

# 基于 HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF 通路探讨腰痹通胶囊改善深静脉血栓形成的作用机制

代斌斌, 朱高双, 谢攀, 李娟, 黄醒, 刘涵星, 张新庄, 曹亮, 王振中, 范小雪\*, 肖伟\*  
中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室(江苏康缘药业股份有限公司), 江苏南京 211112

**摘要:**目的 探讨腰痹通胶囊(Yaobitong Capsules, YBT)对深静脉血栓形成(deep vein thrombosis, DVT)的干预作用及其分子机制。方法 采用大鼠下肢深静脉结扎模型、苯肼诱导的斑马鱼血瘀模型和氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤模型多维度评价YBT的作用。大鼠下肢深静脉结扎模型中,采用血栓质量与长度比值、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色评估血栓病理改变;检测凝血六项、血浆组织因子(tissue factor, TF)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )等指标。斑马鱼血瘀模型中,以邻联茴香胺染色和共聚焦成像观察红细胞瘀滞与血小板聚集情况;qRT-PCR检测凝血相关基因(*fga*、*fgb*、*fgg*、*f2*)表达。OGD诱导的HUVEC细胞损伤模型中,采用qRT-PCR、Western blotting和免疫荧光检测TF、VCAM-1、ET-1、HIF-1 $\alpha$ 的表达及核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)p65的磷酸化与核转位情况。结果 在大鼠下肢深静脉结扎模型中,YBT能够降低血栓质量与长度比值,改善组织病理变化( $P<0.05$ ),延长活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)( $P<0.001$ ),降低纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、D-二聚体(D-Dimer)、纤维蛋白降解产物(fibrinogen and fibrin degradation products, FDP)、TF、ET-1、sVCAM-1、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MDA和HIF-1 $\alpha$ 水平( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),并提高SOD活性( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。在斑马鱼血瘀模型中,YBT能够显著增加斑马鱼心脏红细胞染色强度与循环血小板数目( $P<0.001$ ),并下调凝血相关基因的表达( $P<0.01$ 、 $0.001$ )。在OGD诱导的HUVEC细胞损伤模型中,YBT能够下调TF、VCAM-1、ET-1、HIF-1 $\alpha$ 的mRNA表达( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),下调TF与HIF-1 $\alpha$ 的蛋白表达( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ),并抑制NF- $\kappa$ B p65的磷酸化及核转位( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。结论 YBT可能通过抑制HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF信号轴(下调HIF-1 $\alpha$ 表达,抑制NF- $\kappa$ B p65磷酸化及核转位,进而减少TF过度表达),减轻缺氧-炎症级联反应,保护血管内皮功能并改善高凝状态,从而有效抑制DVT。

**关键词:** 腰痹通胶囊; 深静脉血栓形成; 凝血功能; 缺氧; 炎症; HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF 信号轴

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1759-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.015

## Mechanism of Yaobitong Capsules against deep vein thrombosis via HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF pathway

DAI Binbin, ZHU Gaoshuang, XIE Pan, LI Juan, HUANG Xing, LIU Hanxing, ZHANG Xinzhuang, CAO Liang, WANG Zhenzhong, FAN Xiaoxue, XIAO Wei

State Key Laboratory of Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd.), Nanjing 211112, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of Yaobitong Capsules (腰痹通胶囊, YBT) on deep vein thrombosis (DVT). **Methods** Multi-scale evaluation of the effect of YBT was conducted using a rat lower limb deep vein ligation model, a zebrafish blood stasis model induced by phenylhydrazine, and an oxygen glucose deprivation (OGD)-induced human umbilical vein

收稿日期: 2025-11-12

基金项目: 江苏省基础研究计划自然科学基金-前沿引领技术基础研究专项(BK20232014)

作者简介: 代斌斌, 男, 助理工程师, 研究方向为药物筛选与药效评价。E-mail: daibinbin9851@163.com

\*通信作者: 肖伟, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药研发及过程质量控制。E-mail: kanionlunwen@163.com

范小雪, 女, 主管药师, 研究方向为药物筛选与药效评价。E-mail: 13914779902@163.com

endothelial cell (HUVEC) injury model. In the rat lower limb deep vein ligation model, the ratio of thrombus weight to length and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to evaluate the pathological changes of thrombus. Six coagulation parameters, plasma tissue factor (TF), endothelin-1 (ET-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and other indicators were detected. In the zebrafish blood stasis model, the stasis of red blood cells and platelet aggregation were assessed via o-dianisidine staining and confocal microscopy, respectively. qRT-PCR was employed to measure the expressions of coagulation-related genes (*fga*, *fgb*, *fgg*, *f2*). In the OGD induced HUVEC cell injury model, qRT-PCR, Western blotting and immunofluorescence were used to detect the expressions of TF, VCAM-1, ET-1, HIF-1 $\alpha$ , as well as the phosphorylation and nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65. **Results** In the rat model of deep vein ligation of the lower limbs, YBT could reduce the ratio of thrombus weight to length, improve histopathological changes ( $P < 0.05$ ), prolong activated partial thromboplastin time (APTT) ( $P < 0.001$ ), reduce fibrinogen (FIB), D-dimer, fibrinogen and fibrin degradation products (FDP), TF, ET-1, sVCAM-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MDA and HIF-1 $\alpha$  levels ( $P < 0.01, 0.001$ ), and increase SOD activity ( $P < 0.05, 0.01$ ). In the zebrafish blood stasis model, YBT could significantly increase cardiac erythrocyte staining intensity and circulating platelet number ( $P < 0.001$ ), and down-regulate the expressions of coagulation related genes ( $P < 0.01, 0.001$ ). In the OGD induced HUVEC cell injury model, YBT could down-regulate the mRNA expressions of *TF*, *VCAM-1*, *ET-1* and *HIF-1 $\alpha$*  ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), down-regulate the protein expressions of TF and HIF-1 $\alpha$  ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), inhibit the phosphorylation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65 ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** YBT may effectively inhibit DVT by inhibiting HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF axis (down-regulating HIF-1 $\alpha$  expression, inhibiting NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation and nuclear translocation, thereby reducing TF overexpression), alleviating the hypoxia inflammation cascade, protecting endothelial function, and improving hypercoagulability.

**Key words:** Yaobitong Capsules; deep vein thrombosis; coagulation; hypoxia; inflammation; HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF axis

深静脉血栓形成 (deep vein thrombosis, DVT) 是血液在深静脉内异常凝集导致的静脉回流障碍性疾病, 以下肢最为常见<sup>[1]</sup>。其起病隐匿, 典型表现为突发肿痛, 发病率已升至 10.3%, 骨科术后更骤增至 32%~68%, 为围术期首位血管并发症。一旦脱落, 可引发致死性肺栓塞或脑梗死, 严重威胁患者生命<sup>[2]</sup>。血液高凝、血流瘀滞及静脉壁损伤三重机制交互作用, 是 DVT 发生与复发的核心病理基础<sup>[3]</sup>。现行临床策略仍以血栓形成后的抗凝、溶栓为主, 肝素、华法林、尿激酶等虽疗效确切, 却伴随出血、肝肾功能损害等局限<sup>[4]</sup>, 亟需开发安全、可早期干预的新型药物。而许多活血化瘀类中药在治疗 DVT 方面已取得较好的临床实践效果<sup>[5-6]</sup>。

腰痹通胶囊 (Yaobitong Capsules, YBT) 由三七、川芎、延胡索、白芍、狗脊、熟地黄、独活、牛膝组成, 具有活血化瘀、祛风除湿、行气止痛的功效, 临床用于治疗血瘀气滞型腰痛<sup>[7-8]</sup>。方中三七总皂苷被证实具有多途径抗血栓作用, 包括调节内皮细胞功能、抑制血小板黏附、释放与聚集、促进纤维蛋白溶解、降低血液黏度及改善红细胞指标<sup>[9]</sup>。川芎则通过抑制血小板聚集、阻断斑块内血管新生及促进纤溶过程, 从而防治血栓形成, 改善血管梗死状态及全身血液循环<sup>[10]</sup>。延胡索提取物亦被报道可通过调控血管内皮细胞凋亡及抑制组织因子表

达, 发挥抗血栓效应<sup>[11]</sup>。在斑马鱼模型中, 白芍显示出促血管生成与抗血栓的双重活性<sup>[12]</sup>。狗脊中水溶性成分原儿茶酸与 3,4-二羟基苯甲醛能有效抑制血小板凝集, 防止血栓形成<sup>[13]</sup>。熟地黄可显著降低血小板黏附与聚集, 增强其活血化瘀功效<sup>[14]</sup>。独活所含香豆素类成分亦表现出显著的血小板聚集抑制活性, 进而发挥心血管保护作用<sup>[15]</sup>。上述研究提示, YBT 所含多味药材均具备抗血栓的潜力, 为其治疗 DVT 提供了理论依据。本研究拟整合大鼠下肢深静脉结扎模型、斑马鱼血瘀模型与人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 缺氧模型, 系统评价 YBT 的作用, 并聚焦缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) p65/组织因子 (tissue factor, TF) 信号轴, 解析其抗凝、抗炎、抗氧化、保护内皮的多环节机制, 为 YBT 临床预防及治疗 DVT 提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞与动物

HUVEC 细胞 (批号 20241024) 由上海安为生物科技有限公司提供。

斑马鱼胚胎为受精后 48 h (48 h post-fertilization, 48 hpf) 的野生型胚胎和血小板转基因品系胚胎, 分别由中国药科大学和南京一树梨花生

物科技有限公司提供, 孵育温度为 28.5 °C。

SPF 级雄性 SD 大鼠 56 只, 体质量 180~220 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 20250401Aazz06190000191, 实验动物许可证号 SCXK(浙)2024-0001, 饲养于 SPF 环境中, 室温 22~26 °C, 相对湿度 40%~60%, 大鼠分笼饲养, 每笼 4 只。动物实验方案经江苏康缘药业股份有限公司机构动物护理与使用委员会批准(批准号 2025032807)。

## 1.2 药品与试剂

YBT(国药准字 Z20010045, 批号 250114)由江苏康缘药业股份有限公司提供; 利伐沙班片(批号 BJ79224、BJ79453)购自德国 Bayer AG 公司; 异氟烷(批号 2024060701)购自瑞沃德生命科技股份有限公司; 纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)检测试剂盒、凝血酶时间(thrombin time, TT)检测试剂盒、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)检测试剂盒、纤维蛋白降解产物(fibrinogen and fibrin degradation products, FDP)检测试剂盒、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)检测试剂盒、D-二聚体(D-Dimer)检测试剂盒(批号分别为 241201800、241001100、241209601、240806300、240808800、241006300)购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; HIF-1 $\alpha$ 检测试剂盒、TF 检测试剂盒(批号分别为 L514AD0362、L521AD0358;)购自生工生物工程股份有限公司; 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)检测试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )检测试剂盒、IL-1 $\beta$ 检测试剂盒、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)检测试剂盒、可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)检测试剂盒(批号分别为 20240705、20250519、20250220、20250528、20250605)购自南京建成生物工程研究所; 内皮细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、内皮细胞生长添加剂、青霉素/链霉素溶液(批号分别为 41333、41356、41183、41245)购自美国 ScienCell 公司; 无糖 DMEM 培养基(批号 2821945)购自美国 Gibco 公司; 柱式法 RNA 提取试剂盒、定量 PCR 反转录专用反转录试剂盒(批号分别为 AM90890A、AM90890A)购自日本 Takara 生物技术公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)

检测试剂盒、免疫染色通透液(Triton X-100)、DAPI 染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、噻唑蓝(批号分别为 A089250305、A221250326、090222221101、113021110321、090419191224、110123231205、091120201020、070921220315、A017A241127)购自碧云天生物技术有限公司; NF- $\kappa$ B p65 抗体、HIF-1 $\alpha$  抑制剂 PX-478、NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC、HIF-1 $\alpha$  抗体、p-NF- $\kappa$ B p65 抗体、TF 抗体(批号分别为 316453、780356、28990、793641、621222、854712)购自美国 MCE 公司; 核蛋白与胞质蛋白提取试剂盒、FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒、HiScript III RT SuperMix for gPCR(+gDNA wiper)试剂盒、Tag Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(批号分别为 7E0710D5、7E2172E5、7E1311L4、7E1891B5)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; E3 培养基(货号 SSJ013)购自南京一树梨花生物科技有限公司; 苯肼、*N*-苯基硫脲、3,3'-二甲氧基联苯胺、3-乙氧酰基苯胺甲磺酸盐、阿司匹林(批号分别为 E2305572、103274125、H2124132、K2507397、K2324099)购自上海阿拉丁生物科技有限公司; 醋酸钠(批号 XG3494272)购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

## 1.3 仪器

BY-R20 型高速离心机(北京白洋医疗器械有限公司); KJMR-II型血液混匀器(江苏天翎仪器有限公司); R550 型五通道麻醉机、DOM-1001 型体式显微镜(瑞沃德生命科技有限公司); C3100Vet 型兽用全自动凝血分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); BSM-220.4 型电子天平(上海卓精电子科技有限公司); Invitrogen Countess 自动细胞计数仪、3111 型恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱、Lighcycler 480 II QuantStudio<sup>®</sup> 3 型实时荧光定量 PCR 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); WCI-180T 型三气培养箱[维根技术(北京)有限公司]; Primo Vert 倒置显微镜(德国 ZEISS 公司); T100<sup>™</sup> Thermal Cycler PCR 仪、mini-protean tetra system 电泳系统、Gel Doc<sup>™</sup> XR+凝胶成像系统、Trans-blot SD cell 221BR 型半干转系统(美国 Bio Rad 公司); SpectraMax M2 型多功能读板机(美国 Molecular Devices 公司); FV3000 型共聚焦荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

## 2 方法

### 2.1 DVT 大鼠实验

**2.1.1 分组、造模与给药** 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为对照组、假手术组、模型组、利伐沙班 (1.063 mg/kg) 组和 YBT 低、中、高剂量 (196.88、393.75、787.50 mg/kg, 分别相当于 0.5、1、2 倍临床剂量) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组、假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水溶液, 1 次/d, 连续给药 14 d。给药第 12 天时, 按照文献方法<sup>[16-18]</sup>, 采用下腔静脉完全结扎法建立 DVT 大鼠模型, 具体操作如下: 大鼠麻醉后, 腹部切口, 分离下腔静脉和动脉, 左肾静脉下方结扎, 手术结束后缝合肌肉和皮肤并用碘伏消毒。假手术组除不结扎外, 其余操作一致。对照组未进行

任何手术干预, 仅在解剖取材时, 穿一根丝线做轻拉牵引, 方便截取。于末次给药次日取材。

**2.1.2 凝血六项检测** 大鼠经麻醉固定后, 开腹并经真空采血管采集血液样本。血液经离心分离血浆后, 用于检测 APTT、PT、TT、D-Dimer、FIB 和 FDP。

**2.1.3 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色** 观察组织病理变化 大鼠采集血液样本后, 仔细分离含血栓的下腔静脉, 吸干表面血液后, 精确测定血栓湿质量与长度, 并于 4% 多聚甲醛中固定保存。组织经固定、石蜡包埋及切片后, 进行 HE 染色, 观察血栓程度、炎症细胞浸润及血管壁结构与内皮完整性等病理形态学特征, 由专业人员依据表 1 标准进行评分与分级。

表 1 HE 病理评分分级标准

Table 1 Standard of HE pathological scoring

分值	血栓形成程度	炎症细胞浸润	血管壁结构与内皮完整性
0	血管通畅, 无血栓	血管壁及血栓周围未见炎症细胞	血管壁结构正常, 内皮细胞连续、完整、光滑
1	微小血栓, 血栓占据管腔面积 < 25%	极轻度浸润, 偶见炎症细胞附着于血管内膜或血栓表面	内皮细胞轻微肿胀或局灶性脱落 (<10%), 血管壁各层结构清晰
2	非闭塞性血栓, 血栓占据管腔面积 ≥ 25% 且 ≤ 50%	轻度浸润, 少量炎症细胞浸润至血栓表层或血管内膜	内皮细胞片状脱落 (10%~50%), 伴轻度血管壁水肿或平滑肌细胞排列轻度紊乱
3	部分闭塞性血栓, 血栓占据管腔面积 > 50% 且 ≤ 90%	中度浸润, 中等量炎症细胞弥漫浸润至血栓内部及血管壁全层	内皮细胞广泛脱落 (>50%), 血管壁中层结构明显紊乱、水肿增厚
4	完全闭塞性血栓, 血栓完全堵塞血管管腔 (>90%)	重度浸润, 大量炎症细胞弥漫性浸润, 并形成密集炎症聚集灶	血管壁结构严重破坏, 出现内膜断裂、中膜溶解、坏死或全层崩解

**2.1.4 血浆中相关因子检测** 按照试剂盒说明书检测大鼠血浆中 TF、ET-1、sVCAM-1、IL-6、IL-1β、TNF-α、SOD、MDA、HIF-1α 水平。

### 2.2 斑马鱼实验

**2.2.1 YBT 对斑马鱼胚胎毒性的影响** 将 48 hpf 的斑马鱼胚胎置于 6 孔板中, 每孔 30 尾, 每组设 3 个复孔, 对照组加入 4 mL E3 培养基, YBT 组加入由培养基稀释的系列质量浓度 (100、200、400、500、800、1 000 μg/mL) 药液。每隔 24 h 更换新鲜药液, 连续培养 48 h 后, 观察并统计每组死亡或发育畸形的胚胎, 计算胚胎死亡率。根据 YBT 在斑马鱼胚胎上的最大非致死浓度, 选择 100、200、400 μg/mL YBT 进行后续实验。

**2.2.2 分组、给药与斑马鱼血瘀模型的构建** 48 hpf 的斑马鱼胚胎随机分为对照组、模型组、阿司匹林 (40 μg/mL) 组和 YBT 低、中、高剂量 (100、200、400 μg/mL) 组。各给药组加入相应药物, 对照组和模型组加入 E3 培养基, 28.5 °C 孵育 36 h。参考文献中的造模方法<sup>[19-20]</sup>, 在 84 hpf 时, 模型组

加入 0.75 μmol/L 苯胍溶液, 各给药组加入相应药物和 0.75 μmol/L 苯胍溶液, 28.5 °C 孵育 12 h。

**2.2.3 qRT-PCR 检测相关基因表达** 收集各组胚胎样本, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。以 β-actin 为内参基因, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各基因的相对表达量。引物序列见表 2。

**2.2.4 红细胞邻联茴香胺染色** 收集各组胚胎样本, PBS 清洗, 加入 4% 多聚甲醛, 4 °C 固定过夜。PBST 清洗, 加入邻联茴香胺染色液, 孵育 5~10 min, PBST 清洗, 在体式显微镜下进行心脏红细胞染色成像, 利用 Image J 软件分析心脏红细胞染色强度。

**2.2.5 共聚焦成像** 造模及预给药结束后, 加入新鲜 E3 培养基清洗各组胚胎 3 遍, 在培养基中加入适量麻醉剂, 孵育 3~5 min 后, 将胚胎转移至共聚焦玻底培养皿中, 加入低熔点琼脂糖胶, 并使胚胎侧躺于皿底。待琼脂糖胶凝固后, 使用共聚焦显微镜进行尾部区域血小板的荧光成像。

表2 引物序列  
Table 2 Primer sequences

基因	种属	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	斑马鱼	F: TGGCCCATCCATCGTCCACAG R: CGCCATACAGAGCAGAAGCCA
<i>f2</i>	斑马鱼	F: TGGAAGGAAAACCTGAACCG R: TGAGGTCCAAGACTCCCAG
<i>fga</i>	斑马鱼	F: TTCAAGGCACAAGACACCTG R: TGGTCAGCTTTGTCCATGAG
<i>fgb</i>	斑马鱼	F: CGCCTTACAAGGTCTTCTGC R: TCTTCGGTAGTCGTCCCAAC
<i>fgg</i>	斑马鱼	F: GAAGAGCATTCTCGTCAGG R: TCTTTGCACATTTGGTCCAG
<i>HPRT1</i>	人	F: TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA R: ATCCAACACTTCGTGGGGTTC
<i>HIF-1α</i>	人	F: GCTTTAACTTTGCTGGCCCC R: TTTTCGTTGGGTGAGGGGAG
<i>VCAM-1</i>	人	F: TGTCATGGGCTGTGAATCCC R: CTCAGGGTCAGCGTGAATTT
<i>ET-1</i>	人	F: TTTGGGTCAACACTCCCAG R: CACGGTCTGTTGCCTTTGTG
<i>TF</i>	人	F: CTGCTTTGCCTGGACAACAC R: CCTGGTTGAGAAGCTCCAG

### 2.3 细胞实验

**2.3.1 细胞培养** HUVEC 细胞用 ECM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞长满约 90%, 进行消化离心, 按照 1:3 的比例进行传代。

**2.3.2 细胞活力检测** 对照组加入 100 μL 培养基或含 5% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 的培养基, YBT 组加入由培养基稀释的系列质量浓度 (12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL) 药液。培养 48 h 后, 弃去上清, 每孔加入 100 μL 含 MTS 的培养基, 于培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

**2.3.3 氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 诱导的 HUVEC 细胞模型的构建与给药** 对照组和模型组加入 2 mL 无血清的 ECM 培养基, 各给药组加入 2 mL 含 25、50、100 μg/mL YBT 或 50 μmol/L PDTC 或 25 μmol/L PX-478 无血清的 ECM 培养基, 于正常培养箱中培养 24 h。对照组更换为高糖无血清的 DMEM 培养基, 模型组更换为无糖无血清的 DMEM 培养基, 各给药组更换为用无糖无血清的 DMEM 培养基配制的药物。除对照组外, 其余各组放入 5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中分别培养 2、3、4 h, 收集样本, 用于后续指标检测。

**2.3.4 qRT-PCR 检测相关基因的表达** 收集各组细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。以 *HPRT1* 为内参基

因, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各基因的相对表达量。引物序列见表 2。

**2.3.5 免疫荧光染色检测 NF-κB p65 蛋白的表达** HUVEC 细胞传代消化后接入激光共聚焦培养皿, 正常培养 24 h, 至融合状态。按“2.3.3”项下方法处理后, 弃去培养基, 冷 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 30 min; 冷 PBS 洗涤 3 次, 加入 0.1% Triton-100, 室温孵育 15 min; 冷 PBS 洗涤 3 次, 加入山羊血清于室温封闭 30 min; 冷 PBS 洗涤 3 次, 加入荧光二抗, 室温避光孵育 2 h; 冷 PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI, 避光孵育 10 min; 冷 PBS 洗涤 3 次, 加入抗荧光淬灭剂, 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

**2.3.6 胞质与核蛋白提取及定量** 收集各组细胞样本, 采用试剂盒分别提取样本中的胞质蛋白及核蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量。

**2.3.7 Western blotting 检测相关蛋白表达** 收集细胞样本并提取蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量。加入 6×蛋白上样缓冲液, 混合均匀后, 煮沸 5 min 使蛋白变性。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 3% 牛血清白蛋白于室温封闭 2 h, 加入一抗, 于 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤后, 加入二抗, 室温孵育 2 h, 洗涤后滴加 ECL 显影液进行曝光, 采用 Image Lab 5.2.1 软件分析条带灰度值。

### 2.4 统计学分析

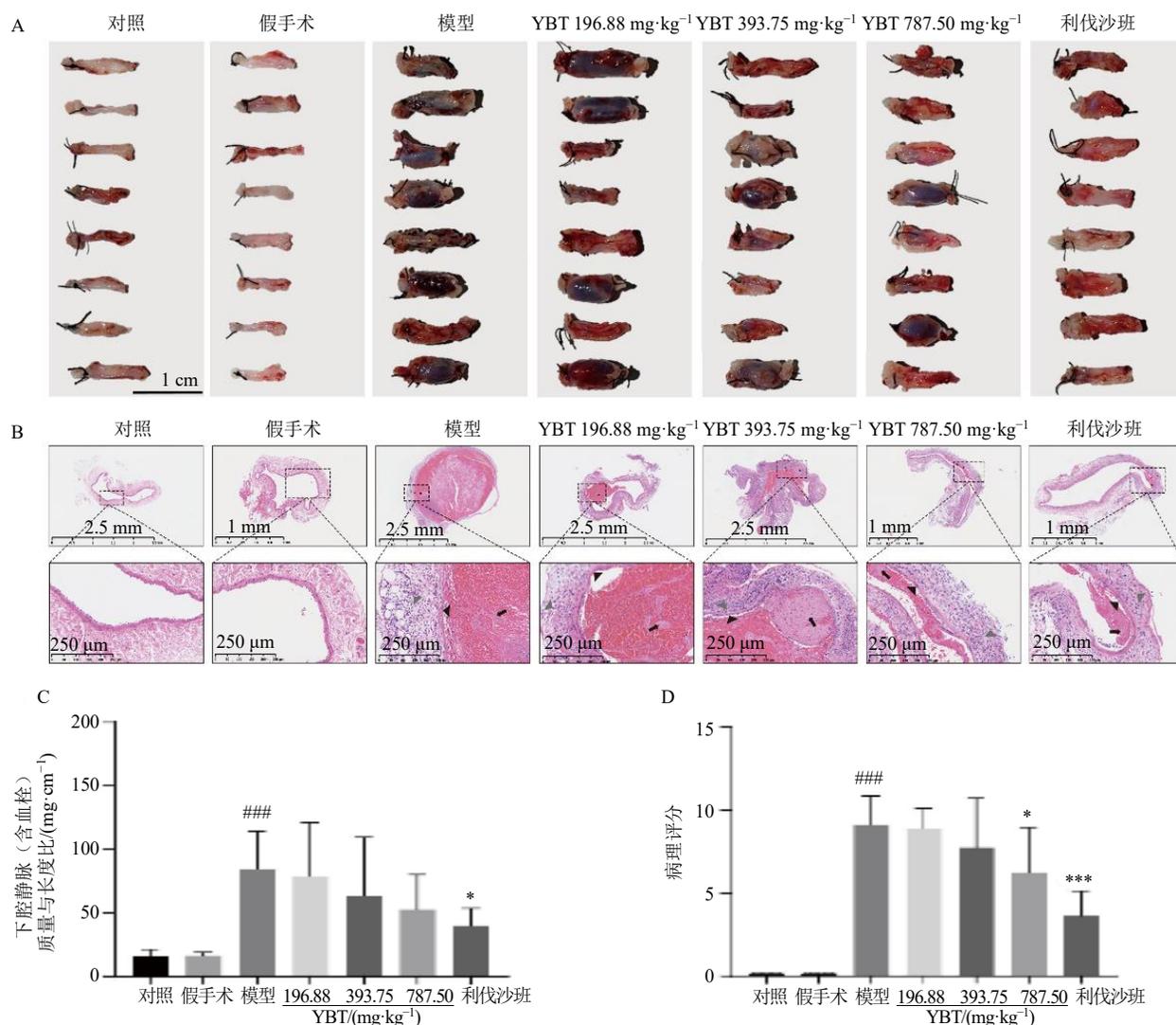
数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 8.2.1 统计软件, 选择单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验联合 Dunnett 的多重比较测试方法进行数据统计分析。

## 3 结果

### 3.1 YBT 对 DVT 大鼠模型下腔静脉血栓形成及血管病理改变的影响

如图 1-A、C 所示, 下腔静脉结扎 3 d 后, 模型组大鼠的血栓形成显著, 肉眼可见明显血栓, 静脉管壁呈青紫色, 伴有暗红色血栓, 血栓质量与长度比值显著升高 ( $P < 0.001$ ); YBT 各剂量组均显示出抑制下腔静脉结扎所致血栓形成的趋势。

如图 1-B、D 所示, 模型组大鼠血管腔内可见红色血栓与白色血栓共存, 呈现淡红色珊瑚状血小板小梁, 小梁间可见纤维素网内充斥大量红细胞,



A-大鼠下腔静脉（含血栓）外观；B-大鼠下腔静脉（含血栓）HE染色典型图像（局部放大图为×100），黑色箭头指示血栓程度，黑色三角形箭头指示内皮细胞脱落程度，灰色三角形指示外膜变性伴炎性细胞浸润程度；C-下腔静脉（含血栓）质量与长度比值；D-大鼠下腔静脉（含血栓）病理评分；与假手术或对照组比较：<sup>###</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ；与模型组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ，下同。

A-appearance of inferior vena cava (with thrombus) of rats; B-representative HE-stained image of inferior vena cava (with thrombus) of rats (magnified view is × 100), black arrows indicate thrombus extent, black triangles indicate degree of endothelial cell detachment, gray triangles indicate degree of adventitial degeneration with inflammatory cell infiltration; C-weight-to-length ratio of inferior vena cava (with thrombus); D-pathological score of inferior vena cava (with thrombus) of rats; <sup>###</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham or control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

图1 YBT对DVT大鼠模型下腔静脉血栓形成及血管病理改变的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of YBT on inferior vena cava thrombosis and vascular pathological changes in DVT rats model ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

血栓程度为重度，内皮细胞脱落严重，外膜出现轻度变性并伴有炎性细胞浸润。而经YBT干预后，上述病理变化得到改善，其中高剂量组具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

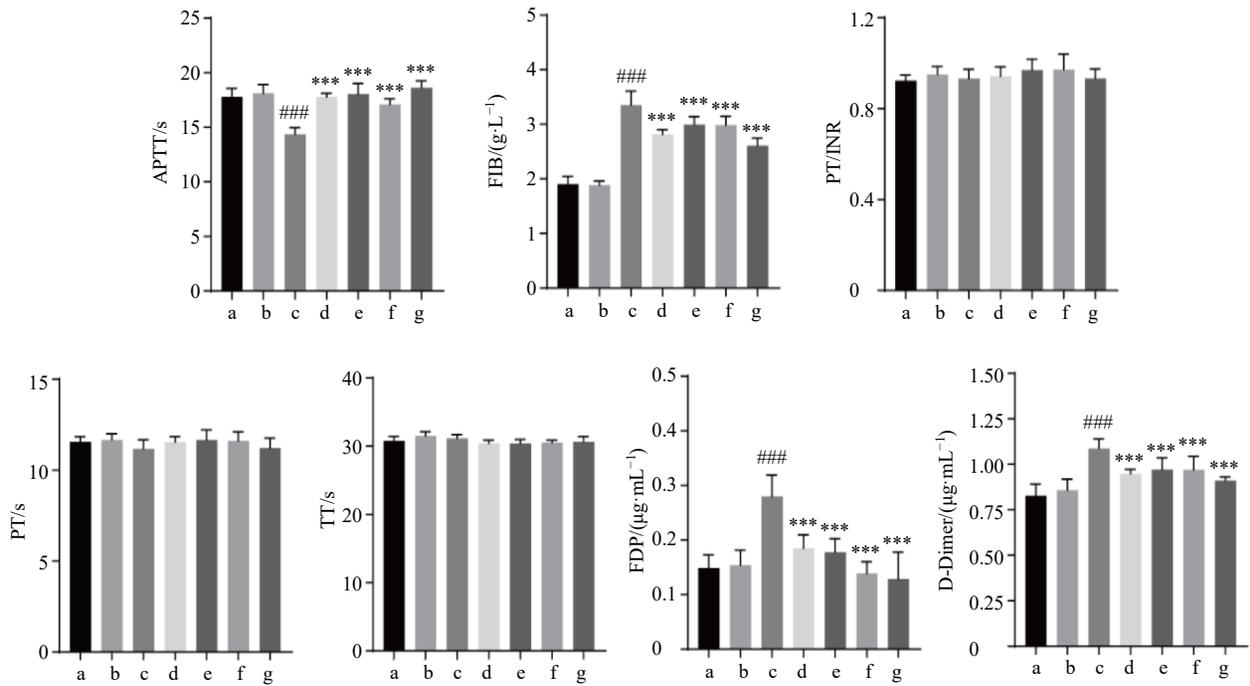
### 3.2 YBT对DVT大鼠模型凝血功能的影响

如图2所示，与假手术组比较，模型组大鼠血浆的APTT显著降低 ( $P < 0.001$ )，FIB、FDP及D-Dimer均显著升高 ( $P < 0.001$ )；与模型组比较，YBT

各剂量组大鼠血浆的APTT均显著升高 ( $P < 0.001$ )，FIB、FDP和D-Dimer显著降低 ( $P < 0.001$ )。表明预防性给予YBT能有效改善下腔静脉结扎所致大鼠凝血功能的异常状态。

### 3.3 YBT对DVT大鼠模型血浆内皮损伤、炎症及缺氧相关因子水平的影响

如图3-A~C所示，与假手术组比较，模型组大鼠血浆中TF、ET-1及sVCAM-1水平显著升高



a-对照组; b-假手术组; c-模型组; d-YBT 低剂量组; e-YBT 中剂量组; f-YBT 高剂量组; g-利伐沙班组, 图3同。

a-control group; b-sham group; c-model group; d-YBT low-dose group; e-YBT medium-dose group; f-YBT high-dose group; g-rivaroxaban group, same as Fig. 3.

图2 YBT对DVT大鼠模型凝血功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Effect of YBT on coagulation function in DVT rats model ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

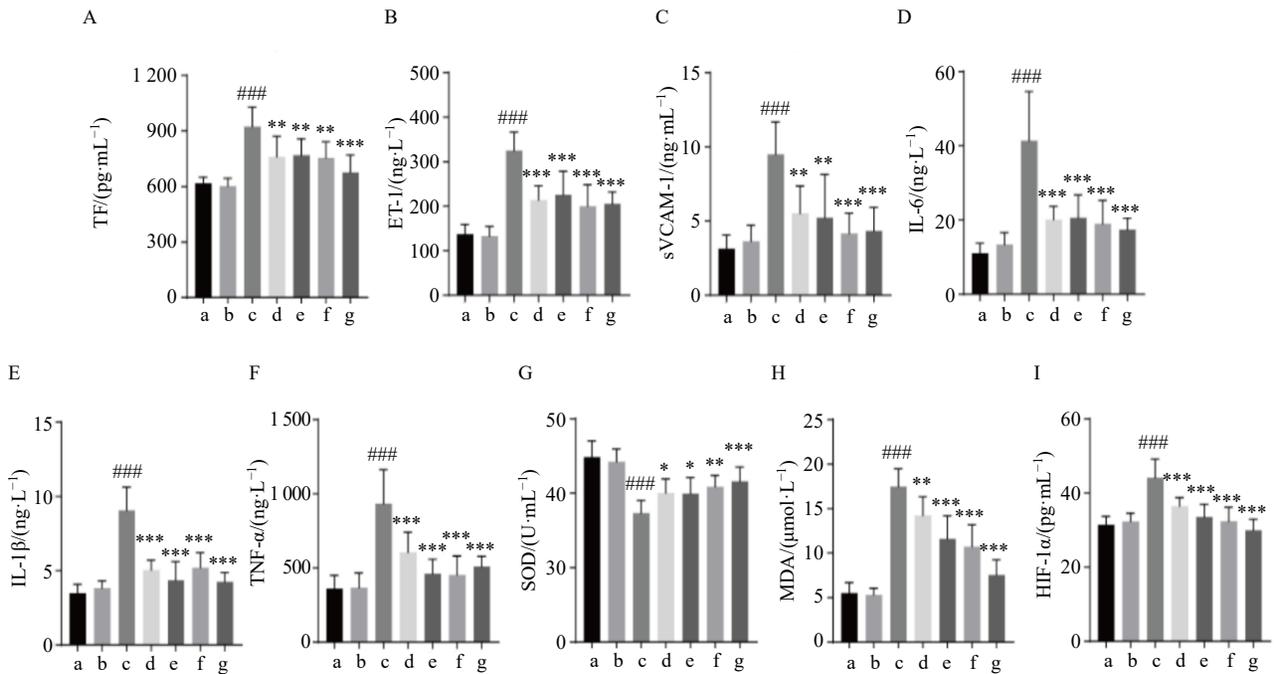


图3 YBT对DVT大鼠模型血浆内皮损伤(A~C)、炎症(D~F)及缺氧(G~I)相关因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Effect of YBT on levels of plasma endothelial injury (A—C), inflammatory (D—F) and hypoxia (G—I)-related factors in DVT rats model ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组 TF、ET-1 及 sVCAM-1 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 提示 YBT 能够有效缓解下腔静脉结扎所致的大鼠凝血级联关键触发因子 TF 含量升高及内皮细胞损伤。如图 3-D~F 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血浆中 IL-6、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组 IL-6、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 表明 YBT 对下腔静脉结扎所致的大鼠炎症反应具有明显的抑制作用。如图 3-G~I 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血浆中 SOD 活性显著降低 ( $P < 0.001$ ), MDA 和 HIF-1 $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组 SOD 活性显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), MDA 和 HIF-1 $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 提示 YBT 可有效改善下腔静脉结扎所致的大鼠氧化应激与缺氧损伤。

### 3.4 YBT 对斑马鱼胚胎毒性的影响

为了探究药物浓度对斑马鱼胚胎发育的影响, 在 48 hpf 时给予斑马鱼胚胎不同质量浓度的 YBT 药液, 处理 48 h 后统计死亡或发育畸形的胚胎数目。如图 4 所示, 500~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 YBT 溶液会导致胚胎的死亡率显著增加 ( $P < 0.001$ ), 因此选取 100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 个 YBT 给药质量浓度进行后续实验。

### 3.5 YBT 促进斑马鱼血瘀模型血小板循环并抑制凝血因子的表达

如图 5-A~D 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼胚胎心脏红细胞染色强度及循环血小板荧光

数目均显著降低 ( $P < 0.001$ ), 提示血瘀伴血小板滞留; 与模型组比较, YBT 各剂量组斑马鱼胚胎心脏红细胞染色强度显著升高 ( $P < 0.001$ ), YBT 中、高剂量组循环血小板数目显著升高 ( $P < 0.001$ ), 表明 YBT 可促进血小板再循环并阻止血瘀形成。如图 5-E 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼胚胎中凝血因子 *fga*、*fgb*、*fgg* 及 *f2* 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组斑马鱼胚胎中 *fga*、*fgb*、*fgg* 及 *f2* 的 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 提示 YBT 通过下调凝血级联关键基因表达, 逆转苯肼诱导的高凝状态。

### 3.6 YBT 对 HUVEC 细胞活力的影响

为判断药物浓度是否对 HUVEC 细胞产生毒性作用, 采用 MTS 法检测不同质量浓度 YBT 处理 HUVEC 细胞 48 h 后的细胞活力, 如图 6 所示, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  YBT 显著抑制细胞活力 ( $P < 0.01$ ), 因此选取 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  3 个给药质量浓度进行后续实验。

### 3.7 YBT 抑制 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 TF 的表达

如图 7 所示, 与对照组比较, OGD 4 h 后 HUVEC 细胞 TF 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组 TF 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 与 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 PX-478 和 NF- $\kappa\text{B}$  抑制剂 PDTC 的作用一致。表明 YBT 能在转录和蛋白水平上有效抑制 OGD 诱导的 TF 过度表达。

### 3.8 YBT 下调 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 VCAM-1、ET-1 的表达并抑制 NF- $\kappa\text{B}$ p65 活化

如图 8-A、B 所示, 与对照组比较, OGD 3 h 后 HUVEC 细胞 *VCAM-1* 和 *ET-1* 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组 *VCAM-1* 和 *ET-1* 的 mRNA 表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。

为进一步探究机制, 检测了 NF- $\kappa\text{B}$  p65 通路关键蛋白的磷酸化水平。如图 8-C 所示, 与对照组比较, OGD 3 h 后 HUVEC 细胞 p-p65/p65 值显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, YBT 中、高剂量组 p-p65/p65 值显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明 YBT 能够有效抑制 NF- $\kappa\text{B}$  p65 信号通路的活化。

### 3.9 YBT 抑制 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 NF- $\kappa\text{B}$ p65 核转位

通过免疫荧光染色观察发现, 与对照组比较,

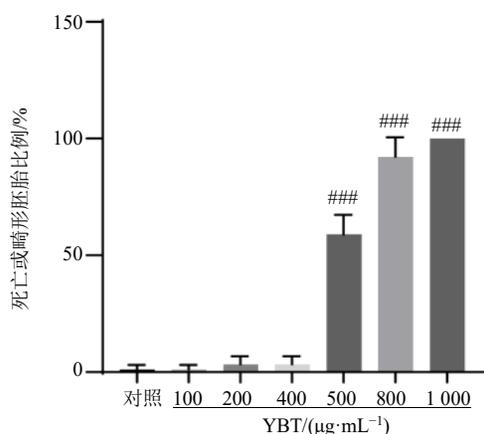
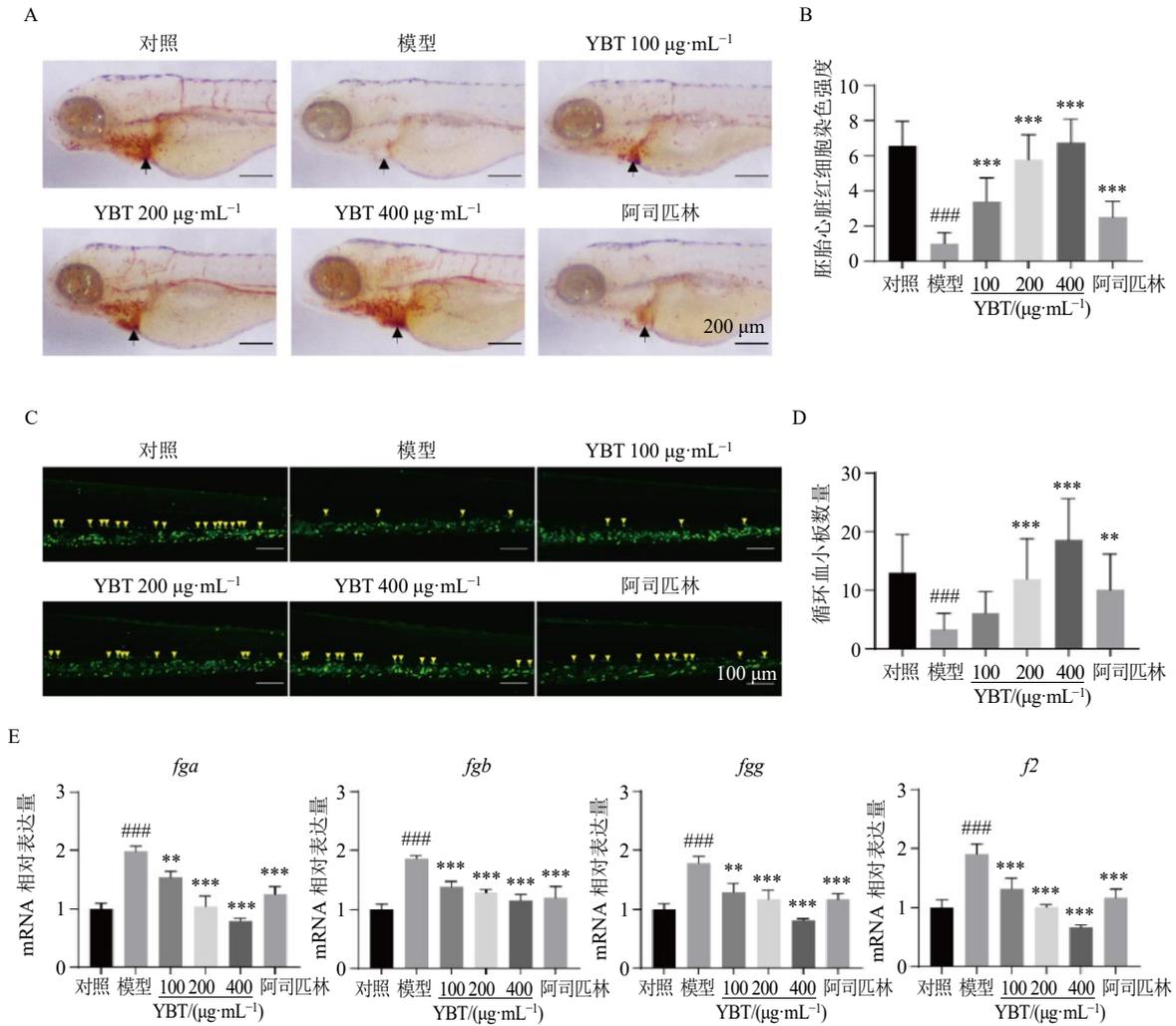


图 4 YBT 对斑马鱼胚胎毒性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of YBT on toxicity of zebrafish embryos ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-胚胎心脏红细胞染色代表图 (×50); B-胚胎心脏红细胞染色强度量化图; C-循环血小板代表图 (×100); D-循环血小板计数统计图; E-凝血级联关键基因表达。

A-representative image of erythrocyte staining in embryonic heart (×50); B-quantitative analysis of erythrocyte staining intensity in embryonic heart; C-representative image of circulating platelets (×100); D-statistical plot of circulating platelet counts; E-expressions of key coagulation cascade genes.

图5 YBT 促进斑马鱼血瘀模型血小板循环并抑制凝血因子的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Fig. 5 YBT promotes platelet circulation and suppresses expressions of coagulation factors in zebrafish blood stasis model ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

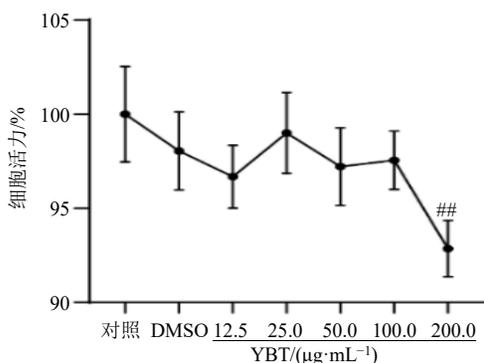


图6 YBT 对 HUVEC 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Effect of YBT on viability of HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

OGD 3 h 后 HUVEC 细胞呈现 NF-κB p65 蛋白核内聚集 (图 9-A); 而经 100 µg/mL YBT 处理后, NF-κB p65 核阳性细胞有所减少。Western blotting 核质蛋白分离实验进一步量化了这一现象, 与模型组比较, YBT 处理后细胞核内 NF-κB p65 蛋白表达下降 ( $P < 0.01$ , 图 9-B), 同时胞质内 NF-κB p65 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )。表明 YBT 通过阻止 NF-κB p65 亚基向细胞核内转位, 从而抑制其转位。

### 3.10 YBT 下调 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 HIF-1α 的表达

如图 10 所示, 与对照组比较, OGD 2 h 后 HUVEC 细胞 HIF-1α 的 mRNA 和蛋白表达水平显

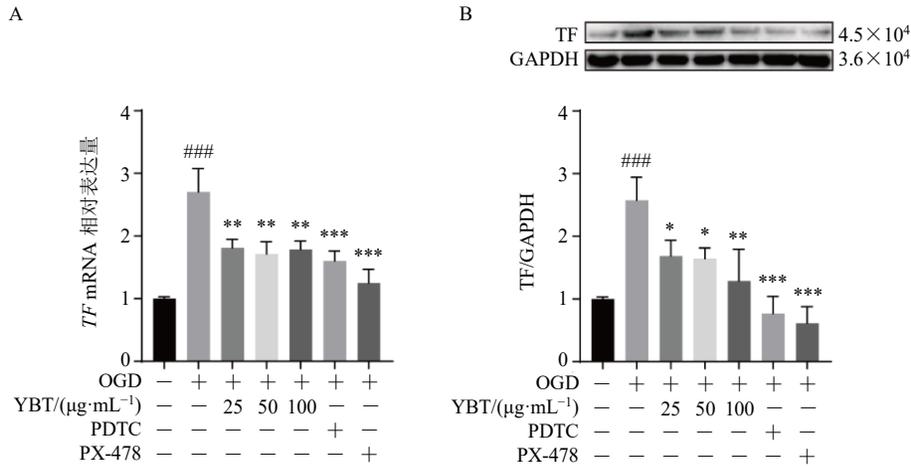


图7 YBT抑制 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 TF mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 7 YBT inhibits TF mRNA (A) and protein (B) expressions in OGD-induced HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

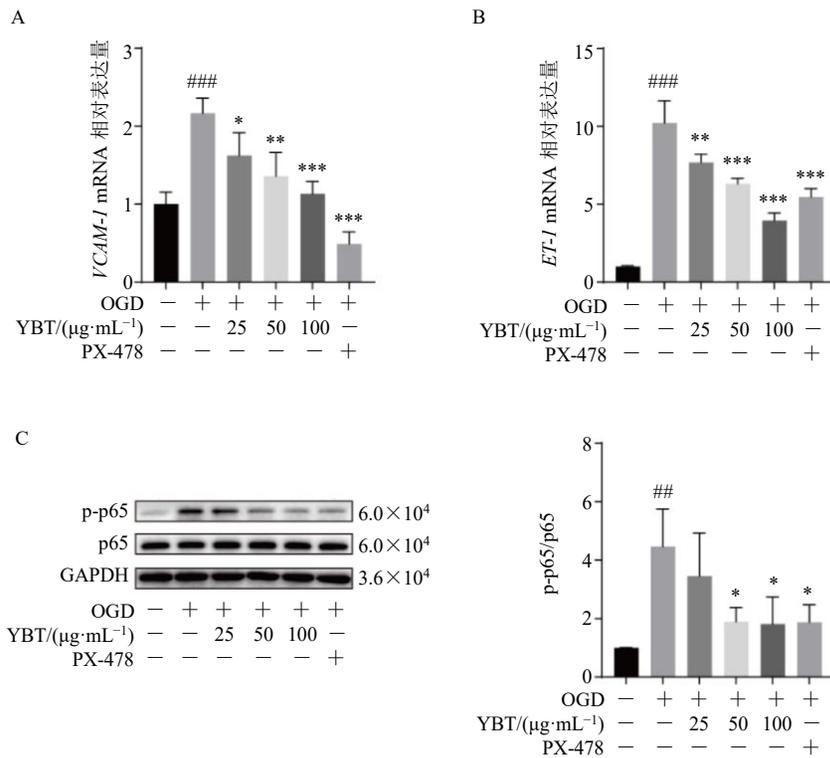


图8 YBT 下调 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 VCAM-1、ET-1 的表达 (A、B) 并抑制 NF- $\kappa$ B p65 活化 (C) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 8 YBT down-regulates VCAM-1, ET-1 expressions (A, B) and inhibits NF- $\kappa$ B p65 activation (C) in OGD-induced HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

著升高 ( $P < 0.01, 0.001$ ); 与模型组比较, YBT 各剂量组 *HIF-1 $\alpha$*  的 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), YBT 中、高剂量组 *HIF-1 $\alpha$*  的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01, 0.001$ ), 表明 YBT 能够有效抑制缺氧条件下 *HIF-1 $\alpha$*  的积累。

以上结果表明, YBT 通过抑制 *HIF-1 $\alpha$*  的表达,

进而阻遏 NF- $\kappa$ B p65 信号的活化 (表现为 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化及核转位减少), 最终下调其下游靶基因 TF、VCAM-1 和 ET-1 的过度表达。这一作用于“*HIF-1 $\alpha$* /NF- $\kappa$ B p65/TF”轴的级联反应, 是 YBT 减轻 OGD 诱导的 HUVEC 细胞促凝、促炎表型, 从而发挥血管内皮保护作用的重要细胞分子机制。

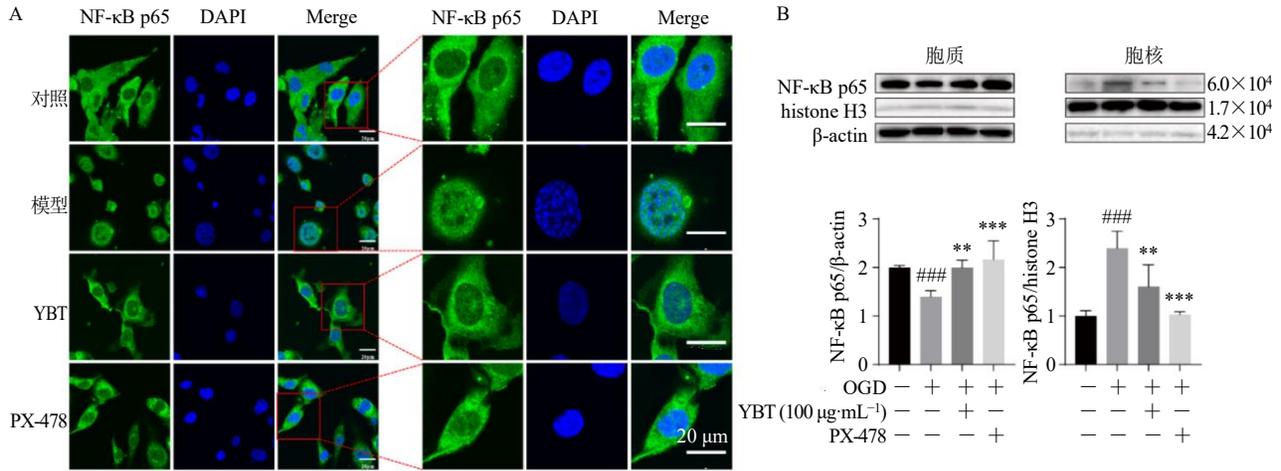


图9 YBT抑制 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 NF-κB p65 核转位 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 9 YBT inhibits NF-κB p65 nuclear translocation in OGD-induced HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

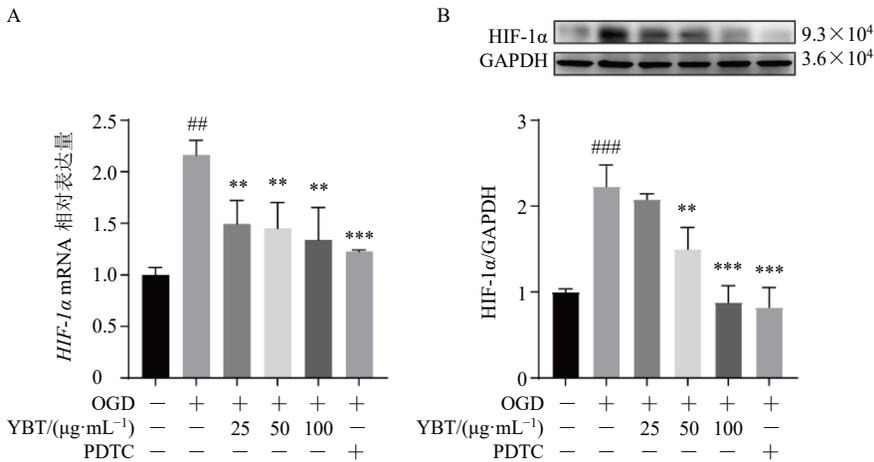


图10 YBT下调 OGD 诱导的 HUVEC 细胞中 HIF-1α mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 10 YBT down-regulates HIF-1α mRNA (A) and protein (B) expressions in OGD-induced HUVEC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

DVT 在中医理论中归属于“股肿”“脉痹”“淤血流注”等范畴，古代医家很早就对该病有所认识，并对其病因病机进行了深入探讨<sup>[21-22]</sup>。《黄帝内经》虽未直接提出“血瘀”概念，但书中多次出现的“留血”“恶血”“血凝泣”“脉不通”等描述，已从病机层面深刻揭示了血液运行不畅的病理状态。张仲景更在《辨瘀血吐衄下血疮痍病脉证并治》篇中首次将“瘀血”作为独立病名设立专篇论述，确立以辨证统法、以法统方的诊疗体系，标志着血瘀证及活血化瘀治法理论框架的初步形成。临床治疗紧扣“血瘀湿阻”这一核心病机，常以“活血化瘀，利湿通络”为基本治法，多配伍活血药与祛湿药同用，

疗效明确<sup>[23-24]</sup>。DVT 的形成经典地遵循 Virchow 三联征，即静脉血流淤滞、血管内皮损伤和血液高凝状态<sup>[25-26]</sup>。其中，血流淤滞导致的局部组织缺氧是启动血栓形成的关键环节<sup>[27]</sup>。缺氧可诱导 HIF-1α 的稳定与激活，进而启动一系列下游基因表达，成为连接缺氧与炎症、高凝状态的分子桥梁<sup>[28-29]</sup>。YBT 源自中国中医科学院孙树椿主任医师的经验方，正是该治法的具体体现<sup>[30]</sup>。方中三七为君，活血定痛、化瘀止血；川芎、延胡索、白芍为臣，养血柔肝、行气止痛；佐以狗脊、独活、熟大黄，以活血通经、祛风胜湿；使以牛膝，引血下行，通泻瘀热。全方共奏活血化瘀、通络止痛、利湿消肿之效<sup>[31-33]</sup>，与 DVT “血瘀湿阻”之病机高度契合。现代药理学研

究表明, YBT 方中单味药活性成分(如三七中的人参皂苷 R<sub>g1</sub>/R<sub>b1</sub>、川芎中的川芎嗪与阿魏酸等)具有抗血小板聚集、改善血液流变性、增强纤溶活性、保护血管内皮、抗炎及抗氧化等多重药理作用<sup>[34-36]</sup>, 体现了中药复方多成分、多靶点、整体调节的特点。进一步研究揭示, 其作用机制与调控 NF- $\kappa$ B、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)等信号通路相关<sup>[37-38]</sup>, 这为理解“活血化瘀”功效的现代内涵提供了依据, 也提示其可能干预上述缺氧相关病理环节。

本研究通过大鼠 DVT 模型、斑马鱼血瘀模型及 OGD 诱导的 HUVEC 细胞损伤模型, 系统评价了 YBT 的防治作用。结果显示, YBT 能显著减轻血栓负荷、改善血液高凝状态、保护血管内皮、抑制炎症反应与氧化应激, 并从整体动物到细胞层面验证了其“活血化瘀”功效。机制研究表明, YBT 可抑制 HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF 信号通路的激活。HIF-1 $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B p65 之间存在正反馈调控, 共同促进 TF 表达, 加剧血栓形成。YBT 通过抑制该通路, 从而在源头上干预缺氧诱导的内皮功能障碍、炎症反应及凝血激活, 实现对 Virchow 三联征的协同调控。当前关于 DVT 的中医药干预研究, 多聚焦于单味药或单一活性成分(如丹参素、川芎嗪)的抗凝或抗血小板作用。相比之下, 本研究突出复方制剂 YBT 在“多靶点、整体调节”方面的独特优势, 不仅验证其在改善整体高凝状态及减轻血栓负荷方面的疗效, 更系统揭示了其同时干预缺氧、炎症与凝血 3 大病理环节的整合机制。此外, 本研究结果显示 YBT 可显著降低 HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达水平, 提示该方可能通过影响 HIF-1 $\alpha$  的稳定性实现对缺氧信号的调控, 这为进一步揭示其上游作用靶点提供了重要线索。常氧条件下, HIF-1 $\alpha$  经脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domain protein, PHD) 羟基化修饰后, 由冯希佩尔-林道蛋白(von Hippel-Lindau protein, VHL) 介导泛素化降解; 而在缺氧状态下, PHD 活性被抑制, HIF-1 $\alpha$  得以稳定积累<sup>[39]</sup>。YBT 是否通过调控 PHD/VHL 介导的 HIF-1 $\alpha$  降解通路, 进而影响其表达水平, 值得进一步深入研究。另外, 三七皂苷、川芎嗪等成分已被报道具有改善细胞能量代谢与缓解氧化应激的作用<sup>[40-41]</sup>, 这些效应可能间接调节 PHD 活性或相关氧感应通路。未来研究

可通过检测 PHD 活性、VHL 与 HIF-1 $\alpha$  的结合情况以及泛素化水平等指标, 进一步明确 YBT 是否直接干预 HIF-1 $\alpha$  的降解过程, 从而更精确地阐释该复方调控缺氧信号通路的分子靶点。

综上, 本研究通过“大鼠下肢深静脉完全结扎模型、苯胍诱导的斑马鱼血瘀模型、OGD 诱导的 HUVEC 细胞损伤模型”多尺度体系, 系统阐释了 YBT 改善 DVT 的有效性及其作用机制。结果表明 YBT 通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /NF- $\kappa$ B p65/TF 通路, 从源头上减轻缺氧诱导的内皮激活、炎症反应与凝血启动, 从而协同拮抗 Virchow 三联征, 这为 YBT 防治 DVT, 尤其是腰椎术后等高危患者, 提供了坚实的现代科学依据。本研究结果提示, YBT 作为一种具有多环节作用特点的中药复方, 或可适用于术后长期卧床、气血不畅、证属血瘀湿阻患者的预防; 同时, 本研究揭示的通路机制也为临床识别缺氧相关的高血栓风险状态及探索个体化治疗提供了潜在靶点。本研究不仅为 YBT 预防腰椎间盘突出症患者术后 DVT 提供了实验依据, 也将中医“活血化瘀”理论与现代“缺氧-炎症-凝血”轴理论相联系, 为阐释中医药理论的现代生物学内涵提供了新的视角和思路。

本研究的局限性包括临床前模型与人体病理的差异、YBT 多成分体系的协同/拮抗机制尚未完全明确等。未来工作可结合临床队列研究进一步验证其转化价值, 并利用基因编辑、网络药理学、蛋白质组学等技术深入探索其直接作用靶点与系统药理学机制, 为中药复方的现代化与国际化研究提供范例。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 李晓强, 张福先, 王深明. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南(第3版)[J]. 中国血管外科杂志: 电子版, 2017, 9(4): 250-257.
- [2] 张旭阳, 赵德杰, 商铭溶, 等. 下肢深静脉血栓形成的中医辨证要素分析[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2024, 30(3): 432-435.
- [3] 潘建平, 李隆萍. 下肢深静脉血栓的防治及护理[J]. 科学之友, 2024(11): 60-61.
- [4] Di Nisio M, van Es N, Büller H R. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism [J]. *Lancet*, 2016, 388(10063): 3060-3073.
- [5] 张旭聪, 陈文阁. 中药塌渍合活血化瘀类方剂治疗下

- 肢深静脉血栓形成的研究进展 [J]. 临床医学进展, 2025, 15(6): 1655-1660.
- [6] 魏鸿鑫, 曾维铨, 连晓文, 等. 活血化瘀类中药及类方预防髋、膝关节置换术后深静脉血栓形成的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2025, 44(2): 144-148.
- [7] 王雪晶, 宋亚玲, 罗鑫, 等. 腰痹通胶囊化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2018, 49(2): 288-292.
- [8] 马慧. 腰痹通胶囊联合手法治疗血瘀气滞型腰椎间盘突出症的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- [9] 李佩娟, 王春梅, 赵茜. 三七总皂苷预防血栓的机制 [J]. 基础医学与临床, 2024, 44(7): 912-915.
- [10] 韩炜. 川芎的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(9): 1341-1349.
- [11] 郑娜, 张红, 李佰成, 等. 延胡索化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2025, 47(3): 872-883.
- [12] 王芳, 许平翠, 林炳锋, 等. 白芍对血管的保护作用及谱效关系研究 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(14): 1883-1891.
- [13] 侯喆, 刘瑞霞. 狗脊配伍及现代应用 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(19): 137-138.
- [14] 王云, 张雪, 麻印莲, 等. 熟大黄的炮制、药效及临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 219-226.
- [15] 白翠慧, 侯国栋, 关永霞, 等. 独活化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(10): 129-144.
- [16] Fei J W, Qin X, Ma H F, *et al.* Resveratrol ameliorates deep vein thrombosis-induced inflammatory response through inhibiting HIF-1 $\alpha$ /NLRP3 pathway [J]. *Inflammation*, 2022, 45(6): 2268-2279.
- [17] Zhai K F, Tang Y M, Zhang Y Y, *et al.* NMMHC IIA inhibition impedes tissue factor expression and venous thrombosis via Akt/GSK3 $\beta$ -NF- $\kappa$ B signalling pathways in the endothelium [J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114(1): 173-185.
- [18] 谭开云, 卢敏, 邝高艳. 骨科大手术后下肢深静脉血栓大鼠模型的改良及评价 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(10): 1-6.
- [19] Sheng J, Meng Q F, Yang Z Z, *et al.* Identification of cryptotanshinone from Tongmai to inhibit thrombosis in zebrafish via regulating oxidative stress and coagulation cascade [J]. *Phytomedicine*, 2020, 76: 153263.
- [20] Zhu X Y, Liu H C, Guo S Y, *et al.* A zebrafish thrombosis model for assessing antithrombotic drugs [J]. *Zebrafish*, 2016, 13(4): 335-344.
- [21] 刘森. 髋关节置换术后血栓预防的研究进展 [J]. 名医, 2023(4): 51-53.
- [22] 辛爱雪, 郑旭光, 刘洋, 等. 补阳还五汤联合参附注射液对老年髋关节置换术后下肢深静脉血栓形成的疗效 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2025, 31(3): 363-367.
- [23] 金明华, 罗致强. 因湿致瘀在岭南心血管疾病防治中的应用 [J]. 中医杂志, 2009, 50(3): 265-267.
- [24] 于洋, 王景, 张海丽. 中医药治疗下肢深静脉血栓研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 137-140.
- [25] 罗淑芳, 黄博宁, 何广铭, 等. 土鳖虫通过改善炎症抑制深静脉血栓形成的机制研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(12): 4917-4926.
- [26] de Gouveia R H, Gulczynski J, Canzonieri V, *et al.* Rudolf Virchow: 200th birth anniversary [J]. *Virchows Arch*, 2021, 479(6): 1063-1065.
- [27] Wang Q H, Zennadi R. Oxidative stress and thrombosis during aging: The roles of oxidative stress in RBCs in venous thrombosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4259.
- [28] 祁江峡, 李海燕, 刘洋, 等. 血清HIF-1 $\alpha$ 水平与急性缺血性脑卒中患者静脉溶栓后症状性脑出血发生及预后的关联性研究 [J]. 中国临床新医学, 2023, 16(7): 694-699.
- [29] 邓瑞成. HIF-1 $\alpha$ -EPO/EDN-1/VEGF 通路参与 COPD 血液高凝的机制研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2024.
- [30] 唐朝辉, 李娜, 曹亮, 等. 腰痹通胶囊改善大鼠腰椎间盘突出及其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(10): 1086-1091.
- [31] 严婧. 腰痹通胶囊的质量标准及药代动力学研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2025.
- [32] 葛敏迪, 何文全. 腰痹通胶囊治疗椎间盘源性腰痛临床研究 [J]. 新中医, 2019, 51(6): 190-192.
- [33] 马洪亮. 腰痹通胶囊治疗腰椎间盘突出症疼痛的效果及对 IL-6、IL-8 因子的影响 [J]. 空军医学杂志, 2018, 34(3): 199-201.
- [34] 易汉文. 川芎嗪预防骨水泥型全髋关节置换术后深静脉血栓形成的研究 [J]. 湖南中医杂志, 2010, 26(2): 48-50.
- [35] 国家中医心血管病临床医学研究中心, 中国医师协会中西医结合医师分会, 中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会, 等. 三七总皂苷制剂临床应用中国专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(10): 1157-1167.
- [36] 殷越, 牟春燕, 沈子芯, 等. 川芎化学成分及药理作用

- 研究进展 [J]. 环球中医药, 2025, 18(3): 635-641.
- [37] Deng Y J, Gao X, Feng T T, *et al.* Systematically characterized mechanism of treatment for lumbar disc herniation based on Yaobitong Capsule ingredient analysis in rat plasma and its network pharmacology strategy by UPLC-MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113097.
- [38] Xin J, Jia F S, Xu Z W. Effect of Yaobitong Capsule on histomorphology of dorsal root ganglion and on expression of p38mark phosphorylation in autologous nucleus pulposus transplantation model of rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(10): 860-863.
- [39] Wu Y, Li Z H, McDonough M A, *et al.* Inhibition of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor: A potential hypoxia response modulating strategy [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(11): 7189-7209.
- [40] 谢雨婷, 胡宇洁, 祝怡峰, 等. 三七与尼莫地平治疗脑梗死的代谢组学机制及协同作用研究进展 [J]. 中医学, 2025, 14(8): 3578-3585.
- [41] 孙芳园, 孟佳磊, 马宇慧, 等. 川芎嗪对脂多糖诱导大鼠心肌细胞炎症及氧化应激的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(20): 3253-3258.

[责任编辑 李亚楠]