

·论 著·

三七对下腔静脉结扎DVT大鼠模型D-二聚体、cTn-I、BNP的影响

江楚峰 王大芬 祝晨 陈玮 王灵聪

[摘要] 目的 观察三七对下腔静脉结扎深静脉血栓(DVT)大鼠D-二聚体、心肌肌钙蛋白 I(cTn-I)、血B型钠尿肽(BNP)的影响。方法 将20只大鼠随机分为三七组、DVT组、依诺肝素组和假手术组,每组各5只。除假手术组外均行开腹结扎下腔静脉造模。下腔静脉结扎造模成功后48 h处死大鼠,取游离左肾静脉和下腔静脉汇合处及向下1 cm血管进行苏木素-伊红染色,于显微镜下观察,并检测血管D-二聚体、cTn-I、BNP含量。结果 四组大鼠血浆cTn-I、D-二聚体、BNP含量比较,差异均有统计学意义(F 分别=26.56、9.86、7.34, P 均 <0.05)。DVT组大鼠血浆中cTn-I、D-二聚体、BNP含量高于假手术组,差异有统计学意义(t 分别=11.40、6.67、8.92, P 均 <0.05)。三七组、依诺肝素组cTn-I含量明显低于DVT组,差异均有统计学意义(t 分别=2.62、3.50, P 均 <0.05)。依诺肝素组D-二聚体含量明显低于DVT组,差异有统计学意义($t=3.66, P<0.05$)。结论 三七和依诺肝素对于DVT大鼠模型均有一定治疗作用。

[关键词] 三七; 深静脉血栓; D-二聚体; 心肌肌钙蛋白I; 血B型钠尿肽

Effects of Radix Notoginseng on D-dimer, cTn-I and BNP in rat model of DVT with inferior vena cava ligation

JIANG Chufeng, WANG Dafen, ZHU Chen, et al. Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China.

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Radix Notoginseng on D-dimer, cTn-I and BNP in DVT rats. **Methods** Twenty rats were randomly divided into four groups, namely, the Radix Notoginseng group, the DVT group, the enoxaparin group and the sham group, with five animals in each group, and all of them were subjected to open-abdomen ligation of the inferior vena cava for modeling except the sham-operation group, which was only subjected to open-abdomen. The animals were executed 48h after the ligation and modeling of inferior vena cava, and the blood vessels at the confluence of the free left renal vein and inferior vena cava and 1 cm downward were stained with hematoxylin-eosin, and observed under the microscope. The plasma D-dimer, cTn-I, and BNP were detected. **Results** Comparison of plasma cTn-I, D-dimer, and BNP levels among the four groups of rats showed statistically significant differences ($F=26.56, 9.86, 7.34, P<0.05$). The cTn-I, D-dimer, and BNP levels of rats in the DVT group were higher than those in the sham group, and the differences were statistically significant ($t=11.40, 6.67, 8.92, P<0.05$). Compared with the DVT group, the cTn-I content in the Radix Notoginseng group and enoxaparin group was significantly lower ($t=2.62, 3.50, P<0.05$). The D-dimer content in the enoxaparin group was significantly lower than that in the DVT group, and the difference was statistically significant ($t=3.66, P<0.05$). **Conclusion** Both Radix Notoginseng and enoxaparin had some therapeutic effects on the DVT rat model.

[Key words] Radix Notoginseng; deep vein thrombosis; D-dimer; cardiac troponin-I; brain natriuretic peptide

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.008.003

基金项目:2022年度浙江省中医院扶持学科[浙中院字(2022)65号];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);2022年度浙江中医药大学校级基础科研能力提升项目(2022JKJNTZ24);浙江省自然科学基金(LY17H290006)

作者单位:310053 浙江杭州,浙江中医药大学(江楚峰);浙江中医药大学附属第一医院(浙江省中医院)重症医学科(王大芬、祝晨、陈玮、王灵聪)

通讯作者:王灵聪, Email: wlc501@139.com

肺栓塞是以各种栓子阻塞肺动脉或其分支为其发病原因的一组疾病或临床综合症的总称,包括肺血栓栓塞症(pulmonary thromboembolism, PTE)、

脂肪栓塞综合征、羊水栓塞、空气栓塞、肿瘤栓塞等,其中PTE为肺栓塞的最常见类型。引起PTE的血栓主要来源于下肢的深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)^[1]。三七止血化瘀能力均强^[2-3],有止血而不留瘀之优,凡出血及瘀肿即可投之,解除血液高凝状态的功能,从而起到抗血栓的作用^[4-6]。欧洲急性肺栓塞指南^[7]指出,急性肺栓塞患者血B型钠尿肽(brain natriuretic peptide, BNP)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin-I, cTn-I)、D-二聚体水平较低者预后良好。本研究旨在探索三七对DVT大鼠D-二聚体、cTn-I、BNP的影响,为临床上用药选择和指标的监测提供一定的帮助。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 实验时间2023年2月12日至2023年2月15日。选取湖北省实验动物研究中心提供的雄性健康SPF(无特定病原体)级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。三七由杭州华东中药饮片有限公司生产,依诺肝素钠注射液由葛兰素史克中国投资有限公司生产;cTn-I酶联免疫吸附测定试剂盒由中国上海酶联生物生产;D-二聚体酶联免疫吸附测定试剂盒由中国江莱生物生产;BNP酶联免疫吸附测定试剂盒由中国上海酶联生物生产;SpectraMax Plus 384型全波长酶标仪由美国美谷分子仪器(上海)有限公司生产;TDZ4-WS型低速自动平衡离心机由中国湖南湘仪实验室仪器开发有限公司生产;OD值测量仪器(高精度分光光度计)由北京美林恒通(北京)仪器有限公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 DVT模型构建 根据预实验发现DVT造模后48 h为静脉血栓高峰,因此选择造模后48 h为取材时间。采用下腔静脉结扎的方法诱导VTE模型^[8,9]。取SD大鼠,用气体麻醉,无菌条件下沿腹白线逐层切开入腹,将肠管及其系膜湿纱布包裹后牵向腹腔右侧,避免将肠管牵出腹腔外,以减少对肠管的感染。充分暴露腹腔的下腔静脉及腹主动脉后,游离左肾下方,游离左肾静脉与下腔静脉汇合处及其下方1 cm下腔静脉段。在左肾静脉汇入下腔静脉下方穿过一条“0”号丝线,打成活结,并将结扎线两头穿过腹壁引出腹腔。用同样的方法在左髂总静脉上方置结扎线予以结扎(无需活结),将肠

管及其系膜回纳腹腔,调整结扎线的位置以避免压迫肠管,将结扎线固定在腹壁外,并将0.9%氯化钠注射液2 mL注入腹腔中,关腹,术后动物保温,6 h后抽出近心端活结,解除近心端(即左肾静脉汇入下腔静脉处)结扎,之后可自由进食、饮水,术后肌肉注射抗生素。

1.2.2 分组及处理 将20只SPF级雄性SD大鼠,按照随机数字表法分成假手术组、DVT组、三七组和依诺肝素组,共4组,每组5只。①三七组:大鼠给予三七粉0.5 g(每日总量 $2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃处理,每日2次,于灌胃第4天,全部进行DVT造模处理,造模后依旧是每日2次,48 h后处死取材。②DVT组:从造模前开始采用0.5 g 0.9%氯化钠注射液灌胃,每日2次。③依诺肝素组:DVT造模前不予用药,DVT造模后立即予皮下注射依诺肝素针,每次 $4\text{ mg/kg}^{[10]}$,每天2次。④假手术组:从造模前开始采用0.5 g 0.9%氯化钠注射液灌胃,每日2次,不进行血管两处结扎处理。

1.3 检测指标

1.3.1 病理学观察 造模成功后48 h,取结扎段血管(即左肾静脉汇入下腔静脉处至左髂总静脉上方,长约1 cm)制作切片,苏木素-伊红染色,显微镜下观察病理学变化。

1.3.2 BNP、cTn-I检测 室温平衡1 h后取出板条,设置标准品孔、空白孔和样本孔。标准品孔中各加不同浓度的标准品50 μL ,样本孔中加待测样本50 μL ,空白孔不做任何处理。除空白孔外,其余孔中加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体100 μL ,用封板膜封住,37℃恒温箱温育60 min。弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液(350 μL),静置1 min后甩去洗涤液后拍干,如此重复洗5次。每孔加入底物50 μL ,37℃避光孵育15 min。每孔加入终止液50 μL ,15 min内,在450 nm波长处测定各孔的OD值,记录各组大鼠的BNP、cTn-I值。

1.3.3 D-二聚体检测 室温平衡10 min后取出所需板条。分别将样品或不同浓度标准品按照每孔100 μL 加入相应孔中,空白孔中加入100 μL 通用稀释液,盖上封板膜后37℃温育1 h。取出酶标板,弃去液体,不洗涤。每孔直接加入生物素化抗体工作液100 μL ,盖上封板膜后37℃温育1 h。弃去液体,每孔加入300 μL 洗涤液,静置1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此反复洗3次。每孔加入酶结合物工作液100 μL ,盖上封板膜后37℃温育

30 min。弃去液体,洗板5次,方法同上。每孔加入底物(TMB)90 μL ,盖上封板膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育15 min。最后取出酶标板后每孔加入终止液50 μL ,立即在450 nm波长处测定各孔的OD值,记录各组大鼠的D-二聚体值。

1.4 统计学方法 采用SPSS 26.0统计软件进行数据处理和分析。计量资料呈正态分布的数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,多组间比较采用 F 检验,两两比较采用LSD- t 法。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学观察见封二图1

由封二图1可见,与假手术组相比,DVT组大鼠下腔静脉内膜严重损伤,内皮细胞大部分脱落,血管壁连续性中断,可见大量血栓形成,红色血栓与大量嗜酸性纤维素组成混合血栓,并且附着于血管壁上,血管内皮层及血栓内大量炎细胞浸润;三七组大鼠下腔静脉内膜严重损伤,内皮细胞大部分脱落,血管壁连续性中断,混合血栓中有大量炎细胞浸润(相比DVT组较少),混合血栓中心以纤维素为主,存在机化现象,并有小面积再通现象;依诺肝素组大鼠下腔静脉内皮层严重损伤,内皮细胞部分脱落,血管壁连续性部分中断,有炎细胞浸润,血栓以纤维素样血栓为主,血栓形成较DVT组和三七组轻。

2.2 各组大鼠血浆中cTn-I、D-二聚体、BNP含量见表1

表1 各组大鼠血浆中cTn-I、D-二聚体、BNP含量比较

组别	cTn-I/pg/mL	D-二聚体/ng/mL	BNP/pg/mL
假手术组	226.42 \pm 55.22	339.05 \pm 68.16	67.84 \pm 10.97
DVT组	672.13 \pm 67.75*	848.31 \pm 156.68*	157.35 \pm 19.58*
三七组	543.45 \pm 86.52 [#]	669.96 \pm 223.34	140.51 \pm 41.77
依诺肝素组	475.02 \pm 106.24 [#]	517.16 \pm 128.18 [#]	134.72 \pm 44.40

注: *:与假手术组比较, $P<0.05$; #:与DVT组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,四组大鼠血浆cTn-I、D-二聚体、BNP含量比较,差异均有统计学意义(F 分别=26.56、9.86、7.34, P 均 <0.05)。进一步两两比较,DVT组大鼠血浆中cTn-I、D-二聚体、BNP含量高于假手术组,差异均有统计学意义(t 分别=11.40、6.67、8.92, P 均 <0.05)。三七组、依诺肝素组cTn-I含量明显低于DVT组,差异均有统计学意义(t 分别=2.62、3.50, P 均 <0.05),三七组与依诺肝素组cTn-I含量比较,差异无统计学意义($t=1.12$, $P>0.05$)。依

诺肝素组D-二聚体含量明显低于DVT组,差异有统计学意义($t=3.66$, $P<0.05$),三七组与DVT组、依诺肝素组D-二聚体含量比较,差异均无统计学意义(t 分别=1.46、1.33, P 均 >0.05)。三七组、依诺肝素组BNP含量与DVT组比较,差异均无统计学意义(t 分别=0.82、1.04, P 均 >0.05)。

3 讨论

在引起大鼠DVT形成的模型中,大部分实验采用自颈静脉、尾静脉输注栓子^[11]的方式,不同于常用的下腔静脉狭窄模型^[9,12,13],本次研究模型采用IVC结扎法,完全结扎了下腔静脉,6 h后松解近心端,术后后临近40 h时观察发现大鼠呼吸急促,胸腔起伏明显,预实验也证实造模48 h后大鼠肺栓塞大体标本渗血明显,本次研究前期实验^[14]和其他研究^[8]共同证明了造模后48 h取材的可行性。

欧洲心脏病学会与欧洲呼吸学会合作制定的急性肺栓塞指南认为BNP、cTn-I、D-二聚体水平较低患者预后良好^[7]。肌钙蛋白是调节心肌肌肉组织收缩的蛋白,肺栓塞导致肺动脉和右心室压力的急性升高,随后出现局部缺血、张力和功能障碍,以及全身肌钙蛋白释放。根据一项国外的meta分析,肌钙蛋白升高对急性肺栓塞患者死亡率的影响较高,即使在低风险肺栓塞患者中,肌钙蛋白对死亡率的影响仍然较高^[15],是急性肺栓塞患者预后较差的一个危险因素^[16]。

发生急性肺栓塞时,BNP快速合成并释放入血来调节心脏功能。在临床上,血浆前脑钠肽和脑钠肽水平可以用于预测急性肺栓塞患者的不良预后结局^[17]。D-二聚体是被纤溶酶降解交联纤维蛋白后的产物,临床上D-二聚体对血栓形成的敏感性高,联合患者D-二聚体、脑钠肽水平对预测患者预后、指导治疗等有较大作用^[18]。

本次研究结果表明,DVT组大鼠cTn-I、D-二聚体、BNP三项指标均有显著上升,表示DVT组成功造模即出现下肢DVT;与DVT组比较,三七组的大鼠cTn-I指标明显降低,说明三七可显著降低下肢DVT大鼠的cTn-I,三七组大鼠的D-二聚体、BNP指标相比假手术组大鼠,虽无明显差异,但在数据中仍可见有不同程度的降低,说明三七在DVT大鼠上有一定的治疗效果;依诺肝素组治疗效果与三七组对比时无明显差异,表明三七有较好的治疗效果,可以在一定程度上预防手术后患者的DVT^[19,20]。

下肢DVT形成的治疗有抗凝、溶栓及取栓等,

但在临床上,患者的出血风险往往较高,故有必要对高出血风险患者进行预防。作者所在课题组前期实验研究表明,三七通过mTOR信号通路以及其他自噬通路可抑制创伤性颅内出血^[15,21],高浓度三七表现出与低分子肝素相当的阳性疗效。除三七外,活血化瘀的中药还有川芎、丹参、当归等,以上中药在临床使用中患者的出血风险仍较大^[22]。三七具有“止血而不留瘀”的特点,三七中的有效成分三七总皂苷能降低血小板表面活性,抑制血小板聚集和黏附,组织血栓形成^[23],三七中的三七素也有止血效果^[24,25]。在临床上也有运用三七止血及抗血栓^[26],所以当患者有出血或高出血风险以致不能使用低分子肝素等抗凝手段时,可以使用三七抗凝或预防,同时不加重出血或出血风险。

本次实验不足之处,动物实验的样本较少,无法提供更为精确的各项数据进行统计,另外,本次实验无法提供大鼠肺栓塞相关的病理和肺部CT。未来的研究中,将通过三七干预PTE大鼠甲基化修饰变化的信号通路及相关基因验证PTE大鼠部分基因m6A甲基化修饰变化,探究其对大鼠肺栓塞的调控机制。

参考文献

- Lutsey PL, Zakai NA. Epidemiology and prevention of venous thrombosis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(4): 248-262.
- 许智超, 温燕华, 李美娟, 等. 景天三七对阿司匹林大鼠的止血活血功效及作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(1): 84-85.
- 梁璐. 三七对血液系统药理活性的探讨[J]. *中国处方药*, 2016, 15(7): 22-23.
- 黄有荣, 蒋攀峰. 三七总皂甙预防兔创伤性肢体深静脉血栓形成的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2009, 17(3): 15-17.
- 蒋贤高, 林晓, 黄一统, 等. 三七总皂甙注射液对脓毒症凝血功能的影响[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2010, 9(4): 419-421.
- 陈鹏, 胡晓立, 雷伟亚, 等. 三七叶甙对兔血小板聚集功能的影响[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2005, 4(1): 82-85.
- Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS) [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(4): 543-603.
- Porembskaya O, Zinserling V, Tomson V, et al. Neutrophils mediate pulmonary artery thrombosis in situ[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5829.
- Liu H, Lu ZQ, Lin BQ, et al. Inferior vena cava stenosis-induced deep vein thrombosis is influenced by multiple factors in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110270.
- He JW, He LZ, Lu F, et al. Low-molecular-weight heparin calcium attenuates the tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Injury*, 2021, 52(8): 2068-2074.
- Karpov A, Vaulina D, Smirnov S, et al. Rodent models of pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. *Heliyon*, 2022, 8(3): e09014.
- Ponomaryov T, Payne H, Fabritz L, et al. Mast cells granular contents are crucial for deep vein thrombosis in mice[J]. *Circ Res*, 2017, 121(8): 941-950.
- Brandt M, Giokoglu E, Garlapati V, et al. Wenzel, pulmonary arterial hypertension and endothelial dysfunction is linked to NADPH oxidase-derived superoxide formation in venous thrombosis and pulmonary embolism in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 1860513.
- Zhu C, Jiang HF, Zhou XQ, et al. Blood circulation activating effect of Sanqi (Radix Notoginseng) on venous thromboembolism rat[J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41(5): 753-761.
- El-Menyar A, Sathian B, Al-Thani H. Elevated serum cardiac troponin and mortality in acute pulmonary embolism: Systematic review and meta-analysis[J]. *Respir Med*, 2019, 157: 26-35.
- Konstantinides S, Geibel A, Olschewski M, et al. Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism[J]. *Circulation*, 2002, 106(10): 1263-1268.
- Meng XD, Fu MM, Wang JJ, et al. Effects of recombinant human brain natriuretic peptide in patients with acute pulmonary embolism complicated with right ventricular dysfunction who underwent catheter-directed therapy[J]. *Int Heart J*, 2022, 63(1): 8-14.
- 洪流, 张家明, 陈华英, 等. D-二聚体含量检测在血栓性疾病中的临床应用[J]. *卫生职业教育*, 2017, 35(20): 96-97.
- Wang CM, Guo XF, Liu LM, et al. Prevention of deep vein thrombosis by panax notoginseng saponins combined with low-molecular-weight heparin in surgical patients[J]. *Chin Integr Med*, 2022, 28(9): 771-778.
- Yan ST, Gao F, Dong TW, et al. Meta-analysis of randomized controlled trials of xueshuantong injection in prevention of deep venous thrombosis of lower extremity after orthopedic surgery[J]. *Evid Based Compl Alt*, 2020,

(下转第702页)

- 对脑卒中偏瘫患者下肢与平衡功能恢复的影响[J]. 赣南医学院学报, 2021, 41(1): 57-60.
- 11 Hao MQ, Fang Q, Wu B, et al. Rehabilitation effect of intelligent rehabilitation training system on hemiplegic limb spasms after stroke[J]. Open Life Sci, 2023, 18(1): 20220724.
- 12 Cui R, Liu HT, Li M, et al. Effects of "taking the waist as the axis" therapy on trunk postural control disorder after stroke: A randomized controlled trial[J]. Front Aging Neurosci, 2023, 15: 1040277.
- 13 唐泽文, 许方军, 秦成义, 等. 上肢康复机器人联合等速肌力训练对脑卒中恢复期偏瘫患者的康复效果研究[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(16): 3183-3186, 3200.
- 14 苏丽丽, 方小养, 林玲, 等. 上肢康复机器人训练对亚急性脑卒中患者认知和上肢运动功能的效果[J]. 中国康复理论与实践, 2022, 28(5): 508-514.
- 15 Ma Y, Wang T, Wang HB, et al. Crossover investigators. extracranial-intracranial bypass and risk of stroke and death in patients with symptomatic artery occlusion: The crossover randomized clinical trial[J]. JAMA, 2023, 330(8): 704-714.
- 16 Bersano A, Khan N, Fuentes B, et al. European stroke organisation (ESO) guidelines on moyamoya angiopathy endorsed by vascular european reference network (VAS-CERN)[J]. Eur Stroke J, 2023, 8(1): 55-84.
- 17 刘莉莉, 王玲, 于峰. 脑电仿生电刺激联合上肢智能反馈康复机器人治疗老年急性缺血性脑卒中的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(23): 4148-4151.
- (收稿日期 2024-01-18)
(本文编辑 高金莲)

(上接第680页)

- 2020: 8877791.
- 21 Shi Y, Zhou XQ, Yang RH, et al. Panax notoginseng protects the rat brain function from traumatic brain injury by inhibiting autophagy via mammalian targeting or rapamycin[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(8): 11207-11217.
- 22 Jiang T, Zhou XQ, Jiang HF, et al. Efficacy of Sanqi (Radix Notoginseng) in treating cerebral hemorrhage in rats with traumatic brain injury[J]. Tradit Chin Med, 2021, 41(2): 262-269.
- 23 袁军芬. 三七的临床应用[J]. 中国民间疗法, 2014, 22(5): 21.
- 24 王阶, 许军, 袁敬柏, 等. 三七总苷对高黏血症患者血小板活化分子表达和血小板聚集的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(4): 312-316.
- 25 周家明, 马妮, 詹泽丰, 等. 三七粉和三七素的止血效果对比[J]. 人参研究, 2016, 29(3): 5-7, 18.
- 26 张涛, 宋玉, 杨惠芬. 三七粉预防重症加强护理病房颅脑损伤昏迷患者并发静脉血栓栓塞症临床研究[J]. 新中医, 2022, 54(9): 60-62.
- (收稿日期 2024-03-11)
(本文编辑 葛芳君)