

◆ 实验研究论著 ◆

血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠血浆中 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 含量的影响邓冰湘¹, 张文将², 谭达全¹, 尹抗抗¹, 赵梁², 梁媛², 卢金冬³, 闫云云³

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学 2011 级硕士研究生班, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学 2012 级硕士研究生班, 湖南 长沙 410208

[摘要] 目的: 研究血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠血浆中血栓素 B₂ (TXB₂)、6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 含量及其比值的影响。方法: SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 随机分为空白组, 模型组, 阿司匹林组, 血府逐瘀汤高、中、低剂量组, 各组预防性给药 14 天, 对除空白组外的其余组大鼠用三氯化铁复制动脉血栓模型, 比较各组血栓重量和血浆中 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 含量, 并计算两者的比值。结果: ①模型组有明显的血栓形成, 说明造模成功; ②与模型组比较, 血府逐瘀汤高、中、低剂量组、阿司匹林组干血栓质量均减轻, 其中中剂量组干血栓质量最轻, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各用药组大鼠血浆中 TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 比值、TXB₂ 含量降低, 6-keto-PGF_{1α} 含量升高, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。结论: 血府逐瘀汤有明显的抗动脉血栓形成的作用, 其机制可能与影响血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 水平有关。

[关键词] 血府逐瘀汤; 动脉血栓; 血栓素 B₂ (TXB₂); 6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}); 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 02-0187-03

血栓的形成是由多种因素参与的复杂过程, 它涉及到血流动力学、血管壁、血小板、凝血与纤溶活性等诸多因素、而在动脉血栓的形成中血小板起着重要的作用, 故抗血小板治疗在血栓性疾病的防治中尤为重要^[1]。本课题组已有的实验证明血府逐瘀汤可改善血瘀模型大鼠血液流变性, 有效降低血液黏度, 从而起到活血化瘀的功效^[2]; 可以升高急性心肌梗死大鼠血清一氧化氮(NO)含量, 显著降低内皮素(ET)含量、有效保护血管内皮细胞, 从而有效减少大鼠心肌梗死面积^[3]; 故推断此方有抗血栓的作用, 本实验通过血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠血浆中血栓素 B₂ (TXB₂)、6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 含量及其比值的影响来研究该方抗血栓的机制。

1 材料

1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重(272 ± 11)g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(湘)2011-0003。动物饲养于标准动物房, 每天保持 12 h 光暗循环, 不限制饲料和饮水。动物室光照充足, 通风和空调设备良好, 室温控制在 22~27 °C, 湿度为 50%~70%。实验室按常规定期消毒。

1.2 药物及试剂 血府逐瘀汤组成^[4]: 桃仁 12 g, 红花、当归、牛膝、生地黄各 9 g, 川芎、桔梗各 4.5 g, 柴胡 3 g, 赤芍、枳壳、甘草各 6 g。用蒸馏水浸泡 1 h, 煮沸 30 min 后过滤取液, 再加水于残渣并煮沸, 如此反复操作 2 次, 合并 2 次滤液, 浓

[收稿日期] 2013-11-12

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目 (编号: 2008031)。

[作者简介] 邓冰湘 (1955-), 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事缺血性心脑血管疾病的防治研究。

缩至每毫升含生药 1.368 g、0.684 g、0.342 g 3 种剂量，熬制完毕，将中药放于立式压力蒸汽灭菌器里灭菌，放入 4℃ 冰箱冷藏备用。0.9% 氯化钠注射液 500 mL，批号：20120106，安徽双鹤有限责任公司；阿司匹林肠溶片，规格：25 mg，批号：120354，济南永宁制药股份有限公司；三氯化铁，批号：20120104，国药集团化学试剂有限公司；Rat TXB₂，ELISA Kit 批号：RA20424 BIO-Swamp；Rat 6-Keto-PGF_{1α}，ELISA Kit 批号：RA20690 BIO-Swamp。

1.3 仪器 鼓风干燥箱：WG-71 天津市泰斯特仪器有限公司；立式压力蒸汽灭菌器：LDZX-30KBS 上海申安医疗器械厂；隔水式恒温培养箱 GNP-9160 型：上海精宏实验设备有限公司；DNM-9602 酶标仪：北京普朗新技术有限公司；电子分析天平：梅特勒-托利多仪器有限公司；TDZ4-WS 低速自动平衡离心机：湘仪离心机仪器有限公司；冰箱(中国海尔公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 SD 大鼠随机性饲养 7 天，观察动物的行为，按照性别进行分层，然后按照随机数字法分为空白组、模型组、阿司匹林组和血府逐瘀汤低、中、高剂量组，每组 10 只，均普通饲养。各组预防性给药。空白组和模型组灌胃生理盐水，剂量 10 mL/(kg·d)；阿司匹林组灌胃阿司匹林水溶剂(现配)，剂量 10 mg/(kg·d)，相当于 60 kg 成人 100 mg/d 剂量；血府逐瘀汤低、中、高剂量组分别灌胃 3.42 g 生药/(kg·d)、6.84 g 生药/(kg·d)、13.68 g 生药/(kg·d)。每天 1 次，连续 14 天。

2.2 造模方法 除空白组外，其余组大鼠均于术前 12 h 禁食不禁水，于末次给药 1 h 后，予大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦(5 mL/kg)麻醉，然后参照 Kurz 法^[9]改良制作颈总动脉血栓模型。方法：颈部备皮后，皮肤表面先用碘酊涂擦术野皮肤，再用 75% 乙醇分 2 次脱碘，用灭菌器材沿颈中线纵行切开颈部皮肤，止血钳钝性分离肌组织，暴露气管，用玻璃分针分离出两侧颈总动脉约 3 cm，在颈总动脉与周围组织间放一塑料保鲜膜，用于保护血管周围组织，将吸有 35% 三氯化铁溶液 20 μL 的小片滤纸(1 cm × 1 cm)敷于左侧颈总动脉上，滤纸片要紧贴血管壁，右侧颈总动脉穿线备用采血，敷纸片后 30 min 去除纸片，血栓形成。

2.3 指标采集与检测 去除纸片 90 min 后，用一次性采血器右侧颈总动脉采血，将采集到的血置于 5 mL 的 EDTA-K₂ 的一次性真空采血管中，采血过程中为避免溶血，采血后立即颠倒混匀 5~8 次，3 000 r/min 离心 15 min，取上层血浆，于 -70℃ 冷冻备用。指标检测前将所有试剂和标本平衡至室温后进行，严格按照说明书步骤进行操作，用酶联免疫法检测血浆 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 含量。用标志物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，即为样品的实际浓度。

2.4 血栓质量及其抑制率 动物取血后，结扎左侧颈总动脉两端，用游标卡尺在滤纸包裹处精确截取剪下与包裹滤纸等长的颈动脉血栓形成段，置于盛有生理盐水的玻璃器皿中，清除周围组织与血液，吸干后测定血栓长度，然后置于恒温干燥箱内 60℃ 烘烤 2 h，称其质量为干质。取出血栓后的血管再称质量，前后两者相减即为 1 cm 长度血管段内血栓质量。根据血栓质量，按下列公式计算各组的抑制率，抑制率 = [(模型组测定值 - 实验组测定值) / 模型组测定值] × 100%。

2.5 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计学软件进行分析，实验结果计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示，多组间均数比较用单因素方差分析，组间两两比较方差齐者用 LSD 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠干血栓质量及其抑制率比较 见表 1。血府逐瘀汤高、中、低剂量组及阿司匹林组与模型组比较，干血栓质量较轻，差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)；低剂量组、高剂量组干血栓质量均重于阿司匹林组，差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)，而中剂量组和阿司匹林组比较，差异无显著性意义($P > 0.05$)；血府逐瘀汤不同剂量组间比较：中剂量组干血栓质量最轻，高剂量组次之，低剂量组最重，各组的差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。中剂量组和阿司匹林组的抑制率均大于 40%，提示有良好的抑制血栓形成的作用。

3.2 各组大鼠血清 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 含量及 TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 比较 见表 2。与空白组比较，模型组 TXB₂ 升高，6-keto-PGF_{1α} 降低，差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)，提示造模成功；与模型组

比较, 血府逐瘀汤高、中、低剂量组、阿司匹林组大鼠血浆TXB₂/6-keto-PGF_{1α}比值、TXB₂含量下降, 6-keto-PGF_{1α}含量升高, 差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠干血栓质量及其抑制率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	干血栓(mg)	抑制率(%)
空白组	10	0.00 ± 0.00	-
模型组	10	9.33 ± 1.15	-
阿司匹林组	10	5.45 ± 0.95	41.6
低剂量组	10	7.45 ± 0.26	20.1
中剂量组	10	5.38 ± 0.46	42.3
高剂量组	10	6.45 ± 0.82	30.7

与空白组比较, ① $P < 0.01$; 与模型组比较, ② $P < 0.01$; 与阿司匹林组比较, ③ $P < 0.01$; 与低剂量组比较, ④ $P < 0.01$; 与高剂量组比较, ⑤ $P < 0.01$

表2 各组大鼠血清TXB₂、6-keto-PGF_{1α}含量及TXB₂/6-keto-PGF_{1α}比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TXB ₂ (Pg/mL)	6-keto-PGF _{1α} (Pg/mL)	TXB ₂ /6-keto-PGF _{1α}
空白组	10	3234 ± 154.93	95.36 ± 5.06	34.014 ± 2.640
模型组	10	3730 ± 115.95	81.60 ± 3.97	45.846 ± 2.359
阿司匹林组	10	1816 ± 54.61	103.20 ± 7.07	17.671 ± 1.321
低剂量组	10	3154 ± 134.35	91.90 ± 5.72	34.456 ± 2.780
中剂量组	10	2645 ± 149.91	106.00 ± 6.50	25.367 ± 1.735
高剂量组	10	2660 ± 245.85	91.56 ± 3.76	29.118 ± 2.995

与空白组比较, ① $P < 0.01$; 与模型组比较, ② $P < 0.01$

4 讨论

血栓素 A₂(TXA₂)是迄今发现最强的血小板聚集剂和血管收缩剂, 前列环素(PGI₂)是已知最强的血小板聚集抑制剂和血管扩张剂。这两种物质的比值适中以维持血管处于正常的舒缩状态, 一旦其平衡关系被破坏就会导致血栓形成。但TXA₂很不稳定, 在37℃、pH7.4的条件下半衰期仅30s, 很快自发地转变成稳定的、但无生物学活性的TXB₂; PGI₂也极不稳定, 在37℃条件下半衰期仅2~3min, 迅速转变成稳定而无生物学活性的6-keto-PGF_{1α}。由于TXA₂和PGI₂性质极不稳定, 不易检测, 而其代谢产物TXB₂和6-keto-PGF_{1α}则相当稳定, 因此测定TXB₂和6-keto-PGF_{1α}即可代表TXA₂和PGI₂的水平, 可以作为血小板被激活的标志, 根据判定TXB₂和6-Keto-PGF_{1α}可特异性反映血小板活化和破坏程度^[9]。

本实验结果表明, 以35%三氯化铁外敷颈总动脉30min后可肉眼观察到明显的血栓形成。模型组

大鼠血清TXB₂含量高于空白组、血清6-keto-PGF_{1α}含量低于空白组, 差异均有非常显著性意义($P < 0.01$), 表明此种方法造模成功; 血府逐瘀汤高、中、低剂量组均可以抑制血栓的形成, 其中中剂量组抑制血栓作用最强; 血府逐瘀汤高、中、低剂量组血浆TXB₂含量均降低, 6-keto-PGF_{1α}含量均升高, 改善两者的平衡失调, 其中中剂量组大鼠血浆TXB₂下降最为明显, 6-keto-PGF_{1α}含量升高尤为突出, TXB₂/6-keto-PGF_{1α}比值明显高于其他组别, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 说明中剂量组用药抑制血栓形成作用最强, 故建议临床中剂量用药; 在各用药组中, 阿司匹林组抑制TXB₂最为突出, 并且在小剂量运用的过程中并没有抑制6-keto-PGF_{1α}的生成, 此实验同时验证小剂量的阿司匹林对血小板环氧化酶有明显的抑制作用, 而对内皮细胞环氧化酶没有抑制作用, 所以小剂量阿司匹林防治血栓性疾病是合理的。

血府逐瘀汤抗动脉血栓形成的机制可能是一方面抑制了亢进的血小板功能, 使其聚集、黏附、释放功能降低, 合成TXA₂减少; 另一方面使损伤的血管内皮细胞功能恢复, 合成PGI₂能力提高, 从而使血管舒张, 抑制血小板聚集。通过改变血小板的花生四烯酸代谢途径, 维持血液中的TXB₂/6-keto-PGF_{1α}比值的平衡, 可能是发挥抗血栓形成作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 王振义, 李家增, 阮长耿, 等. 血栓与止血理论与临床[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 14.
- [2] 邓冰湘, 谭达全, 张秋雁, 等. 血府逐瘀汤对大鼠急性心肌缺血心电图及瘀血模型血液流变性的影响[J]. 中医研究, 2005, 18(1): 17-19.
- [3] 邓冰湘, 张秋雁, 蔡光先, 等. 血府逐瘀汤超微颗粒对急性心肌缺血模型大鼠SOD、MDA、NO、ET的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(5): 7-9.
- [4] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 238-239.
- [5] Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat of model arterial thrombosis induced by ferric chloride [J]. Thromb Res, 1990, 60(4): 269-280.
- [6] 曹德钧, 谢先丰, 刘少星, 等. 帕瑞昔布钠对大鼠局灶缺血再灌注损伤的影响[J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34(4): 26-27.

(责任编辑: 马力)