

蓬子菜中香叶木苷抗急性血瘀作用及机制研究

董 坤¹, 寇韩旭¹, 宁 馨¹, 孙 超¹, 马英丽^{2*}

1. 黑龙江中医药大学药物化学实验室, 哈尔滨 黑龙江 150040

摘 要: **目的** 研究蓬子菜活性成分香叶木苷抗急性血瘀作用及其作用机制。**方法** 采用 sc 盐酸肾上腺素复合冰水浴制备大鼠急性血瘀模型, ig 给予不同剂量香叶木苷 (45、90、180 mg/kg), 阿司匹林为阳性药, 应用血液流变测试仪、全自动血沉仪检测血液流变学指标: 全血黏度、血浆黏度、红细胞比容、血沉及红细胞聚集指数; 采用试剂盒法检测血浆炎症因子 C 反应蛋白 (CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平。**结果** 与模型组比较, 香叶木苷能不同程度降低全血黏度、血浆黏度、红细胞比容、血沉及红细胞聚集指数, 明显改善血瘀大鼠血液流变学指标; 显著降低炎症因子 CRP、TNF- α 和 IL-1 β 水平。**结论** 香叶木苷有效改善急性血瘀大鼠血液流变学异常, 减少炎症因子释放, 从而治疗急性血瘀及静脉炎症, 改善微循环。

关键词: 蓬子菜; 香叶木苷; 急性血瘀; 静脉炎症; 血液流变学; 炎症因子

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)02-0207-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.010

Mechanism and influence on acute blood stasis syndrome of diosmin abstracted from *Galium verum*

DONG Kun¹, KOU Han-xu¹, NING Xin¹, SUN Chao¹, MA Ying-li²

1. Laboratory of Medicinal Chemistry, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To study the influence of diosmin which is one active component abstracted from *Galium verum* on blood rheology of rat model and investigate the mechanism. **Methods** Apply epinephrin sc injection and ice water bath to make rat model of blood stasis syndrome. Rats were administered with diosmin (45, 90, and 180 mg/kg) and aspirin as a positive drug. Then make a study that how diosmin ameliorated the hemorheology by assaying the indexes of blood rheology and tetrachoric including whole blood viscosity, plasma viscosity, hematocrit, erythrocyte sedimentation rate and erythrocyte aggregation index using hemeorheology instrument and automatic ESR analyzer. Meantime, we made an approach to the subject that the influence of diosmin on the relationship between blood stasis and inflammation by assaying CRP, TNF- α , and IL-1 β . **Results** Diosmin can improve the indexes of hemorheology obviously. It also can reduce the content of inflammatory factors. **Conclusion** Diosmin can improve the abnormality of hemorheology, and further, it processes the properties of curing inflammation of vein and improving microcirculation by reducing the discharge of inflammatory factors effectively.

Key words: *Galium verum* L; diosmin; acute blood clotting; inflammation of vein; hemorheology; inflammatory factor

蓬子菜 *Galium verum* L. 为茜草科 (Rubiaceae) 拉拉藤属 (*Galium* L.) 药用植物蓬子菜的干燥全草, 来源广泛^[1]。蓬子菜具有行血散瘀、消肿祛瘀等功效, 因其含有大量黄酮类成分, 故临床上常用于治疗心脑血管疾病及周围血管病, 且疗效显著^[2]。研究表明, 香叶木苷是蓬子菜治疗静脉系统疾病的主

要活性成分, 可全面作用于 3 大血管回输系统, 能有效改善静脉通透性, 增加静脉张力, 治疗静脉炎症^[3]。本实验以香叶木苷药理作用为基础, 制备大鼠急性血瘀模型, 观察香叶木苷对大鼠血液流变学的影响; 同时, 通过考察血液中相关炎症因子的水平变化, 初步探讨其治疗急性血瘀的作用机制, 为

收稿日期: 2015-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (201281274034); 教育部博士点博导类基金项目资助 (20112327110006)

作者简介: 董 坤 (1987—), 女, 博士在读, 研究方向为中药活性成分的机制研究。E-mail: ddruihan@163.com

*通信作者 马英丽 (1954—), 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药活性成分的机制研究。E-mail: Mylt666@sina.com

蓬子菜的临床使用提供药效学 and 安全性依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 购于黑龙江中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (黑) 2012-005。

1.2 药品与主要试剂

香叶木苷, 本实验室自制, 经高效液相色谱法测定, 质量分数 $\geq 90\%$ 。所用药材购于黑龙江省玉泉镇, 经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为茜草科拉拉藤属植物蓬子菜 *Galium verum* L., 入药部位为其干燥全草。阿司匹林泡腾片 (阿斯利康制药有限公司, 批号 H32026199); 盐酸肾上腺素注射液 (天津金耀氨基酸有限公司, 批号 H12020526); 水合氯醛 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 20130325); 大鼠 C 反应蛋白 (CRP) ELISA 试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司); 大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (北京欣博盛生物技术有限公司)。

1.3 仪器

Z30-全自动血液流变测试仪 (南京志伦科技有限公司); Roller20-全自动血沉仪 (北京现代威士达医疗器械有限公司); KDC-160HR-离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); SpectraMax Plus384-连续光谱扫描式酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

Wistar 雄性大鼠随机分成 6 组: 对照组, 模型组, 香叶木苷低、中、高剂量 (45、90、180 mg/kg) 组, 阿司匹林 (阳性药, 25 mg/kg) 组, 每组 10 只。ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 14 d, 对照组和模型组给予等量生理盐水。

2.2 急性血瘀模型的制备

于第 13 天给药后, 除对照组外, 各组动物 sc 0.8 mg/kg 盐酸肾上腺素 2 次, 2 次之间间隔 4 h, 第 2 次注射之前, 将大鼠置于 $0 \sim 2$ °C 冰水中浸泡 5 min, 造成大鼠急性血瘀模型。禁食 12 h 后, 于第 14 天取血前 30 min ig 给药 1 次。

2.3 取材方法

以 10% 的水合氯醛 3 mL/kg ip 麻醉大鼠, 仰卧位固定, 于下腔静脉处, 用肝素钠真空采血管进行快速采血, 并轻轻颠倒混匀, 并于 4 h 内检测血液

流变学指标。将采血管于室温下静置 30 min, 2 500 r/min 离心 20 min, 取上清血浆分装于无菌 EP 管中 (每管 115~215 μ L), 置于 -80 °C 冰箱储存备用, 用于各炎症因子的检测。

2.4 指标检测

2.4.1 血流变指标检测 将处理后的样本放入血液流变测试仪、全自动血沉仪检测全血黏度、血浆黏度、血沉、红细胞比容及红细胞聚集指数。

2.4.2 炎症因子检测 采用 ELISA 法, 检测血浆样本中 CRP、TNF- α 和 IL-1 β 水平, 所有操作严格按照说明书进行。

2.5 统计学方法

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。单因素方差分析进行组间比较, 方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 对血液流变学的影响

与对照组比较, 模型组血流变参数均发生显著变化 ($P < 0.01$), 证明大鼠急性血瘀模型制备成功。而香叶木苷各组均能不同程度降低全血黏度、血浆黏度、红细胞比容、血沉及红细胞聚集指数, 能有效改善血瘀模型大鼠血液流变学, 抑制血细胞聚集。结果见表 1、2。

3.2 对血瘀-炎症关系的影响

与对照组比较, 模型组所释放的 CRP、TNF- α 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明在制备血瘀模型的过程中, 血管内皮损伤, 发生急性炎症, CRP 水平升高, 激发分泌细胞因子 TNF- α , 并引起 IL-1 β 的释放, 从而影响血管内皮活性, 加速血瘀过程的发展。给药后, 香叶木苷各剂量组均能显著降低 CRP 及 TNF- α 水平, 中、高剂量组降低 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 保护血管内皮, 抑制促炎因子表达, 从而发挥抗炎作用。结果见表 3。

4 讨论

依据中医理论中急性血瘀证的病因“暴怒”和“寒邪”, 选择本实验所需的动物模型, 采用 sc 大剂量盐酸肾上腺素模拟暴怒时的机体状态, 并结合冰水浴模拟寒邪侵袭。肾上腺素为 α 、 β 受体兴奋剂, 加之冷刺激, 可强烈收缩外周血管, 增大心脏负荷, 降低心功能, 从而使血液运行发生障碍^[4]。这种血瘀造模方法, 导致急性的应激状态。

蓬子菜可有效治疗静脉系统疾病, 本实验初步

表1 香叶木苷对全血黏度及血浆黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Effect of diosmin on whole blood viscosity and plasma viscosity ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/(mPa·s)
		高切 (200 s ⁻¹)	中切 (30 s ⁻¹)	低切 (3 s ⁻¹)	
对照	—	4.35±0.20	5.11±0.21	9.58±1.11	1.28±0.04
模型	—	6.39±0.59 ^{##}	7.90±0.78 ^{##}	14.65±1.82 ^{##}	1.60±0.09 ^{##}
香叶木苷	45	4.66±0.17 [*]	5.67±0.22 ^{**}	11.62±0.69 ^{**}	1.56±0.05
	90	4.52±0.47 ^{**}	5.59±1.09 ^{**}	13.03±1.93	1.54±0.09
	180	5.24±0.29 [*]	5.98±0.09 ^{**}	13.72±0.69	1.57±0.04
阿司匹林	25	4.72±0.62 [*]	5.51±0.11 ^{**}	11.96±1.56	1.55±0.05

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{*} $P < 0.05$ vs model group表2 香叶木苷对红细胞比容、血沉及红细胞聚集指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of diosmin on hematocrit, erythrocyte sedimentation rate, and erythrocyte aggregation index ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红细胞比容	血沉/(mm·h ⁻¹)	红细胞聚集指数
对照	—	0.50±0.01	1.36±0.50	7.32±0.91
模型	—	0.53±0.01 ^{##}	2.96±0.50 ^{##}	10.46±0.71 ^{##}
香叶木苷	45	0.51±0.01 ^{**}	1.30±0.48 ^{**}	8.08±0.52 ^{**}
	90	0.50±0.01 ^{**}	1.50±0.84 ^{**}	8.00±0.98 ^{**}
	180	0.52±0.01 [*]	2.18±0.75 [*]	8.34±0.41 ^{**}
阿司匹林	25	0.51±0.01 ^{**}	1.56±0.78 ^{**}	7.17±0.62 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{*} $P < 0.05$ vs model group表3 香叶木苷对大鼠血管炎症的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effect of diosmin on inflammation of vein ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CRP/(μg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg/mL ⁻¹)	IL-1β/(ng/mL ⁻¹)
对照	—	2.14±1.46	34.05±22.20	0.19±0.04
模型	—	4.35±2.38 [#]	55.21±14.78 ^{##}	0.29±0.09 [#]
香叶木苷	45	2.14±1.11 [*]	45.01±17.39 [*]	0.21±0.08
	90	1.77±0.97 ^{**}	39.58±23.12 [*]	0.17±0.05 [*]
	180	1.65±0.99 ^{**}	39.48±15.20 ^{**}	0.15±0.06 ^{**}
阿司匹林	25	2.25±1.51 [*]	48.24±13.72 [*]	0.16±0.07 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{*} $P < 0.05$ vs model group

探讨蓬子菜中的香叶木苷抗急性血瘀, 以及治疗静脉炎症的作用, 因此取血部位为下腔静脉, 并以带有负压的肝素钠真空采血管进行快速采血, 保障采血速度, 避免发生溶血及凝血。

损伤的血管内皮细胞, 在多因素刺激下, 可释放多种前炎症因子, 并造成微循环血管功能异常, 从而导致血液流变性异常。同时, 血瘀与炎症能够相互影响, 在血瘀过程中生成的物质能引发炎症,

而炎症又能促进血液高凝^[5]。

血液流变学是判断血瘀证的公认指标, 也是开发治疗心血管疾病、抗血栓及改善微循环药物的重要参考指标。实验结果证明, 蓬子菜活性成分香叶木苷能有效改善血瘀模型动物的各血流变参数, 有效治疗血瘀证。

在急性血瘀发生及发展过程中, 会激发许多炎症因子的表达, 且与血瘀-炎症相关的信号通路多而

复杂, 本实验选取其中标志性指标进行检测。CRP 异常是出现血瘀证的一个重要信号, CRP 水平升高, 能激发细胞因子 TNF- α 分泌, 并引起 IL-1 β 的释放^[6], 从而进一步参与炎症并影响血管内皮活性, 参与血瘀过程的发展。香叶木苷能降低血瘀大鼠血液中 CRP、TNF- α 、IL-1 β 的水平, 抑制炎症发生和血瘀发展, 治疗静脉炎症, 改善微循环。本实验对蓬子菜中的香叶木苷抗急性血瘀作用及机制进行了初步探讨, 在后续的实验中还将多通路、多层次对该机制进行深入研究。

参考文献

[1] 马英丽, 卢卫红, 崔明宇, 等. 蓬子菜药材 HPLC 指纹

图谱研究 [J]. 中草药, 2006, 37 (11): 1723-1726.

- [2] 马 超. 蓬子菜活性指标成分—香叶木苷的药物动力学研究 [D]. 黑龙江: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [3] 苏秀丽. 香叶木苷调控血栓靶蛋白的研究 [D]. 黑龙江: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [4] 王丽超, 刘新光, 王 琦, 等. 银杏酮酯分散片对急性血瘀型大鼠血液流变学的影响 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(23): 2802-2804.
- [5] 刘剑刚, 史大卓. 影响血液流变学的活血化瘀中药药物研究 [J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(1): 133-137.
- [6] 胡文娟. 不同血瘀证亚型特征特点与血小板活化及炎症损伤关系的实验研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2012.