

丹参注射液对老龄大鼠红细胞膜组分的影响

牛雯颖, 袁良杰, 张禹, 武爽, 冯月男, 卞敬琦, 张瑶, 肖洪彬*

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:从血液流变学和红细胞膜组分的变化探讨丹参注射液改善老龄大鼠血瘀证的作用机制。方法:70~72 周龄 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,随机分为丹参注射液(按生药量计)高剂量组(4.4 g·kg⁻¹)、低剂量组(1.1 g·kg⁻¹)和模型组。另外 10 只青龄大鼠作为青龄对照组,ip 给药 14 d 后,取血测定全血黏度、血浆黏度、红细胞变形指数以及红细胞膜各组分等指标。结果:与青龄对照组比较,模型组全血黏度显著升高($P < 0.05$),血浆黏度升高极显著($P < 0.01$);在 200 s⁻¹,500 s⁻¹切变率下红细胞变形指数均降低极显著($P < 0.01$),1 000 s⁻¹切变率下红细胞变形指数显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比丹参注射液组能够显著降低老龄大鼠的全血黏度($P < 0.01$)和血浆黏度($P < 0.05$),明显提高红细胞变形能力($P < 0.01$);并且能显著增加老龄大鼠红细胞膜唾液酸含量和巯基含量($P < 0.05$),显著提高红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 SOD(超氧化物歧化酶)活性($P < 0.01$, $P < 0.01$),降低 MDA(丙二醛)水平($P < 0.01$)。结论:丹参注射液可能是通过增加红细胞膜表面唾液酸含量、影响膜上脂质代谢、提高机体抗氧化能力,以及改变膜上负电荷荷电量等方面来改善老龄大鼠的血液流变学特性。

[关键词] 老龄大鼠;丹参注射液;血液流变学;红细胞膜

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0183-04

[doi] 10.11653/syfy2013110183

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1404.006.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:04

Effect of Danshen Injection on the Components of Erythrocyte Membrane in the Aged Rats

NIU Wen-ying, YUAN Liang-jie, ZHANG Yu, WU Shuang, FENG Yue-nan,
BIAN Jing-qi, ZHANG Yao, XIAO Hong-bin*

[收稿日期] 20121227(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173186);黑龙江省博士后项目;黑龙江中医药大学优秀创新人才项目

[第一作者] 牛雯颖,助理研究员,博士后,E-mail:nwy012603001@126.com

[通讯作者] *肖洪彬,Tel:0451-82193409,E-mail:hrbxiaohongbin@126.com

果仅是对药物的在体作用提供了参考,组分配伍的具体作用和体内配伍比例尚有待于动物实验来进一步确证。

[参考文献]

- [1] Hofbauer L C, Brueck C C, Singh S K, et al. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(9):1317.
- [2] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes[J]. Calcif Tissue Int, 2009, 84(1):45.
- [3] 盛华刚,李娜,朱立俏,等.三七总皂苷和淫羊藿苷组

分配伍对成骨细胞的增殖和钙化作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):183.

- [4] 刘芳.菟丝子总黄酮对成骨细胞骨代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):232.
- [5] 李溪,向盈盈,龚跃昆,等.糖尿病骨折大鼠骨痂组织中成骨细胞增殖和骨钙素表达与骨形态发生蛋白-2干预的关系[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(20):3857.
- [6] 宫明智,唐立群,刘中浩,等.糖尿病模型大鼠增殖情况的观察骨折后骨痂细胞[J].中华老年医学杂志,2006,25(10):772.

[责任编辑 聂淑琴]

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of action in blood stasis syndrome of aged rats by Danshen injection. And the change of hemorheology and the components of erythrocyte membrane were studied. **Method:** Thirty Wistar rats which were 70-72 weeks were randomly assigned to Danshen injection high-dose group (drug 4.4 g·kg⁻¹), low-dose group (drug 1.1 g·kg⁻¹) and model group with 10 rats in each group. Another ten younger Wistar rats were as young control group. The related indexes of hemorheology such as the whole blood viscosity, plasma viscosity, the red blood cell deformability and the components of erythrocyte membrane were determined after giving medicine 14 days by intraperitoneal injection. **Result:** Compared with the control group, the whole blood viscosity and plasma viscosity of the model group were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And the red blood cell deformability was decreased significantly under 200 s⁻¹ and 500 s⁻¹ ($P < 0.01$) and 1 000 s⁻¹ ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Danshen injection group was effective. The whole blood viscosity ($P < 0.01$), plasma viscosity ($P < 0.05$), the content of malondialdehyde (MDA) in erythrocyte membrane ($P < 0.01$) were decreased. The red blood cell deformability ($P < 0.01$) and the content of sialic acid, sulfhydryl, superoxide dismutase (SOD) and Na⁺-K⁺-ATPase activity ($P < 0.05$) in erythrocyte membrane were increased. **Conclusion:** Danshen injection can improve the situation of blood stasis through increasing the content of sialic acid and SOD and reducing the content of MDA in erythrocyte membrane. It indicated that the metabolism of lipid was affected, ability of anti-oxidation was enhanced, the content of oxygen radical was decreased and the carrying capacity of negative charge in erythrocyte membrane was improved.

[Key words] aged rats; Danshen injection; hemorheology; erythrocyte membrane

血液流变学改变是血瘀证形成的主要基础。血液流变学异常与红细胞变形能力降低有关。活血化瘀药物大都可以改善血瘀证“浓”、“黏”、“凝”、“聚”状态^[1]。丹参是一味具有临床实用价值和广阔应用前景的活血化瘀中药^[2-3]。研究表明,丹参具有扩张冠状动脉,抑制血小板聚集,降低全血黏度和血浆黏度的作用,从而改善微循环和预防血栓的形成^[4]。然而,目前有关丹参注射液对老年大鼠血液黏度和红细胞膜组分的影响研究无报道。本研究通过观察对大鼠血液流变学指标和红细胞膜组分的影响,从而探讨丹参注射液改善血液流变性的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 Wistar 老龄大鼠 30 只,体重 (495 ± 46) g; 雄性 Wistar 青龄大鼠 10 只,体重 (108 ± 19) g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(黑)2008004。

1.2 受试药物 丹参注射液(正大青春宝药业有限公司,批号 0908262)。

1.3 仪器 Anthos2010 酶标仪(郑州博赛生物工程有限责任公司),722 分光光度计(山东高密分析仪器厂),Beckman 低温超速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司),LBY-N6B 型血液黏度仪、LBY-BX

型红细胞变形仪(均为北京普利生仪器有限公司),TGL-16G 型高速台式离心机(上海医用分析仪器厂),Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),蒸发光散射检测器 ELSD 2000(美国 Alltech 公司)。

1.4 试剂 总胆固醇试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号 11304100),甲醇(色谱纯,美国,迪马技术有限公司),甲醇(分析纯,西陇化工股份有限公司),氯仿(分析纯,天津市化学试剂六厂分厂),胆固醇对照品(美国, Sigma 公司),红细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶试剂盒,唾液酸试剂盒、巯基试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20091104),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20090916)。

2 方法

2.1 分组及给药 30 只老龄大鼠按体重随机分为 3 组,即丹参注射液(按生药量计)高剂量组(4.4 g·kg⁻¹)、丹参注射液低剂量组(1.1 g·kg⁻¹)、模型组,青龄对照组(10 只青龄大鼠)。丹参注射液组 ip 给药,模型组、青龄对照组 ip 同体积蒸馏水(2.96 mL·kg⁻¹),每日 1 次,连续给药 14 d。于第 13 d 给药后禁食不禁水 12 h,次日末次给药后 0.5 h 后以乌拉坦 1 g·kg⁻¹ 麻醉,固定,取血进行指标的测定。

2.2 红细胞膜的制备 取新鲜肝素抗凝血 2 mL 以及枸橼酸钠抗凝血 6 mL。枸橼酸钠抗凝血以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 除去中间的白细胞和血小板层, 以 1:3 加入等渗 pH 7.4 PBS, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 反复洗涤 3 次, 最终得到干净的红细胞。按照 1:80 比例向红细胞中加入预冷的 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4 Tris-HCl 溶液^[5], 同时加入 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂 PMSF (对甲苯磺酰氟), 超声 15 min (80 Hz, 20 °C), 放入 4 °C 冰箱过夜使其充分溶血。红细胞溶血液以 $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 加入 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4 Tris-HCl 溶液以 $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 反复洗涤 3 次, 最后得到乳白色膜, 将其 1:1 悬浮在 PBS 溶液中, 膜蛋白定量后置于低温冰箱备用。

2.3 血液流变学指标检测

2.3.1 全血黏度测定 取肝素抗凝血 1 mL, 用 LBY-N6B 型血液黏度仪测定全血黏度。

2.3.2 血浆黏度测定 取肝素抗凝血 1 mL 离心 ($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 取血浆用于血浆黏度测定。

2.3.3 红细胞压积的测定 取抗凝血 0.5 mL 加入压积管中, 用全自动动态血沉测试仪进行测定。

2.3.4 红细胞变形性的测定 取抗凝血 20 μL , 加入 15% PVP 悬浮液 1 mL 中混匀, 吸取 500 μL 采用型红细胞变形仪进行测定, 剪切参数分别为 200, 500, 1 000 s^{-1} 。

2.4 红细胞膜组分变化

2.4.1 红细胞膜胆固醇含量测定 取制备好的红细胞膜液 0.5 mL, 加入 2.5 mL 提取液 (氯仿: 甲醇 2:1), 向膜液中每加入 0.5 mL 涡旋振荡器剧烈振荡一会, 直至全部加完后, 避光室温静置 2 h, 取下层

有机层 2 mL, 作为供试品溶液, 采用高效液相色谱法进行测定。

2.4.2 红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性测定 采用比色法测定红细胞膜上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。

2.4.3 红细胞膜唾液酸及巯基含量测定 根据试剂盒说明书检测红细胞膜上唾液酸及巯基含量。

2.4.4 红细胞膜 SOD 及 MDA 水平检测 根据试剂盒说明书检测红细胞膜上 SOD 和 MDA 水平。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件处理所得数据, 选用单因素分差分析进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 老龄大鼠血液流变学指标 与青龄对照组比较, 老龄大鼠模型组全血黏度显著升高 ($P < 0.05$), 血浆黏度升高极显著 ($P < 0.01$); 在 200, 500 s^{-1} 切变率下红细胞变形指数均极显著降低 ($P < 0.01$), 1 000 s^{-1} 切变率下红细胞变形指数显著降低 ($P < 0.05$)。丹参注射液高、低剂量组均能够显著降低老年大鼠高、低切变率下的全血黏度及血浆黏度 ($P < 0.05$), 能够明显升高老年大鼠的红细胞变形指数 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 1。

3.2 老龄大鼠红细胞膜组分指标 与青龄对照组比较, 老龄大鼠模型组红细胞膜老龄大鼠红细胞膜上唾液酸含量, SOD 以及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性均降低极显著 ($P < 0.01$), 巯基含量降低显著 ($P < 0.05$), MDA 含量显著增高 ($P < 0.01$)。丹参高剂量组能够显著增加老龄大鼠红细胞膜唾液酸含量和巯基含量 ($P < 0.05$), 低剂量组无明显影响; 丹参注射液能够明显增加红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性 ($P < 0.01$), 提高 SOD 活性 ($P < 0.01$), 降低 MDA 水平 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 丹参注射液对老龄大鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全血黏度/ $\text{mPa}\cdot\text{s}$		血浆黏度 / $\text{mPa}\cdot\text{s}$	红细胞变形指数		
		10 s^{-1}	150 s^{-1}		200 s^{-1}	500 s^{-1}	1 000 s^{-1}
青龄对照	-	8.09 \pm 1.60 ²⁾	3.77 \pm 0.33 ¹⁾	0.95 \pm 0.020 ²⁾	41.4 \pm 1.57 ²⁾	44.5 \pm 2.22 ²⁾	46.1 \pm 2.352 ¹⁾
模型	-	11.88 \pm 2.41	4.42 \pm 0.68	1.06 \pm 0.067	37.9 \pm 1.72	40.8 \pm 1.08	42.2 \pm 1.12
丹参注射液	4.4	9.07 \pm 2.33 ¹⁾	3.81 \pm 0.37 ¹⁾	0.99 \pm 0.044 ¹⁾	39.8 \pm 1.11 ²⁾	42.4 \pm 1.02 ²⁾	44.4 \pm 1.46 ²⁾
	1.1	9.38 \pm 2.72 ¹⁾	3.95 \pm 0.44 ¹⁾	1.01 \pm 0.039 ¹⁾	39.3 \pm 0.79 ¹⁾	42.2 \pm 1.69 ¹⁾	43.5 \pm 1.58 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 丹参注射液对红细胞膜组分指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	唾液酸 /mmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	巯基 /mmol·mg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 /μmolPi·mg ⁻¹ ·h ⁻¹
青龄对照	-	0.583 ± 0.075 ²⁾	6.49 ± 0.341 ²⁾	3.58 ± 0.430 ²⁾	0.355 ± 0.030 ¹⁾	2.08 ± 0.222 ²⁾
模型	-	0.446 ± 0.062	3.68 ± 0.554	4.48 ± 0.609	0.264 ± 0.033	1.40 ± 0.134
丹参注射液	4.4	0.530 ± 0.056 ¹⁾	5.00 ± 0.812 ²⁾	3.68 ± 0.416 ²⁾	0.323 ± 0.064 ¹⁾	1.78 ± 0.214 ²⁾
	1.1	0.463 ± 0.092	4.66 ± 0.944 ¹⁾	3.79 ± 0.539 ¹⁾	0.303 ± 0.034	1.69 ± 0.337 ¹⁾

4 讨论

丹参注射液具有活血化瘀,通脉养心,通络止痛的功效。临床广泛应用于治疗冠心病,心绞痛,心肌梗死,中风后遗症及微循环障碍等相关疾病。丹参注射液有改善血液流体力学,增加血流量,改善循环障碍等多种作用^[6-8]。丹参注射液是一种具有临床实用价值和广阔应用前景的中成药,但在改善血液流变学方面,还未有从红细胞膜组分及功能方面来探讨作用机制的报道。

前期实验研究表明老龄大鼠的全血黏度、血浆黏度以及红细胞变形性等指标均有变化,可以作为天然血瘀模型^[9-11]。因此此次实验仍旧采用老龄大鼠作为血瘀动物模型。实验结果表明,老龄大鼠与青龄大鼠比较,其全血黏度、血浆黏度均高于青年大鼠,红细胞变形能力明显降低;红细胞膜上胆固醇含量,丙二醛含量明显升高,而膜上 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、SOD 活性和唾液酸含量均降低。表明老龄大鼠在高切变率时血液黏度增高与红细胞变形能力降低有关,而红细胞变形能力降低又与红细胞膜上的组分以及酶活性高低有关;在低切变率时黏度增高与红细胞膜上的唾液酸含量等有关,而丹参注射液能够降低老龄大鼠高、低切变率时的全血黏度,改善红细胞的变形性,其机制可能是与降低红细胞膜胆固醇含量、丙二醛含量,升高 SOD 活性、膜上 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、巯基含量、唾液酸含量有关,即影响红细胞膜上脂质代谢,增加抗氧化能力,减少氧自由基生成,维持细胞内外离子浓度和细胞内浓度的相对稳定,以及改善红细胞膜上的电荷。上述研究结果仅是丹参注射液降低血液黏度机制一方面,是否影

响血小板聚集、纤维蛋白原含量方面有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘军莲,宋剑南. 中医血瘀证本质研究概况[J]. 辽宁中医杂志,2006,33(9):1061.
- [2] 陈丽娜,朱晓新. 丹参改善血液流变性的实验研究进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(8):630.
- [3] 方芳,王平珍,邱芸. 中药丹参的临床研究进展[J]. 内蒙古中医药,2012,19:81.
- [4] 杜冠华. 丹参研究进展[C]. 北京:第二届中日韩血瘀证及活血化瘀研究学术大会论文集,2003:21.
- [5] 邵淑娟. 血府逐瘀汤的临床应用及研究进展[J]. 北京中医药,2008,27(9):724.
- [6] 赵敏. 丹参注射液临床应用研究进展[J]. 中国乡村医药杂志,2004,11(4):44.
- [7] 许亚萍,伍旭明. 丹参注射液治疗心血管疾病的研究进展[J]. 中国药业,2012,21(6):90.
- [8] 李伦,刘琳,李传钰,等. 3种活血化瘀药对实验性血瘀证模型大鼠作用的比较研究[J]. 中医药学报,2011,39(6):37.
- [9] 牛雯颖,王鸣慧,肖洪彬,等. 补阳还五汤对老龄大鼠红细胞膜组分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):125.
- [10] 吕建敏,王德军,寿旗扬,等. 老年 SD 大鼠的血液流变学与相关生化指标的研究[J]. 实验动物科学与管理,2005,22(2):1.
- [11] 蔡何青,赵燕平,朱伟玲,等. 拉曼光谱研究丹参注射液对入红细胞膜作用及机制讨论[J]. 中国中药杂志,2012,37(10):1467.

[责任编辑 聂淑琴]