

## 血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠抗凝系统的影响

陈慧<sup>1</sup>, 张文将<sup>2</sup>, 唐标<sup>1</sup>, 谭达全<sup>1</sup>, 梁媛<sup>1</sup>, 邓冰湘<sup>1</sup>, 尹抗抗<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 益阳医学高等专科学校, 湖南益阳 413000)

**[摘要]** 目的 研究血府逐瘀汤不同剂量组对三氯化铁(FeCl<sub>3</sub>)所致大鼠颈总动脉血栓形成后抗凝血酶-III(AT-III)和蛋白C(PC)含量的影响。方法 选择SD大鼠60只,雌雄各半,随机分为空白组,模型组,阿司匹林组,血府逐瘀汤高剂量组、中剂量组、低剂量组,连续灌胃给药14d,第14天除空白组外,均采用FeCl<sub>3</sub>外敷颈总动脉的方法复制动脉血栓模型,分别称量其血栓质量和测定血浆AT-III和PC含量。结果 模型组有明显的血栓形成,说明造模成功;与模型组比较,血府逐瘀汤高、中、低剂量组,阿司匹林组血栓质量减轻,其中中剂量组血栓质量最轻,差异有统计学意义( $P<0.01$ );血府逐瘀汤不同剂量组血浆中AT-III含量降低、PC含量升高( $P<0.01$ )。结论 血府逐瘀汤不同剂量组抗凝机制可能通过与AT-III结合而灭活凝血因子,促进了PC对凝血因子的灭活,从而发挥抗凝作用。

**[关键词]** 血府逐瘀汤;动脉血栓;抗凝;大鼠;桃仁;红花;当归;牛膝

**[中图分类号]**R289.3

**[文献标识码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.008

### Effects of Xuefu Zhuyu Decoction on the Anticoagulant System of Arterial Thrombosis Model Rats

CHEN Hui<sup>1</sup>, ZHANG Wenjiang<sup>2</sup>, TANG Biao<sup>1</sup>, TAN Daquan<sup>1</sup>, LIANG Yuan<sup>1</sup>, DENG Bingxiang<sup>1</sup>, YIN Kangkang<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410008, China; 2. Yiyang Medical College, Yiyang, Hunan 413000, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the effects of Xuefu Zhuyu Decoction in different dose groups on the arterial thrombosis caused by FeCl<sub>3</sub> and the concentration of antithrombin-III (AT-III) and protein C (PC) in plasma of rats. **Methods** 60 SD rats, half male and half female, were randomly divided into blank group, model group, aspirin group, Xuefu Zhuyu Decoction of high, medium and low dose group. All rats were administrated continuously for 14 days by gavage. Except the blank group, the arterial thrombosis rat models were induced by FeCl<sub>3</sub> applied onto the carotid artery. The weight of thrombosis and the concentration of AT-III and PC in plasma of rats were measured. **Results** The model group has obvious thrombosis indicating a successful model. Compared with the model group, the thrombus weight of Xuefu Zhuyu Decoction in high, medium and low dose group and aspirin group were significantly decreased, in which the weight of medium dose group was the lightest ( $P<0.01$ ). The AT-III content of Xuefu Zhuyu Decoction in different dose group were significantly lower, while PC content were significantly increased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Anti-thrombotic action of Xuefu Zhuyu Decoction in different dose groups might concern inactivating coagulation factors by binding with AT-III or accelerating inactivation of coagulation factors by PC.

**[Keywords]** Xuefu Zhuyu Decoction; arterial thrombosis; anticoagulant; rats; peach seed; flos carthami; *Angelica sinensis*; *Achyranthes bidentata*

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<sup>[1]</sup>。本课题组已有的实验发现血府逐

瘀汤可以升高急性心肌缺血大鼠其血清一氧化氮(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<sup>[2]</sup>;可

**[收稿日期]**2015-10-20

**[基金项目]**湖南省自然科学基金资助项目(09JJ6040)。

**[作者简介]**陈慧,女,讲师,研究方向:中医基础理论治则与治法的研究。

**[通讯作者]**\* 尹抗抗,男,实验师,E-mail:yinkk\_001@163.com。

以通过显著升高组织型纤溶酶原激活物(t-PA)水平、降低纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)水平,调节t-PA和PAI-1这两种平衡物质来维持机体纤溶功能的平衡稳定<sup>[3]</sup>;通过改变血小板的花生四烯酸代谢途径,维持血液中的血栓素B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)/6-酮-前列腺素F<sub>1a</sub>(6-keto-PGF<sub>1a</sub>)比值的平衡<sup>[4]</sup>,故推断此方有抗血栓的作用。本研究采用大鼠动脉血栓模型,检测大鼠血浆凝血酶-Ⅲ(AT-Ⅲ)和蛋白C(PC)含量,旨在研究该方抗动脉血栓形成作用与抗凝系统的关系,以期进一步阐明血府逐瘀汤抗血栓形成的作用及机理,并为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠60只,雌雄各半,体质量(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)。动物饲养与标准动物房,每日保持12h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22-27℃,湿度为50%-70%。实验室按常规定期消毒。

1.1.2 主要药物和试剂 血府逐瘀汤按文献<sup>[5]</sup>(桃仁12g,红花9g,当归9g,生地黄9g,川芎4.5g,赤芍6g,牛膝9g,柴胡3g,桔梗4.5g,枳壳6g,甘草6g)购买。用蒸馏水浸泡1h,煮沸30min后过滤取液,再加水残渣煮沸,如此反复操作2次,合并2次滤液,浓缩至每毫升含生药1.368g、0.684g、0.342g3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%的氯化钠注射液500mL,批号:20120106,安徽双鹤有限责任公司;阿司匹林肠溶片,规格:25mg/片,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 AT-Ⅲ ELISA Kit 批号:RA20663 BIO-Swamp;Rat PC ELISA Kit 批号:RA20764 BIO-Swamp。

1.1.3 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

离心机,湘仪离心机仪器有限公司;冰箱(中国海尔公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 分组及给药 SD大鼠随机性饲养7d,观察动物的行为,按照性别进行分层,然后按照随机数字法进行分组,具体分组如下:(1)空白组(n=10):普通饲养,灌胃用生理盐水10mL/(kg·d);(2)模型组(n=10):普通饲养,灌胃用生理盐水10mL/(kg·d);(3)阿司匹林组(n=10):普通饲养,灌胃剂量10mg/(kg·d),相当于60kg成人100mg/d剂量,由于阿司匹林溶于水易于水解,所以必须现配现用;(4)血府逐瘀汤高剂量组(n=10下称高剂量组):普通饲养,灌胃用生药13.68g/(kg·d);(5)血府逐瘀汤中剂量组(n=10下称中剂量组):普通饲养,灌胃用生药6.84g/(kg·d);(6)血府逐瘀汤低剂量组(n=10下称低剂量组):普通饲养,灌胃用生药3.42g/(kg·d)。

1.2.2 造模方法 各组大鼠连续灌胃给药(空白和模型组予以等剂量的生理盐水)14d,每日灌胃给药1次,所有组大鼠均于术前12h禁食不禁水,于末次给药1h后,将大鼠腹腔注射20%乌拉坦(5mL/kg)麻醉,然后参照Kurz法改良制作颈总动脉血栓模型<sup>[6]</sup>,颈部备皮后,皮肤表面先用碘酊涂擦手术野皮肤,再用75%乙醇分两次脱碘,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3cm,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,给药后1h,将吸有35%FeCl<sub>3</sub>溶液20μL的小片滤纸(1cm×1cm)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30min去除纸片,去除纸片后90min后,用一次性采血器右侧颈总动脉采血,将采到的血置于5mL的EDTA-K<sub>2</sub>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,3000r/min离心15min,取上层血浆,于-70℃冷冻备用。

1.2.3 血浆AT-Ⅲ和PC检测 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AT-Ⅲ和PC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。

1.2.4 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,取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%。

### 1.3 统计学方法

应用 spss16.0 统计学软件进行分析,实验结果所有数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”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, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血府逐瘀汤不同剂量组对血栓质量及抑制率的影响

模型组与空白组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );血府逐瘀汤高、中、低剂量组、阿司匹林组与模型组相比血栓干质量较轻,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );模型组、低剂量组、高剂量组血栓干质量重于阳性对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),而中剂量组和阿司匹林组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );血府逐瘀汤不同剂量组间比较:中剂量组血栓干质量最轻,高剂量组次之,低剂量组最重,各组间的差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );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。结果见表 1。

表 1 各组干血栓质量及其抑制率结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	<i>n</i>	干血栓 (mg)	抑制率 (%)
空白组	10	0.00±0.00	-
模型组	10	9.33±1.15 <sup>▲▲●●▲▲</sup>	-
阿司匹林组	10	5.45±0.95 <sup>▲▲▲▲</sup>	41.6
低剂量组	10	7.45±0.26 <sup>▲▲●●</sup>	20.1
中剂量组	10	5.38±0.46 <sup>▲▲▲▲</sup>	42.3
高剂量组	10	6.45±0.82 <sup>▲▲●●▲▲</sup>	30.7
<i>F</i> 值		226.582	
<i>P</i> 值		< 0.01	

注:与空白组相比  $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与模型组相比  $**P < 0.01$ ;与阿司匹林组比  $\bullet\bullet P < 0.01$ ;与低剂量比  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

### 2.2 血府逐瘀汤不同剂量组对 AT-III、PC 含量的影响

与空白组相比,大鼠血栓模型组血浆 AT-III、PC 含量降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),提示造

模成功;与模型组相比,血府逐瘀汤不同剂量组血浆 AT-III 含量降低,PC 含量升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结果见表 2。

表 2 AT-III 与 PC 含量检测结果 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

组 别	<i>n</i>	AT-III	PC
空白组	10	454.50±20.71	19.41±2.37
模型组	10	396.02±13.61 <sup>**</sup>	10.34±1.34 <sup>**</sup>
阿司匹林组	10	395.20±13.78 <sup>**</sup>	10.38±1.66 <sup>**</sup>
低剂量组	10	372.50±9.89 <sup>**▲▲</sup>	15.31±1.17 <sup>**▲▲</sup>
中剂量组	10	341.28±16.17 <sup>**▲▲</sup>	15.00±1.05 <sup>**▲▲</sup>
高剂量组	10	295.53±22.19 <sup>**▲▲</sup>	16.59±0.97 <sup>**▲▲</sup>
<i>F</i> 值		106.002	56.235
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01

注:与空白组相比  $**P < 0.01$ ;与模型组比  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

## 3 讨论

本实验结果发现血府逐瘀汤抑制血栓形成与剂量大小并不呈正相关关系,而以中剂量组抑制血栓形成效果最佳,我们考虑其机制可能与小剂量阿司匹林抑制血栓形成的机制相似,课题组前期已有的实验结果表明血府逐瘀汤大鼠中剂量组血浆中 TXB2 含量最低,血浆中 6-keto-PGF1a 含量最高,浓度越高反而抑制 6-keto-PGF1a 的生成,从而影响抗栓的作用,说明中剂量组可以通过抑制亢进的血小板功能从而起到抗血栓的作用,建议临床中剂量组进行治疗。

正常情况下,凝血系统和抗凝系统处于动态平衡,当凝血系统被激活占优势时,则出现血栓性疾病;而机体正常的抗凝系统对防止血栓在血管内形成,保证血液循环正常运行的起着重要作用<sup>[7]</sup>。抗凝系统主要有三个体系:抗凝血酶系统、PC 系统和组织因子途径抑制物系统。其中抗凝血酶和 PC 系统占主导地位,任何原因引起它们的减少、缺乏或结构改变均可导致血液抗凝活性降低,从而引起血栓形成<sup>[8]</sup>。因而,在抗血栓形成的过程中,提高抗凝血酶和 PC 含量具有重要意义。

AT-III 主要由肝细胞和血管内皮细胞分泌,是人体血浆中主要的生理性抗凝物质,约占血浆总抗凝血酶活性的 50%-70%<sup>[9]</sup>。在正常情况下,AT-III 与肝素结合后抑制凝血酶、纤溶酶及多种凝血因子的活性,维持血液平衡,是防止血栓形成的主要生理物质<sup>[10]</sup>。AT-III 可灭活极大部分的凝血酶,减少血栓形成的风险;当血浆中 AT-III 活性低于 70% 时,血栓

形成的危险性就会大大增加<sup>[1]</sup>。本实验中模型组血浆中 AT-Ⅲ含量的降低,考虑由于三氯化铁化学腐蚀法造成血管内皮细胞的损伤,可以使内皮细胞表面的 AT-Ⅲ减少,致使凝血酶活性增强,大量凝血酶形成的同时伴有 AT-Ⅲ消耗的增加,导致 AT-Ⅲ含量的降低。由于我们测定的血浆 AT-Ⅲ和 PC 含量反映的是血浆中剩余的 AT-Ⅲ和 PC 含量,从而使血浆中残存的 AT-Ⅲ和 PC 减少。血府逐瘀汤高、中、低剂量组均可以抑制血栓形成,不同程度的降低 AT-Ⅲ含量,且 AT-Ⅲ含量显著低于模型组,推测可能通过与 AT-Ⅲ结合使 AT-Ⅲ活化发挥抗凝血作用,从而使游离的 AT-Ⅲ含量降低,为此我们推测其抗动脉血栓的可能机制为通过增强 AT-Ⅲ的活性而增强动脉血栓模型抗凝系统活性。阿司匹林阳性对照组同样可以减轻血栓重量,但是 AT-Ⅲ含量与模型组比较没有统计学意义,表明其抗血栓作用的环节可能不是通过抗凝系统实现的,其抗栓作用可能与其抑制血小板聚集和释放有关。

PC 抗凝系统是机体内除肝素、抗凝血酶Ⅲ外的另一重要抗凝系统,主要由 PC、蛋白 S(PS)、PC 抑制物(PCI)和血栓调节蛋白(TM)组成,对血液凝固和纤溶过程起着重要的调节作用。PC 是 PC 系统的最主要的组成成分,是体内重要的抗凝因子,其抗凝活性占全血的 20%~30%,直接影响凝血与抗凝血机制的平衡<sup>[12]</sup>。模型组 PC 含量下降的原因考虑动脉血栓形成过程中,凝血酶大量活化,凝血亢进必然消耗 PC,加之血管内皮细胞受损,抗凝因子合成减少,故 PC 含量的下降与消耗及合成减少有关。本实验中,血府逐瘀汤不同剂量组均可以抑制血栓的形成,不同程度升高 PC 的浓度,由此可以推测血府逐瘀汤升高 PC 的浓度的原因可能通过激活 AT-Ⅲ途径灭活

凝血因子,从而使 PC 消耗减少所致。而 PC 浓度升高,进而活化成 APC 使其浓度升高,APC 抗凝活性增强而使血浆抗凝系统活性增强。

#### 参考文献:

- [1] 庞兴学,王 显.血栓形成的过程与机制研究进展[J].医学综述,2011,17(11):1 613-1 615.
- [2] 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.
- [3] 张文将,谭达全,邓冰湘.血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠纤溶活性的影响[J].湖南中医药大学学报,2013,33(11):28-31.
- [4] 邓冰湘,张文将,谭达全,等.血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠血浆中 TXB<sub>2</sub>、6-keto-PGF<sub>1a</sub> 含量的影响[J].新中医,2014,46(2):187-189.
- [5] 邓中甲.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2009:238-239.
- [6] Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat of model arterial thrombosis induced by ferric chloride [J]. Thromb Res, 1990, 60(4):269-280.
- [7] 王 颖,张曦彤.下肢深静脉血栓形成介入治疗后复发危险因素分析[J].介入放射杂志,2013,22(9):764-767.
- [8] 刘泽霖,贺石林,李家增.血栓性疾病的诊断与治疗[M].北京:人民卫生出版社,2006:103-105.
- [9] 徐耀铭,牛 平.凝血酶原片段 1+2 和抗凝血酶 3 在围手术期患者中检测的临床意义[J].中风与神经疾病杂志,2015,32(2):166-167.
- [10] 周丽杰.抗凝血酶 III、蛋白 C 在血栓形成性疾病、妊娠、糖尿病中的变化及意义[J].医药前沿,2013(14):170-171.
- [11] 覃乃辉,周达利,秦 立,等.脑梗死患者血 D-二聚体、超敏 C 反应蛋白及抗凝血酶 III 的检测及意义 [J]. 海南医学院学报,2014(1):50-53.
- [12] 刘宇明,许治强,周伯荣,等.蛋白 C、抗凝血酶 III 在缺血性脑血管病发病机制中的作用 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2011,18(5):379-380.

(本文编辑 李 杰)