

# 羟基红花黄色素 A 联用 $\beta$ -乳香酸对血瘀证模型大鼠凝血功能、NO、cGMP 的影响<sup>△</sup>

王明明<sup>1,2\*</sup>, 陈敏纯<sup>2</sup>, 李玉文<sup>2</sup>, 丁一<sup>2</sup>, 张一恺<sup>2</sup>, 卫培峰<sup>1</sup>, 文爱东<sup>2#</sup> (1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 第四军医大学附属西京医院, 西安 710032)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4417-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.01

**摘要** 目的: 研究羟基红花黄色素 A(HSYA) 联用 $\beta$ -乳香酸( $\beta$ -BA) 对血瘀证模型大鼠凝血功能、一氧化氮(NO) 与环磷酸鸟苷(cGMP) 的影响。方法: 48 只 SD 大鼠随机分为正常对照(等容生理盐水) 组、模型(等容生理盐水) 组、阿司匹林(100 mg/kg) 组、HSYA(100 mg/kg) 组、 $\beta$ -BA(200 mg/kg) 组、联合用药(HSYA 50 mg/kg+ $\beta$ -BA 100 mg/kg) 组, 每 12 h 灌胃给药 1 次, 连续 7 次。第 5 次给药后给予大鼠皮下注射盐酸肾上腺素(0.8 mg/kg) 2 次, 间隔 4 h, 中间给予冰水刺激以复制大鼠急性血瘀证模型。末次给药 30 min 内取腹主动脉血检测凝血指标和 NO、cGMP 水平, 并取大鼠颈动脉观察其病理变化。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠血浆凝血酶时间(TT)、血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT) 缩短, 纤维蛋白原(FIB) 含量增加, NO、cGMP 水平降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); 病理切片表明, 大鼠颈动脉内皮受损, 血管内皮细胞部分从血管壁脱落。与模型组比较, HSYA 组、 $\beta$ -BA 组、联合用药组大鼠血浆 TT、PT、APTT 延长, FIB 含量减少, NO、cGMP 含量增加, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); 大鼠血管内皮受损程度改善, 且联合用药较单独用药效果明显。结论: HSYA 联用 $\beta$ -BA 能显著改变血瘀证大鼠的凝血功能, 增加血浆 NO 与 cGMP 的含量。

**关键词** 羟基红花黄色素 A;  $\beta$ -乳香酸; 血瘀证; 凝血功能; 一氧化氮; 环磷酸鸟苷

## Effect of the Combination of HSYA and $\beta$ -boswellic Acid on Coagulation Function, NO and cGMP in Blood-stasis Model Rats

WANG Ming-ming<sup>1,2</sup>, CHEN Min-chun<sup>2</sup>, LI Yu-wen<sup>2</sup>, DING Yi<sup>2</sup>, ZHANG Yi-kai<sup>2</sup>, WEI Pei-feng<sup>1</sup>, WEN Ai-dong<sup>2</sup> (1. Shaanxi University of TCM, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2. Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effect of HSYA (HSYA) and  $\beta$ -boswellic acid (BA) on blood coagulation, nitric oxide (NO) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in blood-stasis model rats. METHODS: 48 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), aspirin group (100 mg/kg), HSYA group (100 mg/kg),  $\beta$ -BA group (200 mg/kg), drug combination group (HSYA 50 mg/kg+ $\beta$ -BA 100 mg/kg). They were given relevant medicine intragastrically every 12 h for consecutive 7 times. After the fifth administration, the model rats were given adrenalin hydrochloride(0.8 mg/kg) subcutaneously twice with an interval of 4 h. During the interval between two injections, ice-cold water was used to induce acute blood stasis model. Blood samples were collected within 30 min after the last administration to detect the coagulation parameters, NO and cGMP concentration; the pathological changes of carotid artery were observed. RESULTS: Compared with normal control group, the thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were all shortened in model group; the content of fibrinogen content (FIB) increased while the concentration of NO and cGMP decreased; there was statistical significance ( $P < 0.01$ ). Rats' vascular endothelium was impaired, and part of their vascular endothelial cell fell off from vascular wall. Compared with model group, TT and APTT were prolonged and the content of FIB decreased in HSYA group,  $\beta$ -BA group and drug combination group; there was statistical significance ( $P < 0.01$ ). Vascular endothelium injury were improved, and the effect of drug combination was more obvious than single drug. CONCLUSIONS: HSYA and  $\beta$ -boswellic acid can significantly improve coagulation function and increase NO and cGMP concentrations in blood-stasis model rats.

**KEYWORDS** HSYA;  $\beta$ -BA; Blood-stasis; Coagulation function; NO; cGMP

<sup>△</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81373947)

\* 药师, 硕士研究生。研究方向: 临床中药学。电话: 029-84775475-8303。E-mail: wangmm130@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 临床药理学, 中药药效物质基础。电话: 029-84775475-8401。E-mail: adwen@fmmu.edu.cn

1665 年,《外科大成》卷中将红花-乳香配方命名为活血定痛汤, 主治活血祛瘀、定痛, 二药相须相使。其中, 红花长于活血化瘀, 消散癥瘕; 乳香为橄榄科植物卡氏乳香树及同属其他树种植物皮部伤后渗出的油胶树脂<sup>[1]</sup>, 具有活血行气、通经止痛、消肿生肌、追毒之功效。现代医学研究表明, 红花及其有效组分羟基红花黄色素 A(HSYA) 在预防和治疗心脑血管病

中发挥着活血化瘀、抗炎、抗氧化、促进血液循环等重要作用<sup>[2-4]</sup>。在印度的传统医学中,乳香制剂常被用来治疗各种炎症性疾病。现代医学研究表明,乳香及其有效成分乳香酸(BA)在抑制炎症反应与血栓形成、抗氧化方面也具有明确的疗效<sup>[5-6]</sup>。而一氧化氮(NO)-鸟苷酸环化酶(sGC)-环磷酸鸟苷(cGMP)传导途径与改善血液循环障碍密切相关<sup>[7]</sup>。本研究通过研究HSYA联合 $\beta$ -BA对血瘀证大鼠凝血功能和血浆NO、cGMP水平的影响,进一步探讨HSYA和 $\beta$ -BA改善大鼠血瘀证的协同作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1510-01141C型酶标仪、HistoCentre 3型全自动组织包埋机(美国Thermo scientific公司);BX60PM20型显微镜(日本Olympus公司);RM2135型高级组织切片机(美国Leica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

HSYA(中国食品药品检定研究院,批号:111637-201207); $\beta$ -BA(宝鸡市晨光生物科技有限公司,批号:20130424);阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司,批号:BJ11735);盐酸肾上腺素注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号:1302221);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)、cGMP检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;NO检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所。

### 1.3 动物

SD大鼠48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]。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

48只SD大鼠随机均分为6组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、阿司匹林(100 mg/kg)组、HSYA(100 mg/kg)组、 $\beta$ -BA(200 mg/kg)组、联合用药(HSYA50 mg/kg+ $\beta$ -BA100 mg/kg)组。ig给药,每12 h给药1次,连续7次。

### 2.2 模型的复制<sup>[2]</sup>

第5次给药后sc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证模型。

### 2.3 凝血功能的测定

末次给药30 min内,3.5%水合氯醛ip麻醉,经大鼠腹主动脉取血2 ml,以3.8%枸橼酸钠抗凝,以离心半径为10 cm、2 500 r/min离心15 min,取血浆测定PT、APTT、TT、FIB水平。

### 2.4 血浆中NO、cGMP的测定

末次给药30 min内,3.5%水合氯醛ip麻醉,经腹主动脉取血5 ml,肝素抗凝,以离心半径为10 cm、2 500 r/min离心15 min,取血浆,-20℃贮藏,测定NO、cGMP水平。

### 2.5 颈动脉组织病理学观察

取大鼠腹主动脉血,同时取颈动脉,置10%福尔马林液中

固定,石蜡包埋,切片,行苏木素-伊红(HE)染色,观察大鼠颈动脉病理学变化。

## 2.6 统计学方法

采用SPSS19.0软件对实验数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,然后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 联合用药对模型大鼠凝血参数的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠的TT、PT、APTT缩短,FIB增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,HSYA组、 $\beta$ -BA组、联合用药组、阿司匹林组大鼠的TT、PT、APTT延长,FIB减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),且联合用药组改善程度均好于单用药组。联合用药对模型大鼠凝血参数的影响见表1。

表1 联合用药对模型大鼠凝血参数的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 1 Effect of drug combination on blood coagulation parameters of model rats( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	凝血参数			
	TT,s	PT,s	APTT,s	FIB,g/L
正常对照组	46.26±2.17	13.10±0.44	24.06±0.63	1.79±0.08
模型组	27.44±5.18*	8.60±0.29*	17.47±0.83*	4.05±0.40*
HSYA组	37.94±2.98**	9.21±0.26**	19.31±0.73**	3.49±0.20**
$\beta$ -BA组	36.13±2.42**	9.17±0.35*	19.06±0.87**	3.45±0.49**
联合用药组	42.73±1.96**	10.07±0.64**	21.79±0.76**	2.47±0.43**
阿司匹林组	44.27±2.99**	11.99±0.56**	23.08±0.66**	2.40±0.42**

与正常对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. normal control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3.2 联合用药对模型大鼠血浆中NO、cGMP水平的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血浆NO、cGMP水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,HSYA、 $\beta$ -BA、联合用药组、阿司匹林组大鼠血浆NO、cGMP水平增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),且联合用药组改善程度均好于单用药组。联合用药对模型大鼠血浆中NO、cGMP水平的影响见表2。

表2 联合用药对模型大鼠血浆中NO、cGMP水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 Effect of drug combination on the concent of NO and cGMP in model rats( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	NO, $\mu$ mol/L	cGMP,nmol/L
正常对照组	10.98±0.58	16.50±0.38
模型组	4.27±0.18*	9.88±0.31*
HSYA组	7.37±0.78*	12.65±0.31*
$\beta$ -BA组	6.80±0.94*	11.85±0.57*
联合用药组	9.93±0.27*	15.58±0.36*
阿司匹林组	10.75±0.78*	15.99±0.52*

与正常对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与模型组比较: # $P < 0.01$  vs. normal control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: # $P < 0.01$

### 3.3 联合用药对模型大鼠颈动脉病理切片的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠颈动脉内皮受损,部分血

管内皮细胞从血管壁脱落,而HSYA组、 $\beta$ -BA组、联合用药组、阿司匹林组均有所改善。大鼠颈动脉病理切片见图1。

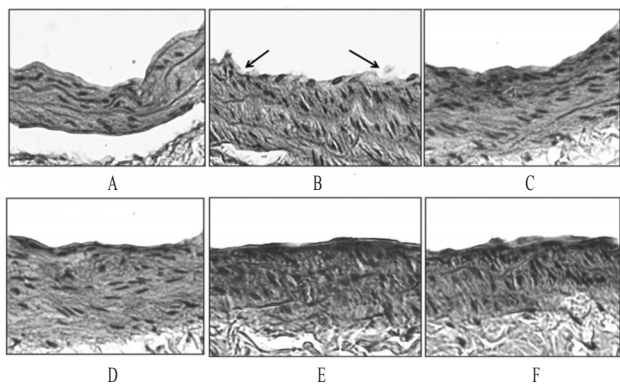


图1 大鼠颈动脉病理切片(40 $\times$ )

Fig 1 Pathological section of rats' carotid artery (40 $\times$ )

A.正常对照组;B.模型组;C.HSYA组;D. $\beta$ -BA组;E.联合用药组;F.阿司匹林组

A.normal control group;B.model group;C.HSYA group;D. $\beta$ -BA组;E. drug combination group;F.aspirin group

#### 4 讨论

“万病”之恶在于瘀,若瘀在头(脑缺血)则诱发脑卒中,瘀在心(心缺血)则造成心梗。现代医学认为,血瘀证血液均有“浓、黏、凝、聚”的改变。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将凝血指标异常、NO含量减少等列为血瘀证的实验室诊断标准。本研究参考相关文献<sup>[2]</sup>,在2次给予盐酸肾上腺素间隔给予冷水刺激造成血液淤滞来复制血瘀证模型,结果模型组较正常组大鼠TT、PT、APTT明显缩短,FIB明显增加,血浆NO、cGMP水平降低,表明模型复制成功。

PT主要用于检测机体外源性凝血系统,其可反映凝血因子VII、X和V的水平;APTT和TT则用于检测机体内源性凝血系统状态,可反映凝血因子XII、XI、前激肽释放酶V、II和I的水平<sup>[8]</sup>。本研究中,模型组大鼠TT、PT、APTT明显降低,FIB明显升高。有研究表明,FIB明显升高可使心血管病患者发生急性血栓栓塞的机会远远高于FIB水平正常人群<sup>[9]</sup>;而HSYA、 $\beta$ -BA能明显延长TT、PT、APTT时间,降低FIB,且HSYA、 $\beta$ -BA联合给药较单独给药效果明显。

NO是由血管内皮细胞中一氧化氮合酶催化L-精氨酸生成的水溶性气体,在维持血管内环境稳定方面具有广泛的生物学活性,包括血管扩张、局部细胞生长调控、保护血管免受血小板和循环血液细胞中的有害物质的损害等。血管内皮细胞产生的NO,一部分参与氧化应激而失活;另一部分进入血管平滑肌细胞刺激可溶性SGC,使cGMP水平增加。cGMP有很多生理作用,包括松弛平滑肌、抑制血小板聚集等,并可降低血小板活化功能,抑制其黏附到血管内皮细胞平面<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,模型组大鼠血浆NO、cGMP水平明显降低;联合用药组大鼠血浆NO、cGMP水平增加,且HSYA和 $\beta$ -BA联合给

药较单独给药效果明显。通过取大鼠颈动脉HE染色可以看出,模型组大鼠颈动脉内皮受损,部分血管内皮细胞从血管壁脱落,而HSYA、 $\beta$ -BA、联合用药均可改善这种情况。

综上所述,HSYA、 $\beta$ -BA联合用药能够延长血瘀证大鼠凝血时间,降低FIB,增加血浆中NO、cGMP的水平,维持血管正常功能。在联合用药组的剂量减半后,效果仍优于单独用药全剂量组,表明两药在改善血瘀证方面“相须”“相使”。

#### 参考文献

- [1] 李平华,赵汉臣,闫荟.CO<sub>2</sub>超临界流体萃取乳香的工艺研究[J].中国药房,2007,18(33):2584.
- [2] Liu L, Duan JA, Tang YP, et al.Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation[J]. *J Ethnopharmacol*,2012, 139(2):381.
- [3] Sun X, Wei XB, Qu SF, et al. Hydroxysafflor Yellow A suppresses thrombin generation and inflammatory responses following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. *Bioorg Med Chem Lett*,2010,20(4):4120.
- [4] Liu YN, Zhou ZM, Chen P. Evidence that hydroxysafflor yellow A protects the heart against ischaemia-perfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2008, 35(2):2116.
- [5] Cuaz-Pérolin C, Billiet L, Baugé E, et al. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF- $\kappa$ B Inhibitor acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswellic acid in LPS-challenged ApoE<sup>-/-</sup>mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2008, 28(2):272.
- [6] Abasi M, Massumi M, Riaz G, et al. The synergistic effect of beta-boswellic acid and Nurr1 overexpression on dopaminergic programming of antioxidant glutathione peroxidase-1-expressing murine embryonic stem cells[J]. *Neuroscience*,2012(222):404.
- [7] 邓礼娟,王琴,原欢欢,等.梓葛冻干粉针对气虚血瘀证大鼠凝血功能、血液流变学和NO的影响[J].中国中药杂志,2012,37(10):1472.
- [8] 宁天一,王婷婷,姜静,等.气滞血瘀证大鼠NO/NOS体系的变化[J].世界中医药,2013,8(1):71.
- [9] Chan KC, Yin MC, Chao WJ. Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats[J]. *Food Chem Toxicol*,2007,45(3):502.

(收稿日期:2014-09-03 修回日期:2014-10-09)