

通络刮痧和中药对气滞血瘀证雌性大鼠肝组织 Nrf2 表达影响的对比研究*

唐也笑**，万荷天一，罗小光***

(贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探究通络刮痧和中药对气滞血瘀证雌性大鼠肝组织核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 表达的影响。方法: 40 只 SD 雌性大鼠随机均分为空白组、模型组、中药组及刮痧组, 模型组、中药组及刮痧组大鼠连续 14 d 腹腔注射盐酸肾上腺素, 4 h 后接受 1~2 种不可预见性物理刺激制作气滞血瘀证动物模型, 空白组大鼠不予注射、正常喂养; 造模成功后次日, 中药组大鼠用桃红四物汤灌胃每日 1 次、共治疗 14 d, 刮痧组大鼠给与通络刮痧法每周 1 次、共治疗 2 次; 模型组大鼠每日抓捕 1 次、持续 2 周, 空白组大鼠不予任何治疗、正常喂养 2 周; 2 周后, 4 组大鼠取血检测全血黏度(低切、中切及高切)、血浆黏度及血细胞比容, 检测凝血酶时间(TT)、部分活化凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)及纤维蛋白原(FIB), 剖腹取出部分肝组织后, 用玻璃匀浆器研磨均匀, 检测肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白的表达。结果: 与空白组相比, 模型组大鼠血液黏度、血细胞比容都明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TT 和 APTT 明显缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白表达增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 中药组和刮痧组大鼠血液黏度、血细胞比容都明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TT 及 APTT 延长 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白表达显著增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 刮痧组和中药组大鼠各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 通络刮痧和桃红四物汤可改善气滞血瘀证雌性大鼠部分血液流变学及凝血指标, 其作用机制可能与上调肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白的表达有关。

[关键词] 通络刮痧; 桃红四物汤; 气滞血瘀; 肝组织; 核因子 E2 相关因子 2; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)05-0547-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.05.010

Comparison of the Effects of Tongluo Scraping and Traditional Chinese Medicine on Liver Nrf2 Expression of Female Rats with Qi-Stagnation and Blood-Stasis Syndrome

TANG Yexiao, WAN He Tianyi, LUO Xiaoguang
(Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** to investigate the effects of Tongluo scraping and Chinese herbs on the expression of liver nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) in female rats with qi stagnation and blood stasis syndrome. **Methods:** Forty female SD rats were randomly divided into blank group, model group, traditional Chinese medicine (TCM) group and scraping group. Rats in the model group, Chinese medicine group and scraping group were intraperitoneally injected with adrenaline hydrochloride (Adr) for 14 days and given 1~2 types of unforeseen physical stimulation to generate the animal model of qi stagnation and blood stasis syndrome. On the next day after successful modeling, TCM group was treated with Taohong Siwu Decoction once a day for 14 days, and the scraping group was given Tongluo scrap-

*[基金项目] 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2015)7437 号]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: lxg3336@163.com

网络出版时间: 2019-05-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190528.0228.010.html>

ing therapy once a week; the model group were given arrest once a day for 2 weeks. The blank group was given normal feeding. We examined blood viscosity (low cut, medium and high cut), plasma viscosity and hematocrit, four thrombin indicators including thrombin time (TT), partial activated thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and fibrinogen (FIB). Liver Nrf2 mRNA was assayed by qPCR and Nrf2 protein was detected by Western Blot. **Results:** Compared with the blank group, blood viscosity, hematocrit and the expression levels of liver Nrf2 mRNA and protein in the model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively), while TT and APTT were significantly shortened ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). Compared with the model group, blood viscosity and hematocrit in TCM group and the scraping group were significantly decreased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), while TT and APTT were prolonged. There was no significant differences in the indexes between scraping group and TCM group. **Conclusion:** Tongluo scraping and Taohong Siwu Decoction can improve the blood rheology and coagulation parameters of female rats with qi stagnation and blood stasis syndrome. The mechanism may be related to the up-regulation of liver Nrf2 mRNA and protein expression.

[**Key words**] Tongluo scraping; Taohong Siwu decoction; qi stagnation and blood stasis; liver tissue; nuclear factor 2 related factor 2; rats, Sprague-Dawley

气滞血瘀证是由于气机郁滞导致血行瘀阻所表现的证候^[1]。《医述》曰：“因忧思过度而致营血郁滞不行，或因怒伤血逆而留积于胸膈之间者，此皆瘀血之因也。”情志异常是气滞血瘀证发病的重要原因。有学者认为^[2]，气滞血瘀证的发病机理和氧化应激存在关联，氧化应激的主要攻击器官是肝脏^[3]，而肝脏等器官中有大量的 Nrf2 核转录因子表达^[4]。Nrf2 核转录因子是一种抗氧化正向调控因子，它不但能够延长细胞寿命，维持细胞氧化还原稳态^[5]，还能调节多基因表达并参与多种信号传导途径^[6]。因此本课题通过建立气滞血瘀证 SD 雌性大鼠模型，观察通络刮痧和桃红四物汤对模型大鼠肝组织核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) mRNA 及蛋白表达的影响，探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

实验动物:40 只 6~8 周龄、体质量为 250~270 g 的 SPF 级成年雌性 SD 大鼠，由长沙市天勤生物动物实验中心提供，合格证号为 SCXK(湘)2014-0010。主要实验药物及试剂:盐酸肾上腺素注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 20170907),水合氯醛(天津市致远化学试剂有限公司,批号 20180910),刮痧精油。主要仪器设备及工具: TG16G 台式高速离心机(湖南凯达科学仪器有限

公司),刮痧板等。

1.2 方法

1.2.1 分组 将 40 只大鼠随机分成空白组、模型组、中药组以及刮痧组,每组 10 只。

1.2.2 造模 动物适应性饲养 1 周后,根据文献[7-9]制备气滞血瘀证模型,除空白组外,其余 3 组大鼠左下腹注射盐酸肾上腺素注射液 0.09 mg/kg,1 次/d;给药 4 h 后随机接受以下一种物理刺激:冰水浴,将大鼠置于 0~4 °C 恒温水箱,4 min/次,2 次/d;烘箱热烘,将大鼠置于 50 °C 恒温箱,10 min/次,2 次/d;夹尾,将两只大鼠鼠尾用同一根皮筋捆绑,大鼠发怒嘶打时松开皮筋,20 min/次,2 次/d;束缚,将大鼠用皮筋捆绑束缚,限制其活动 1 h,2 次/d;倾斜,将鼠笼 45° 倾斜放置,持续 2 h,1 次/d。每日给予以上 1~2 种不同刺激,持续 14 d。空白组正常喂养,不做其他任何处理。

1.2.3 造模后处理 治疗造模成功后 24 h,除空白组外,其它 3 组大鼠均采取不同的干预措施,模型组抓捕,1 次/d;中药组按照 24 g/kg 桃红四物汤煎剂进行灌胃,1 次/d;刮痧组用剃毛器剔除大鼠腹背部毛发,取用少量刮痧精油,涂匀在大鼠的暴露皮肤处,参考《大鼠穴位图谱》^[10],用刮痧板刮拭大鼠膀胱经、督脉(颈部至尾骨)、任脉(颈部至耻骨),以出红色或紫红色痧粒为止,以不刮破皮肤为度,频率为 1 次/周,治疗时间为 2 周。空白组正常喂养,不做其他任何处理。

1.2.4 动物处死及标本采集 在末次治疗次日早

晨,予各组大鼠左下腹注射水合氯醛麻醉后,心脏采血后处死。5 mL 血样本采集入含肝素的采血管中,3 mL 血样本采集入枸橼酸钠采血管中,送至中心实验室检测全血黏度(低切、中切、高切)、血浆黏度及血细胞比容等血液流变学指标和部分活化凝血酶原时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)及纤维蛋白原(FIB)等凝血功能指标;剖腹后取出肝组织放于离心空管中,并置于-80℃密封保存,取出部分肝组织后,用玻璃匀浆器研磨均匀,采用 RT-PCR 法检测肝组织中 Nrf2 mRNA 的表达,Nrf2 引物,上游 5'-TCTGCTGCCATTAGTCAGTCGCTCTC-3',下游 5'-CCACCGTGCCTTCAGTGTGCTTC T-3'; β -actin 引物,上游 5'-GAAGATCAAGATCATTG CTCCT-3',下游 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'。采用 Western Blot 法检测肝组织中 Nrf2 蛋白的表达,严格按照说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间各指标比较采用单因素方差分析,总差异有统计学意义时进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 血液流变学

从表 1 中可以发现,与空白组相比,模型组大鼠血液黏度以及血细胞比容升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,中药组、刮痧组大鼠的血液黏度以及血细胞比容降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中药组和刮痧组大鼠比较,血液流变学指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血液流变学指标比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 The effect of scraping therapy and TCM on rat hemorheology

组别	空白组	模型组	刮痧组	中药组	F	P
全血黏度(低切, mPa/s)	12.24 ± 3.75	15.99 ± 1.28 ⁽¹⁾	14.37 ± 1.72	14.04 ± 1.49	2.72	0.07
全血黏度(中切, mPa/s)	6.59 ± 1.05	8.10 ± 0.60 ⁽²⁾	7.18 ± 0.78	7.13 ± 0.81	3.46	0.04
全血黏度(高切, mPa/s)	4.91 ± 1.02	6.30 ± 0.43 ⁽²⁾	5.48 ± 0.58	5.32 ± 0.96 ⁽⁴⁾	3.28	0.04
血浆黏度(mPa/s)	1.29 ± 0.06	1.48 ± 0.12 ⁽²⁾	1.34 ± 0.04 ⁽³⁾	1.35 ± 0.05 ⁽⁴⁾	6.51	0.00
血细胞比容(%)	42.00 ± 5.06	49.67 ± 1.37 ⁽²⁾	46.00 ± 3.41 ⁽⁴⁾	46.67 ± 2.07 ⁽⁴⁾	5.51	0.01

与空白组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比,⁽³⁾ $P < 0.01$,⁽⁴⁾ $P < 0.05$

2.2 APTT、TT、PT 和 FIB

从表 2 中可以发现,与空白组相比,模型组大鼠 APTT 和 TT 明显缩短,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,中药组、刮痧组大鼠 APTT

和 TT 明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),PT、FIB 差异无统计学意义($P > 0.05$),中药组和刮痧组大鼠 TT、APTT、PT 及 FIB 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠 PT、TT、APTT、FIB 的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 The effect of scraping therapy and TCM on rat PT, TT, APTT and FIB

组别	空白组	模型组	刮痧组	中药组	F	P
PT(s)	16.07 ± 0.89	16.30 ± 0.95	16.43 ± 0.69	15.93 ± 0.54	0.49	0.69
TT(s)	37.13 ± 3.13	26.38 ± 2.53 ⁽¹⁾	33.73 ± 7.23 ⁽²⁾	34.28 ± 4.07 ⁽³⁾	5.93	0.01
APTT(s)	24.10 ± 3.07	17.97 ± 1.56 ⁽¹⁾	22.05 ± 0.88 ⁽³⁾	21.97 ± 1.40 ⁽³⁾	9.01	0.00
FIB(g/L)	2.25 ± 0.27	2.29 ± 0.22	2.28 ± 0.25	2.24 ± 0.19	0.08	0.97

与空白组相比,⁽¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比,⁽²⁾ $P < 0.05$,⁽³⁾ $P < 0.01$

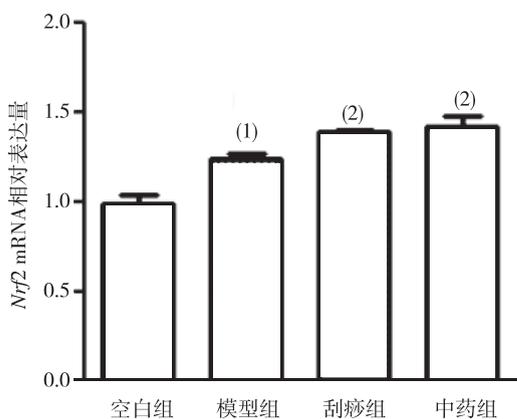
2.3 肝组织 Nrf2 mRNA 及 Nrf2 蛋白表达

RT-PCR 技术检测大鼠肝脏组织中 Nrf2 mRNA 的含量,Western Blot 法测定肝脏组织中 Nrf2 蛋白含量,如图 1 及图 2 显示,模型组大鼠肝组织中的 Nrf2 mRNA 及 Nrf2 蛋白高于空白组($P < 0.05$);与模型组相比,中药组、刮痧组大鼠经治疗后均可上调肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白表达($P <$

0.05 或 $P < 0.01$);而中药组和刮痧组大鼠比较,差异无统计学意义。

3 讨论

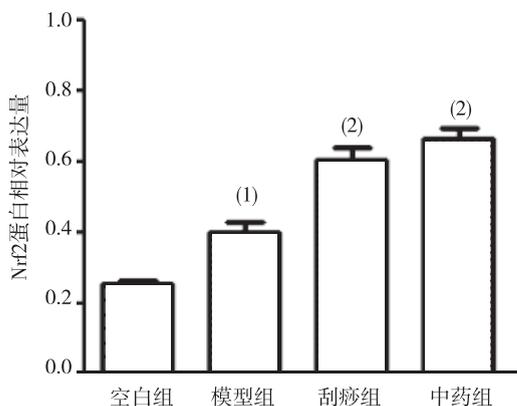
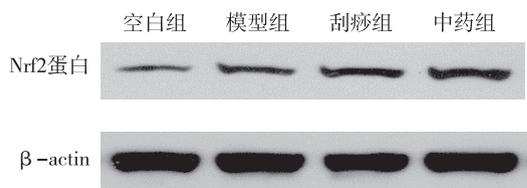
气滞血瘀证多由情志不舒、或外邪侵袭引起肝气久郁不解所致^[1]。本研究通过腹腔注射肾上腺



⁽¹⁾与空白组相比, $P < 0.05$; ⁽²⁾与模型组相比, $P < 0.05$

图 1 各组肝组织 Nrf2 mRNA 表达

Fig. 1 The effect of scraping and TCM on liver Nrf2 mRNA expression



⁽¹⁾与空白组相比, $P < 0.01$; ⁽²⁾与模型组相比, $P < 0.01$

图 2 各组肝组织 Nrf2 蛋白表达的比较

Fig. 2 The effect of scraping and TCM on liver Nrf2 protein expression

素模拟气滞,并施以不可预见性应激刺激来建立符合中医特点的气滞血瘀证大鼠模型。从以往研究者对气滞血瘀证雌性大鼠模型报道来看,血液流变学是气滞血瘀证的客观诊断标准,凝血功能与气滞血瘀证密切相关^[8,11-12]。因此本课题选用血液流变学和凝血指标,判断所建立的大鼠模型是否符合中医气滞血瘀证特点。本次实验研究结果表明,

与空白组相比,模型组的血液黏度、血细胞比容都升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),TT、APTT 时间明显缩短($P < 0.01$),符合中医气滞血瘀证诊断标准。

氧化应激(oxidative stress)是由于机体活性氧类产生,超过机体内源性抗氧化防御水平而造成的一种氧化和抗氧化失衡状态^[13]。气滞血瘀证会引起氧化应激^[2],氧化应激会损伤女性的生殖能力并诱发一系列妇科疾病,如痛经、闭经、卵巢早衰、心血管疾病、肥胖病、更年期综合征女性诸多疾病^[14]。“女子以肝为先天”,肝气郁滞是气滞血瘀证女性疾病的主要病因病机,这与古人认为的“女性情绪的多变性易引起肝气不疏,导致肝气郁结”观点不谋而合,因此选择肝组织作为本次实验的研究对象。在氧化应激反应中,Nrf2 转录因子起着重要氧化-抗氧化的调控作用,并且在肝脏的表面有 Nrf2 转录因子的大量表达^[4]。本研究选择大鼠肝组织 Nrf2 转录因子,究其原因是该因子不但能够延长细胞寿命、维持细胞氧化还原稳态^[5],还可以在氧化应激状态下保护肝脏^[15]。在正常生理状态下,细胞浆内 Nrf2 与 Keap1 结合,当机体 ROS 水平升高处于氧化应激状态时,Nrf2 与 Keap1 解离,经磷酸化的 Nrf2 转移至细胞核,与细胞核内的小 Maf 蛋白结合形成二聚体,与 ARE 启动 NQO1、HO-1、SOD 等 II 相解毒酶的转录,翻译后细胞内 II 相解毒酶增加,可加速 ROS 的清除和代谢,增强组织细胞的抗氧化能力,消除或减轻氧化应激损伤^[16-19]。因此肝组织 Nrf2 表达是否上调可提示能否提高肝组织的抗氧化能力,从而抑制氧化应激。本次实验的数据显示,经治疗干预后的大鼠模型 Nrf2 mRNA 及蛋白的表达均上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),促使肝组织的抗氧化能力提高,抵抗氧化应激。

桃红四物汤源于清朝年间知名医家吴谦所著《医宗金鉴》,它不但能够改善机体的凝血功能,降低血液黏度,抑制 PLT 的粘附和聚集;还能够有效上调组织 Nrf2 的表达^[20-21]。本课题实验结果也支持以上观点,与模型组对比,中药组的血液黏度、血细胞比容均降低($P < 0.05$),TT、APTT 时间均延长($P < 0.05$),肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白表达上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。该药方不仅具有活血化瘀的作用,而且能够提高肝组织抗氧化作用,同时还是妇科血瘀证治疗常用的代表方,因此本实验以桃红四物汤灌胃治疗作为治疗对照组。

络络刮痧是基于脏腑-经络-穴位中医皮部

理论,用刮痧板等工具在相应经络和穴位进行刮拭,起到刺激作用。通络刮痧除了具有调气行血、活血化瘀、舒筋通络等功效,广泛应用于各种病症的治疗和保健领域,还能够提高肝组织抗氧化能力^[22]。由本课题实验结果可见,模型组对比,刮痧组血液黏度降低($P < 0.01$)、血细胞比容降低($P < 0.05$)、TT 延长($P < 0.05$)、APTT 延长($P < 0.01$),肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),刮痧组和中药组各指标之间差异无统计学意义,提示通络刮痧和中药治疗的作用类似,均能上调肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白质的表达,从而达到提高肝的抗氧化能力,抑制氧化应激的目的。

总之,通络刮痧和桃红四物汤均能降低气滞血瘀证模型雌性大鼠的血液黏度、改善凝血功能、上调肝组织 Nrf2 mRNA 及蛋白的表达,两者的作用效果类似,无论从蛋白层面还是基因层面均提示两种治疗方法的作用机制均可能与提高肝组织抗氧化能力,改善氧化应激状态有关。由此有理由认为,肝组织 Nrf2 相关的具体信号通路及机制可能成为治疗和预防女性疾病的潜在抗氧化靶点,值得深入研究。

4 参考文献

[1] 王天芳. 中医诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:109.

[2] 刘丹, 池玉梅, 邓海山, 等. 少腹逐瘀汤对寒凝血瘀模型大鼠氧化应激因子、炎性介质及血管舒缩因子的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(3):249-253.

[3] 王兴华, 张照祥, 丁书姝, 等. PBDE-209 致小鼠肝脏病理学改变及其氧化应激机制研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(3):187-190.

[4] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1):146-152.

[5] 董渠龙, 王华, 侯海燕, 等. Nrf2-ARE 信号通路功能的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2015(4):425-428.

[6] 李慧, 杨林. Nrf2 抗氧化的分子调控机制[J]. 生物信息学, 2018, 16(1):1-6.

[7] 王婷婷, 贾乘, 宁天一, 等. 两种气滞血瘀证造模方法的比较[J]. 中华中医药学刊, 2013, 32(1):157-158.

[8] 李炜, 段金殿, 刘培, 等. 采用雌性 SD 大鼠探索建立

适宜于气滞血瘀证妇科疾病特点的模型评价体系[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8):1007-1010.

[9] 刘楠, 姜云耀, 李莹, 等. 气滞血瘀证动物模型研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018(1):23-27.

[10] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, 2(1):1-5.

[11] 师建平, 白亚峰, 徐宗佩. 蒙药阿敏-额尔敦对气滞血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 3(6):1944-1947.

[12] 邓天琦, 童昭璇, 胡喜娇, 等. 气滞血瘀型输卵管炎大鼠模型的建立[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(10):60-63.

[13] 陈光海, 刘晓平. Keap1-Nrf2 信号通路及细胞氧化应激反应相关性研究进展[J]. 医学理论与实践, 2016, 29(15):2012-2015.

[14] 刘忠慧, 郝翠芳. 氧化应激标记物及其在女性生殖中的应用[J]. 国际妇产科学杂志, 2015, 43(3):311-314.

[15] 李慧, 杨林. Nrf2 抗氧化的分子调控机制[J]. 生物信息学, 2018, 16(1):1-6.

[16] LOBODAA, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 2016, (73):3221-3247.

[17] 崔侯, 马海英, 孔力. Nrf2/ARE 通路及机体抗氧化机制的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011, 37(1):187-190.

[18] 赵舒武, 蔡青, 王晓玲, 等. 补阳还五汤载药血清对缺氧复氧神经干细胞 SOD1 蛋白和 Nrf2 mRNA 的影响及机制研究[J]. 四川中医, 2013, 32(1):48-51.

[19] 孙玉芝, 雒晓东, 赵贝贝. 探究 Nrf2/ARE 通路及机体抗氧化机制的内在机理[J]. 广西医科大学学报, 2015, 35(1):184-188.

[20] LI W M, LIU H T, LI X Y, et al. The effect of tetramethylpyrazine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human umbilical vein endothelial cells[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2010, 106(1):1-10.

[21] 李双双, 郭春燕. 桃红四物汤化学成分及药理作用研究进展[J]. 神经药理学报, 2016, 33(4):44-51.

[22] 刘荣花, 马亚妮, 熊正英. 经络刮痧对耐力训练大鼠肝组织抗氧化能力及运动能力的影响[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2010, 39(5):105-108.

(2019-02-25 收稿, 2019-04-15 修回)

中文编辑: 潘 娅, 严 征; 英文编辑: 张启芳