

# 抵当汤调控深静脉血栓形成大鼠 Th1/Th2 信号漂移的实验研究

安震<sup>1</sup> 张玥<sup>2</sup> 张玉冬<sup>2</sup> 侯光敏<sup>1</sup>

(1.山东中医药大学,山东济南250014; 2.山东中医药大学附属医院周围血管病科,山东济南250014)

**摘要** 目的:探讨深静脉血栓形成(DVT)大鼠辅助性T细胞(Th) Th1/Th2信号漂移的变化规律及抵当汤的干预机制。方法:选取雄性Wistar大鼠120只,分为假手术组、模型组、抵当汤小剂量组和抵当汤大剂量组,每组30只,每组又根据术后第1、3、7日处死时间的不同随机平均分笼饲养。Reyers法制备DVT大鼠模型,造模成功后假手术组和模型组大鼠每日给予生理盐水灌胃,抵当汤大、小剂量组每日分别给予1.8、0.9g/100g体重抵当汤药液灌胃。手术后第1、3、7日灌胃2h后,取相应10只大鼠,腹腔麻醉,开腹,腹主动脉取血,检测Th1、Th2细胞因子的变化。结果:血栓形成后同一时相,模型组较假手术组的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )、白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10)显著升高( $P<0.01$ )。随着干预天数的增加,模型组IL-10/TNF- $\alpha$ 比值在第3天变小,第7天增大,而INF- $\gamma$ /IL-4比值在第3天增大,第7天回落。抵当汤治疗后TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 水平及INF- $\gamma$ /IL-4比值较模型组显著降低( $P<0.01$ ),IL-4、IL-10水平及IL-10/TNF- $\alpha$ 比值较模型组显著升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),且抵当汤大剂量组作用强于抵当汤小剂量组。结论:Th1/Th2信号漂移与DVT的发生密切相关,抵当汤呈剂量依赖性地升高Th2细胞因子的分泌,抑制Th1细胞因子表达,进而调节Th1/Th2信号平衡,达到治疗DVT的目的。

**关键词** 深静脉血栓形成 抵当汤 Th1/Th2信号漂移 实验研究 大鼠

**中图分类号** R543.605 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)11-0076-03

**基金项目** 国家自然科学基金项目(81774311,30801474)

近年来,深静脉血栓形成(deep venous thrombosis, DVT)的发病率逐年上升,随着对本病发病机制研究的不断深入,炎症在DVT中的作用越来越受到重视<sup>[1]</sup>。有学者提出DVT形成的关键事件最有可能是静脉壁的炎症<sup>[2]</sup>。炎症细胞因子作为炎症反应的关键物质,能够通过诱导组织因子的表达促进血液的高凝状态,在DVT中起着重要的作用。辅助性T细胞(Th)的两种亚型Th1和Th2细胞分别分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )等促炎因子和白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10)等抗炎因子,这些因子的失衡导致Th1/Th2的漂移,从而导致疾病进展。本研究以动物实验为基础,从分子生物学的角度探讨Th1/Th2在DVT中的变化规律以及中药抵当汤的干预作用。

## 1 实验材料

**1.1 实验动物** 雄性Wistar大鼠120只,12周龄,体重200~250g,清洁级,购自山东大学动物实验中心(许可证号:SCXK鲁20130009)。

**1.2 实验药物** 抵当汤的四味药物均购于山东中医药大学附属医院,依据《伤寒论》记载的剂量,折算后大黄45g、炒水蛭40g、炒虻虫10g、桃仁6g。汤液

浓缩后折算药物浓度为2g/mL,4℃冰箱储存备用。

**1.3 实验试剂** TNF- $\alpha$ 、IL-4和IL-10的大鼠放免试剂盒,北京普尔伟业生物科技有限公司;大鼠INF- $\gamma$  ELISA试剂盒,R&D进口分装,上海门碟塔生物有限公司;水合氯醛,上海化学试剂采购供应站分装厂。

**1.4 实验仪器** DDL-5冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;SN-695型智能放射免疫 $\gamma$ 测量仪,上海核所日环光电仪器有限公司;WT11001R型电子天平,江苏省常州市万得天平仪器厂。

## 2 实验方法

**2.1 模型制备** 采用Rryers法<sup>[3]</sup>。用10%的水合氯醛按3mL/kg体重腹腔麻醉后,动物取仰卧位,腹中部皮肤去毛,碘伏消毒2遍,铺无菌巾。做剑突下腹正中切口,长6cm,将腹腔肠管移出体外,用湿纱布包裹后置右腹部。打开后腹膜,仔细游离左肾静脉与下腔静脉汇合处,用4#外科非吸收性丝线于左肾静脉下方结扎下腔静脉,1#外科非吸收性丝线结扎左肾静脉水平以远下腔静脉段的主要属支,将外置肠管回纳腹腔,1#丝线缝合腹壁和皮肤,给予腹腔注射青霉素10万单位/只,4h后成功建立DVT大鼠模型。此法一

一般在结扎后3h血栓形成率为60%~80%，结扎后6h血栓形成率为100%<sup>[3]</sup>。课题组前期在进行预实验时，采用Rryers法造模4h后肉眼均发现有血栓形成。

**2.2 分组与给药** 将120只Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组、抵当汤小剂量组和抵当汤大剂量组，每组30只。各组大鼠又分别按照术后第1、3、7日处死时间的不同随机平均分笼饲养，每笼10只。假手术组按照下腔静脉造模术的方法分离出下腔静脉后，不予以结扎，而后关腹。术后4h开始每日给药。假手术组和模型组给予生理盐水灌胃，每日1mL/100g，1次/d；抵当汤大、小剂量组分别每日予1.8、0.9g/100g药液灌胃，1次/d。

**2.3 取材** 分别于术后第1、3、7日取相应笼中的大鼠，最后一次灌胃2h后，腹腔麻醉，开腹，操作同造模方法，腹主动脉取血，立即置于不加抗凝剂的试管内，于30min内送核医学科离心后保存待测。

**2.4 观察指标及方法**

**2.4.1 血清TNF-α、IL-4、IL-10** 取腹主动脉血2mL，注入普通塑料试管内，4℃、离心半径17.8cm、3000r/min离心10min，离心血清，-20℃保存备用。测定前使样本置于室温或冷水中复融，再次4℃、离心半径17.8cm、3000r/min离心5min，取上清液测定。

**2.4.2 血浆IFN-γ** 取腹主动脉血2mL，注入含EDTA的试管内，离心半径17.8cm、3000r/min离心30min去除颗粒，-20℃保存备用。测定前至室温中复融，采用固相夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)测定。

**2.5 统计学方法** 采用SPSS 22.0统计软件进行数据处理。数据资料用( $\bar{x} \pm s$ )形式表示，采用t检验，多组间比较用方差分析，组间两两比较用q检验。P<0.05为有显著性差异，P<0.01为有非常显著性差异。

**3 实验结果**

实验过程中各组大鼠均有因麻醉过量、相互咬伤、手术操作不当以及其他原因而未能获得标本就已经死亡的情况，剩余只数

见表1、表2。

**3.1 各组大鼠干预各时期血清TNF-α、IL-4、IL-10，血浆IFN-γ水平比较** 结果见表1。说明抵当汤对血栓引起的TNF-α、IFN-γ升高有抑制作用，且其作用表现出剂量依赖性；能剂量依赖性地升高IL-4、IL-10水平。各组大鼠TNF-α、IFN-γ水平随手术的天数呈现先升高而后下降的趋势，说明随着血栓的形成，细胞因子TNF-α、IFN-γ水平逐渐升高，在术后第3天达到高峰，第7天时已逐渐下降。各组IL-4、IL-10水平随手术的天数呈现逐渐升高的趋势。

**3.2 各组大鼠干预各时期IL-10/TNF-α、IFN-γ/IL-4比值比较** 结果见表2。

表1 各组大鼠干预各时期血清TNF-α、IL-4、IL-10，血浆IFN-γ水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	动物数(只)	TNF-α (ng/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (ng/mL)
假手术组	术后第1日	10	1.57±0.142	16.16±0.412	446.13±6.640	29.67±2.186
	术后第3日	9	1.60±0.156	17.96±1.531	451.61±8.035	31.42±1.481
	术后第7日	9	1.52±0.098	16.56±0.939	458.44±11.189	33.48±1.592
模型组	术后第1日	9	2.10±0.168**	26.89±1.780**	489.97±13.449**	36.43±1.366**
	术后第3日	9	2.41±0.149***	34.17±4.462***	504.12±10.769***	38.41±2.021**
	术后第7日	9	2.29±0.105***	31.15±3.761***	530.67±17.409***	41.76±2.665***
抵当汤小剂量组	术后第1日	9	1.85±0.159**	22.75±2.235**	518.91±11.238**	40.78±4.477*
	术后第3日	9	2.16±0.137**	27.22±2.141**	540.70±8.254**	41.26±2.186
	术后第7日	8	2.02±0.141**	25.51±2.958**	574.36±18.186**	47.32±1.592
抵当汤大剂量组	术后第1日	10	1.76±0.088**	20.70±1.512**	538.58±10.471**	42.05±1.048**
	术后第3日	8	2.00±0.117**	24.96±2.112**	552.28±11.907**	49.85±1.907**
	术后第7日	8	1.87±0.115**	21.34±1.227**	605.81±11.939**	51.97±1.648**

注：与假手术组比较，\*\*P<0.01；与模型组比较，▲P<0.05，▲▲P<0.01；与抵当汤大剂量组比较，△P<0.05，△△P<0.01；与本组术后第1日比较，#P<0.05，##P<0.01；与本组术后第3日比较，☆P<0.05，☆☆P<0.01。

表2 各组大鼠干预各时期IL-10/TNF-α、IFN-γ/IL-4比值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	动物数(只)	IL-10/TNF-α	IFN-γ/IL-4
假手术组	术后第1日	10	20.53±1.966	3.62±0.329
	术后第3日	9	19.64±1.181	3.98±0.367
	术后第7日	9	20.73±1.592	3.61±0.505
模型组	术后第1日	9	17.35±2.211**	5.49±0.630**
	术后第3日	9	15.94±0.699**	6.78±0.686***
	术后第7日	9	18.23±1.289**	5.87±0.621**
抵当汤小剂量组	术后第1日	9	22.043±1.778**	3.998±0.174**
	术后第3日	9	19.102±1.792**	5.03±0.895**
	术后第7日	8	22.19±3.651**	4.44±0.736**
抵当汤大剂量组	术后第1日	10	23.875±1.055**	3.47±0.330**
	术后第3日	8	24.93±1.382**	4.52±0.837**
	术后第7日	8	27.79±1.888**	3.522±0.690**

注：IFN-γ/IL-4比值数值过小，为了计算方便，表中数值为比值×100。与假手术组比较，\*\*P<0.01；与模型组比较，▲▲P<0.01；与抵当汤大剂量组比较，△P<0.05，△△P<0.01；与本组术后第1日比较，#P<0.05，##P<0.01；与本组术后第3日比较，☆P<0.05，☆☆P<0.01。

## 4 讨论

随着近年来分子生物学的发展,对于DVT发病机制的研究越来越深入。越来越多的研究证明炎症与DVT的发生密切相关。Th1和Th2是Mossmann在1989年根据T细胞分泌因子的不同提出的两个功能亚群, Th1和Th2细胞能够分泌多种炎症细胞因子,其中Th1分泌的TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 具有促炎作用, Th2分泌的IL-4、IL-10具有抑炎作用<sup>[5]</sup>。正常情况下, Th1/Th2在体内存在着动态平衡,当Th1/Th2平衡失调并向某一状态转化时,称之为Th1/Th2漂移现象<sup>[6]</sup>。习惯上把Th1及其细胞因子占优势的状态称为Th2向Th1漂移,反之Th2及其细胞因子占优势的状态称为Th1向Th2漂移。Th1/Th2漂移,能够影响疾病进展。本研究结果显示,血栓形成后同一时相,模型组较假手术组TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4和IL-10显著升高,差异有非常显著性( $P<0.01$ ),说明在排除手术的原因后,血栓形成能引起TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4和IL-10的升高。随着天数的增加,IL-10/TNF- $\alpha$ 比值在第3天变小,第7天增大,而IFN- $\gamma$ /IL-4比值在第3天增大,第7天回落。说明血栓形成后,机体存在TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等促炎因子分泌增加,导致Th1占优势, Th2向Th1漂移,且在第3天达到高峰。这与DVT的临床表现相一致:发病初期,随着Th1细胞因子分泌的增加,机体的炎症反应明显,表现为肢体红肿热痛;随着病程的延长, Th2细胞因子分泌逐渐增加,下调静脉壁的炎症,表现为患肢红肿热痛减轻,血栓也趋于稳定。

DVT属于中医学“股肿”“瘀血流注”范畴,临床表现多有患肢的红、肿、热、痛,中医辨证多属瘀热互结。DVT后瘀血阻于经脉,气血运行不畅,瘀久化热,热邪又可伤津灼血,使血脉滞涩,即所谓“瘀积发热”“留瘀化火”。“血不利则为水”,瘀血阻于脉中,营血回流受阻,导致津液代谢、输布障碍,聚而为湿。瘀久化热,热邪灼津,炼液成痰。可见瘀和热不仅是DVT过程中的病理产物,还是新的致病因素<sup>[7-8]</sup>。因此中医治疗当以泻热逐瘀为主要治法。抵当汤出自《伤寒杂病论》,由水蛭、虻虫、桃仁、大黄四味药物组成,是治疗下焦蓄血证的经典方剂。方中水蛭逐恶血破癥,具有破瘀血而不伤新血,专入血分而不伤气分的特点;虻虫入肝经而专破瘀血;辅以活血祛瘀的桃仁,下瘀泻热的大黄,使瘀热从下窍而泄。本研究结果显示,抵当汤治疗后TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平及IFN- $\gamma$ /IL-4比值较模型组降低,IL-4、IL-10水平及IL-10/TNF- $\alpha$ 比值较模型组升高,且抵当汤大剂量组的作用强于小剂量组。

说明抵当汤能剂量依赖性促进Th2细胞因子的分泌,抑制Th1细胞因子分泌,使Th2向Th1漂移的状态得到遏制和逆转。

综上所述,本研究观察了Th1和Th2在DVT中的比例变化及其特征性炎症因子的表达。DVT存在Th1细胞因子分泌占优势, Th2向Th1漂移的现象。抵当汤能剂量依赖性诱导Th2细胞因子的分泌,抑制Th1细胞因子表达,调节Th1/Th2平衡,减轻炎症反应,达到治疗DVT的目的。下一步我们将通过研究Th1/Th2漂移调节机制,控制其分化的细胞因子微环境,进而调节体内Th1/Th2漂移,最终实现控制炎症,达到防治DVT的目的。

## 参考文献

- [1] RABINOVICH A, COHEN J M, CUSHMAN M, et al. Association between inflammation biomarkers, anatomic extent of deep venous thrombosis, and venous symptoms after deep venous thrombosis[J]. Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders, 2015, 3 (4): 347.
- [2] BRANCHFORD B R, CARPENTER S L. The Role of Inflammation in Venous Thromboembolism[J]. Front Pediatr, 2018, 6: 142.
- [3] REYERS I, MUSSONI L, DONATI M B, et al. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats[J]. Thromb Res, 1980, 18 (5): 669.
- [4] 邱海波,周韶霞,蒋雄斌,雷公藤多苷对小鼠急性肺损伤的防治作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8 (2): 109.
- [5] MOSMANN T R, COFFMAN R L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells[J]. Adv Immunol, 1989, 46: 111.
- [6] BELLINGHAUSEN I, BRAND U, ENK A H, et al. Signals involved in the early TH1/TH2 polarization of an immune response depending on the type of antigen[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103 (2 Pt 1): 298.
- [7] 张玥. 深静脉血栓形成“瘀热互结”病机浅析[J]. 中医杂志, 2009, 50 (11): 1049.
- [8] 刘政,张颀颖. 探析“血不利则为水”学术思想在防治周围血管病中的应用[J]. 新中医, 2013, 45 (6): 7.

第一作者:安震(1991—),男,硕士研究生,研究方向为中西医结合治疗周围血管疾病。

通讯作者:张玉冬,博士,副教授。13573143378@163.com

收稿日期:2018-07-10

编辑:吴宁