

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20250303003

基于 Nrf2/HO-1 信号通路探究纤维蛋白原过表达对冠心病血瘀证大鼠的影响及机制

张宜帆¹, 周霞辉², 罗晓欣¹, 周曼丽¹, 赵彦禛¹, 简维雄^{1,3}

1. 湖南中医药大学(湖南 长沙 410208); 2. 贵州中医药大学第一附属医院(贵州 贵阳 550025); 3. 国家重点学科中医诊断学湖南省重点实验室(湖南 长沙 410208)

【摘要】 目的 探讨纤维蛋白原(Fib)过表达对冠心病(CHD)血瘀证大鼠的影响及其通过核红细胞 2 相关因子 2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路介导血管内皮损伤的机制。**方法** ①将 36 只大鼠随机分为空白(N)组(6.0 mg/kg 0.9 %氯化钠溶液)、高脂(HFD)组(6.0 mg/kg 0.9 %氯化钠溶液)、高脂+空载体低剂量[HFD+腺病毒相关病毒(AAV)Low]组(8.50×10^{11} vg/kg AAV)、高脂+空载体高剂量(HFD+AAV High)组(1.13×10^{12} vg/kg AAV)、高脂+Fib 低剂量(HFD+FIB Low)组[8.50×10^{11} vg/kg 纤维蛋白原腺相关病毒载体(AAV-FIB)]、高脂+Fib 高剂量(HFD+FIB High)组(1.13×10^{12} vg/kg AAV-FIB)。在高脂喂养的第 0 天及第 3 天尾静脉注射给予相应干预,3 周后取材。酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测 Fib 表达。②将 30 只大鼠随机分为空白(N)组(6.0 mg/kg 0.9 %氯化钠溶液)、CHD 血瘀证(CHDX)组(6.0 mg/kg 0.9 %氯化钠溶液)、CHD+Fib(CHDX+FIB)组(1.13×10^{12} vg/kg AAV-FIB)。采用高脂饮食联合维生素 D₃及异丙肾上腺素构建 CHD 血瘀证大鼠模型,并在高脂喂养的第 0 天及第 3 天尾静脉注射给予相应干预。苏木精-伊红(HE)染色评估主动脉的病理形态,并检测血脂、血液流变学指标,ELISA 法检测 Fib、内皮素-1(ET-1)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平,Western blot 法检测 Nrf2、HO-1 蛋白表达,免疫荧光染色法观察蛋白定位。**结果** ①与 N 组、HFD 组比较,HFD+FIB High 组 Fib 表达水平升高($P < 0.05$)。②与 N 组比较,CHDX 组 Fib 表达水平升高($P < 0.01$),总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平和血浆低切黏度升高($P < 0.05$),主动脉可见明显病变,心电图 ST 段抬高,MDA、ET-1 水平升高($P < 0.01$),SOD 水平下降($P < 0.01$),主动脉 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平升高($P < 0.01$);与 CHDX 组比较,CHDX+FIB 组 Fib 表达水平进一步升高($P < 0.05$),TC、三酰甘油(TG)和 LDL-C 水平升高($P < 0.05$),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平降低($P < 0.01$),血浆黏度升高($P < 0.05$),主动脉形成粥样硬化斑块,心电图 ST 段抬高 > 0.1 mV,MDA、ET-1 水平下降($P < 0.01$),SOD、Nrf2、HO-1 水平升高($P < 0.01$)。**结论** 高脂喂养可成功构建 Fib 过表达大鼠模型,Fib 过表达提高了大鼠血脂水平和血浆黏度,从而增加了 CHD 血瘀证的致病性;同时其通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路启动代偿机制,调节氧化应激引起的血管过度损伤。

【关键词】 冠心病;血瘀证;纤维蛋白原;动脉粥样硬化;血管内皮损伤;中医证候;大鼠模型

Exploration on effect and mechanism of fibrinogen overexpression on coronary heart disease with blood stasis syndrome rats based on Nrf2/HO-1 signaling pathway

ZHANG Yifan¹, ZHOU Xiahui², LUO Xiaoxin¹, ZHOU Manli¹, ZHAO Yanzhen¹, JIAN Weixiong^{1,3}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of National Key Discipline of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Changsha, Hunan 410208, China.

Abstract: Objective To investigate the effects of fibrinogen (Fib) overexpression on rats with coronary heart disease (CHD) with blood stasis syndrome, and the its mechanism in mediating vascular endothelial injury through the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme

oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods** ① Thirty-six rats were randomly divided into the control (N) group (6.0 mg/kg 0.9% sodium chloride solution), high-fat diet (HFD) group (6.0 mg/kg 0.9% sodium chloride solution), high-fat+empty vector low-dose [HFD+adeno-associated virus (AAV) Low] group (8.50×10^{11} vg/kg AAV), high-fat+empty vector high-dose (HFD+AAV High) group (1.13×10^{12} vg/kg AAV), high-fat+Fib low-dose (HFD+FIB Low) group [8.50×10^{11} vg/kg Fib-associated viral vector (AAV-FIB)], and

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374334);湖南中医药大学研究生创新课题(2024CX038)

[作者简介] 张宜帆,女,博士研究生,主要从事中医心病证治机理研究

[通信作者] 简维雄,教授,博士研究生导师;

E-mail: daxiong20001977@163.com

high-fat+Fib high-dose (HFD+FIB High) group (1.13×10^{12} vg/kg AAV-FIB). On day 0 and 3 of high-fat feeding, the rats received the corresponding intervention via tail vein injection, and tissue samples were collected after 3 weeks. Fib expression was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ② Thirty rats were randomly divided into the blank (N) group (6.0 mg/kg 0.9% sodium chloride solution), CHD blood stasis syndrome (CHDX) group (6.0 mg/kg 0.9% sodium chloride solution), CHD+Fib (CHDX+FIB) group (1.13×10^{12} vg/kg AAV-FIB). A CHD blood stasis rat model was established using a high-fat diet combined with vitamin D₃ and isoproterenol, and the corresponding interventions were administered via tail vein injection on day 0 and 3 of high-fat feeding. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to assess the pathological morphology of the aorta, and lipid levels, blood rheology, and levels of Fib, endothelin-1 (ET-1), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) were measured using ELISA. Western blot analysis was used to detect the expression of Nrf2 and HO-1 proteins, and immunofluorescence staining was used to observe protein localization. **Results** ① Compared with the N and HFD groups, the Fib expression level increased in the HFD+FIB High group ($P < 0.05$). ② Compared with the N group, the Fib expression level increased in the CHDX group ($P < 0.01$), total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels, and plasma low-viscosity increased ($P < 0.05$), obvious lesions were observed in the aorta. ST segment elevation was seen on the electrocardiogram. The MDA and ET-1 levels increased ($P < 0.01$), SOD level decreased ($P < 0.01$), and the protein expression levels of Nrf2 and HO-1 in the aorta increased ($P < 0.01$). Compared with the CHDX group, the CHDX+FIB group showed further increased Fib expression ($P < 0.05$), and the TC, triglycerides (TG), and LDL-C levels were significantly increased ($P < 0.05$), the high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level was decreased ($P < 0.01$), plasma viscosity was increased ($P < 0.05$), atherosclerotic plaques formed in the aorta, ECG ST-segment elevation was > 0.1 mV, MDA and ET-1 levels decreased ($P < 0.01$), while SOD, Nrf2, and HO-1 levels increased ($P < 0.01$). **Conclusions** A rat model of Fib overexpression can be successfully established via a high-fat diet. Fib overexpression increases the blood lipid level and plasma viscosity in rats, thereby enhancing the pathogenicity of CHD with blood stasis syndrome. Concurrently, it activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway to initiate compensatory mechanism, regulating excessive vascular damage caused by oxidative stress.

Keywords: coronary heart disease; blood stasis syndrome; fibrinogen; atherosclerosis; vascular endothelial injury; traditional Chinese medicine syndrome; rat model

冠心病(coronary heart disease, CHD)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)所致的心血管疾病,发病率居高不下且呈明显的年轻化趋势,已成为全球公共健康领域面临的重大挑战之一^[1]。中医认为,血瘀为CHD的主要致病因素,贯穿其发生发展全过程^[2],而CHD血瘀证的严重程度与生存质量及病死率密切相关^[3-4]。临床研究^[5]也表明,血瘀证是CHD最常见的证型,其病理实质与微循环障碍、血管内皮损伤及氧化应激密切相关,且与冠状动脉病变严重程度呈正相关。AS斑块的形成与中医“痰瘀互结”理论高度契合^[6],提示调控血瘀状态可能是干预CHD的重要靶点。

纤维蛋白原(Fib)是由肝细胞合成并分泌到血浆中的凝血因子。在AS患者的血浆^[7]、斑块^[8-9]中,Fib水平显著升高。Fib可通过调控内皮细胞通透性^[10]及巨噬细胞聚集,促进炎症因子的高表达^[11-12],参与并推动CHD的病理进程。同时,Fib也可通过调节血小板的聚集^[13]及血液黏稠度,促进血管收缩,加速血栓形成,造成局部血行滞涩,日久成瘀。研究^[14]发现,Fib与冠状动脉病变的严重程度和血瘀证的轻重程度呈正相关。高Fib水平会导致血液黏稠度升高,红细胞聚集,进而加剧血管堵塞、缺氧和血栓形成,促进血管内皮损伤^[15]。

现代医学认为血管内皮损伤是AS的始动环节^[16]。当血管内皮功能障碍时,血管壁的完整性和屏障功能受损,通透性增加,使血管内皮细胞(VECs)迁移至血管

内皮间隙,进一步导致氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)的沉积。Ox-LDL的积累触发炎症反应,促使单核细胞向受损区域迁移并分化为巨噬细胞。巨噬细胞吞噬Ox-LDL,形成泡沫细胞,促进斑块形成并加剧血管壁炎症^[17-18]。此外,VECs表面活性氧(ROS)的积聚也会引发氧化应激,损伤血管内皮并释放炎症介质,推动AS发展^[19]。

本研究基于基因转导技术,以腺病毒相关病毒(AAV)为载体,构建Fib过表达的CHD血瘀证动物模型,深入研究Fib对CHD血瘀证的影响及对血管内皮损伤的作用机制,以期CHD的证候研究与治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 66只SPF级雄性SD大鼠,体质量230~270 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004;动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009。大鼠饲养于湖南中医药大学动物实验中心,饲养条件为温度22~26℃,湿度50%~70%,自由饮水摄食,实验前适应性喂养1周。动物实验方案符合湖南中医药大学动物伦理委员会的相关伦理要求(伦理审批号:LL2020071702)。

1.1.2 药物与试剂 纤维蛋白原腺相关病毒载体(AAV-FIB)由上海汉恒生物科技有限公司构建;高脂饲料(批号:20220200001288)配方为:3%胆固醇、0.5%

胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油、81.3% 基础饲料,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司生产;维生素 D₃(VitD₃)(批号:2019070401),湖北楚米生物科技有限公司;异丙肾上腺素(批号:BSF190725),合肥巴斯夫生物科技有限公司。

Fib、内皮素-1(ET-1)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(批号分别为 RX302244R、RXJ302458R、RX302820R、RXJ302836R),泉州市睿信生物科技有限公司;核红细胞 2 相关因子 2(Nrf2)抗体(批号:A21176),武汉爱博泰克生物科技有限公司;血红素氧合酶-1(HO-1)抗体(批号:66743-1-IG),武汉三鹰生物技术有限公司;肌动蛋白(Actin)抗体、Nrf2 抗体、ET-1 抗体(批号分别为 GB12001、GB113808、GB11557),武汉赛维尔生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 高速冷冻离心机、轮转式切片机(型号分别为 Sorvall Legend XTR、HM355S),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;显微镜(型号:STELLARIS STED),德国 Leica 公司;核酸电泳仪、水平电泳槽(型号分别为 EPS-300、HE 120),上海天能科技有限公司;生物组织包埋机(型号:KD-BMⅢ),浙江金华科迪仪器设备有限公司;16 导联生理记录仪(型号:MP160),美国 BIOPAC 公司;恒温培养振荡器(型号:HNY-200B),天津欧诺仪器股份有限公司。

1.2 分组与造模

1.2.1 高脂喂养条件下 Fib 最佳转导剂量探索 36 只大鼠随机分为 6 组,分别为空白(N)组、高脂(HFD)组、高脂+空载体低剂量(HFD+AAV Low)组、高脂+空载体高剂量(HFD+AAV High)组、高脂+Fib 低剂量(HFD+FIB Low)组、高脂+Fib 高剂量(HFD+FIB High)组,每组 6 只。N 组大鼠喂养普通饲料,其余各组喂养高脂饲料并分别尾静脉注射给予相应干预:N 组、HFD 组给予 6.0 mg/kg 0.9 % 氯化钠溶液, HFD+AAV Low 组给予 8.50×10^{11} vg/kg AAV, HFD+AAV High 组给予 1.13×10^{12} vg/kg AAV, HFD+FIB Low 组给予 8.50×10^{11} vg/kg AAV-FIB, HFD+FIB High 组给予 1.13×10^{12} vg/kg AAV-FIB;于高脂喂养第 0 天及第 3 天各注射 1 次,干预 3 周后取材。

1.2.2 Fib 过表达的 CHD 血瘀证大鼠模型相关机制研究 30 只大鼠随机分为空白(N)组、CHD 血瘀证(CHDX)组、CHD+纤维蛋白原(CHDX+FIB)组,每组 10 只。N 组大鼠普通饲料喂养,其余组以高脂饲料喂养构建 CHD 血瘀证模型。高脂饲料配方和模型构建方法参照本课题组前期研究^[20]:高脂喂养 1 周后,在 10 d 内分 3 次给予 VitD₃ 灌胃(剂量分别为 3×10^5 IU/kg、 3×10^5 IU/kg、 2×10^5 IU/kg),诱导血管钙化及内皮损伤。接着继续高脂喂养 7 周,并在 1 周内分 3 次皮下注射给予异

丙肾上腺素(5 mg/kg),诱导大鼠急性心肌缺血。N 组与 CHDX 组尾静脉注射给予 0.9 % 氯化钠溶液 6.0 mg/kg, CHDX+FIB 组尾静脉注射给予 1.13×10^{12} vg/kg AAV-FIB,于高脂喂养第 0 天及第 3 天各注射 1 次。

考虑到 AAV 转导的 Fib 表达会随时间下降,选取造模过程中间时间点(即第 30 天及第 33 天)补充注射, AAV-FIB 注射剂量为 5.67×10^{11} vg/kg。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 血脂、血液流变学检测 各组大鼠在采用戊巴比妥钠(50 mg/kg)深度麻醉后进行腹主动脉采血,血脂相关指标总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)在湖南中医药大学第一附属医院检验科采用全自动生化分析仪进行检测;血液流变学相关指标(全血低、中、高切黏度)在湖南中医药大学科技创新中心采用全自动血流变仪进行检测。

1.3.2 组织病理学评估 将大鼠主动脉固定于多聚甲醛固定液中,而后经乙醇脱水、石蜡包埋固定后切片,并使用苏木精、伊红染色液对细胞核、胞质进行染色;用显微镜观察实验结果,并采集图像用于后续分析。

1.3.3 ELISA 法检测相关蛋白表达 将大鼠血液样本离心分离出血清、血浆,取上清检测。按照试剂盒说明书准备不同的工作液,并严格按照说明书步骤操作,对大鼠 Fib、ET-1、MDA、SOD 的含量进行检测。

1.3.4 Western blot 法检测相关蛋白表达 使用裂解液(裂解液:蛋白酶抑制剂:磷酸酶抑制剂=98:1:1)冰上裂解大鼠主动脉组织,用二辛可酸(BCA)法检测蛋白浓度。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质后电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。用无蛋白快速封闭液封闭后,分别加入一抗 Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:1 000)、Actin(1:2 000)并孵育 2 h。分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗,孵育 30 min,加入显色剂后使用凝胶成像仪拍照和定量分析。

1.3.5 免疫荧光染色法检测 Nrf2、ET-1 共定位 将大鼠主动脉组织固定于多聚甲醛固定液中并制成石蜡切片。首先用一抗 Nrf2(1:5 000)于 4 °C 孵育过夜,随后加入荧光标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:200),室温避光孵育 50 min,多功能荧光染料染色后避光孵育。然后进行加热处理,孵育一抗 ET-1(1:300),于 4 °C 孵育过夜,再与荧光标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:200)室温避光孵育 50 min。最后,染色后加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染液,避光室温孵育 10 min,加抗荧光淬灭封片剂封片,使用激光共聚焦显微镜采集图像进行分析。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。若同时满足正态性和方差齐性用单因素方差分析,然后进行LSD检验;若满足正态性不满足方差齐性用Dunnett's T3检验;若不满足正态性用非参数Kruskal-Wallis H检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

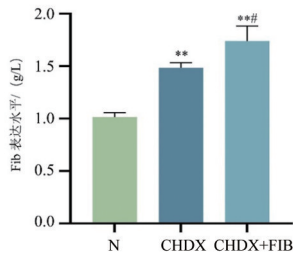
2.1 高脂喂养下Fib转导的最佳转导剂量 研究^[21]表明,高脂喂养可显著提高Fib水平。本研究首先探讨了高脂喂养下Fib能否过表达及其最佳转导剂量。结果显示,转导Fib后的HFD+AAV Low组、HFD+AAV High组大鼠血浆Fib水平显著高于HFD组($P<0.05$),且HFD+FIB High组大鼠血浆Fib水平明显高于HFD+FIB Low组($P<0.05$)。见表1。故本研究选择高剂量(即 1.13×10^{12} vg/kg)作为后续实验中Fib转导剂量。

表1 高脂喂养对大鼠血浆Fib水平的影响($n=6, \bar{x}\pm s, g/L$)

组别	Fib水平
N	0.61 ± 0.06
HFD	0.69 ± 0.12
HFD+AAV Low	$1.12\pm 0.16^{*#}$
HFD+AAV High	$1.12\pm 0.08^{*#}$
HFD+FIB Low	$1.07\pm 0.19^{*#}$
HFD+FIB High	$1.33\pm 0.21^{*#\Delta\nabla\blacktriangle}$

注:Fib为纤维蛋白原。N为空白组,HFD为高脂组,HFD+AAV Low为高脂+空载体低剂量组,HFD+AAV High为高脂+空载体高剂量组,HFD+FIB Low为高脂+Fib低剂量组,HFD+FIB High为高脂+Fib高剂量组。与N比较, $*P<0.05$;与HFD比较, $#P<0.05$;与HFD+AAV Low比较, $\Delta P<0.05$;与HFD+AAV High比较, $\nabla P<0.05$;与HFD+FIB Low比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

2.2 CHD血瘀证大鼠模型Fib过表达水平 ELISA检测结果显示,与N组相比,CHDX组Fib表达水平升高($P<0.01$),CHDX+FIB组Fib表达水平较CHDX组进一步升高($P<0.05$)。见图1。

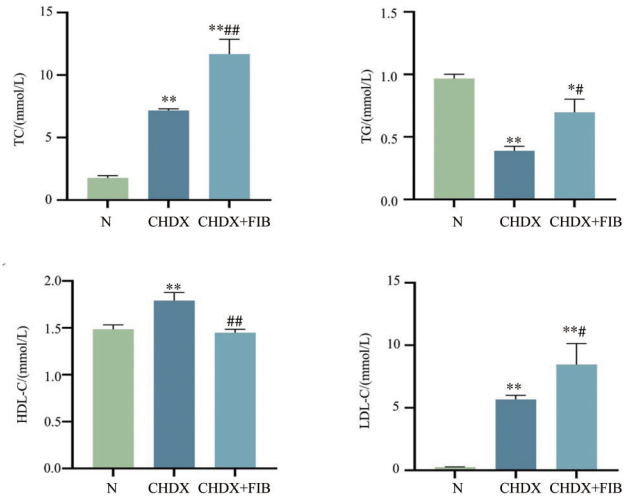


注:Fib为纤维蛋白原。N为空白组,CHDX为冠心病血瘀证组,CHDX+FIB为冠心病+Fib组。与N组比较, $**P<0.01$;与CHDX组比较, $#P<0.05$; $n=3, \bar{x}\pm s$ 。

图1 各组大鼠Fib表达水平比较

2.3 Fib过表达对CHD血瘀证大鼠血脂、血液流变学水平的影响 血脂检测结果显示,长期高脂饮食后,与N组大鼠相比,CHDX组大鼠的TC、HDL-C及LDL-C水

平显著升高($P<0.01$),TG水平显著下降($P<0.01$)。与CHDX组大鼠相比,Fib转导后可观察到TC、TG和LDL-C水平显著升高($P<0.05$),HDL-C水平显著降低($P<0.01$)。见图2。



注:TC为血清总胆固醇,TG为血清三酰甘油,HDL-C为血清高密度脂蛋白胆固醇,LDL-C为血清低密度脂蛋白胆固醇。N为空白组,CHDX为冠心病血瘀证组,CHDX+FIB为冠心病+纤维蛋白原组。与N组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与CHDX组比较, $#P<0.05$, $##P<0.01$; $n=3, \bar{x}\pm s$ 。

图2 各组大鼠血脂水平比较

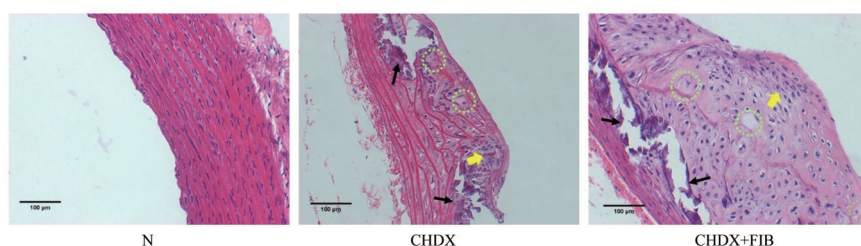
血液流变学检测结果显示,造模后各组血浆黏度呈现出不同程度的上升。与CHDX组相比较,CHDX+FIB组低切、中切、高切黏度均升高($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠血液流变学变化比较($n=3, \bar{x}\pm s, mPa\cdot s$)

组别	全血黏度		
	低切	中切	高切
N	1.46 ± 0.00	4.74 ± 0.26	4.06 ± 0.22
CHDX	$1.49\pm 0.01^{*}$	6.06 ± 0.21	4.69 ± 0.09
CHDX+FIB	$1.52\pm 0.01^{*##}$	$7.81\pm 1.42^{*##}$	$6.39\pm 1.07^{*##}$

注:N为空白组,CHDX为冠心病血瘀证组,CHDX+FIB为冠心病+纤维蛋白原组。与N组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与CHDX组比较, $#P<0.05$, $##P<0.01$ 。

2.4 Fib过表达对CHD血瘀证大鼠主动脉形态结构的影响 如图3所示,N组大鼠主动脉结构完整,内膜、中膜和外膜层次清晰,弹性纤维排列有序。造模后,CHDX组大鼠主动脉形成AS斑块,斑块部位细胞密集,提示炎症细胞浸润,且斑块处可见部分细胞的胞质染色较浅,提示存在轻度脂质沉积。血管结构明显破坏,3层结构模糊,内中膜平滑肌钙化形成坏死空腔,中膜几乎消失,外膜破坏,管壁塌陷、变窄、变薄。与CHDX组相比,CHDX+FIB组主动脉也表现出明显的斑块形成、脂质沉积和中膜破坏,坏死空腔亦较常见,提示Fib干预可能加重局部炎症与病变进程。



注: N 为空白组、CHDX 为冠心病血瘀证组、CHDX+FIB 为冠心病+纤维蛋白原组。黄色箭头为动脉粥样硬化斑块, 绿色虚线圈为脂质沉积, 黑色箭头为钙盐沉积形成的坏死空腔。标尺: 100 μm 。

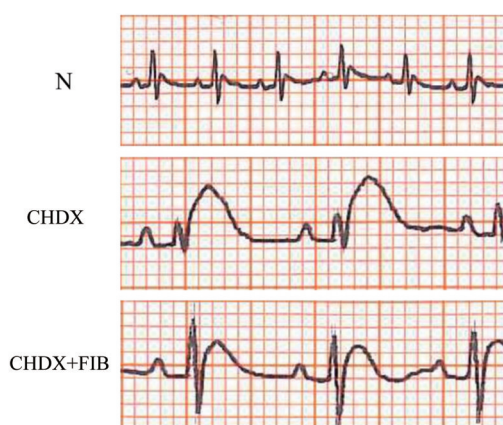
图3 各组大鼠主动脉病理形态(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

2.5 Fib 过表达对 CHD 血瘀证大鼠心电图的影响 心电图结果显示, CHDX 组及 CHDX+FIB 组大鼠心电图均出现 ST 段弓背向上型抬高, 抬高程度 $> 0.1 \text{ mV}$ 。见图 4。

2.6 Fib 过表达对大鼠血管内皮损伤标志物的影响 ELISA 检测结果显示, CHD 血瘀证模型大鼠 MDA、ET-1 水平明显升高 ($P < 0.01$), SOD 水平降低 ($P < 0.01$), 而 CHDX+FIB 组 MDA、ET-1 水平较 CHDX 组有所下降 ($P < 0.01$), SOD 水平有所升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.7 Fib 过表达对 CHD 血瘀证大鼠 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 结果显示, CHD 血瘀证模型大鼠主动脉中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); CHDX+FIB 组较 CHDX 组 Nrf2、HO-1 表达水平进一步升高 ($P < 0.01$)。见图 6。

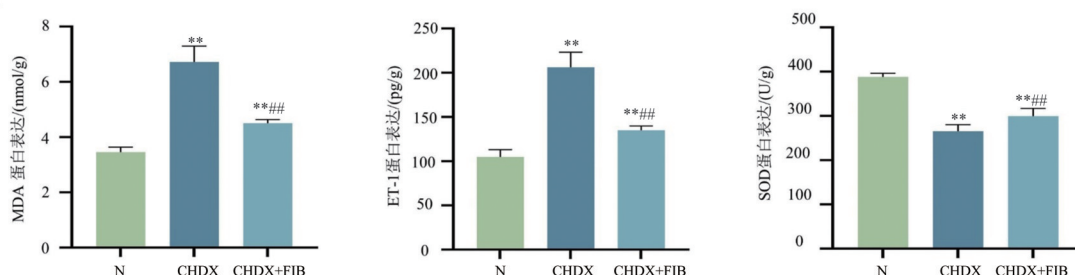
2.8 Fib 过表达对 CHD 血瘀证大鼠 Nrf2 与 ET-1 荧光共定位表达的影响 结果显示, CHDX 组大鼠主动脉组织



注: N 为空白组, CHDX 为冠心病血瘀证组, CHDX+FIB 为冠心病+纤维蛋白原组。

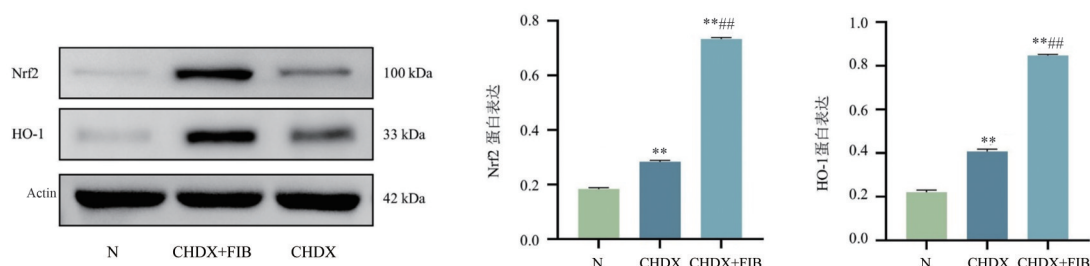
图4 各组大鼠心电图

Nrf2、ET-1 表达水平较 N 组升高 ($P < 0.05$)。与 CHDX 组相比, CHDX+FIB 组 Nrf2 表达进一步升高 ($P < 0.01$), 而



注: MDA 为血清丙二醛, ET-1 为血清内皮素-1, SOD 为血清超氧化物歧化酶。N 为空白组、CHDX 为冠心病血瘀证组、CHDX+FIB 为冠心病+纤维蛋白原组。与 N 组比较, ** $P < 0.01$; 与 CHDX 组比较, ## $P < 0.01$; MDA、ET-1, $n = 6$; SOD, $n = 5$; $\bar{x} \pm s$ 。

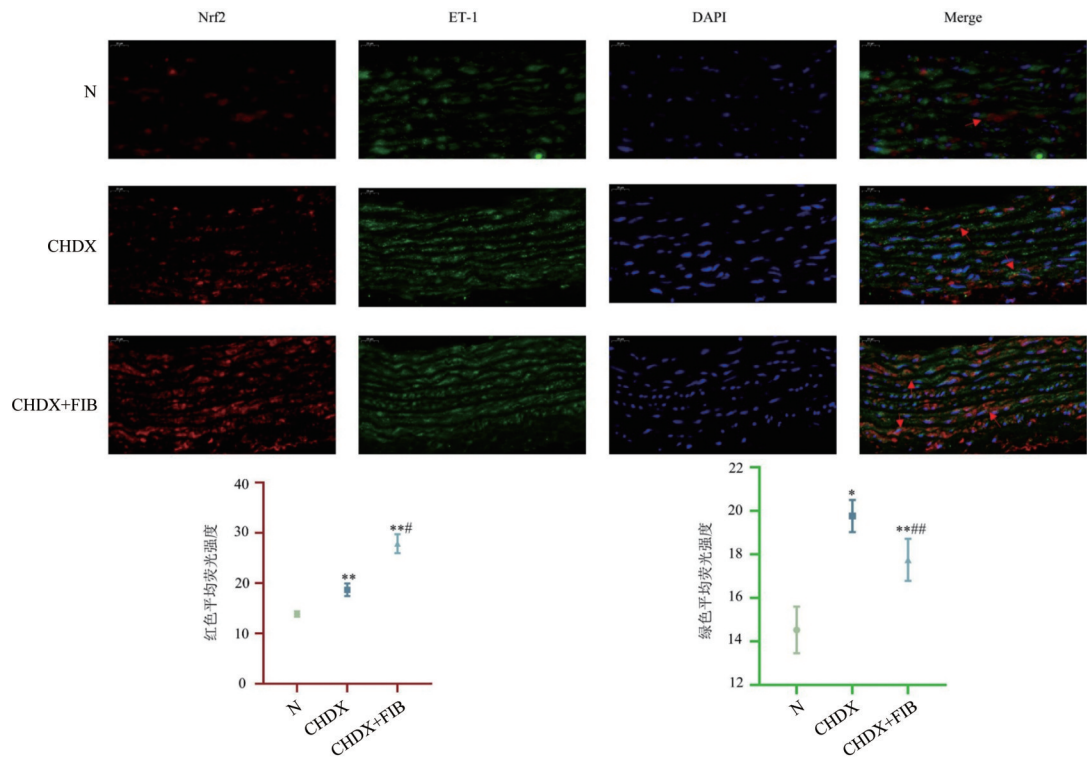
图5 各组大鼠主动脉血管损伤标志物 MDA、ET-1、SOD 含量比较(酶联免疫吸附分析法)



注: Nrf2 为核红细胞 2 相关因子 2, HO-1 为血红素氧合酶-1, Actin 为肌动蛋白。N 为空白组、CHDX 为冠心病血瘀证组、CHDX+FIB 为冠心病+纤维蛋白原组。与 N 组比较, ** $P < 0.01$; 与 CHDX 组比较, ## $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图6 各组大鼠主动脉 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达比较(Western blot 法)

ET-1 表达水平下降($P<0.05$)。见图 7。



注: Nrf2 为核红细胞 2 相关因子 2, ET-1 为内皮素-1, DAPI 为 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 为合并。N 为空白组, CHDX 为冠心病血瘀证组, CHDX+FIB 为冠心病+纤维蛋白原组; 红色箭头指向 Nrf2 与 ET-1 共定位部位。与 N 组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与 CHDX 组比较, $#P<0.05$, $##P<0.01$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图 7 各组大鼠主动脉组织 Nrf2 与 ET-1 荧光共定位比较(免疫荧光染色法, $\times 500$)

3 讨论

Fib 是血浆蛋白凝血因子, 能够通过加速血小板聚集、增强细胞间黏附与增殖以及调节内皮损伤部位的血管收缩, 促进动脉壁内血栓形成^[22-23], 直接或间接诱导 AS 及相关病变, 导致心肌缺血、缺氧, 是 CHD 和急性心肌梗死等心血管疾病的常见原因^[24-26]。中医学认为, 血瘀证的核心病机为“血行滞涩, 脉道不通”, 而 Fib 的异常升高通过加剧血液高凝状态、促进血栓形成及血管内皮损伤, 与血瘀证的病理进程高度关联。因此, 本研究围绕 CHD 血瘀证的核心病理机制展开, 重点探讨了 Fib 过表达对血瘀状态的影响及其可能的分子机制, 对于 CHD 的诊断与治疗具有重要意义。前期研究^[21]表明, 高脂喂养可导致痰湿内生、痰浊阻脉、血行滞涩, 显著升高血浆 Fib 水平。本研究发现, 高脂饮食干预 3 周后, 大鼠血浆 Fib 水平呈现升高趋势, 但差异无统计学意义。这一结果与文献^[27]报道的长期高脂模型中 Fib 显著升高的现象存在差异, 可能归因于本研究喂养周期较短, 未能充分激活慢性炎症相关通路以驱动 Fib 合成。值得注意的是, 尽管单纯高脂饮食未显著上调 Fib, 但通过尾静脉注射 AAV-Fib (1.13×10^{12} vg/kg) 可成功实现 Fib 过表达, 表明外源性转导可突破内源性调控阈值, 为构建 Fib 过表达的血瘀证模型提供了可行方

案, 故选择该剂量用于后续实验。

随后, 本研究构建了 Fib 过表达的 CHD 血瘀证大鼠模型。造模后, CHDX+FIB 组大鼠主动脉组织 Fib 水平显著高于 CHDX 组, 主动脉组织结构明显破坏, 内膜下及中膜平滑肌层可见典型的钙盐沉积和坏死空腔, 主动脉形成 AS 斑块, 心电图显示 ST 段抬高。血脂检测结果显示, CHDX 组大鼠 TC 和 LDL-C、HDL-C 水平较 N 组显著升高, TG 水平下降。这一结果与经典高脂模型的血脂变化存在一定差异, 可能与造模方法诱导的代谢应激有关。研究^[28]表明, 异丙肾上腺素可通过激活 β -肾上腺素能受体, 促进脂肪分解及能量消耗; 同时, VitD₃ 造成的高钙血症会引起大鼠消化功能障碍, 导致大鼠体质质量下降, 故出现 TG 水平降低和 HDL-C 水平升高^[29]。然而, CHDX+FIB 组 TC、TG、LDL-C 水平较 CHDX 组进一步升高, HDL-C 显著降低, 表明 Fib 过表达加剧了脂质代谢紊乱, 其机制可能与 Fib 通过抑制脂蛋白脂肪酶活性减少 TG 分解, 并干扰 HDL 介导的胆固醇外流有关^[30]。血液流变学检测结果表明, CHDX 组大鼠血浆黏度升高, Fib 过表达进一步提高了血浆黏度。以上结果表明, Fib 过表达不仅可提高大鼠血脂水平, 还可增加血浆黏度, 使血瘀证加重, 从而加剧 CHD 的致病性。

VECs 通过增殖和迁移促进血管生成, 但在氧化应激、炎症反应或脂质积聚的情况下, 内皮功能异常、

ROS 的增加加速血管炎症,进而推动 CHD 进展^[31-32]。有学者^[33]认为,血管内皮功能障碍类似于血瘀证的形成过程,涉及脉中气机郁滞和血液及津液代谢障碍,导致血管活性物质分泌异常,进而影响机体稳态。近年来,改善血管内皮损伤治疗 CHD 是血瘀证研究的热点^[34]。研究^[35-36]表明,AS 早期脂质过氧化导致 MDA 水平显著升高,并且氧化应激诱导内皮细胞分泌血管收缩因子(如 ET-1),促进冠状动脉收缩,加速血栓形成,可能导致心肌缺血和坏死。本研究发现,CHD 血瘀证大鼠 MDA、ET-1 水平显著升高,而 Fib 过表达则降低了其分泌,这与 Hloch 等^[37]的研究结果一致,提示 Fib 的过表达可能调节了 AS 所致的血管内皮的损伤。此外,SOD 作为重要的抗氧化酶在氧化应激中起保护作用。本研究发现 CHD 血瘀证大鼠 SOD 活性降低,而 Fib 过表达逆转了这一趋势,这可能与抗氧化应激机制的激活或机体的适应性反应有关,旨在弥补氧化还原反应过度增加造成的氧化应激损伤^[38-39]。

Nrf2 是细胞内重要的抗氧化应激防御因子,当机体发生氧化应激时,Nrf2 可被激活并促进 HO-1 的表达,从而减轻血管氧化损伤并维持细胞氧化还原稳态^[40-41]。然而,Fib 的过表达可能通过影响氧化应激水平,导致 Nrf2/HO-1 通路的调控异常,加重血管内皮损伤及促凝状态。研究^[42]表明,在 Nrf2 敲除模型中,HO-1 合成降低,抗氧化能力受损,进而减少其对血管内皮细胞的修复作用,延缓新生血管生成。因此,本研究进一步探讨了 Nrf2/HO-1 信号通路是否参与 Fib 过表达诱导的血管内皮损伤。结果显示,CHD 血瘀证模型大鼠主动脉中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平升高,Fib 过表达进一步增强了这一表达。此外,免疫荧光染色结果表明,Fib 过表达激活了 Nrf2 并抑制了 ET-1 的过度表达。与我们的发现类似,Yu 等^[43]也发现脂质过氧化增强了内皮细胞氧化应激,并通过激活 Nrf2 抗氧化机制来恢复氧化还原稳态,减少氧化应激对血管的过度损害。

进一步分析表明,Fib 过表达可能通过双重机制影响 Nrf2/HO-1 通路。一方面,Fib 诱导的氧化应激激活 Nrf2 核转位,促进 HO-1 等抗氧化酶的表达,从而增强内皮细胞的抗氧化能力;这与于春磊等^[44]的研究一致,其发现血瘀证模型中 Nrf2 表达上调可通过提高 GSH 合成减轻 ROS 损伤。另一方面,Fib 的促凝活性可能导致血管内皮持续损伤,加剧局部氧化应激负荷,迫使 Nrf2/HO-1 通路超负荷激活,最终导致抗氧化防御系统的代偿性衰竭。本研究结果显示,CHDX+FIB 组 Nrf2/HO-1 蛋白表达水平较 CHDX 组进一步升高,但 MDA 水平下降,提示 Fib 过表达初期通过激活 Nrf2/HO-1 通路缓解氧化损伤,然而长期高 Fib 状态可能因通路过度激活引发适应性耗竭,加剧内皮损伤。这一动态平衡的

破坏可能是血瘀证“久病入络”的分子基础。因此,靶向 Nrf2/HO-1 通路的适度激活可能成为逆转 Fib 相关血管损伤的有效策略。

本研究成功构建了 Fib 过表达的 CHD 血瘀证大鼠模型。本研究发现,Fib 过表达加剧了 CHD 血瘀证引起的脂质代谢紊乱,增加血浆黏度,促进 AS 斑块形成并导致主动脉结构损害,显著加重了 CHD 血瘀证。同时,Fib 过表达通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路启动代偿机制,以抵抗血管内皮过度损伤,这可能与脂质代谢紊乱引发的氧化应激和机体适应性反应有关。本研究提示,Fib 过表达通过激活 Nrf2/HO-1 通路部分缓解氧化损伤,但长期高 Fib 状态可能导致通路代偿性耗竭。基于此,开发靶向 Nrf2/HO-1 通路的中药复方可能通过双向调节 Fib 代谢与抗氧化防御,改善血瘀证患者的微循环障碍。未来研究可进一步筛选具有“活血化瘀”功效的中药成分,结合 Fib 水平动态监测,实现 CHD 血瘀证的精准干预,为中西医结合防治 CHD 提供新策略。

参考文献:

- [1] 刘明波,何新叶,杨晓红,等.《中国心血管健康与疾病报告 2023》概要(心血管疾病流行及介入诊疗状况)[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2024, 32(10): 541-550.
- [2] 金娟,郭东浩,孔菲. 国医大师段富津运用“三参丹饮”治疗气虚血瘀型胸痹经验摘要[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 84-87.
- [3] BENDERLY M, GRAFF E, REICHER-REISS H, et al. Fibrinogen is a predictor of mortality in coronary heart disease patients [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(3): 351-356.
- [4] MJELVA Ø R, SVINGEN G F T, PEDERSEN E K R, et al. Fibrinogen and neopterin is associated with future myocardial infarction and total mortality in patients with stable coronary artery disease[J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118(4): 778-790.
- [5] 中国医师协会中西医结合医师分会. 活心丸(浓缩丸)临床应用专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2025, 45(2): 140-145.
- [6] 牛朴钰,刘耀远,王含香,等. 207 793 例冠心病中医证候分布特点研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(14): 201-204.
- [7] DEVECI B, GAZI E. Relation between globulin, fibrinogen, and albumin with the presence and severity of coronary artery disease[J]. *Angiology*, 2021, 72(2): 174-180.
- [8] STAKHNEVA E M, MESHCHERYAKOVA I A, DEMIDOV E A, et al. A proteomic study of atherosclerotic plaques in men with coronary atherosclerosis[J]. *Diagnostics*, 2019, 9(4): 177.
- [9] WANG J, JIA L, LI X, et al. New insights into the association between fibrinogen and coronary atherosclerotic plaque vulnerability: an intravascular optical coherence tomography study [J]. *Cardiovasc Ther*, 2019, 2019: 8563717.
- [10] WU F, CHIPMAN A, DONG J F, et al. Fibrinogen activates PAK1/ Cofilin signaling pathway to protect endothelial barrier integrity [J]. *Shock*, 2021, 55(5): 660-665.
- [11] TOMITA T, KATO M, HIRATSUKA S. Regulation of vascular permeability in cancer metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8): 2966-2974.

- [12] JINNOUCHI H, GUO L, SAKAMOTO A, et al. Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(10): 1919-1932.
- [13] HOSSEINI E, GHASEMZADEH M, AZIZVAKILI E, et al. Platelet spreading on fibrinogen matrix, a reliable and sensitive marker of platelet functional activity during storage[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2019, 48(3): 430-438.
- [14] 杨莹骊, 王亚红, 孙卉丽, 等. 冠心病血瘀证与冠脉病变相关性研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2015, 49(2): 90-93.
- [15] GARCIA-MEJIA K A, CUSTODIO-CHABLE S J, VAZQUEZ-FRANCO J E, et al. β -amyloid orchestrates factor XIII and platelet activation leading to endothelial dysfunction and abnormal fibrinolysis in alzheimer disease[J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2021, 35(1): 91-97.
- [16] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809.
- [17] GUO J, DU L. An update on ox-LDL-inducing vascular smooth muscle cell-derived foam cells in atherosclerosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1481505.
- [18] GIANOPOULOS I, DASKALOPOULOU S S. Macrophage profiling in atherosclerosis: understanding the unstable plaque[J]. *Basic Res Cardiol*, 2024, 119(1): 35-56.
- [19] ZHENG D, LIU J, PIAO H, et al. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1039241.
- [20] 周曼丽, 俞赞丰, 罗晓欣, 等. 线粒体动力学介导冠心病血瘀证心肌能量代谢[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(21): 80-90.
- [21] LUYENDYK J P, SCHOENECKER J G, FLICK M J. The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation[J]. *Blood*, 2019, 133(6): 511-520.
- [22] KRYCZKA K E, KRUK M, DEMKOW M, et al. Fibrinogen and a triad of thrombosis, inflammation, and the renin-angiotensin system in premature coronary artery disease in women: a new insight into sex-related differences in the pathogenesis of the disease[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 1036.
- [23] KONIECZYNSKA M, NATORSKA J, UNDAS A. Thrombosis and aging: fibrin clot properties and oxidative stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2024, 41(4-6): 233-254.
- [24] LARSEN J B, HVAS A M. Fibrin clot properties in coronary artery disease: new determinants and prognostic markers[J]. *Pol Arch Intern Med*, 2021, 131(11): 16113.
- [25] SURMA S, BANACH M. Fibrinogen and atherosclerotic cardiovascular diseases-review of the literature and clinical studies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 193.
- [26] ZABCZYK M, NATORSKA J, UNDAS A. Fibrin clot properties in atherosclerotic vascular disease: From pathophysiology to clinical outcomes[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(13): 2999.
- [27] KIM M H, LEE J, JUNG S, et al. The involvement of ginseng berry extract in blood flow via regulation of blood coagulation in rats fed a high-fat diet[J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(2): 120-126.
- [28] 程扣辉, 姜允奇, 王文景, 等. 非受体酪氨酸激酶 Src 在异丙肾上腺素介导脂肪分解中的作用[J]. *中国心血管杂志*, 2021, 26(6): 569-574.
- [29] 周红, 吴晓燕, 袁艺标, 等. 三种剂量维生素 D₃ 结合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(11): 995-998.
- [30] ZHEN E Y, CHEN Y Q, RUSSELL A M, et al. Angiopoietin-like protein 4/8 complex-mediated plasmin generation leads to cleavage of the complex and restoration of LPL activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(7): e2214081120.
- [31] XIAO S T, KUANG C Y. Endothelial progenitor cells and coronary artery disease: Current concepts and future research directions[J]. *World J Clin Cases*, 2021, 9(30): 8953-8966.
- [32] YAN R, ZHANG X, XU W, et al. ROS-induced endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Aging Dis*, 2024, 16(1): 250-268.
- [33] 吴以岭. “脉络-血管系统”相关性探讨[J]. *中医杂志*, 2007, 48(1): 5-8.
- [34] SHI L, LI Y, XU X, et al. Brown adipose tissue-derived Nrg4 alleviates endothelial inflammation and atherosclerosis in male mice[J]. *Nat Metab*, 2022, 4(11): 1573-1590.
- [35] SRI ISWARI R, DAFIP M, PURWANTOYO E. Malondialdehyde (MDA) production in atherosclerosis supplemented with steamed tomato[J]. *Pak J Biol Sci*, 2021, 24(3): 319-325.
- [36] WANG L, CHENG C K, YI M, et al. Targeting endothelial dysfunction and inflammation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2022, 168: 58-67.
- [37] HLOCH O, FILA L, HAVLIN J, et al. Significance of plasma fibrinogen and malondialdehyde in the post-inflammatory period in patients with cystic fibrosis[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2022, 123(3): 149-152.
- [38] SHAITO A, ARAMOUNI K, ASSAF R, et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases[J]. *Front Biosci*, 2022, 27(3): 105.
- [39] SCRIBANO MDE L, BAEZ MDEL C, FLORENCIA B, et al. Effects of atorvastatin on oxidative stress biomarkers and mitochondrial morphofunctionality in hyperfibrinogenemia-induced atherogenesis[J]. *Adv Med*, 2014, 2014: 947258.
- [40] ZHANG Q, LIU J, DUAN H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [41] SHA W, ZHAO B, WEI H, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates vascular endothelial dysfunction by stimulating macrophage M2 polarization via potentiating Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154667.
- [42] CHEN Y, ZHANG X, YANG Y, et al. Tert-butylhydroquinone enhanced angiogenesis and astrocyte activation by activating nuclear factor-E2-related factor 2/heme oxygenase-1 after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Microvasc Res*, 2019, 126: 103891.
- [43] YU W, LIU W, XIE D, et al. High level of uric acid promotes atherosclerosis by targeting NRF2-mediated autophagy dysfunction and ferroptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9304383.
- [44] 于春磊, 徐天娇, 张晓杰, 等. 基于“有故无殒”药术对正常和血瘀证小鼠毒性差异机制的研究[J]. *药学报*, 2019, 54(2): 329-334.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-03-03