

## 注射用血塞通（冻干）对家兔下腔静脉血栓的抑制作用研究

韩冰<sup>1</sup>, 郝春华<sup>2</sup>, 王维亭<sup>2</sup>, 张蕊<sup>2</sup>, 席文恭<sup>2</sup>, 徐向伟<sup>2</sup>, 葛一蒙<sup>1</sup>, 孙双勇<sup>2\*</sup>, 赵专友<sup>2</sup>

1. 哈尔滨珍宝制药有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150060

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300193

**摘要:** **目的** 观察注射用血塞通(冻干)对电刺激所致家兔下腔静脉血栓形成的影响,并探讨其作用机制。 **方法** 使用电刺激伴狭窄法制备家兔下腔静脉血栓模型,造模1 h后,连续5天iv给予5、10、20 mg/kg的注射用血塞通(冻干)、sc给予100 U/kg的低分子肝素钠注射液,最后一次给药1 h后测定家兔出血时间和出血量,颈动脉取血分离血浆,试剂盒检测活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)以及纤维蛋白原(FIa)水平,ELISA试剂盒检测血浆内凝血因子FIIa、FXa、FXIa、抗凝血酶III(ATIII)、凝血因子TAT、活化蛋白C(APC)、组织性纤维溶酶激活剂(t-PA)、纤溶酶原(PLG)、尿激酶原(PROUK)、胰蛋白酶(Trypsin)、6-酮前列腺素F1a(6-keto-PGF1a)和血栓素B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)水平;取血栓,测定血栓湿质量、干质量以及基质量。在血小板聚集实验中,制备家兔贫、富血小板血浆,分别以胶原(CG)、二磷酸腺苷二钠盐(ADP)和花生四烯酸钠(AA)为诱导剂,比浊法测定不同浓度血塞通对血小板聚集的影响。 **结果** 家兔iv注射用血塞通(冻干)后,与模型组比较,血栓湿质量、干质量及基质量均显著降低,并具有一定的剂量依赖性;出血时间和出血量未出现明显增加,APTT、PT和TT也未出现明显变化;血浆内t-PA和6-keto-PGF1a水平显著增加,TXB<sub>2</sub>水平显著降低,其他指标没有明显变化。在血小板聚集实验中,血塞通可以剂量依赖性地抑制由AA诱导的血小板聚集。 **结论** 注射用血塞通(冻干)具有良好的抑制下腔静脉血栓作用,且无明显出血副作用,作用机制与增强纤溶活性、抑制血小板聚集和血管收缩有关。

**关键词:** 注射用血塞通(冻干);家兔;下腔静脉血栓;纤溶活性;血小板聚集

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2016)06-0939-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.005

## Inhibition of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on inferior vena cava thrombosis in rabbits

HAN Bing<sup>1</sup>, HAO Chun-hua<sup>2</sup>, WANG Wei-ting<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>2</sup>, XI Wen-gong<sup>2</sup>, XU Xiang-wei<sup>2</sup>, GE Yi-meng<sup>1</sup>, SUN Shuang-yong<sup>2</sup>, ZHAO Zhuan-you<sup>2</sup>

1. Harbin Zhenbao Pharmaceutical Co., Ltd, Harbin 150060, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co.Ltd, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To study the inhibitory effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on inferior vena cava thrombosis in rabbits, observe its bleeding side effect and its effect on coagulation function, and explore its mechanism. **Methods** Inferior vena cava thrombosis model in rabbits was created by electrical stimulation and stenosis. One hour later, Xuesaitong Injection (freeze-drying) of 5, 10, and 20 mg/kg were injected into ear vein of rabbits for 5 d after surgery, and low molecular weight heparin sodium injection of 100 U/kg was sc given as a positive drug. Bleeding time and blood loss were measured 1 h after infusion. Blood was taken from the jugular vein and prepared into plasma. Activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), and fibrinogen (FIa) were determined by kits, and coagulation factor FIIa, FXa, FXIa, antithrombin III (ATIII), coagulation factor TAT, activated protein C (APC), tissue fibrinolytic enzyme activator (t-PA), plasminogen (PLG), prourokinase (PROUK), trypsin, 6-keto-PGF1a, and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) were determined by enzyme immunoassay kit. Thrombus was taken out, and wet weight, dry weight and base quality of thrombus were determined. In the platelet aggregation experiment, platelet-poor and platelet-rich

收稿日期: 2016-06-12

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(14JCQNJC13300)

作者简介: 韩冰, 女, 工程师, 执业药师, 主要从事新药研发工作。Tel: 15945152296 E-mail: hanbing@zbdzy.com

\*通信作者 孙双勇, Tel: (022)84845255 E-mail: sunshuangyong@163.com

plasma were prepared, and collagen (CG), ADP, and arachidonic acid (AA) were used as the inducers. Effects of different concentration of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on platelet aggregation were measured using nephelometry. **Results** Wet weight, dry weight, and base quality of thrombus were all significantly reduced in a dose-dependent manner after injection of Xuesaitong Injection (freeze-drying), which indicated that Xuesaitong Injection (freeze-drying) had a significant inhibitory effect on deep vein thrombosis. After administration of Xuesaitong Injection(freeze-drying), bleeding time and blood loss of rabbits were no significant extended, and APTT, PT, and TT did not change significantly compared with the model group, which indicated that Xuesaitong Injection (freeze-drying) showed no significant bleeding side effects when it played antithrombotic effect. After administration of Xuesaitong Injection (freeze-drying), t-PA and 6-keto-PGF1a in rabbit plasma were significantly increased, and TXB<sub>2</sub> was significantly reduced. In the platelet aggregation experiment, Xuesaitong Injection (freeze-drying) could inhibit platelet aggregation induced by AA in a dose dependent manner. **Conclusion** Xuesaitong Injection (freeze-drying) has a good inhibitory effect on inferior vena cava thrombosis, and its mechanism of action may be related to enhancing fibrinolysis and inhibition of platelet aggregation and vasoconstriction.

**Keywords:** Xuesaitong Injection (freeze-drying); rabbit; inferior vena cava thrombosis; thrombolytic activity; platelet aggregation

深静脉血栓 (deep venous thrombosis, DVT) 是在深静脉形成的血栓, 是严重创伤和骨科大手术后的常见并发症。研究表明, 术前未采取任何预防措施的情况下, 全髋关节置换术后 DVT 发生率高达 40%~60%, 骨科大手术后 DVT 发生率约为 43.2%<sup>[1]</sup>。目前, 治疗和预防 DVT 常用的方法是服用抗凝药物, 包括直接凝血酶抑制剂达比加群酯和凝血因子 Xa (FXa) 抑制剂利伐沙班等。然而, 这些抗凝药物在发挥抗血栓作用的同时, 均存在着一定的出血副作用, 并且在发生大出血等紧急情况时, 尚无有效的解毒剂可以迅速逆转它们的抗凝作用<sup>[2]</sup>。因此, 寻找疗效确切、出血副作用较小的治疗 DVT 药物变得尤为重要。

注射用血塞通 (冻干) 的主要成分为五加科人参属植物三七提取物, 常用于脑卒中和脑卒中后遗症的预防和治疗<sup>[3]</sup>。有研究表明<sup>[4]</sup>, 血塞通滴丸能够有效抑制大鼠动静脉旁路血栓的形成; 曹洪等<sup>[5]</sup>的研究结果表明, 血塞通注射液对家兔的股静脉血栓有明显的抑制作用。在机制研究方面, 嵇扬等<sup>[6]</sup>通过实验证实, 注射用血塞通对二磷酸腺苷诱导的血小板聚集有明显的抑制作用。本课题组采用电刺激伴狭窄法制备家兔下腔静脉血栓模型, 观察注射用血塞通 (冻干) 对深静脉血栓形成的抑制作用, 并对其可能的作用机制进行探讨。

## 1 材料

### 1.1 药品及主要试剂

注射用血塞通 (冻干), 哈尔滨珍宝制药有限公司提供, 批号 F140617a4-126, 临用前用生理盐水溶解至所需浓度; 低分子肝素钠注射液 (商品名 Fluxum, 希弗全), 意大利阿尔法韦士曼制药公司

(Alfa Wassermann) 生产, 批号 6832, 临用前用生理盐水稀释至所需浓度, 供 sc 给药用。

活化部分凝血酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 测定试剂盒, 批号 021408A; 凝血酶原时间 (Prothrombin Time, PT) 测定试剂盒, 批号 0114038; 凝血酶时间 (Thrombin Time, TT) 测定试剂盒, 批号 031404A; 纤维蛋白原 (F1a) 测定试剂盒, 批号 041403C; 均购自美德太平洋科技有限公司。

兔凝血因子 (FXa)、兔凝血因子 IIa (FIIa)、兔凝血因子 XIa (XIIa)、兔抗凝血酶 III (ATIII)、兔凝血因子 TAT、兔活化蛋白 C (APC)、兔组织性纤维溶酶激活剂 (t-PA)、兔纤溶酶原 (PLG)、兔尿激酶原 (PROUK)、兔胰蛋白酶 (Trypsin)、兔 6-酮前列腺素 F1a (6-keto-PGF1a)、兔血栓素 B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) 等酶联免疫分析试剂盒, 均购自上海通蔚实业有限公司。

蛋白定量试剂盒, 批号 20131011, 购自北京索莱宝科技有限公司。胶原 (CG), 批号 3422; 二磷酸腺苷二钠盐 (ADP), 批号 116H810; 花生四烯酸钠 (AA), 批号 041M5204V, 均购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 动物

雄性家兔, 体质量 2.5~2.8 kg, 北京隆安实验动物养殖中心提供, 动物合格证号 SCXK (京) 2014-0003。

### 1.3 仪器

Rayto RT-6100 酶标仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; LG-PABER 型凝血因子分析仪, 北京世帝科学仪器公司; BT87-2 型实验性体内血栓形成测

定仪,包头医学院心血管研究室;LD5-2A离心机,北京医用离心机厂;Sartorius BT 125D 电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司;540VS型血小板聚集仪,美国CHRONO-LOG公司。

## 2 方法

### 2.1 对家兔下腔静脉血栓形成的影响

**2.1.1 家兔血栓模型制备及给药** 家兔手术前,禁食过夜,40 mg/kg 戊巴比妥钠 iv 麻醉后,仰卧位固定于手术台上,按照文献方法<sup>[7]</sup>加以改进,制备家兔下腔静脉血栓模型。腹部手术剃净兔毛,碘酊消毒,沿腹中线开腹,切口约长5 cm;分离左侧肾脏远心端的下腔静脉,结扎一段15 mm血管段,血管腔内插入0.5 cm长针状阳极电极,阴极插入动物皮下形成环路。刺激电流为1 mA,时间15 min。接通直流电后在阳极形成活性氧离子,对血管内皮产生损伤,从而慢慢形成血栓。电刺激完毕后将电极取出,松开血管段两端的结扎线;受损的下腔静脉近心端狭窄至原先的1/5。逐层缝合腹壁,动物清醒后回笼饲养,为防感染,im 青霉素(20万单位)。

注射用血塞通临床使用剂量为3.3 mg/kg,换算成家兔等效剂量为10 mg/kg。家兔按照体质量随机分为5组:模型组,血塞通低、中、高剂量(5、10、20 mg/kg)组和低分子肝素钠注射液(阳性药,100 U/kg)组,每组10只。造模1 h后开始给药,模型组给予相应体积的生理盐水。其中注射用血塞通(冻干)组和模型组采用耳缘iv给药,低分子肝素钠注射液采用sc注射,连续给药5 d。给药体积均为1 mL/kg。

**2.1.2 标本采集和指标检测** 家兔最后一次给药完毕1 h后,测定家兔出血时间。用专制的刀片于家兔舌的正面作一标准切口(深1 mm、长5 mm),随后每隔20秒以滤纸吸附一次切口部位血液,并小心避免与伤口接触,切口起始至滤纸不再粘附血迹为止的间隔时间为出血时间;称取吸附血液前后的滤纸质量,计算流出血液总质量即为出血量。

随后行颈总动脉插管取血,3.8%枸橼酸钠抗凝(全血:抗凝剂=9:1),3 000 r/min离心10 min后取血浆置于一80℃冰箱内,应用试剂盒进行后续检测。PT、TT、APTT、FIIa采用凝固法检测;FXa、FIIa、FXIa、ATIII、TAT、APC、t-PA、PLG、PROUK、Trypsin、6-keto-PGF1a和TXB<sub>2</sub>采用酶联免疫法检测。家兔采血完毕,剖开腹腔,取血栓形成部位的血管段,纵向剖开,将血栓纵向切分成2份,分

别称湿质量后,一部分烤箱内烤至恒重,用于折算血栓干质量;另一部分用0.5 mol/L NaOH溶解,使用蛋白定量试剂盒测定血栓内基质量。最后根据初始分成的两部分比例进行结果校正,计算出全血栓的干质量及血栓基质量。

### 2.2 对家兔血小板聚集的影响

**2.2.1 家兔贫、富血小板血浆的制备** 家兔iv 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,仰卧位固定在手术台上,切开颈部皮肤行颈总动脉插管,动脉取血后3.8%枸橼酸钠溶液抗凝,700 r/min离心10 min,取上清部分即富血小板血浆(PRP),剩余部分3 000 r/min离心10 min,取上清部分即贫血小板血浆(PPP)。

**2.2.2 血小板聚集率测定** 按照Born氏比浊法,将盛有240 μL PRP的比浊管置于血小板聚集仪中,分别加入不同浓度的血塞通,使血塞通终质量浓度为0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mg/mL,对照组给予相应体积的生理盐水,体积为10 μL,37℃孵育3 min,经PPP标定后,在搅拌情况下加入诱导剂诱导聚集。所用诱导剂分别为:CG 4 μg/mL、ADP 0.02 mmol/L、AA 0.5 mmol/L。根据最大聚集率分析药物对血小板聚集的影响。

血小板聚集抑制率=(对照组血小板最大聚集率-给药组血小板最大聚集率)/对照组血小板聚集率

## 2.3 数据统计

以SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$ ,组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐者用LSD检验,方差不齐者用Games-Howell检验。

## 3 结果

### 3.1 对家兔下腔静脉血栓形成的影响

**3.1.1 对静脉血栓质量及基质量的影响** 家兔下腔静脉电刺激后,模型组下腔静脉内形成明显血栓,血栓湿质量均值为134.3 mg。家兔给予注射用血塞通(冻干)5、10、20 mg/kg后,其血栓湿质量明显减轻,并呈现一定的量效关系,与较模型组比较差异显著( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。给予100 U/kg低分子肝素钠注射液后,其血栓湿质量亦明显降低( $P < 0.05$ )。

血栓取材称重后,将其烘干至恒重。模型对照组干质量均值为78.0 mg。给予注射用血塞通(冻干)5、10、20 mg/kg后,可以剂量依赖性减轻血栓干质量,中、高剂量组差异显著( $P < 0.01$ )。给予100 U/kg低分子肝素钠注射液后,其血栓干质量亦明显降低( $P < 0.001$ )。

模型组血栓内的基质均质量为 25.4 mg, 家兔给予注射用血塞通(冻干) 5、10、20 mg/kg 后, 其血栓内基质量明显降低, 高剂量组差异显著( $P<0.05$ ); 给予低分子肝素钠注射液后, 其血栓内基质量亦明显降低, ( $P<0.01$ )。结果表明, 注射用血塞通(冻干)对电刺激伴狭窄所致的家兔下腔静脉血栓的形成有明显的抑制作用。结果见表 1。

表 1 注射用血塞通(冻干)对家兔电刺激形成静脉血栓质量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on weight of venous thrombosis weight caused by electrical stimulation in rabbits ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	湿质量/mg	干质量/mg	基质量/mg
模型	—	134.3±69.6	78.0±34.8	25.4±15.8
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	104.4±35.7	52.9±20.6	15.2±5.5
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	80.0±39.5*	36.0±17.3**	13.6±5.9
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	60.8±31.9**	29.9±8.7**	12.2±5.4*
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	63.9±24.3*	24.0±10.0***	7.9±2.7**

与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ , 下同

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs model group, same as below

表 2 注射用血塞通(冻干)对家兔出血时间及出血量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Xuesaitong Injection(freeze-drying) on bleeding time and blood loss in rabbits ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	出血时间/s	出血量/mg
模型	—	60.9±25.6	61.6±34.8
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	60.6±11.0	58.7±57.3
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	67.8±28.2	64.1±43.2
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	63.5±13.7	68.5±36.3
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	105.6±26.0**	148.6±80.6**

**3.1.3 对血浆 APTT、PT 及 TT 的影响** 家兔给予注射用血塞通(冻干)后, APTT、PT、TT 无明显变化; 与模型组比较, 低分子肝素钠注射液组 PT、APTT 显著延长( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。该项结果表明, 注射用血塞通(冻干)在发挥抗血栓作用的同时, 对凝血参数无显著的影响, 见表 3。

**3.1.4 对凝血因子的影响** 连续 5 d iv 给予注射用血塞通(冻干)后, 家兔血浆内的 FIIa、FIIa、FXa 和 FXIa 水平均无明显变化, 低分子肝素钠注射液对 FIIa 和 FXa 活性有一定的抑制作用( $P<0.05$ )。该项结果表明, 血塞通对家兔凝血因子无显著影响, 见表 4。

**3.1.5 对抗凝系统的影响** 连续 5 d iv 给予注射

**3.1.2 对出血时间及出血量的影响** 家兔给予注射用血塞通(冻干)后, 出血时间和出血量均无明显变化。低分子肝素钠注射液组的出血时间和出血量均显著增加, 与模型组比较显著增加( $P<0.01$ )。结果表明, 注射用血塞通(冻干)在发挥抗血栓作用的同时, 不会产生明显的出血副作用, 见表 2。

用血塞通(冻干)后, 家兔血浆内的 ATIII、TAT 和 APC 水平均无明显变化; 低分子肝素钠注射液对 ATIII、TAT 和 APC 水平亦无显著的影响。结果表明, 注射用血塞通(冻干)对家兔抗凝系统无显著影响, 见表 5。

**3.1.6 对纤溶系统的影响** 连续 5 d iv 给予 20 mg/kg 的注射用血塞通(冻干)后, 家兔血浆内的 t-PA 显著增加( $P<0.01$ ); 低分子肝素钠注射液组 t-PA 水平与模型组比较也明显增加( $P<0.01$ )。连续给予注射用血塞通(冻干)和低分子肝素钠注射液后, PLG、PROUK 和胰蛋白酶水平均无显著性变化。该项结果表明, 注射用血塞通(冻干)能够增加家兔血浆内 t-PA 水平, 见表 6。



表3 注射用血塞通(冻干)对PT、TT和APTT的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 3 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on PT, TT, and APTT in plasma of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	PT/s	TT/s	APTT/s
模型	—	7.1±0.3	13.5±1.7	24.7±5.4
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	7.0±0.4	13.4±2.4	26.3±4.9
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	6.6±0.5	14.3±2.5	27.0±4.4
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	7.0±0.6	13.6±1.0	31.6±10.1
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	7.6±0.4**	14.4±1.3	33.5±12.0*

表4 注射用血塞通(冻干)对家兔FIIa、FIIa、FXa和FXIa水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 4 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on FIIa, FIIa, FXa, and FXIa contents in plasma of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	FIIa/(g·L <sup>-1</sup> )	FIIa/(U·L <sup>-1</sup> )	FXa/(U·L <sup>-1</sup> )	FXIa/(U·L <sup>-1</sup> )
模型	—	5.2±1.5	26.1±2.5	26.3±3.6	20.9±9.2
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	5.2±1.3	26.6±2.1	25.1±3.5	19.0±1.7
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	6.0±2.2	25.9±2.8	24.1±3.4	18.6±1.1
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	4.5±0.9	24.8±2.8	25.2±3.3	18.6±1.2
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	5.0±0.5	24.0±2.4*	23.4±2.9*	18.6±2.6

表5 注射用血塞通(冻干)对家兔ATIII、TAT和APC水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 5 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on ATIII, TAT, and APC contents in plasma of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	ATIII/(ng·mL <sup>-1</sup> )	TAT/(ng·L <sup>-1</sup> )	APC/(ng·mL <sup>-1</sup> )
模型	—	57.6±4.9	156.6±80.1	3.6±0.5
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	60.6±6.4	198.8±28.7	3.7±0.4
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	56.8±7.3	197.9±27.7	3.5±0.4
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	55.6±6.9	189.9±24.6	3.5±0.4
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	57.6±5.9	171.0±32.9	3.2±0.4

表6 注射用血塞通(冻干)对家兔t-PA、PLG、PROUK和Trypsin的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 6 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on contents of t-PA, PLG, PROUK, and Trypsin in plasma of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	t-PA/(μg·L <sup>-1</sup> )	PLG/(mU·L <sup>-1</sup> )	PROUK/(pg·mL <sup>-1</sup> )	Trypsin/(ng·mL <sup>-1</sup> )
模型	—	4.6±0.4	764.3±146.5	116.6±9.8	3.2±0.4
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	4.5±0.6	765.5±82.5	115.1±10.8	3.6±0.5
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	4.6±0.6	697.9±124.9	118.0±13.1	3.6±0.3
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	5.1±0.6**	873.2±195.8	119.8±11.3	3.4±0.3
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	5.2±0.6**	750.6±128.2	116.8±12.5	3.1±0.4

**3.1.7 对血小板活化参数的影响** 给予注射用血塞通(冻干)后,中、高剂量组家兔血浆内 6-keto-PGF1a 水平显著增加 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ );低分子肝素钠注射液组 6-keto-PGF1a 变化不明显。给予 20 mg/kg 注

射用血塞通(冻干)后, TXB<sub>2</sub> 水平显著降低 ( $P<0.05$ );低分子肝素钠注射液组无明显变化。结果表明,注射用血塞通(冻干)能够增加血浆内 6-keto-PGF1a 的水平,同时降低 TXB<sub>2</sub> 的水平,见表 7。

表 7 注射用血塞通(冻干)对家兔 6-keto-PGF1 $\alpha$  和 TXB<sub>2</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 7 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on content of 6-keto-PGF1 $\alpha$  and TXB<sub>2</sub> in plasma of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	6-keto-PGF1 $\alpha$ /(ng·L <sup>-1</sup> )	TXB <sub>2</sub> /(ng·L <sup>-1</sup> )
模型	—	230.8 $\pm$ 24.6	437.6 $\pm$ 47.2
注射用血塞通(冻干)	5 mg·kg <sup>-1</sup>	248.0 $\pm$ 48.3	430.2 $\pm$ 59.0
	10 mg·kg <sup>-1</sup>	255.0 $\pm$ 27.2 <sup>**</sup>	405.3 $\pm$ 32.6
	20 mg·kg <sup>-1</sup>	291.9 $\pm$ 29.7 <sup>***</sup>	380.6 $\pm$ 68.5 <sup>*</sup>
低分子肝素钠注射液	100 U·kg <sup>-1</sup>	255.8 $\pm$ 35.0	429.2 $\pm$ 169.7

### 3.2 对家兔血小板聚集的影响

**3.2.1** 对 CG 和 ADP 诱导的家兔血小板聚集的影响 高浓度的注射用血塞通(冻干)对 CG、ADP 诱导的家兔血小板聚集有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ 、0.01), 抑制率分别为 12.9%、29.5%, 但均未达到 50%, 见表 8。

**3.2.2** 对 AA 诱导的家兔血小板聚集的影响 家兔血浆内加入 AA 后, 血小板发生聚集, 分别加入不同浓度的注射用血塞通(冻干)0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mg/mL 后, 可以剂量依赖性地抑制 AA 所致的兔血小板聚集, 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.920 mg/mL。结果见表 9。

表 8 注射用血塞通(冻干)对 CG、ADP 诱导的家兔血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Table 8 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on platelet aggregation induced by CG and ADP ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	诱导剂	最大聚集率/%	抑制率/%
对照	—	CG	64.1 $\pm$ 4.3	—
注射用血塞通(冻干)	4	CG	56.0 $\pm$ 7.3 <sup>*</sup>	12.9 $\pm$ 7.3
对照	—	ADP	57.3 $\pm$ 7.6	—
注射用血塞通(冻干)	4	ADP	40.5 $\pm$ 12.2 <sup>**</sup>	29.5 $\pm$ 19.0

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group

表 9 注射用血塞通(冻干)对 AA 诱导的家兔血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Table 9 Effect of Xuesaitong Injection (freeze-drying) on platelet aggregation induced by AA ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	最大聚集率/%	抑制率/%
对照	—	70.8 $\pm$ 7.6	—
注射用血塞通(冻干)	0.125	67.9 $\pm$ 8.0	6.6 $\pm$ 6.0
	0.250	58.8 $\pm$ 6.4 <sup>*</sup>	20.7 $\pm$ 11.7
	0.500	51.8 $\pm$ 6.3 <sup>**</sup>	29.6 $\pm$ 13.8
	1.000	31.1 $\pm$ 8.4 <sup>***</sup>	57.4 $\pm$ 14.7
	2.000	10.8 $\pm$ 13.7 <sup>***</sup>	84.9 $\pm$ 18.5
	4.000	1.1 $\pm$ 2.5 <sup>***</sup>	98.4 $\pm$ 3.3

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group

## 4 讨论

早在 19 世纪, 德国著名医学家魏尔啸就提出血栓形成的三大因素为血流状态改变、血管内皮损伤和血液成分改变。在此理论基础上, 常见的静脉血栓动物模型的制备方法主要包括狭窄法、结扎法和电刺激法<sup>[8]</sup>。狭窄法主要通过改变血管内血流状态形

成血栓, 电刺激法则主要通过损伤血管内皮导致血栓的形成。本课题组采用电刺激伴狭窄法制备家兔下腔静脉血栓, 考察重组人尿激酶原的影响<sup>[9]</sup>。在本实验中, 采用电刺激伴狭窄法造家兔下腔静脉血栓模型, 比单纯使用电刺激法或结扎法能更好地模拟人体生理状态下静脉血栓形成的过程。

注射用血塞通(冻干)连续5 d给药后,能够剂量依赖性地降低血栓湿质量、干质量及基质量,表明注射用血塞通(冻干)对下腔静脉血栓有明显的抑制作用。低分子肝素钠注射液亦有一定的抗血栓作用,在作用强度方面,低分子肝素钠注射液优于中剂量的注射用血塞通(冻干)。在出血副作用方面,家兔给予注射用血塞通(冻干)后,出血量和出血时间与模型组比较均无显著性差异,表明注射用血塞通(冻干)在发挥抗血栓活性的同时,产生的出血副作用较小。家兔注射低分子肝素钠注射液后,出血时间和出血量均显著增加,表明其在发挥抗血栓作用的同时,存在着一定的出血风险。在对凝血功能的影响方面,家兔静脉给予注射用血塞通(冻干)后,3个剂量组 APTT、PT 以及 TT 均无明显变化,表明其对凝血功能无显著影响。家兔给予低分子肝素钠注射液后,APTT 及 PT 均明显增加,表明其对家兔凝血功能造成影响,使凝血时间延长。综上,注射用血塞通(冻干)的抗栓效果比低分子肝素钠注射液稍弱,但在出血副作用以及对凝血功能的影响方面明显低于低分子肝素钠注射液,提示其在使用过程中可能比低分子肝素钠注射液更加安全。

为了明确注射用血塞通(冻干)抗血栓的作用机制,本研究对家兔凝血系统、抗凝系统、纤溶系统以及血小板活化参数4个方面的指标进行了检测。结果表明,注射用血塞通(冻干)对家兔凝血系统和抗凝系统指标无明显影响。在凝血级联反应中,抑制凝血过程中的任何一个因子都会产生一定的抗凝作用,但相应地也会使凝血功能受损,造成出血的增加。注射用血塞通(冻干)在使用过程中对凝血因子无明显影响,因此不会造成出血的增加,也不需要使用者进行密切的凝血功监控,使用起来更加方便和安全。

在纤溶系统指标方面,注射用血塞通(冻干)能够增加家兔血浆内 t-PA 的水平。研究显示<sup>[10-11]</sup>, t-PA 在纤维蛋白溶解过程中起着重要的作用,它是纤溶系统主要的生理性激活剂,可以在纤维蛋白凝块上高效地激活纤溶酶原生成纤溶酶,进而使得纤维蛋白降解,对维持血管内血流的通畅起着重要的作用。本实验结果表明,注射用血塞通(冻干)能增加血浆内 t-PA 水平,提示其抗血栓作用的机制可能与其影响 t-PA 的分泌有关。注射用血塞通(冻干)通过增加 t-PA 的水平,增强纤溶系统活性,进而使血栓溶解,抑制血栓的形成。

在血小板活化指标方面,注射用血塞通(冻干)能够增加家兔血浆内 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 的水平,同时降低 TXB<sub>2</sub> 的水平。前列环素(PGI<sub>2</sub>)和血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)是花生四烯酸代谢过程中产生的一对具有重要生理调节功能的物质,PGI<sub>2</sub> 具有强烈的抑制血小板聚集和舒张血管的作用,而 TXA<sub>2</sub> 具有很强的促血小板聚集和血管收缩作用。正常生理状况下,血液中 TXA<sub>2</sub> 和 PGI<sub>2</sub> 水平保持相对平衡,动态调节体内血流的正常流动,从而保持血管的通畅。当血管受到损伤时, TXA<sub>2</sub> 将分泌增多, PGI<sub>2</sub> 减少,导致血小板聚集,血栓形成加速。PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 在血液中极不稳定,短时间内便转变为稳定的代谢产物 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 和 TXB<sub>2</sub>, 因此可以通过对 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 和 TXB<sub>2</sub> 的检测,间接反映 PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 的水平<sup>[12-13]</sup>。在本实验中,注射用血塞通(冻干)能够增加家兔血浆内 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 水平,降低 TXB<sub>2</sub> 水平,表明其可能作用于血栓形成部位的血管内皮细胞,增加前列腺合成酶活性,促进血小板生成 PGI<sub>2</sub>, 减少 TXA<sub>2</sub> 的生成,从而抑制血小板的聚集和血管收缩,减少血栓的形成。

在血小板聚集实验中,采用3种诱导剂诱导血小板聚集。注射用血塞通(冻干)对 CG 和 ADP 诱导的血小板聚集虽然也有一定的影响,但都是在较高浓度下(4 mg/mL)产生的,且抑制程度较低,均未达到 50%。注射用血塞通(冻干)对 AA 诱导的血小板聚集,显示出明显的抑制作用,且存在着一定的剂量依赖性,提示注射用血塞通(冻干)抑制血小板聚集可能通过花生四烯酸途径发挥作用的。

综上,注射用血塞通(冻干)抑制血栓形成的机制可能是多方面的。一方面,它能够增加 t-PA 水平,增强纤溶系统活性,促进血栓溶解;另一方面,它可以增加 PGI<sub>2</sub> 分泌,抑制 TXA<sub>2</sub> 的生成,抑制血小板的聚集和血管收缩,进而抑制血栓的形成。注射用血塞通(冻干)兼具抗血栓和溶栓的双重作用,二者相辅相成,最终达到抑制血栓生成的结果。

#### 参考文献

- [1] Colwell C W Jr. Rationale for thromboprophylaxis in lower joint arthroplasty [J]. *Am J Orthop* (Belle Mead NJ), 2007, 36(9 Suppl): 11-13.
- [2] Lauw M N, Coppens M, Eikelboom J W. Recent advances in antidotes for direct oral anticoagulants: their arrival is imminent [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(4): 381-384.
- [3] 刘宪平. 注射用血塞通治疗急性脑梗死的疗效观察

- [J]. 中草药, 2003, 34(6): 550-551.
- [4] 陈云华, 张硕峰, 孙建宁, 等. 注射用血塞通滴丸抗大鼠血栓形成及溶栓作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 253-256.
- [5] 曹 洪, 张 颖, 张功礼. 血塞通注射液预防深静脉血栓形成的实验研究 [J]. 中医正骨, 2008, 20(5): 6-8.
- [6] 嵇 扬, 沈 娟, 聂渝琼, 等. 注射用血塞通注射液对二磷酸腺苷(ADP)诱导血小板聚集的抑制作用 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(7): 1405-1406.
- [7] Sun Y L, Zhao Y, Xiang Z, *et al.* An experimental study of acutobin and heparin on acute inferior vena cava thrombus in rabbits [J]. *Chin J Gen Surg*, 2010, 25(7): 562-565.
- [8] 刘 政, 张 玥, 侯玉芬. 深静脉血栓形成动物模型的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 57-59.
- [9] 孙双勇, 丁文侠, 孙 倩, 等. 重组人尿激酶原对家兔下腔静脉血栓的抑制作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 582-586.
- [10] Sha J H, Yang Z W, Xia W C, *et al.* Influence of uneven constant magnetic field on thrombosis and plasminogen activator in mice [J]. *Chin J Phys Ther*, 2001, 24(6): 325-327.
- [11] 赵检英, 石 雕, 谭 茜, 等. 全蝎纯化液对实验性动脉血栓形成 t-PA、PAI-1 的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(2): 195-196.
- [12] Targher G, Chonchol M, Zoppini G, *et al.* Hemostatic disorders in type 1 diabetes mellitus [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2011, 37(1): 58-65.
- [13] Takeuchi K, Watanabe H, Tran Q K, *et al.* Effects of cytochrome P450 inhibitors on agonist-induced  $Ca^{2+}$  responses and production of NO and  $PGI_2$  in vascular endothelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 248(1-2): 129-134.