

• 实验研究 •

精制大黄虻虫丸对动脉血栓形成的影响

王东生^{1*} 钟广伟¹ 万玲¹ 魏星¹ 贺福元² 段晓鹏² 江焱³

(1. 中南大学湘雅医院中西医结合科, 湖南省长沙市开福区湘雅路 87 号, 410008;

2. 湖南中医药大学药学院; 3. 中南大学粉末冶金国家重点实验室)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173198); 2010 年度国际科技合作专项资助项目(2010DFA32370);

“十一五”国家科技支撑计划(2009BAI80B01); 湖南省科学技术厅科技计划重点项目(2008WK3002);

中国博士后科学基金资助项目(20060390891)

* 通讯作者: wdsh66@yahoo.com.cn, (0731)84327369

[摘要] 目的 探讨精制大黄虻虫丸抗动脉血栓形成作用及机制, 观察钛铝金属间化合物多孔材料对药物作用的影响。方法 50 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、大黄虻虫丸组、精制方组、多孔材料组, 每组各 10 只。除正常组外, 其余大鼠通过三氯化铁诱导动脉血栓形成模型, 大黄虻虫丸组给予大黄虻虫丸, 精制方组大鼠给予精制大黄虻虫丸, 多孔材料组大鼠给予通过钛铝金属间化合物多孔材料处理的精制大黄虻虫丸方药, 各给药组根据体重按 1ml/100g 灌胃, 每天 2 次, 共 1 周; 模型组、正常组给予等体积生理盐水灌胃。光学显微镜下观察大鼠颈动脉血管组织病理变化, 记录各组大鼠血栓干重, 检测血小板计数、血液流变学、活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)及血栓素 B_2 (TXB₂) 和 6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α}) 的水平。结果 与模型组比较, 大黄虻虫丸组、精制方组和多孔材料组血栓干重减轻 ($P < 0.05$); 多孔材料组较精制方组和大黄虻虫丸组血栓干重降低明显 ($P < 0.05$)。与正常组相比, 模型组血小板计数、TXB₂ 水平明显增加, 6-keto-PGF_{1 α} 降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 大黄虻虫丸组、精制方组和多孔材料组均可以明显降低血小板计数和 TXB₂ 水平, 升高 6-keto-PGF_{1 α} ($P < 0.05$); 多孔材料组较精制方组和大黄虻虫丸组降低血小板计数和 TXB₂ 水平明显 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组血液黏度增高、APTT 和 PTT 缩短 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 大黄虻虫丸组、精制方组和多孔材料组血液黏度降低, APTT 和 PTT 均明显延长 ($P < 0.05$)。结论 精制大黄虻虫丸能明显抑制大鼠动脉血栓形成, 能改善血液流变性, 明显延长 APTT 和 PTT, 其机制可能与升高 6-keto-PGF_{1 α} 的水平、降低 TXB₂ 的水平有关。钛铝金属间化合物多孔材料可应用于中药的分离筛选以提高疗效。

[关键词] 钛铝金属间化合物多孔材料; 精制大黄虻虫丸; 动脉血栓

Effect of Refined Dahuang Zhechong Pill on Arterial Thrombosis

WANG Dongsheng¹, ZHONG Guangwei¹, WAN Ling¹, WEI Xing¹, HE Fuyuan², DUAN Xiaopeng², JIANG Yao³

(1. Xiangya Hospital of Central-South University, Hunan Province 410008; 2. Hunan University of Chinese Medicine; 3. Central-South University)

ABSTRACT Objective To research the effect and mechanism of Refined Dahuang Zhechong Pill [Refined Rhubarb (*Radix et Rhizoma Rhei*) and Ground Beetle (*Eupolyphaga seu Steleophaga*) Pill, RDZP] on arterial thrombosis and observe the influence of titanium-aluminum intermetallic compound porous material on drug action. **Methods** Fifty SD rats were randomized into the normal group, model group, DZP group, RDZP group and porous material group, with 10 in each. The arterial thrombosis models were induced by ferric chloride in all groups except normal group. DZP, RDZP and RDZP processed by titanium-aluminum intermetallic compound porous material were given to the DZP group, RDZP group and porous material group respectively. Each administration group was given 1ml/100g of corresponding drug solution intragastrically based on body weight twice daily for one week. The normal group and model group were given the same volume of saline intragastrically. The pathological situation of carotid artery in rats was observed by microscope. The dry weight of thrombosis, platelet count, hemorheology, activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) blood coagulation and the content of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-keto-prostaglandin F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α}) were recorded. **Results** The thrombosis could be seen in all modeling groups and the dry weight of thrombosis in the model group was the heaviest. Comparing with the model group, the dry weights of thrombosis were significantly reduced in the DZP group, RDZP group and porous material group ($P < 0.05$), especially in the porous material group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the normal group, the platelet count and TXB₂ content were significantly increased and 6-keto-PGF_{1 α} content were significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the platelet count and TXB₂ content were significantly decreased and 6-keto-PGF_{1 α} content were significantly increased in the DZP group, RDZP group and porous material group ($P < 0.05$). Comparing with the DZP

group and RDZP group, the platelet count and TXB_2 content were significantly decreased in the porous material group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the normal group, the blood viscosity was significantly increased but APTT and PT were significantly shortened in the model group ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the blood viscosity was significantly decreased but APTT and PT were significantly prolonged in the DZP group, RDZP group and porous material group ($P < 0.05$). **Conclusion** RDZP can obviously inhibit arterial thrombosis, improve blood rheology and prolong APTT and PT that may be relevant to increasing 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ content and decreasing TXB_2 content. Titanium-aluminum intermetallic compound porous material can be applied in the separation and filtering of Chinese medicinal to improve efficacy.

Keywords titanium-aluminum intermetallic compound porous material; Refined Dahuang Zhechong Pill; arterial thrombosis

大黄廬虫丸出自张仲景《金匱要略》，功效活血化瘀、去瘀生新，有良好的抗动脉血栓形成作用^[1-4]。在前期研究中，我们已通过正交试验对该方进行筛方^[5]，发现大黄、土鳖虫、水蛭、桃仁、虻虫为该方的主要成分，组成精制大黄廬虫丸。本实验通过我们自行研制的钛铝金属间化合物多孔材料^[6-7]，对精制大黄廬虫丸抗动脉血栓形成进一步深入研究。

1 材料与方法

1.1 药物

大黄廬虫丸组成：熟大黄 300 g、炒土鳖虫 30 g、制水蛭 60 g、桃仁 120 g、虻虫（去翅足）45 g、炒蛭蟥 45 g、煅干漆 30 g、桃仁 120 g、炒苦杏仁 120 g、黄芩 60 g、生地黄 300 g、白芍 120 g、甘草 90 g。精制大黄廬虫丸组成：熟大黄 300 g、炒土鳖虫 30 g、制水蛭 60 g、桃仁 120 g、虻虫（去翅足）45 g。以上药物均由中南大学湘雅医院药剂科一次性购齐，水煎后经乙醇沉淀制备药液，生药浓度 1 g/ml。另将精制大黄廬虫丸水煎后通过孔径为 1~5 μm 钛铝金属间化合物多孔材料分离处理，控制流速为 3 BV/h，经乙醇沉淀制备药液，生药浓度 1 g/ml。

1.2 动物

清洁级 SD 雄性大鼠 50 只，体重 300~340 g，实验动物合格证号：2008A010，由中南大学实验动物中心提供。

1.3 主要试剂

肝素钠注射液购自河北常山生化药业股份有限公司（批号 061101，12500 U/2 ml/支）；三氯化铁（ FeCl_3 ）分析纯为上海国药集团试剂有限公司生产（批号 20090211）；活化部分凝血酶时间（APTT）测定试剂盒（批号 B281002）、凝血酶原时间（PT）测定试剂盒（批号 C049002）均购自上海太阳生物技术有限公司。

1.4 仪器

离心机（德国 Sigma）、电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）、HMIAS-2000 彩色医学图文

分析系统（武汉千屏影像技术有限责任公司）、显微镜（日本 Olympus）、Image-ProPlus 6.0 软件（美国 Media Cybernetics 公司）、ht-型 Biocell 酶标仪（中国郑州博赛公司）、LBY-N6 型血液黏度计（北京普利生公司生产）、孔径为 1~5 μm 的钛铝金属间化合物多孔材料由中南大学粉末冶金国家重点实验室研制。

1.5 动物分组及给药

按完全随机方法将大鼠分为正常组、模型组、大黄廬虫丸组、精制方组、多孔材料组，每组 10 只。大黄廬虫丸组给予大黄廬虫丸灌服，精制方组大鼠给予精制大黄廬虫丸灌服，多孔材料组大鼠给予通过钛铝金属间化合物多孔材料处理的精制大黄廬虫丸方药。各给药组根据体重按 1 ml/100 g 灌胃，每天 2 次，每天约含 4 g 生药，共 1 周；模型组、正常组给予等体积生理盐水灌胃。

1.6 模型制备

大鼠于实验前 12 h 按上述方法给药 1 次，再于实验前给药 1 次，给药 15 min 后以 2% 戊巴比妥钠 0.0025 ml/g 腹腔注射麻醉，按 FeCl_3 诱导大鼠颈总动脉血栓模型方法^[8-9]，分离大鼠两侧颈总动脉，左侧分离长度约 1.5 cm，其下置小片塑料薄膜（3 cm × 1 cm）用于保护血管周围组织，1 h 后将吸有 20 μl 2.16 mmol/L FeCl_3 溶液的小片滤纸片（1 cm × 1 cm）敷在其上，正常组以等体积生理盐水代替 FeCl_3 溶液。右侧颈总动脉分离约 1.5 cm，穿线备用。每组敷纸片 30 min 后去纸片。去纸片 1.5 h 后，于右侧颈总动脉插管取血。第 1 管取血 0.5 ml，置于含有 EDTA- Na_2 （0.06 mol/L）的抗凝管中；第 2 管 3 ml 置于肝素抗凝管中；第 3 管取 3 ml 置于有 EDTA- Na_2 （0.06 mol/L）的塑料管中，混匀后 3000 r/min 4℃ 离心 15 min，-80℃ 保存备用；第 1 管用于血小板计数，第 2 管用于检测血液流变学，第 3 管测定血栓素 B_2 （ TXB_2 ）和 6-酮-前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ （6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ）及凝血二项（PT 和 APTT）。以上大鼠取血后，迅速剪下造模处颈总动脉血管，放于滤纸片上吸干余血，烘干称重。

1.7 检测指标及方法

①血栓形态学观察:给药 1 周后分别取各组大鼠的颈总动脉,吸除多余水分;入 10% 福尔马林液保存,标本作石蜡切片,HE 染色光镜下观察病理变化。②血栓测量:取血后迅速剪下左侧颈动脉血栓部位血管,用滤纸吸干残血,将取得的血栓放入 40℃ 的烘箱中烘干 40 min,称得血栓干重。③血小板计数:采用全自动血细胞计数仪(美国 ABBOTT 公司 CELL-DYN1700 system 型)进行血小板计数。④血液流变学:使用血液流变学检测仪(北京利普生 LBY-N6 型)检测,血液黏度采用锥—板法测量;血小板黏附性(PADT)采用旋转玻球法,计算血小板黏附率;红细胞变形性采用激光衍射法。⑤凝血二项:采用凝固法检测。⑥ TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 测定:用放射免疫分析法测定。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件对资料进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(LSD 法)。

2 结果

2.1 各组大鼠血栓形态学观察

模型组大鼠造模处血栓形成,完全阻塞血管,血管内皮损伤严重,血栓连续、紧密;血栓主要由大量红细胞、纤维蛋白和血小板组成,亦有少量白细胞可见;精制方组、多孔材料组和大黄廬虫丸组病理变化与模型组比较,血栓形成不完全或已部分溶解,血管内皮损伤较模型组明显减轻;其中大黄廬虫丸组血栓形成不完全,精制方组及多孔材料组血栓部分溶解,多孔材料组已溶解的血管管径较精制方组清晰;而正常组大鼠造模处血管内未见血栓,内皮光滑连续,未见损伤。

2.2 各组大鼠血栓干重、血小板计数、6-keto-PGF_{1α} 及 TXB₂ 水平比较

表 1 示,除正常组外,其余各组均有血栓形成。与模型组比较,大黄廬虫丸组、精制方组和多孔材料

组血栓干重减轻($P < 0.05$);多孔材料组较精制方组和大黄廬虫丸组血栓干重降低明显($P < 0.05$)。与正常组相比,模型组血小板计数、TXB₂ 水平明显增加,6-keto-PGF_{1α} 降低($P < 0.05$);与模型组比较,大黄廬虫丸组、精制方组和多孔材料组均可以明显降低血小板计数和 TXB₂ 水平,升高 6-keto-PGF_{1α} ($P < 0.05$);多孔材料组较精制方组和大黄廬虫丸组降低血小板计数和 TXB₂ 水平明显($P < 0.05$);但精制方组与大黄廬虫丸组比较,在降低血小板计数、TXB₂ 水平方面差异无统计学意义($P > 0.05$);大黄廬虫丸组、精制方组和多孔材料组在升高 6-keto-PGF_{1α} 方面差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠凝血指标与大鼠血液流变学指标比较
表 2 示,与正常组比较,模型组全血低切黏度(LBD)、中切黏度(MBD)、高切黏度(HBD)和血浆黏度(η_p)都有明显增高,APTT、PT 均缩短($P < 0.05$)。与模型组比较,大黄廬虫丸组、精制方组和多孔材料组 LBD、MBD、HBD 和 η_p 均降低,APTT、PT 均明显延长($P < 0.05$)。多孔材料组较精制方组和大黄廬虫丸组降低 LBD、升高 PT 和 APTT 明显($P < 0.05$),而大黄廬虫丸组、精制方组和多孔材料组在降低 MBD、HBD、 η_p 方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

本实验采用 FeCl₃ 外敷建立动脉血栓模型大鼠,观察精制大黄廬虫丸的抗血栓疗效,发现精制大黄廬虫丸能不同程度的降低血液黏度及聚集度。而经钛铝金属间化合物多孔材料处理的精制大黄廬虫丸在降低血液黏度方面上明显优于大黄廬虫丸组和精制方组,提示钛铝金属间化合物多孔材料能够分离筛选更多的有效成分。大黄廬虫丸给药后均可使模型大鼠 APTT、PT 延长。但大黄廬虫丸原方与精制方比较,两者在延长大鼠凝血酶时间方面差异无统计学意义,说明精制方在减少药物组成后的药效学并没有降低。同时,多孔材料组在延长凝血酶时间方面,明显优于大黄廬虫丸组和精制方组。大

表 1 各组大鼠血栓干重、血小板计数、6-keto-PGF_{1α} 及 TXB₂ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血栓干重(10 ⁻⁴ g)	血小板计数(×10 ⁹ /L)	6-keto-PGF _{1α} (pg/ml)	TXB ₂ (pg/ml)
正常组	10	0	685.19±105.35	155.38±15.54	74.23±11.64
模型组	10	26.62±3.75	1485.26±188.38*	91.27±10.23*	145.17±18.45*
大黄廬虫丸组	10	21.36±3.15▲	917.42±129.78▲	129.11±13.63▲	97.18±13.08▲
精制方组	10	20.89±3.54▲	926.15±103.28▲	125.59±12.71▲	96.51±9.34▲
多孔材料组	10	17.21±2.87▲#△	717.35±112.47▲#△	124.28±11.65▲	75.85±10.17▲#△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$;与大黄廬虫丸组比较,△ $P < 0.05$;与精制方组比较,△ $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠凝血指标与血液流变学指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LBD(mpa·s)	MBD(mpa·s)	HBD(mpa·s)	η_p (mpa·s)	PT(s)	APTT(s)
正常组	10	9.25±1.97	5.31±1.28	3.46±0.62	1.28±0.21	19.47±4.51	64.25±7.68
模型组	10	12.77±1.53*	7.87±1.25*	5.21±1.25*	1.67±0.24*	10.34±2.22*	32.39±8.15*
大黄蟾虫丸组	10	11.05±1.74▲	5.91±1.57▲	3.83±0.63▲	1.31±0.33▲	15.11±2.75▲	51.18±10.01▲
精制方组	10	11.02±1.79▲	5.79±1.73▲	3.51±0.58▲	1.24±0.31▲	15.48±2.79▲	52.51±9.87▲
多孔材料组	10	9.68±1.85▲#△	5.48±1.55▲	3.55±0.47▲	1.27±0.25▲	18.16±3.95▲#△	61.85±10.25▲#△

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$;与大黄蟾虫丸组比较,# $P<0.05$;与精制方组比较,△ $P<0.05$

黄蟾虫丸能够降低各组大鼠的血小板计数,而且精制大黄蟾虫丸与原方比较差异无统计学意义,说明两者都能降低血小板计数,其疗效相当,但多孔材料组在降低血小板计数上明显高于大黄蟾虫丸组和精制方组,提示经多孔材料处理后精制方更加浓缩,药效更加明显。

血小板的聚集功能与血小板及血管内皮细胞花生四烯酸(AA)代谢也有密切关系,血小板激活时,在磷脂酶A₂和C的作用下,AA由血小板膜磷脂上分离出来,在环氧化酶作用下生成不稳定的中间物前列腺素G₂(PGG₂)和前列腺素H₂(PGH₂),前者经血栓素A₂(TXA₂)合成酶催化形成TXA₂,后者则生成前列腺素I₂(PGI₂)。TXA₂具有强烈的促血小板聚集和血管收缩作用,PGI₂具有强烈的抑制血小板聚集和舒张血管作用^[10]。TXA₂和PGI₂是体内调节血小板聚集的一对生物活性物质,二者的平衡是影响血小板功能的主要因素。血浆或组织中的TXA₂/PGI₂失衡是造成血小板聚集、血管痉挛收缩或血栓形成的原因之一^[11-14]。精制大黄蟾虫丸能够降低动脉血栓形成大鼠TXB₂水平,升高6-keto-PGF_{1α}水平,提示精制大黄蟾虫丸抑制血小板聚集机制可能与AA的代谢途径有关。

综上所述,精制大黄蟾虫丸能明显抑制大鼠动脉血栓形成,能改善血液流变性,明显延长PT和APTT;并不同程度的升高6-keto-PGF_{1α}的水平,降低TXB₂的水平。精制大黄蟾虫丸与原方比较,两者在抑制动脉血栓形成方面无明显差异,其药效相当。经钛铝金属间化合物多孔材料处理的精制大黄蟾虫丸在抑制动脉血栓形成方面明显优于未处理的精制大黄蟾虫丸。钛铝金属间化合物多孔材料可广泛应用于中药的分离筛选,具有耐酸碱、耐高温、再生性好等优点,前景广阔。这也实现了中医药与材料科学的学科交叉与融合。

参考文献

- [1]王东生,陈方平,贺石林,等.大黄蟾虫丸血浆药理学与血清药理学作用的比较研究[J].血栓与止血学,2005,11(1):5-8.
- [2]王东生,陈方平,贺石林,等.大黄蟾虫丸抗血小板活化的机制研究[J].中华中医药杂志,2008,23(9):114-117.
- [3]王东生,陈方平,贺石林,等.大黄蟾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]王东生,陈方平,贺石林,等.大黄蟾虫丸抗动脉血栓形成的基因表达谱研究[J].中药材,2009,32(9):1410-1413.
- [5]魏星,王战义,李佶阳,等.大黄蟾虫丸抗动脉血栓的正交实验研究[J].中药材,2012,35(1):106-111.
- [6]黄虎军,贺跃辉,江焱,等. Ti-Al系金属间化合物多孔材料的制备和性能[J].材料研究学报,2007,4(21):18-23.
- [7]江焱,贺跃辉,黄伯云,等. Ti-Al金属间化合物多孔材料的研究进展[J].中国材料进展,2010,29(3):18-22.
- [8]Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arteriothrombosis induced by ferric chloride[J]. Thromb Res, 1990, 60(4):269-280.
- [9]邓常青,唐映红,梁燕,等. Fecl₃诱导的大鼠颈总动脉血栓模型血浆TXA₂ PGI₂抗凝和纤溶活性的变化[J].中国药理学通报,2006,22(11):1353-1355.
- [10]Straub A, Krajewski S, Hohmann JD, et al. Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011,31(7):1607-1616.
- [11]Broos K, Feys HB, De Meyer SF, et al. Platelets at work in primary hemostasis[J]. Blood Rev, 2011,25(4):155-167.
- [12]Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis[J]. Thromb Haemost, 2011, 105(Suppl 1):34-42.
- [13]de Candia M, Liantonio F, Carotti A, et al. Fluorinated benzyloxyphenyl piperidine-4-carboxamides with dual function against thrombosis; inhibitors of factor Xa and platelet aggregation[J]. J Med Chem, 2009, 52(4):1018-1028.
- [14]Busch G, Steppich B, Sibbing D, et al. Bivalirudin reduces platelet and monocyte activation after elective percutaneous coronary intervention[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(2):340-344.

(收稿日期:2012-08-16;修回日期:2012-10-22)

© 2013-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net [编辑:邓媛]