

血府逐瘀胶囊对内皮损伤大鼠血栓弹力图的影响

王宏, 康利, 王蕾

(天津市医药科学研究所 心脑血管药物研发中心, 天津市 300020)

[关键词] 血府逐瘀胶囊; 同型半胱氨酸; 血管内皮损伤; 血栓弹力图

[摘要] **目的** 研究血府逐瘀胶囊对高同型半胱氨酸诱导的内皮损伤大鼠血栓弹力图(TEG)的影响。**方法** SD大鼠随机分为6组:空白对照组、模型对照组、通心络胶囊0.21 g/kg组、血府逐瘀胶囊1.6、0.8和0.4 g/kg组。2 g/kg蛋氨酸灌胃造模,1次/天,连续4周。造模同时,各治疗组分别灌胃给予相应药物。给药结束后测定大鼠血清同型半胱氨酸(Hcy)、内皮素1(ET-1)和血浆一氧化氮(NO)水平、血小板数目及平均血小板体积(MPV),枸橼酸钠抗凝测TEG。**结果** 血府逐瘀胶囊各剂量组均能降低大鼠血清Hcy和ET-1水平($P<0.01$),0.8 g/kg组能够显著升高血浆NO和MPV,降低血小板数目($P<0.05$)。血府逐瘀胶囊1.6 g/kg组R值明显升高($P<0.05$),MA值显著降低($P<0.01$);血府逐瘀胶囊0.8 g/kg组R值明显升高,Angle和MA值显著降低($P<0.01$);血府逐瘀胶囊0.4 g/kg组MA值明显降低($P<0.01$)。**结论** 血府逐瘀胶囊能够明显缓解内皮损伤大鼠血小板功能亢进及高凝血因子状态,对高同型半胱氨酸诱导的血管内皮损伤具有保护作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Influence of Xuefuzhuyu Capsule on Thrombelastography in Rats with Vascular Endothelial Injury

WANG Hong, KANG Li, and WANG Lei

(Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences & Cardiovascular Drugs Research and Development Center, Tianjin 300020, China)

[KEY WORDS] Xuefuzhuyu Capsule; Homocysteine; Vascular Endothelial Injury; Thrombelastography

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of Xuefuzhuyu capsule on thrombelastography (TEG) in rats with vascular endothelial injury induced by homocysteine (Hcy). **Methods** SD rats were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, Tongxinluo capsule 0.21 g/kg group, Xuefuzhuyu capsule 1.6, 0.8 and 0.4 g/kg groups. Rat endothelial injury models were established by intragastric gavaged of methionine once per day for continuous 4 weeks. Meanwhile, each treated group was intragastric gavaged of corresponding drug. After 4 weeks, serum levels of Hcy and endothelin-1 (ET-1), plasma level of nitric oxide (NO), platelet (PLT) number and mean platelet volume (MPV), as well as TEG were detected. **Results** All doses of Xuefuzhuyu capsule could significantly reduce the serum levels of Hcy and ET-1 ($P<0.01$), increase the plasma level of NO and MPV, and lower the number of PLT number, with statistical significances in 0.8 g/kg group ($P<0.05$). All doses of Xuefuzhuyu capsule could significantly reduce MA ($P<0.01$), the R of 1.6 and 0.8 g/kg groups were significantly prolonged ($P<0.01$ or $P<0.05$), the Angle of 0.8 g/kg group showed significant decrease ($P<0.01$). **Conclusion** Xuefuzhuyu capsule can relieve the state of platelet hyper function and high coagulation factor, and attenuate high Hcy induced injury in rats.

高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)是动脉粥样硬化的独立危险因素,其中HHcy诱导的血管内皮损伤是重要的始动环节^[1-2]。血府

逐瘀胶囊由桃仁(炒)、红花、赤芍、川芎、枳壳(麸炒)、柴胡、桔梗、当归、地黄、牛膝、甘草共11味药材组成,具有活血祛瘀、行气止痛的功效,临床广泛

[收稿日期] 2015-07-17

[修回日期] 2015-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81202801)

[作者简介] 王宏,硕士,研究实习员,主要从事心脑血管药理研究,E-mail为 wh19860906@126.com。康利,研究实习员,主要从事心脑血管药理研究。通讯作者王蕾,硕士,副研究员,主要从事心脑血管药理研究,E-mail为 zws9905@sina.com。

用于心脑血管疾病的治疗^[3-4],但其对 HHcy 致血管内皮损伤的作用研究鲜有报道。血栓弹力图(thrombelastography, TEG)能够完整地监测从凝血开始至血凝块形成以及纤维蛋白溶解的全过程,越来越多地应用于抗栓治疗领域^[5]。本研究通过蛋氨酸灌胃法复制 HHcy 诱导大鼠内皮损伤,着重从 TEG 角度研究血府逐瘀胶囊对大鼠血管内皮损伤的保护作用,为该药进一步应用于临床提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物

SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重 180~200 g,购自中国军事医学科学院卫生学环境医学研究所实验动物中心,许可证号:SCXK(军)2014-0001。

1.2 药物与试剂

血府逐瘀药粉由天津宏仁堂药业有限公司提供;通心络胶囊购自石家庄以岭药业股份有限公司;蛋氨酸购自天津天药药业股份有限公司;同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)试剂盒购自长春汇力生物技术有限公司;内皮素 1(endothelin-1, ET-1)试剂盒购自北京北方生物技术研究;一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒购自普利莱基金技术有限公司;活化凝血检测试剂盒、Disposable Cups and Pins 购自唯美血液技术医疗器材(上海)国际贸易有限公司。

1.3 模型复制

除空白对照组外,大鼠灌胃给予 2 g/kg 蛋氨酸造模,1 次/天,4 周后取血检测 Hcy 水平,选用 Hcy 10 μmol/L 以上者进行实验^[6]。

1.4 分组与给药

大鼠适应性饲养 7 天后,随机分为 6 组:空白对照组、模型对照组、通心络胶囊 0.21 g/kg 组、血府逐瘀胶囊 1.6、0.8 和 0.4 g/kg 组,每组 10 只。各治疗组灌胃给予相应的受试药物,空白对照组给予等体积溶媒对照,1 次/天,共 4 周。

1.5 血清 Hcy、ET-1 和血浆 NO 水平测定

末次给药 1 h 后,4.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉取血。取 4 mL 血置于离心管中,静置 30 min 后,2500 r/min 离心 10 min 取血清,酶联免疫吸附法检测 Hcy、ET-1 水平;取 2 mL 血置于 EDTA 抗凝管中,2500 r/min 离心 10 min 取血浆,酶联免疫吸附法检测 NO 水平。严格按照试剂盒说明书操作。

1.6 血小板数目和平均血小板体积检测

取 10 μL 血置于 1.7 mL 血球稀释液中,血液分析仪检测血小板(platelet, PLT)数目及平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)。

1.7 血栓弹力图测定

取 1 mL 枸橼酸化的全血与活化凝血检测试剂混匀备用,先加 20 μL 0.2 mol/L 氯化钙,再吸取 340 μL 备用血样于 TEG 分析仪预热的杯中,进行 TEG 检测。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血府逐瘀胶囊对大鼠血清 Hcy、ET-1 及血浆 NO 水平的影响

与空白对照组相比,模型对照组在灌服蛋氨酸 4 周后血清 Hcy 和 ET-1 水平明显升高,血浆 NO 水平显著降低($P < 0.01$)。与模型对照组相比,血府逐瘀胶囊各剂量组血清 Hcy、ET-1 水平显著降低($P < 0.01$),0.8 g/kg 组血浆 NO 水平明显升高($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 血府逐瘀胶囊对大鼠血清 Hcy、ET-1 及血浆 NO 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1. Effect of Xuefuzhuyu capsule on rat serum Hcy, ET-1 and plasma NO($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	Hcy (μmol/L)	ET-1 (ng/L)	NO (μmol/L)
空白对照组	10.9±1.0	36.5±16.1	53.4±10.9
模型对照组	77.0±27.9 ^b	90.7±24.5 ^b	33.9±5.3 ^b
通心络胶囊组	37.6±14.1 ^{bd}	37.4±18.4 ^d	53.0±11.7 ^d
血府逐瘀胶囊 1.6 g/kg 组	27.2±8.3 ^d	43.7±14.0 ^d	41.1±7.1 ^a
0.8 g/kg 组	23.7±9.9 ^d	36.8±9.2 ^d	45.8±11.4 ^c
0.4 g/kg 组	30.9±6.9 ^{ad}	47.0±20.4 ^d	41.5±3.3 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较。

2.2 血府逐瘀胶囊对血小板参数的影响

与空白对照组相比,模型对照组血小板数目明显降低,MPV 显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组相比,血府逐瘀胶囊 0.8 g/kg 组血小板数目升高,MPV 降低($P < 0.05$;图 1)。

2.3 血府逐瘀胶囊对大鼠 TEG 的影响

血栓弹力图是反映血液凝固动态变化的指标,其中, R 表示形成首个明显的血凝块所需时间,

Angle 反映血凝块聚合速率,MA 反映血凝块的最大强度。与空白对照组相比,模型对照组 R 值明显缩短($P<0.01$),Angle 和 MA 值显著增大($P<0.01$),说明模型对照组大鼠血液处于血小板功能亢进及高凝血因子状态。与模型对照组相比,血府逐瘀胶囊 1.6 g/kg 组 R 值明显升高($P<0.05$),MA 值显著降低($P<0.01$);血府逐瘀胶囊 0.8 g/kg 组 R 值明显升高,Angle 和 MA 值显著降低($P<0.01$);血府逐瘀胶囊 0.4 g/kg 组 MA 值明显降低($P<0.01$;图 2 和表 2)。

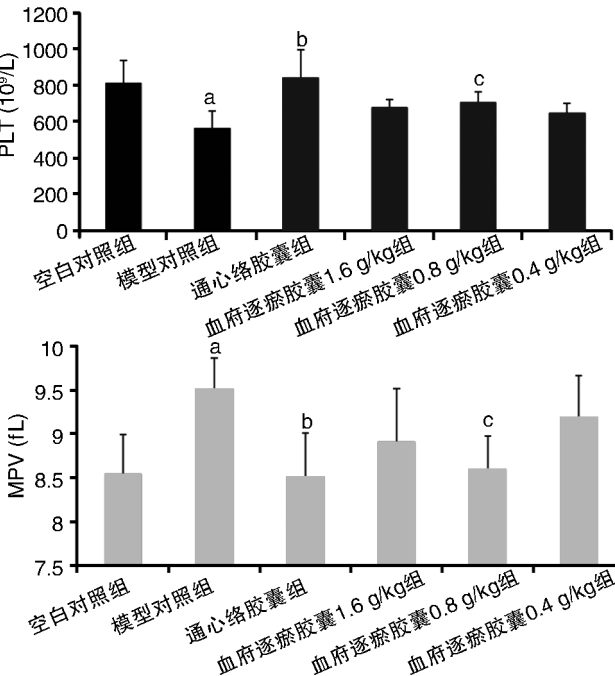


图 1. 血府逐瘀胶囊对大鼠血小板参数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
a 为 $P<0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与模型对照组比较。

Figure 1. Effect of Xuefuzhuyu capsule on rat PLT parameters($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

表 2. 血府逐瘀胶囊对大鼠 TEG 中 R、Angle 和 MA 值的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2. Effect of Xuefuzhuyu capsule on the values of R, Angle and MA in the TEG of rats($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

分 组	R(min)	Angle(°)	MA(mm)
空白对照组	2.13±0.09	65.07±2.09	66.07±3.37
模型对照组	1.17±0.05 ^a	85.27±0.46 ^a	80.67±0.90 ^a
通心络胶囊组	2.03±0.12 ^c	76.70±1.50 ^c	71.13±0.42 ^c
血府逐瘀胶囊 1.6 g/kg 组	1.50±0.08 ^b	83.40±0.51	77.20±0.08 ^c
血府逐瘀胶囊 0.8 g/kg 组	1.77±0.12 ^c	81.73±1.11 ^c	75.03±0.29 ^c
血府逐瘀胶囊 0.4 g/kg 组	1.27±0.09	84.53±0.49	78.13±0.45 ^c

a 为 $P<0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与模型对照组比较。

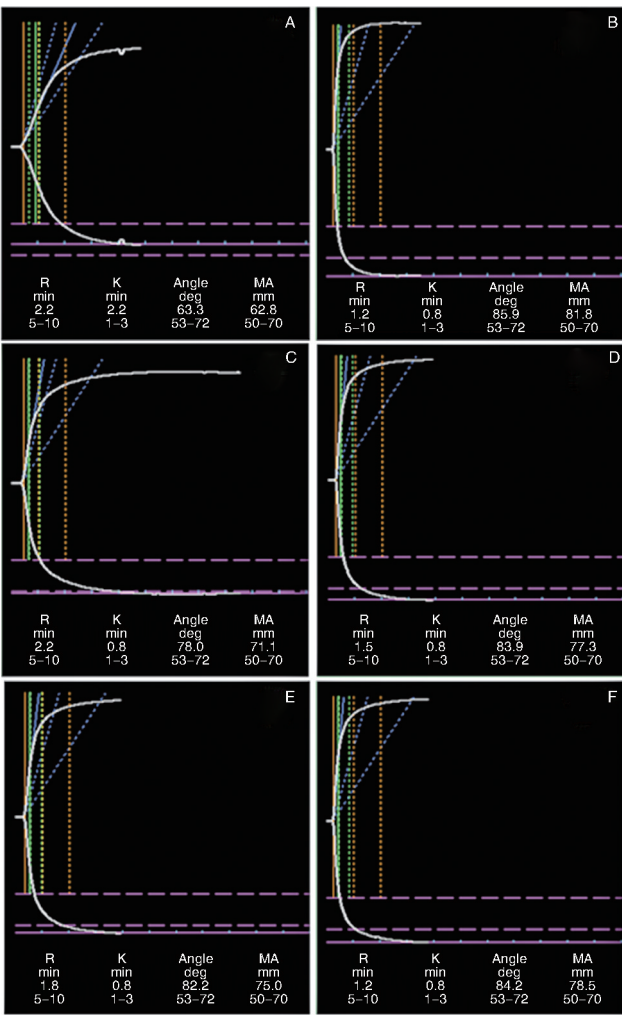


图 2. 血府逐瘀胶囊对大鼠 TEG 的影响 A 为空白对照组, B 为模型对照组,C 为通心络胶囊组,D 为血府逐瘀胶囊 1.6 g/kg 组,E 为血府逐瘀胶囊 0.8 g/kg 组,F 为血府逐瘀胶囊 0.4 g/kg 组。

Figure 2. Effect of of Xuefuzhuyu capsule on TEG of rats

3 讨 论

血府逐瘀胶囊来自清代王清任《医林改错》一书中的血府逐瘀汤,是活血化瘀代表方之一。近年来的临床和药理研究表明,血府逐瘀胶囊对冠心病、缺血性脑血管病、动脉粥样硬化等疾病效果明显^[3-4,7]。且已知内皮细胞结构和功能的改变是上述疾病的共同病理基础,因此,本研究通过复制大鼠内皮损伤模型,着重从 TEG 角度研究血府逐瘀胶囊对大鼠血管内皮损伤的保护作用。

研究表明,通心络胶囊具有明确的血管内皮保护作用^[8-9]。本研究选用通心络胶囊作为阳性对照药,不仅可以检验实验体系的可靠性,还能估计血府逐瘀胶囊与其相比在作用强度和特点上的差异。

Hcy 是蛋氨酸代谢的中间产物。短期大量摄入蛋氨酸会引起血 Hcy 升高,血管内皮细胞收缩和脱落,导致血管内皮损伤^[10-11]。本研究采用蛋氨酸灌胃法复制大鼠内皮损伤模型。生理状态下,血管内皮细胞合成和分泌的 NO 和 ET-1 处于动态平衡之中,共同维持血管张力。当血管内皮细胞受损时,NO 的生成和释放减少,ET-1 增多,血管收缩加强,舒张功能下降^[12]。血府逐瘀胶囊可明显降低 HHcy 大鼠 ET-1 水平,显著升高 NO 水平,从而改善血管的舒缩功能。

血小板数目反映血小板生成和衰亡的动态平衡,MPV 反映骨髓造血功能及骨髓中巨核细胞增殖、代谢和血小板的生成情况。当血管内皮受到破坏时,内壁粗糙,血小板易于黏附聚集,破坏增多,血小板减少,从而刺激骨髓巨核细胞再生增强,释放大大小不等的大体积血小板,MPV 增大^[13]。本研究中模型对照组大鼠血小板数目明显降低,MPV 显著升高。血府逐瘀胶囊可使血小板数目升高,MPV 降低,改善模型大鼠血小板参数的变化。

TEG 是反映血液凝固动态变化的指标,能从一份血样完整地监测从凝血开始至血凝块形成以及纤维蛋白溶解的全过程。对凝血因子、纤维蛋白原、血小板聚集功能以及纤维蛋白溶解等方面进行凝血全貌的检测和评估,结果不受肝素类物质的影响。监测 TEG,对于指导药物治疗(如溶栓、抗凝和抗血小板治疗等)、判断疗效和评估预后均有重要意义^[14]。TEG 作为传统凝血检测的重要补充,越来越多地应用于临床抗栓治疗^[5,15]。但其在动物实验及内皮损伤的基础研究中应用较少。本研究通过复制 HHcy 模型诱导大鼠内皮损伤,血管内皮受损时会破坏正常的凝血机制,促进血栓形成。结果显示,模型对照组大鼠 R 值明显缩短,Angle 和 MA 值显著增大,大鼠血液处于血小板功能亢进及高凝血因子状态。血府逐瘀胶囊 0.8 g/kg 组 R 值明显升高,Angle 和 MA 值显著降低,说明血府逐瘀胶囊能够缓解模型大鼠血液的高凝固性。

血府逐瘀胶囊各剂量组能够不同程度地抑制 HHcy 引起的 NO 降低,ET-1 升高,血小板减少和 MPV 增大,改善大鼠血液血小板功能亢进及高凝血因子状态。提示血府逐瘀胶囊具有保护血管内皮,防治动脉粥样硬化等疾病的作用,具有广泛的临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke; a meta-analysis [J]. JAMA, 2002, 288 (16): 2 015-020.
- [2] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (8): 272-276.
- [3] 姜华,姜玉姬. 3 种中药复方血清对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症因子 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (10): 985-988.
- [4] 唐汉庆,赵善民,黄俊杰,等. 血府逐瘀汤对冠心病血瘀模型家兔心功能、心肌及血管的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (2): 165-169.
- [5] 于立研,王华亭,宋辉,等. H 型高血压患者颈动脉粥样硬化程度与血栓弹力图及危险因素的相关性[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19 (12): 1 163-168.
- [6] 中国高血压防治委员会. 中国高血压防治指南 2010 年修订版 [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2011, 3 (5): 42-91.
- [7] 周波. 血府逐瘀汤加减配合功能锻炼治疗中风后遗症临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (6): 1 724-726.
- [8] 吴琳,刘勇,熊肇军,等. 通心络胶囊对同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (5): 385-389.
- [9] Liang JQ, Wu K, Jia ZH, et al. Chinese medicine Tongxinluo modulates vascular endothelial function by inducing eNOS expression via the PI3K/Akt/HIF-dependent signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133 (2): 517-523.
- [10] 朱琳,王彦军,俞天虹,等. 红景天苷通过抑制内质网应激减少高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (1): 5-10.
- [11] Sharma S, Singh M, Sharma PL. Mechanism of hyperhomocysteinemia-induced vascular endothelium dysfunction-possible dysregulation of phosphatidylinositol-3-kinase and its downstream phosphoinositide dependent kinase and protein kinase B [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 721 (1-3): 365-372.
- [12] Boutique SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature; new perspectives [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 300 (6): R1288.
- [13] Chu SG, Becker RC, Berquer PB. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8 (1): 148-167.
- [14] 蔡毅,崔华,范利. 血栓弹力图研究进展概况[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16 (11): 1 217-218.
- [15] Huang RS, McDonald MM, Wetzel JS, et al. Clot strength as measured by thrombelastography correlates with platelet reactivity in stroke patients [J]. Ann Clin Lab Sci, 2015, 45 (3): 301-307.

(此文编辑 文玉珊)