

Z-没药甾酮对急性血瘀模型大鼠凝血和血管内皮功能的改善作用及其机制研究^Δ

李宏力^{1*}, 李玉文², 刘天龙², 文爱东^{2#}(1.陕西能源职业技术学院医学护理系, 西安 710613; 2.第四军医大学附属西京医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2615-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.08

摘要 目的:研究Z-没药甾酮(Z-GL)对急性血瘀模型大鼠凝血和血管内皮功能的改善作用及其机制。方法:将40只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(阿司匹林片, 50 mg/kg)和Z-GL低、高剂量组(25、50 mg/kg), 每组8只, 各给药组大鼠每12 h ig相应药物1次, 正常组和模型组大鼠ig生理盐水, 连续给药7次。第5次给药后, 除正常组外其余各组大鼠ih盐酸肾上腺素+冰水刺激复制急性血瘀模型。给药结束后30 min内, 取腹主动脉血检测凝血指标[凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)], 并取大鼠颈动脉观察其病理变化。将人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和Z-GL低、高浓度组(25、50 μmol/L), 培养24 h后, 对模型组和Z-GL组细胞进行氧糖剥夺6 h, 检测细胞中磷酸化内皮型一氧化氮合成酶(p-eNOS)蛋白表达水平; 另取细胞, 分组、给药、处理方式同上, 检测细胞中一氧化氮(NO)水平。结果:与正常组比较, 模型组大鼠PT、TT、APTT缩短, FIB含量增加($P<0.01$), 颈动脉内皮受损、血管内皮细胞部分从血管壁脱落; 与模型组比较, 各给药组大鼠TT、PT、APTT延长, FIB含量减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 血管内皮受损程度减轻。p-eNOS蛋白及NO检测结果显示, 与模型组比较, Z-GL给药组细胞中p-eNOS蛋白表达及NO水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:Z-GL能有效改善血瘀模型大鼠凝血和血管内皮功能, 其机制可能与其激活eNOS、升高细胞内NO水平有关。

关键词 Z-没药甾酮; 血瘀证; 凝血功能; 血管内皮功能; 内皮型一氧化氮合成酶; 大鼠; 人脐静脉血管内皮细胞

Study on Improvement Effect of Z-Guggulsterone on Coagulation and Vascular Endothelial Functions of Acute Blood-stasis Model Rats and Its Mechanism

LI Hongli¹, LI Yuwen², LIU Tianlong², WEN Aidong²(1.Dept. of Medical Nursing, Shaanxi Energy Institute, Xi'an 710613, China; 2.Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect of Z-Guggulsterone (Z-GL) on blood coagulation and vascular endothelial functions of acute blood-stasis model rats and its mechanism. METHODS: 40 rats were randomly divided into normal group, model group, positive group (Aspirin tablet, 50 mg/kg) and Z-GL low-dose and high-dose groups (25, 50 mg/kg), with 8 rats in each group. They were given relevant medicine intragastrically every 12 h, and normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically for consecutive 7 times. After the fifth administration, except for normal group, those groups were given adrenalin hydrochloride subcutaneously+ice-cold water to induce acute blood-stasis model. Within 30 min after the last administration, aorta abdominalis sample were selected to detect the coagulation parameters [prothrombin time (PT), thrombin time (TT), activated partialthromboplastin time (APTT), fibrinogen (FIB)], and pathological changes of carotid artery were observed. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into blank group (normal saline), model group (normal saline) and Z-GL low-concentration and high-concentration groups (25, 50 μmol/L). After culturing for 24 h, the cells were exposed to glucose and oxygen deprivation for 6 h in model group and Z-GL groups. The expression of p-eNOS protein was detected. Other cells were selected, grouped, administrated and treated as above cells, and the NO level of these cells were detected. RESULTS: Compared with normal group, PT, TT and APTT were all shortened in model group, while FIB content was increased ($P<0.01$); vascular endothelium was injured, and endothelial cells fell off from the wall. Compared with model group, PT, TT and APTT were prolonged in administration groups, while FIB content was decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); vascular endothelium injury was relieved. Results of p-eNOS protein and NO levels determination showed that compared with model group, p-eNOS protein and NO levels were increased in Z-GL groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Z-GL can significantly improve coagulation and vascular endothelium functions of blood-stasis model rats, and its mechanism may be associated with the activation of eNOS and the increase of NO level.

KEYWORDS Z-Guggulsterone; Blood-stasis; Coagulation function; Vascular endothelium functions; eNOS; Rat; Human umbilical vein endothelial cells

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373947)

* 副教授, 硕士。研究方向:中药药理学。电话:029-83928278。

E-mail: lihongli-1221@126.com

通信作者:主任药师, 博士生导师, 博士。研究方向:中药药理学。电话:029-84773636。E-mail: adwen-2004@hotmail.com

没药为橄榄科植物没药树或其他同属植物茎干部渗出的油胶树脂, 具有活血止痛、消肿生肌之功效, 其主要成分为树脂、树胶、苦味素和挥发油等^[1]。现代医学研究证实没药具有抗炎、镇痛、保护黏膜、抗血吸虫等多种药理活性^[2]。在印度, 没药被广泛用于抗肥胖、抗凝血和抗动脉粥样硬化^[3]。其抗血

脂的主要活性成分为Z-没药甙酮(Z-GL)和E-没药甙酮(E-GL),二者为同分异构体。研究显示,Z-GL和E-GL对总血脂、总胆固醇和血小板凝集有显著的抑制作用^[3]。

内皮型一氧化氮合酶(eNOS)广泛分布于心血管系统中,它在相当短的时间内即可被Ca²⁺激活,从而催化左旋精氨酸(L-Arg)生成水溶性气体一氧化氮(NO),生成的NO具有抑制血小板活化聚集和单核巨噬细胞的黏附、抑制内皮细胞和平滑肌细胞增殖以及维持血管内环境稳定等生物学活性^[4]。内皮细胞的功能可因缺血、脂质沉积、血流动力学的机械力等而受损,从而导致内皮功能失调。内皮功能失调主要表现为内皮依赖性舒张功能障碍,以NO生化活性减低为特征^[5]。蛋白激酶介导的磷酸化是调节eNOS活性的主要翻译后修饰,其中最经典的功能性磷酸化序列是位于还原酶区的丝氨酸位点ser1177^[6]。在本研究中,笔者拟通过体内实验研究Z-GL对血瘀证大鼠凝血功能和血管内皮的改善作用,并通过体外细胞实验探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

1510-01141C型酶标仪(美国Thermo Scientific公司);BX60PM20型显微镜(日本Olympus公司);TDZ4A-WS型台式低速离心机(上海斯祁科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

Z-GL(上海甄准生物科技有限公司,批号:12100905,纯度:>98%);阿司匹林肠溶片(德国拜耳医药保健有限公司,批号:BJ11735,规格:100 mg/片);盐酸肾上腺素注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号:1302221,规格:1 ml/支);凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);NO检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);抗磷酸化内皮型一氧化氮合酶(p-eNOS)抗体、山羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 动物

健康SD大鼠40只,♂,体质量220~280 g,由第四军医大学动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK-(军)2007-007]。

1.4 细胞

人脐静脉血管内皮细胞(HUEVCs)购自上海兴明生物医药技术有限公司。

2 方法

2.1 动物分组、给药与造模

将40只SD大鼠随机均分为5组,即正常组、模型组、阳性组和Z-GL低、高剂量组。阳性组大鼠ig阿司匹林肠溶片50 mg/kg^[7],Z-GL组大鼠分别ig Z-GL 25、50 mg/kg(在没药甙酮的心脏保护作用研究中,50 mg/kg Z-GL可有效发挥抗异丙肾上腺素诱导的心肌损伤作用^[7],因此选此剂量为本次体内实验的高剂量,其0.5倍剂量为本次体内实验的低剂量),正常组和模型组大鼠ig等容生理盐水,每12 h给药1次,连续给药7次。第5次给药后,除正常组大鼠外其余各组大鼠ih盐酸肾上腺素(0.8 mg/kg)2次,2次间隔4 h,中间给予冰水(0~2℃)刺激以复制大鼠急性血瘀模型^[6]。

2.2 各组大鼠凝血指标的测定

末次给药后30 min内,各组大鼠均ip 3.5%水合氯醛麻醉,经腹主动脉取血2 ml,置于加有3.8%枸橼酸钠抗凝的EP管中,以离心半径为10 cm、2 500 r/min离心15 min,取血浆测定PT、TT、APTT、FIB水平。

2.3 各组大鼠颈动脉组织病理观察

于取血同时取大鼠颈动脉,置10%福尔马林液中,固定,

石蜡包埋,切片,行苏木精-伊红(HE)染色,观察大鼠颈动脉病理变化。

2.4 HUEVCs氧糖剥夺模型的制备^[8]

将HUEVCs的培养液换成磷酸盐缓冲液(PBS),将细胞置于密封缺氧装置中,持续通入95% N₂和5% CO₂。5 min后同时关闭缺氧装置进、出气口,取出细胞放入37℃恒温孵育箱中孵育6 h。取出,吸弃PBS溶液,加入正常培养基(DMEM,含10%胎牛血清),再放回5% CO₂、37℃孵育箱中正常培养24 h。

2.5 HUVECs中p-eNOS表达的测定

采用免疫荧光法。将用95%酒精润洗的盖玻片烘干并灭菌,置于6孔板中,将细胞接种于6孔板中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养,待细胞长满80%左右,将细胞分为空白组、模型组和Z-GL低、高浓度组(25、50 μmol/L)。各组细胞培养24 h后,除正常组外,其余各组细胞均按“2.4”项下方法进行氧糖剥夺,空白组细胞常规培养(正常培养基,37℃、5% CO₂培养箱中孵育)。将6孔板取出用4%多聚甲醛固定15 min, PBS漂洗3次,每次5 min。0.5%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton)穿孔30 min, PBS漂洗3次,每次5 min。1%牛血清白蛋白(BSA)封闭10 min。加入1% BSA稀释的抗p-eNOS抗体(1:200),摇床上温和振荡30 min,4℃冰箱过夜。取出6孔板, PBS漂洗2次,每次5 min,加入1% BSA稀释的山羊抗兔二抗(1:200),避光,摇床上温和振荡30 min,37℃放置1 h。PBS漂洗2次,每次5 min,加入5 μg/ml 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色2 min。将盖玻片固定于载玻片上,显微镜下观察细胞荧光强度。

2.6 HUVECs中NO水平的测定

取对数生长期的HUVECs,胰酶溶液消化,调整细胞密度为5×10⁴ ml⁻¹,均匀接种于96孔板上,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h后,将细胞分为空白组、模型组和Z-GL低、高浓度组(25、50 μmol/L)。培养24 h后,模型组和Z-GL低、高浓度组细胞按“2.4”项下方法进行氧糖剥夺,空白组细胞给予常规培养(正常培养基,37℃、5% CO₂培养箱中孵育)。培养结束后按照试剂盒说明书的操作步骤进行NO检测。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较行LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠凝血指标的测定结果

与正常组比较,模型组大鼠PT、TT、APTT显著缩短,FIB含量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,Z-GL低、高剂量组和阳性组大鼠PT、TT、APTT显著延长,FIB含量显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠血浆凝血指标测定结果见表1。

表1 各组大鼠凝血指标测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Coagulation parameters of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	TT,s	PT,s	APTT,s	FIB,g/L
正常组		46.01±2.37	13.06±0.25	24.71±0.45	1.83±0.02
模型组		28.93±4.43*	8.55±0.18*	17.19±0.73*	4.34±0.30*
Z-GL低剂量组	25	34.56±2.06**	9.23±0.30*	18.94±0.64*	3.51±0.33**
Z-GL高剂量组	50	43.90±2.18**	11.48±0.35**	22.13±0.36**	2.47±0.78**
阳性组	50	44.36±2.23**	11.61±0.36**	22.17±0.21**	2.39±0.62**

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 各组大鼠颈动脉病理变化的观察结果

与正常组比较,模型组大鼠颈动脉内皮损伤,部分血管内皮细胞从血管壁脱落。与模型组比较,Z-GL低、高剂量组和阳性组大鼠内皮损伤程度均有显著改善。各组大鼠颈动脉病理

切片见图1。

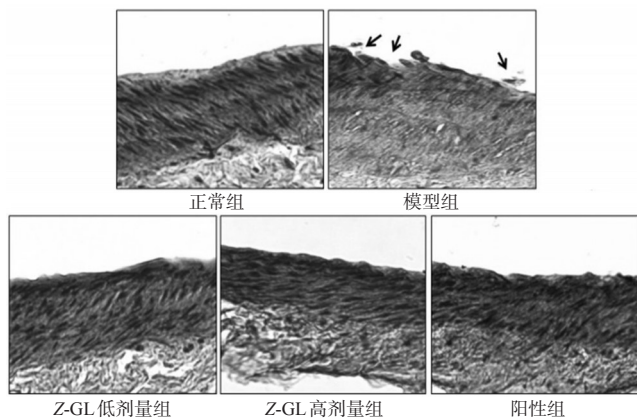


图1 各组大鼠颈动脉病理切片(×40)

Fig 1 Pathological section of carotid artery of rats in each group(×40)

3.3 各组细胞中p-eNOS表达的测定结果

与空白组(平均荧光密度为 652 ± 96.87 ,下同)比较,模型组细胞中p-eNOS表达水平(353 ± 22.63)显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,Z-GL低、高浓度组细胞中p-eNOS表达水平[(457 ± 96.17)、(471 ± 82.73)]显著升高($P < 0.01$)。

3.4 各组细胞中NO水平的测定结果

与空白组比较,模型组细胞中NO水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,Z-GL低、高浓度组细胞中NO水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞中NO水平测定结果见图2。

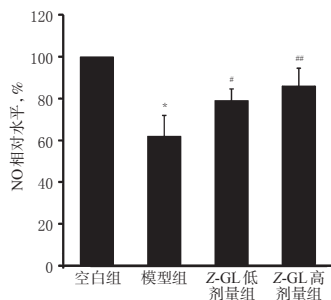


图2 各组细胞中NO水平测定结果

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

Fig 2 NO level in cells in each group

Note: vs. blank group,* $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

4 讨论

中国传统医药学认为血瘀证通常是指因气虚、气滞、寒凝、火热等原因,导致的血瘀而血行不畅^[9]。活血化瘀药物具有改善血流动力学及血液流变学、抑制血栓形成、降血压、保护血管壁及内皮细胞、调节免疫功能等多种药理活性。2010年第8次全国中西医结合治疗血瘀证及活血化瘀研究学术大会上将凝血指标异常列为血瘀证的实验室诊断标准^[10]。中医讲“寒则涩而不流,温则消而去之”,本研究采用急性寒凝血瘀大鼠模型,在两次给予大鼠盐酸肾上腺素的间隔给予冷水刺激。结果显示与正常组比较,模型组大鼠PT、TT、APTT明显缩短,FIB含量明显增加,表明在本次实验中造模是成功的。

血凝的第一阶段为凝血酶原激活物的形成,分为内源性凝血系统和外源性凝血系统。外源性凝血是指受伤的组织释放凝血因子Ⅲ进入血浆,参与形成凝血酶原激活物。内源性凝血系统主要是指血管内膜损伤后暴露胶原,引发一系列凝血因子(Ⅻ、Ⅺ、Ⅸ、Ⅷ、Ⅹ、Ⅴ)的活化,形成凝血酶原激活物。

血液的高凝状态是血瘀证产生的中药病理、生理基础^[11]。本研究结果显示,Z-GL可显著延长血瘀证大鼠的PT、TT和APTT,显著改善血液的高凝状态。并且组织形态学观察结果显示,模型组大鼠的颈动脉内皮损伤,部分血管内皮细胞从血管壁脱落;与模型组比较,Z-GL组内皮损伤程度有显著改善,与凝血指标的结果一致。

因体外氧糖剥夺模型可以在体外细胞水平模拟血瘀证状态下对血管内皮的损伤作用^[8],因此本研究利用体外细胞进行机制研究。在体外HUEVCs细胞中建立的氧糖剥夺模型中,Z-GL能显著增强p-eNOS的表达,增强eNOS活性,并且细胞内NO水平与p-eNOS的表达水平均得到明显升高。阿司匹林具有抑制血小板环氧化酶、防止血小板黏附聚集作用,并可通过促进eNOS ser1177位点磷酸化,增强NOS活性,提高血管内皮细胞NO水平,故本研究选其作为阳性药物^[12]。

综上所述,Z-GL能显著延长血瘀证大鼠的凝血时间,减少FIB含量,改善血瘀证大鼠的凝血状态,维持血管内环境的稳定。其机制可能与激活eNOS、升高细胞内NO水平有关。

参考文献

- [1] 叶建红.对药乳香没药的药理作用与临床应用体会[J].安徽中临床杂志,2003,15(3):264.
- [2] 万文珠,娄红详.没药的化学成分和药理作用[J].国外医药植物药分册,2005,20(6):236.
- [3] Kimura I, Yoshikawa M, Kobayashi S, et al. New triterpenes, myrrhanol a and myrrhanone a, from guggul-gum resins, and their potent anti-inflammatory effect on adjuvant-induced air-pouch granuloma of mice[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(8):985.
- [4] Huige L, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease[J]. *J Pathol*, 2000, 190(3):244.
- [5] Luscher T. Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system[J]. *Heart*, 2000, 84(Suppl 1):i20.
- [6] Thorsa B, Halldórsson H, Thorgeirsson G. eNOS activation mediated by AMPK after stimulation of endothelial cells with histamine or thrombin is dependent on LKB1[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1813(2):322.
- [7] Chander R, Rizvi F, Khanna AK, et al. Cardioprotective activity of synthetic guggulsterone (E and Z-isomers) in isoproterenol induced myocardial ischemia in rats: a comparative study[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2003, 18(2):71.
- [8] Wang M, Chen M, Ding Y, et al. Pretreatment with β -boswellic acid improves blood stasis induced endothelial dysfunction: role of eNOS activation[J]. *Sci Rep*, 2015, doi:10.1038/srep15357.
- [9] 颜正华.中药学[M].2版北京:人民卫生出版社,2005:613.
- [10] 王明明,陈敏纯,李玉文,等.羟基红花黄色素A联用 β -乳香酸对血瘀证模型大鼠凝血功能、NO、cGMP的影响[J].中国药房,2014,25(47):4417.
- [11] Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, et al. Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis[J]. *Nature*, 2001, 413(6851):74.
- [12] Hetzel S, Demets D, Schneider R, et al. Aspirin increases nitric oxide formation in chronic stable coronary disease[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013, 18(3):217.

(收稿日期:2016-03-22 修回日期:2016-05-06)

(编辑:林 静)