

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.08.016

大黄廑虫丸对大鼠凝血因子 11 的影响

沈玉玲, 王东生*

(中南大学湘雅医院, 湖南省长沙市开福区湘雅路 87 号, 410008)

摘要 目的 探讨大黄廑虫丸对血栓的影响及可能作用机制。方法 1) 15 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、阿司匹林组和大黄廑虫丸低、高剂量组各 3 只。大黄廑虫丸低、高剂量组分别给予 0.26、1.05 g/(kg·d) 大黄廑虫丸灌胃, 阿司匹林组给予 8.7 mg/(kg·d) 阿司匹林肠溶片灌胃, 假手术组及模型组给予 1.0 g/(kg·d) 生理盐水灌胃, 各组连续灌胃 7 天。末次灌胃后 2 h, 除假手术组外其余各组建立颈总动脉血栓模型。HE 染色法制作颈总动脉病理切片。2) 21 只 SD 大鼠随机分为空白组和大黄廑虫丸低、高剂量组各 7 只, 大黄廑虫丸低、高剂量组分别给予 0.26、1.05 g/(kg·d) 大黄廑虫丸灌胃, 空白组给予 1.0 g/(kg·d) 生理盐水灌胃, 各组连续灌胃 7 天。末次灌胃 2 h 后, 检测血浆凝血因子 11 活性 (FXIa) 及凝血因子 11 蛋白 (FXIag) 水平, 检测肝组织凝血因子 11 (FXI) mRNA 表达。3) 12 只 SD 大鼠以 1.05 g/(kg·d) 大黄廑虫丸灌胃 14 天, 分别于给药第 0、7、14 天心脏采血检测 FXIa 及 FXIag 水平。结果 病理结果显示, 假手术组无血栓形成, 模型组大鼠颈动脉管腔内充满血栓, 大黄廑虫丸低剂量组和阿司匹林组颈动脉管腔内血栓闭塞程度较模型组减轻, 大黄廑虫丸高剂量组大鼠颈动脉管腔内仅有少量游离血栓。大黄廑虫丸高剂量组血浆 FXIa 较空白组和大黄廑虫丸低剂量降低 ($P < 0.05$), 各组大鼠血浆 FXIag 水平及肝组织 FXI mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与第 0 天比较, 第 7 天及第 14 天大鼠 FXIa 降低, 且第 14 天较第 7 天降低更明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各时间点大鼠血浆 FXIag 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 大黄廑虫丸具有抗血栓形成作用, 其机制可能与抑制 FXIa 有关。

关键词 大黄廑虫丸; 动脉血栓; 凝血因子 11

随着老龄化的进展, 血栓相关性疾病的发病率逐渐升高。传统抗凝药物如肝素、维生素 K 拮抗剂、新型抗凝药等通过抑制凝血系统相关凝血因子的活性, 进而抑制纤维蛋白的生成, 已经成为临床预防、治疗血栓性疾病的主要治疗措施之一^[1]。然而由于上述抗凝药物无法区分生理性止血和病理性血栓形成, 且治疗周期较为漫长, 因此临床应用增加患者的出血风险^[2]。大黄廑虫丸出自《金匮要略》, 是医圣张仲景所创活血化瘀名方, 具有祛瘀血、消瘀热、滋阴血、润燥结作用。本课题组前期实验证明, 大黄廑虫丸可明显减少家兔动脉血栓的形成, 抗栓作用同阿司匹林、氯吡格雷等西药无明显差异^[3]。凝血因子 11 (FXI) 是内源性凝血途径的一员, 多项研究表明, FXI 在血栓形成中发挥重要作用, 且有较小的出血风险, 成为目前抗栓治疗的新靶点^[4-6]。本实验旨在观察大黄廑虫丸对大鼠 FXI 的

影响, 从而探索大黄廑虫丸抗血栓的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 8~10 周龄, 体重 280~300 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物合格证号: 43004700032590。饲养温度 20~25℃, 湿度 50%~70%。

1.2 实验药物

大黄廑虫丸, (北京同仁堂股份有限公司, 批号: 1013408) 用无菌蒸馏水配置成高、低剂量浓度分别为 0.105、0.026 g/ml 的溶液; 阿司匹林肠溶片 (拜耳医药保健有限公司, 批号: BJ32869), 用无菌蒸馏水配置成浓度为 0.869 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

7.5% FeCl₃ (批号: 20090211)、10% 水合氯醛 (批号: 20151010)、4% 多聚甲醛 (批号: 1702943)、HE 染色液 (批号: G1005)、苏木精分

* 通讯作者: wdsh66@aliyun.com, 13808481269

色液 (批号: G1039)、苏木精返蓝液 (批号: G1040), 均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 大鼠 FXIa ELISA 试剂盒 (货号: E-EL-R0769c), Elabscience 公司; 大鼠肝组织总 RNA 提取试剂盒 (批号: R6934-01), OMEGA 公司; RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒 (批号: AK4501), TAKARA 公司; All-in-One qPCR Mix (批号: QP101), GeneCopoeia 公司。光学显微镜 (型号: DFC450), Leica 公司; 酶标仪 (型号: NANO-QUANT), Bio-Tek 公司; q-PCR 仪 (型号: VIIA7), Applied 公司; PCR 仪 (型号: MASTER-CYCLER Pro), Eppendorf 公司; 分光光度计 (型号: NANODROP2000), Thermo Scientific 公司。

1.4 大黄䷭虫丸对颈动脉血栓大鼠颈动脉病理学的影响

15 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、阿司匹林组及大黄䷭虫丸低、高剂量组各 3 只。大黄䷭虫丸低、高剂量组分别给予 0.26 g/(kg·d) (成人等效剂量) 和 1.05 g/(kg·d) (成人 4 倍等效剂量) 大黄䷭虫丸灌胃。阿司匹林组给予 8.7 mg/(kg·d) (成人等效剂量) 阿司匹林肠溶片灌胃。假手术组及模型组给予 1.0 g/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每日 1 次, 连续灌胃 7 天。末次灌胃后 2 h, 除假手术组外其余各组建立颈总动脉血栓模型。参考文献 [7-8] 方法, 用 10% 水合氯醛按 0.3 ml/100 g 剂量麻醉大鼠, 将麻醉完全的大鼠仰卧位固定, 手术部位备皮, 消毒后取颈前正中切口, 于下颌角内侧舌骨水平分离出右颈总动脉, 将颈总动脉和迷走神经分离, 用浸润 7.5% FeCl₃ 的长条滤纸 (1 cm × 3 cm) 包裹暴露的颈总动脉, 3 min 后取下滤纸, 用生理盐水冲洗, 20 min 后剪取颈总动脉, 用滤纸吸取多余水分, 置于 4% 多聚甲醛溶液保存。假手术组仅分离右颈总动脉, 不进行滤纸包裹。

标本制作石蜡切片, 水浴恒温捞片, 二甲苯脱蜡, 无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇洗蜡, 水洗, 苏木素染色, 水洗多余染料, 分色, 返蓝, 伊红染色, 80% 乙醇脱水 2 次, 无水乙醇脱水 2 次, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 光学显微镜观察。

1.5 大黄䷭虫丸对大鼠血浆凝血因子 11 活性 (FXIa)、凝血因子 11 蛋白 (FXIag) 水平及肝组织 FXI mRNA 表达影响

21 只 SD 大鼠按随机数字表法分为空白组和大黄䷭虫丸高、低剂量组各 7 只, 大黄䷭虫丸低、高剂量组分别给予 0.26、1.05 g/(kg·d) 大黄䷭虫丸

灌胃。空白组给予 1.0 g/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每日 1 次, 连续灌胃 7 天。末次灌胃 2 h 后, 心脏采血检测 FXIa 及 FXIag 水平, 剪取肝组织检测 FXI mRNA 表达。

FXIa 测定采用一期凝固法^[9], 参考血浆活性/时间标准曲线, 计算待测血浆的活性。FXIag 测定采用酶联免疫法 (ELISA) 检测, 按照试剂盒操作步骤进行操作, 反应终止后用酶标仪 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)。FXI mRNA 测定采用 RT-PCR 法, 根据大鼠肝组织总 RNA 提取试剂盒要求提取 RNA, 以 RNA 为模板逆转录 cDNA, 37℃ 孵育 15 min, 85℃ 孵育 5 s, 冰上冷却, 进行实时定量 PCR。基因引物由生工生物股份有限公司合成, 以 GAPDH 作为内参, 实验重复 3 次。引物序列如下: FXI, 上游 TTCAAGCAATGCCCTCAG, 下游 CAAATGCCGACGACAGACA; GAPDH, 上游 GACATGCCGCCTGGAGAAAC, 下游 AGCCCAG-GATGCCCTTTAGT。由荧光定量 PCR 仪自动采集目的基因及内参基因的 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各样品组相对于对照组样品目的基因的表达水平。

1.6 大黄䷭虫丸不同用药时间对大鼠血浆 FXIa 及 FXIag 的影响

12 只 SD 大鼠以高剂量即 1.05 g/(kg·d) 大黄䷭虫丸灌胃 14 天, 分别于给药第 0、7、14 天后心脏采血, 过程中死亡 4 只 (第 0、7 天各死亡 2 只, 两只大鼠血液标本发生溶血, 最后 6 只大鼠完成实验, 检测 FXIa 及 FXIag 水平。检测方法同上。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

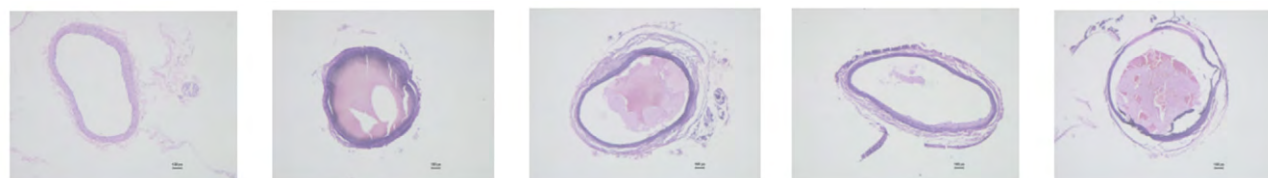
2 结果

2.1 各组大鼠颈动脉病理学结果

图 1 示, 假手术组大鼠颈动脉横截面血管清晰完整, 无血栓形成; 模型组大鼠颈动脉管腔内充满血栓。大黄䷭虫丸低剂量组大鼠颈动脉管腔血栓闭塞程度较模型组相对较轻, 有部分软化、溶解。大黄䷭虫丸高剂量组大鼠颈动脉管腔内少量游离血栓; 阿司匹林组大鼠颈动脉管腔闭塞程度与大黄䷭虫丸低剂量组相似。

2.2 各组大鼠血浆 FXIa、FXIag 及肝组织 FXI mRNA 水平比较

表 1 示, 大黄䷭虫丸高剂量组血浆 FXIa 较空



假手术组 模型组 阿司匹林组 大黄廔虫丸高剂量组 大黄廔虫丸低剂量组
图 1 各组大鼠颈动脉组织病理图 (HE 染色, $\times 100$)

表 1 各组大鼠血浆 FXIa、FXIag 及肝组织 FXI mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FXIa (%)	FXIag (ng/ml)	FXI mRNA
空白组	7	44.18 $\pm$ 4.56	0.491 $\pm$ 0.153	1
大黄廔虫丸低剂量组	7	43.33 $\pm$ 2.76	0.821 $\pm$ 0.378	1.003 $\pm$ 0.021
大黄廔虫丸高剂量组	7	29.33 $\pm$ 6.29 * Δ	0.816 $\pm$ 0.261	0.998 $\pm$ 0.031

注: FXIa, 凝血因子 11 活性; FXIag, 凝血因子 11 蛋白; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与大黄廔虫丸低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

白组低剂量组降低 ($P < 0.05$), 而大黄廔虫丸低剂量组与空白组比较血浆 FXIa 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠血浆 FXIag 水平及肝组织 FXI mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 不同用药时间大鼠血浆 FXIa、FXIag 水平比较

表 2 示, 与第 0 天比较, 第 7 天及第 14 天大鼠 FXIa 降低 ($P < 0.01$), 而第 14 天时较第 7 天时降低更明显 ($P < 0.05$)。各时间点大鼠血浆 FXIag 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 不同用药时间大鼠血浆 FXIa、FXIag 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FXIa (%)	FXIag (ng/ml)
第 0 天	6	56.23 $\pm$ 5.52	0.684 $\pm$ 0.092
第 7 天	6	38.67 $\pm$ 3.35 *	0.737 $\pm$ 0.114
第 14 天	6	21.40 $\pm$ 1.49 * Δ	0.510 $\pm$ 0.179

注: FXIa, 凝血因子 11 活性; FXIag, 凝血因子 11 蛋白; 与第 0 天比较, * $P < 0.01$; 与第 7 天比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

大黄廔虫丸与历代活血化瘀方不同之处是虫类药与植物类药双重用法, 方中植物类药大黄、桃仁、干漆等可活血祛瘀, 攻热下血, 以通血闭; 虫类药系蠕动啖血之物, 破血逐瘀, 其性峻猛; 虫类药与植物药的双重作用, 发挥祛瘀活血、通经络的协同功效。方中的熟地黄、白芍、甘草等滋养血脉、缓急止痛。诸药合用正如尤在泾《金匱心典》中所说“润以濡其干, 虫以动其瘀, 通以祛其闭”, 其配伍精当, 是活血化瘀的祖方。流行病学资料显示, FXI 严重缺乏的人群与正常人群相比有较低的静脉血栓事件发生率, 而血浆 FXI 高于正常人 10% 的人群发生静脉血栓的风险是正常人群的 2 倍^[10-11]。FXI 缺乏引起的出血多见于外伤后或者

手术过程中, 自发性出血较少见, 出血量与 FXI 水平没有明显相关性, 当血浆 FXI < 25 U/dl 时会出现严重出血^[12]。另有研究证实, FXI 主要参与血栓的增殖和稳定性, 并不影响起始小血栓的形成, 进一步从理论上阐述 FXI 缺乏并不会引起严重出血, 但有较好抗血栓作用^[13]。亦有研究表明, 抑制 FXIa 可显著预防小鼠动脉粥样斑块破裂模型血栓的形成, 当抑制 50% 以上 FXIa 时, 可明显预防狒狒血栓模型血栓的形成, 且有较小的出血风险^[14-15]。

本研究病理结果显示, 大黄廔虫丸低剂量有同阿司匹林肠溶片相似的预防动脉血栓形成的作用, 大黄廔虫丸高剂量组预防血栓形成作用优于阿司匹林组, 进一步证实大黄廔虫丸具有良好的预防血栓形成作用。此外, 大黄廔虫丸高剂量组可明显降低 FXIa, 并且呈时间依赖性, 于用药第 14 天可使 FXIa 降低 60%, 但大黄廔虫丸并不能影响 FXIag 及 FXI mRNA 的表达。关于大黄廔虫丸抗血栓形成的具体作用机制, 下一步我们将利用网络药理学方法找到其作用于 FXIa 的活性成分, 为临床应用奠定基础。

参考文献

- [1] 钱阳阳, 廖专, 李兆申. 新型直接口服抗凝药物与胃肠道出血的研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2017, 38 (9): 1183-1189.
- [2] 倪红斌, 梁维邦, 蒋健. 抗凝药物相关性脑出血 35 例的临床分析 [J]. 中华临床医师杂志, 2010, 4 (12): 2518-2520.
- [3] 王东生, 陈方平, 唐发清. 大黄廔虫丸对家兔动脉血栓形成模型的影响 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2009, 34 (9): 919-925.
- [4] WHEELER AP, GAILANI D. The intrinsic pathway of coagulation as a target for antithrombotic therapy [J].

- Hematol Oncol Clin North Am, 2016, 30(5) : 1099-1114.
- [5] GAILANI D, GRUBER A. Factor XI as a therapeutic target [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(7) : 1316-1322.
- [6] GAILANI D, BANE CE, GRUBER A. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy [J]. J Thromb Haemost, 2015, 13(8) : 1383-1395.
- [7] WU W, LI H, NAVANEETHAM D, et al. The kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2 inhibits factor XIa and murine carotid artery and middle cerebral artery thrombosis [J]. Blood, 2012, 120(3) : 671-677.
- [8] ZHANG H, LOWENBERG EC, CROSBY JR, et al. Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: a novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk [J]. Blood, 2010, 116(22) : 4684-4692.
- [9] 腾飞鹏, 杨明清. 凝血因子活性测定的规范化 1 [J]. 医学科技, 2000(1) : 40-42.
- [10] SALOMON O, STEINBERG DM, ZUCKER M, et al. Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis [J]. Thromb Haemost, 2011, 105(2) : 269-273.

- [1] MEIJERS JC, TEKELENBURG WL, BOUMA BN, et al. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis [J]. N Engl J Med, 2000, 342(10) : 696-701.
- [2] PEYVANDI F, PALLA R, MENEGATTI M, et al. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(4) : 615-621.
- [3] YOUNIS HS, CROSBY J, HUH JI, et al. Antisense inhibition of coagulation factor XI prolongs APTT without increased bleeding risk in cynomolgus monkeys [J]. Blood, 2012, 119(10) : 2401-2408.
- [4] VAN MONTFOORT ML, KUIJPERS MJ, KNAUP VL, et al. Factor XI regulates pathological thrombus formation on acutely ruptured atherosclerotic plaques [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(8) : 1668-1673.
- [5] CROSBY JR, MARZEC U, REVENKO AS, et al. Antithrombotic effect of antisense factor XI oligonucleotide treatment in primates [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(7) : 1670-1678.

Impact of *Dahuang Zhechong Wan* (大黄䗪虫丸) on Blood Coagulation Factor11 in Rats

SHEN Yuling, WANG Dongsheng

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410008)

ABSTRACT Objective To explore the impact and possible mechanism of *Dahuang Zhechong Wan* (大黄䗪虫丸) on thrombosis. **Methods** 1) Fifteen SD rats were randomized into sham operation group, model group, aspirin group, *Dahuang Zhechong Wan* low and high dose group, 3 rats in each group. The *Dahuang Zhechong Wan* low and high dose group were given 0. 26 and 1. 05 g/(kg · d) *Dahuang Zhechong Wan* respectively by gavage. The aspirin group was given 8. 7 mg/(kg · d) aspirin enteric coated tablet by gavage. The sham operation group and the model group were given 1. 0 g/(kg · d) normal saline by gavage. All groups were gavaged for 7 days. At 2 hours after the last gavage, rats in other groups except the sham operation group were made common carotid artery thrombosis models. Common carotid artery pathological section was made by hematoxylin and eosin (HE) stain. 2) Twenty-one SD rats were randomized into blank group, *Dahuang Zhechong Wan* low and high dose group, 7 rats in each group. The *Dahuang Zhechong Wan* low and high dose group were given 0. 26 and 1. 05 g/(kg · d) *Dahuang Zhechong Wan* by gavage. The blank group was given 1. 0 g/(kg · d) normal saline by gavage. All groups were given gavage for 7 days. At 2 hours after the last gavage, the activity of plasma coagulation factor 11 (FXIa) and the level of Coagulation factor 11 protein (FXIaG) were detected. The expression of hepatic tissue coagulation factor 11 (FXI) mRNA was detected. 3) Twelve SD rats were given 1. 05 g/(kg · d) *Dahuang Zhechong Wan* by gavage for 14 days. The levels of FXIa and FXIaG were detected by heart blood collection on the 0, 7th and 14th day of medication. **Results**

Pathological results showed that there was no thrombosis in the sham operation group. Rats' carotid artery was filled with thrombus in the model group. The occlusion degree of carotid artery thrombosis in the *Dahuang Zhechong Wan* low dose group and in the aspirin group was less severe than that in the model group. Only a small amount of free thrombus was found in rats' carotid artery in the *Dahuang Zhechong Wan* high dose group. Plasma FXIa in the *Dahuang Zhechong Wan* high dose group was less than that in the blank group and the *Dahuang Zhechong Wan* low dose group ($P < 0.05$). The difference of plasma FXIaG level and hepatic tissue FXI mRNA level of rats in all groups was not significant ($P > 0.05$). Compared with the 0 day, rats' FXIa decreased on the 7th and the 14th day. Moreover, the decrease on the 14th day was more significant than that on the 7th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The difference of rats' plasma FXIaG level at each time point was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** *Dahuang Zhechong Wan* might have the antithrombotic effect; the mechanism might relate to inhibiting FXIa.

Keywords *Dahuang Zhechong Wan*; arterial thrombosis; blood coagulation factor11

(收稿日期: 2017-09-21; 修回日期: 2017-12-12)

编辑: 邓 媛