

## 沙棘总黄酮不同给药途径对血栓形成的影响

程嘉艺<sup>1</sup>, 汤 晴<sup>1</sup>, 杨金玲<sup>1</sup>, 近藤一直<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032; 2 日本滨松医科大学药理学教室, 日本 滨松)

关键词: 沙棘总黄酮; 血栓模型; 血小板聚集

中图分类号: R966

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2006)02-0262-03

血栓可以导致某些致命的疾病,如心肌梗塞、脑梗塞以及动脉粥样硬化等,而血小板活性是血栓形成的关键性的病理原因<sup>[1-3]</sup>,因此,血小板活性抑制剂已经被频繁地用于上述疾病的预防。近年来,中药对动脉粥样硬化形成和血栓性疾病的影响受到人们的关注<sup>[4-5]</sup>。

沙棘是一种传统中药,已有的报道表明:沙棘总黄酮(TFH, total flavones of *Hippophae Rhamnoides* L)和山楂总黄酮对降低血脂和调节血脂蛋白有协同作用,两者合用能更好地防治动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>。静注沙棘总黄酮可明显增强心衰犬的心脏泵功能和心肌收缩性能,并可明显改善心肌舒张性能,降低外周血管阻力和心肌耗氧量<sup>[7]</sup>。TFH灌胃给药,显著降低全血黏度<sup>[8]</sup>。肌肉注射沙棘总黄酮显著提高大鼠心肌组织 SOD 活性并减少 MDA 的生成<sup>[9]</sup>。上述研究结果表明沙棘总黄酮对心血管系统有着明显的活性,但对于是否对血小板活性及其血栓形成有影响还没有见到报道。因此,在本实验中我们观察了沙棘总黄酮对动物体内血栓形成的影响并对其作用机制进行了初步探讨。

### 1 材料

#### 1.1 实验动物

Wistar大鼠,体重 180~230 g,由中国医科大学实验动物中心提供。动物合格证号:辽实动字第 051号。ICR小鼠由 Medical animal centre, Hamamatsu, Japan 提供。

#### 1.2 药品

沙棘总黄酮由辽宁阜新利公司提供,槲皮素为其主要成分,含量为总黄酮的 87%。胶原购于 Nycomed pharma German, ADP 购于 MC Medical (Tokyo Japan)。花生四烯酸是 Sigma (St Louis, MO, USA) 的产品。阿司匹林为沈阳市延风制药厂产品,批号为 199901034。

#### 1.3 仪器

脉冲式多普勒血流测定仪, PDV-20, Crystal Biotech America 全血细胞计数器, Celltac, Nihon Konden, Tokyo, Japan 全自动恒温水浴震荡器, Taiyo Incubator Personal, Taitec, Tokyo, Japan

### 2 方法

收稿日期: 2005-03-14

基金项目: 沈阳市自然科学基金资助项目 (1998-40)

作者简介:程嘉艺 (1961~),女,辽宁中医学院中药系副教授,硕士,1995年和 2001年赴日本滨松医科大学等学习,主要从事心血管药理的研究。电话:024-31207115; E-mail: shuodongw@hotmail.com

#### 2.1 沙棘总黄酮灌胃给药对大鼠动静脉旁路丝线血栓形成的影响

大鼠 40只,按体重随机分为 4组,分别为病理模型组,灌胃给予蒸馏水;阳性对照组,灌胃给予阿司匹林;沙棘总黄酮大剂量组、小剂量组,灌胃给予沙棘总黄酮。给药时间为 30 d,最后 1次给药后 2 h,用 10% 乌拉坦麻醉,将大鼠胃仰卧位固定,分离左颈外静脉和右颈总动脉,取两段内径为 1 mm 的聚乙烯管组成的套管,其中一段置一根 6 cm 长的称重消毒丝线,以肝素生理盐水 (50 μg/mL) 充满聚乙烯管,将管的一端插入颈外静脉固定,用动脉夹将右颈总动脉的向心端夹住,用手术线结扎远心端后,将套管的另一端插入右颈总动脉固定,手术完成后立即放开血流,15 min 后中断血流,迅速取出丝线称重,总重量减去丝线原重即为血栓湿重。

#### 2.2 沙棘总黄酮尾静脉给药对小鼠大腿动脉光化学反应血栓形成的影响

ICR 小鼠 32 只 (5周, 24~30 g),腹腔注射苯巴比妥钠 (80 mg/kg) 麻醉,以仰卧位固定,在左侧颈静脉插入一插管并留置,用于给受试药和孟加拉玫瑰红,暴露左侧大腿动脉,在远心端大腿动脉上方固定一个脉冲式多普勒血流探头,被暴露部位用波长 540 nm 的绿色光照射。在确立了基础血流之后,由留置插管处静脉给予受试药,给药 15 min 后开始照射,并经留置管缓慢静脉给予孟加拉玫瑰红,血流完全停止达 1 min 以上,可被认为栓塞性血栓形成,将栓塞性血栓形成所需时间作为指标衡量沙棘总黄酮对血栓形成的影响<sup>[10]</sup>。沙棘总黄酮溶解在 0.1 的 DMSO 中,给药剂量为 100 μg/kg 和 300 μg/kg,静脉给药容积为 0.02 mL/kg,对照组以同样的方式给予 0.1 的 DMSO。阳性对照组给予 10 mg/kg 的阿司匹林,阿司匹林溶于 0.1 mol/L 的碳酸氢钠中,同时用 0.1 mol/L 的碳酸氢钠作为阿司匹林的溶媒对照组。

#### 2.3 沙棘总黄酮体外给药对血小板聚集性的影响

全血血小板聚集实验采用血小板计数法<sup>[11]</sup>。31 只 ICR 小鼠用苯巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血,向各管中分别加入受试药和对照药,在 37℃ 水浴中孵育 30 min 后,加入 10 μL 的胶原 (2 μg/mL)、花生四烯酸 (80 μM) 或 ADP (0.3 μM),

混匀,加入福尔马林以终止血小板的聚集和解聚。在全血细胞计数器上计数各管中血小板的数量。

#### 2.4 沙棘总黄酮灌胃给药对血小板聚集性影响

取 SD大鼠 18只,按体重随机分成 3组,即正常对照组,灌胃给予蒸馏水;沙棘总黄酮 0.5 g/kg和 1.0 g/kg两个剂量组,分别灌胃给予沙棘总黄酮,给药时间 30 d,每组 6只大鼠,最后 1次给药 2 h后,用苯巴比妥钠麻醉,心脏采血 1 mL,置于 37℃ 水浴中,分别加入 10 μL生理盐水、1、2、4和 8 μg/mL的胶原,立即以 140次/min的速度水平振摇 5 min,加入福尔马林以终止血小板的聚集和解聚。在全血细胞计数器上计数各管中血小板的数量。

#### 2.5 统计方法

两组间的数据采用非配对 *t*检验;3组以上采用单因素多重方差分析法。所有数据以  $\bar{x} \pm s$ 表示。

### 3 结果

#### 3.1 沙棘总黄酮灌胃给药对大鼠动静脉旁路丝线血栓形成的影响

由表 1可见,以 0.5 g/kg和 1.0 g/kg的剂量灌胃给与沙棘总黄酮对大鼠动静脉旁路丝线血栓形成没有抑制作用,0.05 g/kg的阿司匹林对同一模型血栓形成有极其显著的抑制作用。

表 1 沙棘总黄酮灌胃给药对大鼠动静脉旁路丝线

血栓形成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	动物数 (n)	剂量 (g/kg)	血栓湿重 (mg)
模型对照组	10		60.38 ± 9.60
阿司匹林组	10	0.05	35.03 ± 18.93**
沙棘总黄酮	10	0.50	55.10 ± 19.43
	10	1.00	63.42 ± 18.46

与模型对照组比较 \*  $P < 0.05$ ;与模型对照组比较 \*\*  $P < 0.01$  (下同)。

#### 3.2 沙棘总黄酮静脉给药对小鼠大腿动脉光化学反应血栓形成的影响

静脉给予 0.1 μM 的 DMSO 的 6只小鼠,在 540 nm光照的条件下给予孟加拉玫瑰红引起大腿动脉血栓形成所需的时间是 (8.5 ± 1.4) min,而 300 μg/kg沙棘总黄酮将该时间延长为 (11.6 ± 2.4) min ( $P < 0.05$ ),见 Fig 1A,与 10 mg/kg的阿司匹林作用相似,阿司匹林将血栓形成时间从 (7.6 ± 1.1) min延长至 (10.3 ± 2.5) min ( $P < 0.05$ ),见 Fig 1B。100 μg/kg的沙棘总黄酮对孟加拉玫瑰红引起的血栓堵塞没有影响。

#### 3.3 沙棘总黄酮体外给药对血小板聚集性的影响

##### 3.3.1 沙棘总黄酮体外给药对胶原、花生四烯酸引起的血小板聚集的影响

在溶媒对照组即 0.1 μM 的 DMSO 组和 0.1 M 的碳酸氢钠组,无论是否接受血小板聚集剂的刺激,两组间血小板的数量均无明显差异。2 μg/mL 胶原的加入明显减少了血小板的数量,表明发生了血小板聚集。沙棘总黄酮以剂量依存的方式抑制了由胶原引起的血小板聚集,并且 3.0 μg/mL 沙

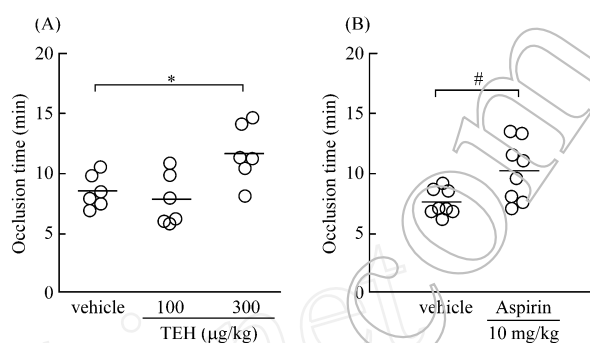


Fig 1 TFH(A)和阿司匹林(B)对小鼠大腿动脉血栓形成的影响

\*、#均为与对照组比较  $P < 0.05$

棘总黄酮的作用非常显著 ( $P < 0.01$ );80 μM 的花生四烯酸非常显著地引起血小板聚集,表现为血小板数量的减少,沙棘总黄酮对花生四烯酸诱发的血小板聚集有明显的抑制作用,并呈现一定的量效关系。沙棘总黄酮体外抑制血小板聚集的作用与阿司匹林相似,见表 2。

表 2 沙棘总黄酮体外给药对血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	血小板数 ( $\times 10^4$ 细胞/μL)	
		胶原 (2.0 μg/mL)	花生四烯酸 (80 μM)
DMSO组		14.7 ± 0.6	13.7 ± 0.4
诱导剂		6.3 ± 1.2	3.8 ± 0.4
沙棘总黄酮	0.3	8.5 ± 1.9	6.7 ± 1.0*
	1.0	11.7 ± 1.8*	10.4 ± 1.1**
	3.0	14.9 ± 1.0**	13.0 ± 0.8**
碳酸氢钠		14.1 ± 0.6	15.7 ± 0.9
诱导剂		6.7 ± 1.4	3.7 ± 0.9
阿司匹林 (mM)	0.1	11.9 ± 1.9*	6.2 ± 1.2*
	0.3	13.6 ± 2.4**	11.3 ± 1.8**
	1.0	17.6 ± 1.6**	16.1 ± 1.9**

##### 3.3.2 沙棘总黄酮体外给药对 ADP 诱导的血小板聚集的影响

在本实验中我们分别采用 0.1 μM 及 0.3 μM 的 ADP 诱导血小板的聚集,无论是 0.1 μM 的 ADP 还是 0.3 μM 的 ADP 都显著引起了血小板的聚集。沙棘总黄酮各剂量组对两种浓度 ADP 诱导的血小板聚集均没有表现出抑制作用;阿司匹林各剂量组对 0.1 μM ADP 诱导的血小板聚集呈现出抑制倾向,但没有统计学意义,对 0.3 μM ADP 诱导的血小板聚集没有影响,见表 3。

##### 3.4 沙棘总黄酮体内给药对血小板聚集性影响

由 Fig 2 可见 0.5 g/kg、1.0 g/kg 的沙棘总黄酮灌胃给予大鼠 30 d,对胶原引起的血小板聚集没有产生显著影响。

### 4 讨论

我们在本实验中观察了沙棘总黄酮体内给药对两种不同血栓模型的影响及体外、体内给药时对不同血小板聚集剂诱导的血小板聚集的影响,并与阿司匹林做了比较。沙棘总黄酮静脉给药时具有与阿司匹林相似的抑制血栓形成的作用,在这一实验中我们采用了光化学反应血栓模型,光化学反应动物血栓模型是国际药理学界一个崭新的技术,在这之

表 3 沙棘总黄酮、阿司匹林体外给药对 ADP 诱导的  
血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (mM)	血小板聚集率 (%)	
		ADP (0.1 $\mu$ M)	ADP (0.3 $\mu$ M)
碳酸氢钠		10.3 $\pm$ 1.4	12.8 $\pm$ 5.9
ADP		61.8 $\pm$ 6 <sup>**</sup>	82.3 $\pm$ 9 <sup>**</sup>
阿司匹林	0.1	55.4 $\pm$ 4.1	82.3 $\pm$ 1.6
	0.3	50.5 $\pm$ 2.7	82.6 $\pm$ 1.3
	1.0	46.2 $\pm$ 6.2	82.2 $\pm$ 2.7
DMSO		15.2 $\pm$ 6.6	11.8 $\pm$ 5.3
ADP		39.2 $\pm$ 6.1 <sup>*</sup>	72.2 $\pm$ 5.3 <sup>**</sup>
TFH ( $\mu$ g/mL)	0.3	41.8 $\pm$ 8.3	70.8 $\pm$ 3.6
	1.0	45.7 $\pm$ 8.8	74.8 $\pm$ 4.2
	3.0	43.3 $\pm$ 5.3	77.9 $\pm$ 5.2

注:为与溶剂对照组比较 \*  $P < 0.05$ ;为与溶剂对照组比较 \*\*  $P < 0.01$ 。

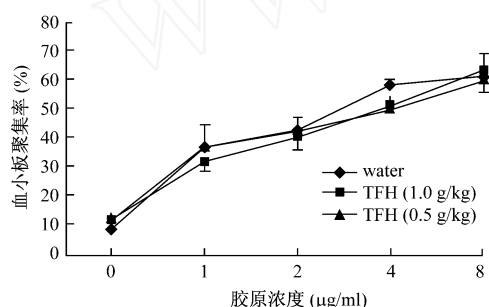


Fig 2 沙棘总黄酮体外给药对胶原引起血小板聚集率的影响

前,国内外常用的血栓动物模型大多为冠状动脉结扎法,丝线法,颈总动脉和静脉结扎或气囊压迫法以及大脑中动脉电烧灼损伤法等,这些模型与临床的血栓栓塞性疾病的病因相差甚远并造成一些不可逆的损伤。临床的血栓栓塞性疾病是由过氧化物损伤血管内皮细胞造成血管内皮增生和血小板功能异常活跃所致为多见,该模型具有与临床病理机制相近,因此具有一定的结论可靠性。综观已有的研究,对于沙棘总黄酮的研究多是采用体外给药或注射给药的方法<sup>[12-15]</sup>。在本研究中我们采用了灌胃给药的方式,结果表明:沙棘总黄酮口服给药 30 d,对动静脉旁路丝线血栓的形成没有抑制作用,但阿司匹林却显示了非常明显的抑制作用。尽管口服给药没有采用光化学反应血栓模型而是采用了动静脉旁路丝线血栓模型,但沙棘总黄酮灌胃给予大鼠 30 d,对胶原引起的血小板聚集没有产生显著影响。这一实验结果也为沙棘总黄酮经口给药对血栓形成不产生抑制作用提供了佐证;沙棘总黄酮静脉给药对动物体内血栓的形成有显著的抑制作用,口服无抗栓活性可能是由于活性成分生物利用度低或成分之间的相互作用,这将在今后的研究中继续探索。

在本研究中,我们发现沙棘总黄酮经口给药没有表现出

抗栓药理活性,这是将其作为预防血栓栓塞性疾病药物的一大欠点,我们今后应进一步跟踪寻找沙棘总黄酮中抗栓作用的有效成分,并对其药代动力学做进一步的研究工作,在此基础上通过药物制剂学的方法对这一问题加以解决。同时也应对其毒理学进行研究,期待能从沙棘总提取物发现安全、有效的新的抗栓药物。

## 参考文献:

- [1] Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death [J]. *Circulation*, 1986, 73: 418.
- [2] Oemar BS, Yang Z, Luscher TF. Molecular and cellular mechanisms of atherosclerosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1995, 4: 82.
- [3] Yamazaki M, Vchiyama S, Awata M. Measurement of platelet fibrinogen binding and p-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction [J]. *Thromb Res*, 2001, 104: 197.
- [4] Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68: 1390S.
- [5] Ballantyne CM. Reducing atherothrombotic events in high-risk patients: recent data on therapy with statins and fatty acids [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 1999, 1: 6.
- [6] 王云彩. 沙棘总黄酮和山楂总黄酮及其混合液对大鼠高血脂的影响 [J]. *中国药理通报*, 1992, 8(2): 85.
- [7] 吴英, 王毅. 沙棘总黄酮对急性心衰犬心功能和血流动力学的影响 [J]. *中国中药杂志*, 1997, 22(7): 429.
- [8] 王秉文, 成华. 沙棘总黄酮对正常大鼠血液流变学的影响 [J]. *西北药学杂志*, 1993, 8(2): 69.
- [9] 吴英, 王毅. 沙棘总黄酮对大鼠心肌再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(1): 53.
- [10] Kondo K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation [J]. *European J Pharmacol*, 2002, 455: 53-57.
- [11] Saniabadi AR, Vmemura K, Suzuki Y, et al. Adenosine 5'-diphosphate as a factor in platelet aggregation induced by human plasma remnant lipoproteins [J]. *Life Sci*, 1998, 63: 1065-1074.
- [12] 肖准. 沙棘总黄酮改善心肌肥大的分子药理机制 [J]. *四川大学学报*, 2003, 34(2): 283.
- [13] 王立群, 郑金生. 沙棘总黄酮与银杏总黄酮心血管药效学的对比研究 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2002, 5(12): 1205.
- [14] 梁伟, 孙铁民, 李春玲, 等. 沙棘总黄酮与 PHA 诱发猪脾淋巴因子的临床应用研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2003, 30(12): 1000.
- [15] 吴英, 王毅. 沙棘总黄酮对急性心衰犬心功能和血流动力学的影响 [J]. *中国中药杂志*, 1997, 22(7): 429.