

桂郁金水提物抗血栓作用及其机制研究^{*}

宿玉 程婧 刘竹青 姚瑶

(安徽中医药大学中医学方药系,安徽 合肥 230038)

摘要:目的 探讨桂郁金水提物(WECK)对三氯化铁(FeCl_3)诱导的大鼠颈动脉血栓模型抗血栓作用及机制。方法 建立 FeCl_3 诱导大鼠颈动脉血栓模型,观察血栓形成,测定血小板聚集率、PT、APTT,ELISA法测定血浆TXB₂、6-K-PGF₁ α 水平,对TXB₂/6-K-PGF₁ α 比值与血栓湿重的相关性进行分析。结果 WECK低、中、高剂量组(50,100,150mg·kg⁻¹)和ASP组(100mg·kg⁻¹)均能显著抑制由 FeCl_3 诱导的血栓形成和血小板聚集、显著延长PT、APTT时间,与模型组比较均有统计学差异($P < 0.01$);WECK对血栓形成抑制率最高为38.23%,ASP的抑制率为41.75%,两组比较无显著性差异($P > 0.05$);对血小板聚集抑制率为72.10%,ASP的抑制率为78.12%。WECK高剂量组血栓形成抑制率、血小板聚集抑制率及凝血功能与ASP组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。与假手术比较,模型组TXB₂水平明显升高($P < 0.01$),6-K-PGF₁ α 明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,WECK低、中、高剂量组和ASP组TXB₂水平明显下降($P < 0.01$),6-K-PGF₁ α 水平明显升高($P < 0.01$)。且TXB₂/6-K-PGF₁ α 比值与血栓湿重呈正相关性。结论 WECK通过抑制血小板聚集和抗凝血而发挥抗血栓作用,其作用机理可能是通过抑制TXA₂和促进PGI₂的合成保持TXA₂和PGI₂比值平衡,通过减少TXA₂合成抑制血小板功能亢进,促进内皮细胞分泌PGI₂,诱导血管舒张并抑制血小板聚集而发挥抗血栓作用。

关键词:桂郁金水提物;颈动脉血栓;抗血栓;血小板聚集

中图分类号:R282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1340(2019)06-0080-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2019.06.022

血栓是指人体血管壁或心脏内壁发生血液沉积物或在循环血中发生异常的血凝块,可遍及全身组织和器官引起血管阻塞并诱发心脑血管血栓、肺栓塞等致残率和致死率高的重大疾病^[1]。其中心脑血管血栓是导致以心肌梗死和冠心病等疾病为代表的心血管疾病、以卒中、脑梗塞和脑出血等疾病为代表的脑血管疾病的病理原因,可见血栓性疾病在心脑血管事件的发生和发展中扮演着重要的角色^[2]。目前有关其形成机制尚不完全清楚,文献报道其与凝血功能、纤溶、血小板、血管壁等多因素有关^[3-4]。目前抗血栓治疗已成为当前心脑血管病治疗的重要策略之一。血栓的现成可能是多机制共同作用的结果,而目前临床上使用的抗血栓药物主要有维生素K拮抗剂、FXa抑制剂、抗凝血酶激活剂等,这些药物仅针对其中某个环节产生作用,且副作用大、出血和复发的风险

高^[5-6]。因此,寻找能够预防和治疗血栓形成,同时能够降低副作用的新药物具有重要临床意义。

桂郁金为姜科植物广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)的干燥块根,与温郁金、黄丝郁金和绿丝郁金共同作为郁金入药,是《中华人民共和国药典》2015部所收录的四种郁金药材来源之一。其辛、苦、寒,归肝、心、肺经,具活血止痛、行气解郁、清心凉血、利胆退黄等功效^[7]。有研究报道,同基源的温郁金能够增强血管舒张能力减少血栓的形成,具有预防和治疗心脑血管疾病的作用^[8]。而有关桂郁金的抗血栓作用及机制目前尚未见报道。因此,本研究通过三氯化铁诱导构建大鼠颈动脉血栓模型,探讨桂郁金水提物(Water extract of *curcumae kwangsiensis*, WECK)的抗血栓作用及机制,为桂郁金在临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD大鼠,雄性,SPF级,体重(200 ± 20)g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)2011-0003)。

1.2 受试药物 桂郁金购于广西省钦州市灵山县,经鉴定为广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee etC. F. Liang 的干燥块根。桂郁金切碎,10倍量水浸泡2h后回流提取3h,滤过后药渣再重复提取1次,合并滤液,用70%乙酸乙酯萃取,减压浓缩、干燥至干膏后备用(干膏得率为27%),实验时用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)制成WECK混悬液。

1.3 试剂及仪器 阿司匹林(Aspirin, ASP, 武汉欣欣佳丽生物科技有限公司,批号:50782),用0.5%的羧甲基纤维素钠(Carboxymethyl cellulose sodium, CMC)溶解制备成ASP混悬液备用;三氯化铁(FeCl_3 , 天津市大茂化学试剂厂), PUN-2048半自动凝血分析仪(南京普朗医用设备有限公司), SA-6000自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司), GL-16M台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司), SpectraMax M5多功能酶标仪(美谷分子仪器上海有限公司)。

1.4 动物分组 与大鼠体内血栓模型构建 将大鼠随机分为假手术组,模型组,ASP组,WECK低、中、高剂量组,每组10只。WECK高、中、低剂量组(150 、 100 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃给予相应浓度的WECK混悬液,ASP组给予 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASP混悬液灌胃,模型组和假手术组给予等体积0.5% CMC灌胃,每日1次,连续7d。末次给药30min后,参照文献方法^[11]并加以改进制备血栓模型:大鼠腹腔注射20%水合氯醛 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉,沿颈正中线切开颈部皮肤约3~4cm,钝性分离左、右侧颈总动脉约3cm,置于塑料薄膜($5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$)上,将在50% FeCl_3 溶液中浸透的滤纸条($2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$)环敷右侧颈总动脉,滤纸接口处用镊子轻夹确保滤纸紧贴右侧颈总动脉,30min后取掉滤纸,并用生理盐水冲洗右侧颈总动脉,待左侧颈总动脉取血后,剪下用滤纸条包裹的右侧颈总动脉血栓血管段,置于滤纸上吸干浮血,称定血栓湿重,计算血栓形成抑制率 = (模型组血栓湿重 - 给药组血栓湿重)/模型组血栓湿重 $\times 100\%$ 。假手术组滤纸

条浸透溶液用生理盐水代替50% FeCl_3 ,其它处理方法同上。

1.5 抗血小板聚集实验 在文献^[9]基础上进行改进。颈总动脉取血后立即加入3.8%枸橼酸钠溶液1:9(抗凝剂:血液)充分抗凝,然后离心机离心10min(4°C 、3 000 rpm),移液器小心分取上层上清液,避免吸入血细胞,即为富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP);将剩余的下层再次离心10min(4°C 、3 000 rpm)后,用移液器小心吸取上层上清液,即为贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。参照文献方法^[10]采用比浊法经半自动凝血分析仪测定血小板聚集率,血小板最大抑制率($\%$) = (模型组最大聚集率 - 给药组最大聚集率)/模型组最大聚集率 $\times 100\%$ 。

1.6 凝血功能的检测 利用光电学原理经半自动凝血分析仪检测凝血功能。取PRP用于测定凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)的检测。

1.7 鼠血浆TXB₂、6-K-PGF₁ α 的检测 取“1.5项”下的PRP血样,采用ELISA法测定血浆血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮-前环列腺素F₁ α (6-keto-prostaglandin F₁ α , 6-K-PGF₁ α)水平。

1.8 统计学方法 所有计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS19.0统计分析软件进行数据分析,计量资料(均数之间的比较)用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 FeCl_3 诱导的大鼠颈总动脉血栓形成的影响

WECK低、中、高剂量组(50 、 100 、 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和ASP组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)均能显著抑制由 FeCl_3 诱导的血栓形成,与模型组比较,药物作用后血栓湿重显著下降,相比均有统计学差异($P < 0.01$);WECK对 FeCl_3 诱导的血栓形成抑制率最高为38.23%,ASP的抑制率为41.75%。与ASP组比较,WECK高剂量组血栓形成抑制率无显著性差异($P > 0.05$);而WECK低、中剂量组对血栓的形成作用较差,与ASP组比较均有统计学差异($P < 0.01$)。可见,WECK高剂量组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对血栓形成的抑制作用与 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASP作用相当,且WECK对血栓形成的

抑制作用具有良好的量效关系,结果见表 1。

表 1 对 FeCl₃ 诱导的大鼠颈总动脉
血栓形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量(mg · kg ⁻¹) | 血栓湿重(mg) | 血栓形成抑制率(%) |
|-----------|----------------------------|-----------------|------------|
| 模型组 | - | 22.68 ± 0.19 ** | - |
| ASP 组 | 100 | 13.21 ± 0.11 ** | 41.75 |
| WECK 高剂量组 | 150 | 14.01 ± 0.12 ** | 38.23 |
| WECK 中剂量组 | 100 | 16.12 ± 0.14 ** | 28.92 |
| WECK 低剂量组 | 50 | 18.69 ± 0.16 ** | 17.59 |

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

2. 2 对 FeCl₃ 诱导的大鼠血小板聚集的影响

WECK 低、中、高剂量组(50,100,150mg · kg⁻¹)和 ASP 组(100mg · kg⁻¹)均能显著抑制由 FeCl₃ 诱导的血小板聚集,与模型组比较,药物作用后血小板聚集率显著下降,相比均有统计学差异(*P* < 0.01);WECK 对 FeCl₃ 诱导的血小板抑制率最高为 72.10%,ASP 组的抑制率为 78.12%,两组比较无显著性差异(*P* > 0.05);而 WECK 低、中剂量组对血小板聚集抑制作用较差,与 ASP 组比较均有统计学差异(*P* < 0.01)。可见,WECK 高剂量组(150mg · kg⁻¹)对血小板聚集的抑制作用与 100mg · kg⁻¹ASP 作用相当,且 WECK 对血小板聚集的抑制作用具有良好的量效关系,结果见表 2。

表 2 对 FeCl₃ 诱导的大鼠血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量(mg · kg ⁻¹) | 最大聚集率(%) | 抑制率(%) |
|-----------|----------------------------|-----------------|--------|
| 模型组 | - | 41.69 ± 0.35 | - |
| ASP 组 | 100 | 9.12 ± 0.09 ** | 78.12 |
| WECK 高剂量组 | 150 | 11.63 ± 0.11 ** | 72.10 |
| WECK 中剂量组 | 100 | 19.12 ± 0.07 ** | 54.14 |
| WECK 低剂量组 | 50 | 18.67 ± 0.16 ** | 55.22 |

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

2. 3 对 FeCl₃ 诱导的大鼠凝血功能的影响

WECK 低、中、高剂量组(50,100,150mg · kg⁻¹)和 ASP 组(100mg · kg⁻¹)均能显著延长 PT、APTT 时间,与模型组比较均有显著性差异(*P* < 0.01);与 ASP 组比较,WECK 高剂量组的 PT、APTT 时间无显著性差异(*P* > 0.05),而 WECK 低、中剂量组的 PT、APTT 时间显著缩短,相比有显著性差异(*P* < 0.01)。可见,WECK 对外源性 PT、APTT 的作用较强,其凝血作用呈良好的量效关系,结果见表 3。

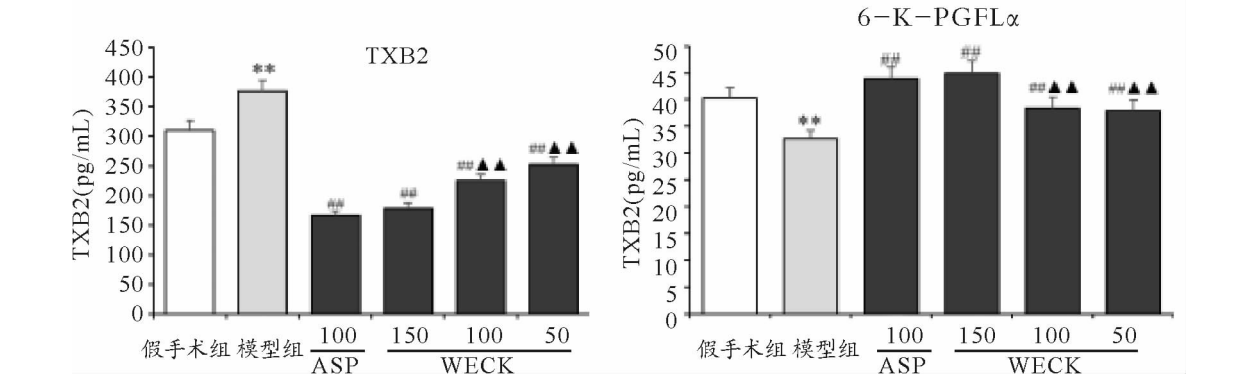
表 3 WECK 对 FeCl₃ 诱导的大鼠凝血功能的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量(mg · kg ⁻¹) | PT(s) | APTT(s) |
|-----------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| 模型组 | - | 11.99 ± 1.28 | 21.60 ± 2.92 |
| ASP 组 | 100 | 17.53 ± 1.63 ** | 34.15 ± 3.37 ** |
| WECK 高剂量组 | 150 | 16.80 ± 1.56 ** | 32.54 ± 3.22 ** |
| WECK 中剂量组 | 100 | 14.84 ± 1.37 ** | 30.28 ± 2.99 ** |
| WECK 低剂量组 | 50 | 13.42 ± 1.23 ** | 27.05 ± 2.67 ** |

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

2. 4 WECK 对大鼠血浆 TXB₂、6-K-PGF₁α 水平及的影响

与假手术比较,模型组 TXB₂ 水平明显升高(*P* < 0.01),6-K-PGF₁α 明显降低(*P* < 0.01);与模型组比较,WECK 低、中、高剂量组(50,100,150mg · kg⁻¹)和 ASP 组(100mg · kg⁻¹)TXB₂ 水平明显下降(*P* < 0.01)、6-K-PGF₁α 水平明显升高(*P* < 0.01)。不同药物组之间与 ASP 组比较,WECK 高剂量组 TXB₂、6-K-PGF₁α 水平无显著性差异(*P* > 0.05);而 WECK 低、中剂量组 TXB₂ 水平显著升高(*P* < 0.01),6-K-PGF₁α 水平显著下降(*P* < 0.01)。结果见表 1。



注:与假手术组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组比较,#*P* < 0.05,##*P* < 0.01;与 ASP 比较,^*P* < 0.05,^^*P* < 0.01

图 1 1 WECK 对大鼠血浆 TXB₂、6-K-PGF₁α 水平的影响

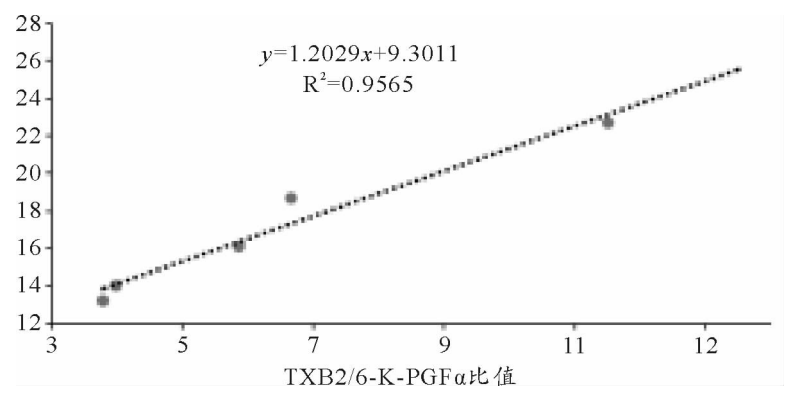


图2 大鼠血浆 TXB2/6-K-PGF1 α 比值与血栓湿重的相关性图

3 讨论

血栓的形成是机体处于病理情况下的一个逐渐发生和进展的过程,其过程包括:体内的凝血系统被激活而发生血液凝固,血管内壁脱落处、修补处形成栓子最终形成血栓^[2]。体内血栓形成会引发冠心病、脑中风、心肌梗死、肺栓塞等血栓性疾病,均是临床上常见的高致死率和致残率的重大疾病。据统计,近年来,此类疾病的发病率呈逐年上升的趋势,对人类的身体健康造成了极大威胁。目前临床尚无特效药,故寻找抗血栓作用的药物具有重要的临床意义。本实验发现 WECK 具有抗血栓作用。

FeCl₃ 诱导的颈动脉血栓是目前广泛应用的血栓模型,由于该模型与人类血栓疾病的发病机制比较相似,且对抗血小板及抗凝药物较敏感,被广泛应用于实验性动物的动、静脉血栓的实验^[9-10]。因此实验中选用此模型。FeCl₃ 诱导的颈动脉血栓主要是通过氧化损伤血管内膜,引起血小板黏附、聚集、释放,在损伤局部形成阻塞性血栓,导致血栓形成^[11]。而 WECK 可显著抑制由 FeCl₃ 诱导的血栓形成,显著减轻大鼠颈动脉血栓湿重,对血栓的形成有抑制作用。

血栓形成的凝血过程中,PT 和 APTT 可分别反映内源性凝血和外源性凝血的功能状况^[12]。PT 主要反映外源性凝血是否正常,是凝血系统的一个较为敏感的筛选指标,APTT 主要反映内源性凝血是否正常,是内源性凝血系统的一个较为敏感的筛选指标。PT 和 APTT 的延长与凝血酶的抑制有关,其延长或缩短分别反映酶原(因子Ⅱ)、因子Ⅴ、因子Ⅶ、因子Ⅹ及纤维蛋白原缺乏,PT 和 APTT 的缩短均提示血栓栓塞性疾病的发生^[13-14]。出

血时间的长短与血小板的数量和功能、纤溶及毛细血管功能、组织因子等有关。而血小板和毛细血管功能是血栓形成最重要的两个因素。血小板和凝血酶在血栓的发生、发展过程中相互作用^[15]。因此,抑制血小板功能和防止血液凝固是预防血栓形成的关键。本实验结果表明,WECK 低、中、高剂量组(50, 100, 150mg · kg⁻¹)均能显著抑制由 FeCl₃ 诱导的血小板聚集,延长 PT、APTT 时间。WECK 抗血栓作用与抑制血小板功能和防止血液凝固作用具有一致性,提示 WECK 抗血栓作用可能与其抑制血小板聚集和抗凝血功能有关。

TXB₂、6-K-PGF1 α 均是花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)在各种生理和病理刺激下的重要代谢产物。正常情况下细胞中的 AA 不会游离出来,但当组织受损时可游离出来,在环氧化酶(cyclooxygenase, COX)的环氧化活性和过氧化活性的作用下,转变为不稳定的中间代谢产物前列腺素(PG)。然后经过下游不同的前列腺素合成酶的作用代谢生成各种有生物活性的前列腺素,包括 TXA₂ 和 PGI₂。TXA₂ 常用作血小板聚集剂和缩血管物质,但由于其性质不稳定,常以无生物活性的 TXB₂ 形式存在^[16]。PGI₂ 是通过扩张血管和抑制血小板功能发挥抗血栓作用,其性质也不稳定,常以无生物活性的 6-K-PGF1 α 形式存在。TXA₂ 和 PGI₂ 分别由血小板和血管内皮细胞产生,它们对血管以及血小板的作用相反,TXA₂ 诱导血管收缩,是一种强血小板激动剂;PGI₂ 诱导血管舒张并抑制血小板聚集。TXA₂ 和 PGI₂ 互为拮抗,生理状态下的活性平衡可以保持血管正常的收缩与舒张功能,当这种活性平衡一旦失衡,则使血管系统的稳定状态被打乱,容易诱发血栓

形成^[17]。

本实验结果表明,与假手术比较,模型组 TXB2 水平明显升高($P < 0.01$),6-K-PGF1 α 明显降低($P < 0.01$),可能是因为 FeCl3 造成大鼠血栓模型血管内皮组织损伤,使 AA 游离,在 COX 的氧化作用下,下游 PG 在 PG 合成酶的作用下上调 TXA2,下调 PGI2,使 TXA2 和 PGI2 拮抗作用减弱,加速血小板的活化和聚集,导致血栓形成。与模型组比较,WECK 低、中、高剂量组和 ASP 组 TXB2 水平明显下降($P < 0.01$),6-K-PGF1 α 水平明显升高($P < 0.01$)。并且 TXB2/6-K-PGF1 α 比值与血栓湿重呈正相关性。我们推测 WECK 通过抑制血小板聚集和抗凝血对机体产生明显的抗血栓作用,其作用机理可能是 WECK 通过抑制 TXA2 和促进 PGI2 的合成保持 TXA2 和 PGI2 比值平衡,通过减少 TXA2 合成抑制血小板功能亢进,促进内皮细胞分泌 PGI2,诱导血管舒张并抑制血小板聚集,发挥抗血栓作用。总之,基于 TXA2/PGI2 比值平衡的 AA 代谢途径可能是 WECK 抗血栓的作用机制之一。

参考文献

- [1] Choi BR, Kim DH, Back DB, et al. Characterization of white matter injury in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Stroke, 2016, 47(2): 542-547.
- [2] Fei X, Xin T, Xue FW. Antiphospholipid syndrome causing reversible internal? carotid artery thrombosis [J]. The Lancet, 2018, 391(40): 2631-2640.
- [3] Luo XC, Yue QQ, Su XZ, et al. The effect of pravastatin on carotid artery thrombosis in rats under the stimulus of C-reactive protein [J]. Thrombosis Research, 2016, 144(8): 213-214.
- [4] Jacquelen St, Roberto C, Shahab T, et al. Common Carotid Artery Thrombosis With Recurrent Cerebral Emboli Treated With Ligation [J]. Journal of Vascular Surgery, 2016, 64(3): 849-850.
- [5] 谷胜男,姜彤伟. 活血化瘀药治疗血栓性疾病的临床应用及实验研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(2): 382-388.
- [6] 黎均铭. 桃仁红花煎治疗缺血性心脏病 56 例临床观察 [J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(5): 36-37.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 208.
- [8] Xia Q, Wang X, Xu D, et al. Inhibition of platelet aggregation by curdione from Curcuma wenyujin essential Oil [J]. Thrombosis Research, 2012, 130(3): 409-414.
- [9] 梁辰, 陈本宏, 王福文. FeCl3 诱导大鼠颈总动脉血栓制备慢性脑缺血模型的探索 [J]. 生命科学研究, 2017, 21(1): 46-50.
- [10] 卞冬燕, 刘红旭, 梁钰敏, 等. 硫化氢对 FeCl3 诱导的小鼠颈动脉血栓模型中凝血和纤溶活性的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 523-527.
- [11] 王丽晔, 陈志刚, 罗玉敏. 动物慢性脑缺血模型的研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 67-73.
- [12] 陈晓军, 韦洁, 农云开, 等. 广西莪术水提取物抗血栓形成作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2018, 25(4): 495-497.
- [13] 毛山, 李玉, 王治校, 等. 替格瑞洛对冠心病介入治疗患者氧化应激、凝血功能、血小板功能及相关因子的影响 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(6): 424-426.
- [14] 冯剑, 王毓国, 许成勇, 等. 清热解毒凉血法改善急性辐射损伤大鼠凝血功能及微循环状态的作用机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 355-359.
- [15] 李颖, 吴英娜. 氯吡格雷、阿司匹林单用及双联抗血小板长期治疗对老年冠心病患者经皮冠状动脉介入术后的影响分析 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(22): 72-75.
- [16] 苏敏, 梁慧超, 孟江, 等. 姜炭对虚寒性出血证大鼠凝血功能, 血栓素 B2 和 6-酮-前列腺素 F1 α 的影响. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 190-193.
- [17] 王毓国, 窦永起, 秦丽. 黛黄芍药散对放射性直肠炎大鼠 COX2、TXB2 及 6-Keto-PGF1 α 的影响 [J]. 环球中医药, 2016, 9(9): 1043-1046.

(收稿日期: 2019-06-22 编辑: 巩振东)