

过山蕨总黄酮对大鼠血栓闭塞性脉管炎的改善作用

梁大连¹, 程艳玲¹, 董世波¹, 李 宁^{2*}

1. 山东省医药工业研究所, 山东 济南 250101

2. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 观察过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎模型大鼠的改善作用。**方法** 大鼠股动脉注射月桂酸制备血栓闭塞性脉管炎, 造模后肉眼观察病变情况并评分, 按评分结果将大鼠随机分为模型组, 对照组, 过山蕨总黄酮高、中、低剂量(7.2、3.6、1.8 mg/kg)组和脉管复康片(648 mg/kg)阳性对照组, 每组10只, 给药组于造模3 d后每天ig给药1次, 连续7 d。观察大鼠体征、血栓病理切片、血液流变学指标。**结果** 过山蕨7.2 mg/kg可显著改善血栓性闭塞性脉管炎模型大鼠的症状。**结论** 过山蕨总黄酮对大鼠血栓性闭塞性脉管炎有显著治疗作用, 该作用可能与其阻断 α 受体和兴奋 β 受体、抗去甲肾上腺素、抑制二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集功能等有关。

关键词: 过山蕨总黄酮; 血栓闭塞性脉管炎; 血栓形成; 肾上腺功能亢进

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)06-0481-04

Improving effect of total flavonoids from *Camptosorus sibiricus* on rats with thromboangiitis obliterans

LIANG Da-lian¹, CHENG Yan-ling¹, DONG Shi-bo¹, LI Ning²

1. Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250101, China

2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To observe the improving effect of total flavonoids from *Camptosorus sibiricus* on rats with thromboangiitis obliterans. **Methods** The thromboangiitis obliterans of rats was made by administration lauric acid into femoral artery. After the models were made, the limb lesions were observed and scored, by which the rats were divided into model group, control group, administration group (7.2, 3.6, and 1.8 mg/kg), and Maignan Fukang Tablet (648 mg/kg) as positive control group with ten in each group, respectively. After the models were made for 3 d, the successive ig administration was given once a day for 7 d. The physical signs, pathological sections, and hemorheological indexes were investigated. **Results** The significant improving effect of total flavonoids from *C. sibiricus* on model rats with thromboangiitis obliterans was observed in the high dose (7.2g/kg) group. **Conclusion** The treatment of the total flavonoids from *C. sibiricus* on rats with thromboangiitis obliterans may be related to the effect of blocking α -receptor, exciting β -receptor, antinorepinephrine, and inhibiting the platelet aggregation induced by ADP.

Key word: total flavonoids from *Camptosorus sibiricus* Rupr.; thromboangiitis obliterans; thrombosis; adrenal gland hyperfunction

铁角蕨科过山蕨属植物全世界有两种, 主要分布在亚洲和大洋洲, 我国有一种, 即过山蕨 *Camptosorus sibiricus* Rupr., 别名马蹬草、还阳草, 主产于东北、华北、西北、内蒙古等地, 历代本草未见其药用记载。民间用过山蕨全草治疗外伤出血、子宫出血、脉管炎、神经性皮炎、脑栓塞引起的偏瘫以及糖尿病并发症等。现代药理研究表明, 过山蕨提取物对兔耳血管、蟾蜍后肢血管以及家兔后肢血管有扩张

作用, 其有效部位为总黄酮^[1]。血栓闭塞性脉管炎多发生在20~40岁青年, 以男性患者居多, 且在北方地区发病率较高。目前临床治疗脉管炎多以扩张血管药物、抗血小板聚集药物为主, 但作用单一、针对性不强, 疗效不尽理想。本实验观察过山蕨总黄酮对大鼠血栓性闭塞性脉管炎的影响, 为其临床应用以及研发对血栓性闭塞性脉管炎疗效确切的单味中药新药制剂提供参考。

收稿日期: 2011-10-12

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102); 辽宁省博士科研启动基金资助项目(20091079)

作者简介: 梁大连(1978—), 男, 山东济南人, 硕士, 主要从事中药新药开发。

*通讯作者 李 宁, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师。Tel: (024)23986475 E-mail: liningsypharm@163.com

1 材料

1.1 药品与试剂

过山蕨总黄酮, 由山东省医药工业研究所中药室提供, 批号 20101201, 紫外分光光度法测得过山蕨总黄酮以山柰酚量计达 73%。脉管复康片, 规格 0.6 g, 天津同仁堂集团股份有限公司生产, 批号 Z12020023。月桂酸, 规格 250 g, 质量分数 99.8%, 批号 F20100330, 国药集团化学试剂有限公司生产。肝素钠注射液, 规格 2 mL: 1.25 万单位, 由天津生物化学制药有限公司生产, 批号 20091109。甲醛, 分析纯。

1.2 动物

Wistar 大鼠, 60 只, 雄性, 体质量 (280~320) g, 由山东大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号 SYXK (鲁) 20100004。

1.3 主要仪器

LBY—NJ4 血小板聚集仪、C2000 型血凝仪 (北京普利生仪器有限公司), DMLS2 型显微镜 (Leica 公司)。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠经股动脉注射月桂酸 0.1 mL, 约 15 min 后动物患肢足爪部开始变苍白, 有的甚至青紫, 皮肤温度降低, 动脉搏动减弱或消失, 次日受累的足趾变黑, 并逐渐向上发展, 形成坏疽和木乃伊化。少数动物手术后表现为患肢疼痛、跛行和曳行现象。

2.2 分组与给药

造模 3 d 后, 肉眼观察并根据坏疽和木乃伊化程度评分, 按评分结果随机将大鼠分为模型组, 过山蕨总黄酮高、中、低剂量 (7.2、3.6、1.8 mg/kg) 组, 脉管复康片 (648 mg/kg) 阳性对照组, 另设正

常动物对照组, 每组 10 只。给药组每天 ig 给药 1 次, 给药体积为 0.005 mL/g, 模型组和对照组 ig 等体积的纯水, 连续 7 d, 给药速度约 0.5 mL/s。

2.3 观察指标

2.3.1 体征变化 肉眼观察体征变化, 参照王军等^[2]的方法并采用分级标准分级: I 级, 病变局限于趾甲部; II 级, 病变局限于趾部; III 级, 病变局限于足爪部; IV 级, 病变局限于膝关节以下; V 级, 病变发展到膝关节以上。

2.3.2 血栓病理分级 取大鼠右下肢, 4% 甲醛固定 3 d 后用 10% 硝酸脱钙, 足趾、踝关节上、下及股部 4 个部位横断切片, HE 染色, 观察血栓形成数目, 进行分级, 0 级, 无血栓; I 级, 1 个血栓; II 级, 2~3 个血栓; III 级, 4 个以上血栓。

2.3.3 血液流变学指标检测 大鼠腹主动脉取血, 经抗凝等处理后检测全血黏度、血浆黏度、血沉、红细胞压积、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)、血浆纤维蛋白原 (FIB); 计算红细胞聚集指数、红细胞刚性指数和红细胞变形指数。

2.3.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件, 组间血液流变学指标和凝血指标的差异性比较采用方差分析, 等级数据采用等级检验, 率的比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠病变的影响

1 周内各组部分大鼠患侧出现程度不同的坏疽部分脱落, 模型组的病变最严重, 过山蕨总黄酮高剂量组和脉管复康片组大鼠病变最轻, 与模型组比较差异有显著性 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

表 1 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠病变的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of total flavonoids from *C. sibiricus* on pathological changes in rats with thromboangiitis obliterans ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药前动物病变/只						给药后动物病变/只					
		正常	I	II	III	IV	V	正常	I	II	III	IV	V
对照	—	10						10	0	0	0	0	0
模型	—	0	1	1	5	3	0	1	1	0	1	0	7 ^{▲▲}
过山蕨总黄酮	1.8	0	1	1	5	3	0	2	2	0	1	1	4
	3.6	0	1	1	6	2	0	3	3	0	0	0	4
	7.2	0	1	1	6	2	0	6	1	0	0	1	2 [*]
脉管复康片	648	0	1	1	5	3	0	6	1	0	1	0	1 ^{**}

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与对照组比较: ^{▲▲} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; ^{▲▲} $P<0.01$ vs control group

3.2 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠血液流变学的影响

连续给药 7 d 后,各给药组大鼠血小板聚集率、血液流变学指标、血栓分级和凝血指标未见明显改善。结果见表 2~5。

4 讨论

血栓性闭塞性脉管炎的病因至今尚不清楚,一般认为与吸烟、寒冷、潮湿、外伤、感染、营养不良、激素紊乱、遗传、自身免疫功能紊乱等有关。近 10 余年的研究发现,自身免疫因素在血栓性闭塞性脉管炎发病中所起的作用日益受到重视。血栓性闭塞性脉管炎患者血清中 IgG、IgA 和 IgM 明显增加,而补体 CH50 和 C3 则减少,由此形成的免疫复合物沉积于患者的血管导致血管炎症反应和血栓形成。

目前临床治疗脉管炎多以扩张血管药物、抗血小板聚集药物为主,作用单一、针对性不强,治疗

效果不尽理想。过山蕨中主要化学成分为黄酮类和有机酸类。本实验表明过山蕨总黄酮高剂量(7.2 mg/kg)对血栓性闭塞性脉管炎具有良好疗效。对过山蕨总黄酮扩张外周血管作用机制的初步分析表明,过山蕨总黄酮有阻断 α 受体和兴奋 β 受体的作

表 2 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of total flavonoids from *C. sibiricus* on platelet aggregation in rats with thromboangiitis obliterans ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	血小板聚集率/%
对照	—	9	44.32±9.94
模型	10	10	40.01±11.90
过山蕨总黄酮	1.8	10	40.42±6.80
	3.6	9	46.32±11.00
	7.2	10	33.56±5.07
脉管复康片	648	8	51.38±13.03

表 3 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of total flavonoids from *C. sibiricus* on hemorheology in rats with thromboangiitis obliterans ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/(mPa·s)	血沉/(mm·H ⁻¹)	血沉方程 K 值
		低切	中切	高切			
对照	—	12.93±2.30	6.88±0.86	6.00±0.70	1.27±0.16	2.57±0.90	38.50±3.26
模型	—	12.86±2.95	6.56±1.30	5.66±1.10	1.28±0.14	3.10±0.64	30.20±2.74
过山蕨总黄酮	1.8	12.73±1.45	6.66±0.78	5.78±0.71	1.22±0.15	10.11±1.68	12.11±1.79
	3.6	11.83±1.33	6.30±0.55	5.49±0.54	1.18±0.08	8.56±0.99	19.18±1.05
	7.2	12.21±1.78	6.38±0.83	5.54±0.76	1.17±0.18	14.70±1.68	4.70±2.01
脉管复康片	648	12.70±2.91	6.65±0.91	5.78±0.68	1.31±0.15	6.10±1.43	19.14±1.62

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	全血还原黏度/(mPa·s)			红细胞压积/%
		低切	中切	高切	
对照	—	28.39±7.12	13.62±2.63	11.47±2.08	44.74±6.30
模型	—	28.95±6.08	13.23±2.79	10.98±2.43	42.46±3.84
过山蕨总黄酮	1.8	27.00±1.56	12.60±1.26	10.52±1.25	40.03±4.40
	3.6	26.82±3.84	12.79±1.63	10.75±1.58	40.85±3.32
	7.2	25.81±5.04	12.35±1.68	10.40±1.33	40.28±2.40
脉管复康片	648	27.17±6.63	12.80±2.14	10.72±1.59	39.94±5.20

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红细胞聚集指数	红细胞刚性指数	红细胞变形指数	红细胞电泳指数
对照	—	2.15±0.22	9.22±2.17	1.12±0.15	5.22±0.94
模型	10	2.27±0.27	8.56±2.18	1.12±0.17	5.76±0.73
过山蕨总黄酮	1.8	2.25±0.17	8.85±1.35	1.08±0.07	5.25±0.66
	3.6	2.18±0.31	8.87±1.49	1.14±0.08	5.55±1.03
	7.2	2.16±0.25	8.70±1.85	1.06±0.13	4.99±0.79
脉管复康片	648	2.16±0.27	8.32±1.84	1.10±0.15	5.40±0.95

表 4 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠凝血作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of total flavonoids from *C. sibiricus* on blood coagulation in rats with thromboangiitis obliterans ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TT/s	PT/s	APTT/s	FIB/g·L ⁻¹
对照	—	29.12±2.13	13.87±1.70	15.90±2.52	10.46±2.48
模型	—	29.16±6.73	13.08±1.53	16.21±3.15	10.44±1.92
过山蕨总黄酮	1.8	28.83±3.29	13.68±0.99	16.94±2.53	10.88±2.78
	3.6	31.79±3.51	13.92±0.96	16.27±2.36	10.03±2.41
	7.2	28.73±3.07	13.37±1.60	16.77±4.01	11.04±2.33
脉管复康片	648	28.74±5.64	13.43±1.80	17.04±3.05	10.56±1.72

表 5 过山蕨总黄酮对血栓闭塞性脉管炎大鼠血栓病理切片分级的影响

Table 5 Effects of total flavonoids from *C. sibiricus* on score of pathological section in rats with thromboangiitis obliterans

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物血栓分布/只			
		0 级	I 级	II 级	III 级
对照	—	10	0	0	0
模型	—	2	6	1	1
过山蕨	1.8	3	2	5	0
总黄酮	3.6	4	1	4	1
	7.2	3	3	4	0
脉管复康片	648	6*	4*	0*	0*

与模型组比较* $P<0.05$

* $P<0.05$ vs model group

用, 具解除体表皮肤黏膜血管 (α 受体) 和骨骼肌血管 (β 受体为主) 痉挛的作用, 有利于改善病变

肢体的全面血液循环。过山蕨总黄酮还具有抗去甲肾上腺素、抑制二磷酸腺苷诱导的血小板聚集功能等作用, 表明其可阻止血栓形成和对抗患者肾上腺功能亢进, 但具体机制尚需进一步研究。本研究将为过山蕨总黄酮开发成有效部位集中、组成明确的单味中药新药提供有益参考。

参考文献

[1] 李 宁, 吴永军, 李 锐, 等. 过山蕨的化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2008, 39(1): 34-36.
[2] 周 青, 贺菊乔, 曹 晖, 等. 脉管通胶囊对血栓闭塞性脉管炎大鼠模型影响的研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2003, 23(4): 4-7.
[3] 王 军, 王玉升, 付蔓华, 等. 脉络通冲剂抗血栓闭塞性脉管炎的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(7): 421-423.
[4] 周晓辉, 刘忠德, 朱晓男, 等. 血栓闭塞性脉管炎造模方法的改进 [J]. 辽宁中医杂志, 2000, 27(8): 378-379.