

消栓饮对深静脉血栓形成兔外周血 IL-6、IL-8 的影响

曾林军¹, 王 勇², 李冬春², 黄永松²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙, 410005)

[摘要] 目的: 通过检测在消栓饮干预下深静脉血栓(DVT)兔模型 IL-6、IL-8 不同时段的变化水平, 初步探讨消栓饮治疗深静脉血栓的作用机制。方法: 将 45 只新西兰兔建立 DVT 动物模型, 随机分为 3 组, 即消栓饮组、低分子肝素钠组、0.9% 氯化钠注射液组, 分别于术后第 1 天给予消栓饮、低分子肝素钠、0.9% 氯化钠注射液治疗, 连续治疗 1 周, 分别于第 1、3、7 天给药 4h 后检测各组 IL-6、IL-8 水平。结果: 与 0.9% 氯化钠注射液组比较, 消栓饮组与低分子肝素钠组在术后同期的检测指标均下降($P < 0.05$); 与术后第 3 天比较, 3 组术后第 1、7 天检测指标水平均下降($P < 0.05$); 消栓饮组与低分子肝素钠组术后同期检测指标比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 消栓饮通过减少深静脉血栓外周血 IL-6、IL-8 炎症因子的释放水平, 从而抑制炎症反应, 对深静脉血栓形成有防治作用。

[关键词] 深静脉血栓; 消栓饮; IL-6; IL-8; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.05.079

Effect of Xiaoshuan decoction on peripheral interleukin - 6 and interleukin - 8 in rabbits with deep venous thrombosis

ZENG Lin - jun¹, WANG Yong², LI Dong - chun², HUANG Yong - song²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the changes in interleukin - 6 (IL - 6) and interleukin - 8 (IL - 8) in different periods of time in rabbits with deep venous thrombosis (DVT) treated by Xiaoshuan decoction and the mechanism of action of Xiaoshuan decoction in the treatment of DVT. Methods: A total of 45 New Zealand rabbits were used to establish an animal model of DVT and then randomly divided into Xiaoshuan decoction group, low - molecular - weight heparin (LMWH) group, and 0.9% sodium chloride injection group. These groups were treated with Xiaoshuan decoction, LMWH, and 0.9% sodium chloride injection, respectively, since day 1 after surgery. The course of treatment was one week. On days 1, 3, and 7, the levels of IL - 6 and IL - 8 were measured at 4 hours after administration. Results: Compared with the 0.9% sodium chloride injection group, the Xiaoshuan decoction group and the LMWH group had significant reductions in the above indices at each time point after surgery ($P < 0.05$). In all groups, the values on days 1 and 7 after surgery were significantly lower than those on day 3 ($P < 0.05$). There were no significant differences in these indices between the Xiaoshuan decoction group and the LMWH group at each time point after surgery ($P > 0.05$). Conclusion: Xiaoshuan decoction can reduce the levels of peripheral IL - 6 and IL - 8, inhibit inflammatory response, and thus help with the prevention and treatment of DVT.

Key words: deep venous thrombosis; Xiaoshuan decoction; interleukin - 6; interleukin - 8; experimental study

深静脉血栓(DVT)通常是血液非正常凝结,导致静脉回流障碍,从而引起下肢肿胀、疼痛。它是目前骨科骨折术后常见的并发症之一,若得不到及时诊治,一旦血栓脱落,将引起严重的肺栓塞而致人猝死。近年来,随着对 DVT 发

病机制的深入研究,认识到炎症与血栓之间有着错综复杂的关系,炎症因子能够引发 DVT,并参与其疾病发展整个过程。消栓饮为湖南中医药大学第二附属医院王勇教授临床经验方,其具有良好的抗凝、抗炎作用。本实验通过消栓饮

基金项目:湖南省自然科学基金项目(编号:2015JJ2108)

第一作者:曾林军,男,2015 级硕士研究生,研究方向:骨与关节损伤的研究

通讯作者:王勇,男,主任医师,教授,研究方向:中医药防治骨与关节损伤, E-mail:459831678@qq.com

干预深静脉血栓兔模型,观察其外周血 IL-6、IL-8 等炎症因子在不同时间点的动态变化,初步探究 DVT 的发病机制及消栓饮治疗 DVT 的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 普通级成年健康的新西兰大白兔 45 只,体质量 2.0~2.5kg,均为雄性(由湖南太平生物科技有限公司提供,许可证号:SYSK(湘)2013-0005),于湖南中医药大学动物实验中心分笼饲养,自由饮水,适应性喂养 1 周。

1.2 药物与试剂 消栓饮由黄芪 50g、丹参 20g、白芍 30g、桂枝 6g、当归尾 10g、甘草 6g、大腹皮 15g、泽泻 10g、茯苓 10g、川牛膝 15g、枳壳 10g、陈皮 10g 组成,由湖南中医药大学第二附属医院药剂科统一制备成 3g/mL 的含药液。低分子肝素钠:昆明积大制药有限公司生产,规格:0.4mL;5000IUaXa:用 5% 葡萄糖注射液 25mL 制备成 200IU/mL 稀释液备用。IL-6、IL-8 试剂盒由解放军总医院科技开发中心提供。

2 实验方法

2.1 模型制备 参照郑玉江等^[1]造模方法制备 DVT 兔模型:耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠稀释液(1mL/kg)麻醉,密切观察基本生命体征,取仰卧位,左股骨内侧区备皮消毒,在扪及明显股动脉搏动处,沿股动脉走向做长约 3cm 的皮肤切开,逐层分离筋膜、肌肉,仔细暴露并分离出股静脉,在游离出长约 2cm 的股静脉近心端用血管夹关闭,并用血管钳均分 3 段各夹血管壁 15 次,每次持续 2s,钳夹完毕后,关闭伤口。左髌以“人”字石膏外固定,维持在屈髌屈膝位,并保证右髌能活动自如。造模后于右大腿外侧予以青霉素钠注射液 2 万 IU/只肌肉注射预防术后感染。麻醉清醒后自由饮食,正常饲养,不予以抗凝药物。术后 6h 观察患侧肢端血运情况,并通过血管彩超证实深静脉血栓形成。

2.2 分组与给药 将 30 只造模成功的兔子随机均分为 0.9% 氯化钠注射液组(A 组)、消栓饮组(B 组)、低分子肝素钠组(C 组)。根据《中药药理研究》中“实验动物与人按体表面积比等效剂量换算比率表”计算出各组药物人兔等效剂量。各组在造模术后第 1 天开始分别给药,连续治疗 7d。其中消栓饮组按 5.0mL/(kg·d)灌胃给药,每天 1 次;低分子肝素钠组按 400IU/kg(即稀释液 2mL/kg)腹部皮下注射,每天 1 次;0.9% 氯化钠注射液组给予同等剂量的 0.9% 氯化钠注射液灌胃。

2.3 指标采集与检测 造模后第 1、3、7 天给药 4h 后,各组依次随机选取 5 只模型兔,取腹主动脉血 6mL,保存在 EDTA 管中,在离心机中以 3000r/min 转速离心 10min,取上清液,保存于 -80℃ 低温冰箱,采用 ELISA 法按照试剂说明书检测 IL-6、IL-8 水平。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件统计,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3 组血清不同时间点 IL-6、IL-8 水平比较,与 A 组比较,B、C 组术后同期检测指标水平均下降,差异均有统计学意义;各组术后 3d 的 IL-6、IL-8 水平均高于术后 1、7d,差异有统计学意义;与 C 组比较,B 组术后同期 IL-6、IL-8 检测水平差异无统计学意义。(见表 1)

表 1 3 组血清不同时间点 IL-6、IL-8 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	时间	IL-6	IL-8
A 组	10	术后 1d	1.324 ± 0.075 ^b	1.045 ± 0.038 ^b
		术后 3d	1.962 ± 0.150	1.883 ± 0.026
		术后 7d	1.812 ± 0.132 ^b	1.944 ± 0.051 ^b
B 组	10	术后 1d	1.213 ± 0.037 ^{abc}	1.134 ± 0.051 ^{abc}
		术后 3d	1.511 ± 0.053 ^{ac}	1.433 ± 0.042 ^{ac}
		术后 7d	1.232 ± 0.067 ^{abc}	1.208 ± 0.049 ^{abc}
C 组	10	术后 1d	1.011 ± 0.042 ^{ab}	0.962 ± 0.024 ^{ab}
		术后 3d	1.301 ± 0.019 ^a	1.372 ± 0.041 ^a
		术后 7d	1.132 ± 0.032 ^{ab}	1.175 ± 0.052 ^{ab}

注:与 A 组同期比较,^a $P < 0.05$;与本组术后 3d 比较,^b $P < 0.05$;与 C 组比较,^c $P > 0.05$ 。

4 讨论

静脉内膜损伤、血流缓慢和血液高凝状态,目前仍是公认的深静脉血栓的三大因素^[2]。传统上认为机体炎症和血栓的形成是两个相互孤立的病理过程。但近年来,随着国内外专家对 DVT 的深入研究,逐渐认识到体内炎症-血栓形成之间存在着错综复杂的网络关系。一方面,炎症因子能促进凝血因子分泌,使血液呈高凝状态,从而容易形成血栓;另一方面,凝血系统的启动可引起炎症因子的释放,引发或加重炎症^[3-4]。Ferraccioli 曾提出血栓形成过程中伴随着急性炎症向慢性炎症转化的过程^[5]。炎症因子根据作用可分为 2 类:(1)促炎症因子,主要引起组织损伤,刺激炎症介质释放,如 IL-6、IL-8、TNF 等;(2)抗炎性因子,其主要平衡前者对组织的损伤效应,抑制其产生,如 IL-4、IL-10 等。其中 IL-6 主要由单核巨噬细胞与成纤维细胞分泌,它是机体创伤和炎症过程中一种急性期反应介质,能够刺激肝脏产生纤维酶原激活抑制物,降低机体纤溶功能,促进血栓形成;同时还能延迟吞噬细胞的吞噬功能,进一步加剧炎症介质的产生^[6]。IL-8 是静脉血栓形成的重要因子,它可以诱导单核细胞生成 TF,并促进白细胞聚集,从而激活凝血系统,促使血栓形成^[7]。

深静脉血栓虽然在中医学中没有相关医籍的直接记载,但根据其临床症状和体征,应归属于“脉痹”“股肿”等范畴,主要因外伤、术后等原因导致脉络瘀阻,气血不通,水津外溢,流注下肢而发,病机特点可概括为湿、热、瘀、虚,故治疗上多以益气活血化瘀为根本,辅以清热利湿消肿。消栓饮具有益气活血、化瘀止痛、利水消肿的功效,(下转第 196 页)

- COPD模型的可行性[J]. 医学临床研究, 2010, 27(12): 2294-2296.
- [13] 宋小莲, 王昌惠, 白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较[J]. 第二军医大学学报, 2010(3): 246-249.
- [14] 李四维, 张玲, 李春雷, 等. 熏香烟加气管注入脂多糖和结合臭氧暴露法建立大鼠慢性阻塞性肺病模型[J]. 北京中医药大学学报, 2014(5): 321-324, 364.
- [15] 史琦, 李春雷, 阎玥, 等. 氧化应激特征性慢性阻塞性肺疾病大鼠模型建立及评价方法研究[J]. 中华中医药杂志, 2016(4): 1203-1206.
- [16] 许浒, 熊密, 黄庆华, 等. 细菌感染导致慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999(12): 34-37, 65.
- [17] Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, et al. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema[J]. Journal of immunology (Baltimore, Md; 1950), 2005, 175(10): 6968-6975.
- [18] Mohseni A, Mi T, Xia Y, et al. Genetic removal of the A2A adenosine receptor enhances pulmonary inflammation, mucin production, and angiogenesis in adenosine deaminase-deficient mice[J]. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology, 2007, 293(3): 753-761.
- [19] 张葵, 滕久祥, 彭芝配. 肺气虚证稳定期慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009(3): 179-181.
- [20] 李亚光, 曹柏龙, 贾东岩, 等. 慢性阻塞性肺疾病“肺脾气虚证”复合证型动物模型的研究[J]. 内蒙古中医药, 2005(5): 21-22.
- [21] 张伟, 宫静, 张靖轩, 等. 一种肺脾两虚型慢阻肺动物模型的建立[J]. 辽宁中医杂志, 2009(1): 142-143.
- [22] 金朝晖, 彭芝配, 滕久祥, 等. 慢性阻塞性肺疾病痰热郁肺证大鼠模型建立的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2008(4): 17-19.
- [23] 李泽庚, 王传博, 彭波, 等. 慢性阻塞性肺疾病痰瘀阻肺证大鼠模型的建立[J]. 天津中医药, 2010(1): 43-45.
- [24] 李素云, 乔翠霞, 李建生, 等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰湿证模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2012(3): 585-590.
- [25] 高振, 李凤森, 王晶, 等. 止嗽散加减方对慢性阻塞性肺疾病西北寒燥证大鼠模型肺功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014(5): 556-561.
- [26] 孙广仁, 巩会利, 高博, 等. 寒凉因素在慢性阻塞性肺疾病寒饮蕴肺证大鼠模型形成中的作用[J]. 山东中医药大学学报, 2011(4): 343-345.
- [27] 谭光波, 柏正平, 刘芳, 等. 慢性阻塞性肺疾病阴虚痰饮证大鼠模型的建立[J]. 中医药导报, 2015(22): 4-8.
- [28] 冯淳灵. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气虚血瘀痰阻证评价[J]. 中国中医药信息杂志, 2009(8): 39-40, 51.

(收稿日期: 2017-09-14)

(上接第173页)使瘀血得以化解, 水肿得以消除, 标本兼顾。消栓饮组方中以黄芪为君药, 益气活血; 丹参、当归尾、牛膝均为臣, 活血化瘀、通络止痛, 其中牛膝亦为引经药, 引药效下行至下肢; 桂枝配芍药, 以调和营卫、温通经脉; 猪苓、茯苓、泽泻清热利湿消肿; 陈皮、枳壳行气以助血行, 佐君药活血化瘀。前期研究^[8-9]结果表明, 消栓饮能抗血小板聚集, 延长凝血酶原时间; 同时还能纠正深静脉血栓形成中ET水平的失衡, 从而对DVT有防治作用。

本实验结果显示, 在深静脉血栓兔模型中, IL-6、IL-8等炎症因子水平在术后第1、3、7天各时段呈现出先升高后下降的趋势, 这种趋势基本符合深静脉血栓形成的病理过程, 说明炎症与血栓之间存在着某种网络关系。同时消栓饮可以减少深静脉血栓兔模型外周血IL-6、IL-8等炎症因子释放水平。通过减少炎症因子的分泌, 从而影响炎症-血栓之间的网络系统, 进而抑制血栓形成。因此, 减少炎症因子分泌是消栓饮预防及治疗深静脉血栓的机制之一。由于炎症-血栓网络系统关系错综复杂, 不能全面详细地阐述其具体作用机制, 故本实验只是消栓饮防治深静脉血栓作用机制的初步探讨, 其具体作用机制将有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 郑玉江, 汤庆, 邓方阁, 等. 建立新西兰白兔深静脉血栓模型的

实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(5): 437-439.

- [2] 笪波. 下肢深静脉血栓形成防治的临床研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2010, 18(7): 402-403.
- [3] Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus containa provirus integrated inThe sail region of the host genome[J]. Cell, 1982, 31(109): 99-109.
- [4] 刘晓毅, 杨林, 祁光裕, 等. 白介素、C反应蛋白和纤维蛋白原在下肢深静脉血栓炎症反应中的作用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 7(17): 660-663.
- [5] Gianfranco Ferraccioli, Elisa Gremese. Thrombogenicity of TNF α in rheumatoid arthritis defined through biological probes: TNF α blockers[J]. Autoimmunity Reviews, 2003(4): 172-174.
- [6] 乐海浪, 罗国强. 创伤后早期炎症因子 TNF-a、IL-1、IL-6 的研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(4): 763-765.
- [7] 徐余兴, 刘斌, 朱化刚, 等. 下肢深静脉血栓形成急性期 C-反应蛋白、IL-6、IL-8 及纤维蛋白原的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(4): 471-473.
- [8] 肖清明, 王勇, 谭胜平, 等. 消栓饮对兔下肢深静脉血栓形成血液流变学影响实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(5): 39-41.
- [9] 张栋, 高山, 汪能, 等. 消栓饮对创伤性肢体深静脉血栓大鼠血浆 ET 水平及血栓湿度的影响[J]. 中医药导报, 2016, 22(7): 39-41.

(收稿日期: 2017-12-04)