

白藜芦醇对大鼠血液高凝态的抑制作用及其与 NF- κ B 表达的关系

王立文¹, 沈晓洁^{1*}, 吴倩²

(1. 无锡卫生高等职业技术学校护理系, 江苏 无锡 214028; 2. 中国药科大学药学院药理系, 南京 210009)

【摘要】目的 研究白藜芦醇对于大鼠血液高凝态形成的影响及其与 NF- κ B 表达的关系。**方法** SD 大鼠分空白组、模型组、白藜芦醇高剂量组(60 mg/kg)、白藜芦醇低剂量组(30 mg/kg)和阿司匹林组(10 mg/kg), 连续灌胃给药 7 d, 采用肾上腺素联合冰浴法和凝血酶法建立高凝态大鼠模型, 采集血样测凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)及全血粘度; 收集血管内皮细胞, 采用蛋白印迹法测 NF- κ B 表达情况。**结果** 空白组、白藜芦醇高剂量组和阿司匹林组较模型组 PT、APTT 显著延长($P < 0.05$), 血液粘度显著降低($P < 0.05$); 白藜芦醇高剂量组血管内皮细胞 NF- κ B 表达较模型组明显降低($P < 0.05$)。**结论** 高剂量白藜芦醇(60 mg/kg)可抑制大鼠血液高凝态形成, 这种作用可能与其降低 NF- κ B 的表达有关。

【关键词】 白藜芦醇; 高凝态; NF- κ B; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 12-0079-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.12.014

Inhibitory effect of resveratrol on the hypercoagulable state in rats and its relationship with the expression of NF- κ B

WANG Li-wen¹, SHEN Xiao-jie^{1*}, WU Qian²

(1. Department of Nursing, Wuxi Healthcare Vocational Technology School, Wuxi 214028, China; 2. Faculty of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

【Abstract】Objective The topic of this study was to study the inhibitory effect of resveratrol on hypercoagulable state in rats and its relationship with the expression of NF- κ B. **Methods** Rats were divided into control and model groups, and resveratrol (high dose, 60 mg/kg), resveratrol (low dose, 30 mg/kg) and aspirin (10 mg/kg) were given by intragastric administration for 7 d. Then, the rats were treated by adrenaline with ice bath or thrombin to generate hypercoagulable state. Blood samples were collected to test the prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and blood viscosity. Vascular endothelial cells were collected to detect the expression of NF- κ B by western blotting. **Results** PT and APTT values of rats in the control, resveratrol (high dose) and aspirin groups were significantly increased than the model group ($P < 0.05$). Blood viscosity of rats in the control, resveratrol (high dose) and aspirin groups was significantly lower than the model group ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B was decreased than that of the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Resveratrol in high dose (60 mg/kg) can inhibit hypercoagulable state of rat, which may be related with its effect on decreasing the expression of NF- κ B.

【Key words】 Resveratrol; Hypercoagulable state; NF- κ B; Rats

【基金项目】 无锡市医院管理中心科研项目(YGZXM1533)。

【作者简介】 王立文(1968-), 男, 副教授, 研究方向: 外科、危急症教学。E-mail: jshywxw1w@aliyun.com

【通讯作者】 沈晓洁(1971-), 女, 副教授, 研究方向: 病理、病理生理研究。E-mail: wxwxsxj@sina.com

高凝态(hypercoagulable state)即中医理论中的血瘀证,是心血管疾病最常见的现象,具有血液凝固性增加、血液流变学异常等特点,血液高凝态人群的血栓栓塞率显著高于正常人^[1,2]。研究发现白藜芦醇(resveratrol, RSV)可抑制大鼠动静脉旁路血栓和角叉菜胶小鼠致尾血栓的形成、延长小鼠凝血时间^[3];小鼠 NF- κ B 水平提高时,其动脉血栓的发生显著增加^[4]。但白藜芦醇对于高凝态的影响及其机制未见报道,本研究旨在探索白藜芦醇对于大鼠血液高凝态形成的影响,及其与 NF- κ B 表达的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,8 周龄,体重 180 ~ 220 g,由浙江省实验动物中心提供[SCXK(浙)2014-0001],在中国药科大学药学实验动物中心进行实验操作[SYXK(苏)2016-0011]。所有动物于实验开始一周前适应新环境,每天保持光照、黑暗各 12 h 的正常昼夜节律,自由饮食,温度 20 ~ 26℃,相对湿度 40%~70%,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂及仪器

白藜芦醇购自中美华东制药有限公司(98%, HPLC);阿司匹林购自湖北恒硕化工有限公司(98%, HPLC);凝血酶购自湖南一格制药有限公司(批号 130722-2);盐酸肾上腺素注射液购自上海禾丰制药有限公司(批号:10141102);水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司(批号:20150303);PT 试剂盒(冻干型)(批号:105252)、APTT 试剂盒(批号:112176)购自上海太阳生物技术有限公司;NF- κ B p65 抗体购自 Cell signal 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司(批号:20160718);DMEM 高糖培养基购自 HyClone 公司(批号:SH30243.01B);I 型胶原酶购自 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物技术有限公司(批号: CW0014);Western 及 IP 细胞裂解液(批号:P0013)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号:P0018)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)(批号:P0015)购自上海碧云天生物技术有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购自武汉谷歌生物科技有限公司(批号:G5001)。

AYW8003 半自动凝血分析仪(南京瑞麦科技开发有限公司);酶标仪(BIO-RAD 680);SA-5600 自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司);

Bio-Rad 电泳仪(伯乐生命医学产品(上海)有限公司);5200 化学发光成像系统(上海天能科技有限公司);常用玻璃、手术器皿等用具。

1.3 实验方法

1.3.1 白藜芦醇对肾上腺素联合冰浴法致高凝态大鼠的影响

40 只 SD 大鼠随机分为五组,即空白组、模型组、白藜芦醇高剂量组(60 mg/kg)、白藜芦醇低剂量组(30 mg/kg)和阿司匹林组(10 mg/kg),雌雄各半。各组均按 1 mL/100 g 给予药液或生理盐水,每天 1 次,连续 7 d,第 7 天给药于采血前 30 min 进行。于第 6 天进行造模处理:除空白组外其他各组大鼠分别皮下注射盐酸肾上腺素溶液 0.7 mg/kg;2 h 后将大鼠置于 4℃ 水浴游泳 4 min;再 2 h 后皮下注射盐酸肾上腺素溶液 0.7 mg/kg。空白组大鼠皮下注射等体积生理盐水;2 h 给予常温水浴游泳 4 min;再 2 h 后皮下注射等体积生理盐水。禁食不禁水饲养 12 h 后,各组大鼠按 3 mL/kg 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,于颈总动脉取血,血样分为 2 份,分别置于含枸橼酸钠离心管制备血浆和含 EDTA 离心管内制备全血样品。血浆样品用于测定 PT、APTT,全血样品用于血液流变学的测定。

1.3.2 白藜芦醇对凝血酶致高凝态大鼠的影响

40 只 SD 大鼠分组同 1.3.1,各组均按 1 mL/100 g 给予药液或生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。第 7 天给药后 30 min,各组大鼠按 3 mL/kg 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,分别于股静脉注射生理盐水和凝血酶 10 U/kg,60 s 后颈总动脉采血制备血浆、全血样品,测试 PT、APTT 和全血粘度。

1.3.3 蛋白质免疫印迹检测大鼠血管内皮细胞 NF- κ B 表达

大鼠经 1.3.2 处理后,分离并剪下颈动脉、腹主动脉和下腔静脉,迅速转移至超净台,4℃ 预冷的 1×PBS 洗涤血管管腔除去血细胞,纵向剪开血管;于培养皿中加入 1 mL 胶原酶(1000 U/mL),血管内膜朝下置于培养皿内,37℃ CO₂ 孵箱孵育 60 min;加入 6 mL 含 20% 胎牛血清的培养基冲洗血管内膜,转移溶液和血管至离心管,吹打数次后弃去血管,1000 r/min 离心 5 min 收集内皮细胞;4℃ 预冷的 1×PBS 洗涤细胞 3 次,置于冰上,加入 RIPA 裂解液裂解 30 min,转移裂解液及细胞碎片至 1.5 mL 离心管,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;收集上清,采用 BCA 法测定总蛋白浓度;取一定量蛋白上样,于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,根据 Marker 切下目标蛋白所在部位凝胶, PVDE 膜转膜处理,5% BSA

封闭;加入 NF- κ B、 β -actin 抗体 4℃ 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次;加入二抗室温孵育 1 h;TBST 洗涤三次;加入 ECL 化学发光试剂曝光显影,Image J 软件进行图像数据分析。

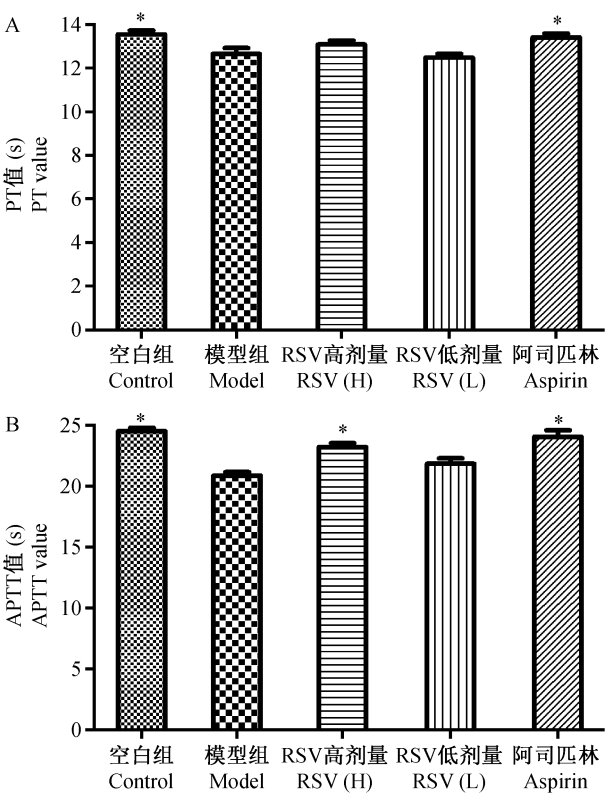
1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,所有数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析统计组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 白藜芦醇对肾上腺素冰浴致高凝态大鼠凝血指标和血液粘度的作用

各组大鼠经给药、肾上腺素联合冰浴造模处理后,其血浆 PT、APTT 数值如图 1 所示,血液粘度值如表 1 所示。同模型组相比,空白组与阿司匹林组 PT 值显著延长 ($P < 0.05$),白藜芦醇高剂量与低剂量组 PT 值与模型组差异无显著性。空白组、白藜芦醇高剂量组和阿司匹林组 APTT 值较模型组显著延长 ($P < 0.05$),而白藜芦醇低剂量组 APTT 值与模型组差异无显著性。低剪切力 (5/s) 和中剪切力 (30/s) 下,空白组、白藜芦醇高剂量组、阿司匹林组较空白组血液粘度降低,白藜芦醇低剂量组与空白组差异无显著性;高剪切力 (200/s) 下,各组与模型组均差异无显著性。



注:A:PT值;B:APTT值。同模型组相比,* $P < 0.05$ 。

图1 白藜芦醇对肾上腺素联合冰浴致高凝态大鼠血浆PT、APTT值影响

Note. A: PT value;B: APTT value. Compared with model, * $P < 0.05$.

Fig.1 Effect of resveratrol on the plasma PT and APTT values in rats with hypercoagulable state caused by adrenaline and ice bath

表1 白藜芦醇对肾上腺素冰浴致高凝态大鼠血液粘度影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 The effect of resveratrol on blood viscosity of rats with hypercoagulable state caused by adrenaline and ice bath			
组别 Group	5/s	30/s	200/s
空白组 Control	14.66 $\pm$ 0.73 *	7.80 $\pm$ 0.54 *	5.58 $\pm$ 0.46
模型组 Model	17.16 $\pm$ 2.49	9.31 $\pm$ 0.86	5.86 $\pm$ 0.43
RSV 高剂量组 RSV (H)	14.60 $\pm$ 1.19 *	8.40 $\pm$ 0.56 *	5.91 $\pm$ 0.60
RSV 低剂量组 RSV (L)	17.25 $\pm$ 1.76	8.92 $\pm$ 1.02	5.86 $\pm$ 0.71
阿司匹林组 Aspirin	14.81 $\pm$ 1.32 *	8.20 $\pm$ 0.85 *	5.55 $\pm$ 0.36

注:与模型组相比,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

2.2 白藜芦醇对凝血酶致高凝态大鼠凝血指标和血液粘度的作用

各组大鼠经给药、凝血酶造模处理后,其血浆 PT、APTT 数值如图 2 所示,血液粘度值如表 2 所示。同模型组相比,空白组与阿司匹林组 PT 值显著延长 ($P < 0.05$),白藜芦醇高剂量与低剂量组 PT

值与模型组无明显差异。空白组、白藜芦醇高剂量组和阿司匹林组 APTT 值较模型组显著延长 ($P < 0.05$),而白藜芦醇低剂量组 APTT 值与模型组差异无显著性。低剪切力 (5/s) 下,空白组、白藜芦醇高剂量组、阿司匹林组较空白组血液粘度降低,白藜芦醇低剂量组与空白组差异无显著性;中剪切力

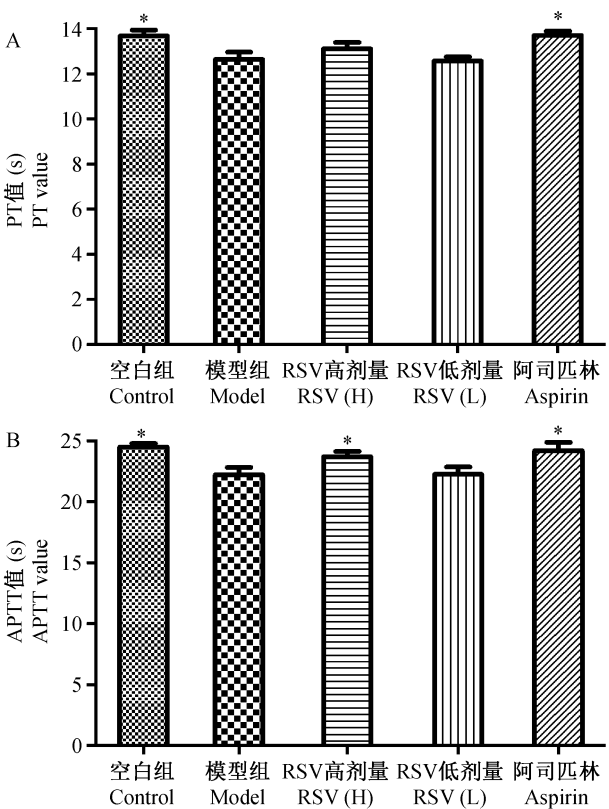
(30/s)下,空白组、阿司匹林组较模型组血液粘度显著降低,白藜芦醇高剂量和低剂量组与模型组差异无显著性;高剪切力(200/s)下,各组与模型组均差异无显著性。

2.3 蛋白质免疫印迹检测白藜芦醇对高凝态大鼠血管内皮中 NF-κB 表达的影响

大鼠经给药、凝血酶造模后,血管内皮中 NF-κB 的表达情况如图 3 所示;空白组和白藜芦醇高剂量组 NF-κB 较模型组明显减少($P < 0.05$),白藜芦醇低剂量组和阿司匹林组与模型组差异无显著性。

3 讨论

高凝态或称血栓前状态 (prethrombotic state)、促血栓状态 (prothrombotic state)、促凝状态 (procoagulant state),因其诱发的动静脉血栓栓塞事件在全球特别是发达国家逐渐增加,近二十年来相关的研究越来越受到重视^[5]。高凝态多见于恶性疾病患者、孕妇、房颤和人工关节置换及老年人等人群^[6]。2010 年,全球因血栓栓塞死亡的人数占据总死亡人数的 25%^[7]。血液高凝态具有很强的血栓形成趋势,但相关的研究及治疗措施较少,因此针对高凝态的治疗药物及相关机制研究具有重要意义。



注:A:PT 值;B:APTT 值。同模型组相比,* $P < 0.05$ 。
图 2 白藜芦醇对凝血酶致高凝态大鼠血浆 PT、APTT 值影响
Note. A: PT value;B: APTT value. Compared with model group, * $P < 0.05$.
Fig. 2 Effect of resveratrol on the plasma PT and APTT values in rats with hypercoagulable state caused by thrombin

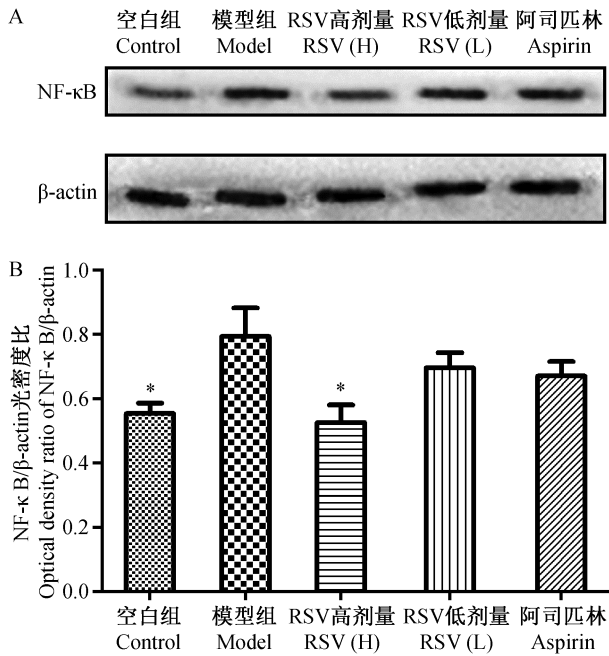
表 2 白藜芦醇对凝血酶致高凝态大鼠血液粘度影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	5/s	30/s	200/s
空白组 Control	14.33 ± 1.16 *	7.75 ± 1.10 *	5.52 ± 0.55
模型组 Model	16.95 ± 2.50	9.27 ± 1.09	5.89 ± 0.45
RSV 高剂量组 RSV (H)	14.52 ± 1.05 *	8.56 ± 0.85	5.75 ± 0.63
RSV 低剂量组 RSV (L)	16.80 ± 1.37	9.17 ± 1.04	5.56 ± 0.60
阿司匹林组 Aspirin	14.42 ± 1.35 *	7.82 ± 1.23 *	5.46 ± 0.31

注:与模型组相比,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

白藜芦醇是一种天然多酚化合物,最早发现于白藜芦根部,存在于多种植物如浆果、花生特别是葡萄皮内,具有抗炎、抗氧化、抗增殖、心血管保护等作用^[8-10]。近年来研究发现,白藜芦醇通过降低血小板聚集、增加血管内皮细胞一氧化氮的合成具有抗血栓活性^[3];在实验性脑血栓研究中,白藜芦醇可减轻脑血栓引发的伊文氏蓝蓝染和脑水肿,对脑血栓的发生具有抑制作用^[11]。NF-κB 家族包含五个成员:RelA/p65、RelB、c-Rel、NF-κB 1/p50, and NF-κB 2/p52,其中 NF-κB p50/p65 异源二聚体是转录因子 Rel 家族的主要成员,非活性状态下 NF-κB 二聚体与 IκB 结合位于细胞质内,活化状态

下 NF-κB 二聚体与 IκB 分离并转移入核^[12,13]。小鼠动脉血栓研究发现,当 NF-κB 水平升高时,其血栓的发生显著增加^[4];大鼠下腔静脉结扎诱导深静脉血栓研究显示,正常静脉内皮细胞中 NF-κB 表达极低,深静脉血栓形成后其表达量明显增加^[14];此外,大鼠骨损伤静脉血栓的发生也伴随着内皮细胞 NF-κB 表达的增加^[15],说明 NF-κB 可能参与血栓的发生。因此,本研究旨在探索白藜芦醇对于大鼠血液高凝态的影响及 NF-κB 表达在其中的作用。
本研究以肾上腺素联合冰浴法和凝血酶法建立高凝态大鼠模型^[16,17],以 PT、APTT 和血液粘度为高凝态检测指标,以阿司匹林为阳性对照,探究



注:A:蛋白质免疫印迹的结果;B:NF-κB 与 β-actin 光密度之比。同模型组相比,* $P < 0.05$ 。

图 3 白藜芦醇对凝血酶致高凝态大鼠血管内皮 NF-κB 表达的影响

Note. A: Result of western blotting;B: Optical density ratio of NF-κB/β-actin. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of resveratrol on the expression of NF-κB in vascular endothelial cells of rats with hypercoagulable state caused by thrombin

白藜芦醇对于高凝态大鼠凝血相关指标及血管内皮表达 NF-κB 的影响。研究发现,模型组大鼠 NF-κB/p65 较空白组的表达明显增加($P < 0.05$),提示大鼠血液高凝态的形成可能与血管内皮细胞 NF-κB/p65 的表达增加有关;高剂量白藜芦醇(60 mg/kg)可显著延长高凝态模型大鼠的 PT 和 APTT 值,降低全血粘度,同时降低 NF-κB/p65 的表达($P < 0.05$),提示白藜芦醇抑制大鼠高凝态的形成可能与降低 NF-κB 的表达有关。综上所述,高剂量白藜芦醇(60 mg/kg)可抑制肾上腺素联合冰浴法和凝血酶法所致的大鼠血液高凝态形成,这种抑制作用可能与其抑制血管内皮 NF-κB 的表达有关。

参考文献:

[1] 武汀,张硕峰,董世芬,等. 血栓通胶囊抗急性心肌缺血和抗血栓形成的作用[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(12):10-14,25.

[2] Kloeters O, Vasilic D, Hupkens P, et al. Markers of blood coagulation and fibrinolysis in patients with early and delayed microsurgical reconstructions in the lower extremities [J]. J Plast Surg Hand Surg, 2017, 20: 1-7.

[3] 闫启光. 白藜芦醇抗血栓作用实验研究 [J]. 中国民族民间医药,2010,19(13):58-59.

[4] Breitenstein A, Stein S, Holy EW, Camici GG, et al. Sirt1 inhibition promotes in vivo arterial thrombosis and tissue factor expression in stimulated cells [J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(2): 464-72.

[5] Girolami A, Cosi E, Ferrari S, et al. Prethrombotic, prothrombotic, thrombophilic states, hypercoagulable state, thrombophilia etc.: semantics should be respected even in medical papers [J]. J Thromb Thrombolysis, 2017, 43(3): 390-393.

[6] Wada H. Pre-thrombotic (hypercoagulable) state/hypercoagulable disease[J]. Rinsho Byori, 2015, 63(12): 1405-11.

[7] Wendelboe AM, Raskob GE. Global burden of thrombosis: epidemiologic aspects [J]. Circ Res, 2016, 118(9): 1340-1347.

[8] Guo H, Chen Y, Liao L, et al. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2013, 27(3): 189-198.

[9] Xu M, Xue W, Ma Z, et al. Resveratrol reduces the incidence of portal vein system thrombosis after splenectomy in a rat fibrosis model [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016(12): 1-7.

[10] 刘国栋,刘秀华,白静,等. 白藜芦醇对血管钙化大鼠血压和心脏功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志,2014,24(10): 58-62.

[11] 李萍,杜洪霞,侯进,等. 白藜芦醇对大鼠实验性脑血栓形成的影响 [J]. 时珍国医国药,2010,21(9): 2391-2392.

[12] Cai Y, Li W, Tu H, et al. Curcuminolide reduces diabetic retinal vascular leukostasis and leakage partly via inhibition of the p38MAPK/NF-κB signaling [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(8): 1835-1839.

[13] 李恩琪,帅训军,闫战秋,等. Toll 样受体 4/NF-κB 信号通路在依达拉奉影响单肺通气患者炎症细胞因子中的作用 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(32): 4-7.

[14] 叶柳青. NF-κB 在孕鼠深静脉血栓血管内皮细胞中的表达及其抑制剂的干预作用 [D]. 广州:南方医科大学,2012.

[15] 高峰,周玉凯,薛德磊. 骨损伤大鼠静脉血栓发生后的细胞因子变化及预防效果的实验研究 [J]. 中国医学装备,2014, 11: 189-190.

[16] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等. 大鼠急性血瘀模型方法的研究与评价 [J]. 中国药理学通报,2011,27(12): 1761-1765.

[17] 王立文,沈晓洁,吴倩,等. 凝血酶法致大鼠血液高凝态模型的建立 [J]. 中国实验动物学报,2016,24(6): 639-642.