

白花丹参总酚酸提取物对大鼠血栓闭塞性脉管炎的影响

朱海林¹, 张大伟², 孙隆儒^{1*}, 纪建波¹, 吴 凯²

1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

摘要: **目的** 探讨白花丹参总酚酸提取物对血栓闭塞性脉管炎模型大鼠的影响, 为其临床用于治疗血栓闭塞性脉管炎提供科学依据。 **方法** 采用 LC-UV-MS 法对白花丹参总酚酸提取物中的主要成分进行定性分析。Wistar 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 白花丹参总酚酸提取物高、中、低剂量 (5.63、2.82、1.41 g/kg) 组, 通塞脉片 (0.66 g/kg) 阳性对照组。大鼠股动脉注射月桂酸溶液制备血栓闭塞性脉管炎模型后第 2 天 ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 1 周, 观察用药前后大鼠的体征、血管平滑肌和纤维组织等病理变化, 以及血清中血栓素 B₂ (TXB₂)、6-酮前列腺素 1 α (6-k-PGF_{1 α})、内皮素 (ET) 水平。 **结果** 白花丹参总酚酸提取物明显减轻血栓闭塞性脉管炎大鼠患肢病变程度和范围, 减轻炎症反应, 减少血管内血栓形成, 降低血清中 TXB₂、ET 水平, 升高 6-k-PGF_{1 α} 水平。 **结论** 白花丹参总酚酸提取物对血栓闭塞性脉管炎大鼠具有较好的治疗作用, 其作用机制与其抗氧化、减轻血管壁炎症反应有关。

关键词: 白花丹参; 总酚酸提取物; 血栓闭塞性脉管炎; 血栓素 B₂ (TXB₂); 6-酮前列腺素 1 α (6-k-PGF_{1 α}); 内皮素 (ET)

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)08-1565-05

Effects of total salvianolic acid from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* on thromboangiitis obliterans in rats

ZHU Hai-lin¹, ZHANG Da-wei², SUN Long-ru¹, JI Jian-bo¹, WU Kai²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

2. Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

Abstract: **Objective** To study the effect of total salvianolic acid from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* (TSAS) on rat models with thromboangiitis obliterans (TAO) and provide basis for treatment of this disease. **Methods** Principal components analysis in TSAS was carried out by LC-UV-MS. Wistar rats were randomly divided into six groups, such as Sham, model, TSAS high-, mid-, and low-dose (5.63, 2.82, and 1.41 g/kg) groups, as well as Tongsemai Tablets (0.66 g/kg) as positive group. TAO model was prepared by iv injecting lauric acid solution into the femoral artery of rats and on the second day the rats were ig administrated with TSAS and Tongsemai Tablets, respectively once a day for a week. The changes of physical signs and pathologic grading of vascular smooth muscle and fibrous tissue were observed and the levels of thromboxane B₂ (TXB₂), endothelin (ET), and 6-keto-prostaglandin F_{1 α} (6-k-PGF_{1 α}) in serum were detected. **Results** TSAS significantly reduced the degree and scope of limb lesion in animals of treating group, with the inflammatory reaction and number of thrombus formatron inhibited, decreased the levels of TXB₂ and ET, while increased the level of 6-k-PGF_{1 α} in serum. **Conclusion** TSAS has the significant therapeutic effect on the experimental TAO prepared among rats. The possible mechanisms for this effect may be achieved by improving anti-oxidative function of vessel endothelia and inhibiting the inflammatory reaction in vascular wall.

Key words: thromboangiitis obliterans (TAO); *Salvia miltiorrhiza* Bunge f. *alba* C. Y. Wu et H. W. Li; total salvianolic acid (TSA); thromboxane B₂ (TXB₂); 6-keto-prostaglandin F_{1 α} (6-k-PGF_{1 α}); endothelin (ET)

血栓闭塞性脉管炎 (TAO) 是一种特发的、非累及肢体中小动脉和静脉, 病因不清, 发病机制复杂, 目前仍无定论。白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge

收稿日期: 2011-11-01

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (2009ZRB019UX)

作者简介: 朱海林 (1986—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药及天然药物活性成分。Tel: (0531)88382944 E-mail: hailin8609@126.com

*通讯作者 孙隆儒 Tel: (0531)88382012 E-mail: sunlr@sdu.edu.cn

f. *alba* C. Y. Wu et H. W. Li 为唇形科植物丹参的白花变型, 主要分布在山东省境内。研究表明, 白花丹参不但与丹参的化学成分基本相同, 而且具有丹参所不具备的对血栓闭塞性脉管炎的独特疗效^[1-3]。本实验通过观察血栓闭塞性脉管炎模型大鼠体征及血管平滑肌和纤维组织等病理变化, 以及血清中血栓素 B₂ (TXB₂)、6-酮前列腺素 F_{1α} (6-k-PGF_{1α})、内皮素 (ET) 指标的变化, 探讨白花丹参总酚酸提取物对血栓闭塞性脉管炎大鼠的影响, 为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠, 56 只, 体质量 280~300 g, 由山东大学实验动物中心提供, 动物生产许可证: SCXK (鲁) 20090001。

1.2 药品与试剂

白花丹参总酚酸提取物, 由本实验室制备, 提取物中丹酚酸 B 质量分数达 42.5%; 通塞脉片, 江苏南星药业有限责任公司, 批号 110203。月桂酸, 国药集团化学试剂有限公司; TXB₂、6-k-PGF_{1α}、ET 酶联免疫试剂盒, RD 公司; 乙腈 (色谱纯)、冰乙酸 (分析纯)。

1.3 仪器

LC-MS—2020 液质联用色谱仪, 日本岛津公司; Leica ASP300S 自动组织脱水机、Leica EG1150H 石蜡包埋机、Leica RM2235 切片机, 德国徕卡公司; Olympus BX51 光学显微镜, 日本 Olympus 公司; Bio-Rad Model 680 酶标仪, 美国伯乐公司。

2 方法

2.1 白花丹参总酚酸提取物定性分析

取白花丹参总酚酸提取物约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过。参照文献方法^[4], 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.4% 醋酸水溶液, 线性梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 288 nm, 进样量 10 μL。

2.2 造模、分组与给药

56 只大鼠随机分为假手术组, 模型组, 通塞脉片阳性对照组, 白花丹参总酚酸提取物高、中、低剂量组, 假手术组 6 只大鼠, 其余各组均 10 只。参照文献方法^[5]稍加改进, 制备血栓闭塞性脉管炎模型: 大鼠 ip 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉, 游离股动

脉, 用动脉夹阻断血流, 假手术组于远心端注入 0.2 mL 生理盐水, 其余大鼠于动脉夹下方远心端注入 0.2 mL 月桂酸, 各组均于注射月桂酸后 15 min 去掉动脉夹, 缝合皮肤。手术后第 2 天 ig 给药, 通塞脉片组给予通塞脉片 0.66 g/kg, 白花丹参总酚酸提取物高、中、低剂量组分别给予白花丹参总酚酸提取物 5.63、2.82、1.41 g/kg (每克提取物相当于 7.1 g 生药量), 每天给药 1 次, 连续给药 1 周。假手术组和模型组均给予等体积生理盐水。

2.3 观察指标

2.3.1 大鼠体征变化 观察大鼠患肢皮肤颜色、温度、有无肿胀、有无坏疽及坏疽的程度、跛行等情况。病变程度分级: 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^[5-6]。

2.3.2 患肢血管平滑肌、纤维组织病理观察 送检标本为大鼠患肢月桂酸注射处以下部位的动脉、静脉主干, 以 10% 福尔马林液固定, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色。光学显微镜 (×200) 观察血管平滑肌、纤维组织病变以及动脉壁炎性细胞浸润、纤维增生等情况。

2.3.3 血清 TXB₂、6-k-PGF_{1α} 和 ET 检测 剖开大鼠腹部, 下腔静脉取血, 离心, 取血清。采用酶联免疫法、按试剂盒说明测定血清中 TXB₂、6-k-PGF_{1α} 和 ET 的量。

2.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数等级资料采用秩和检验, 计量资料采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析。

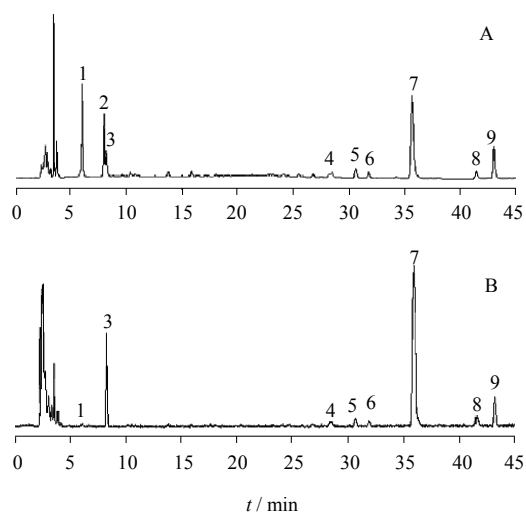
3 结果

3.1 白花丹参总酚酸提取物定性分析

采用 LC-UV-MS 法对白花丹参总酚酸提取物的主要成分进行定性分析, 所得紫外吸收色谱图 (图 1-A) 与总离子流色谱图 (图 1-B) 基本一致。应用 ESI-MS 技术对图中各色谱峰进行质谱扫描后得到一级质谱图, 将各色谱峰的质谱图与文献数据比对^[4,7], 鉴定白花丹参总酚酸提取物的主要成分, 结果见表 1。

3.2 对血栓闭塞性脉管炎大鼠体征的影响

假手术组大鼠无病变表现。模型组大鼠在造模后, 患肢皮肤温度降低, 足爪部开始出现不同程度的苍白、肿胀, 患肢均有缺血表现, 肢体青紫色加



A-紫外吸收色谱图 B-总离子流色谱图
A-UV chromatogram B-total selective ions

图 1 白花丹参总酚酸提取物 LC-UV-MS 图
Fig. 1 LC-UV-MS chromatogram of TSAS

表 1 白花丹参总酚酸提取物中 9 种化合物一级质谱信息
Table 1 MS data of nine compounds in TSAS

峰号	t_R / min	质谱数据	相对分子质量 ($\times 10^5$)	推测物质
1	6.03	347	—	未知
2	7.98	—	—	—
3	8.16	395.0 [2M-1] ⁻	1.98	丹参素
4	28.48	717.0 [M-H] ⁻	7.18	丹酚酸 E
5	30.59	359.0 [M-H] ⁻	3.60	迷迭香酸
6	31.79	537.1 [M-H] ⁻	5.38	紫草酸
7	35.70	717.0 [M-H] ⁻	7.18	丹酚酸 B
8	41.50	717.0 [M-H] ⁻	7.18	丹酚酸 E 或 L 或异构体
9	43.13	493.1 [M-H] ⁻	4.94	丹酚酸 A

深并逐渐向上发展,出现跛行或拖曳现象,在造模 1 周内有部分大鼠出现肢端糜烂、溃疡及炎症反应、有脓液渗出、恶臭味,少数大鼠患侧坏疽部分脱落,患肢的胫后肌群出现严重坏死。与模型组相比,通塞脉片组与白花丹参总酚酸提取物中、高剂量组大鼠的病变程度均明显减轻 ($P < 0.05$),白花丹参总酚酸提取物低剂量组的作用则不明显 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

3.3 血栓闭塞性脉管炎大鼠血管平滑肌、纤维组织病理学观察

假手术组大鼠股动脉通畅,内膜光滑完整,无剥离和脱落现象,血管内无血栓形成,无炎性细胞

表 2 白花丹参总酚酸提取物对血栓闭塞性脉管炎大鼠体征的影响

Table 2 Effect of TSAS on physical signs in rats with TAO

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物 / 只	病变程度					
			无	I	II	III	IV	V
假手术	—	6	6	0	0	0	0	0*
模型	—	10	0	1	2	4	3	0
总酚酸提取物	5.63	10	6	3	0	1	0	0*
	2.82	10	4	4	1	0	1	0*
	1.41	10	2	1	3	3	1	0
通塞脉片	0.66	10	4	2	3	1	0	0*

与模型组比较: * $P < 0.05$, 下同

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

浸润。模型组大鼠股动脉内均有不同程度的血栓形成,低倍镜下观察可见动脉壁增厚,动脉管腔内发生血栓性闭塞,未见再通,内膜大部分脱落,外膜炎性细胞浸润较其他组明显,伴行静脉内亦有血栓形成;高倍镜下观察可见,内皮细胞部分发生水肿、变性、坏死或脱落,有脂质细胞形成并且突进管腔。通塞脉片组与白花丹参总酚酸提取物中、高剂量组大鼠的血栓减少,管腔较规则,血管及周围组织少量炎性细胞浸润,炎症反应减轻;而白花丹参总酚酸提取物低剂量组大鼠动脉壁增厚,炎性细胞浸润及血栓形成较严重,并有脂质沉积。结果见图 2。

3.4 对血栓闭塞性脉管炎大鼠血清 TXB_2 、6-k-PGF_{1 α} 和 ET 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清 6-k-PGF_{1 α} 水平降低 ($P < 0.05$), TXB_2 和 ET 水平明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,通塞脉片组及白花丹参总酚酸提取物高、中剂量组大鼠血清 6-k-PGF_{1 α} 水平明显升高 ($P < 0.05$), TXB_2 和 ET 水平明显降低 ($P < 0.05$);白花丹参总酚酸提取物低剂量组 TXB_2 和 ET 水平明显降低 ($P < 0.05$),而 6-k-PGF_{1 α} 改变不明显 ($P > 0.05$)。结果见表 3。

4 讨论

血栓闭塞性脉管炎的发病机制虽尚未完全阐明,但血管内皮细胞功能受损是其重要因素之一^[8]。ET、血栓素 A₂ (TXA₂)、前列腺素 I₂ (PGI₂) 等是由血管内皮细胞直接合成、分泌或经血管内皮细胞转化的生物活性物质,这些物质与血栓形成密切相关^[9]。内皮细胞损伤后其抗血栓形成功能降低,从而促进血栓形成,并且血管内皮细胞损伤更易造成

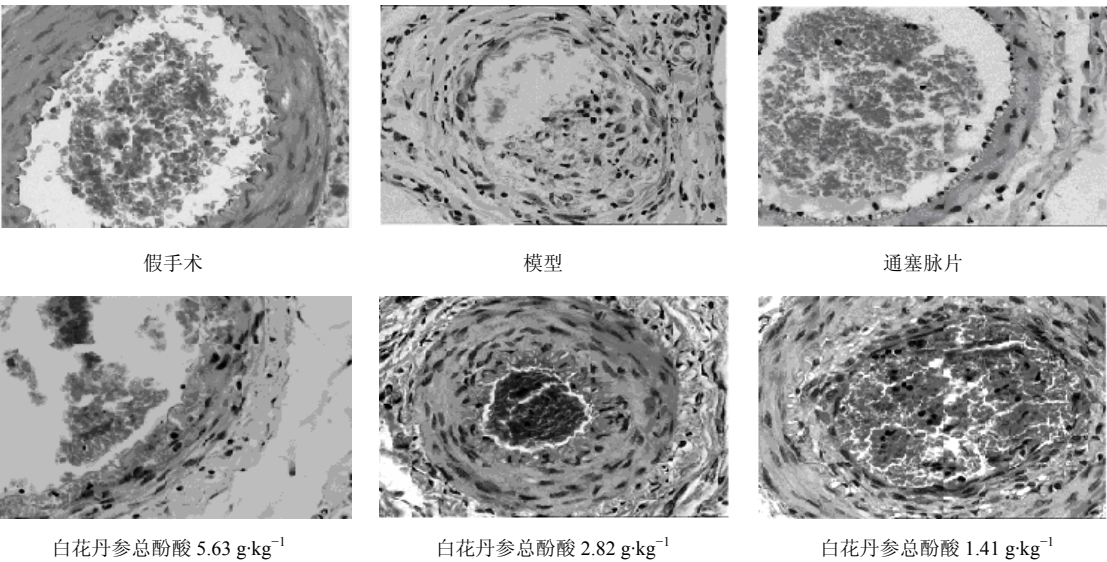


图 2 各组大鼠血管平滑肌和纤维组织病理学观察

Fig. 2 Pathologic images of vascular smooth muscle and fibrosis tissue of rats in each group

表 3 白花丹参总酚酸提取物对血栓闭塞性脉管炎大鼠血清 TXB₂、6-k-PGF_{1α} 和 ET 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of TSAS on TXB₂, 6-K-PGF_{1α}, and ET levels in serum of rats with TAO ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物 / 只	剂量 / (g·kg ⁻¹)	TXB ₂ / (pg·mL ⁻¹)	6-k-PGF _{1α} / (pg·mL ⁻¹)	ET / (pg·mL ⁻¹)
假手术	6	—	218.35 ± 13.64*	157.79 ± 11.42*	16.12 ± 2.96*
模型	10	—	335.43 ± 55.67	92.66 ± 15.46	35.00 ± 7.08
总酚酸提取物	10	5.63	251.77 ± 32.68*	131.10 ± 22.39*	19.81 ± 9.79*
	10	2.82	264.38 ± 33.46*	123.73 ± 18.50*	22.62 ± 9.52*
	10	1.41	288.32 ± 32.01*	113.11 ± 12.63	25.03 ± 6.62*
通塞脉片	10	0.66	269.47 ± 25.74*	125.91 ± 24.34*	22.87 ± 8.57*

血小板等促凝物质在此聚集, 进一步加重病情^[10]。因此血管内皮细胞在血栓闭塞性脉管炎发病过程中起重要作用。血栓闭塞性脉管炎患者脂质过氧化反应剧增可能参与血管内膜损伤^[11]。

丹参总酚酸提取物是从白花丹参中得到的水溶性部位, 含有丹酚酸 A、丹酚酸 B 和迷迭香酸等多酚羟基化合物。丹参总酚酸提取物具有很强的抗脂质过氧化、清除自由基、抑制白细胞黏附及减轻炎症反应等作用, 可以从内部改善血管状况^[12-13]。有研究表明, 丹参素、丹酚酸 A、丹酚酸 B 及丹参水溶性提取物具有抗氧化作用^[14-16]; 原儿茶醛、丹酚酸 A、丹酚酸 B 可抑制黏附分子的表达^[14,17-18]; 丹酚酸 B 可通过抑制动脉粥样硬化模型大鼠肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-6 (IL-6) 等相关炎症因子的分泌, 抑制动脉粥样硬化的炎症反应^[19], 还可降低动脉粥样硬化模型家兔血浆中 TXB₂ 和 ET

的水平, 增加 6-k-PGF_{1α} 的水平, 具有明确的内皮细胞功能保护作用^[20]。本实验发现, 血栓闭塞性脉管炎模型大鼠均有病变表现, 出现不同程度的血栓形成, 血清中 TXB₂ 和 ET 水平显著升高, 6-k-PGF_{1α} 水平显著降低。而与模型组比较, 白花丹参总酚酸提取物中、高剂量给药组大鼠体征变化明显改善, 炎症反应减轻, 血栓减少, 血清中 6-k-PGF_{1α} 水平明显升高, TXB₂ 和 ET 水平降低, 表明白花丹参总酚酸提取物对血栓闭塞性脉管炎具有一定的治疗作用, 其作用机制与其抗氧化作用、抑制炎症反应以及对血管内皮细胞的保护作用有关。白花丹参治疗血栓闭塞性脉管炎的其他有效成分和疗效的确切机制有待进一步深入研究。

参考文献

[1] 王培军, 高长清, 李 蜜. 丹参与白花丹参中丹参酮 II_A 的含量研究 [J]. 甘肃中医, 2004, 17(4): 42-43.

- [2] 张红波, 郭 凯, 任启明. 白花丹参中丹酚酸 B 等成分的图谱鉴别及含量测定 [J]. 中国药业, 2006, 15(15): 46.
- [3] 张百铭. 白花丹参为主治疗血栓闭塞性脉管炎 113 例临床观察 [J]. 山东中医学院学报, 1979(2): 40-41.
- [4] Liu A H, Guo H, Ye M, *et al.* Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1161(1/2): 170-182.
- [5] 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.
- [6] 梁大连, 程艳玲, 董世波, 等. 过山蕨总黄酮对大鼠血栓闭塞性脉管炎的改善作用 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(6): 481-484.
- [7] Wei Y J, Li P, Shu B, *et al.* Analysis of chemical and metabolic components in traditional Chinese medicinal combined prescription containing *Radix Salvia Miltiorrhiza* and *Radix Panax Notoginseng* by LC-ESI-MS methods [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(8): 797-809.
- [8] 周晓辉, 刘忠德, 朱晓勇, 等. 血栓闭塞性脉管炎病因及发病机制研究进展 [J]. 辽宁中医学院学报, 2000, 2(3): 223-224.
- [9] 杨文涛, 金 星. 血栓闭塞性脉管炎实验研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2000, 6(4): 306-308.
- [10] 张淑兰, 魏晨玲. 血栓闭塞性脉管炎患者血栓素、前列环素及血液流变学指标的检测分析 [J]. 微循环学杂志, 2005, 15(1): 58-59.
- [11] 葛金文, 江一平, 贺石林, 等. 血栓闭塞性脉管炎氧自由基与前列环素的变化及其与中医辨证分型的关系 [J]. 中国中西医结合杂志, 1993(11): 652.
- [12] Ho J H, Hong C Y. Salvianolic acids: Small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 30.
- [13] 陈 磊, 陆 茵, 郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 476-479.
- [14] Han J Y, Fan J Y, Yoshinori H, *et al.* Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117(2): 280-295.
- [15] Zhao G R, Zhang H M, Ye T X, *et al.* Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 73-81.
- [16] Zhao G R, Xiang Z J, Ye T X, *et al.* Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* [J]. *Food Chem*, 2006, 99(4): 767-774.
- [17] Zhou Z, Liu Y, Miao A D, *et al.* Protocatechuic aldehyde suppresses TNF- α induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 513(1/2): 1-8.
- [18] Zhou Z, Liu Y, Miao A D, *et al.* Salvianolic acid B attenuates plasminogen activator inhibitor type 1 production in TNF- α treated human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 96(1): 109-116.
- [19] 陈昕琳, 顾仁樾, 章怡祎. 丹参多酚酸 B 对动脉粥样硬化大鼠炎症细胞因子的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(1): 63-67.
- [20] 张艳军, 张发艳, 范英昌. 丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对家兔动脉粥样硬化模型内皮细胞功能的影响 [J]. 天津中医药, 2005, 22(4): 328-330.