

[文章编号] 1007-3949(2002)10-02-0129-03

• 实验研究 •

## 红葡萄酒及白藜三醇对血小板聚集的影响

王志荣<sup>1</sup>, 黄元铸<sup>1</sup>, 邹建刚<sup>1</sup>, 曹克将<sup>1</sup>, 徐以南<sup>1</sup>, 蔡海江<sup>2</sup>, Joseph M. Wu<sup>3</sup>

(南京医科大学 1. 附属第一医院心脏科, 2. 动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029;

3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, New York Medical College, Valhalla, New York 10595, USA)

[主题词] 红葡萄酒; 白藜三醇; 血小板聚集; 高脂血症

[摘要] 观察红葡萄酒及其提取物白藜三醇对离体和在体条件下血小板聚集的影响, 以探讨它们对心血管系统的保护作用机制。以高胆固醇饮食造成实验性高脂血症, 以凝血酶、二磷酸腺苷和胶原为诱导剂, 采用 Born 氏法测定血小板聚集率。结果发现, 高脂饮食明显增加兔血浆胆固醇水平, 并伴有血小板聚集的明显增强。同时给予红葡萄酒、去酒精红葡萄酒和白藜三醇可以消除高脂饮食对兔血小板聚集的增强作用。离体条件下白藜三醇明显抑制凝血酶、二磷酸腺苷及胶原诱导的健康人的血小板聚集。结果提示, 红葡萄酒及白藜三醇均具有抑制血小板聚集的作用, 此作用可能为白藜三醇抗动脉粥样硬化的机制之一。

[中图分类号] R972.6

[文献标识码] A

### Effects of Red Wine and Resveratrol on Platelet Aggregation

WANG Zhi Rong<sup>1</sup>, HUANG Yuan Zhu<sup>1</sup>, ZOU Jian Gang<sup>1</sup>, CAO Ke Jiang<sup>1</sup>, XU Yi Nan<sup>1</sup>, CAI Hai Jiang<sup>2</sup>, and Joseph M. Wu<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, 2. Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, New York Medical College, Valhalla, New York 10595, USA)

[MeSH] Red Wine; Resveratrol; Platelet Aggregation; Hyperlipidemia

[ABSTRACT] **Aim** To explore the cardioprotection mechanism of red wine and resveratrol, the effects of red wine and resveratrol on platelet aggregation both in vitro and in vivo were studied. **Methods** Hypercholesterolemia in rabbits was induced by high cholesterol diet. Platelet aggregation induced by thrombin, ADP and collagen was measured by using Born's method.

**Results** Hypercholesterolemia induced by high cholesterol diet enhanced the platelet aggregation in rabbits. Red wine, de-alcohol red wine or resveratrol were administered orally, which significantly inhibited ADP induced platelet aggregation in rabbits with hypercholesterolemia. In vitro resveratrol significantly inhibited healthy volunteers' platelet aggregation induced by thrombin, ADP or collagen in a concentration dependent manner.

**Conclusions** Red wine and resveratrol can inhibit platelet aggregation both in vitro and in vivo. This may be one of the mechanisms by which resveratrol prevents against atherosclerosis.

九十年代对“法国矛盾现象”的深入研究提示, 中等量饮用红葡萄酒比饮用其他酒精饮料更能有效地减少冠心病的发病率和死亡率, 红葡萄酒中起作用的主要活性物质可能是白藜三醇 (resveratrol, RES)<sup>[1]</sup>。近年来国外研究表明, 白藜三醇是一种很有希望的抗动脉粥样硬化物质。离体研究发现, 白藜三醇具有抑制血小板聚集的作用<sup>[2]</sup>, 但长期口服能否产生相同作用, 白藜三醇对血小板聚集的抑制是否与调节血脂有关等问题尚无文献报道。此外, 国产红葡萄酒中白藜三醇含量如何, 对血小板聚集

有无抑制作用更未见报道。本文就高脂饮食对兔血脂水平、血小板聚集的影响, 口服国产红葡萄酒或白藜三醇的抗血小板聚集作用进行系统研究, 以进一步探讨其在动脉粥样硬化防治中的可能作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

实验用新西兰纯种大白兔由南京种兔厂提供; 二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 和白藜三醇购自 Sigma 公司; 胆固醇为分析纯, 购自上海新兴化工试剂研究所; 红葡萄酒及去酒精红葡萄酒均由连云港市天晴制药集团王府葡萄酒厂提供, 前者为干红葡萄酒, 后者为同一种品牌红葡萄酒经加热蒸发而成; TYXN-91 智能血小板聚集仪为上海通用机电技术研究所生产, 全自动生化分析仪为日本产的 OLYMPUS AU800。

[收稿日期] 2001-08-05 [修回日期] 2002-01-21

[作者简介] 王志荣, 男, 1962 年 10 月出生, 江苏省连云港市人, 博士研究生, 副教授, 副主任医师, 研究方向为白藜三醇抗动脉粥样硬化实验研究。黄元铸, 男, 1935 年 11 月出生, 上海市人, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的防治。邹建刚, 男, 1965 年 9 月出生, 江苏省张家港市人, 博士, 讲师, 副主任医师, 研究方向为白藜三醇抗动脉粥样硬化实验研究和右心室特发性室性心动过速的消融治疗。

### 1.2 白藜三醇含量的测定

由中国药科大学药物分析研究室用岛津 LC-10AT 色谱仪和大连 Hypersil 色谱柱采用高效液相色谱法测定。测定对象为数种市售国产红葡萄酒,测定结果见表 1。

表 1. 几种国产红葡萄酒白藜三醇的含量 (mg/L)。

红葡萄酒品种	白藜三醇
花果山法国兰红葡萄酒	0.87
花果山全汁红葡萄酒	2.91
花果山凯威世纪干红葡萄酒	1.73
花果山凯威干红葡萄酒	2.25
本实验用红葡萄酒	3.98
本实验用去酒精红葡萄酒	3.26
通化干红葡萄酒	1.29
御龙天玺赤霞珠干红葡萄酒	未测到

### 1.3 离体研究

男性健康志愿者 6 人,空腹 12 h 采静脉血,用 0.13 mol/L 枸橼酸钠按 1:9 比例混匀抗凝,500 r/min 离心 5 min,获得富血小板的血浆 (platelet rich plasma, PRP),余血浆以 3 000 r/min 离心 15 min,获得贫血小板的血浆 (platelet poor plasma, PPP)。用 PPP 按比浊法调整 PRP 密度为  $3 \times 10^{11}$ /L。吸取 200  $\mu$ L PRP 置比浊管中,加入不同浓度白藜三醇,终浓度分别为 10、100 及 1 000  $\mu$ mol/L,正常对照组、溶剂对照组和阳性对照组分别加入等量生理盐水、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和阿司匹林 (acetylsalicylic acid, ASA),37  $^{\circ}$ C 温育 5 min 后,加入不同诱导剂 (终浓度分别为凝血酶 330 u/L,ADP 4  $\mu$ mol/L,胶原 5 mg/L),测定 5 min 最大血小板聚集率 (maximum platelet aggregation rate, PARmax)。

表 2. 高脂饮食后血脂水平的改变。

Table 2. The changes in serum lipids after high cholesterol diet ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ , mmol/L)。

Index	Control		Hypercholestermia		RES		Red wine		De alcohol red wine	
	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
TC	2.1 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.7	2.7 $\pm$ 0.8	23.7 $\pm$ 9.7 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.8	20.5 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.5	18.3 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 1.0	17.5 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>
TG	1.9 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.7
HDLc	0.8 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
LDLC	0.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.7	20.6 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.3	17.5 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.6	14.8 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with before high cholesterol diet.

### 2.2 口服白藜三醇对血小板聚集率的影响

### 1.4 动物实验

雄性新西兰纯种大白兔 40 只,平均体重  $2.4 \pm 0.3$  kg,随机分成 3 组,分别为对照组 (正常兔饲料)、高脂血症组 (饲料中含有 1.5% 胆固醇)、红葡萄酒组 [高胆固醇饮食 + 红葡萄酒 4 mL/(kg·d)]、去酒精红葡萄酒组 [高胆固醇饮食 + 去酒精红葡萄酒 4 mL/(kg·d)] 和白藜三醇组 [高胆固醇饮食 + 白藜三醇 4 mg/(kg·d)]。本实验用红葡萄酒中白藜三醇含量为 3.98 mg/L,酒精度为 12% (v/v);去酒精红葡萄酒中白藜三醇含量为 3.26 mg/L。喂养 12 周后,空腹 12 h 采静脉血,用 0.13 mol/L 枸橼酸钠按 1:9 比例混匀抗凝,血小板聚集测定方法同上,诱导剂 ADP 终浓度为 10  $\mu$ mol/L,测定 5 min 最大血小板聚集率。同时用全自动生化分析仪测定血脂水平。

### 1.5 统计学处理

所有实验数据都用  $\bar{x} \pm s$  表示,组内差异比较采用配对  $t$  检验,组间差异比较采用多组资料的方差分析 (两两比较采用  $q$  检验), $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 血脂水平的改变

实验 4 周后,对照组血脂水平无明显变化;高脂血症组血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLc) 均明显升高;红葡萄酒组、去酒精红葡萄酒组及白藜三醇组血清 TC、HDLC 和 LDLc 也明显升高,但与高脂血症组比较无显著性差异,各组甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平均无明显变化 (表 2, Table 2)。

对照组平均血小板聚集率为  $39.51\% \pm 5.86\%$ ,

高脂血症组血小板聚集率(61.02% ± 7.01%)明显升高( $P < 0.001$ );同时给予白藜三醇则使血小板聚集率(35.66% ± 6.34%)维持在对照组水平,但明显低于高脂血症组( $P < 0.001$ )。红葡萄酒组血小板聚集率(45.05% ± 8.95%)与去酒精红葡萄酒组血小板聚集率(43.35% ± 7.64%)无明显差异,均明显低于高脂血症组( $P < 0.001$ )。

### 2.3 白藜三醇对离体血小板聚集率的影响

不同浓度白藜三醇对凝血酶、ADP 和胶原诱导的血小板聚集均有明显的抑制作用,其效能呈剂量依赖性,且与对照组相比均有显著性差异。中、高浓度白藜三醇对凝血酶、ADP 及胶原诱导血小板聚集的抑制作用强于阿司匹林(表 3, Table 3)。

表 3. 白藜三醇对血小板聚集率的影响。

Table 3. The effects of resveratrol on platelet aggregation in healthy subjects ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ , %).

Index	Thrombin	ADP	Collagen
Control	82.9 ± 12.5	64.8 ± 5.1	74.0 ± 4.0
DMSO	74.4 ± 8.4	61.3 ± 3.7	72.2 ± 4.5
RES $1 \times 10^{-5}$ mol/L	64.0 ± 13.9 <sup>a</sup>	55.2 ± 6.2 <sup>a</sup>	60.6 ± 4.8 <sup>a</sup>
RES $1 \times 10^{-4}$ mol/L	43.6 ± 6.3 <sup>b</sup>	46.2 ± 9.3 <sup>b</sup>	47.2 ± 7.1 <sup>b</sup>
RES $1 \times 10^{-3}$ mol/L	30.6 ± 5.2 <sup>b</sup>	15.5 ± 2.3 <sup>b</sup>	26.9 ± 4.3 <sup>b</sup>
ASA	52.5 ± 4.6 <sup>b</sup>	48.8 ± 6.3 <sup>b</sup>	43.9 ± 4.7 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

## 3 讨论

流行病学研究发现,尽管法国人的生活方式中也包含脂肪摄入量高、运动少以及吸烟等危险因素,但罹患冠心病者却非常少,这就是所谓的法国矛盾现象<sup>[1]</sup>。目前研究者们将这一现象归功于法国人每天规律饮用葡萄酒,认为少量或中等量饮用红葡萄酒能减少动脉粥样硬化的发生率<sup>[3]</sup>。白藜三醇是红葡萄酒中发挥心血管保护作用的主要活性物质,它具有多种生物学活性<sup>[2]</sup>,但口服白藜三醇对动脉粥样硬化形成的影响及其作用机制尚未完全明确。本研究结果表明,实验性高脂血症能显著增强血小板聚集,白藜三醇能使高脂血症兔的血小板聚集率维持在正常水平,其抑制作用并不依赖于血脂的降低;国产红葡萄酒含有较高浓度白藜三醇,也能显著抑制高脂血症兔的血小板聚集,其作用不依赖于乙醇。

血脂异常可通过多种途径促进血栓形成。低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)能增强血小板对各种诱导剂的聚集反应,我们的研究也证实了这一点。白藜三醇虽未能降低血浆 LDL 水平,但明显抑制了高脂血症引起的血小板聚集的增强,我们认为这可能归功于白藜三醇的抗氧化活性。白藜三醇能显著抑制 LDL 的氧化修饰<sup>[4,5]</sup>,氧化型 LDL 具有更强的促血小板聚集作用;而且白藜三醇可抑制诱导剂刺激下血小板  $Ca^{2+}$  的内流<sup>[6]</sup>,后者为血小板聚集所必需。

文献[2]报道,不同红葡萄酒中白藜三醇的含量差异颇大,自 0.1 mg/L 至 15 mg/L 不等,白藜三醇的含量与所用葡萄的种类、光照时间及酿造工艺等因素有关,我们对几种国产红葡萄酒进行测定的结果与之相似,部分品牌的国产红葡萄酒中含有较高浓度的白藜三醇,最高者接近 4 mg/L。白藜三醇作为一种植物防御素,存在于多种天然植物中,红葡萄酒中含有相当高的浓度。研究发现,白藜三醇含量高的饮料对人体具有多种益处<sup>[7,8]</sup>,如果证实这些有益作用来自于白藜三醇,必将为动脉粥样硬化性疾病的药物及饮食防治提供新的途径。

总之,本实验结果显示,白藜三醇能显著抑制血小板聚集,口服白藜三醇也能发挥有效作用,而此作用可能为其抗动脉粥样硬化作用机制之一,这也部分解释了红葡萄酒对冠心病的预防作用。

### [参考文献]

- [1] Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000, **66**: 663-673
- [2] Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 1995, **235**: 207-219
- [3] Das DK, Sato M, Ray PS, et al. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp Clin Res*, 1999, **25**: 115-120
- [4] Zou JG, Huang YZ, Chen Q, et al. Resveratrol inhibits copper ion induced and azo compound initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. *Biochem Mol Biol Int*, 1999, **47**: 1 089-096
- [5] 邹建刚, 黄元铸, 陈琪, 等. 白藜三醇对人低密度脂蛋白氧化修饰的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 13-16
- [6] Dobrydneva Y, Williams RL, Blackmore PF. Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br J Pharmacol*, 1999, **128**: 149-157
- [7] Freedman JE, Parker C, Li L, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circ*, 2001, **103**: S2 792-798
- [8] Keevil JG, Osman HE, Reed JD, et al. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr*, 2000, **130**: 53-56

(此文编辑 文玉珊)