

西红花酸抗凝血和抗血栓形成作用的实验研究

徐沁蕾, 钱之玉

(中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究西红花酸的抗凝血和抗血栓作用。方法 分别通过毛细管、剪尾法研究西红花酸对小鼠凝血时间、尾出血时间的影响, 用 Chandler 法及下腔静脉结扎法研究西红花酸对大鼠体外血栓和下腔静脉血栓形成的影响; 同时通过对凝血指标: 复钙时间 (RT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血激酶时间 (APTT)、凝血酶时间 (TT) 的观察, 研究西红花酸对血瘀大鼠凝血功能的影响。结果 西红花酸 40、80 mg/kg 能明显延长小鼠凝血时间; 20、40、80 mg/kg 均能明显延长小鼠尾出血时间; 25、50 mg/kg 能明显抑制大鼠体外血栓和下腔静脉血栓的形成, 在同样剂量下, 可以明显抑制血瘀大鼠的凝血功能。结论 西红花酸具有抗凝血和抗血栓形成作用。

关键词: 西红花酸; 凝血时间; 出血时间; 血栓形成

中图分类号: R286.32

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0089-03

Experimental study on anticoagulability and antithrombotic activity of crocetin

XU Qin-lei, QIAN Zhi-yu

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Key words: crocetin; coagulation time; bleeding time; thrombosis

西红花 *Crocus sativus* L. 又名藏红花、番红花、撒馥兰、泊夫兰等, 属鸢尾科多年生草本植物。西红花热水提取物西红花苷 (crocetin) 类化合物是西红花中的一种水溶性胡萝卜素类化合物, 具有抗血小板聚集、抗血栓形成、抗动脉粥样硬化、抗心肌缺血等多种药理作用^[1]。西红花酸 (crocetin) 是西红花苷体内水解产物, 是西红花的有效成分之一^[2]。文献报道西红花酸具有抗肿瘤^[3]、抗动脉粥样硬化^[4,5]等多种药理作用。笔者分析认为西红花酸的抗动脉粥样硬化作用可能与其抗血栓、对凝血的作用有关, 为此本实验对其抗血栓、抗凝血作用进行了进一步的研究。

本实验室一直致力于从中药栀子中提取分离西红花酸及其药效机制研究, 研究发现西红花酸整体动物实验可以改善血液黏度, 可增加冠脉血流量^[6]。在体内, 西红花苷可以水解为西红花酸被肠道吸收, 本实验进一步探讨其苷元——西红花酸对血液凝固及血栓形成的影响, 为西红花酸用于血液系统疾病提供理论依据。

1 材料

1.1 动物: ICR 小鼠, 体重 18~20 g; 昆明种小鼠; Wistar 老年雄性大鼠, 350~400 g, 均由中国药科大学实验动物中心提供。

1.2 仪器: XX-1 型血栓监测仪, 由上海南汇林青

医学仪器厂生产。

1.3 实验药物与试剂: 西红花酸 (质量分数≥98%, HPLC) 本实验室自制, 用 0.5% CMC-Na 配制。复方丹参片, 南京同仁堂药业有限责任公司, 批号 040901。肾上腺素, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 0408241。凝血酶原时间 (PT) 试剂、活化部分凝血激酶时间 (APTT) 试剂和凝血酶时间 (TT) 试剂, 上海太阳生物制品有限公司。

2 方法

2.1 对小鼠凝血时间 (CT) 的影响^[7]: 取雄性小鼠, 于实验前选用基础生理凝血时间在 40~160 s 者用于实验, 根据基础凝血时间进行分组。随机分为 4 组, 每组 16 只。正常组, 0.5% CMC-Na 溶液; 阳性对照组, 20 mg/kg 阿司匹林; 给药组分别给予 40、80 mg/kg 西红花酸。各组均 ig 给药, 每日 2 次, 连续 3 d, 末次给药后 1 h 用内径 1 mm 玻璃毛细管插入小鼠内眦球后静脉丛取血, 自血液流入管中开始计时, 血液注满后取出毛细管平放于桌上, 每隔 30 s 折断两端毛细管, 并缓慢向左右拉开, 观察折断处是否有血凝丝, 至血凝丝出现时停止计时, 所得时间即为 CT。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间行 *t* 检验 (下面实验方法相同)。

2.2 对小鼠尾出血时间的影响: 昆明种雄性小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只。正常组, 0.5%

CMC-Na 溶液;阳性对照组,20 mg/kg 阿司匹林;给药组分别给予 20、40、80 mg/kg 西红花酸。小鼠 ig 给药,每日 2 次,连给 3 d,末次给药后 1 h 取小鼠置于固定器中,使其尾部垂直,距尾尖 1.5 mm 处剪断,用滤纸吸血直至吸不出血为止,记录断尾尖至吸不出血的时间即为尾出血时间。

2.3 对大鼠体外血栓形成的影响:取 (250±30) g 大鼠,随机分为 4 组,每组 8 只。正常组,0.5% CMC-Na;阳性对照组,10 mg/kg 阿司匹林;给药组分别给予 25、50 mg/kg 西红花酸。各组均 ig 给药,容积为 10 mL/kg,每天 2 次,共 5 次。末次给药 60 min 后,取已硅化的塑料管旋转环(直径 4 mm),眼眶取血 1 mL,迅速注入血栓环内,将塑料管联结成圆环,迅速放入血栓仪金属转盘的凹槽中,立即计时。启动转盘,37℃ 下转动 15 min,转速为 16 r/min,停止转动,取出血栓,并以滤纸吸干血液,称量其长度和湿质量,60℃ 烘 24 h,称干质量。

2.4 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响^[8]:大鼠随机分为 4 组,每组 8 只。分组及给药方法同 2.3 项。末次给药 60 min,参照文献方法^[9]制作静脉血栓模型。用 3% 戊巴比妥钠 0.1 mL/100 g ip 麻醉大鼠,沿腹中线打开腹腔,分离下腔静脉,在左肾静脉下方水平处结扎,然后缝合腹壁。2 h 后重新打开腹腔,在结扎下方 2 cm 处夹闭血管,纵向剪开下腔静脉管腔,用滤纸条仔细吸去血管内血液并观察有无血栓形成,若已形成血栓,则小心取出,立即称质量为血栓湿质量,然后于 60℃ 干燥 20 h 后称质量,为血栓干质量。计算血栓抑制率。

血栓抑制率=(正常组血栓质量-给药组血栓质量)/正常组血栓质量×100%

2.5 对血瘀大鼠凝血功能的影响:大鼠 50 只,随机分成对照组、模型组、西红花酸 (25、50 mg/kg) 组、阿司匹林 (10 mg/kg) 组。按文献方法^[10]制备急性血瘀大鼠模型。模型组大鼠每天 ig 0.5% CMC-Na 1 mL/100 g,给药组 ig 相应药物,连给 3 d,除对照组外,各组大鼠于第 4 天 sc 肾上腺素 0.08 mL/100 g,共 2 次,间隔 4 h,在注射之间(前后间隔 2 h)将各组大鼠浸入冰水浴中 5 min,水温 5℃,禁食(不禁水)12 h,次日凌晨检测,取 4 mL 血置事先放有枸橼酸钠(1:9)管内,轻轻摇匀后测定(复钙时间)RT、PT、APTT 和 TT^[11]。

3 结果

3.1 对小鼠凝血时间的影响:各组动物用药前后比较,正常组凝血时间没有显著改变,而阳性药和西红

花酸高、低剂量组凝血时间显著延长 ($P<0.01$)。西红花酸低、高剂量组的凝血时间与正常组相比有显著延长 ($P<0.05、0.01$),提示西红花酸能抑制小鼠的凝血功能,结果见表 1。

表 1 西红花酸对小鼠凝血时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=16$)

Table 1 Effect of crocetin on coagulation time of mice

($\bar{x}\pm s, n=16$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	凝血时间/s	
		给药前	给药后
正常	—	89.00±37.35	109.29±30.74
阿司匹林	20	88.81±35.93	132.71±16.23**
西红花酸	40	88.75±35.87	135.79±25.55**
	80	88.94±36.32	148.57±14.86***

与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与本组给药前比较: ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group

** $P<0.01$ vs same group before treatment

3.2 对小鼠尾出血时间的影响:结果表明,阿司匹林组、西红花酸各剂量组的尾出血时间均明显长于正常组 ($P<0.05、0.01$),结果见表 2。

表 2 西红花酸对小鼠尾出血时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of crocetin on bleeding time of mice tail

($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尾出血时间/s
正常	—	201.5±69.5
阿司匹林	20	353.2±103.3**
西红花酸	20	278.1±85.6*
	40	373.2±119.8**
	80	343.5±124.7**

与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group

3.3 对大鼠体外血栓形成的影响:结果表明,西红花酸高、低剂量组与正常组大鼠比较,血栓长度明显缩短,血栓湿质量与干质量均减轻,差异显著 ($P<0.05、0.01$),结果见表 3。

表 3 西红花酸对大鼠体外血栓形成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of crocetin on thrombosis of rats in vitro

($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血栓长度/ mm	血栓湿质量/ mg	血栓干质量/ mg
正常	—	30.13±12.55	72.98±27.93	21.20±9.02
阿司匹林	10	11.56±3.64**	47.71±10.54*	12.64±3.47*
西红花酸	25	10.88±4.16**	28.94±12.35**	7.50±3.39**
	50	12.75±5.23**	36.26±12.74**	10.26±2.77**

与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group

3.4 对大鼠下腔静脉血栓形成的影响:结果表明,西红花酸高、低剂量能够显著抑制下腔静脉血栓的形成 ($P<0.05$),结果见表 4。

表4 西红花酸对大鼠下腔静脉血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of crocetin on inferior vena cava thrombosis of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	湿质量/ mg	湿质量抑制率/ %	干质量/ mg	干质量抑制率/ %
正常	—	23.16±9.98	—	7.59±2.49	—
阿司匹林	10	8.38±8.28**	63.82	3.08±2.25**	59.42
西红花酸	25	10.30±9.80*	55.53	3.78±3.10*	50.20
	50	9.68±8.59*	58.20	3.70±2.78*	51.25

与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group

3.5 对血瘀大鼠凝血功能的影响:实验结果表明,与正常组大鼠比较,模型组大鼠 RT、TT、PT 和 APTT 明显缩短 ($P<0.01$),说明模型制备成功。给药后西红花酸高、低剂量组 RT、PT 和 APTT 与模型组比较明显延长 ($P<0.05, 0.01$),西红花酸高剂量组 TT 与模型组比较明显延长 ($P<0.05$),见表5。

表5 西红花酸对大鼠 RT、PT、APTT 和 TT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of crocetin on RT, PT, APTT, and TT of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	RT/s	PT/s	APTT/s	TT/s
正常	—	283.38±42.85**	13.38±2.62**	26.13±4.91**	19.13±3.04**
模型	—	205.13±33.20	9.25±1.58	19.13±4.12	14.88±1.81
阿司匹林	10	276.50±37.75**	11.88±2.70*	25.63±3.93**	17.88±3.36*
西红花酸	25	245.63±41.61*	12.25±2.49*	25.88±5.11*	16.13±4.22
	50	261.50±40.53**	12.25±2.49*	27.38±4.63**	17.50±2.93*

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

4 讨论

血栓形成与血管内膜损伤、血小板功能及凝血系统被激活有关,若能防止血液凝固或抑制血小板功能则可以预防血栓的形成^[12]。血栓形成过程包括:血小板的黏附、聚集和释放反应形成白色血栓;通过内源及外源凝血系统,由于X因子的激活导致凝血酶的形成而发生血液凝固和纤维蛋白网络血流中的红细胞、白细胞,最终形成血栓。本实验结果表明西红花酸能够明显延长小鼠凝血时间、小鼠尾出血时间,对于大鼠的体外血栓和静脉血栓,西红花酸

明显减轻血栓湿质量和干质量,并且对血瘀大鼠 TT、PT、APTT 都有显著延长作用。

有研究表明西红花总苷能够抑制凝血系统、抗血小板聚集以及抗大鼠动静脉血栓形成^[13],西红花苷大鼠小肠吸收实验表明其在肠道不被吸收,血液检测不到苷,但能检测到其苷元——西红花酸^[14]。提示西红花苷的抗凝血和抗血栓作用可能是通过其苷元——西红花酸发挥的,后者作为一种天然抗血栓药物,有进一步深入研究及开发的必要。

References:

- [1] Qian Z Y. Preparative method and usage of a kind of mixture of drug used for angiocardopathy [P]. CN, 941115046, 1996-06-05.
- [2] Gao W Y, Zhu D Y. Chemical and pharmacological overview of saffron [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (5): 389-391.
- [3] Abdullaev F I. Cancer chemo-preventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227(1): 202-251.
- [4] Gainer J I, Jones J R. The used of crocetin in experimental atherosclerosis [J]. *Experientia*, 1975, 31: 5482-5891.
- [5] Deng Y X, Qian Z Y, Tang F T. Effects of crocetin on experimental atherosclerosis in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (7): 777-781.
- [6] Gainer J L, Rudolph D B, Caraway D L. The effect of crocetin on hemorrhagic shock in rats [J]. *Circ Shock*, 1993, 41(1): 1-7.
- [7] Chen Z. Studies of Si Miao Yong An extract on blood coagulation and thrombosis [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30(6): 441-443.
- [8] Ubatuba F B. An animal model for the study of arterial thrombosis [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1989, 22: 993.
- [9] Chen C X, Jin R M, Li Y K, et al. Inhibitory effect of rhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1992, 13(2): 126-130.
- [10] 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, 1994.
- [11] Ma Y, Xu Q P. Overview of experimental animals used for thrombosis formation [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1998, 14(2): 47-48.
- [12] Chen K J. *The Prevention of Thrombosis Formation* (防治血栓形成) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1990.
- [13] Ma S P, Liu B L, Zhou S D, et al. Pharmacological studies of glycosides of Saffron *Crocus* (*Crocus sativus*) II. Effects on blood coagulation, platelet aggregation and thrombosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(3): 196-198.
- [14] Jin Y Y, Zhang J S, Zhang Y, et al. Studies on the intestinal absorption of crocin in rats and determination of the partition coefficient [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35(3): 283-284.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1985—1994年(80元/年),1995—1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001—2003年(200元/年)、2004年(220元/年)、2005年(260元/年)、2006年(280元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)、2006年增刊(65元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzjb@tjipr.com