

三七总皂苷对急性血瘀大鼠血液流变学的改善作用

韩淑燕^{1,2}, 李海霞¹, 文宗曜³, 屠鹏飞^{1*}

(北京大学 1. 药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 3. 基础医学院血液流变学中心, 北京 100191; 2. 北京大学临床肿瘤学院, 北京 100142)

摘要: **目的** 观察三七总皂苷(PNS)对急性血瘀大鼠血液流变学的影响。**方法** 大鼠随机分为正常对照组、模型组、阿司匹林 100 mg·kg⁻¹阳性对照组、PNS 50 和 100 mg·kg⁻¹组,每日早晚 ig 给药各 1 次,共 7 次。第 5 次给药后,除正常对照组外,其余 4 组大鼠 sc 给予肾上腺素加冰浴造成急性血瘀模型。在切变率 200~1 s⁻¹ 范围内采用锥板法测定全血粘度和血浆粘度;微量毛细管法测定红细胞压积;光电比浊法测定二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板凝聚和光电电磁法测定凝血参数。**结果** 模型组大鼠全血粘度和血浆粘度升高,红细胞聚集指数和血小板凝聚率增加,红细胞压积升高,纤维蛋白原含量增加,凝血酶时间、活化部分凝血活酶时间和凝血酶原时间均显著缩短。而与模型组相比,大鼠 ig 给予 PNS 50 和 100 mg·kg⁻¹ 均能显著降低全血粘度[200 s⁻¹: (4.5 ± 0.4) vs (4.1 ± 0.4), (4.0 ± 0.3) mPa·s; 100 s⁻¹: (5.0 ± 0.4) vs (4.4 ± 0.5), (4.4 ± 0.4) mPa·s; 50 s⁻¹: (5.6 ± 0.5) vs (4.9 ± 0.6), (4.9 ± 0.4) mPa·s; 1 s⁻¹: (27.1 ± 3.0) vs (22.2 ± 4.6), (22.0 ± 3.5) mPa·s] 及血浆粘度[50 s⁻¹: (1.51 ± 0.14) vs (1.33 ± 0.10), (1.32 ± 0.08) mPa·s], 明显降低红细胞压积[0.49 ± 0.02 vs 0.45 ± 0.03, 0.44 ± 0.03]、红细胞聚集指数[(5.5 ± 0.4) vs (5.0 ± 0.5), (5.0 ± 0.6)] 和血小板凝聚率[(32 ± 3)% vs (26 ± 3)%, (24 ± 4)%]; 明显降低纤维蛋白原含量[(4.8 ± 0.3) vs (4.2 ± 0.4), (4.1 ± 0.3) g·L⁻¹], 以及延长凝血酶时间[(25.2 ± 2.7) vs

(30.5 ± 4.7), (31.2 ± 3.9) s] 和凝血酶原时间[(14.5 ± 1.1) vs (15.7 ± 1.1), (15.8 ± 1.0) s]。

结论 PNS 能显著改善血瘀大鼠血液流变学异常。

关键词: 三七总皂苷; 血液流变学; 血液凝固; 血小板凝聚; 全血凝固时间; 纤维蛋白原

中图分类号: R973, R285

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)03-0183-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.03.004

冠心病属中医“血瘀证”范畴,主要病机是心脉痹阻,冠心病和心肌梗死患者存在血液流变学异常^[1]。三七为临床常用治疗冠心病的药物,具有较好的活血化瘀作用,能明显降低血粘度、降低血脂、改善微循环、防治血栓性疾病。降低心肌梗死和缺血性中风的发病率^[2]。三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)是三七中的主要活性成分,具有改善血液流变异常的作用^[3-6]。本课题组前期研究表明,PNS 具有心肌缺血保护作用。为探讨其对缺血性心脏病血液流变异常的改善作用及其作用环节,本文从流变学的角度观察了其对于急性血瘀大鼠血液流变学相关指标的影响。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

PNS, 云南植物药业有限公司, 批号: HB20060352, 含人参皂苷 R_g 32.39%, R_b 33.06%, 三七皂苷 R₁ 5.91%; 阿司匹林(aspirin)肠溶片, 拜耳医药保健有限公司, 批号: BTA6E93; 盐酸肾上腺素(adrenaline)注射液: 10 μg·mL⁻¹, 天津市氨基酸公司, 批号: 20070612; 凝血酶时间(thrombin time, TT)试剂、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)试剂、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)试剂和纤维蛋白原(fibrinogen,

收稿日期: 2008-12-01 接受日期: 2009-04-03

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助课题(30525043)

作者简介: 韩淑燕(1973-), 女, 博士, 主要从事天然药物活性成分的药效和作用机制研究; 屠鹏飞(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物活性成分与新药研究。

* 联系作者 E-mail: pengfeitu@vip.163.com Tel & Fax: (010)82802750

Fib) 试剂,北京中勤世帝科学仪器公司;二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP),批号: 04041602,中国科学院上海生物化学研究所。

1.2 主要仪器

LG-R-80B 型血液粘度仪, LG-PABER-I 血小板凝聚因子分析仪均购自北京中勤世帝科学仪器有限公司; LBY-BX2 红细胞变形仪, 北京普利生仪器有限公司; TGL-16G A 冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; 3F-2 型多功能微量高速离心机, 中国人民解放军第四军医大学暨航空工业部华兴航空机轮公司。

1.3 急性血瘀模型的制备^[7]

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体重 240 ~ 280 g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 合格证号为 SCXK(京)2006-0008。大鼠给予肾上腺素 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 共 2 次, 间隔时间为 4 h。第 1 次 sc 给予肾上腺素 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后 2 h, 将大鼠置于 0°C 冰水中游泳 5 min, 2 h 后再第 2 次 sc 给予肾上腺素 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 造成大鼠急性血瘀症。

1.4 动物分组及给药

将大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 即正常对照组、模型组、阿司匹林 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 阳性对照组、PNS 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。阿司匹林组、PNS 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠 ig 给药, 正常对照组和模型组大鼠 ig 给予等体积的空白溶剂, 每日早晚各 1 次, 共 7 次。于第 5 次给药后, 除对照组 sc 给予生理盐水外, 其余各组大鼠按 1.3 的方法造成大鼠急性血瘀症, 禁食 16 ~ 18 h, 期间给第 6 次和第 7 次药。最后一次给药后 30 min 腹主动脉取血, 肝素钠 $20 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗凝血用于全血粘度、血浆粘度和红细胞压积的测定, 3.8% 枸橼酸钠抗凝血(枸橼酸钠: 全血为 1:9, V/V)用于 APTT, TT, PT, Fib 含量和血小板凝聚率的测定。

1.5 全血粘度和血浆粘度的测定

以锥板式旋转粘度计测定大鼠全血粘度。取肝素抗凝的 0.8 mL 全血加入血液黏度计的样品池中, 于 37°C 测定切变率 200, 100, 50 和 1 s^{-1} 下的全血粘度, 并计算红细胞聚集指数(erythrocyte aggregation index, EAI)^[8], 即 $\text{EAI} = \eta_1 / \eta_{100}$, 其中 η_1 是切变率 1 s^{-1} 下的全血粘度, η_{100} 是切变率 100 s^{-1} 下的全血粘度。取 2 mL 肝素抗凝血, $3000 \times g$ 离心 15 min, 取 0.8 mL 血浆于 37°C 测定血浆粘度。

1.6 红细胞压积的测定

取肝素钠抗凝血适量, $15\,000 \times g$ 离心 5 min, 以

微量毛细管法测定红细胞压积(hematocrit)。

1.7 血小板凝聚性的测定

取枸橼酸钠抗凝血 2 mL , $800 \times g$ 离心 10 min, 制备富血小板血浆; 再以 $2500 \times g$ 离心 10 min, 制备贫血小板血浆, 调节血小板密度约 $2.5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, 以终浓度 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP 为血小板凝聚诱导剂, 采用比浊法于 37°C 测定血小板凝聚率。

1.8 活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血酶原时间和纤维蛋白原含量的测定

取枸橼酸钠抗凝血 1 mL , $3000 \times g$ 离心 15 min, 取上层血浆, 采用血小板凝聚因子分析仪, 按测定试剂说明方法于 37°C 测定 APTT, TT, PT 和 Fib 含量。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 三七总皂苷对急性血瘀大鼠全血粘度和血浆粘度的影响

表 1 结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠全血测定切变率在 200, 100, 50 和 1 s^{-1} 下的全血粘度及血浆粘度明显增高。与模型组相比, PNS 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均可显著降低上述各切变率下的全血粘度及血浆粘度。

2.2 三七总皂苷对急性血瘀大鼠红细胞压积和红细胞聚集的影响

表 2 结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠的红细胞压积和 EAI 明显增加。与模型组相比, PNS 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均可显著降低红细胞压积和 EAI, 与阳性对照阿司匹林的作用相近。

2.3 三七总皂苷对二磷酸腺苷诱导血小板凝聚的影响

图 1 结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠的血小板凝聚率明显增加。与模型组相比, PNS 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均可显著降低血小板的凝聚。

2.4 三七总皂苷对凝血参数的影响

与对照组相比, 急性血瘀模型组的 Fib 含量高(图 2A), APTT, TT 和 PT 显著缩短(图 2B)。与模型组相比, PNS 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组均能显著降低 Fib 含量, 延长 TT 和 PT, 但对 APTT 无明显影响($P > 0.05$)。

Tab 1. Effects of *Panax notoginseng* (PNS) saponins on whole blood and plasma viscosity in rats with blood stasis

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	Whole blood viscosity/mPa·s				Viscosity of plasma/mPa·s
		200	100	50	1 (s ⁻¹)	50 (s ⁻¹)
Normal control		3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.3	4.6 ± 0.3	20.1 ± 1.9	1.22 ± 0.06
Model		4.5 ± 0.4**	5.0 ± 0.4**	5.6 ± 0.5**	27.1 ± 3.0**	1.51 ± 0.14**
Aspirin	100	3.9 ± 0.5##	4.3 ± 0.5##	4.8 ± 0.6##	21.9 ± 4.1##	1.27 ± 0.06##
PNS	50	4.1 ± 0.4##	4.4 ± 0.5##	4.9 ± 0.6##	22.2 ± 4.6##	1.33 ± 0.10##
	100	4.0 ± 0.3##	4.4 ± 0.4##	4.9 ± 0.4##	22.0 ± 3.5##	1.32 ± 0.08##

The rats in aspirine and PNS groups were ig given PNS and aspirine twice a day for consecutive days, altogether 7 times. After the 5th administration, the blood stasis rat model was induced by ice water soaking for 5 min during the time interval between two subcutaneous injections of adrenaline, the control rats received the same procedure except injected with normal saline. The rats were fasted overnight and the blood samples were collected after the last dose. The whole blood viscosity and plasma viscosity were measured. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; ## $P < 0.01$, compared with model group.

Tab 2. Effects of *Panax notoginseng* saponins on hematocrit and erythrocyte aggregation index in rats with blood stasis

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	Hematocrit	EAI
Normal control		0.41 ± 0.02	4.9 ± 0.2
Model		0.49 ± 0.02**	5.5 ± 0.4**
Aspirin	100	0.43 ± 0.02##	5.0 ± 0.5#
PNS	50	0.45 ± 0.03##	5.0 ± 0.5#
	100	0.44 ± 0.03##	5.0 ± 0.6#

See Tab 1 for the treatments. Erythrocyte aggregation index (EAI) = η_1 / η_{100} , η_1 and η_{100} refer to whole blood viscosity under shear rates of 1 s⁻¹ and 100 s⁻¹, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with model group.

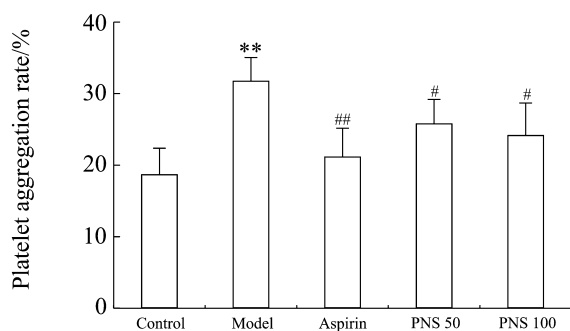


Fig 1. Effects of *Panax notoginseng* saponins on platelet aggregation rate in rats. See Tab 1 for the treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with model group.

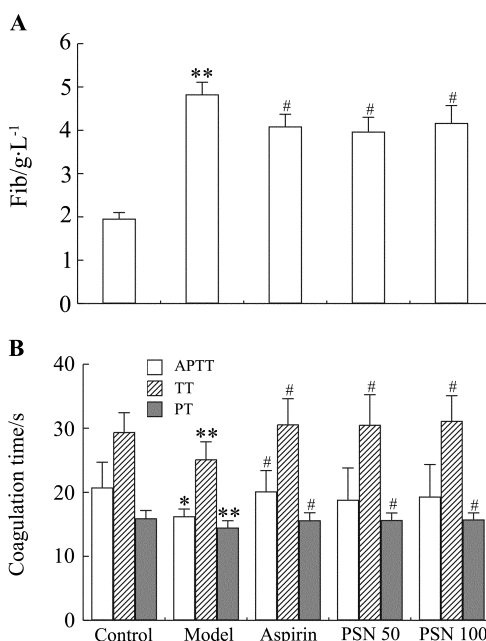


Fig 2. Effects of *Panax notoginseng* saponins on fibrinogen (Fib) (A), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and prothrombin time (PT) (B) in rat blood stasis model. See Tab 1 for the treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with model group.

3 讨论

血液流变学包括3个层次的内容:血液的宏观流动性,即粘度;血细胞的流变性,主要是红细胞的凝聚性和变形性;血液生化物质对血液流变性的影响,主

要是纤维蛋白原等。为了全面评价 PNS 对血瘀模型血液流变性的影响,本研究对上述指标进行了测定。

全血粘度是反映血液流变学特性的宏观指标,影响全血粘度的因素有:红细胞压积、血浆粘度、红细胞聚集性、红细胞变形性、血小板的凝聚性和粘附性等。在诸多因素中,对全血粘度影响最大的就是红细胞压积^[9]。红细胞压积增高将会导致循环障碍,间接刺激血管活性物质的释放导致血小板凝聚。血小板被激活发生凝聚,除参与血栓形成外,凝聚时血栓素 A₂(thromboxane A₂, TXA₂)水平升高还可引起冠脉痉挛,引起微血栓,造成心肌细血管阻塞,使心肌微循环发生障碍,加重心肌缺血。

在本研究中,PNS 50 和 100 mg·kg⁻¹能显著降低急性血瘀大鼠的全血粘度、血浆粘度、红细胞聚集率、红细胞压积和血小板凝聚率。该结果提示 PNS 通过降低血浆粘度,降低红细胞聚集和红细胞压积,减少血小板凝聚^[10],从而降低了全血粘度。据文献报道,三七中皂苷成分对肾上腺素血瘀模型大鼠的血小板凝聚性有明显的抑制作用,该作用主要与升高 6-酮-前列腺素 F_{1a}(6-keto-prostaglandin F_{1a})水平有关^[11];对 ADP 诱导的正常大鼠血浆血小板凝聚作用也具有明显抑制作用,其作用机制可能与抑制 TXA₂的合成有关^[12]。研究表明,三七中的人参皂苷 Rg 类化合物是其抑制血小板凝聚的主要活性成分^[11-12]。

APTT, PT 和 TT 是检测内源性凝血、外源性凝血和凝血共同通路变化的主要筛选指标。PNS 没有显著延长 APTT,表明该药对内源性凝血通路无影响;PNS 能显著延长 TT 和 PT,表明其抗凝血作用主要与外源性凝血系统凝血因子有关^[13]。其中 TT 与 Fib 具有负相关性,TT 延长,Fib 含量应降低^[14],本研究结果与此一致。凝血的共同通路是激活凝血酶原使血浆中的纤维蛋白原转变为纤维蛋白。Fib 对红细胞、血小板的凝聚起桥联作用,使红细胞聚集性、血小板凝聚性增加,从而导致全血粘度升高。本研究表明 PNS 能显著降低血浆中 Fib 的含量从而降低全血粘度。

本研究从不同层次研究了 PNS 改善急性血瘀大鼠血液流变学的作用,验证了三七活血化瘀的药效,但其改善血液流变学的分子机制需进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Zhang ZL, Li B, Zhang LJ, Peng XS, Ma W. Analysis of hemorheology property in coronary heart disease patients[J]. *Chin J Hemorheol*(中国血液流变学杂志), 2006, **16**(2):270-272.
- [2] Yan XW. Observation of clinical effect of notoginseng total saponin tablets in high blood viscosity and hyperlipidemia[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 1999, **5**:19-23.
- [3] Cao BW, Du YB. The influence of notoginseng saponins on hemorheology of ischemic cerebrovascular disease [J]. *People's Mil Surg*(人民军医), 2003, **46**(12):695-697.
- [4] Zhong SQ, Zhang HF, Huang YL, Zhong YY. The effect of Xuesaitong soft capsule in treating acute cerebral infarction and hemorheology [J]. *Chin Remedies Clin*(中国药物与临床), 2008, **8**(1):68-71.
- [5] Zuo Y. The hemorheological change in coronary atherosclerosis patients before and after notoginsenoside injection treatment[J]. *Heilongjiang Med J*(黑龙江医学), 2006, **30**(10):748-751.
- [6] Wang J, Xu J, Zhong JB, Liu JG. Effect of Radix Notoginseng saponins on platelet activating molecule expression and aggregation in patients with blood hyperviscosity syndrome[J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med*(中国中西医结合杂志), 2004, **24**(4):312-316.
- [7] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica*(中药药理研究方法学)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993:564.
- [8] He L, Jiang WY, Mao TM. Preliminary exploration on establishing a simulated model of acute and chronic after-qi-stagnation blood stasis by adrenaline injection [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med*(中国中西医结合杂志), 2004, **24**(3):244-246.
- [9] Wang HR, Wen ZY. *Mechanics of Blood Circulation*(血液循环力学)[M]. Beijing: The Union Publishing House of Peking Medical College & Peking Union Medical College, 1990:7.
- [10] Yao Y, Wu WY, Liu AH, Deng SS, Bi KS, Liu X, et al. Interaction of salvianolic acids and notoginsengosides in inhibition of ADP-induced platelet aggregation [J]. *Am J Chin Med*, 2008, **36**(2):313-328.
- [11] Yang J, Qin CL, Liu T, Zhang Y, Sun YF, Tan HG, et al. Effects of active fractions of danshen or sanqi on platelet adhesion, aggregation and TXA₂, PGI₂ in rat model of blood stasis syndrome[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2004, **10**(6):35-38.
- [12] Yang J, Zhang Y, Qin CL, Sun YF, Tan HG, Zhang

SY, *et al.* Effects of active fractions of danshen or sanqi on platelet adhesion, aggregation and TXA₂, PGI₂ in normal rat[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2004, **10**(5):21-24.

[13] Zheng Y, Xu ZG. Comparative pharmacological study of

ginseng and notoginseng[J]. *Pharmacol Clin Mater Med* (中药药理与临床), 2000, **16**(5):22-24.

[14] Jiang P, Xiao CJ. The correlation analysis of fibrinogen and thrombin time in clotting test[J]. *J Prac Med Tech* (实用医技杂志), 2008, **15**(2):189-190.

Ameliorative effects of *Panax notoginseng* saponins on hemorheology in rats with acute blood stasis

HAN Shu-Yan^{1,2}, LI Hai-Xia¹, WEN Zong-Yao³, TU Peng-Fei^{1*}

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. School of Oncology, Peking University, Beijing 100142, China, 3. Hemorheology Center, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: AIM To evaluate effects of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on the hemorheological abnormality in rats with acute blood stasis. **METHODS** The rats were randomly divided into normal control, model, aspirine 100 mg·kg⁻¹, PNS 50 and 100 mg·kg⁻¹ groups. The rats were ig given PNS or aspirin twice a day, altogether 7 times. After the 5th administration, the acute blood stasis model was induced by adrenaline and ice water soaking. The control group treated with the same procedure except sc normal saline. Whole blood viscosity and plasma viscosity were evaluated by cone-plate viscometer, hematocrit was determined by micro-capillary method, platelet aggregation was measured by photoelectric turbidimetry and coagulation parameters were evaluated by optical electromagnetic method. **RESULTS** Compared with normal control group, whole blood viscosity and plasma viscosity of rats in blood stasis model group were significantly increased; erythrocyte aggregation index (EAI) and the platelet aggregation rate were also significantly elevated. Meanwhile, hematocrit and fibrinogen (Fib) content were also increased, while prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and thrombin time (TT) were shortened. Compared with model group, PNS 50 and 100 mg·kg⁻¹ could signifi-

cantly decrease whole blood viscosity [200 s⁻¹: (4.5 ± 0.4) vs (4.1 ± 0.4), (4.0 ± 0.3) mPa·s; 100 s⁻¹: (5.0 ± 0.4) vs (4.4 ± 0.5), (4.4 ± 0.4) mPa·s; 50 s⁻¹: (5.6 ± 0.5) vs (4.9 ± 0.6), (4.9 ± 0.4) mPa·s; 1 s⁻¹: (27.1 ± 3.0) vs (22.2 ± 4.6), (22.0 ± 3.5) mPa·s], and plasma viscosity [50 s⁻¹: (1.51 ± 0.14) vs (1.33 ± 0.10), (1.32 ± 0.08) mPa·s]; inhibit EAI [(5.5 ± 0.4) vs (5.0 ± 0.5), (5.0 ± 0.6)] and ADP-induced platelet aggregation rate [(32 ± 3)% vs (26 ± 3)%, (24 ± 4)%]; reduce hematocrit (0.49 ± 0.02 vs 0.45 ± 0.03, 0.44 ± 0.03 and Fib content [(4.8 ± 0.3) vs (4.2 ± 0.4), (4.1 ± 0.3) g·L⁻¹]; however, TT [(25.2 ± 2.7) vs (30.5 ± 4.7), (31.2 ± 3.9) s] and PT [(14.5 ± 1.1) vs (15.7 ± 1.1), (15.8 ± 1.0) s] were delayed. **CONCLUSION** PNS possesses remarkable ameliorative effects on hemorheological abnormality in rats with acute blood stasis. **Key words:** *Panax notoginseng* saponins; hemorheology; blood coagulation; platelet aggregation; whole blood coagulation time; fibrinogen

Foundation item: The project supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30525043)

* Corresponding author.

(本文编辑 付良青)