

论著·基础研究

姜黄素及姜黄提取物对血栓模型大鼠凝血功能的影响*

任碧琼¹, 田雪飞^{1△}, 陈园², 徐飞¹

(1. 湖南省第二人民医院/湖南中医药大学临床医学院, 湖南长沙 410007;

2. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208)

摘要:目的 初步探讨姜黄素及姜黄提取物对血栓模型大鼠凝血功能的影响,为进一步研究其作用机制做前期准备。方法 分别用姜黄素及姜黄提取物灌胃 14 d 后,采用物理方法建立大鼠血栓模型,获取各组大鼠血浆,全自动凝血仪检测活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)及抗凝血酶 3(AT3)。结果 血栓模型鼠血栓形成后,血浆 APTT 显著延长($P=0.011$);姜黄素低、高剂量灌胃处理的血栓模型鼠血浆 APTT 缩短($P=0.02, P<0.001$),而姜黄提取物处理的血栓模型鼠血浆 APTT 进一步延长($P<0.001, P=0.019$);血栓模型鼠血栓形成后血浆 FIB 显著升高($P<0.001$),姜黄素及姜黄提取物低、高剂量对血浆 FIB 没有显著影响;姜黄素灌胃缩短 TT 时间($P=0.03, P=0.001$),而姜黄提取物没有此作用;姜黄素有降低 AT3 的作用,而姜黄提取物有升高 AT3 的作用。结论 姜黄素没有抗凝作用,而姜黄提取物则表现出较强的抗凝作用,提示姜黄提取物的活血化瘀机制与抗凝作用有关,而姜黄素的作用机制有待进一步探讨。

关键词:姜黄素; 姜黄提取物; 血栓模型; 凝血; 抗炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.001

中图法分类号:R285.1

文章编号:1673-4130(2019)09-1025-04

文献标识码:A

Effects of curcumin and Turmeric extract on coagulation function in thrombus model rats*

REN Biqiong¹, TIAN Xuefei^{1△}, CHEN Yuan², XU Fei¹

(1. School of Clinical Medicine of Hunan Second People's Hospital/Hunan

University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. College of integrated Chinese and

Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

Abstract: Objective To study the effects of curcumin and turmeric extract on coagulation function in rats with thrombotic model, and to prepare for further study of its mechanism. **Methods** After 14 days of intragastric administration of curcumin and turmeric extract, the thrombosis model of rats was established by physical method. The plasma of rats in each group was obtained. The activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen (FIB), thrombin time (TT) and antithrombin 3 (AT3) were detected by automatic coagulation analyzer. **Results** The plasma APTT was significantly prolonged after thrombosis in thrombotic model rats ($P=0.011$), and the plasma APTT in thrombotic model rats treated with curcumin at low and high doses by gavage was shortened ($P=0.02, P<0.001$), while the plasma APTT of thrombotic model rats treated with turmeric extract was further prolonged ($P<0.001, P=0.019$), and the plasma FIB increased significantly after thrombosis in thrombotic model rats ($P<0.001$). Curcumin and turmeric extract at low and high doses had no significant effect on plasma FIB level, curcumin gavage decreased TT ($P=0.03, P=0.001$), but turmeric extract did not have this function. Curcumin tended to decrease AT3, and turmeric extract had an effect of increasing AT3. **Conclusion** Curcumin has no anticoagulant effect, but turmeric extract shows strong anticoagulant effect, suggesting that the mechanism of activating blood circulation and removing blood stasis of turmeric extract is related to anticoagulant effect, and the mechanism of curcumin action needs to be further explored.

Key words: curcumin; turmeric extract; thrombus model; coagulation; anti-inflammatory

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81473617);湖南省中医药管理局重点项目(201720);湖南省教育厅创新平台开放基金资助项目(16K066)。

作者简介:任碧琼,女,主要从事免疫分子调控水平疾病方面的研究。△ 通信作者, E-mail:003640@hnucm.edu.cn。

本文引用格式:任碧琼,田雪飞,陈园,等.姜黄素及姜黄提取物对血栓模型大鼠凝血功能的影响[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1025-1027.

正常情况下血液在血管中保持流动状态是因为机体的凝血与抗凝血、纤溶与抗纤溶系统维持一种动态平衡,物理、化学、炎症及代谢性疾病等多种因素均可打破这种平衡导致血栓形成^[1]。由于血栓形成伴随各种炎症反应^[2-4],因此血栓性疾病的防治不仅需要抗凝,还需要抗炎。中药成分姜黄素及姜黄提取物均具有抗炎作用^[5-6],为了探讨姜黄素及姜黄提取物对血栓性疾病的治疗作用的机制,本研究分别用姜黄素及姜黄提取物对大鼠进行灌胃处理,然后采用物理方法导致血管内皮损伤启动内源性凝血途径建立大鼠血栓模型,采用假手术组作为对照组,收集各组大鼠血浆,检测血浆活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)及抗凝血酶 3(AT3)的变化,比较各组之间的差异,初步探讨姜黄素及姜黄提取物对血栓模型大鼠血浆中凝血指标的影响,为进一步研究姜黄素及姜黄提取物的作用机制提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 姜黄素及姜黄提取物 姜黄素购自美国 Sigma 公司,批号:SLBN7214V;姜黄提取物由湖南中医药大学天然药物化学教研室提供,其中姜黄素含量为 4.95%。姜黄素低剂量为 100 mg/(kg·d),姜黄素高剂量为 500 mg/(kg·d);姜黄提取物组按比例换算使姜黄素含量与姜黄素组保持一致,低剂量为 2 020 mg/(kg·d),高剂量为 10 100 mg/(kg·d)。

1.2 姜黄素、姜黄提取物处理及大鼠血栓模型的建立 分组:选用 SD 大鼠 60 只,雄性,体质量在 300~450 g,将 60 只大鼠随机分为假手术对照组、血栓模型组、姜黄素低剂量处理组、姜黄素高剂量处理组、姜黄提取物低剂量组、姜黄提取物高剂量处理组,每组各 10 只。

处理:假手术对照组及血栓模型组采用蒸馏水灌胃,其他 4 组分别用姜黄素及姜黄提取物高、低剂量连续灌胃 15 d,然后进行造模手术,术后 24 h 开腹取栓,手术显微镜下观察下腔静脉(IVC)形态及侧枝静脉开放代偿程度,切取结扎线下方 IVC 段,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 IVC 及髂静脉,收集血栓,并检测质量。取

IVC 段,行苏木素-伊红(HE)染色,镜下观察血栓形成情况。

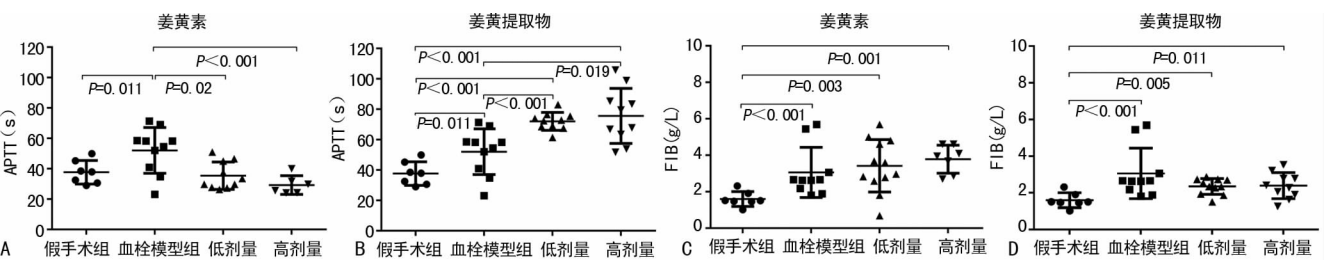
1.3 6 组大鼠血浆 APTT、FIB、TT 及 AT3 的检测 采用日本希森美康公司生产的全自动凝血分析仪 CA7000 分别检测 6 组大鼠血浆 APTT、FIB、TT 及 AT3 水平,所有试剂均为日本希森美康 CA7000 配套试剂,随临床常规标本一同检测,质量控制遵照 SOP 文件采用高、低两个浓度水平质控物,在控方可进行检测。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐时,两两比较用 q 检验,方差不齐时用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

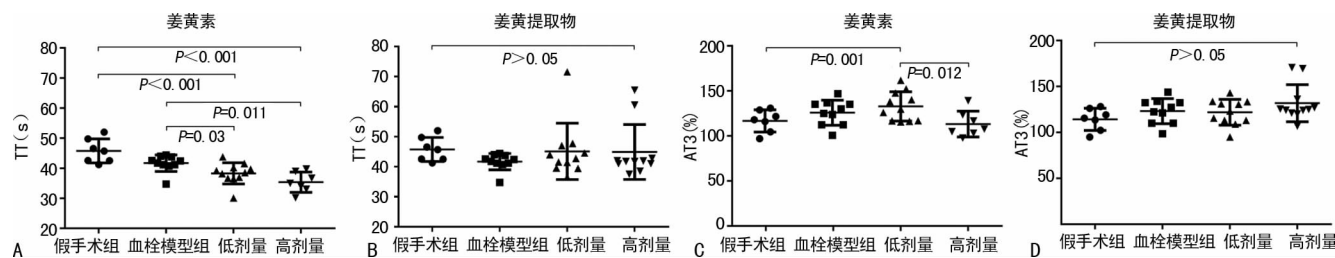
2.1 姜黄素及姜黄提取物对血栓大鼠模型血浆 APTT、FIB 的影响 与假手术组大鼠相比,血栓模型鼠组血浆 APTT 显著延长($P = 0.011$),低剂量、高剂量姜黄素灌胃均使血栓模型鼠血浆 APTT 缩短($P = 0.02$, $P < 0.001$),而低剂量、高剂量姜黄提取物灌胃组则使 APTT 进一步延长($P < 0.001$, $P = 0.019$),见图 1A、B;与假手术组相比,血栓模型组、低剂量姜黄素及高剂量姜黄素灌胃组血浆 FIB 显著升高($P = 0.017$, $P = 0.003$, $P = 0.001$);与假手术组相比,血栓模型组、低剂量姜黄提取物及高剂量姜黄提取物灌胃组血浆 FIB 水平差异有统计学意义($P < 0.001$, $P = 0.005$, $P = 0.011$),见图 1C、D。

2.2 姜黄素及姜黄提取物对血栓模型鼠血浆 TT、AT3 的影响 与假手术组大鼠相比,血栓模型组大鼠血浆 TT、AT3 差异均无统计学意义($P > 0.05$),低剂量、高剂量姜黄素灌胃组血浆 TT 均显著降低($P = 0.03$, $P = 0.001$),而低、高剂量姜黄提取物灌胃组血浆 TT 差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2A、B;姜黄素、姜黄提取物灌胃对血栓大鼠模型血浆 AT3 的影响差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 2C、D。



注:A为姜黄素对 APTT 的影响;B为姜黄提取物对 APTT 的影响;C为姜黄素对 FIB 的影响;D为姜黄提取物对 FIB 的影响

图 1 姜黄素及姜黄提取物对血栓模型鼠血浆 APTT 及 FIB 的影响



注: A 为姜黄素灌胃对 TT 的影响; B 为姜黄提取物灌胃对 TT 的影响; C 为姜黄素灌胃对 AT3 的影响; D 为姜黄提取物灌胃对 AT3 的影响

图 2 姜黄素及姜黄提取物对血栓模型鼠血浆 TT 及 AT3 的影响

3 讨 论

姜黄素的抗炎机制主要是抑制炎症因子的产生^[7]。由于普遍认为姜黄提取物中的有效成分主要是姜黄素,因此很少有单独研究姜黄提取物作用机制的报道。然而姜黄提取物的成分是很复杂的,不仅含有一定比例的姜黄素,还有甲氧基姜黄素及双脱甲氧基姜黄素^[8],还有其他未知成分。本研究发现,就姜黄素、姜黄提取物对血栓模型大鼠的凝血因子的影响来看,它们有着较大的差异,姜黄素灌胃处理组大鼠血浆 APTT 时间缩短,而姜黄提取物灌胃组大鼠 APTT 时间延长,这就意味着姜黄素和姜黄提取物对血栓性疾病中有着截然不同的作用机制。

APTT 主要反映内源性凝血途径的相关凝血因子,血栓性疾病处于高凝状态时 APTT 是缩短的^[9],但在血栓形成的过程中凝血因子被消耗,最终便会导致 APTT 延长,本研究中血栓模型大鼠血浆 APTT 时间比假手术组大鼠延长也证明了这一点。本文的实验结果显示,低、高剂量的姜黄素灌胃处理的抗凝作用不明显,相反有一定的缓解 APTT 时间延长的作用,说明姜黄素的抗炎作用并不是通过活血化瘀,而是有着阻止出血的作用;而低、高剂量的姜黄提取物灌胃处理的血栓模型大鼠血浆 APTT 时间均延长,说明姜黄提取物有着较强的抗凝活性,这种抗凝作用用中医理论来形容便是活血化瘀的功效。

姜黄素与姜黄提取物灌胃组大鼠 FIB、TT 及 AT3 的改变也各不相同,与血栓模型组相比,姜黄素灌胃组 FIB 变化差异无统计学意义,但 TT 时间呈缩短趋势;姜黄提取物灌胃组 FIB 的变化也不明显,但 TT 时间有延长趋势,说明姜黄素有促使凝血酶形成的作用,也就是阻止出血的作用,而姜黄提取物则有阻滞凝血酶形成的作用,也就是抗凝作用;对 AT3 的影响也是姜黄素灌胃有使其降低的趋势,姜黄提取物灌胃则有使其呈升高趋势,进一步说明了姜黄素的促凝作用及姜黄提取物的抗凝作用。多项结果均显示二者在凝血方面起着相反的作用,究其原因可能与它们的分子结构差异和成分差异有关,姜黄素为单一成分,而姜黄提取物包含有甲氧基姜黄素和双脱甲氧基

姜黄素以及其他成分。灌胃时为了保证姜黄素的作用一致,将姜黄提取物中姜黄素的含量调整到与姜黄素相同,但同时也放大了甲氧基姜黄素和双脱甲氧基姜黄素及其他成分的作用^[10],这是否正是引起凝血改变各异的主要原因还需要进一步研究。有研究报道姜黄提取物对小鼠肝纤维化的改善作用与姜黄素的效果相当^[11],但本文的研究提示即使二者在疾病治疗中有着同样的功效,其作用机制也是各不相同的。周丽娟等^[12]的研究结果显示,不同来源姜黄提取物抗肝损伤作用各异,此差异原因可能与姜黄的不同产地及化学成分有关,但他们后来的研究又表明不同商品规格、等级姜黄提取物含量有差异,但具有相似的抗氧化活性,且该活性与姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素含量无量效关系^[13]。

4 结 论

本研究发现姜黄素及姜黄提取物灌胃处理对造模大鼠血浆 APTT、FIB、TT 及 AT3 的影响有着较大的差异,姜黄素表现出促凝作用,而姜黄提取物处理表现出明显的抗凝作用,初步推测这种区别与分子结构有关,但需进一步证实。对于二者作用机制的研究有利于更加合理地将二者用于疾病的治疗,本研究为进一步探讨姜黄素及姜黄提取物的作用机制提供了新的研究方向。

参考文献

[1] HENKE P K, VARMA M R, MOAVENI D K, et al. Fibrotic injury after experimental deep vein thrombosis is determined by the mechanism of thrombogenesis [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 98(5): 1045-1055.
[2] PENN M S, IGWE C. Role of inflammation in modulating thrombotic-fibrinolytic balance in venous thrombosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(12): 1256-1257.
[3] KIM K H, BARAZIA A, CHO J. Real-time imaging of heterotypic platelet-neutrophil interactions on the activated endothelium during vascular inflammation and thrombus formation in live mice [J]. *J Vis Exp*, 2013, 2(74): e50329.
[4] IBA T, LEVY J H. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial (下转第 1031 页)

- idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands[J]. Neuromuscul Disord, 2004, 14(5): 337-345.
- [2] 李柳冰. 肌炎特异性自身抗体研究进展[J]. 中华内科杂志, 2017, 12(56): 958-961.
- [3] MCHUGH N J, TANSLEY S L. Autoantibodies in myositis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(5): 290-302.
- [4] LUNDBERG I E, DE VISSER M, WERTH V P. Classification of myositis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(5): 269-278.
- [5] CAVAZZANA I, FREDI M, CERIBELLI A, et al. Testing for myositis specific autoantibodies: comparison between line blot and immunoprecipitation assays in 57 myositis sera[J]. J Immunol Methods, 2016, 433: 1-5.
- [6] BOHAN A, PETER J B. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts)[J]. N Engl J Med, 1975, 292(8): 403-407.
- [7] BOHAN A, PETER J B. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts)[J]. N Engl J Med, 1975, 292(7): 344-347.
- [8] SONTHEIMER R D. Would a new name hasten the acceptance of amyopathic dermatomyositis (dermatomyositis sine myositis) as a distinctive subset within the idiopathic inflammatory dermatomyopathies spectrum of clinical illness[J]. J Am Acad Dermatol, 2002, 46(4): 626-636.
- [9] MOGHADAM-KIA S, ODDIS C V, AGGARWAL R. Anti-MDA5 antibody spectrum in western world[J]. Curr Rheumatol Rep, 2018, 20(12): 78.
- [10] LI L, WANG Q, YANG F, et al. Anti-MDA5 antibody as a potential diagnostic and prognostic biomarker in patients with dermatomyositis[J]. Oncotarget, 2017, 8(16): 26552-26564.
- [11] RIDER LG, NISTALA K. The juvenile idiopathic inflammatory myopathies: pathogenesis, clinical and autoantibody phenotypes, and outcomes[J]. J Intern Med, 2016, 280(1): 24-38.
- [12] BETTERIDGE Z, MCHUGH N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis[J]. J Intern Med, 2016, 280(1): 8-23.
- [13] WOLSTENCROFT P W, FIORENTINO D F. Dermatomyositis clinical and pathological phenotypes associated with myositis-specific autoantibodies[J]. Curr Rheumatol Rep, 2018, 20(5): 28.
- [14] FUJIMOTO M, WATANABE R, ISHISUKA Y, et al. Recent advances in dermatomyositis-specific autoantibodies[J]. Curr Opin Rheumatol, 2016, 28(6): 636-644.
- [15] HAMAGUCHI Y, KUWANA M and TAKEHARA K. Comparison of anti-OJ antibody detection assays between an immunoprecipitation assay and line blot assay[J]. Mod Rheumatol, 2017, 27(3): 551-552.
- [16] FUJIMOTO M, MURAKAMI A, KUREI S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of anti-transcriptional intermediary factor-1 gamma and anti-Mi-2 autoantibodies in dermatomyositis[J]. J Dermatol Sci, 2016, 84(3): 272-281.
- [17] RONNELID J, BARBASSO HELMERS S, STORFORS H, et al. Use of a commercial line blot assay as a screening test for autoantibodies in inflammatory myopathies[J]. Autoimmun Rev, 2009, 9(1): 58-61.

(收稿日期: 2018-09-14 修回日期: 2018-11-02)

(上接第 1027 页)

- cells and their interactions in thrombus formation during sepsis[J]. J Thromb Haemost, 2018, 16(2): 231-241.
- [5] KOCAADAM B, SANLIER N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(13): 2889-2895.
- [6] KARIMIAN M S, PIRRO M, MAJEED M A. Curcumin as a natural regulator of monocyte chemoattractant protein-1[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 33: 55-63.
- [7] SHI X, ZHENG Z, LI J, et al. Curcumin inhibits A β -induced microglial inflammatory responses in vitro; Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways[J]. Neurosci Lett, 2015, 594: 105-110.
- [8] WOJCIK M, KRAWCZYK M, WOJCIK P, et al. Molecular mechanisms underlying curcumin-mediated therapeutic effects in type 2 diabetes and cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018: 9698258.
- [9] AHMAD I, SHARMA S, GUPTA N, et al. Antithrombotic potential of esculin 7, 3', 4', 5', 6'-O-pentasulfate (EPS) for its role in thrombus reduction using rat thrombosis model[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 119: 360-368.
- [10] HASAN M, LATIFI S, KAHN C J, et al. The positive role of curcumin-loaded salmon nanoliposomes on the culture of primary cortical neurons[J]. Mar Drugs, 2018, 16(7): 218.
- [11] 肖志勇. 姜黄提取物对小鼠肝纤维化的影响[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(4): 516-520.
- [12] 周丽娟, 赵军宁, 徐海波, 等. 不同来源姜黄提取物的抗肝损伤药效学研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 55-57.
- [13] 周丽娟, 赵军宁, 徐海波, 等. 不同商品规格, 等级姜黄提取物抗氧化作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 110-112.

(收稿日期: 2018-09-18 修回日期: 2018-11-06)