

丹参注射液对老龄大鼠血液流变学指标 和红细胞膜胆固醇的影响

牛雯颖, 袁良杰, 韩翠翠, 姜广坤, 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胆固醇的变化探讨丹参注射液改善老龄大鼠红细胞变形性的作用机制。方法: 70~72 周龄 Wistar 大鼠 30 只, 雌雄各半, 随机分为丹参注射液高剂量组(4.4 g 生药/kg)、低剂量组(1.1 g 生药/kg)和模型组。另外 10 只轻龄大鼠作为轻龄对照组, ip 给药 14 d 后, 取血测定全血黏度、血浆黏度和红细胞变性指数等指标, 并用高效液相色谱法测定红细胞膜胆固醇含量。结果: 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($P < 0.01$)、血浆黏度($P < 0.05$)以及红细胞膜上胆固醇含量($P < 0.01$); 并能明显提高红细胞变形能力($P < 0.01$)。结论: 丹参注射液可能通过减少红细胞膜上的胆固醇含量, 影响红细胞膜上脂质代谢, 是提高红细胞膜变形性, 改善血液黏度的机制之一。

[关键词] 老龄大鼠; 丹参注射液; 血液流变学; 红细胞膜; 胆固醇

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0140-04

Effect of Danshen Injection on Hemorheological Indexes and Cholesterol in Erythrocyte Membrane in Aged Rats

NIU Wen-ying, YUAN Liang-jie, HAN Cui-cui, JIANG Guang-kun, XIAO Hong-bin*
(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the action mechanism of Danshen injection on red blood cell deformability in aged rats. And the change in hemorheological indexes and cholesterol in erythrocyte membrane was studied. **Method:** Thirty Wistar rats (70-72 weeks old) were randomly assigned to Danshen injection high-dose group (4.4 g·kg⁻¹), low-dose group (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 and the red blood cell deformability, were determined while the contents of cholesterol in erythrocyte membrane were determined by HPLC after giving medicine 14 days by intraperitoneal injection. **Result:** Compared with the model group, the Danshen injection group was effective. The whole blood viscosity ($P < 0.01$), plasma viscosity ($P < 0.05$) and the content of cholesterol in erythrocyte membrane ($P < 0.01$) were decreased. And the deformability of erythrocyte ($P < 0.01$) was increased. **Conclusion:** Danshen injection can decrease the content of cholesterol in erythrocyte membrane and affect the metabolism of lipid which maybe one of the mechanism of increasing deformability of erythrocyte and improving the blood viscosity.

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

[收稿日期] 20101014(012)

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金
(20092327110005)

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

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]。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^[3]。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上胆固醇的影响研究无报道。本研究通过观察对大鼠血液流变学指标和红细胞膜胆固醇的影响,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 Wistar 老龄大鼠 30 只(70~72 周龄),雌雄各半,雌性体重 280~360 g,雄性体重 360~455 g;Wistar 轻龄大鼠 10 只,雌雄各半,体重 75~115 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:由正大青春宝药业有限公司生产,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;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,北京普利生仪器有限公司;LBY-BX 型红细胞变形仪,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 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。

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,即丹参注射液高、低剂量组(按生药量计为 4.4,1.1 g·kg⁻¹),模型组,10 只轻龄大鼠作为轻龄对照组。丹参注射液组 ip 给药,模型组、轻龄对照组 ip 同体积蒸馏水(2.96 mL·kg⁻¹),每日 1 次,连续给药 14 d。

2.2 红细胞膜的制备 按照每支试管中血液和肝素 9:1 比例加入肝素,置 37 ℃ 烘干,备用。大鼠颈总动脉取血置于抗凝管中,制成肝素抗凝血 5 mL,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,除去中间的白细胞和血小板层,再以 1:3 比例加入等渗 pH 7.4 PBS,3 000 r·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 mmol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl

溶液^[4],同时加入 0.1 mmol·L⁻¹ 蛋白酶抑制剂 PMSF(对甲苯磺酰氟),超声 15 min(80 Hz,20 ℃),放入 4 ℃ 冰箱过夜使其充分溶血。红细胞溶血液以 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,加入 5 mmol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 溶液以 15 000 r·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 全血黏度的测定 取抗凝血 1 mL,用 LBY-N6B 型血液黏度仪测定全血黏度。

2.3.2 血浆黏度的测定 取抗凝血 1 mL 离心(3 000 r·min⁻¹,10 min),取血浆用于血浆黏度测定。

2.3.3 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 LBY-BX 型红细胞变形仪进行测定,剪切参数分别为 200 s⁻¹,500 s⁻¹,1 000 s⁻¹。

2.4 红细胞膜胆固醇含量测定

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm,美国迪马科技有限公司);流动相甲醇;流速 1 mL·min⁻¹;柱温 25 ℃;检测条件:蒸发光检测器;流速 2 L·min⁻¹;温度 60 ℃;进样量 10 μL。在此条件下,供试品中胆固醇得到较好的分离,不仅其色谱峰的保留时间与对照品一致,而且色谱峰也均经过标准加入法得到了较好的确认。

2.4.2 供试品溶液的制备 取制备好的红细胞膜液 1 mL,加入 5 mL 提取液(氯仿:甲醇 2:1),向膜液中每加入 1 mL 涡旋振荡器剧烈振荡 0.5 min,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。对照品溶液与供试品溶液均自动进样 10 μL,记录峰面积,按外标法计算红细胞膜上胆固醇的含量。

2.4.3 对照品溶液的制备 精密称取胆固醇对照品 7.5 mg 置于量瓶中,以无水乙醇定容,配制成 1.5 g·L⁻¹ 的对照品储备溶液。精确量取适量上述对照品储备液置于量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,分别制成质量浓度为 1.1,0.5,0.4,0.3,0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.4.4 线性关系考察 在 2.4.1 色谱条件下,不同浓度的对照品溶液液相色谱仪自动进样 10 μL 分析,记录色谱峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标,对照品质量浓度 ρ (g·L⁻¹) 为横坐标,得胆固醇的回归方程

及相关系数。

2.4.5 精密密度考察 精密吸取供试品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 按胆固醇峰面积进行计算, RSD 1.38% ($n=6$)。

2.4.6 稳定性试验 精密吸取供试品 10 μL , 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 时进样, 按胆固醇峰面积进行计算, 结果 RSD 2.18%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.7 重复性试验 取红细胞膜样品 6 份, 制备供试品溶液, 仪器自动吸取供试品溶液 10 μL , 按样品测定项下测定, 计算, 结果胆固醇峰面积 RSD 1.5% ($n=6$)。

2.4.8 样品测定 分别吸取对照品溶液和供试品溶液, 进样 10 μL , 按上述 HPLC 色谱条件测定峰面积值, 计算供试品中胆固醇的含量。

2.5 统计学处理 所有数据用 SPSS 软件处理。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对老龄大鼠全血黏度和血浆黏度的影响 与轻龄对照组比较, 老龄大鼠模型组全血黏度和血浆黏度显著升高 ($P < 0.01$); 丹参高、低剂量组均能够显著降低老龄大鼠全血黏度及血浆黏度 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见表 1。

表 2 丹参注射液对老龄大鼠红细胞变形指数和红细胞膜胆固醇含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	红细胞变形指数			胆固醇含量 $/\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
		200 s^{-1}	500 s^{-1}	1 000 s^{-1}	
丹参	4.4	39.8 \pm 1.11 ²⁾	42.4 \pm 1.02 ²⁾	44.4 \pm 1.46 ²⁾	0.540 \pm 0.094 ²⁾
	1.1	39.3 \pm 0.79 ¹⁾	42.2 \pm 1.69 ¹⁾	43.5 \pm 1.58 ¹⁾	0.582 \pm 0.078 ¹⁾
模型	-	37.9 \pm 1.72	40.8 \pm 1.08	42.2 \pm 1.12	0.702 \pm 0.128
轻龄对照	-	41.4 \pm 1.57 ²⁾	44.5 \pm 2.22 ²⁾	46.1 \pm 2.35 ²⁾	0.524 \pm 0.054 ²⁾

4 讨论

研究人员对健康老人的调查显示, 人一旦进入老年期, 都有不同程度的血瘀存在, 血瘀证的检出率和程度随年龄增加而呈递增趋势^[4]。脑血栓、冠心病^[5]、心梗、糖尿病^[6]、高血压等多与血瘀有关, 发病多在更年期以后, 说明老年期是血瘀证的多发年龄段。已有文献报道 18 月龄大鼠较 6 月龄大鼠的全血黏度、血浆黏度明显升高, 电泳指数、刚性指数也显著升高; 同时, 还存在有微循环障碍, 流量明显降低, 说明 18 月龄大鼠接近于天然瘀血状态^[7]。本实验也证实了老龄大鼠可以作为天然血瘀模型进行

表 1 丹参注射液对老龄大鼠全血黏度和血浆黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	全血黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}$		血浆黏度 $/\text{mPa} \cdot \text{s}$
		10 s^{-1}	150 s^{-1}	
丹参	4.4	9.07 \pm 2.33 ²⁾	3.81 \pm 0.37 ¹⁾	0.99 \pm 0.044 ¹⁾
	1.1	9.38 \pm 2.72 ¹⁾	3.95 \pm 0.44 ¹⁾	1.01 \pm 0.039 ¹⁾
模型	-	11.88 \pm 2.41	4.42 \pm 0.68	1.06 \pm 0.067
轻龄对照	-	8.09 \pm 1.60 ²⁾	3.77 \pm 0.33 ²⁾	0.95 \pm 0.020 ²⁾

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

3.2 对老龄大鼠红细胞变形性和红细胞膜胆固醇的影响

3.2.1 胆固醇线性范围的考察 回归方程为 $Y = 4 \times 10^6 \rho - 751 406$, ($r = 0.999 6$)。实验结果表明, 胆固醇进样量在 0.2 ~ 1.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 进样量与峰面积呈良好的线性关系。该方法精密性、重现性和分离效果好, 分析快速准确, 适合于红细胞膜上胆固醇含量的测定。

3.2.2 红细胞变形性和红细胞膜胆固醇含量测定结果 与轻龄对照组比较, 老龄大鼠模型组在 200, 500, 1 000 s^{-1} 切变率下红细胞变形指数均显著降低 ($P < 0.01$), 红细胞膜胆固醇含量显著升高 ($P < 0.01$); 丹参高、低剂量组均能够显著升高老龄大鼠 3 个切变率下的红细胞变形指数 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 并能够明显降低老龄大鼠红细胞膜胆固醇含量 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见表 2。

活血化痰药作用机制的研究。

细胞膜流动性是生物膜结构的一个基本特性, 通常是指细胞膜上膜脂质的运动特性。适宜的膜脂流动性是维持细胞膜正常功能的必要条件, 它与细胞的通透性、信息传递、物质和能量交换等多种功能具有密切的关系。当机体处于病理状态时, 细胞膜的结构和功能发生变化, 膜脂质流动性的变化是其直观的体现^[8]。由于红细胞膜与其他生物膜相同, 其结构以脂质双分子层为基架。胆固醇镶嵌在脂质双层的磷脂尾部之间, 它可以稳定细胞膜, 增加小分子水溶性物质的可通透性。脂质中胆固醇所占的比

例较大,因此在红细胞膜正常结构的维持中胆固醇起了一个至关重要的作用。病理状态下,膜脂组成及流动性均有改变^[9]。据报道胆固醇在心血管疾病的多种危险因子中居首位^[10]。红细胞的变形能力主要取决于红细胞的几何形状、红细胞内液黏度和红细胞的流动性。其中任何一个环节发生异常,均可导致红细胞变形能力的下降^[11-12]。胆固醇是影响红细胞膜变形性的重要因素之一。

丹参注射液是活血化瘀的一个主要药物,有许多有益的心血管效应。近年来被广泛用于治疗冠心病等疾病,并取得较好的疗效^[13]。该药适用于胸痹血瘀症候,如胸闷、心悸、心绞痛,急慢性心肌梗塞,缺血性脑中风,脑梗死或中风后遗症^[14]。采用人工膜研究发现^[15],丹参可以影响人工膜脂质构象,可以调节脂质双层膜的物理状态,改变膜蛋白的脂类环境,改善膜的功能和代谢过程,这对于改善某些疾病状态如冠心病患者的细胞功能有一定作用。红细胞膜胆固醇是红细胞膜中一个动态的组成成分,受到一系列生理、病理和药理条件的影响^[16]。据报道,随着年龄的增加、慢性酒精摄入、女性肥胖、怀孕诱导的高血压和环孢素 A 的摄入,红细胞膜胆固醇增加^[17]。

实验结果表明,丹参注射液能够降低老龄大鼠高、低切变率时的全血黏度和血浆黏度,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有关。此研究为丹参注射液临床合理应用提供实验依据。

[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. 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] 杜冠华. 丹参研究进展[J]. 第二届中日韩血瘀证及活血化瘀研究学术大会论文集[C]. 北京:2003:21.
 [4] 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.
 [5] 杨明. 血府逐瘀汤对稳定型心绞痛患者血液流变学的影响[J]. 中医药导报,2009,15(2):34.
 [6] Nayak B S, Beharry V Y, Armoogam S, et al. Determination of RBC membrane and serum lipid composition in Trinidadian type II diabetics with and without nephropathy [J]. Vasc Health Risk Manag, 2008,4(4):893.
 [7] 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.
 [8] 汲晨锋,肖凤. 青龙衣多糖对 S180 小鼠红细胞膜组分的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2008,24(4):391.
 [9] 权志博,张红秋,李瑛. 血总胆固醇与红细胞变形性测定及其关系探讨[J]. 陕西医学杂志,2004,33(9):804.
 [10] 孙志军,陈晖,李虹伟. 红细胞膜总胆固醇含量——急性冠状动脉综合征的一个新型标志物[J]. 心血管病学进展,2009,30(3):453.
 [11] 毛秉豫. 益气活血对红细胞变形性作用的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(8):25.
 [12] 汪长生,杨解人,桂常青,等. 丹参注射液对大鼠急性心肌缺血及血液流变学的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2002,7(13):30.
 [13] 王燕燕. 丹参注射液治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(5):307.
 [14] 许可. 丹红注射液治疗急性脑梗死临床观察[J]. 河北中医,2008,30(2):191.
 [15] 杜冠华,张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报,2004,23(7):435.
 [16] 张卫光,潘文萧,田珑,等. 大鼠肝硬化形成早期的红细胞电泳率和红细胞膜胆固醇含量改变的研究[J]. 中国血液流变学杂志,2004,14(1):5.
 [17] 刘铁民,刘德云,席文瑞,等. 过度训练对红细胞膜结构和功能影响的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2003,16(1):60.

[责任编辑 聂淑琴]