

## · 论 著 ·

## 脉络舒通丸对血栓闭塞性脉管炎模型大鼠的治疗作用

王梦丽<sup>1,2</sup>, 楚尧娟<sup>1,2</sup>, 左莉华<sup>1,2</sup>, 赵梦帆<sup>1,2</sup>, 刘霁云<sup>1,2</sup>, 李冰<sup>3</sup>, 孙志<sup>1,2</sup>, 张晓坚<sup>1</sup>, 杜书章<sup>1</sup>  
(1. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450000; 2. 河南省精准医学临床质谱工程研究中心, 河南 郑州 450000; 3. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000)

**摘要:** 目的 研究脉络舒通丸(MLST)对血栓闭塞性脉管炎(TAO)的治疗作用。方法 雄性SD大鼠右后肢股动脉注射0.2 mL月桂酸钠( $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )制备TAO模型,假手术组注射等体积生理盐水。次日(D1)以注射侧肢体缺血性改变为模型制备成功。模型大鼠分别ig给予MLST 3.8, 7.6 和  $15.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,阳性对照组ig给予通塞脉片(TSM)  $2.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每天1次,连续14 d。分别于D1和D14记录体重,D14对患肢形态变化评级。用全自动血液分析仪和显微镜检测血常规指标,凝固法检测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB)水平,ELISA测定内皮素1(ET-1)、白细胞介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )、血栓素2(TXB2)和6-酮-前列腺素(6-K-PGF $1\alpha$ )水平;HE染色观察患肢侧股动脉和股静脉组织形态,免疫荧光法分析股动脉组织NF- $\kappa$ B表达水平。结果 与假手术组相比,TAO模型组体重下降( $P<0.01$ ),患肢发生明显病变( $P<0.01$ ),血常规指标显著升高( $P<0.01$ );FIB水平升高( $P<0.05$ ),PT,APTT和TT缩短( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );ET-1, TXB2和IL- $1\beta$ 水平升高( $P<0.01$ ),6-K-PGF $1\alpha$ 水平下降( $P<0.01$ );股动脉和股静脉内膜、中膜和外膜均被炎症细胞浸润,股动脉组织NF- $\kappa$ B表达水平升高( $P<0.01$ )。与TAO模型组相比,模型+MLST 3.8 和  $7.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组体重增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),患肢病变程度减轻( $P<0.05$ ),血常规指标均有不同程度的降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );血浆FIB水平下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),PT,APTT和TT延长( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );血清中ET-1, TXB2和IL- $1\beta$ 水平下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),6-K-PGF $1\alpha$ 水平升高( $P<0.01$ );股动脉和股静脉炎症细胞浸润减少,股动脉组织NF- $\kappa$ B表达降低( $P<0.01$ )。结论 MLST可通过抑制炎症反应并改善凝血状态发挥对TAO的治疗作用。

**关键词:** 脉络舒通丸; 血栓闭塞性脉管炎; 内皮素1; 白细胞介素 $1\beta$ ; 血栓素2; 6-酮-前列腺素

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)01-0017-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.01.003

血栓闭塞性脉管炎(thromboangiitis obliterans, TAO)是一种主要损伤四肢远端中小动静脉及浅静脉的炎症性血管疾病,其特征是高度单核细胞血栓形成的节段性血管闭塞<sup>[1-2]</sup>,临床症状表现为四肢组织供血不足,具有慢性、进行性、持续性和阶段性的特点,治疗预后良好,但坏死性病变的发病率很高<sup>[3-4]</sup>。现代医学对TAO发病原因及机制的阐述尚未明确,目前研究认为其与烟草、免疫和高凝状态等因素密切相关。许多研究表明,香烟中存在的氧化物质损害血小板和血管内皮细胞的功能,从而增加了血栓

的形成,介导炎症反应<sup>[5]</sup>,血栓和炎症是TAO发展的2个主要事件<sup>[6]</sup>。中医学认为,TAO的发生因心、脾、肾亏虚,复感寒湿之邪,使经络瘀阻,阳气不能温达四末,肢端失于供养,郁邪化热,而致“脱疽”<sup>[7]</sup>。凝滞脉络或热毒炽盛,闭塞不通,血运不畅,阳气不达,气血两虚,失于温通濡养所致脉络痹阻,气流通不畅为其主要病机,与血栓形成和炎症反应相对应<sup>[8]</sup>。因此,用来治疗TAO的中药制剂主要在于其活血化瘀、清热祛湿等功效。

脉络舒通丸(Mailuo Shutong pills, MLST),由黄芪、金银花、黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍、甘草、水蛭、蜈蚣和全蝎等12味药材炮制而成,黄芪和金银花为君药,发挥解毒消肿的功能;而黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍和甘草为臣药,发挥清热祛湿的作用;水蛭、蜈蚣和全蝎为佐药,达到驱除瘀血的作用<sup>[9]</sup>。多味药材合用,临床疗效确

**基金项目:** 世界中医药学会联合会项目(WFCMS2019003); 河南省高等学校重点科研项目(20A350015)

**作者简介:** 王梦丽, 硕士研究生, 主要从事中药药理学与药物分析研究。

**通讯作者:** 杜书章, E-mail: dushuzhang911@163.com; 张晓坚, E-mail: zhxj0524@sina.com

切,常用于湿热瘀阻脉络所致的血栓性浅静脉炎,非急性期深静脉血栓形成所致的下肢肢体肿胀、疼痛、肤色暗红或伴有条索状物,具有清热解毒、化瘀通络、祛湿消肿的功效<sup>[10]</sup>,与治疗 TAO 的中药功效相吻合。目前有关 MLST 治疗 TAO 的研究多偏重于临床疗效的观察,发现 MLST 与其他抗凝血药物联用后患者脚和小腿部位酸痛感减轻,步行不适感消失<sup>[11]</sup>,但单独使用治疗 TAO 的治疗效果和作用机制尚不明确。因此,本研究通过制备 TAO 大鼠模型,观察 MLST 对 TAO 的治疗作用及炎症因子和凝血因子的变化,为 TAO 的治疗开辟新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、药物、试剂和主要仪器

清洁级雄性 SD 大鼠,体重 230~270 g〔动物生产许可证号:SCXK(豫)2017-0001〕,购自郑州大学医学实验中心,饲养环境温度 23~27℃,相对湿度为 45%~55%,每 12 h 明暗交替,自由饮食饮水,适应性喂养 7 d 后开始实验。动物实验遵循郑州大学动物实验伦理委员会规定。

MLST,国药准字 Z20090636,批号:18200141,每克含黄芪甲苷 $\geq 0.30$  mg,每克含绿原酸 $\geq 3.2$  mg,鲁南厚普制药有限公司;通塞脉片(Tongsaimai tablet, TSM),国药准字 Z32020535,批号:170402,江苏康缘阳光药业有限公司。月桂酸钠(纯度 98%,批号:R007037),上海易恩化学技术有限公司;大鼠内皮素 1(endothelin-1, ET-1)、血栓素 2(thromboxane-2, TXB-2)和 6-酮-前列腺素(6-keto-prostaglandin, 6-K-PGF1 $\alpha$ )ELISA 试剂盒(批号:E06979r, E08047r 和 E14411r),武汉华美生物工程有限公司;白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )ELISA 试剂盒(批号:EK301B/3-24),杭州联科生物技术股份有限公司;兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B 单克隆抗体(一抗)和 CY3 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗),武汉塞维尔生物科技有限公司。

AL104 型电子天平(德国梅特勒-托利多仪器有限公司);D3024R 台式高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器股份公司);RT-3100C 全自动洗板机(雷杜生命科技有限公司);GEL-70 电热鼓风干燥箱(天津莱玻特瑞仪器有限公司);MX-F 型涡旋混合器(武汉赛维尔生物科技有限公司);Epoch 型酶标检测仪(美国博腾仪器有限公司)。

### 1.2 动物分组和给药

60 只雄性 SD 大鼠随机分为:TAO 模型组、模型+

TSM 2.6 g·kg<sup>-1</sup>,模型+MLST 3.8, 7.6 和 15.2 g·kg<sup>-1</sup> 及假手术组,每组 10 只。以造模当天为实验第 0 天(D0),根据文献[12]向大鼠右后肢股动脉注入 0.2 mL 月桂酸钠(7 g·L<sup>-1</sup>)制备 TAO 模型,假手术组注入 0.2 mL 生理盐水,手术完毕后 ip 给予青霉素 400 kU,预防感染。注射月桂酸钠后,1 min 内肢体皮肤颜色出现苍白(与自身对侧肢体相比)表明月桂酸钠注射成功,次日(D1)注射侧肢体出现缺血性改变(表现为肢体青紫颜色加深,趾尖发黑,有跛行或拖曳现象)表明模型制备成功。D1 开始 ig 给药,将 MLST 和 TSM 研磨为粉末与羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)溶液混溶(粉末:CMC-Na=1:1.5)用于 ig 给药,TAO 模型组、假手术组给予同体积的 CMC-Na 溶液。每天同一时间 ig 给药 1 次,持续 14 d。

### 1.3 体重和患肢形态变化评级

记录大鼠 D1 和 D14 体重,D14 参照 Shinichiro Ashida 等<sup>[13]</sup>采用的分级标准对患肢形态变化进行评级。0 级:整体外观无变化;I 级:病变局限于趾甲部;II 级:病变局限于趾部;III 级:病变局限于足爪部;IV 级:病变超过踝关节,膝关节以下;V 级:病变发展到膝关节以上。

### 1.4 血常规检测

按 1.2 分组处理大鼠,于 D15 用 100 g·L<sup>-1</sup>水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>)麻醉,用一次性血液采集针和真空负压管腹主动脉取全血。乙二胺四乙酸二钾(ethylenediamine tetraacetic acid dipotassium, EDTAK2)抗凝采血管收集血液 2 mL,检测其白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和血小板数目及红细胞比容。

### 1.5 凝固法检测凝血纤溶相关指标测

同 1.4 操作,用柠檬酸钠抗凝采血管收集腹主动脉血液 2 mL,3000×g 离心 15 min,取上层血浆,检测大鼠血浆的凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)和纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)水平。

### 1.6 ELISA 法测定血浆炎症因子和凝血因子水平

同 1.4 操作,用肝素钠抗凝管收集大鼠腹主动脉血液,30 min 内于 4℃ 3000×g 离心 15 min,取上清置 -80℃ 保存,用于 ELISA 检测。按 ELISA 试剂盒说明书测定血浆中 ET-1, IL-1 $\beta$ , TXB-2 和 6-K-PGF1 $\alpha$  水平。

### 1.7 HE 染色观察股动脉和股静脉组织病理变化

各组大鼠取血后迅速剥离股动脉和股静脉,在穿刺点下方剪取 2~3 cm,用生理盐水冲洗后,10%

甲醛溶液浸泡。取固定好的大鼠动、静脉组织,经脱水、透明、石蜡包埋、切片、脱蜡、HE 染色、封片等操作步骤后,于倒置显微镜下观察组织病理变化并拍照。

### 1.8 免疫荧光法检测股动脉组织 NF-κB 表达水平

取 1.7 制备的大鼠动脉组织切片脱蜡,置盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中进行抗原修复。用组化笔在组织周围画圈,圈内加入自发荧光淬灭剂保持 5 min,冲洗后孵育 30 min。加抗 NF-κB 抗体(一抗,1:100 稀释)4℃孵育过夜;漂洗 3 次,加 CY3 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗,1:500 稀释)避光室温孵育 50 min,DAPI 复染细胞核,封片,镜检拍照,使用 Image J 计算荧光强度(fluorescence intensity, FI)。

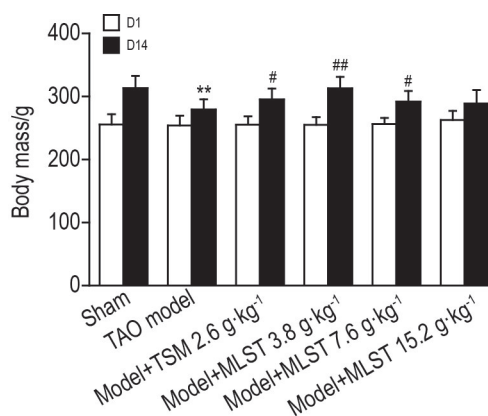
### 1.9 统计学分析

实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计分析软件 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8 处理。两两比较采用 *t* 检验分析;多组资料比较,方差齐时采用最小显著差异法(LSD)分析,方差不齐时采用非参数多重比较法(Games-Howell)分析;采用 Kruskal-Wallis 检验比较各组间病变分级差异。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MLST 对 TAO 模型大鼠体重和患肢形态变化的影响

D1 各组大鼠体重无差异。D14,与假手术组相比,TAO 模型组体重下降( $P < 0.05$ );与 TAO 模型组相比,模型+MLST 3.8 和 7.6  $g \cdot kg^{-1}$  组及模型+TSM 2.6  $g \cdot kg^{-1}$  组体重均增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (图 1)。TAO 模型组大鼠患肢逐渐紫暗发黑,最后变硬,干枯发黄,木乃伊化,病变部位也从趾端逐渐蔓延至膝关节以上,伴有患肢、跛行和曳行现象,



**Fig.1 Effect of Mailuo Shutong pills (MLST) on body mass of thromboangiitis obliterans (TAO) model rats.** The TAO model was prepared by injecting 0.2 mL sodium laurate 7  $g \cdot L^{-1}$  into the distal end of rats, and 0.2 mL normal saline was injected into the sham group. After injection, paleness in the skin color of the limbs within 1 min indicated the successful injection of sodium laurate, and ischemic changes in the limbs appeared the next day (D1) indicated the successful preparation of the model. The administration started on D1, the model + TSM group was ig given TSM 2.6  $g \cdot kg^{-1}$  and the model+MLST group was ig given MLST 3.8, 7.6 and 15.2  $g \cdot kg^{-1}$ , respectively, once a day, for 14 d. The sham group was ig given CMC-Na solution. The body mass of rats was recorded on D1 and D14 after drug treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ . \*\* $P < 0.01$ , compared with sham group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , compared with TAO model group.

2周内部分大鼠患肢坏疽脱落。假手术组未出现病变。与模型组相比,模型+MLST 3.8 和 7.6  $g \cdot kg^{-1}$  组与模型+TSM 组患肢病变减轻( $P < 0.05$ ),各组大鼠患肢病变评级见表 1。

### 2.2 MLST 对 TAO 模型大鼠血常规的影响

与假手术组相比,TAO 模型组大鼠白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和血小板数目及红细胞比容显著上升( $P < 0.01$ );与 TAO 模型组相比,模型+MLST 7.6  $g \cdot kg^{-1}$  组上述指标均降低( $P < 0.01$ ),模型+TSM 2.6  $g \cdot kg^{-1}$  组上述指标亦均降低( $P < 0.05$ ) (表 2)。

**Tab.1 Effect of MLST on grading of TAO model rats**

Group	Rat number						P value
	Grade 0	I	II	III	IV	V	
Sham	10	0	0	0	0	0	-
TAO model	0	0	0	0	0	10	<0.01
Model+TSM 2.6	0	0	1	2	1	6	0.03
Model+MLST 3.8	0	0	1	1	2	6	0.03
7.6	0	0	2	1	2	5	0.01
15.2	0	0	1	1	1	7	>0.05

See Fig.1 for the rat treatment. The conditions of the posterior limb lesions on the operative side were graded on D14 after drug administration. Grade 0: no change in overall appearance; Grade I: nail lesion; Grade II: toe lesion; Grade III: paw lesion; Grade IV: ankle lesion but below the knee joint; Grade V: knee joint lesion. The number of rats at each level was recorded.  $n=10$ .



### 2.3 MLST 对 TAO 模型大鼠凝血纤溶相关指标的影响

与假手术组相比,TAO 模型组 PT,APTT 和 TT 缩短( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),FIB 水平升高( $P<0.05$ );与 TAO 模型组相比,模型+TSM 2.6 g·kg<sup>-1</sup>及模型+MLST 3.8 和 7.6 g·kg<sup>-1</sup>组 PT,APTT 和 TT 延长( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),FIB 水平下降( $P<0.05$ )(表 3)。

### 2.4 MLST 对 TAO 模型大鼠血浆炎症因子和凝血因子水平的影响

与假手术组相比,TAO 模型组大鼠血浆 ET-1, TXB2 和 IL-1 $\beta$  水平升高( $P<0.01$ ), 6-K-PGF1 $\alpha$  水

平明显降低( $P<0.01$ );与 TAO 模型组相比,模型+MLST 3.8, 7.6 和 15.2 g·kg<sup>-1</sup>组及模型+TSM 2.6 g·kg<sup>-1</sup>组 ET-1, TXB-2 和 IL-1 $\beta$  降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),6-K-PGF1 $\alpha$  升高( $P<0.01$ )(表 4)。

### 2.5 MLST 对 TAO 模型大鼠股动脉和股静脉组织病理变化的影响

股动脉:假手术组股动脉内膜光滑完整,中膜细胞排列有序,外膜和外膜结缔组织无炎症细胞浸润;TAO 模型组,中膜、外膜以及外膜结缔组织内膜均被炎症细胞浸润,内膜细胞脱落严重,管腔极度狭窄,细胞排列紊乱;模型+MLST 3.8,7.6 和 15.2 g·kg<sup>-1</sup>

**Tab.2 Effect of MLST on blood routine indicators of TAO model rats**

Group	White blood cell/10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	Neutrophil/10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	Lymphocyte/10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	Platelet/10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	Hematocrit value/%
Sham	7.7±2.1	1.6±0.6	5.8±1.6	1015±31	40.0±2.0
TAO model	10.2±2.2**	3.4±1.1**	7.8±1.4**	1764±57**	53.9±2.0**
Model+TSM 2.6	9.7±2.4 <sup>#</sup>	2.4±1.0 <sup>#</sup>	6.8±1.5 <sup>#</sup>	1463±46 <sup>#</sup>	45.6±2.5 <sup>#</sup>
Model+MLST 3.8	10.0±2.4	2.6±0.7 <sup>#</sup>	7.2±1.7 <sup>#</sup>	1522±39 <sup>#</sup>	47.5±2.5 <sup>#</sup>
7.6	9.8±2.3 <sup>#</sup>	2.0±1.3 <sup>##</sup>	6.5±1.1 <sup>#</sup>	1425±37 <sup>#</sup>	44.7±2.6 <sup>##</sup>
15.2	10.3±2.0	2.4±0.9 <sup>#</sup>	7.6±1.3	1608±57	48.2±2.5 <sup>#</sup>

See Fig.1 for the rat treatment. Blood routine indicators of rats were detected on D15 by an automatic hematology analyzer and microscope.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with sham group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ , compared with TAO model group.

**Tab.3 Effect of MLST on coagulation and fibrinolysis indicators of TAO model rats**

Group	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/g·L <sup>-1</sup>
Sham	12.7±0.3	31.1±2.0	14.8±0.3	4.6±0.3
TAO model	8.6±0.1**	22.5±1.1**	11.0±0.9*	5.1±0.3*
Model+TSM 2.6	12.4±0.5 <sup>##</sup>	34.3±1.6 <sup>##</sup>	12.2±0.7 <sup>#</sup>	3.8±0.2 <sup>#</sup>
Model+MLST 3.8	10.7±0.3 <sup>#</sup>	30.1±1.9 <sup>##</sup>	12.0±0.1 <sup>#</sup>	4.0±0.4 <sup>#</sup>
7.6	12.6±0.7 <sup>##</sup>	33.9±1.8 <sup>##</sup>	12.8±0.6 <sup>#</sup>	3.4±0.1 <sup>#</sup>
15.2	11.5±0.5 <sup>##</sup>	35.7±1.3 <sup>##</sup>	11.6±0.4	4.6±0.4

See Fig.1 for the rat treatment and Tab.2 for detection time. PT: prothrombin time; APTT: activated partial thromboplastin time; TT: thrombin time; FIB: fibrinogen.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with sham group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ , compared with TAO model group.

**Tab.4 Effect of MLST on plasma inflammatory factors and thrombotic factors in TAO model rats**

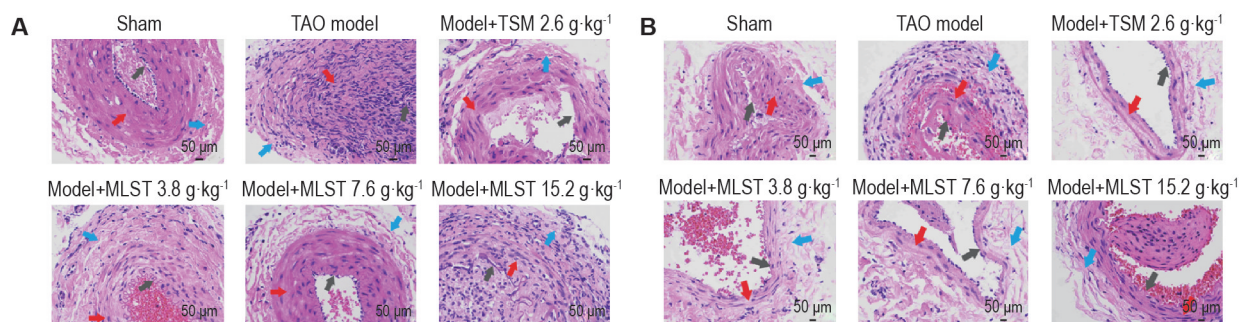
Group	ET-1/ng·L <sup>-1</sup>	TXB-2/ng·L <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>	6-K-PGF1 $\alpha$ /ng·L <sup>-1</sup>
Sham	6.6±1.7	2.2±0.6	291±37	28.2±3.6
TAO model	14.4±0.8**	10.5±0.3**	462±64**	16.4±3.6**
Model+TSM 2.6	6.5±1.4 <sup>##</sup>	4.7±0.4 <sup>##</sup>	305±51 <sup>##</sup>	21.9±2.1 <sup>##</sup>
Model+MLST 3.8	5.4±1.5 <sup>##</sup>	3.5±0.3 <sup>##</sup>	351±60 <sup>#</sup>	26.6±2.3 <sup>##</sup>
7.6	6.3±1.8 <sup>##</sup>	4.3±0.5 <sup>##</sup>	294±60 <sup>##</sup>	20.8±3.5 <sup>##</sup>
15.2	5.1±1.7 <sup>##</sup>	8.3±0.3 <sup>#</sup>	392±49.3 <sup>#</sup>	22.5±1.3 <sup>##</sup>

See Fig.1 for the rat treatment and Tab.2 for detection time. Inflammatory factors and thrombotic factors in plasam were tested by enzyme-linked immunosorbent assay. ET-1: endothelin-1; TXB-2:thromboxane-2; IL-1 $\beta$ : interleukin-1; 6-K-PGF1 $\alpha$ : 6-keto-prostaglandin.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with sham group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ , compared with TAO model group.

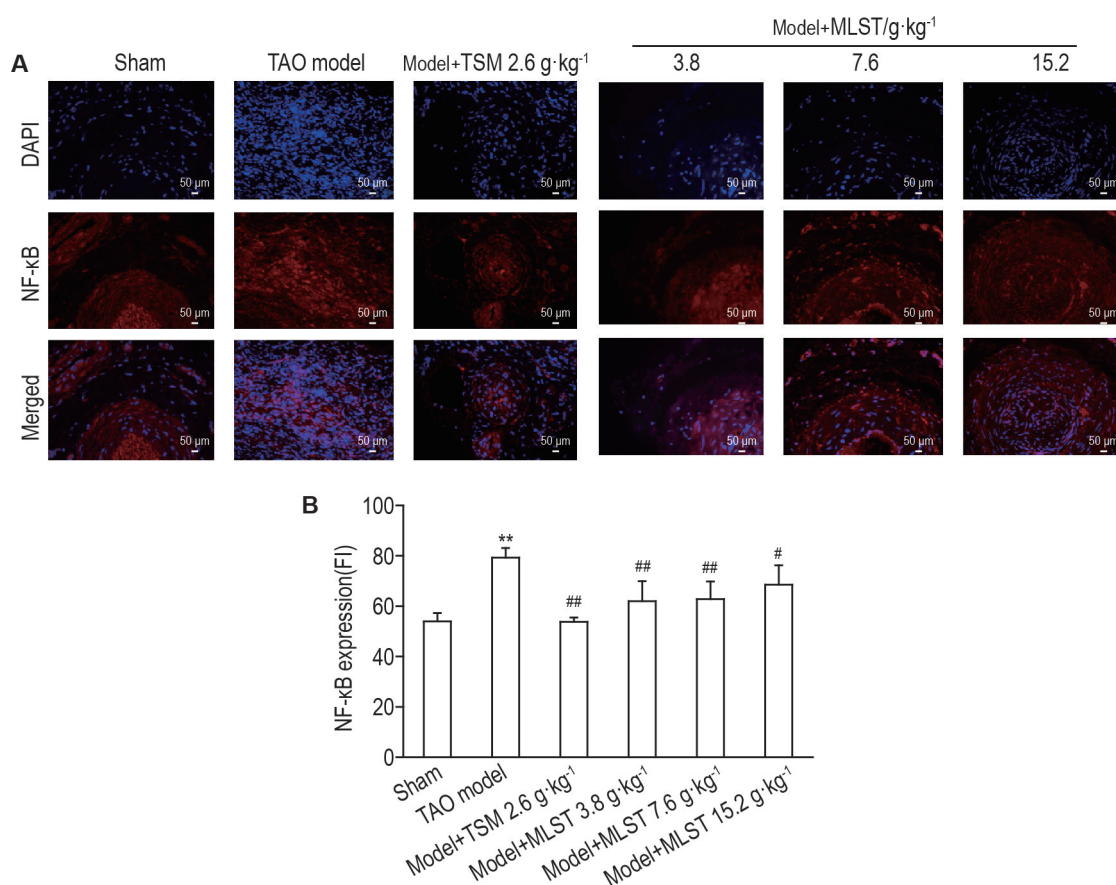
组和模型+TSM 2.6 g·kg<sup>-1</sup>组股动脉病变均有不同程度降低(图 2A)。股静脉:假手术组膜内无炎症细胞浸润;TAO 模型组内膜、中膜和外膜均有炎症细胞浸润,内膜细胞有脱落;模型+MLST 3.8, 7.6 和 15.2 g·kg<sup>-1</sup>组和模型+TSM 2.6 g·kg<sup>-1</sup>组内膜细胞无脱落,中膜和外膜炎性细胞浸润减少,病变程度均有所减轻(图 2B)。

## 2.6 MLST 对 TAO 模型大鼠股动脉组织 NF-κB 表达的影响

免疫荧光实验结果(图 3)显示,与假手术组相比,TAO 模型组大鼠股动脉组织 NF-κB 表达升高 ( $P<0.01$ );与 TAO 模型组相比,模型+TSM 2.6 g·kg<sup>-1</sup>组及模型+MLST 3.8, 7.6 和 15.2 g·kg<sup>-1</sup>组股动脉组织 NF-κB 表达均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。



**Fig.2** Effect of MLST on pathological changes of arteriovenous tissue of femoral artery (A) and femoral vein (B) of TAO model rats by HE staining. See Fig.1 for the rat treatment and Tab.2 for detection time. The gray arrow shows the Intima, the red arrow represents the media, and the blue arrow represents the adventitia.



**Fig.3** Effect of MLST on expression of NF-κB in femoral artery of TAO model rats by immunofluorescence assay. See Fig.1 for the rat treatment and Tab.2 for detection time. FI: fluorescence intensity. B was the semi-quantitative result of A.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ . \*\* $P<0.01$ , compared with sham group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , compared with TAO model group.

### 3 讨论

本研究采用月桂酸钠注射法成功制备了大鼠 TAO 模型,并探讨了 MLST 对 TAO 的治疗作用。结果显示,TAO 模型大鼠股动脉和股静脉组织形态均发生明显病理变化,炎症细胞显著增多;模型+MLST 组大鼠股动脉和股静脉炎症细胞浸润出现了不同程度的降低,其中模型+MLST 3.8 和 7.6 g·kg<sup>-1</sup> 组股动脉和股静脉的内膜细胞炎症反应明显改善。本研究将动脉和静脉分别取样观察,发现静脉的病理特征与动脉类似,均被炎症细胞浸润,表明该模型对动、静脉均造成损伤。目前 MLST 仅用于浅静脉炎的治疗。本研究结果显示,MLST 给药后大鼠动脉和静脉的损伤均有改善。但这可能是多种因素共同作用的结果,还需进一步研究。

内皮细胞和基底膜构成了血管的天然屏障,对维持内环境稳定起着重要作用<sup>[14]</sup>。造模时月桂酸钠注入造成内皮细胞损伤,内皮细胞在损伤状态下,向血液循环系统释放多种细胞因子,如 ET-1 和 IL-1 $\beta$  等。ET-1 是血管内皮功能受损的标志物,可引起细胞内 NF- $\kappa$ B 信号转导通路激活,介导炎症反应和调控平滑肌增殖,最终导致炎症损伤加重<sup>[15]</sup>。IL-1 $\beta$  除作用于内皮细胞导致其损伤外,还可与表面受体结合,通过酶反应诱导细胞产生损伤物质,导致其损伤或坏死<sup>[16]</sup>。当全身循环炎症反应加重时,全身的免疫系统被激活,白细胞和淋巴细胞等亦增多,这与本研究模型组检测结果相符。与模型组相比,模型+ MLST 3.8 和 7.6 g·kg<sup>-1</sup> 组血浆中 ET-1 和 IL-1 $\beta$  表达降低,股动脉组织 NF- $\kappa$ B 表达下降,表明 MLST 减轻血管内皮损伤程度,同时抑制 NF- $\kappa$ B 信号激活,使血管内炎症因子释放减少,也减轻了 IL-1 $\beta$  所介导的继发性炎症反应,具有保护血管内皮细胞的作用;模型+MLST 3.8 和 7.6 g·kg<sup>-1</sup> 组白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和血小板数目下降,提示 MLST 能减轻全身炎症反应,具有抗炎作用。

TXB2 和 6-KPGF1 $\alpha$  分别是血栓素 A2 和前列腺素 I2 的稳定水解产物。血栓素 A2 可促进血小板聚集和黏附,引起血管收缩,血小板聚集,使血液黏稠度增加,引发血栓形成;前列腺素 I2 可以保护血管,抑制血小板的聚集,调节微血管血流<sup>[17-18]</sup>。在正常状态下,体内两者之间达到一种动态平衡,TAO 状态下血栓素 A2 增多,前列腺素 I2 降低,体内凝血-抗凝血平衡被打破,凝血功能亢进,凝血酶原转化为凝血酶,血液处于高凝状态,血小板聚集,最终导致血栓的形成。与模型组相比,模型+ MLST 3.8 和

7.6 g·kg<sup>-1</sup> 组 TXB2 表达降低和 6-KPGF1 $\alpha$  表达升高,PT,APTT 和 TT 延长,表明 MLST 可能通过选择性地抑制血小板中 TXA2 的产生,同时保留前列腺素 I2 的合成来调节体内的凝血-抗凝血平衡,改善凝血状态,使血液黏度降低,抑制血小板的聚集,最终抑制血栓形成。

综上所述,MLST 对 TAO 模型大鼠的治疗作用主要体现在 2 个方面:① 抑制炎症因子,改善血管内损伤状态;② 抑制血小板聚集,降低血液黏度,改善凝血和微循环。这可能与其调控血浆 IL-1 $\beta$ ,ET-1, TXB2 和 6-K-PGF1 $\alpha$  等炎症因子和凝血因子相关。

#### 参考文献:

- [1] Liew NC, Lee L, Nor Hanipah Z, *et al.* Pathogenesis and management of Buerger's disease[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2015, 14(3): 231-235.
- [2] Modaghegh MS, Hafezi S. Endovascular treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) [J]. *Vasc Endovasc Surg*, 2018, 52(2): 124-130.
- [3] Fazeli B, Dadgar Moghadam M, Niroumand S. How to treat a patient with thromboangiitis obliterans: a systematic review[J]. *Ann Vasc Surg*, 2018, 49: 219-228.
- [4] Rivera-Chavarría IJ, Brenes-Gutiérrez JD. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2016, 7: 79-82.
- [5] Shapouri-Moghaddam A, Saeed Modaghegh MH, Rahimi HR, *et al.* Molecular mechanisms regulating immune responses in thromboangiitis obliterans: a comprehensive review[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(3): 215-224.
- [6] Fazeli B, Rezaee SA. A review on thromboangiitis obliterans pathophysiology: thrombosis and angiitis, which is to blame? [J] *Vascular*, 2011, 19(3): 141-153.
- [7] 张婧, 李璇, 刘明, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗血栓闭塞性脉管炎的用药规律研究[J]. *中国中西医结合外科杂志 (Chinese Surgical Journal of Integrated Traditional and Western Medicine)*, 2020, 26(5): 850-857.
- [8] 叶慧, 郝怿隆, 何春水. 血栓闭塞性脉管炎的中西医结合治疗进展[J]. *世界最新医学信息文摘 (World Latest Medicine Information)*, 2020, 20(6): 66-68.
- [9] 吴雅韵. 基于 NF- $\kappa$ B 通路探究脉络舒通丸抗动脉粥样硬化的作用及机制研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [10] 李亚南, 刘小勇, 宋兆华. 脉络舒通颗粒联合西药对血栓性浅静脉炎患者的临床疗效[J]. *中成药 (Chinese Traditional Patent Medicine)*, 2018, 40(6): 1266-1270.
- [11] 李玲, 宋毅, 孙成磊, 等. 脉络舒通丸联合盐酸沙格雷酯治疗血栓闭塞性脉管炎的临床疗效观察[J]. *世界*



- 中医药 (*World Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2019, 14(9): 2316-2319.
- [12] 王赛, 白明, 苗明三. 基于中西医临床病症特点血栓闭塞性脉管炎动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志 (*Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*), 2021, 27(8): 235-240.
- [13] Ashida S, Ishihara M, Ogawa H, *et al.* Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats[J]. *Thromb Res*, 1980, 18(1-2): 55-67.
- [14] Sturtzel C. Endothelial cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1003: 71-91.
- [15] Li L, Zhou R, Niu ZR, *et al.* Cerebral vasorelaxant material basis of Xiaoxuming decoction study with rat basilar artery[J]. 中国药理学与毒理学杂志 (*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2016, 30(10): 1010.
- [16] Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) processing pathway[J / OL]. *Sci Signal*, 2010, 3(105): cm2 (2010-01-19) [2020-10-20]. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm2>.
- [17] Chiang CY, Chien CY, Qiou WY, *et al.* Genetic depletion of thromboxane A2 / thromboxane-prostanoid receptor signalling prevents microvascular dysfunction in ischaemia/reperfusion injury[J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118(11): 1982-1996.
- [18] Braune S, Küpper JH, Jung F. Effect of prostanoids on human platelet function: an overview [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9020 [2020-10-20]. <https://doi.org/10.3390/ijms21239020>.

## Therapeutic effect of Mailuo Shutong pills in thromboangiitis obliterans model rats

WANG Meng-li<sup>1,2</sup>, CHU Yao-juan<sup>1,2</sup>, ZUO Li-hua<sup>1,2</sup>, ZHAO Meng-fan<sup>1,2</sup>, LIU Ji-yun<sup>1,2</sup>, LI Bing<sup>3</sup>,  
SUN Zhi<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-jian<sup>1</sup>, DU Shu-zhang<sup>1</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; 2. Henan Province Precision Medicine Clinical Mass Spectrometry Engineering Research Center, Zhengzhou 450000, China; 3. State Key Laboratory of Generic Technology for Traditional Chinese Medicine, Linyi 276000, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To study the therapeutic effect of Mailuo Shutong Pills (MLST) against thromboangiitis obliterans (TAO). **METHODS** A TAO model was prepared by injecting 0.2 mL sodium laurate (7 g · L<sup>-1</sup>) into the femoral artery of right hind limbs in male rats. The sham group was injected with an equal volume of normal saline into the femoral artery. After that, the MLST groups were set up by ig given MLST 3.8, 7.6 and 15.2 g · kg<sup>-1</sup> for intervention. TSM 2.6 g · kg<sup>-1</sup> was ig administered as positive control, once a day, for 14 d. The body mass was recorded on the 1<sup>st</sup> and 14<sup>th</sup> days, respectively, and the morphological changes of affected limbs were graded on the 14<sup>th</sup> day. The blood routine indicators of rats were detected by an automatic hematology analyzer and microscope, and the indicators of coagulation and fibrinolysis[prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), fibrinogen (FIB) level] were detected by coagulation tests in plasma. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the contents of endothelin-1 (ET-1), interleukin-1β (IL-1β), thromboxane-2 (TXB-2) and 6-keto-prostaglandin (6-K-PGF1α) in plasma of TAO model rats. After HE staining, the morphology of the femoral artery and femoral vein in the affected limbs was observed, and the expression of NF-κB in the femoral artery was analyzed by immunofluorescence. **RESULTS** Compared with the sham group, the body mass of the TAO model group was decreased (*P*<0.01), lesions in the affected limbs became more evident (*P*<0.01), and blood routine indicators were increased significantly (*P*<0.01). The level of FIB was increased (*P*<0.05), while PT, APTT, and TT were shortened (*P*<0.05, *P*<0.01). The expressions of ET-1, TXB2 and IL-1β were increased (*P*<0.01), while the expression of 6-K-PGF1α was decreased (*P*<0.01). The intima, media and adventitia of the femoral artery and femoral vein were all

infiltrated by inflammatory cells, and the level of NF- $\kappa$ B in the femoral artery was increased ( $P<0.01$ ). Compared with the TAO model group, the body mass of rats in model+MLST 3.8 and 7.6 g·kg<sup>-1</sup> groups was increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the pathological degree of the femoral artery and femoral vein was alleviated ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), blood routine indicators were decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the level of FIB was decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and PT, APTT, and TT were extended ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The expressions of ET-1, TXB-2 and IL-1 $\beta$  were significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the level of 6-K-PGF1 $\alpha$  was up-regulated ( $P<0.01$ ). The femoral artery and femoral vein were less infiltrated by inflammatory cells and the level of NF- $\kappa$ B in the femoral artery was decreased ( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** MLST has obvious therapeutic effects against TAO, which may be related to the inhibition of inflammatory responses and the improvement of coagulation.

**Key words:** Mailuo Shutong pills; thromboangiitis obliterans; endothelin-1; interleukin-1 $\beta$ ; thromboxane-2; 6-keto-prostaglandin

**Foundation item:** World Federation of Chinese Medicine Societies (WFCMS2019003); and Key Scientific Research Projects of Colleges and Universities in Henan Province (20A350015)

**Corresponding author:** DU Shu-zhang, E-mail: dushuzhang911@163.com; ZHANG Xiao-jian, E-mail: zhxj0524@sina.com

(收稿日期: 2020-10-20 接受日期: 2021-09-10)

(本文编辑: 贺云霞 魏霞)

## 《中国药理学与毒理学杂志》对图表的要求

1. 论文中的病理照片、电泳图及化学结构式图等要求以“插入”→“图片”方式插入 word 文档,不要使用复制粘贴。病理照片必须加标尺,并以箭头指示典型病变位置。除照片外,其他图尽量不用彩色。

2. 统计的数据图表(包括线图和柱图等)一般通过“插入”→“图表”方式插入 word 文档,双击该图即可直接进入此图的作图软件,看到作图数据。

3. 双栏图大小:宽与高的比为 3:2,宽 $\leq$ 7.5 cm;通栏图大小为:宽 $\leq$ 15 cm;横、纵坐标字体为 Arial,字号为 8 或 9 磅。

4. 论著中的图表(包括图表题和图表注)全部使用英文,要求图表自明。图表注内容包括分组设计、药物浓度、给药顺序、作用时间、指标测试时间、各种缩写的解释说明、对观察内容必要的描述和统计方法等。

5. 线图图例依次使用  $\circ$   $\bullet$   $\triangle$   $\blacktriangle$   $\square$   $\blacksquare$  等,柱图按组别顺序依次用空心、左斜线、右斜线和网格线填充。图例字体用 Arial,字号为 6 磅。

6. 论著中的数据统计图表,应该首先进行一级比较,如模型组与正常对照组比较,结果用“\*”表示;各给药组与模型组比较,为二级比较,用“#”表示;待测药各组组间比较或者与阳性对照组比较,为三级比较,用“ $\Delta$ ”表示。统计学分析结果分  $P<0.05$  和  $P<0.01$  两个水平给出即可。

7. 综述中的图表全部使用中文。