

板栗多糖抗动脉血栓形成的作用

聂牧¹, 王云², 郭守东², 刘浩¹, 姜玮¹, 赵晓民^{2,*}

(1.泰山医学院基础医学院, 山东 泰安 271000; 2.泰山医学院动脉粥样硬化研究所, 山东 泰安 271000)

摘要:目的: 研究板栗多糖对小鼠动脉血栓形成的影响。方法: 热水提取法制备板栗多糖, 小鼠连续灌胃给药(板栗多糖50、100、200 mg/kg) 10 d, 剪尾法测定出血时间, 玻片法检测凝血时间, 在5%氯化铁(FeCl₃)诱导的小鼠颈总动脉血栓模型中, 用激光多普勒血流仪观察记录血栓形成时间、血流变异性, 而后称量血栓质量。结果: 板栗多糖(100、200 mg/kg)可明显延长小鼠出血时间、凝血时间及血栓形成时间, 降低血流波动性。结论: 板栗多糖具有抗动脉血栓形成的作用, 机制与其抗血小板和抗凝血有关。

关键词: 板栗多糖; 出血时间; 凝血时间; 抗血栓

Antithrombotic Effect of Polysaccharide from Seeds of *Castanea mollissima* Blume (Chinese Chestnut)

NIE Mu¹, WANG Yun², GUO Shoudong², LIU Hao¹, JIANG Wei¹, ZHAO Xiaomin^{2,*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Taishan Medical University, Taian 271000, China;

2. Institute of Atherosclerosis, Taishan Medical University, Taian 271000, China)

Abstract: Purpose: To study the effect of polysaccharide from the seeds of *Castanea mollissima* Blume (Chinese chestnut) on arterial thrombosis in mice. Methods: The chestnut polysaccharide was extracted from the seeds of *Castanea mollissima* Blume with hot water. Mice were administered with the polysaccharide at daily doses of 50, 100 and 200 mg/kg for 10 days. The bleeding time and coagulation time of mice were measured by tail cutting method and glass slide method, respectively. The time to occlusion, blood flow of carotid artery and thrombosis weight of mice were measured in 5% ferric chloride (FeCl₃)-induced carotid artery thrombosis model. The time to occlusion and carotid artery blood flow of mice were monitored by laser Doppler fluorimetry. Results: The administration of the water-soluble polysaccharide from Chinese chestnut at 100 and 200 mg/kg significantly prolonged bleeding time, coagulation time and the time to occlusion, and reduced blood flow variability obviously. Conclusion: The chestnut polysaccharide can inhibit arterial thrombosis, which may be related to its anti-platelet and anti-coagulation effects.

Key words: *Castanea mollissima* Blume polysaccharide; bleeding time; coagulation time; antithrombosis

中图分类号: S646.19

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)11-0187-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201511036

动脉血栓形成或栓塞是心脑血管疾病患者致死致残的主要原因之一, 药物防治血栓形成是一项重要的预防和治疗措施。板栗(*Castanea mollissima* Blume)为壳斗科栗属坚果类植物^[1], 是我国传统的农副产品, 也是世界上重要的干果之一, 其经济价值较高, 种植板栗是发展山区经济及山区农民迅速脱贫致富的一个重要途径, 其被山区农民称为“铁杆庄稼”。板栗在我国分布区域广泛, 主要集中在黄河流域的华北地区和长江流域的部分地区。板栗可药食两用, 具有健脾活血、补肾强筋等显著的药用价值和保健功能^[2]。唐代孙思邈《备急千金要方》记载: “栗子, 味咸温无毒, 益气厚肠胃,

补肾气, 令人耐饥, 生食之, 甚治腰脚不遂”。明代李时珍《本草纲目》记载: “栗治肾虚、腰腿无力, 能通肾益气, 厚肠胃也, 肾主大便, 栗能主肾”。现代医学认为, 板栗富含淀粉、可溶性糖、粗纤维、氨基酸、蛋白质、脂肪酸、维生素、胡萝卜素及微量元素等多种营养成分^[3-4], 可供人体吸收和利用的营养成分含量高达98%, 可增强人体免疫力和抗癌能力, 尤其对高血压、冠心病和动脉硬化等心血管疾病有良好的防治效果^[5]。板栗多糖是板栗的有效成分之一, 已有研究表明板栗多糖具有明显的抗凝血^[6]、抗氧化^[7-9]活性, 因此推断其可能对血栓形成有干预作用, 然而目前尚未见板栗多糖抗血

收稿日期: 2014-07-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173061); 泰安市大学生科技创新行动计划项目(2011D2046)

作者简介: 聂牧(1991—), 女, 本科, 研究方向为心血管药理学。E-mail: near0105@foxmail.com

*通信作者: 赵晓民(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为心血管药理学。E-mail: zhaoxiaominty@163.com

栓形成作用的报道。为此,本实验进行板栗多糖对血小板量变和血栓形成作用的研究,旨在为板栗的临床应用和防治血栓性疾病提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物、材料与试剂

健康雄性SPF级昆明种小鼠,5~6周龄,体质量(20±2)g,购自泰安市泰邦生物科技有限公司。标准饲料喂养,在温度(23±2)℃、相对湿度50%~70%的环境下适应性喂养3d后开始实验。

板栗采摘自泰山医学院校本部,由泰山医学院中药教研室鉴定品种为泰安薄壳板栗。

戊巴比妥钠 德国Merck公司;阿司匹林 美国Sigma公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Laborota 4002-control型低压旋转蒸发仪 德国Heidolph公司;T6-新世纪190-1100型紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器公司;AB265-S型电子分析天平瑞士Mettler Toledo设备公司;PeriFlux5001型激光多普勒血流仪 瑞典百灵威公司;PE-6800VET型全自动血细胞分析仪 深圳市普康电子有限公司;Milli-Q Sythesis型超纯水系统 法国Millipore公司。

1.3 方 法

1.3.1 板栗多糖的提取及含量测定

按照文献[10]所述的方法提取多糖,略有修改:板栗去皮粉碎,60℃烘干10h,冷却后称取板栗粉100g,加蒸馏水2000mL,70℃水浴回流2h,冷却后过滤,滤液以旋转蒸发仪减压浓缩至400mL,加入4倍体积的95%乙醇,4℃静置24h,倾倒入上清液后离心,沉淀溶于400mL去离子水,Sevag法^[11]除蛋白4~5次直至不再有蛋白层为止,同上方法浓缩,加入95%乙醇,静置6h,弃上清液后离心,沉淀先后用无水乙醇和乙醚洗涤2次,自然晾干。依文献[12]鉴别确认为板栗多糖。得率为6.7%,4℃条件下存放。经硫酸-苯酚法^[13]测定多糖含量为67%,放置6、12、24个月,多糖质量稳定,含量均为(66±1)%。

1.3.2 小鼠体质量、血细胞计数和血小板平均体积测定

将60只小鼠随机平均分为5组,每组12只:空白对照组(生理盐水20mL/(kg·d));阿司匹林组为阳性对照(20mg/(kg·d));板栗多糖低(50mg/(kg·d))、中(100mg/(kg·d))、高(200mg/(kg·d))剂量组。

以上均为灌胃给药(以体质量计,下同),连续10d。记录实验前后小鼠体质量,末次给药2h后,以戊巴比妥钠(100mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,心脏取血,肝素抗凝。用电子血球计数仪检测血液中红细胞(red blood cell, RBC)、白细胞(white blood cell, WBC)、血小板(platelet, PLT)计数以及血小板平均体积(mean platelet volume, MPV)。

1.3.3 剪尾法测定出血时间

分组及给药方式同1.3.2节。末次给药2h后,将小鼠置于固定器中,使其尾部自然下垂,在距离尾尖5mm处剪断,将小鼠尾尖置于37℃生理盐水中液面下1.5cm处观察血流。自剪断尾尖开始计时,至血流停止的时间,即为出血时间^[14]。

1.3.4 玻片法测定凝血时间

分组及给药方式同1.3.2节。末次给药后2h,用眼科镊迅速摘去小鼠一侧眼球,弃第1滴血后将血液滴于载玻片上,每隔20~30s用大头针自血滴边缘向中间轻轻挑动1次,当有血丝挑起时停止计时。从采血开始至挑起血丝的时间即为凝血时间^[15]。

1.3.5 血栓形成时间、血流变异性和血栓质量测定

将72只小鼠随机平均分为6组,每组12只:空白对照组(生理盐水20mL/(kg·d))、血栓模型组(生理盐水20mL/(kg·d))、阿司匹林组(20mg/(kg·d))、板栗多糖低(50mg/(kg·d))、中(100mg/(kg·d))、高(200mg/(kg·d))剂量组,给药方法同1.3.2节。末次给药2h后,用氯化铁(FeCl₃)诱导形成小鼠颈总动脉血栓模型^[16-17],测定血流变异性、血栓形成时间和血栓质量:以戊巴比妥钠(100mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,仰位固定,切开颈部皮肤,暴露右侧颈总动脉,用激光多普勒血流仪记录血流10min后,将颈总动脉段环裹滤纸条(1mm×3mm):空白对照组滤纸浸透双蒸水,其他各组滤纸浸透5%FeCl₃,3min后取下滤纸条,继续检测血流。从取下滤纸条至颈总动脉血流量降至并稳定在120PU以下保持1min的时间为血栓形成时间,血流变异性为血栓形成时间内的血流标准差。以滤纸环裹处为中心,截取0.5cm长的血管段,称质量,减去取出血栓后的血管质量,即为血栓质量。

1.4 数据统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,两组间比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 板栗多糖对小鼠体质量、血细胞计数和血小板平均体积的影响

表 1 板栗多糖对小鼠体质量、血细胞计数和血小板平均体积的影响
Table 1 Effect of chestnut polysaccharide on body weight, blood cell count and mean platelet volume (MPV) in mice

组别	初体质量/g	末体质量/g	RBC计数/ (10 ¹² 个/L)	WBC计数/ (10 ⁹ 个/L)	PLT计数/ (10 ⁹ 个/L)	MPV/fL
空白对照组	19.6±1.0	20.0±1.2	7.6±0.9	4.4±0.5	445.8±82.4	8.1±1.8
阿司匹林组	19.4±1.4	20.1±0.7	7.8±0.6	4.5±0.4	483.1±117.5	9.1±1.6
板栗多糖低剂量组	19.3±1.2	20.8±0.7	7.4±0.8	4.3±0.6	454.8±134.9	8.6±1.4
板栗多糖中剂量组	19.5±1.4	21.8±1.0	7.7±0.8	4.3±0.5	432.8±125.8	8.8±1.4
板栗多糖高剂量组	19.6±1.4	22.5±0.9**	7.6±0.9	4.4±0.7	483.6±90.5	9.2±1.2

注：**、与空白对照组比较，差异极显著 ($P < 0.01$)；下同。

由表1可知，各组小鼠初体质量无明显差异。灌胃10 d后，与空白对照组比较，板栗多糖（除200 mg/kg剂量组小鼠体质量极显著增加 ($P < 0.01$)）对小鼠体质量、血小板计数和血小板平均体积均无明显影响。

2.2 板栗多糖对小鼠出血时间、凝血时间的影响

表 2 板栗多糖对小鼠出血时间、凝血时间的影响
Table 2 Effect of chestnut polysaccharide on bleeding time and coagulation time in mice

组别	出血时间/s	凝血时间/s
空白对照组	222.0±35.0	147.3±27.5
阿司匹林组	326.0±33.0**	198.3±23.2**
板栗多糖低剂量组	226.9±20.2	162.6±18.5
板栗多糖中剂量组	268.1±26.6*	180.4±20.3*
板栗多糖高剂量组	289.0±34.7**	195.0±20.0**

注：*、与空白对照组比较，差异显著 ($P < 0.05$)；下同。

由表2可知，与空白对照组比较，阿司匹林组、板栗多糖中、高剂量组出血时间、凝血时间均显著延长。与板栗多糖低剂量组比较，板栗多糖高剂量组与阿司匹林组出血时间均极显著延长 ($P < 0.01$)；与板栗多糖中剂量组比较，阿司匹林组出血时间极显著延长 ($P < 0.01$)。与板栗多糖低剂量组比较，板栗多糖高剂量组与阿司匹林组凝血时间均极显著延长 ($P < 0.01$)。这说明板栗多糖能抑制小鼠的出血和凝血功能，且具有剂量依赖关系。

2.3 板栗多糖对小鼠颈总动脉血栓形成时间和血栓质量的影响

由表3可知，与空白对照组比较，血栓模型组血栓形成时间为4.88 min，血栓质量为0.21 mg，表明血栓模型建立成功。与血栓模型组比较，板栗多糖各剂量组和阿司匹林组均极显著延长血栓形成时间 ($P < 0.01$)；与板栗多糖低剂量组比较，板栗多糖中、高剂量组和阿司匹林组均极显著延长血栓形成时间 ($P < 0.01$)；与板栗多糖中剂量组比较，板栗多糖高剂量组和阿司匹林

组均极显著延长血栓形成时间 ($P < 0.01$)；与板栗多糖高剂量组比较，阿司匹林组极显著延长血栓形成时间 ($P < 0.01$)。即阿司匹林延长血栓形成时间的效果强于板栗多糖。各组小鼠颈总动脉的血栓质量未见明显差异。

表 3 板栗多糖对小鼠颈总动脉血栓形成时间和血栓质量的影响
Table 3 Effect of chestnut polysaccharide on time to occlusion and thrombosis weight in common carotid artery of mice

组别	血栓形成时间/min	血栓质量/mg
空白对照组	0	0
血栓模型组	4.88±0.97	0.21±0.04
阿司匹林组	18.72±1.73 ^{abcd}	0.18±0.03
板栗多糖低剂量组	5.51±1.44 ^a	0.20±0.04
板栗多糖中剂量组	8.23±1.40 ^{ab}	0.18±0.03
板栗多糖高剂量组	13.07±1.93 ^{abc}	0.17±0.04

注：a、与血栓模型组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；b、与板栗多糖低剂量组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；c、与板栗多糖中剂量组比较差异极显著 ($P < 0.01$)；d、与板栗多糖高剂量组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4 板栗多糖对FeCl₃诱导血栓模型小鼠颈总动脉血流变异性的影响

表 4 板栗多糖对FeCl₃诱导血栓模型小鼠颈总动脉血流变异性的影响
Table 4 Effect of chestnut polysaccharide on blood flow variability in carotid artery of mice before and after FeCl₃-induced injury

组别	环裹滤纸条前血流 变异性/PU	环裹滤纸条后血流 变异性/PU
空白对照组	19.3±9.3	20.1±11.1
血栓模型组	17.8±6.1	211.0±27.3**
阿司匹林组	22.4±7.8	124.1±76.5 ^{▲▲}
板栗多糖低剂量组	18.3±5.3	162.2±43.5
板栗多糖中剂量组	18.6±5.0	135.8±36.2 ^{▲▲}
板栗多糖高剂量组	19.6±8.0	101.9±38.6 ^{▲▲}

注：▲▲、与血栓模型组比较，差异极显著 ($P < 0.01$)。

由表4可知，FeCl₃损伤前，各组小鼠血流变异性大小均未见统计学差异。环裹浸润双蒸水滤纸条后，空白对照组血流变异性无明显变化。环裹浸润5% FeCl₃滤纸条后，其余组血流变异性较损伤前均极显著增加 ($P < 0.01$)。FeCl₃损伤后，与空白对照组比较，血栓模型组血流变异性极显著升高 ($P < 0.01$)；与血栓模型组比较，板栗多糖组（100、200 mg/kg）、阿司匹林组血流变异性均极显著降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

血栓形成是缺血性心脑血管疾病及血栓栓塞性疾病的重要病理基础，抑制血小板活化和抑制凝血活性为干预血栓形成的重要手段。因而本研究对板栗多糖抗血小板、抗凝血和抗血栓形成作用进行了初步探讨。

实验首先观察了板栗多糖对小鼠一般状态的影响，结果表明灌胃板栗多糖对小鼠体质量（除200 mg/kg剂量组升高外）、血细胞计数和血小板平均体积无明显影

响,表示板栗多糖对小鼠机体健康状态无异常影响。但未观察到文献[12]中所述的板栗多糖升高白细胞现象,可能与实验条件不同有关。

出血时间和凝血时间分别反映血小板功能和内源性凝血系统功能^[18-19]。本研究表明,板栗多糖(100、200 mg/kg)能显著延长出血时间和凝血时间,提示其具有抗血小板和抗凝血作用。

FeCl₃可使血管内膜损伤,引起血小板黏附、聚集和释放活化等,导致内源性凝血系统激活,在动脉损伤的区域形成复合性血栓,与人类血栓性疾病的发病机制相似^[20],因而在国内外研究中被广泛使用^[21-23],本实验选用此模型来评价板栗多糖抑制血栓形成的作用。应用FeCl₃诱导小鼠颈总动脉血栓模型,评价血栓变化主要有3个针对性指标:血栓形成时间(功能学评价)、血栓质量(大体形态学评价)和血栓病理检测(病理学评价,在干预实验中一般不检测)^[24-25]。本研究结果显示,板栗多糖各剂量组均能延长FeCl₃诱导的小鼠颈总动脉血栓形成时间,表明板栗多糖具有抑制动脉血栓形成的作用。但未发现其对血栓质量有显著影响,可能与小鼠颈总动脉血栓质量较轻,现有方法和设备难以观测到组间差异有关。

由于体内血小板活化和血管内皮细胞损伤会引起血栓形成,导致管腔狭窄,致使流经该处的血流不稳,即血流变异性增大,已有研究表明波动血流增加血小板黏附(血小板活化表现之一)^[26],因而血流变异性加大是体内血小板活化的一个重要指标^[27]。本实验中FeCl₃诱导的动脉血栓模型小鼠血流变异性增大,表明该模型存在血小板活化。板栗多糖能降低血流变异性,进一步表明板栗多糖具有抗血小板活化的作用。由于板栗多糖对血小板计数与MPV无明显影响,也提示板栗多糖抗血小板作用与血小板数量无关。

综上所述,板栗多糖具有抗小鼠动脉血栓形成的作用,机制可能与其抗血小板功能有关。本实验为临床应用板栗多糖防治缺血性心脑血管疾病提供了一定依据,但板栗多糖抗血小板和抗凝血的机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵国强,高慧媛,王晓毅,等.板栗种仁化学成分初步研究[J].中国现代中药,2006,8(9):14-16.
- [2] 李清宇,杨颖,贾琳斐,等.板栗多糖的分离纯化,结构分析及抗疲劳作用的研究[J].食品与生物技术学报,2013,32(7):767-772.
- [3] 许景秀,李尚德.FAAS法测定豫南板栗中的微量元素[J].广东微量元素科学,2009,16(5):56-59.
- [4] 金在久,葛明.板栗的化学成分及药理研究进展[J].山西医药杂志,2005,34(9):751-753.
- [5] 梁雪.板栗不同品种(系)多糖结构和活性的初步研究[D].秦皇岛:河北科技师范学院,2013:1-3.
- [6] 杨利剑.板栗多糖的提取、成分分析及活性测定[J].武汉理工大学学报,2010,32(11):14-16.
- [7] 李润丰,刁华娟,彭友舜,等.板栗多糖的提取及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2011,32(8):21-25.
- [8] 邵亭亭,张海晖,段玉清,等.亚临界水萃取板栗多糖及其清除自由基活性研究[J].食品科技,2012,37(12):156-160.
- [9] 戴成国.板栗多糖的分离纯化,结构分析及体外抗氧化研究[D].西安:陕西师范大学,2011:41-45.
- [10] 何玲玲,王新,刘彬,等.板栗多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2010,26(2):72-75.
- [11] SEVAG M G, MAIWEG L. The respiration mechanism of pneumococcus. III[J]. The Journal of Experimental Medicine, 1934, 60(1): 95-105.
- [12] 陈和生,孙振亚,李汉东,等.罗田板栗多糖的分离纯化及成分分析[J].中国药理学杂志,2002,37(1):63-64.
- [13] 刘晓涵,陈永刚,林励,等.蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较[J].食品科技,2009,34(9):270-272.
- [14] 顾云,孟娟如.介绍一种简易的抗血栓药物体内筛选法[J].中国药理学通报,1991,7(4):317-318.
- [15] 王贤波,成浩,赵芸,等.茶叶中EGCG对小鼠抗凝血作用实验研究[J].茶叶科学,2011,31(6):532-536.
- [16] 杨蕾,李伟荣,宓穗卿,等.冰片对三氯化铁诱导的大鼠动脉血栓形成的抑制作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2010(6):164-166.
- [17] WANG Xinkang, XU Lin. An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research[J]. Thrombosis Research, 2005, 115(1): 95-100.
- [18] 朱大年.生理学[M].北京:人民卫生出版社,2010:62-63.
- [19] GARDELL S J, SANDERSON P E J. Novel anticoagulants based on direct inhibition of thrombin and factor Xa[J]. Coronary Artery Disease, 1998, 9(2/3): 75-81.
- [20] 郭朝锋.三氯化铁动物血栓模型方法学及其应用研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2010,24(6):537-539.
- [21] BARR J D, CHAUHAN A K, SCHAEFFER G V, et al. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model[J]. Blood, 2013, 121(18): 3733-3741.
- [22] ECKLY A, HECHLER B, FREUND M, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, 9(4): 779-789.
- [23] XIAN Xunde, DING Yu, ZHANG Ling, et al. Enhanced atherothrombotic formation after oxidative injury by FeCl₃ to the common carotid artery in severe combined hyperlipidemic mice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 385(4): 563-569.
- [24] BANG J, LEE K M, KIM B Y, et al. Anti-thrombotic effects of modified using a FeCl₃-induced carotid arterial thrombosis model[J]. Journal of Korean Medicine, 2013, 34(2): 51-58.
- [25] WANG X, SMITH P L, HSU M Y, et al. Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006, 4(2): 403-410.
- [26] ZHAO Xiaomin, WU Yaping, CAI Hongxin, et al. The influence of the pulsatility of the blood flow on the extent of platelet adhesion[J]. Thrombosis Research, 2008, 121(6): 821-825.
- [27] 赵晓民,秦树存.血小板氧化应激和动脉粥样硬化[J].生理科学进展,2011,42(1):33-38.