

姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓作用研究

张 姐^{1,2}, 金 城^{1*}, 骆骄阳^{1,2}, 李兴丰^{1,3}, 鄢 丹¹, 肖小河^{1*}, 董小萍²

1. 解放军第 302 医院 全军中药研究所, 北京 100039

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

3. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

摘 要: 目的 研究姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓活性, 为探寻姜黄活血化瘀药效物质提供参考。方法 采用家兔血浆复钙时间法、凝血酶时间法及体外血栓法、全血血块法, 分别对 3 个天然姜黄素类化合物姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的体外抗凝血与抗血栓活性进行测定。结果 姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素均能延长家兔血浆复钙时间 ($P < 0.01$) 及凝血酶时间 ($P < 0.01$), 且均能加快体外血栓 ($P < 0.01$) 及全血凝块的溶解 ($P < 0.01$), 其中去甲氧基姜黄素的作用最强。结论 姜黄素类化合物具有较好的体外抗凝血与抗血栓作用, 空间不对称结构能加强姜黄素类化合物结构母核的抗凝活性。

关键词: 姜黄素; 去甲氧基姜黄素; 双去甲氧基姜黄素; 抗凝血作用; 抗血栓作用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2070-04

In vitro anticoagulant and antithrombotic effects of curcuminoids

ZHANG Da^{1,2}, JIN Cheng¹, LUO Jiao-yang^{1,2}, LI Xing-feng^{1,3}, YAN Dan¹, XIAO Xiao-he¹, DONG Xiao-ping²

1. China Military Institute of Chinese Meteria Medica, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

3. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Key words: curcumin; demethoxycurcumin; bisdemethoxycurcumin; antitrombotic effect; anticoagulant effect

姜黄为常用传统活血化瘀中药, 具有破血行气、通经止痛的功效^[1], 现代药理研究表明姜黄素类成分具有调血脂、抗凝、抗氧化、利胆、抗癌等多种药理作用^[2-9]。但目前对姜黄活血化瘀的药效物质基础研究却鲜有报道, 仅见姜黄素抑制血小板聚集、增加纤溶活性^[10-11]等研究, 且大多数研究未对姜黄素类化合物中其他成分活性进行深入探讨。为了较为全面地探寻姜黄活血化瘀的药效物质基础, 本实验选取姜黄素类化合物中 3 种主要成分^[12]姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素作为研究对象, 采用经典的体外抗凝血及抗血栓方法, 以血浆复钙时间、凝血酶时间、体外血栓溶解率及全血凝块溶解率为指标, 考察姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓的活性, 为姜黄活血化瘀功效的深入研究、进一步探讨姜黄组分体外活性提供参考。

1 材料

1.1 动物

新西兰大耳白兔, 雄性, 体质量 2.0~2.5 kg, 由军事医学科学院提供, 合格证号 SCXK(京)2007-0003。

1.2 药品与试剂

姜黄素对照品、去甲氧基姜黄素对照品, 贵州迪大公司, 质量分数均 >98%; 双去甲氧基姜黄素对照品, 上海顺勃生物工程有限公司, 质量分数 >98%; 凝血酶、牛纤维蛋白原 (临用前配制), 均为美国 Sigma 公司产品; 氯化钠注射液, 石家庄四药有限公司生产。

2 方法

2.1 样品的制备

分别精密称取姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去

收稿日期: 2010-12-02

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZXJ09004-057, 2009ZX09502-22)

作者简介: 张 姐 (1986—), 女, 辽宁沈阳人, 成都中医药大学硕士研究生, 主要从事药物化学及生物质量标准的研究。

Tel: (010) 66933325 E-mail: zhangda302@126.com

*通讯作者 肖小河 E-mail: pharmacy302@126.com 金城 E-mail: pijincheng@126.com

甲氧基姜黄素对照品 10.40、10.12、11.31 mg, 加 5%乙醇溶液稀释成不同质量浓度。

2.2 体外抗凝血作用^[13]

2.2.1 对家兔血浆复钙时间的影响 家兔耳缘静脉取血 4.5 mL, 加至含有 38 g/L 枸橼酸钠 0.5 mL 的 10 mL 离心管中, 混匀, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。另取 96 孔板 1 个, 实验组每孔加入混合血浆 0.1 mL 及不同质量浓度姜黄素 (0.208、0.104、0.052 mg/mL)、去甲氧基姜黄素 (0.202、0.101、0.051 mg/mL)、双去甲氧基姜黄素 (0.226、0.113、0.057 mg/mL) 各 0.1 mL, 对照组加入混合血浆 0.1 mL 及 5%乙醇溶液 0.1 mL, 于 37 °C 温育 1 min 后分别向每孔加入 2.775 g/L CaCl₂ 溶液 0.1 mL, 计时, 直到检测到纤维蛋白丝时停止计时, 重复 10 次, 求平均值, 即为血浆复钙时间。

2.2.2 对凝血酶时间的影响 按“2.2.1”项的方法制备混合血浆, 在 96 孔板中加入混合血浆和不同质量浓度 (同“2.2.1”项) 姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素各 0.1 mL, 37 °C 温育 3 min, 再加入已预温的 1×10⁴ U/L 凝血酶 0.1 mL, 混匀, 记录血浆凝固所需时间。以 5%乙醇溶液为对照, 每组重复 10 次, 取平均值。

2.3 体外抗血栓作用^[13]

2.3.1 溶栓作用 家兔耳缘静脉采血置试管中, 按体积比 1:9 加入质量浓度为 38 g/L 枸橼酸钠溶液, 然后依次加入纤维蛋白原溶液 (质量分数为 0.5%)、CaCl₂ 溶液 (55.5 g/L) 和凝血酶溶液 (1.0×10⁵ U/L), 加入量为每毫升血中加入纤维蛋白原溶液 20 μL、CaCl₂ 溶液 10 μL 和凝血酶溶液 20 μL。混匀, 注入到内径为 8 mm 的玻璃试管中, 37 °C 水浴 20 min 后取出血栓, 切成 5 mm 的小段, 放入装有不同质量浓度 (同“2.2.1”项) 姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和 5%乙醇溶液各 2 mL 的试管中, 37 °C 温育, 于 0、4、12、24、48 h 分别测定剩余血栓段的质量, 计算血栓溶解率^[14], 各药物重复测定 10 次。

血栓溶解率=(血栓初始质量-药物作用后各时间点血栓质量)/血栓初始质量

2.3.2 对全血凝块的溶解作用 家兔心脏采血 20 mL 置于表面皿中, 2 h 后自然凝固后切成 0.3 cm³ 的小块, 用生理盐水淋洗 3 遍待用。将不同质量浓度 (同“2.2.1”项) 的姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素及 5%乙醇溶液各 2 mL 加入不同

西林瓶中, 每组 5 小瓶, 再向各瓶中随机加入 2 个血块, 37 °C 水浴保温, 观察血块溶解情况, 并分别于 0、12、24、48 h 分别测血块的质量, 计算全血凝块溶解率。

全血凝块溶解率=(血凝块初始质量-药物作用后各时间点血凝块质量)/血凝块初始质量

3 结果

3.1 体外抗凝血作用

3.1.1 对家兔血浆复钙时间的影响 不同质量浓度的姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素均能显著延长家兔血浆复钙时间, 其中去甲氧基姜黄素作用最强, 且呈量效关系, 而姜黄素与双去甲氧基姜黄素比较无显著差异。结果见表 1。

表 1 姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素对家兔血浆复钙时间及凝血酶时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on plasma recalcificatic time and coagulation time of rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	$\rho/$ (mg·mL ⁻¹)	血浆复钙时间/s	凝血酶时间/s
姜黄素	0.208	57.7±2.3**	126.6±3.6**
	0.104	58.3±2.0**	117.7±2.1**
	0.052	53.5±1.9**	112.4±2.7**
去甲氧基姜黄素	0.202	75.3±3.1**	162.8±3.9**
	0.101	62.1±2.9**	146.1±3.0**
	0.051	57.2±2.7**	144.1±2.1**
双去甲氧基姜黄素	0.226	60.8±2.2**	124.5±2.6**
	0.113	57.7±2.6**	119.6±1.8**
	0.057	55.5±2.4**	117.2±2.4**
5%乙醇	—	43.0±2.7	99.2±2.2

与 5%乙醇组比较: ** $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs 5% EtOH group, below is same

3.1.2 对凝血酶时间的影响 不同质量浓度的姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素均能延长凝血酶时间, 作用强度均随着质量浓度的增大而增强, 其中去甲氧基姜黄素作用最强, 与姜黄素及双去甲氧基姜黄素比较具有显著差异 ($P < 0.05$), 而姜黄素与双去甲氧基姜黄素间无显著差异。结果见表 1。

3.2 体外抗血栓作用

3.2.1 溶栓作用 随着给药时间的延长, 各实验组血栓溶解率也逐渐增大, 血栓变得松散, 渐呈颗粒状。与对照组相比较, 除低质量浓度的双去甲氧基

姜黄素无溶栓作用外，其他各试药均有显著的溶栓作用，其中去甲氧基姜黄素的溶栓作用最强，姜黄素与双去甲氧基姜黄素的溶栓作用无显著差异，见表 2。

3.2.2 对全血凝块的溶解作用 与对照组比较，姜黄素类成分在不同时间点均显示出较强的溶解全血凝块的作用，且随着给药时间的延长，全血凝块溶解率增加，其中去甲氧基姜黄素的作用最强，与姜黄素、双去甲氧基姜黄素比较具有显著差异 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

4 讨论

本实验结果表明，姜黄素类化合物具有较好的体外抗凝血及抗血栓作用，为姜黄活血化瘀的药效物质之一，其作用机制可能与激活纤溶酶有关。血浆复钙时间、凝血酶时间、体外溶栓实验均表明去甲氧基姜黄素的体外抗凝血及抗血栓作用强于姜黄素与双去甲氧基姜黄素。本实验结果与 Chen 等^[15]、Kiuchi 等^[16]对姜黄素类化合物抗癌及杀线虫生物活性研究的报道相一致，这可能与其不对称的空间结构相关。去甲氧基姜黄素的抗凝活性强于姜黄素，

表 2 姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素对体外血栓与全血凝块的溶解作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Dissolution of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on *in vitro* thrombosis and whole blood clots ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	$\rho/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	全血凝块溶解率/%			血栓溶解率/%			
		12 h	24 h	48 h	4 h	12 h	24 h	48 h
姜黄素	0.208	37.4±3.2**	54.6±5.6**	78.5±5.5**	22.9±4.5**	54.1±5.2**	78.5±5.8**	81.4±4.8**
	0.104	35.2±3.9**	54.4±3.8**	72.3±5.6**	23.0±3.1**	49.2±3.8	70.2±6.6**	76.9±3.8**
	0.052	35.7±2.9**	55.6±3.6**	72.1±4.3**	20.7±4.7**	51.3±6.2*	75.9±3.9**	78.8±5.5**
去甲氧基姜黄素	0.202	53.2±5.0**	63.7±6.0**	86.3±6.1**	62.1±5.3**	74.1±4.3**	82.2±6.1**	91.7±6.2**
	0.101	47.1±2.1**	64.2±5.3**	82.7±5.7**	59.2±3.3**	76.9±5.9**	83.0±4.4**	93.9±6.1**
	0.051	48.2±4.3**	60.1±4.2**	83.1±3.6**	60.8±4.8**	72.6±8.1**	80.9±7.1**	88.7±7.3**
双去甲氧基姜黄素	0.226	39.7±3.3**	52.6±6.9**	76.2±4.9**	21.3±4.7**	53.9±3.9**	58.3±4.7**	79.3±5.4**
	0.113	36.1±3.1**	53.8±4.4**	74.4±5.1**	20.1±3.9**	52.6±6.4**	63.7±5.7**	76.6±4.6**
	0.057	34.3±6.4**	52.9±5.2**	72.4±7.2**	18.6±6.3	50.7±7.7	59.6±6.9**	79.5±5.7**
5%乙醇	—	19.7±3.9	34.3±3.7	61.2±4.8	16.5±3.6	47.2±4.5	52.7±3.6	70.6±4.9

提示仅以姜黄素作为姜黄质量控制与评价的指标缺乏科学性，希望该实验结果对姜黄药效物质基础的深入研究有所借鉴。由于姜黄素类物质的水溶性很小（溶解度 50 $\mu\text{mol/L}$ ），为均匀性考虑，本实验中试药均先采用无水乙醇溶解，再加水稀释成含醇 5% 的溶液，溶液性质稳定，同时采用 5% 乙醇作为阴性对照，以保证该方法的科学性及其可重复性。

现代药理研究表明姜黄素类化合物还具有较强的抗氧化及调血脂作用，因此姜黄素类化合物适宜开发成为新型的溶栓药，可主要用于高血脂伴有血栓性疾病的患者。此外，由于姜黄药材的安全范围广^[17]，新制剂的适宜人群亦会较多，病人的顺应性预期良好。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] Jayaprakasha G K, Rao L J M, Sakariah K S, *et al.*

Chemistry and biological activities of *C. longa* [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2005, 16(12): 533-548.
 [3] Qin N Y, Yang F Q, Wang Y T, *et al.* Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(2): 486-492.
 [4] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素防治大鼠高脂性脂肪肝的研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1322-1326.
 [5] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
 [6] 谌辉, 张景辉, 刘文琪, 等. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(8): 1274-1277.
 [7] Tomren M A, Masson M, Loftsson T, *et al.* Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and comple-

- xation with cyclodextrin [J]. *Int Pharm*, 2007, 38(1/2): 27-34.
- [8] Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, *et al.* Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin [J]. *Cancer Lett*, 2005, 223(2): 181-190.
- [9] Cui L, Miao J, Cui L. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(2): 488-494.
- [10] 韩 婷, 宓鹤鸣. 姜黄的化学成分及药理活性研究进展 [J]. *解放军药学报*, 2001, 11(2): 95-97.
- [11] Srivastava K C, Bordia A, Verma S K. Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty-Acids*, 1995, 52(4): 223.
- [12] Radha K M, Anoop K S, Jaya G, *et al.* Multiple biological activities of curcumin: A short review [J]. *Life Sci*, 2006, 78(18): 2081-2087.
- [13] 钟 山, 崔 征, 王 东, 等. 水蛭注射液抗血栓与抗凝血作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(7): 456-458.
- [14] 刘秀文, 汤仲明, 梁心平, 等. 重组链激酶对兔实验性肺栓塞的溶栓作 [J]. *药学报*, 1998, 33(11): 801-806.
- [15] Chen Y K, Duniec Z M, Liu B, *et al.* Endogenous 12 (S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(6): 1574-1579.
- [16] Kiuchi F, Goto Y, Sigimoto N, *et al.* Nematocidal activity of turmeric: synergic action of curcuminoids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(9): 1640-1643.
- [17] Guddadarangavvanahallyk K J, Lingamullu J M R, Kunnumpurath K S. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(13): 3668-3772.

《中国药学杂志》2012年征订启事

《中国药学杂志》是我国药学界创刊最早、发行量较大、反映我国药理学各学科进展和动态的最具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者群为高、中级药理学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药理学各学科, 辟有院士笔谈、专家笔谈、综述、论著(内容包括: 重大新药创制、生物技术、中药及天然药物、药理、药剂、临床药理学、药品质量及检验、药物化学)、药物与临床、新药述评、药学史、药学历人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊58年来在医药卫生界享有很高声誉。连续三次荣获国家期刊奖, 三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖。2007年获“百种杰出学术期刊”称号。2006-2011年连续六年被评为“中国科协精品期刊工程项目资助期刊”。被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、《国际药理学文摘》(IPA)收录, 加入中国学术期刊光盘版, 进入北大中文科技期刊目录(核心版, 排名第2)。欢迎广大医药工作者积极订阅。

本刊为半月刊, 每期30元, 全年720元, 邮发代号: 2-232。

地 址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室 (100022)

电 话: 010-58699280/75/76/78/79

传 真: 010-58699295

网 址: www.zgyxzz.com.cn

电子信箱: zgyxzz@cpa.org.cn