上海宏石医疗科技有限公司）；Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems公司）；K2800 核酸分析仪（北京凯奥科技发展有限公司）；Epoch型酶标检测仪（美国 BioTeK）；CytoFLEX流式细胞仪（美国Beckman coulter公司）；SLK-O3000-S型脱色摇床（美国SCILOGEX公司）；PowerPac Basic型电泳仪（美国 Bio-Rad Laboratories公司）。

2 方法

2.1 体内卡拉胶致小鼠血栓模型实验

2.1.1 样品制备及质量控制 按照《古代经典名方

关键信息表（7 首方剂）》“THSWD”项下公布的处方剂量[9]及课题组前期研究得到的煎煮方法[10]，称取 THSWD 全方饮片 3 倍量，即酒地黄 33.57 g、酒当归 44.76 g、酒白芍 16.80 g、川芎 11.19 g、焯桃仁 11.34 g、酒红花 11.19 g，置陶瓷锅中，加 10 倍量水，浸泡 30 min，武火煮沸后，转文火保持微沸 60 min，待药液冷却至 80 ℃时，采用 3 层 200 目过滤纱布进行滤过，煎煮 2 次，合并 2 次滤液，−0.1 MPa、50 ℃旋转蒸发浓缩至相对密度约为 1.17 g/mL（50 ℃）的浸膏，再于−0.09 MPa、50 ℃的条件下减压干燥 3 d，得 THSWD 基准样品。通过含量测定对 THSWD 基准样品进行质量控制，结果显示，地黄苷 D、阿魏酸、芍药苷、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A 5 种成分质量分数分别为 344.4、154.8、459.2、923.5、1 202.0 μg/g。

按照人与动物表面积换算公式[11]计算给药剂量，参考临床给药剂量，将阳性药与 THSWD 基准样品分别用生理盐水溶解至相应浓度，得到小鼠 ig 样品。

2.1.2 动物分组、造模与给药 将小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药（18.03 mg/kg）组和 THSWD 低、中、高剂量（7.74、15.48、30.96 g/kg）组，每组 8 只。除对照组外，其余各组小鼠 ip 4%卡拉胶溶液（10 mL/kg），以小鼠尾部形成暗红色血栓为造模成功的判定标准[12]。造模成功后，各给药组 ig 相应浓度药物（10 mL/kg），对照组与模型组 ig 等体积生理盐水，连续 3 d，每天 1 次。注射卡拉胶后第 4 天，所有小鼠眼球取血后，立即拍摄小鼠尾巴，脱颈处死后分别采集尾巴、肝和肺组织样本。

2.1.3 小鼠血栓形成率的检测 于小鼠取血后，以游标卡尺测量各组小鼠尾部血栓长度以及尾巴全长，计算各组小鼠血栓形成率。

血栓形成率＝尾部血栓长度/全尾长度

2.1.4 组织切片染色 为确定在小鼠组织血管内形成的血栓，分别在小鼠尾巴距离尾巴尖端 3、5、7 cm 的位置收集小鼠的尾巴，并收集其肝和肺组织，于 4%的多聚甲醛溶液中固定过夜。固定状态良好后，进行修剪、于梯度乙醇中脱水、于石蜡中包埋、切片、HE 染色、封片、镜检。同时制备 5 μm 的肝脏切片，采用免疫组化染色法检测 HMGB1 的表达。

2.1.5 小鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、TPA 水平的检测 取全血于 4 ℃、3 500 r/min 离心 15 min，取上清，按 ELISA 试剂盒的说明书操作，检测各组小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6、TPA 的水平。

2.1.6 实时荧光定量检测肝组织中 *NLRP3* 与 *NF-κB* 的表达 从小鼠肝组织中提取总 RNA，逆转录试剂盒合成 cDNA。采用 SYBR Green Master Mix 和引物进行实时荧光定量（quantitative real-time PCR，qRT-PCR），引物序列见表 1。以 *β-actin* 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *NLRP3* 与 *NF-κB* 的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列（5’-3’）
β-actin	F: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG
	R: ATGCCACAGGATTCCATACC
NLRP3	F: GCTGCGATCAACAGGCGAGAC
	R: CCATCCACTCTTCTTCAAGGCTGTC
NF-κB	F: GACACGACAGAATCCTCAGCATCC
	R: CCACCAGCAGCAGCAGACATG

2.2 体外血小板与内皮细胞氧化应激实验

2.2.1 样品制备 THSWD 基准样品的制备同“2.1.1”项下。分别采用 PBS 缓冲液将阿司匹林（5 μmol/mL）与 THSWD 基准样品（生药量 27.6 mg/mL）充分溶解，获得血小板给药样品。同时采用 PBS 缓冲液将 THSWD 基准样品充分溶解至含生药量 7.74 mg/mL，得细胞给药样品。

2.2.2 检测血小板中 SOD 活力 取适量血小板重悬液（2×10^8 个/mL），随机分为对照组、模型组、阿司匹林（5 μmol/mL）组、THSWD（27.6 mg/mL）组。阿司匹林组和 THSWD 组的血小板各加入相应的药物后，其余组加入同体积的 PBS 缓冲液，37 ℃孵育 2 h。孵育结束后，除对照组外，其余各组均加入 1 U/mL 凝血酶孵育 2 min。采用高速低温组织研磨仪并加入蛋白酶抑制剂裂解血小板，离心，使用 SOD 检测试剂盒测定上清液中 SOD 活力（U/mL）。

2.2.3 观察血小板凝块收缩 血小板悬浮液（2×10^8 个/mL）加入氯化钙（1 mmol/L），分别加入 PBS 缓冲液、THSWD、阿司匹林，在 37 ℃下孵育 30 min，然后加入纤维蛋白原（2 mg/mL）。再次混合后，将反应混合物转移到玻璃管中。加入凝血酶（1 U/mL）并在 37 ℃孵育 1 h，拍摄凝块缩回的照片。

2.2.4 Western blotting 检测血小板中 Akt、ERK1/2、HMGB1 蛋白表达 血小板悬浮液（2×10^8 个/mL）分别用 PBS 缓冲液、THSWD、阿司匹林在 37 ℃下处理 2 h，然后用凝血酶（1 U/mL）处理 2 min。离心收集细胞，每 1×10^6 个细胞中加入 250 μL RIPA 裂解液，提取细胞总蛋白，使用 BCA 试剂盒测定

蛋白浓度。蛋白样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，转移至 PVDF 膜，5%的脱脂牛奶封闭 1 h。一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，二抗室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。采用 ECL 底物在化学发光成像系统下采集发光系统显像并保存，采用勤翔化学分析软件对凝胶图像进行灰度分析。

2.2.5 检测 LPS 处理后 HUVECs 中 ROS 的水平 HUVECs 在含有 10%胎牛血清、100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 中，于 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱内培养。将细胞分为对照组、模型组和 THSWD 组，对照组仅加培养基；LPS 组加入 5 μg/mL LPS；THSWD 组加入 5 μg/mL LPS 和 7.74 mg/mL THSWD，24 h 后使用 ROS 检测试剂盒检测 HUVECs 中的 ROS 水平。

2.2.6 检测 HUVECs 中黏附分子的水平 从 HUVECs 中提取总 RNA，逆转录试剂盒合成 cDNA。采用 SYBR Green Master Mix 和引物进行 qRT-PCR 定量，以 *β-actin* 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 THSWD 处理后的 HUVECs 中血管细胞黏附分子-1（vascular cell adhesion molecule-1，*VCAM-1*）、细胞间黏附分子-1（intercellular cell adhesion molecule-1，*ICAM-1*）的基因表达情况，引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	序列（5’-3’）
β-actin	F: AATCTGGCACCACACCTTCTACAA
	R: GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA
VCAM-1	F: TCTCATTGACTTGCAGCACCACAG
	R: CCTCATTCGTCACCTTCCCATTCAG
ICAM-1	F: GTCACCTATGGCAACGACTCCTTC
	R: AGTGTCTCCTGGCTCTGGTTCC

2.2.7 血小板黏附实验 为了标记血小板，将其与 CFSE 溶液（1 μmol/L）在 37 ℃下孵育 30 min。用 PBS 洗涤血小板 3 次，去除游离 CFSE。24 孔板中的 HUVECs 分别用空白培养基、LPS（5 μg/mL）、LPS（5 μg/mL）＋THSWD（7.74 mg/mL）处理 24 h 后，将 CFSE 标记的血小板（1×10^8 个/孔）加入 HUVECs 中，在 37 ℃下孵育 30 min。用 PBS 冲洗非贴壁细胞或血小板 3 次。然后用徕卡 DMi8 显微镜拍摄结合的血小板，并通过 Image-pro plus 6.0 软件进行分析。

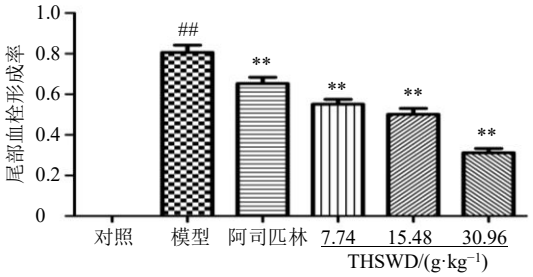
2.3 统计学分析

所有数据最终均采用 SPSS 软件进行正态分布分析。对正态分布下的数据进行参数统计量、单因素方差分析的事后检验。所有结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

3 结果

3.1 THSWD 对小鼠血栓形成的影响

3.1.1 小鼠尾部血栓测量结果 为了评估 THSWD 对血栓形成小鼠模型的影响，本研究测定了不同组别的血栓形成率。如图 1 所示，与模型组比较，THSWD 组和阿司匹林组均表现出尾部血栓形成率显著降低（$P<0.01$），低剂量 THSWD 组与阿司匹林组无显著性差异，但高剂量组（$P<0.05$）和中剂量组（$P<0.01$）效果较阿司匹林明显。



与对照组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$，下图同。

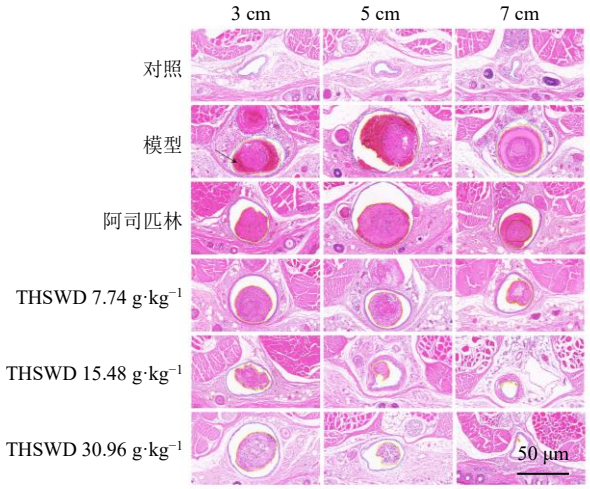
$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* model group, same as below figures.

图 1 各组小鼠尾部血栓形成率（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig. 1 Results of tail thrombosis rate of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

3.1.2 THSWD 对小鼠血栓形成与肝组织 HMGB1 表达的影响 尾部发生的颜色变化表明卡拉胶诱导的血栓形成始于尾尖，而药物是从尾尖另一侧抑制血栓形成。因此，本研究在距离小鼠尾尖不同位置进行 HE 染色。如图 2 所示，模型组小鼠尾部血管管腔中有大量的红细胞积聚，导致其几乎完全被血栓占据，在距离尾尖 5、7 cm 的位置，约 80%被血栓占据。除尾血栓外，给动物注射卡拉胶可诱导其他组织血管血栓[13]。如图 3 所示，在小鼠的肝、肺组织中均可发现不同程度的血栓。此外，尾血管和肝血管周围组织有明显的炎性浸润。不同剂量组的 THSWD 均可抑制小鼠不同部位的血栓形成，主要表现为血栓块的缩小和崩解以及炎性浸润的减少，且 THSWD 低剂量组与阿司匹林的作用效果接近，而 THSWD 中、高剂量组的作用效果较阿司匹林更明显。

此外，采用免疫组化染色法测定了冷冻小鼠肝脏切片中 HMGB1 的蛋白表达。由图 4 所示，THSWD



蓝色虚线-血管管腔；红色虚线-血栓；黑色箭头-炎症，下图同。

blue dashed line-vascular lumen; red dashed line-thrombus; black arrow-inflammation, same as below figures.

图 2　各组小鼠尾部 HE 染色结果（×20）

Fig. 2　Results of HE staining in tails of each mouse group (× 20)

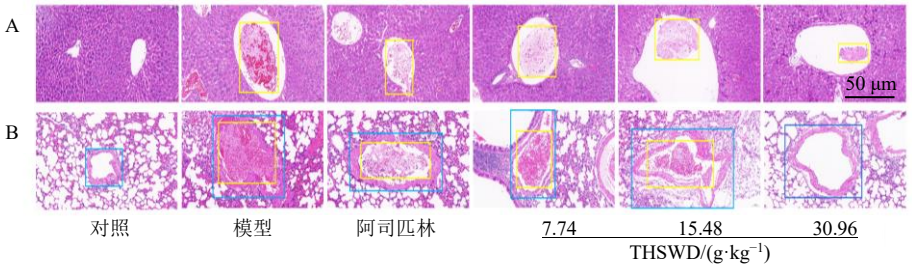


图 3　各组小鼠肝部 (A) 和肺部 (B) HE 染色结果（×20）

Fig. 3　Results of HE staining in liver (A) and in lung (B) tissues of each mouse group (× 20)

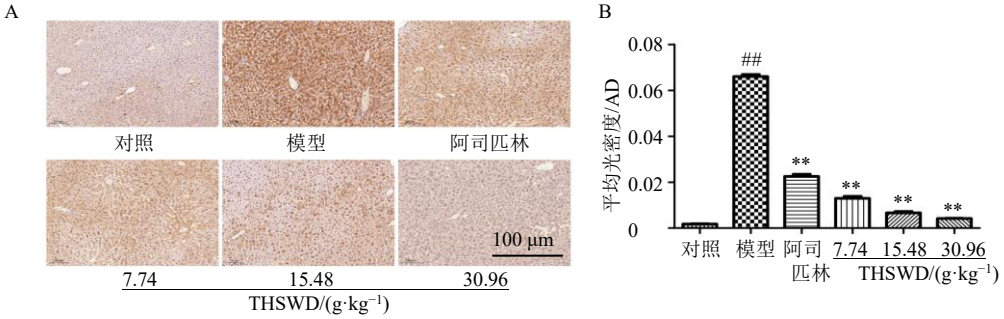


图 4　各组小鼠肝部 HMGB1 免疫组化染色 (A，×200) 和免疫组化图像的平均吸光度定量 (B) 结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Fig. 4　Results of immunohistochemical staining of HMGB1 (A, × 200) and quantitative results of average optical density of immunohistochemical images (B) in liver of each mouse group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

降低了肝组织中的 HMGB1 蛋白表达。由于 HMGB1 是多种炎症通路的上调因子，初步推测 THSWD 可能通过抗炎发挥其抗血栓作用。

3.1.3　THSWD 对血栓小鼠血清中炎症因子水平的影响　如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中的 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平显著升高（$P<0.01$）、TPA 水平显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，THSWD 给药治疗后，各剂量组小鼠血清中的 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平显著降低（$P<0.01$）、TPA 水平明显升高（$P<0.01$），且较阿司匹林显著。结

果表明，THSWD 可以抑制卡拉胶诱导的血清中炎症因子的产生，同时，也能促进组织纤溶酶原激活因子生成，效果均优于阿司匹林。

3.1.4 THSWD 对血栓小鼠肝脏中 *NF-κB* 和 *NLRP3* 表达的影响　除了血液外，小鼠肝脏的 *NF-κB* 和 *NLRP3* 也能促进血栓形成[13]，如图 6 所示，THSWD 降低了血栓小鼠肝脏中 *NF-κB* 和 *NLRP3* mRNA 的表达（$P<0.05$、0.01），进一步证实了 THSWD 抗血栓的机制与其抑制炎症反应密切相关。

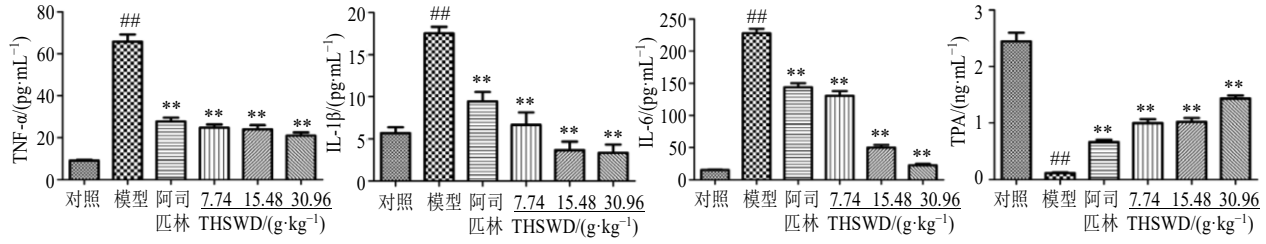


图 5　各组小鼠血清 ELISA 定量测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Fig. 5　Results of ELISA quantitative determination in serum of each mouse group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

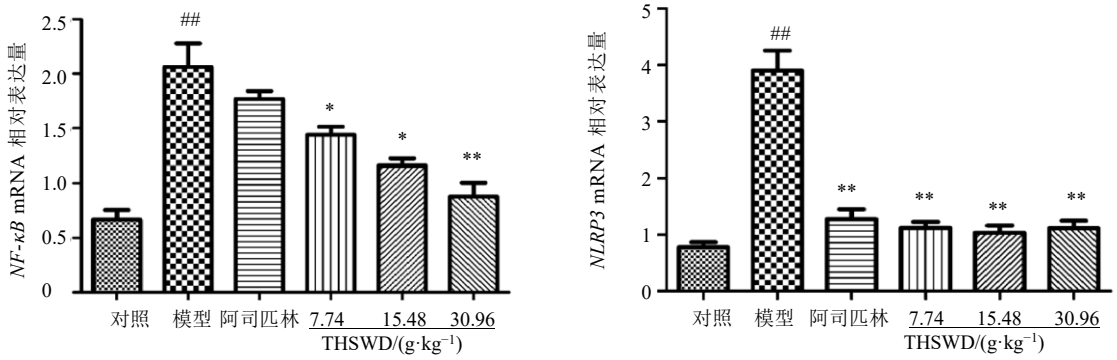


图 6　各组小鼠肝中 qRT-PCR 定量测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 8$）

Fig. 6　Results of qRT-PCR quantitative measurements in liver of each mouse group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.2　THSWD 对血小板、内皮细胞氧化应激反应的影响

3.2.1 THSWD 对血小板 SOD 活力的影响　如图 7 所示，与对照组比较，模型组血小板 SOD 活力显著降低（$P<0.05$）；与模型组相比，THSWD 可显著提高血小板 SOD 的活性（$P<0.05$），说明 THSWD 可降低凝血酶诱导的血小板氧化应激。

3.2.2 THSWD 对血小板收缩的影响　通过血小板凝块回缩，可以反映血小板收缩能力，血小板凝块收缩能力越小，表明药物抗血小板聚集作用越强[13]。与对照组比较，模型组血小板在 1 h 后明显收缩成絮状；与模型组比较，THSWD 处理 1 h 后血小板仍成凝胶状，阿司匹林组变化不明显，说明 THSWD（图 8）可以显著抑制由纤维蛋白原和凝血酶诱导的血小板收缩。

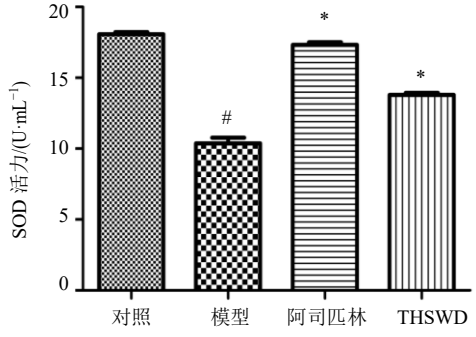


图 7　血小板 SOD 活力测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 7　Results of SOD activity measurement in platelets ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2.3 THSWD 对血小板中 Akt、ERK1/2、HMGB1 蛋白表达的影响　测定结果表明，与

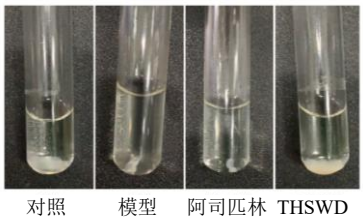


图 8　血小板收缩结果

Fig. 8　Results of platelet contraction

对照组比较，模型组 Akt、ERK1/2、HMGB1 蛋白表达增加（$P<0.05$）；与模型组比较，THSWD 可降低 ERK1/2 和 HMGB1 的表达水平（$P<0.05$），逆转 Akt 升高的趋势（图 9），表明 THSWD 可以通过减少以上因子的表达，抑制血小板聚集。

3.2.4　THSWD 对 LPS 处理后的 HUVECs 中 ROS 的影响　THSWD 对 LPS 处理后的 HUVECs 中

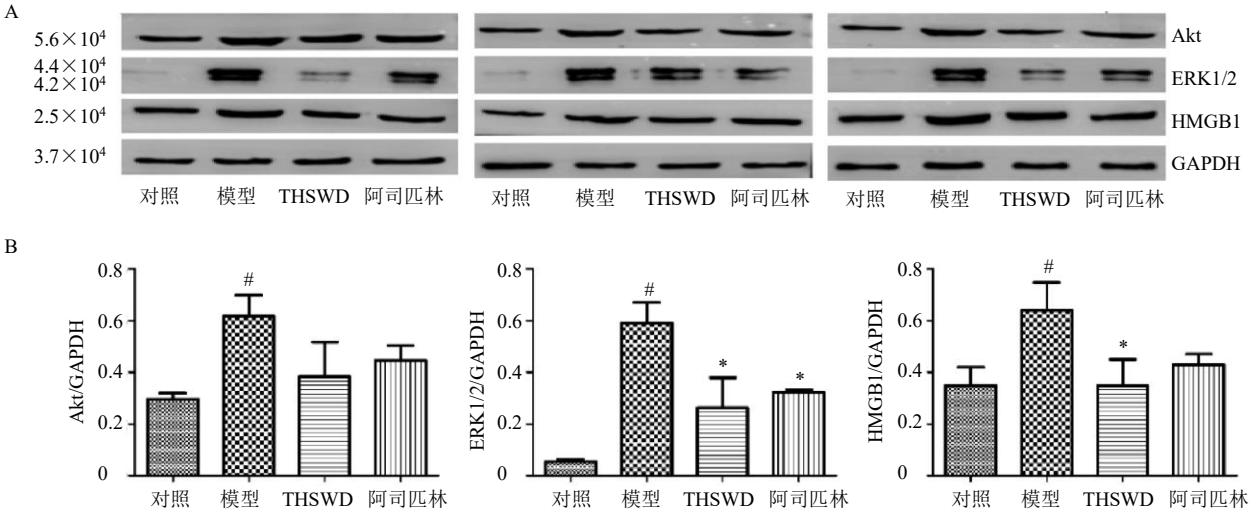


图 9　THSWD 处理后血小板 Akt、ERK1/2、HMGB1 蛋白表达条带 (A) 与定量结果 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9　Expression bands of platelet Akt, ERK1/2 and HMGB1 protein after THSWD treatment (A) and quantitative results (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

ROS 水平的影响见图 10。与对照组比较，模型组中 ROS 的含量显著升高（$P<0.01$），表明 LPS 处理可导致 HUVECs 产生氧化应激反应，从而造成细胞损伤。与模型组比较，THSWD 处理后，ROS 水平显著下降（$P<0.01$）。说明 THSWD 能够抑制 LPS 处理后的 HUVECs 中 ROS 的生成，保护内皮细胞。

3.2.5　THSWD 对 LPS 处理后的 HUVECs 中黏附分子的影响　与对照组比较，模型组中 VCAM-1 和 ICAM-1 表达明显增加（$P<0.01$），与模型组比较，THSWD 显著减少了 LPS 诱导的 HUVECs 中 VCAM-1（$P<0.01$）和 ICAM-1（$P<0.05$）的表达（图 11），而这 2 种黏附分子可以增强 HUVECs 对血小板的黏附，表明 THSWD 可能抑制 LPS 诱导的 HUVECs 与血小板的黏附反应。

3.2.6　THSWD 对 LPS 处理后的 HUVECs 与血小板黏附的影响　如图 12 所示，与对照组比较，经 LPS 处理的模型组中 HUVECs 与血小板的黏附性

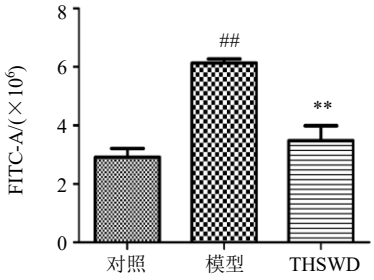


图 10　HUVECs 中 ROS 测定结果($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10　ROS determination results in HUVECs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

显著增加（$P<0.01$）。与模型组比较，THSWD 给药后显著降低了这种作用（$P<0.05$）。

4　讨论

课题组前期开展了 THSWD 临床研究文献计量学分析，发现其在血栓性疾病的临床应用有 60 余篇文献报道，且治疗效果显著[14]，但其抗血栓的作用机制尚不清晰。因此，本研究以活血化瘀经典

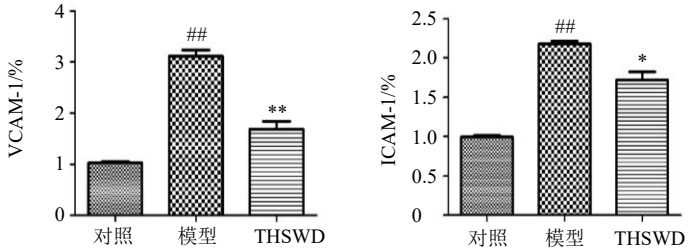


图 11　HUVECs 中黏附分子测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 11　Results of focal adhesion molecule determination in HUVECs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

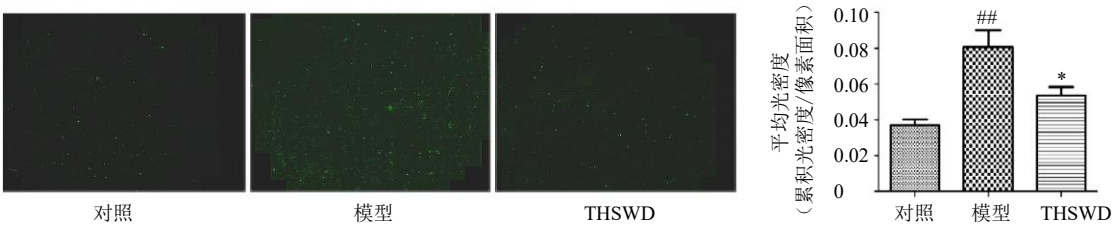


图 12　HUVECs 与血小板黏附荧光图（×1.3）与定量测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 12　Fluorogram of HUVECs adhesion to platelets (× 1.3) and results of quantitative measurement ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

方剂 THSWD 为研究对象，基于其应用于血栓性疾病的优良疗效，探索其抗血栓的作用机制，以期为 THSWD 治疗血栓性疾病提供实验基础。

采用角叉菜胶制备的小鼠血栓模型不需要进行手术等复杂操作且对动物造成创伤小，尾部血栓程度易于观察和测量[15]。角叉菜胶可诱导机体组织急性炎症反应，炎症因子释放入血后，可损伤血管内皮细胞并导致血栓形成[16]。故本研究通过 ip 卡拉胶溶液诱导小鼠组织血管血栓形成，在探索卡拉胶注射浓度中，本研究分别对文献中记载的 50、100、150、200 mg/kg 剂量进行探索[17]，发现 50 mg/kg 注射 12 h，24 h 后尾尖未变黑，与 ip 前相比无明显变化。ip 24 h 后，100 mg/kg 尾尖微黑；150 mg/kg 卡拉胶的黑尾长度较长，但仍未达到理想的黑尾长度，200 mg/kg 卡拉胶 ip 24 h 后，黑尾较明显且致死率较低，故最终采用 200 mg/kg 的卡拉胶注射浓度。

细胞因子是一类在细胞与细胞间传递信息、具有调节免疫等效应功能的蛋白质或小分子多肽。正常情况下，它们可以在细胞间传递信息，从而调节细胞的各项生理反应，以达到提高机体的免疫力的作用，但在受到外界条件刺激后，可能会引起炎症、发烧、休克等病理现象[18]。细胞因子表达的激活，已被证明与血栓形成风险的增加相关。在本研究中，THSWD 处理显著降低了小鼠肝脏 HMGB1 的表达以及血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的水平，这 4 种细胞因子均与炎症反应密切相关。HMGB1 是一种众所周知的损伤相关细胞因子，在病理条件下，它可以从免疫细胞或死亡细胞中释放出来，并激活先天免疫系统，发挥致炎作用，触发血管损伤，诱使血栓形成[19-20]。TNF-α 可刺激内皮细胞释放 HMGB1，而 HMGB1 也可刺激内皮细胞分泌 TNF-α[21]。因此，HMGB1 和 TNF-α 可协同促炎，加重血管内皮细胞的损伤，促进血栓形成。此外，TNF-α 通过其受体促进巨噬细胞释放 IL-6、IL-1β 等细胞炎症因子，从而诱导巨噬细胞、内皮细胞等细胞的激活，加重血管内皮损伤和血栓形成[22]。这些表明 THSWD 的抗血栓形成作用可能与抑制炎症反应、保护血管内皮细胞有关。同时，通过肺组织的 qRT-PCR 结果发现，THSWD 还能降低组织中的 NF-κB 和 NLRP3 表达，NF-κB 调控多种基因并在免疫调节和炎症反应中发挥着重要作用[23]，NLRP3 在各种炎症性疾病中起关键作用，如动脉粥样硬化症、阿尔茨海默症等[24]，进一步证实了 THSWD 抗血栓与其抗炎作用相关。

除了炎症反应，血栓形成过程中，还伴随着纤溶能力的减弱，于是，本研究对血清中组织型纤溶酶原激活剂（tissue plasminogen activator，TPA）[25] 进行了检测分析，结果发现 THSWD 能显著逆转卡拉胶造模后 TPA 表达水平的减少，初步表明

THSWD 也可通过恢复纤溶酶原激活因子的水平而发挥其抗血栓作用。同时，本实验发现 THSWD 抗卡拉胶所致小鼠血栓的效果优于阿司匹林，有几项研究所用药物和阿司匹林的效果比较与我们的结果一致，这可能是因为卡拉胶损伤血管内皮细胞，诱发凝血和纤溶，从而引起血栓，而阿司匹林抗血栓的主要机制为抑制血小板聚集，在该血栓模型仅起部分作用[26-27]。因此需要开展 THSWD 对血小板以及与内皮细胞的相互作用来进一步揭示 THSWD 对血栓的作用机制。

氧化应激反应在血小板活化、聚集中起着关键作用。SOD 属于金属蛋白酶家族，在清除 ROS、减少氧化应激、保护组织免受损伤中发挥重要作用。有研究表明凝血酶的加入会抑制 SOD 活力[28]。同时，血小板具有一定的收缩能力，当其被活化以后，血小板内的 Ca^{2+}浓度会明显增高，从而引起血小板收缩反应，又称为血小板凝块回缩[29]。细胞外信号调节激酶 1/2（ERK1/2）和蛋白激酶 B（PKB 或 Akt）的激活也与血小板聚集相关。因此，降低 ERK1/2 或 Akt 活性（磷酸化）可以减弱血小板的活化/聚集[30]。本实验的研究结果表明 THSWD 可以增加由凝血酶激活的血小板中 SOD 的活性，从而抑制血小板的氧化应激反应，抑制血小板活化。此部分预实验的结果表明，在设定的 5 个 THSWD 质量浓度（生药量 1.725、3.450、6.900、13.800、27.600 mg/mL）中，27.600 mg/mL 的 THSWD 质量浓度可以恢复 SOD 活力至接近对照组的正常值水平。在此质量浓度下，进一步开展相关实验，研究结果表明 THSWD 可以抑制血小板收缩，降低 ERK1/2 和 Akt 的表达水平，从而减少血小板的活化与聚集。

ROS 的异常升高也受氧化应激反应影响。在血管损伤过程中，血管内皮细胞可产生 ROS，刺激血小板活化[31]。此外，在 LPS 的刺激下，内皮细胞可分泌黏附分子，如 VCAM-1 和 ICAM-1，可触发血小板黏附于内皮细胞，加速血小板向损伤的内皮细胞的聚集[32]。此部分预实验的结果表明，在设定的 5 个 THSWD 质量浓度（生药量 1.935、3.870、7.740、15.480、30.960 mg/mL）中，7.740 mg/mL 的 THSWD 浓度可以显著抑制 ROS 生成，并接近对照组正常值。在此浓度下，进一步开展相关实验，研究结果表明 THSWD 可以减少 LPS 刺激后 HUVECs 中 ROS、VCAM-1 与 ICAM-1 的含量，并且通过荧光染色进一步证明了 THSWD 可以减少内皮细胞与血小板的黏附。

综上，本研究发现 THSWD 对如图 13 所示血栓形成的机制发挥作用。其药效机制主要包括抑制炎症反应、促进纤维蛋白溶解、抗血小板聚集、抗氧化应激、保护血管内皮细胞、抑制内皮细胞与血小板黏附。

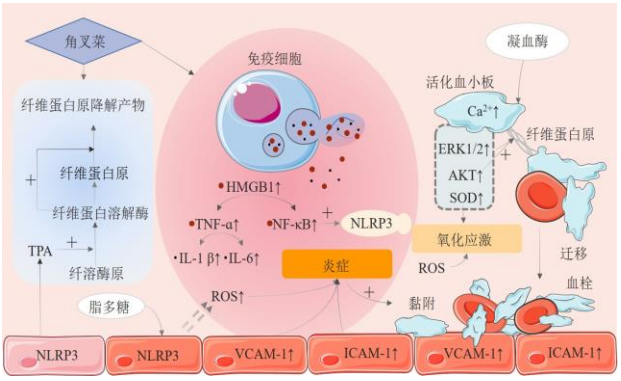


图 13　THSWD-血栓形成相关作用机制

Fig. 13　Mechanism of THSWD on thrombosis

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Faber D R, de Groot P G, Visseren F L. Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis [J]. *Obes Rev*, 2009, 10(5): 554-563.

[2] Jørgensen L. The role of platelets in the initial stages of atherosclerosis [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(7): 1443-1449.

[3] Koupenova M, Kehrel B E, Corkrey H A, *et al*. Thrombosis and platelets: An update [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 785-791.

[4] 清·柴得华原著，于峥，魏民，杨威校注. 妇科冰鉴 [M]. 北京：人民军医出版社, 2012: 11-13.

[5] 韩岚，许钒，章小兵，等. 桃红四物汤活血化瘀作用的实验研究 [J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(1): 36-38.

[6] 郭子悦. 桃红四物汤联合抗凝溶栓治疗下肢骨折合并周围型深静脉血栓形成的疗效观察 [D]. 南京：南京中医药大学, 2022.

[7] 刘晶梅. 桃红四物汤治疗心血瘀阻型稳定性冠心病疗效观察 [J]. 北方药学, 2019, 16(4): 44-45.

[8] 王升菊，郑雨，段赟，等. 基于组方药味古今炮制工艺的经典名方桃红四物汤质量差异性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4201-4209.

[9] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表（7首方剂）》的通知 [EB/OL]. (2020-11-10) [2024-06-01]、http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-

10/18132.html

[10] 何瑶, 江华娟, 成颜芬, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化经典名方桃红四物汤煎煮工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6845-6855.

[11] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 25.

[12] Wei X H, Zhang B P, Wei F Y, *et al*. Gegen Qinlian pills alleviate carrageenan-induced thrombosis in mice model by regulating the HMGB1/NF-κB/NLRP3 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154083.

[13] Zhang Y L, Xi M Z, Choi Y B, *et al*. Antithrombotic effect of fermented *Ophiopogon japonicus* in thrombosis-induced rat models [J]. *J Med Food*, 2017, 20(7): 637-645.

[14] 杜克群, 江华娟, 李敏敏, 等. 基于文献计量学的桃红四物汤临床应用研究现状分析 [J]. 中药与临床, 2020, 11(6): 87-91.

[15] 刘蕾, 丁世兰, 陈影, 等. 注射用血栓通抑制血栓形成及其对血流状态影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2446-2453.

[16] 曹文理, 李菁. 重组水蛭素的抗血栓形成作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(4): 371-374.

[17] 刘光荣, 杨亚军, 刘希望, 等. 角叉菜胶不同剂量对其诱导血栓模型建立的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(24): 2293-2296.

[18] 朱彤波. 医学免疫学 [M]. 第 2 版. 成都: 四川大学出版社, 2017: 2.

[19] Kim S W, Lee J K. Role of HMGB1 in the interplay between NETosis and thrombosis in ischemic stroke: A review [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1794.

[20] Stark K, Philippi V, Stockhausen S, *et al*. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice [J]. *Blood*, 2016, 128(20): 2435-2449.

[21] Luan Z G, Zhang H, Yang P T, *et al*. HMGB1 activates nuclear factor-κB signaling by RAGE and increases the production of TNF-α in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(12): 956-962.

[22] Chen X, Han R F, Hao P, *et al*. Nepetin inhibits IL-1β induced inflammation via NF-κB and MAPKs signaling pathways in ARPE-19 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 87-93.

[23] Ellulu M S. Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: A review of facts and underlying mechanisms [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(3): 313-328.

[24] Grebe A, Hoss F, Latz E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(12): 1722-1740.

[25] Lim H I, Hajjar K A. Annexin A2 in fibrinolysis, inflammation and fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6836.

[26] Arslan R, Bor Z, Bektas N, *et al*. Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model [J]. *Thromb Res*, 2011, 127(3): 210-213.

[27] Ma N, Liu X W, Yang Y J, *et al*. Preventive effect of aspirin eugenol ester on thrombosis in κ-carrageenan-induced rat tail thrombosis model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133125.

[28] Tesfamariam B, DeFelice A F. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders [J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 46(4): 229-237.

[29] Nurden P, Stritt S, Favier R, *et al*. Inherited platelet diseases with normal platelet count: Phenotypes, genotypes and diagnostic strategy [J]. *Haematologica*, 2021, 106(2): 337-350.

[30] Yin H, Stojanovic A, Hay N, *et al*. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation [J]. *Blood*, 2008, 111(2): 658-665.

[31] Bettiol A, Galora S, Argento F R, *et al*. Erythrocyte oxidative stress and thrombosis [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2022, 24: e31.

[32] Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation [J]. *Circ Res*, 2007, 101(7): 654-662.

[责任编辑 罗 曦]