

·论 著·

水蛭联合淮山药对静脉血栓栓塞症大鼠的保护作用

王大芬 江楚峰 祝晨 蔡丹莉 石莹 王灵聪

[摘要] 目的 通过复制静脉血栓栓塞症大鼠模型,探讨水蛭联合淮山药对静脉血栓栓塞症的保护作用。方法 选取40只SD雄性大鼠按随机分成空白组、假手术组、模型组、低分子肝素组、水蛭淮山药组,药物干预后取血及栓塞血管段,采用全自动凝血仪检测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT);采用ELISA法检测血浆D二聚体(D-Dimer)及栓塞血管内皮素(ET)、一氧化氮(NO);采用免疫组织化学检测栓塞血管组织纤溶酶原激活物(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)、血管性血友病因子(vWF)。结果 与模型组比较,低分子肝素组、水蛭淮山药组的大鼠血浆PT、APTT、D-Dimer明显减少(t 分别=-11.84、-10.58、-10.37、-10.19、-16.45、-16.39, P 均<0.05);与模型组比较,低分子肝素组、水蛭淮山药组的大鼠栓塞血管组织ET明显降低、NO明显增加(t 分别=-5.50、-5.89、5.61、5.73, P 均<0.05);与模型组比较,低分子肝素组和水蛭淮山药组的血管t-PA阳性细胞比率明显升高(t 分别=22.83、24.74, P 均<0.05), PAI-1、vWF阳性细胞比率明显降低(t 分别=-12.50、-11.51、-57.63、-55.86, P 均<0.05)。结论 水蛭联合淮山药可以显著降低VTE大鼠血浆PT、APTT及D-Dimer,显著下调栓塞血管段组织中ET、PAI-1、vWF的表达量,显著上调NO及t-PA的表达量,从而改善肺栓塞;其作用机制可能与改善内皮功能、提高凝血与纤溶调节能力有关。

[关键词] 静脉血栓栓塞症; 深静脉血栓; 肺栓塞; 水蛭; 淮山药

Protective effect of leech combined with Huai Yam on venous thromboembolism in rats WANG Dafen, JIANG Chufeng, ZHU Chen, et al. Department of Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of leech combined with Huai Yam on venous thromboembolism by establishing venous thromboembolism rat model. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into blank group, sham operation group, model group, low molecular weight heparin group and leech Huai yam group. After drug intervention, blood and embolized vascular segments were collected. Plasma prothrombin time (PT) and activated partial thrombin time (APTT) were measured by automatic coagulation apparatus. Plasma D-Dimer (D-dimer), vascular endothelin (ET) and nitric oxide (NO) were detected by ELISA. Vascular tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and von Willebrand factor (vWF) were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with model group, the PT, APTT and D-Dimer in low molecular weight heparin group and leech Huai Yam group were

significantly decreased (t =-11.84, -10.58, -10.37, -10.19, -16.45, -16.39, P <0.05). Compared with model group, ET and NO in embolized vascular tissue of rats in low molecular weight heparin group and leech Huai Yam group were significantly decreased and significantly increased (t =-5.50, -5.89, 5.61, 5.73, P <0.05). Compared with model group, the ratios of t-PA positive cells in low molecular weight heparin group and leech Huai Yam group were significantly increased (t =22.83, 24.74, P <0.05), while the ratios of PAI-1 and vWF positive cells were significantly decreased (t =-12.50, -11.51,

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.002.007

基金项目:2022国家中医药管理局中医药康复服务能力提升项目(国中医药规财函2021-242号);浙江中医药大学2022年校级基本科研能力提升项目(2022JKJNTZ24);浙江省中医药科技计划项目(2022ZB124);浙江省医药卫生科技计划项目(2019ZD044),浙江省中医药科技计划项目(2020ZB088)

作者单位:310006 浙江杭州,浙江中医药大学附属第一医院重症医学科(王大芬、祝晨、蔡丹莉、石莹、王灵聪);浙江中医药大学(江楚峰)

通讯作者:王灵聪, Email: wlc501@139.com

-57.63, -55.86, $P < 0.05$). **Conclusion** Leech combined with Huai Yam can significantly reduce PT, APTT and D-Dimer in plasma of VTE rats, significantly down-regulate the expression levels of ET, PAI-1 and vWF in embolized vascular segments, and significantly up-regulate the expression levels of NO and t-PA, so as to improve pulmonary embolism. It is suggested that the mechanism may be related to the improvement of endothelial function and the ability of coagulation and fibrinolytic regulation.

[Key words] venous thromboembolism; deep vein thrombosis; pulmonary embolism; leech; Huai Yam

静脉血栓栓塞症(venous thromboembolism, VTE)是一种由于静脉内血栓形成而引起静脉阻塞性回流障碍及其一系列相关病理生理改变的潜在致死性疾病,包括深静脉血栓栓塞症(deep venous thrombosis, DVT)和肺血栓栓塞症(pulmonary thromboembolism, PTE)^[1,2]。近年来,全球每年有约1 000万VTE病例^[3]。我国VTE发病率也呈上升趋势^[4]。有研究显示,在血管疾病中VTE的发生率仅次于急性冠脉综合征和脑卒中,40%~60%的住院患者存在VTE风险。而DVT和PTE发生后,1个月内病死率分别达到6%和10%^[5]。VTE严重危害人们健康,因此,探索对VTE保护作用的药物意义重大。本实验采用我院国家级名老中医经验方——水蛭联合淮山药,通过复制VTE大鼠模型,探讨该方对VTE的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取湖北省实验动物研究中心[(许可证号SCXK(鄂)2015-0018)]提供的雄性健康SD大鼠40只,体重200~250 g。饲养环境:22℃恒温,空气湿度为50%,用标准的奶头喂养。所有的程序都遵守了机构动物保健和使用委员会的指导原则。

1.2 主要试剂和仪器 水蛭及淮山药(由杭州华东中药饮片有限公司生产),低分子肝素钙针(由葛兰素史克中国投资有限公司生产)。广谱二抗(由上海长岛生物技术有限公司生产),酶标仪(由Thermo Scientific生产),冷冻离心机(由上海卢湘仪离心机仪器有限公司生产),全自动血凝分析仪(由日本希森美康公司生产),Quantum FX μ CT Instrument(由Perkin Elmer生产)。

1.3 动物模型的建立 采用Reyers法^[6],用3%的戊巴比妥钠按50 mg/kg体重腹腔麻醉后,腹中部皮肤去毛,消毒,打开后腹膜,游离左肾静脉与下腔静脉汇合处,用0号丝线于左肾静脉下方结扎下腔静脉(活结),同样于髂总静脉上方置一结扎线(无需活结),将外置肠管回纳腹腔,缝合腹壁和皮肤,给予

腹腔注射0.9%氯化钠注射液2.0 ml,6 h后抽出近心端活结,解除左肾静脉汇入下腔静脉处结扎,成功建立VTE大鼠模型。假手术组:不进行血管两处结扎处理,其它处理与模型组操作相同。

1.4 动物分组与给药 40只SD雄性大鼠按随机数字表法分成空白组、假手术组、模型组、低分子肝素组、水蛭淮山药组共5组,每组8只。

水蛭淮山药组从造模前4天至造模后2天按拟定剂量 $3.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃[以人的每日剂量(水蛭3 g,淮山药30 g)折算成大鼠的剂量,换算公式:大鼠剂量(mg/kg) = $6.09 \times$ 成人每日剂量(mg)/成人体重(60 kg)],每次1.675 g/kg,每日2次。其余组在同一时间给予等量的生理盐水灌胃。低分子肝素组于造模当天起皮下注射低分子肝素钙注射液0.01 ml/kg,每天2次。实验期间每组大鼠自由活动和饮食、饮水。

1.5 观察指标 造模2 d后,随即处死动物,取血及栓塞血管段进行检测。①采用全自动血凝仪检测血浆凝血酶原时间(plasma prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activation of partial thromboplastin time, APTT)。②采用酶联免疫吸附试验法检测血浆D二聚体(D-Dimer)及栓塞血管内皮素(endothelin, ET)、一氧化氮(nitric oxide, NO)。③采用免疫组织化学检测栓塞血管组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)、纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)。

1.6 统计学方法 采用IBM SPSS 22.0统计软件进行数据分析。所有计量数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法或Tamhane's T2法检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血浆PT、APTT、D-Dimer水平和血管t-PA、PAI-1、VWF阳性细胞比率比较见表1

表1 各组大鼠血浆的PT、APTT、D-Dimer水平和血管t-PA、PAI-1、VWF阳性细胞比率比较

组别	PT/s	APTT/s	D-Dimer/ $\mu\text{g/L}$	t-PA/%	PAI-1/%	vWF/%
空白组	9.33±0.77	12.59±0.88	827.76±176.67	25.88±1.87	25.26±2.17	24.75±1.90
假手术组	9.60±0.49	12.51±0.89	993.83±131.80	26.38±2.08	30.12±2.00	28.28±2.50
模型组	18.58±0.62* [△]	24.90±1.73* [△]	2848.19±218.64* [△]	37.27±1.39*	81.48±5.87*	93.57±1.90*
低分子肝素组	13.29±0.65 [#]	17.69±1.63 [#]	1480.62±141.28 [#]	57.03±1.07 [#]	48.59±4.57 [#]	53.44±0.54 [#]
水蛭淮山药组	13.85±1.53 [#]	17.81±1.56 [#]	1485.39±147.88 [#]	58.67±2.02 [#]	47.22±6.03 [#]	53.28±0.76 [#]

注: *: 与空白组比较, $P < 0.05$; [#]: 与模型组比较, $P < 0.05$; [△]: 与假手术组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,五组PT、APTT、D-Dimer比较,差异均有统计学意义(F 分别=142.63、106.644、182.52, P 均 <0.05)。与空白组比较,假手术组大鼠血浆PT、APTT、D-Dimer无明显改变(t 分别=0.62、0.11、2.00, P 均 >0.05)。与空白组、假手术组比较,模型组大鼠血浆PT、APTT、D-Dimer显著增加(t 分别=20.71、20.09、17.71、17.82、24.30、22.31, P 均 <0.05)。与模型组比较,低分子肝素组、水蛭淮山药组的大鼠血浆PT、APTT、D-Dimer明显减少(t 分别=-11.84、-10.58; -10.37、-10.19; -16.45、-16.39, P 均 <0.05)。低分子肝素组、水蛭淮山药组血浆PT、APTT、D-Dimer比较,差异无统计学意义(t 分别=-1.26、-0.18、-0.06, P 均 >0.05)。

五组t-PA、PAI-1、vWF阳性细胞比率比较,差异均有统计学意义(F 分别=684.67、193.96、2118.08, P 均 <0.05)。两两比较,模型组血管栓塞严重,t-PA、PAI-1、vWF阳性细胞比率较空白组升高(t 分别=13.15、25.40、72.60, P 均 <0.05)。与模型组比较,低分子肝素组和水蛭淮山药组的血管t-PA阳性细胞比率明显升高(t 分别=22.83、24.74, P 均 <0.05),PAI-1、vWF阳性细胞比率明显降低(t 分别=-12.50、-11.51; -57.63、-55.86, P 均 <0.05)。

2.2 各组大鼠栓塞血管NO、ET水平见表2

表2 各组大鼠栓塞血管NO、ET表达

组别	NO	ET
空白组	10.22±0.20	314.05±29.21
假手术组	10.48±0.43	312.91±19.79
模型组	7.79±0.53* [△]	466.08±25.81* [△]
低分子肝素组	8.83±0.13 [#]	394.43±9.32 [#]
水蛭淮山药组	8.85±0.41 [#]	389.44±37.44 [#]

注: *: 与空白组比较, $P < 0.05$; [#]: 与模型组比较, $P < 0.05$;

[△]: 与假手术组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,五组NO、ET比较,差异均有统计

学意义(F 分别=71.68、48.40, P 均 <0.05)。

与空白组比较,假手术组大鼠栓塞血管组织NO、ET无明显改变(t 分别=1.40、-0.09, P 均 >0.05)。与空白组、假手术组比较,模型组大鼠栓塞血管组织ET明显增加,NO明显减少(t 分别=11.66、11.75; -13.12、-14.52, P 均 <0.05)。与模型组比较,低分子肝素组、水蛭淮山药组的大鼠栓塞血管组织ET明显降低、NO明显增加(t 分别=-5.50、-5.89; 5.61、5.73, P 均 <0.05)。低分子肝素组、水蛭淮山药组大鼠栓塞血管组织NO、ET比较,差异均无统计学意义(t 分别=-0.12、0.38, P 均 >0.05)。

3 讨论

VTE的形成与多方面因素有关,Virchow三角学说是血栓形成的重要理论基础,该学说认为血栓形成是血管内皮细胞损伤、血流动力学改变和血液黏滞度增加相互作用的最终结果^[7]。

内皮细胞能够合成和分泌多种血管活性物质,影响凝血、纤溶功能,维持血管内皮促血栓形成和抗血栓形成之间的平衡^[8]。NO具有舒张血管、抗血小板聚集、抗血栓形成、抑制平滑肌细胞过度增殖作用,若NO释放减少,则促进血栓形成;ET引起血管收缩,激活巨噬细胞,促进平滑肌细胞增殖和迁移。若NO、ET失衡,血栓聚集。t-PA、PAI-1是纤溶系统的两个重要组成部分,t-PA是纤溶系统主要启动物质,能特异性结合纤维蛋白原,促进血栓溶解;PAI-1可抑制纤溶酶原激活物活性^[9]。病理状态下,两者平衡状态将被打破,内皮细胞表达PAI-1增加,致血小板聚集,血流速度下降,从而促进静脉血栓形成与发展^[10]。vWF是一种大分子多聚糖蛋白,储存于Weibel-Palade小体内。它参与激活血小板及凝血过程,被认为是反映血管内皮损伤的特异性标志物。血管内皮损伤后,内皮下胶原纤维与vWF结合,进而诱导血小板聚集和黏附,启动病理性静脉血栓^[11]。本次研究结果显示,模型组大鼠肺栓塞、血管栓塞严重,血浆PT、APTT、

D-Dimer 显著增加, 栓塞血管组织 NO 显著减少、ET 显著增加以及 t-PA、PAI-1、vWF 阳性细胞比率升高。进一步验证了以往的有关研究。

VTE 在中医归属于“血瘀”“股胀”“股肿”等范畴, 瘀血阻滞是该病的主要病机, 治疗以活血祛瘀为主。水蛭, 俗称蚂蝗, 属环节动物蛭纲蛭目, 光滑, 咸, 苦, 微毒。有破血, 活血化瘀, 疏通效果。主治癥瘕积聚、血瘀经闭、跌打损伤、胸痹心痛、癫痫等症。现代药理研究表明, 水蛭具有抗凝、促纤溶、抑制血栓形成、抗血小板聚集、降低血液黏度、促进血液循环和降血脂、抗炎、脑保护作用、抗细胞凋亡、抗肿瘤、抗纤维化等作用^[12~15]。山药又称薯蓣、淮山等, 药用来源为薯蓣科植物山药干燥根茎。其味甘、平, 归脾、肺、肾经, 具有健脾、补肺、固肾、益精的功效。本次研究以水蛭及淮山药联用, 山药能养正补气, 用以成水蛭啮血逐瘀之功, 使补而不滞, 攻而无伤, 攻补兼施法。本次研究显示, 水蛭淮山药组大鼠肺栓塞较模型组减轻, 血管栓塞也明显好转, 提示水蛭联合淮山药对治疗 VTE 有效。同时, 水蛭联合淮山药显著降低 VTE 大鼠血浆 PT、APTT 及 D-Dimer, 显著下调栓塞血管段组织中 ET、PAI-1、vWF 的表达量, 显著上调 NO 及 t-PA 的表达量, 提示其作用机制可能与改善内皮功能、提高凝血与纤溶调节能力有关。

综上所述, 水蛭联合淮山药对 VTE 大鼠具有一定的保护作用, 值得临床进一步借鉴、应用。但是否存在其他更深层次的作用机制, 还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 National Comprehensive Cancer Network. Venous thromboembolic disease clinical practice guidelines in oncology [EB/OL]. <http://www.nccn.org/professionals/default.aspx>. 2017-07-30
- 2 Khorana AA, Carrier M, Garcia DA, et al. Guidance for the prevention and treatment of cancer-associated venous thromboembolism[J]. J Thromb Thrombolysis, 2016, 41(1): 81-91.
- 3 Jha AK, Larizgoitia I, Audera-Lopez C, et al. The global burden of unsafe medical care: Analytic modelling of observational studies[J]. BMJ Qual Saf, 2013, 22(10): 809-815.
- 4 Law Y, Chan YC, Cheng SWK. Epidemiological updates of venous thromboembolism in a Chinese population[J]. Asian J Surg, 2018, 41: 176-182.
- 5 Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease [J]. Chest, 2016, 149(2): 315-352.
- 6 Reyers I, Mussoni L, Donati MB, et al. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats [J]. Thromb Res, 1980, 18(5): 669-674.
- 7 周斌, 余翀, 李毅清. 静脉血栓栓塞疾病的抗栓治疗-第10版美国胸科医师学会抗栓治疗指南解读[J]. 临床外科杂志, 2017, 25(1): 40-42.
- 8 Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis[J]. BMC Cardiovascular Disorders, 2015, 15: 130.
- 9 Yin H, He H, Wang M, et al. Prospective randomized study of ultrasound-guided foam sclerotherapy combined with great saphenous vein high ligation in the treatment of severe lower extremity varicosis[J]. Ann Vasc Surg, 2017, 39: 256-263.
- 10 Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology[J]. Br J Haematol, 2012, 157(3): 291-298.
- 11 Lazzari MA, Sanchez-Luceros A, Woods AI, et al. Von Willebrand factor (VWF) as a risk factor for bleeding and thrombosis[J]. Hematology, 2012, 17(Suppl 1): S150-152.
- 12 苏斌, 王志斌, 宋程程, 等. 水蛭抗凝血作用实验研究[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(11): 920-923.
- 13 刘良红, 谭茜, 卢茂芳, 等. 水蛭提取液对凝血酶诱导血管内皮细胞释放 TFPI 及表达 TF 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(5): 594-595.
- 14 郭晓庆, 孙佳明, 张辉. 水蛭的化学成分与药理作用[J]. 吉林中医药, 2015, 35(1): 47-50.
- 15 吴晶魁, 杨乔, 李洋洋, 等. 水蛭通过 p38MAPK 信号通路对早期动脉粥样硬化大鼠 VSMCs 的影响[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(16): 3191-3197.

(收稿日期 2022-08-29)

(本文编辑 葛芳君)