

复方血栓通胶囊抗血栓作用的实验研究

聂勇胜,文思,刘静,黄萍*,吴清和,操红缨
(广州中医药大学,广州 510006)

[摘要] 目的:研究复方血栓通胶囊的抗血栓作用。方法:将大鼠随机分为模型对照组、复方血栓通胶囊低、中、高剂量组(0.375,0.75,1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)、阿司匹林肠溶片组(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹),灌胃给药,每天1次,连续7 d。末次给药1 h后,建立大鼠下腔静脉血栓模型和动-静脉旁路血栓模型,观察复方血栓通胶囊对血栓湿重、干重及血栓形成抑制率的影响;将大鼠按上述方法分组,建立颈总动脉血栓溶栓模型,从造模当天开始灌胃给药,每天1次,连续5 d,末次1 h后取大鼠血栓,观察复方血栓通胶囊对血栓湿重及溶栓率的影响;将大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、复方血栓通胶囊低、中、高剂量组、阿司匹林肠溶片组,采用皮下注射盐酸肾上腺素联合冰浴、减少喂食的方法建立大鼠急性血瘀模型,造模期间同时灌胃给药,每天1次,连续7 d,第8 d造模成功,灌胃给药1 h后,观察复方血栓通胶囊对大鼠凝血时间(CT)、凝血酶时间(TT)及血小板聚集功能的影响。结果:与正常组比较,模型组CT,TT显著缩短($P<0.01$),血小板聚集能力显著提高($P<0.01$);与模型组比较,复方血栓通胶囊组大鼠下腔静脉、动-静脉旁路血栓的湿重和干重减轻($P<0.05\sim P<0.01$),颈总动脉血栓的湿重减轻($P<0.05$),CT和TT延长($P<0.05\sim P<0.01$),血小板聚集能力降低($P<0.05$)。结论:复方血栓通胶囊具有抗血栓作用,其机制可能与改善凝血功能、血小板聚集功能有关。

[关键词] 复方血栓通胶囊; 抗血栓; 凝血功能; 血小板聚集

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0178-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014080178

Study on Antithrombotic Effect of Fufang Xueshuantong Capsule

NIE Yong-sheng, WEN Si, LIU Jing, HUANG Ping*, WU Qing-he, CAO Hong-ying
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antithrombotic effect of Fufang Xueshuantong capsule. **Method:** The rats were randomized into model group, low, moderate and high dosages (0.375, 0.75, 1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) groups of Fufang Xueshuantong capsule and aspirin enteric-coated tablets (50 mg·kg⁻¹·d⁻¹) group, each group was ig administrated once every day for 7 days. One hour after the last administration, the vena cava inferior thrombus model and carotid arterio-venous bypass thrombus model were built, the effect of Fufang Xueshuantong capsule on wet weight and dry weight of thrombus, and thrombogenesis-inhibition rate in rats were observed. The carotid artery thrombus model was established, meanwhile intragastric administration lasted 5 days. After the last administration, the effect of Fufang Xueshuantong capsule on wet weight and thrombogenesis-inhibition rate in rats were observed. The rats were given subcutaneous injection of epinephrine, ice-bath and reducing feeding was used to establish acute blood stasis model. The effect of Fufang Xueshuantong capsule on clotting time (CT), thrombin time (TT), and platelet aggregation function of rats was observed. **Result:** Compared with normal group, CT and TT of model group were decreased ($P<0.01$), the function of platelet aggregation was increased ($P<0.01$). Compared with model group, Fufang Xueshuantong capsule could decrease wet weight and dry weight of vena cava inferior thrombus and carotid arterio-venous bypass thrombus, reduce wet weight of carotid artery thrombus ($P<$

[收稿日期] 20130802(013)

[第一作者] 聂勇胜,硕士研究生,Tel:15918727744,E-mail:ronynie@163.com

[通讯作者] * 黄萍,教授,博士生导师,从事中药复方药理研究工作,Tel:020-39358086,E-mail:hping@gzucm.edu.cn

0.05, $P < 0.01$), prolong CT and TT ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and inhibit platelet aggregation of rats ($P < 0.05$). **Conclusion:** Fufang Xueshuantong capsule exhibits an evident antithrombotic effect probably through conditioning the coagulation function and platelet aggregation function.

[**Key words**] Fufang Xueshuantong capsule; antithrombus; blood clotting function; platelet aggregation

复方血栓通胶囊由三七、黄芪、丹参、玄参组成,具有活血化瘀、益气养阴的功效,临床上主要用于血瘀兼气阴两虚证的视网膜静脉阻塞和稳定性劳累型心绞痛^[1]。血栓性疾病常伴有血液黏度增高,凝血时间缩短,血小板聚集活性增高等现象^[2-3]。本实验通过建立多种血栓及血液模型,研究复方血栓通胶囊抗血栓作用及其机制。

1 材料

1.1 药物 复方血栓通胶囊,由合作方广东众生药业股份有限公司提供,批号 111219,全方由三七、黄芪、丹参、玄参组成,每粒胶囊含内容物 0.5 g。复方血栓通胶囊的制法及处方中各药味比例由于涉及企业机密,合作方暂时未提供。复方血栓通胶囊质控标准为每粒胶囊含三七以人参皂苷 R_{g1} ($C_{42}H_{72}O_{14}$)、人参皂苷 R_{b1} ($C_{54}H_{92}O_{23}$) 和三七皂苷 R_1 ($C_{47}H_{80}O_{18}$) 三者的总量计,不得少于 9.0 mg。阿司匹林肠溶片(批号 BJ04316)。

1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠,200 ~ 240 g,雌雄各半,购自广州中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK(粤)2008-0020。

1.3 试剂 水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20111114),氯化铁(天津市大茂化学试剂厂,批号 20111103),硫酸庆大霉素(天津药业焦作有限公司,批号 10092022),盐酸肾上腺素注射液[远大医药(中国)有限公司,批号 111102],肝素钠(Sigma,批号 20110725),枸橼酸钠(天津市大茂化学试剂厂,批号 20111219),胶原(批号 3414, Sysmex Corporation)凝血酶时间测定试剂盒(批号 41168),氯化钙溶液(批号 539472)均为 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH。

1.4 仪器 560CA 血小板聚集仪(Chrono-Log Corporation),CA-1500 全自动凝血分析仪(Sysmex Corporation),DGX-924513-2 烘箱(上海福玛实验设备有限公司),EL204 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响^[4] 取 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 240 g,随机分为模型对照组、阿司匹林肠溶片组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、复方血

栓通胶囊低、中、高剂量组($0.375, 0.75, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 10 只。灌胃给药,每天 1 次,连续 7 d,模型对照组给予等容积蒸馏水。末次给药 1 h 后,10% 水合氯醛麻醉,仰卧位固定,剖开腹壁,分离下腔静脉,于左肾静脉与下腔静脉交叉处结扎下腔静脉,缝合腹壁 6 h 后重新打开腹腔,在结扎下方 2 cm 处夹闭血管,剖开管腔,取出栓子,用滤纸吸去残余血液后用电子天平称湿重,再将栓子放在烘箱中,70 ℃ 烘 2 h 后称干重。按下式计算血栓形成抑制率。

$$\text{血栓形成抑制率} = \frac{\text{模型对照组血栓重} - \text{给药组血栓重}}{\text{模型对照组血栓重}} \times 100\%$$

2.2 对大鼠动-静脉旁路血栓形成的影响 分组方法、每组动物数、给药方法、剂量及给药时间同 2.1。于末次给药 1 h 后,10% 水合氯醛麻醉,将大鼠仰卧位固定,颈部剪毛,常规碘酒乙醇消毒,沿颈前正中线做长约 3 cm 切口,分离右颈总动脉和左颈外静脉,以聚乙烯管作动静脉搭桥(动静脉搭桥由 4 部分组成:动脉端 8 cm,内径 0.9 mm,静脉端 8 cm,内径 0.9 mm,中间接头段长 6 cm,内径 1.5 mm,中段放入一根长 5 cm 精密称重的棉线),管内充满 0.1% 肝素生理盐水溶液,将颈总动脉和颈外静脉远心端结扎,用动脉夹夹住近心端,将聚乙烯管插入已分离出的右颈总动脉,然后再将聚乙烯管的另一端插入左颈外静脉,打开动脉夹,血液从右颈动脉经聚乙烯管流入左颈外静脉。开放血流 15 min 后,迅速取出棉线称血栓湿重,再将栓子放在烘箱中,70 ℃ 烘 2 h 后称血栓干重。按 2.1 中公式计算血栓形成抑制率。

2.3 对大鼠颈总动脉血栓溶栓的影响^[5] 取 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 240 g,水合氯醛麻醉,分离左颈总动脉。铺展薄膜(3 cm × 2 cm)隔离颈总动脉与周围组织。将吸有 20 μL FeCl_3 溶液的小片滤纸(1 cm × 1 cm)包裹左颈总动脉,30 min 后去除纸片,生理盐水清洗后缝合颈部,滴注硫酸庆大霉素。分组方法、每组动物数及给药剂量同 2.1。灌胃给药,每天 1 次,连续 5 d,模型对照组给予等容积蒸馏水。末次给药 1 h 后,10% 水合氯醛麻醉,仰卧位固定,剪取血栓段血管 1 cm,称重。剖开血管,除

去管内血栓后再称取血管壁的质量。按下式计算血栓质量和血栓溶栓率。

血栓质量 = 血栓和血管壁的质量 - 血管壁的质量

$$\text{血 栓 溶 栓 率} = \frac{\text{模型对照组血栓重} - \text{给药组血栓重}}{\text{模型对照组血栓重}} \times 100\%$$

2.4 对急性血瘀大鼠凝血时间(CT)、凝血酶时间(TT)的影响^[2] 取 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 240 g,随机分为正常对照组、模型对照组、阿司匹林肠溶片组、复方血栓通胶囊低、中、高剂量组,每组 10 只,给药剂量同 **2.1**。灌胃给药,每天 1 次,连续 7 d,对照组给予等容积蒸馏水。正常对照组给予饲料 30 g/只/d,其余各组给予饲料 10 g/只/d(为正常组的 1/3),并每天置于(100 cm × 100 cm × 90 cm)水池中强迫游泳至出现下沉时停止。于第 7 d,大鼠按 0.08 mL/100 g 的量皮下注射盐酸肾上腺素,2 h 后将大鼠放入冰水中进行冷刺激 5 min,2 h 后再次皮下注射 0.1% 盐酸肾上腺素(0.08 mL/100 g)。次日即可形成急性血瘀模型。

大鼠急性血瘀模型形成当天,灌胃给药,1 h 后用乙醚将大鼠麻醉,自眼底静脉丛取血,用玻片法测定凝血时间(CT)。以 3.8% 枸橼酸钠溶液与全血按 1:9 比例混匀,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取血浆,用全自动凝血分析仪检测凝血酶时间(TT)。

2.5 对急性血瘀大鼠血小板聚集功能的影响^[2] 分组方法、每组动物数、给药方法、剂量、给药时间及造模方法同 **2.4**。大鼠急性血瘀模型形成当天,灌胃给药,1 h 后用乙醚将大鼠麻醉,自眼底静脉丛取血,以胶原为诱导剂,按电阻法检测血小板聚集功能^[6]。全血与 0.1% 肝素钠溶液 9:1 混匀,将反应杯和磁棒置于预温孔中 15 min 后,加入 500 μL 生理盐水,再加入 500 μL 抗凝全血,混匀,置于反应孔中 37 ℃温育 5 min,将电极插入反应杯中,调零,加入诱导剂 2 μL,终质量浓度为 2 mg·L⁻¹,在血小板聚集仪上检测血小板聚集功能,以电阻大小表示血小板聚集能力。

2.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响 与模型对照组比较,阿司匹林肠溶片组、复方血栓通胶囊中、高剂量组大鼠血栓湿重及干重均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对大鼠动-静脉旁路血栓形成的影响 与模型对照组比较,阿司匹林肠溶片组、复方血栓通胶囊低、中、高剂量组大鼠血栓湿重及干重均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 1 复方血栓通胶囊对大鼠下腔静脉血栓形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血栓湿重 /mg	抑制率 /%	血栓干重 /mg	抑制率 /%
模型对照	-	21.83 ± 10.46	-	5.76 ± 3.04	-
阿司匹林肠溶片	0.05	12.07 ± 7.45 ³⁾	44.69	2.85 ± 1.68 ³⁾	50.47
复方血栓通胶囊	0.375	19.64 ± 10.96	10.02	4.78 ± 2.82	17.07
	0.75	7.57 ± 5.51 ⁴⁾	65.31	1.87 ± 1.36 ⁴⁾	67.51
	1.5	12.52 ± 7.69 ³⁾	42.64	2.93 ± 2.06 ³⁾	49.16

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 复方血栓通胶囊对大鼠动-静脉旁路血栓形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血栓湿重 /mg	抑制率 /%	血栓干重 /mg
模型对照	-	18.96 ± 3.56	-	4.88 ± 1.00
阿司匹林肠溶片	0.05	11.63 ± 4.11 ⁴⁾	38.64	3.22 ± 1.11 ⁴⁾
复方血栓通胶囊	0.375	14.96 ± 2.85 ³⁾	21.10	4.06 ± 0.58 ³⁾
	0.75	14.93 ± 4.94 ³⁾	21.27	3.48 ± 1.87 ³⁾
	1.5	14.48 ± 5.30 ³⁾	23.60	3.46 ± 1.32 ⁴⁾

3.3 对大鼠颈总动脉血栓溶栓的影响 与模型对照组比较,复方血栓通胶囊低、中、高剂量组大鼠血栓湿重均显著减轻($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 复方血栓通胶囊对大鼠颈总动脉血栓溶栓的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血栓湿重/mg	溶栓率/%
模型对照	-	5.21 ± 0.64	-
阿司匹林肠溶片	0.05	4.74 ± 0.68	8.97
复方血栓通胶囊	0.375	4.51 ± 0.88 ³⁾	13.45
	0.75	4.50 ± 0.77 ³⁾	13.61
	1.5	4.38 ± 0.97 ³⁾	15.88

3.4 对急性血瘀大鼠凝血时间(CT)、凝血酶时间(TT)及大鼠血小板聚集功能的影响 与正常对照组比较,模型对照组大鼠 CT, TT 显著缩短($P < 0.01$),大鼠血小板聚集能力显著升高($P < 0.05$);与模型对照组比较,阿司匹林肠溶片组、复方血栓通胶囊低、中、高剂量组 CT 显著延长($P < 0.05 \sim 0.01$),复方血栓通胶囊低、中剂量组 TT 显著延长

($P < 0.05$),阿司匹林肠溶片组、复方血栓通胶囊低、中、高剂量组大鼠血小板聚集能力显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表4。

表4 复方血栓通胶囊对急性血瘀大鼠凝血时间(CT)、凝血酶时间(TT)及大鼠血小板聚集功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CT /s	TT /s	血小板 聚集能力/ Ω
正常对照	-	107.60 ± 34.35	43.10 ± 7.11	19.80 ± 3.33
模型对照	-	61.10 ± 22.92 ²⁾	32.01 ± 3.94 ²⁾	24.90 ± 3.48 ¹⁾
阿司匹林肠溶片	0.05	91.20 ± 35.63 ³⁾	34.20 ± 2.11	8.80 ± 3.33 ⁴⁾
复方血栓通胶囊	0.375	97.90 ± 44.77 ³⁾	36.09 ± 2.97 ³⁾	20.70 ± 4.27 ³⁾
	0.75	95.10 ± 32.19 ³⁾	35.22 ± 1.32 ³⁾	20.11 ± 5.16 ³⁾
	1.5	105.10 ± 35.92 ⁴⁾	33.89 ± 3.43	20.22 ± 5.02 ³⁾

4 讨论

血栓性疾病是一类严重危害人类健康的疾病,血栓形成导致血管堵塞,病变血管内血液供应或回流受阻,造成组织器官缺血缺氧或充血。引起血栓形成的因素主要有三个:血管内皮损伤;血小板黏附、聚集和释放反应;凝血活性增高,血液黏度增加,血流缓慢。动脉血栓主要由于血小板黏附、聚集和释放,促进血液凝固,从而促使血栓形成;静脉血栓主要由于血液瘀滞和血液凝固,血流受阻而形成血栓。防止血液凝固或抑制血小板功能,可以预防静脉或动脉血栓的形成,增强纤维蛋白溶解活性,促进血栓溶解^[5]。血小板的活化、黏附、聚集在血栓形成的病理过程中发挥重要作用。胶原是一种强力血小板致聚剂,能激活血小板膜磷脂酶,使磷脂分解,释放花生四烯酸,而引起血小板不可逆聚集。

凝血过程是一系列血浆凝血因子相继酶激活的过程,一般分为内源性凝血途径,外源性凝血途径和凝血共同途径。凝血时间(CT)指离体静脉血与体外异物表面接触后,体内内源性凝血系统被激活,最后生成纤维蛋白而使血液凝固的这段时间。凝血酶时间(TT)主要反映纤维蛋白原转为纤维蛋白的时间,TT的延长或缩短分别反映凝血因子XI, XII, 前激肽释放酶V, II和I的血浆水平降低或增高^[3]。

复方血栓通胶囊由三七、黄芪、丹参、玄参组成,其中,三七、丹参共奏活血化瘀之效,黄芪益气,玄参养阴兼清热凉血。现代药理研究表明:三七既能缩短凝血时间,又能促使血块溶解、促进纤溶,有利于

止血而不留瘀。三七总皂苷能抑制血小板聚集,降低血液黏度,其可能是通过提高血小板 cAMP 含量,减少血栓素 A₂ 生成,从而抑制血小板聚集功能;丹参能降低血液黏度,抑制红细胞变形能力,改善红细胞聚集性。丹酚酸、丹参多酚酸盐有显著的抗血小板聚集作用,从而有助于维持血运和预防血栓形成^[7];黄芪中的多糖类和黄酮类化合物能提高机体抗脂质过氧化及清除自由基能力,改善微循环和血液流变性,并能降低血小板的黏附性,抑制血栓形成;玄参中环烯醚萜苷类和苯丙素苷类能抑制血小板聚集,降低血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 的活性。

本实验结果显示,复方血栓通胶囊能够显著降低大鼠下腔静脉血栓、动-静脉旁路血栓和颈总动脉血栓的质量,延长 CT 和 TT,抑制胶原诱导的血小板聚集。由此表明,复方血栓通胶囊具有显著抗血栓的功效,而其抗血栓的机制可能与改善凝血功能、血小板聚集功能有关。

[参考文献]

[1] 刘忠政,梁洁萍,聂怡初,等. 复方血栓通胶囊基于血液循环和凝血过程相关靶点的网络药理学研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2013,52(2):97.

[2] 王辉,刘刚,罗顺德. 莲心碱对血小板聚集、凝血功能和血栓形成的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(6):768.

[3] 岳媛,窦丽丽,畅瑞苗,等. 益心脑滴丸对血小板聚集、血栓形成及凝血作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):241.

[4] 马勇,陈金飞,张允申,等. 活血通络汤防治深静脉血栓形成的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):194.

[5] 刘金荣,张洪艳,章新华,等. 灯盏花素脂质体前体与灯盏花素片抗血栓作用比较研究[J]. 解剖科学进展,2010,16(4):338.

[6] 孙晓红,赵凤绵,刘敬闪,等. 电阻法检测汇集血小板聚集功能试验的应用[J]. 河北医药,2012,34(24):3811.

[7] 张允申,马勇,许建安,等. 活血通络汤对大鼠血液流变学及血栓形成影响的实验研究[J]. 中医药信息,2010,27(1):62.

[责任编辑 聂淑琴]