

补阳还五汤及其有效组分生物碱和苷 对动脉血栓形成大鼠抗凝系统活性的影响

唐映红^{1*}, 梁燕², 张淑萍², 杨静², 邓冰湘², 邓常青²

(1. 湖南中医药大学药学院药理教研室, 湖南长沙 410208;

2. 湖南中医药大学病理生理实验室, 湖南长沙 410007)

[摘要] 目的: 研究补阳还五汤及其生物碱、苷两类有效组分对 FeCl₃ 所致大鼠颈总动脉血栓形成后抗凝血酶 III(AT-III) 和蛋白 C(PC) 活性的影响。方法: 大鼠给药后以 35% FeCl₃ 诱导颈总动脉血栓形成, 以发色底物法测定血浆 AT-III 和 PC 活性。结果: FeCl₃ 可诱导颈总动脉血栓形成。补阳还五汤及其有效组分生物碱、苷可使颈总动脉血栓重量减轻 ($P < 0.05$)。模型组 AT-III 活性低于假手术组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 生物碱组和补阳还五汤原方组 AT-III 活性均显著降低 ($P < 0.01$), 而苷组与模型组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。模型组 PC 活性与假手术组比较有所降低 ($0.10 > P > 0.05$); 与模型组比较, 生物碱组 PC 活性显著降低 ($P < 0.05$), 而苷组和原方组 PC 活性与模型组比较则显著性升高 ($P < 0.01$), 且苷和原方组 PC 活性高于假手术组 ($P < 0.01$)。结论: 补阳还五汤、生物碱和苷可抑制血栓形成。补阳还五汤原方既可能通过与 AT-III 结合而发挥抗凝作用, 又可防止血栓形成后血浆中 PC 的消耗。其有效组分生物碱既可能通过与 AT-III 结合而灭活凝血因子, 又可能促进了 PC 对凝血因子的灭活, 从而发挥抗凝作用。苷的抗血栓可能不是通过 AT-III 和 PC 介导的。

[关键词] 补阳还五汤; 动脉血栓形成; 抗凝血酶 III; 蛋白 C

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0039-04

Effect of Buyang Huanwu Decoction and Its Alkaloid and Glycoside on Anticoagulative System Arterial Thrombosis Rat

TANG Ying-hong^{1*}, LIANG Yan², ZHANG Shu-ping², YANG Jing², DENG Bing-xiang², DENG Chang-qing²

(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Laboratory of Pathophysiology, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Buyang Huanwu Decoction (BHD) and its active fractions such as alkaloid and glycoside on activities of antithrombin III(AT-III) and protein C(PC) after carotid arterial thrombosis induced by ferric chloride in rats. **Methods:** Rats were administered with tested drugs and then left carotid artery was applied with FeCl₃ to form thrombus. The activities of antithrombin III(AT-III) and protein C(PC) in plasma in rats were determined by chromogenic substrate assay. **Results:** BHD, alkaloid and glycoside could decrease thrombotic weight ($P < 0.05$). The activities of AT-III in the model group were significantly lower than those of the sham-operated group ($P < 0.01$). The activities of AT-III in BHD and alkaloid group were markedly lower than those of the model group ($P < 0.01$), No significant difference was found in activities of AT-III between the glycoside and model group ($P > 0.05$). The activities of PC in the model group were slightly lower than those of the sham-operated group ($0.10 > P > 0.05$).

[收稿日期] 2006-09-25

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(204100)和湖南省教育厅重点项目(03A033)

[通讯作者] * 唐映红, Tel: 0731-8458238; E-mail: tyhong 62 @ yahoo. com. cn

Compared with the model group, the activities of PC in alkaloid group were decreased ($P < 0.05$). But the activities of PC in BHD and glycoside group were increased when compared to the model group ($P < 0.01$) and sham group ($P < 0.01$). **Conclusions:** BHD, alkaloid and glycoside could inhibit thrombosis. Antithrombotic actions of BHD may be related to binding with AT-III and it could also prevent the consumption of PC after carotid arterial thrombosis. Antithrombotic action of alkaloid may concern inactivating coagulation factors by binding with AT-III or accelerating inactivation of coagulation factors by PC. Antithrombotic action of glycoside may not be related to AT-III and PC.

[Key words] Buyang Huanwu Decoction; arterial thrombosis; antithrombin-III; protein C

大量研究证明,补阳还五汤对缺血性心脑血管疾病疗效显著。该方在凝血酶诱导的血管内皮细胞(VEC)中,可显著抑制凝血酶诱导的 Von Willebrand 因子(vWF)释放和组织因子(TF)表达,促进一氧化氮(NO)释放,而对组织因子途径抑制物(TFPI)释放无抑制作用^[1];该方还能显著降低血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子高表达^[2]。提示该方具有抗血栓作用,其作用与抑制血小板活化、增强血管内皮细胞的抗血栓功能、抑制凝血亢进、促进纤溶等有关。我们新近研究表明,在大鼠局灶性脑缺血模型,补阳还五汤 4 类有效组分生物碱、多糖、苷、苷元能减少脑梗死体积,改善脑缺血后神经行为症状,其中以生物碱和苷的抗脑缺血作用较强。推测这可能是该方抗缺血性脑损伤的部分药效物质基础^[3]。为此,本文研究了该方及其有效组分生物碱和苷抗动脉血栓形成作用与抗凝系统的关系,旨在进一步明确该方作用的物质基础,阐明其抗血栓作用的特点。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200~250 g。由湖南省卫生防疫站实验动物中心提供,合格证号:医动字第 20-010 号。

1.2 药物与试剂 补阳还五汤原方由黄芪 60 g,赤芍 9 g,川芎 6 g,当归 9 g,地龙 9 g,桃仁 9 g,红花 9 g 组成。上述药物由本院药剂科一次性购齐。按该方组成比例以水提醇沉法提取制备原方提取液(注射液)。取原方提取液,用阳离子交换树脂分离出无机盐、氨基酸,用低极性氯仿萃取低极性物质,再以大孔树脂精制纯化得总苷类,主要含黄芪皂苷类、黄芪黄酮苷类、芍药苷、苦杏仁苷等。原方提取液经阳离子交换树脂精制得生物碱类,主要含川芎嗪等生物碱。各有效组分与原方生药之间的关系为:每 mg 生物碱相当于原方生药 0.12 g;每 mg 苷相当于原方生药 0.005 g。以高效液相色谱法进行分析鉴定,各有效组分分离完全,相互之间无混杂。以高效液相色谱

法测定各有效组分中质控物含量,对其进行质量控制,其中,生物碱中川芎嗪含量为 9.76 mg/g 生物碱;苷中黄芪甲苷含量为 2.39 mg/g 苷,苦杏仁苷含量为 17.9 mg/g 苷。使用时调质量浓度为生物碱 20.9 mg/mL,苷 163 mg/mL。噻氯匹啶购自杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司,0.25 g/片,批号:059。低分子肝素(LMWH)为江苏江山制药有限公司提供,5000 抗 XaIU/mL,批号:2005010。3.8% 枸橼酸钠 35% FeCl₃ 溶液为国产分析纯自配。抗凝血酶 III(AT-III)和蛋白 C(PC)发色底物法活性测定试剂盒,由上海太阳生物技术有限公司提供。

2 方法

2.1 分组、模型制作、给药及检测 大鼠先按性别、体重分层,再随机分成补阳还五汤原方(BHD)组 7.5 g 生药/kg、生物碱(Alkaloid)组 0.209 g/kg、苷(Glycoside)组 1.63 g/kg、低分子肝素(LMWH)组 1 150 IU/kg、噻氯匹啶(Ticlopidine)组 0.03 g/kg、模型(Model)组和假手术(Sham)组,各组于实验前 12 h 给药 1 次,原方组、生物碱组、苷组分别腹腔注射(ip)给药,给药体积 10 mL/kg;低分子肝素组背部皮下注射给药,给药体积 1 mL/kg;噻氯匹啶组灌胃给药,给药体积为 10 mL/kg;模型组和假手术组均 ip 等量生理盐水,给药体积均为 10 mL/kg。手术前同上再给药 1 次。各组大鼠于给药后 15 min 参照 Kurz 法^[4],分离两侧颈总动脉,长度约 2 cm,其下置小片塑料薄膜(4 cm × 1.8 cm)用于保护血管周围组织,于第 2 次给药 1 h 后将吸有 35% 的 FeCl₃ 20 μL 的小片定量滤纸片(1 cm × 1 cm)敷在其上(假手术组敷等量生理盐水滤纸片)制作颈总动脉血栓;右侧颈总动脉穿线备用。30 min 后去滤纸片。去滤纸片 1.5 h 后,于右侧颈总动脉插管取血约 1.8 mL,置于 3.8% 枸橼酸钠溶液抗凝管中,血与抗凝剂体积比为 9:1,4 °C 3 000 r/min 离心 15 min,按试剂盒要求以发色底物法检测血浆 AT-III 活性和 PC 活性。并于取血后

迅速剪下左侧颈总动脉血栓部位血管, 放于滤纸片上吸干余血, 以分析天平测定血栓重量。

2.2 统计分析方法 各组数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 SPSS11.5 版统计软件进行统计。采用单因素方差分析和 q 检验比较各给药组血栓重量和 AT-III 活性的变化。

3 结果

结果见表 1, 模型组颈总动脉有明显的闭塞性血栓形成, 而假手术组无血栓形成。补阳还五汤原方、生物碱、昔、低分子肝素和噻氯匹啉组血栓重量均低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组血栓重量、AT-III 及 PC 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Group	Dose /kg	Thrombus weight (mg)	AT-III 活性 (%)	PC 活性 (%)
Sham	—	0.0 \pm 0.0 ²⁾	122.9 \pm 2.8 ²⁾	113.1 \pm 23.2
Model	—	10.1 \pm 2.7	109.5 \pm 7.4	92.7 \pm 26.2
Alkaloid	0.209 g	7.1 \pm 2.7 ¹⁾	89.1 \pm 3.4 ²⁾	65.8 \pm 21.8 ¹⁾
Glycoside	1.63 g	7.9 \pm 1.4 ¹⁾	107.7 \pm 11.1	157.0 \pm 34.9 ²⁾
BHD	7.5 g	7.67 \pm 2.4 ¹⁾	75.4 \pm 18.8 ²⁾	142.9 \pm 26.3 ²⁾
LMWH	1 150 IU	7.75 \pm 1.8 ¹⁾	47.2 \pm 3.4 ²⁾	166.7 \pm 18.2 ²⁾
Ticlopidine	0.03 g	7.92 \pm 2.8 ¹⁾	105.8 \pm 3.0	113.2 \pm 23.7

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

模型组和各给药组 AT-III 活性显著低于假手术组 ($P < 0.01$)。补阳还五汤原方、生物碱及低分子肝素组 AT-III 活性均显著低于模型组 ($P < 0.01$); 而昔和噻氯匹啉组 AT-III 活性与模型组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

模型组 PC 活性与假手术组比较有所降低 ($0.10 > P > 0.05$); 与模型组比较, 生物碱组 PC 活性显著降低 ($P < 0.05$), 而昔、补阳还五汤原方及低分子肝素组 PC 活性则显著升高 ($P < 0.01$); 噻氯匹啉组与模型组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 与假手术组比较, 生物碱组 PC 活性显著降低 ($P < 0.01$), 而昔、补阳还五汤原方及低分子肝素组则显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

一般认为, 在血栓形成的过程中, 血管内皮细胞损伤或功能异常为其始动因素, 血小板活化为其主要环节, 凝血、抗凝、纤溶系统异常也参与了其病理过程^[5]。其中抗凝系统在参与血栓形成中有重要的作用, 它主要有三个体系: 抗凝血酶系统、蛋白 C 系统和组织因子途径抑制物系统。在体内抗凝系统

中, 抗凝血酶和蛋白 C 系统占主导地位, 它们的减少或缺乏或结构异常可导致血液凝固性增高, 从而引起血栓形成^[6]。因而, 在抗血栓形成的过程中, 提高抗凝血酶和蛋白 C 活性具有重要意义。

本实验表明, FeCl₃ 可造成大鼠颈总动脉血栓形成。由 FeCl₃ 诱导的动脉血栓属于内膜损伤引起血小板粘附、聚集、释放, 致凝血系统激活而形成的混合性血栓, 其成分包括纤维蛋白、激活的血小板以及红细胞^[4]。在本模型中, 血浆 AT-III 活性降低, PC 活性有所降低, 表明该模型存在抗凝系统活性降低的变化。由于我们测定的血浆 AT-III 和 PC 活性反映的是血浆中剩余的 AT-III 和 PC 活性, 因而本模型中 AT-III 和 PC 活性降低可能是由于血栓形成时活化的凝血因子与 AT-III 和 PC 结合, 使 AT-III 和 PC 消耗, 从而使血浆中残存的 AT-III 和 PC 减少所致。

抗凝血酶 III 是由肝脏和血管内皮细胞合成的一种多功能丝氨酸蛋白酶抑制剂, 其抗凝作用占生理抗凝活性的 50% ~ 60%, 它通过与凝血酶和凝血因子 IXa, Xa, XIa, XIIa 等活性中心的丝氨酸残基结合灭活凝血因子的活性。当血液中缺乏肝素时, 抗凝血酶 II 对凝血因子的抑制作用非常弱; 当肝素与抗凝血酶 II 结合后, 可使抗凝血酶 II 对凝血因子的抑制作用增加 1 000 倍。因而肝素的抗凝作用需要依赖于抗凝血酶 III。低分子肝素为抗凝血药, 它与抗凝血酶 II 结合, 促进其灭活凝血酶、Xa 等活化凝血因子的作用, 同时, 抗凝血酶 III 与肝素结合后, 抗凝血酶 II 可作为自杀性底物作用于其靶蛋白酶活性部位, 与其结合成 1:1 的共价复合物, 使肝素抗凝治疗后血浆中抗凝血酶 III 活性降低^[7]。本研究表明, 低分子肝素治疗后使血浆抗凝血酶 III 活性降低, 这是因为低分子肝素抗凝时, 使血浆中抗凝血酶 III 消耗增多, 从而剩余的抗凝血酶 II 减少所致。补阳还五汤原方和生物碱也可使血浆中 AT-III 活性降低, 提示原方和生物碱可能具有类似肝素的作用, 它们可能与 AT-III 结合或可促进 AT-III 与内皮细胞表面的硫酸乙酰肝素结合, 从而促进 AT-III 的抗凝作用, 使 AT-III 消耗增加。而抗血小板药噻氯匹啉对 AT-III 活性则无显著影响, 表明其抗血栓作用的环节可能不是通过抗凝系统实现的, 其抗栓作用与其抑制血小板聚集和释放有关。昔也对 AT-III 活性无显著影响, 表明昔的抗血栓作用可能也不是通过 AT-III 途径介导的。

蛋白 C 系统由凝血酶调节蛋白、蛋白 C(PC) 和蛋白 S(PS) 组成, 具有较强的抗凝活性, 约占全血抗凝活性的 20% ~ 30%^[8]。蛋白 C 是一种维生素 K 依赖蛋白, 平时以无活性酶原形式存在于血浆中, 被激活后通过灭活凝血因子 Va 和 VIIIa 及促进纤维蛋白溶解而发挥抗凝抗栓作用。在一些血栓病患者, 如 DIC, 脑梗塞, 可见到 PC 活性降低, 这可能是在血栓形成时 PC 消耗过多所致^[9]。本文结果表明, 模型组血浆 PC 活性有所降低, 表明本模型由于凝血系统激活, 导致消耗一定的 PC, 从而使血中剩余的 PC 有所降低。低分子肝素可使 PC 活性显著升高, 可能是低分子肝素通过激活 AT-III 途径灭活凝血因子, 从而使 PC 消耗减少所致。原方组 PC 活性也高于假手术组, 呈现出与低分子肝素类似的作用, 其机制可能与肝素类似。生物碱组既可使 AT-III 活性降低, 又可使 PC 活性降低, 推测生物碱中某些成份既具有类似肝素的作用, 又可促进 PC 对凝血因子的灭活, 使血中 PC 消耗增加。噻氯匹啶对 PC 活性无显著影响, 提示其作用与抗凝系统无关。而昔对 AT-III 活性无影响, 但可使血浆 PC 活性升高, 推测昔可能对凝血因子发挥直接的抑制作用, 或通过其它途径促进了凝血因子的灭活, 使血中 PC 消耗减少。但其确切的作用环节及作用成份还有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] 文志斌, 尚改萍, 刘发益, 等. 补阳还五汤对凝血酶诱导血管内皮细胞释放 NO、vWF、TFPI 及表达组织因子的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(4): 313-318.
- [2] 陈利国, 屈援, 葛红颖, 等. 补阳还五汤对血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子表达的影响[J]. 中草药, 2005, 36(5): 706-709.
- [3] 唐映红, 邓常青, 刘旺华, 等. 补阳还五汤 4 类有效部位对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积的影响[J]. 中草药, 2005, 36(2): 236-239.
- [4] Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride[J]. Thromb Res, 1990, 60(4): 269-280.
- [5] 李家增, 贺石林, 王鸿利. 血栓病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 5-16.
- [6] Greaves M. Coagulation abnormalities and cerebral infarction[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993, 56(5): 433-439.
- [7] Fareed J, Hoppensteadt DA. Pharmacology of the low-molecular-weight heparins[J]. Semin Thromb Hemost, 1996, 22(suppl 2): 13-18.
- [8] Esmon CT, Gu JM, Xu J, et al. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway[J]. Haematologica, 1999, 84(4): 363-368.
- [9] 胡嗣基. 蛋白质 C[J]. 生物学通报, 2004, 39(6): 20-21.