

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.03.004

龙匙片活血化瘀作用研究

孙会静¹, 李 丽^{2△}

(1. 广西壮族自治区人民医院, 广西 南宁 530021; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530222)

摘要:目的 通过不同试验方法和动物模型对龙匙片活血化瘀的作用进行验证,为临床合理用药提供依据。方法 采用在冰水中游泳后皮下注射肾上腺素(AD)的大鼠制造急性血瘀模型,观察龙匙片对血液流变学的影响;采用AD制造肠系膜急性微循环障碍大鼠模型,观察龙匙片对微循环障碍的改善作用;采用体外法,观察龙匙片对凝血酶原时间(PT)及活化部分凝血活酶时间(APTT)的影响。结果 龙匙片可显著降低大鼠的血浆黏度、全血黏度、血纤维蛋白原含量、血沉及血小板黏附率,可抑制大鼠肠系膜微循环动脉管径缩小、流速减慢、毛细血管开放量减少及流态改变,可延长PT和APTT。结论 龙匙片可改善血液流变学和微循环障碍,具有活血化瘀作用。

关键词:龙匙片;活血化瘀;微循环障碍;SD大鼠

中图分类号:R285.5;R286

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)03-0015-04

Research on Activating Blood Circulation to Dissipate Blood Stasis Effect of Longchi Tablets

Sun Huijing¹, Li Li²

(1. The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi, China 530021;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530222)

Abstract: Objective To verify the effect of Longchi Tablets on activating blood circulation to dissipate blood stasis by several methods and animal models, and provide the evidences for its clinical use. **Methods** The acute blood-stasis rats models were established by hypodermic injection of adrenergic(AD) after swimming in ice water, the effect of Longchi Tablets on hemorheology was observed. The mesenteric microcirculatory disturbance rats models were established by injected with adrenergic, the effect of Longchi Tablets on microcirculatory disturbance was observed. The effect of Longchi Tablets on PT and APTT was observed by *in vitro* method. **Results** Longchi Tablets could significantly reduce the plasma viscosity, whole blood viscosity, blood fibrinogen concentration, erythrocyte sedimentation and platelet adhesion rate of the rats, it could inhibit the narrowing of the arteriole diameter of the mesenteric microcirculation, slow blood flowing rate, reduction of open capillary and the change of the blood flow pattern in rats, and could prolong the PT and APTT. **Conclusion** Longchi Tablets can improve the hemorheology and microcirculatory disturbance, and have the ability of activating blood circulation to dissipate blood stasis.

Key words: Longchi Tablets; activating blood circulation to dissipate blood stasis; microcirculatory disturbance; SD rats

龙匙片主要由匙羹藤、龙血竭、甘草组方,是广西壮族自治区人民医院的临床经验方,使用时间已超过15年,主要用于治疗糖尿病及其并发症,疗效显著。但其活血化瘀的作用研究目前尚未见相关报道,本研究中通过建立急性血瘀和微循环障碍大鼠模型,观察龙匙片对血液流变学、微循环障碍、凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)的影响,进一步了解龙匙片的作用特点,为其临床应用提供依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、动物与试药

1.1.1 仪器

BI-2000型医学图像分析系统(成都泰盟软件有限公司);全自动动物生化分析仪(美国Drew公司);LG-R-80C型全自动血液黏度仪(北京中科富邦LG-R-80C);微量离心机(德国艾本德Minispin

plus公司);体外血栓形成仪、血小板黏附仪(北京第二生化仪器厂)。

1.1.2 动物

SD大鼠120只,体质量180~220g,雌雄各半,实验动物质量合格证号SCXK桂2009-0003。家兔,体质量2.0~2.5kg,实验动物质量合格证号SCXK桂2009-0005。均购自广西医科大学实验动物中心。

1.1.3 试药

龙匙片由匙羹藤12.5g、龙血竭1.5g、甘草9g组方,龙匙片低、中、高3个剂量(分别相当于临床日用量的8倍、15倍、30倍)以龙匙片生药3.06,5.75,11.5g/(kg·d)制备,加入纯净水,充分研磨,混匀;复方丹参片(阳性对照药,广州白云山制药股份有限公司,批号为130918);肾上腺素(AD,武汉远大制药集团有限公司,批号为20130713);APTT检测试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司,PT检测试剂盒购自保定天

第一作者:孙会静(1986-),硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)306357383@qq.com。

△通信作者:李丽(1973-),博士研究生,教授,研究方向为药理学,(电子信箱)317064189@qq.com。

岳生物工程有限公司;链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 对急性血瘀 SD 大鼠模型的影响^[1-3]

将 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组[复方丹参片 5.0 g/(kg·d)],以及龙匙片高、中、低剂量组,各 10 只。各组按照试验方案给药,每日 1 次,给药容积为每 100 g 体质量 2 mL,连续 14 d。第 13 天,皮下注射 AD(10 μg/kg),2 h 后,将大鼠置 0~4℃冰水中游泳 5 min;2 h 后再次皮下注射 AD,建立急性血瘀 SD 大鼠模型^[4-5]。末次给药后 2 h,以 25%乌拉坦(7 mL/kg,腹腔注射)麻醉,剪尾取血,测定凝血时间;随后从颈总动脉取血,其中 1.5 mL 采用肝素抗凝,置 35℃恒温水浴;1.2 mL 注入装有枸橼酸钠的硅管中;0.1 mL 用于血小板黏附率测定。以上血样经抗凝处理后,用于测定血液流变学指标。另取 1.8 mL 用于体外测定,包括血栓长度(L,mL)、血栓湿重(W,mg),并计算血栓指数(Q)。Q=L/2+W。

1.2.2 对大鼠 AD 诱导微循环障碍模型的影响^[6-7]

取 SD 大鼠 60 只,随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组[复方丹参片(5.0 g/(kg·d))],以及龙匙片高、中、低剂量组,各 10 只。各组按照试验方案给药,每日 1 次,给药容积为每 100 g 体质量 2 mL,连续 14 d。末次给药后 2 h,每只大鼠腹腔注射麻醉药乌拉坦,参照 Chambers 法制备微循环标本,测定细动脉/细静脉口径、血流速度、毛细血管网交点数,观察血液流态。除正常对照组外,各组于当前视野滴加 1:250 000 AD 0.05 mL 后 1 min,再次测定以上指标。分别计算滴 AD 后管径、流速、网点数的减少值,计算公式如下。

管径减少值=滴 AD 后的管径-滴 AD 前的管径

流速减少值=滴 AD 后的流速-滴 AD 前的流速

网点数减少值=滴 AD 后的网点数-滴 AD 前的网点数

1.2.3 对家兔 PT 和 APTT 的影响^[8]

取家兔 1 只,称定质量,腹腔注射 25% 乌拉坦

(10 mL/kg)麻醉,行颈总动脉插管采血,使血液流入装有 3.8% 枸橼酸钠溶液的采血容器中,并不断搅拌,混匀,控制血液与枸橼酸钠的体积比为 9:1。3 000 r/min 离心 10 min,制备贫血小板血浆(PPP)。将 PPP 分成 5 组,每组 10 管,分别与以下各组药物混合:正常对照组、肝素钠组(50 U)、龙匙片高浓度组(最终药物质量浓度为含生药 1.28 g/L)、龙匙片中浓度组(最终药物质量浓度为含生药 0.64 g/L)、龙匙片低浓度组(最终药物质量浓度为含生药 0.34 g/L),按照检测试剂盒说明书操作步骤测定 PT 和 APTT。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计数资料以均数±标准差($\bar{X} \pm s$)表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠血液流变学的影响

由表 1 至表 3 可见,与正常对照组比较,模型组大鼠的全血高切黏度、低切黏度、血浆黏度、还原黏度、血沉、凝血时间、血小板黏附率、纤维蛋白原、血栓(如长度、湿重、Q)等各项指标均较高,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明造模成功。与急性血瘀模型组比较,龙匙片对血细胞比容无影响($P > 0.05$)。龙匙片高、中剂量组各指标显著低于模型组($P < 0.05$)。龙匙片低剂量组的全血高切黏度、血浆黏度、还原黏度、纤维蛋白原含量、Q 等指标明显小于急性血瘀模型组($P < 0.05$),全血低切黏度、血沉、凝血时间、血小板黏附率、血栓长度、血栓湿重等指标虽有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示龙匙片能降低大鼠血黏度,改善血液流变学,防止血栓形成,也就是说能改善中医“血瘀症”大鼠血液的“粘、凝、滞”状态,且呈现一定量效关系^[9-10]。

2.2 对肠系膜肾上腺素性微循环障碍模型的影响^[11-12]

由表 4 可见,与正常对照组比较,急性血瘀模型组的细动脉管径、流速及网点数明显减少($P < 0.01$),提示急性血瘀模型造模成功。与急性血瘀组比较,龙匙片大、中剂量均可显著改善肾上腺素诱导的细动脉管径、

表 1 对大鼠血液黏度的影响($\bar{X} \pm s$, mPa·s, $n = 10$)

组别	剂量[g/(kg·d)]	全血高切黏度	全血低切黏度	血浆黏度	还原黏度
正常对照组		3.26 ± 1.33	8.98 ± 1.30	2.51 ± 1.41	6.13 ± 1.69
急性血瘀模型组		5.90 ± 1.25 ^{##}	15.24 ± 15.24 ^{##}	5.13 ± 1.53 ^{##}	10.99 ± 2.10 ^{##}
阳性对照组	5.00	3.56 ± 1.27 ^{**}	9.61 ± 9.61 ^{**}	2.53 ± 1.09 ^{**}	5.98 ± 1.93 ^{**}
龙匙片高剂量组	11.50	3.78 ± 1.41 ^{**}	10.87 ± 10.87 ^{**}	2.81 ± 0.81 ^{**}	6.16 ± 1.58 ^{**}
龙匙片中剂量组	5.75	3.96 ± 1.30 ^{**}	11.40 ± 11.45 [*]	3.08 ± 1.23 ^{**}	7.09 ± 2.62 ^{**}
龙匙片低剂量组	3.06	4.09 ± 1.16 ^{**}	13.13 ± 13.13	3.61 ± 1.63 [*]	8.71 ± 1.94 [*]

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与急性血瘀模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。下表同。

表2 对大鼠凝血功能的影响($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量[g/(kg·d)]	血细胞比容(%)	血沉(mm/h)	凝血时间(min)	血小板黏附率(%)
正常对照组		45.29 ± 5.80	1.74 ± 0.43	2.51 ± 0.78	21.48 ± 3.84
急性血瘀模型组		48.27 ± 5.39	3.29 ± 0.86 ^{##}	1.52 ± 0.67 ^{##}	27.77 ± 6.48 [#]
阳性对照组	5.00	47.16 ± 7.25	1.96 ± 1.00 ^{**}	2.37 ± 0.52 ^{**}	21.08 ± 3.12 ^{**}
龙匙片高剂量组	11.50	46.95 ± 6.41	2.09 ± 0.98 ^{**}	2.32 ± 0.76 [*]	21.61 ± 2.08 [*]
龙匙片中剂量组	5.75	49.18 ± 9.30	2.37 ± 0.85 [*]	2.08 ± 0.37 [*]	22.31 ± 4.37 [*]
龙匙片低剂量组	3.06	48.80 ± 8.41	3.20 ± 1.11	1.83 ± 0.41	23.93 ± 4.24

表3 对大鼠血栓指标的影响($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量[g/(kg·d)]	纤维蛋白原(g/L)	血栓		
			长度(mm)	湿重(mg)	Q
正常对照组		2.05 ± 0.93	13.68 ± 2.78	53.68 ± 8.19	60.53 ± 8.88
急性血瘀模型组		4.59 ± 0.95 ^{##}	21.07 ± 4.39 ^{##}	77.68 ± 9.30 ^{##}	88.22 ± 10.70 ^{##}
阳性对照组	5.00	2.93 ± 1.28 ^{**}	13.94 ± 3.24 ^{**}	58.14 ± 7.57 ^{**}	65.11 ± 8.04 ^{**}
龙匙片高剂量组	11.50	2.84 ± 0.82 ^{**}	15.32 ± 4.98 [*]	61.70 ± 6.40 ^{**}	69.36 ± 7.49 ^{**}
龙匙片中剂量组	5.75	3.01 ± 1.53 [*]	16.62 ± 3.99 [*]	66.96 ± 9.63 [*]	75.27 ± 10.66 [*]
龙匙片低剂量组	3.06	3.20 ± 1.38 [*]	18.06 ± 4.23	69.69 ± 9.57	78.72 ± 8.58 [*]

流速及网点数的异常($P < 0.05$);低剂量组虽有改善趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

测定细动脉/细静脉口径、血流速度、毛细血管网交点数和观察流态的数据,将细动脉中的血液流态分为4级。0级:线流,为正常流态;Ⅰ级:虚线流;Ⅱ级:粒流;Ⅲ级:瘀滞。由表5可见,增加数的0级指未发生改变(加重)的例数。与正常对照组比较,急性血瘀模型组的0级流态减少例数及Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级增加例数均显著少于正常对照组($P < 0.05$),说明急性血瘀模型造模成功。与

急性血瘀模型组比较,龙匙片高、中剂量组可明显抑制AD引起的流态改变,表现为0级流态减少例数及Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级流态增加例数均明显减少($P < 0.05$)。低剂量组虽有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),显示龙匙片能抑制AD引起的微循环流态改变。

2.3 对PT及APTT的影响

由表6可见,与正常对照组比较,肝素组的PT和APTT均有显著延长($P < 0.01$),龙匙片高、中浓度组的PT和APTT均明显延长($P < 0.05$);龙匙片低剂

表4 对大鼠肠系膜肾上腺素性微循环障碍的作用($n=10$)

组别	剂量[g/(kg·d)]	滴AD后减少值		
		管径($\bar{X} \pm s, \mu\text{m}$)	流速($\bar{X} \pm s, \text{mm/s}$)	网点数($\bar{X} \pm s$)
正常对照组		0.66 ± 0.64	0.266 ± 0.24	0.39 ± 0.36
急性血瘀模型组		7.02 ± 3.60 ^{##}	8.122 ± 3.78 ^{##}	4.49 ± 2.08 ^{##}
阳性对照组	5.00	2.11 ± 1.72 ^{**}	2.758 ± 2.18 ^{**}	1.32 ± 0.93 ^{**}
龙匙片高剂量组	11.50	3.15 ± 1.34 ^{**}	4.129 ± 1.77 [*]	1.87 ± 0.80 ^{**}
龙匙片中剂量组	5.75	5.46 ± 2.02 [*]	6.624 ± 2.45	2.65 ± 1.01 [*]
龙匙片低剂量组	3.06	6.25 ± 2.35	7.375 ± 2.40	3.90 ± 1.12

表5 对大鼠肠系膜微循环障碍模型流态的影响($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	剂量[g/(kg·d)]	滴AD前(例)				滴AD后(例)				增加数(例)			0级减少数(例)
		0	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	0	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	
正常对照组		10	2	0	0	2	3	4	3	1	4	3	8
急性血瘀模型组		9	1	0	0	4	1	4	1	0 [#]	4	1 [#]	5 [#]
阳性对照组	5.00	10	4	0	0	8	6	0	0	2	0 ^{**}	0 [*]	2 [*]
龙匙片高剂量组	11.50	9	3	0	0	7	5	0	0	2	0 ^{**}	0 [*]	2 [*]
龙匙片中剂量组	5.75	8	2	0	0	7	2	1	0	0	1 [*]	0 [*]	1 ^{**}
龙匙片低剂量组	3.06	9	3	0	0	4	3	2	3	0	2 [*]	3	5

表6 龙匙片对家兔PT及APTT的影响($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	药物浓度	PT(s)	APTT(s)
正常对照组		11.12 ± 2.26	40.26 ± 10.77
肝素组	50 U	45.16 ± 5.20 ^{##}	295.20 ± 8.11 ^{##}
龙匙片高浓度组	1.15 g/L	76.89 ± 12.37 ^{##}	222.98 ± 35.87 ^{##}
龙匙片中浓度组	0.57 g/L	16.20 ± 2.82 ^{##}	90.72 ± 15.84 ^{##}
龙匙片低浓度组	0.31 g/L	11.95 ± 2.84	60.94 ± 14.49 [#]

量组能明显提高APTT($P < 0.01$),但对PT无影响($P > 0.05$),龙匙片对PT和APTT的影响显示出明显的浓度依赖关系,表明龙匙片有抑制内、外源性凝血系统的作用。

3 讨论

龙匙片是临床经验方,由匙羹藤、龙血竭和甘草组方,可降低血糖、活血化瘀。匙羹藤 *Gymnema sylvestre* (Retz.) schult 为萝藦科植物匙羹藤属类植物,性平、味苦,药理作用主要包括降血糖、调血脂、抗动脉粥样硬化、抑制甜味、抗龋齿和抑制肥胖等^[13]。龙血竭有“血中圣药”美誉,广泛用于各种血症,具有活血散瘀、定痛止血、敛疮生肌等功效^[14-17]。甘草的主要生物活性成分包括三萜类化合物、黄酮类化合物及多糖类化合物等,具有抗炎、抗氧化、降血糖、抗血栓等生理活性^[18-20]。

本研究中采用动物试验性急性血瘀模型、急性微循环障碍模型和体外试验,观察不同剂量的龙匙片活血化瘀作用。结果表明,龙匙片能改善血瘀后血液流变学的异常,还可抑制机体微循环障碍的形成,体外可抑制内源性和外源性凝血系统。龙匙片有显著的活血化瘀作用^[21],与其临床应用相符合,并能相互佐证。

参考文献:

- [1] 杨威,郭秋平,郭健敏,等. 701 跌打镇痛膏活血化瘀实验研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(6):885-886.
- [2] 王琳琳,丁安伟. 赤芍总苷对大鼠血瘀证模型的影响[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(6):552-555.
- [3] 丘芬,金钊,闫守霞,等. 虎杖五种酒制饮片水提物的活血化瘀作用研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(12):2903-2904.
- [4] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等. 大鼠急性血瘀模型造模方法的研究与评价[J]. 中国药理学通报,2011,27(12):1761-1765.
- [5] 刘培,宿树兰,周卫,等. 香附四物汤与四物汤对急性血瘀模型大鼠血液流变性及卵巢功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):124-127.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学(第二版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:199-205.
- [7] 孙兰,李家春,周军,等. 桂枝茯苓胶囊对肾上腺素诱导大鼠实验性肠系膜微循环障碍的改善研究[J]. 现代药物与临床,2015,30(1):8-12.

- [8] 邓奕辉,邓婧溪,陈懿,等. 滋阴活血解毒超微中药方对脑缺血大鼠凝血酶原和蛋白酶激活受体-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(12):2816-2820.
- [9] 钟宇富,刘国洪,杜英娟,等. 月之汤饮对实验大鼠血液流变性及凝血功能的影响[J]. 安徽医药,2016,20(2):236-239.
- [10] Liu G, Zhong Y, Du Y, et al. Study on the lactation-promoting Function Experiment of Yue-nai-tang Decoction in Pregnant Female Rats[J]. Medicinal Plant, 2014, 5(3): 37-40.
- [11] 徐叔云,卞如谦,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1119-1122.
- [12] 林桂平,卢春颜,邱巧芬,等. 复方丹参注射液抗心肌缺血及活血化瘀作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2014,21(3):251-253.
- [13] Shigematsu N. Effect of administration with the extract of GS leaves on lipid metabolism in rats[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2001, 24(6): 713-716.
- [14] 向金莲,程睿,张路路. 血竭的活血和止血作用研究[J]. 华西药理学杂志,2000,15(6):430-434.
- [15] 胡迎庆,宫飘,屠鹏飞. 龙血树属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 国外医学(植物药分册),2000,15(1):5-8.
- [16] 周志宏,王锦亮,杨崇仁. 剑叶血竭素国产血竭中一个新的二聚查耳酮[J]. 药学学报,2001,36(3):200-204.
- [17] 李丹,惠瑞,胡永武,等. 血竭提取物促进成纤维细胞增殖及胶原分泌[J]. 中国组织工程研究,2014,18(46):7437-7441.
- [18] 刘翠霞,吴基良,江南,等. 甘草酸二铵对动物静脉血栓形成及凝血时间的影响[J]. 医药导报,2004,23(11):809-810.
- [19] Sharma V, Agrawal R. In vivo antioxidant and hepatoprotective potential of Glycyrrhiza glabra extract on carbon tetrachloride (CCl₄) induced oxidative-stress mediated hepatotoxicity[J]. Int J Res Med Sci, 2014, 2(1): 314-320.
- [20] Jiang LL, Wang Q, Shen S, et al. Discovery of glycyrrhetic acid as an orally active, direct inhibitor of blood coagulation factor xa[J]. Thromb Res, 2014, 133(3): 501-506.
- [21] 李宏力,李玉文,刘天龙,等. 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[J]. 中国药房,2016,27(19):2615-2617.

(收稿日期:2017-10-12;修回日期:2017-11-11)