

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.021

柠檬汁粉抗血栓作用及其机制研究

Study on antithrombotic effect and mechanism of lemon juice powder

徐丛玥 林 欸 李超英 茹 琴

XU Cong-yue LIN Kuan LI Chao-ying RU Qin

(江汉大学武汉生物医学研究院, 湖北 武汉 430056)

(Wuhan Institutes of Biomedical Sciences, Jianghan University, Wuhan, Hubei 430056, China)

摘要:采用皮下注射盐酸肾上腺素同时冰水浴制作急性血瘀模型,测定全血黏度、红细胞沉降率、凝血四项、6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$, 6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、血栓素 B_2 (thromboxane B_2 , TXB $_2$)、内皮型一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 含量。结果表明:模型组大鼠全血黏度和红细胞沉降率增强,活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、凝血酶时间均显著缩短,纤维蛋白原含量显著增加,6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 和 eNOS 表达量降低, TXB $_2$ 和 ET-1 含量升高;柠檬汁粉能显著降低全血黏度和红细胞沉降率,延长 PT, 增加 6-酮-PGF $_{1\alpha}$ 活性,降低 TXB $_2$ 水平,增加 eNOS 表达和活性,降低 ET-1 的含量。柠檬汁粉具有抗血栓形成的作用。

关键词:柠檬汁粉;抗血栓作用;大鼠;血瘀;凝血功能

Abstract: The acute blood stasis rat model was made by injecting norepinephrine, then rats stayed in ice water bath for 4 mins. Whole blood viscosity (WBV), erythrocyte sedimentation rate (ESR), coagulation parameters, 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-KETO-PGF $_{1\alpha}$), thromboxane B_2 (TXB $_2$), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) were measured. Results: Model group significantly up WBV and ESR level, APTT, PT, TT were decreased whereas FIB content was increased very significantly in rats of the model group, meanwhile the 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and eNOS level were lower and TXB $_2$ and ET-1 level were higher. Lemon juice powder groups might down WBV and ESR level, extend PT, increase 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ level and decrease TXB $_2$ level, maintain the balance between 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and TXB $_2$, whereas the eNOS level was higher and ET-1 level was lower than model group. Lemon juice powder has antithrombotic effect.

Keywords: lemon juice powder; antithrombotic; rats; blood sta-

sis; coagulation function

血栓是多种疾病的诱发因子或并发症,在生理病理认识方面,它与中医的血瘀证有许多共同之处,活血化瘀疗法也是近代中西医结合研究中最活跃的领域之一^[1]。现有的抗血栓药物分为抗血小板药、抗凝剂类药物和溶血栓药/溶纤维蛋白类药物,不仅价格昂贵且伴有一定的副作用,根据中国传统药食同源理念,结合大健康产业的相关政策,寻找具有预防血栓形成功效的动植物食品已成为研究热点。

柠檬含有丰富的柠檬酸、柠檬烯、黄酮类以及 V_c 等营养成分^[2],是一种药食同源的水果,在《本草纲目拾遗》^[3]《岭南采药》^[4]等书著中均有其用药记载。Sengun 等^[5]研究发现柠檬具有预防心血管疾病的功能,但目前从抗血栓方向进行的研究报道较少,仅有陈岑^[6]报道通过体外诱导血小板聚集试验发现,柠檬提取物具有较强的抗血小板聚集活性。

肾上腺素急性给药加冰水应激,会引起血液黏度增高等血液流变学的变化和血管内皮损伤,是气滞血瘀的表现^[7],这种急性血瘀模型已经被广泛使用,而柠檬汁粉对急性血瘀模型大鼠的血液流变状态、抗凝途径及血管内皮损伤的影响目前尚未见报道。试验拟采用急性血瘀模型,以全血黏度、红细胞沉降率、凝血四项、血栓素 B_2 含量等为评价指标,研究柠檬汁粉体内抗血栓的作用及机制,以期对柠檬进一步的开发应用提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

柠檬:产地四川安岳果;

SPF 级昆明大鼠,雌性,体重 (200±10) g,动物许可证号 SCXK(京)2016-0006,北京维通利华实验动物技术有限公司;

凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 测定试剂盒、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 测定试剂盒、活化部分

作者简介:徐丛玥,女,江汉大学中级实验师,硕士。

通信作者:茹琴(1984—),女,江汉大学副研究员,博士。

E-mail: ruq.whibs@aliyun.com

收稿日期:2019-08-26

凝血活酶时间(鞣花酸法)(activated partial thromboplastin time, APTT)测定试剂盒、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)含量测定试剂盒、大鼠 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$, 6-keto-PGF $_{1\alpha}$)酶联免疫分析试剂盒、大鼠血栓素 B_2 (thromboxane B_2 , TXB $_2$)酶联免疫分析试剂盒、大鼠内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)酶联免疫分析试剂盒、大鼠内皮素 1(endothelin-1, ET-1)酶联免疫分析试剂盒:南京建成生物工程研究所;

盐酸肾上腺素注射液:每支 1 mL/mg, 远大医药(中国)有限公司;

阿司匹林肠溶片:25 mg/片, 欧意药业有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高速落地冷冻离心机:J26-XP 型, 德国 Beckman 公司;

冷冻干燥机:FD-1A-50 型, 上海豫明仪器有限公司;

半自动凝血分析仪:SC40 型, 北京中勤世帝生物技术有限公司;

血液黏度分析仪:HMN-6B 型, 天津海迈医用科技有限公司;

Ⅲ生化培养箱:SPX-150B 型, 天津市泰斯特仪器有限公司;

酶标仪:MULTISKAN GO 型, 美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 柠檬汁粉的制备 参考周玥等^[8]的方法并将离心转速稍作调整。调整后的方法为:新鲜柠檬经洗净、去皮去籽、切块后榨汁, 过滤, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液冷冻干燥(温度 -65 °C, 压强 11 Pa), 即得柠檬汁粉, 干燥器内贮藏备用。

1.2.2 大鼠分组及造模 30 只雌性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 体重(200±20) g, 分别为正常组、模型组、阳性对照组(阿司匹林 100 mg/kg)、柠檬汁粉低剂量组(150 mg/kg)和柠檬汁粉高剂量组(300 mg/kg), 连续灌胃给药 7 次, 早晚各 1 次(每天早晚 8:30 给药, 时间间隔 12 h), 灌胃量按大鼠体重 1 mL/100 g, 于第 3 天、第 5 次给药后开始复制急性血瘀模型^[9-10]。

第 3 天下午 6:00 点第 1 次皮下注射盐酸肾上腺素 0.8 mg/kg, 2 h 后冰浴 4 min(控制水温在 0~2 °C), 将大鼠置于冰水中游泳, 晚上 8:30 给第 6 次药, 于晚上 10:00 同等剂量注射第 2 次盐酸肾上腺素, 之后大鼠只给水饲养。第 4 天上午 8:30 最后一次给药, 10:00 用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉大鼠, 于腹主动脉取血, 测量相应的指标^[11]。

1.2.3 全血黏度和红细胞沉降率的测定 全血以肝素抗凝, 每 1 mL 全血添加 10~20 U 肝素, 血液黏度分析仪预热后, 取 0.8 mL 待测全血放入检查盘中, 测定血液在不同切变率下的黏度。

将血液采集到血沉管固定刻度后, 轻轻颠倒 2~3 次, 血沉管插入血沉架上使血液液面与“0”刻度平行, 室温静置 1 h, 读取上层血浆的高度。

1.2.4 凝血四项的测定 血液以体积比 1:9 与抗凝剂 0.109 mol/L 枸橼酸钠混匀, 轻轻颠倒 3~4 次混匀后, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用。

(1) 凝血酶原时间(PT):50 μ L 待测血浆和 100 μ L PT 试剂在 37 °C 中分别预热 10 min, 混匀后立刻开始计时。

(2) 活化部分凝血活酶时间(APTT):取待测血浆 50 μ L, 与 50 μ L APTT 试剂混匀后在 37 °C 预热 3 min, 然后加入 37 °C 预热的 0.025 mol/L CaCl $_2$ 试剂 50 μ L, 记录仪器测定结果。

(3) 凝血酶时间(TT):取待测血浆 100 μ L, 37 °C 预热 3 min, 然后加入 37 °C 预热的 TT 试剂 100 μ L, 记录仪器测定结果。

(4) 纤维蛋白原含量(FIB):取待测血浆 10 μ L, 与 90 μ L 咪唑缓冲液混匀后在 37 °C 预热 3 min, 然后加入 37 °C 预热的 FIB 试剂 50 μ L, 记录仪器测定结果。

1.2.5 血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 、TXB $_2$ 、eNOS、ET-1 含量的测定 各组血液在室温下自然凝固 20 min, 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 按试剂盒方法测定各组大鼠血浆 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、血栓素 B_2 (TXB $_2$)、内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)和内皮素-1(ET-1)的含量。

1.3 数据统计与分析

试验结果表示为(平均值±标准差), 数据通过 SPSS 17.0 和 Origin 分析, 采用单因素方差分析显著性。

2 结果与分析

2.1 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠全血黏度的影响

全血黏度(whole blood viscosity, WBV)是血液最重要的流变学特性参数, 是由血细胞比容、红细胞聚集性、红细胞变形性、红细胞表面电荷、血浆黏度、纤维蛋白原含量以及白细胞和血小板流动性等多种因素决定的综合性指数。全血黏度越大, 血液流动性越小, 脑血栓、脑供血不足、心肌梗死和心绞痛的发病与血液黏度升高有关, 增高的程度可反映心肌缺血严重性^[12]。

由表 1 可知, 在 3 种不同的切变率下, 模型组大鼠的全血黏度均极显著高于正常组的($P < 0.001$), 说明大鼠急性血瘀模型造模成功。与模型组相比, 柠檬汁粉高剂量组的全血黏度在各切变率下均极显著下降, 而柠檬汁粉低剂量组的全血黏度虽低于模型组的, 但无显著差异。表明柠檬汁粉高剂量组可以通过改善血液流变性来抑制血栓的形成。

2.2 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠红细胞沉降率的影响

影响血沉速度的因素主要有血浆和红细胞, 当血浆成分或红细胞数量与形态发生改变时, 会使红细胞间相互排斥而改变血沉速度。血浆中不对称的大分子物质使

表 1 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠全血黏度的影响[†]

Table 1 The effect of lemon juice powder on WBV in rats with acute blood stasis

组别	150 s ⁻¹	80 s ⁻¹	10 s ⁻¹
正常组	2.57±0.85	3.04±1.22	5.74±2.57
模型组	8.42±0.92**	19.65±1.86**	27.84±2.77**
阿司匹林组	4.34±0.41##	5.58±0.94##	10.33±1.18##
柠檬汁粉低剂量	7.70±1.09	16.95±1.32	24.94±1.17
柠檬汁粉高剂量	5.12±0.43##	8.97±3.30##	14.38±3.70##

† ** . 与正常组相比差异极显著(P<0.01); ## . 与模型组相比差异极显著(P<0.01)。

红细胞表面的负电荷减少,导致红细胞沉降加快;而红细胞数量增多或变形、血浆黏度降低时,红细胞下沉时受到的阻力增大使血沉减慢^[13]。

图 1 显示,与正常组相比,模型组大鼠的血沉速率极显著升高;与模型组相比,柠檬汁粉各剂量组的血沉速率极显著降低,且高剂量组降低急性血瘀大鼠红细胞沉降速率比低剂量组的慢。说明柠檬汁粉有抗血栓的效果。

2.3 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠凝血四项的影响

由表 2 可知,与正常组相比,模型组大鼠的 PT、APTT、TT 时间均显著延长,而 FIB 含量显著降低。与

表 2 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠凝血四项的影响[†]

Table 2 The effect of lemon juice powder on coagulation parameters in rats with acute blood stasis

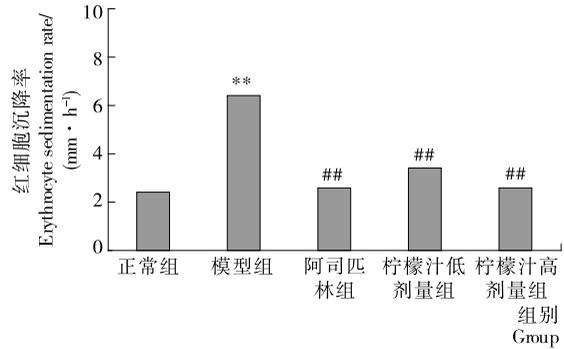
组别	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/(g · L ⁻¹)
正常组	21.04±1.04	19.68±1.35	42.64±1.11	1.40±0.06
模型组	17.74±1.25**	16.48±1.42**	37.99±1.30**	3.40±0.13**
阿司匹林组	24.68±2.72##	29.13±0.92**##	45.72±1.35**##	3.06±0.19#
柠檬汁粉低剂量	18.42±1.59	18.84±0.93#	40.33±1.19	3.42±0.03
柠檬汁粉高剂量	18.55±1.27	19.41±1.24##	39.61±1.61	3.39±0.36

† ** . 与正常组相比差异显著(P<0.01); # . 与模型组相比差异较显著(P<0.05); ## . 与模型组相比差异显著(P<0.01)。

2.4 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠 6-酮前列腺素 F1 α 和血栓素 B $_2$ 的影响

6-酮-PGF1 α 和 TXB $_2$ 分别是前列腺环素(PGI $_2$)和血栓素 A $_2$ (TXA $_2$)稳定的代谢产物,其含量高低可以代表 PGI $_2$ 和 TXA $_2$ 的含量高低。PGI $_2$ 具有抑制血小板聚集和扩张血管的作用,而 TXA $_2$ 与之呈生理拮抗作用,能促进血小板的聚集和血栓的形成。动脉粥样硬化、脑血管病变、周围血管血栓形成及血栓性血小板减少性紫癜等疾病,常见 6-酮-PGF1 α /TXB $_2$ 比值比较低^[14]。

由表 3 可知,与正常组相比,模型组能极显著降低 6-酮-PGF1 α 含量,升高 TXB $_2$ 含量,说明急性血瘀大鼠模型造模成功。与模型组相比,阿司匹林组、柠檬汁粉低剂量组和高剂量组大鼠血清中的 6-酮-PGF1 α 含量均极显著升



** . 与正常组相比差异显著(P<0.01) ## . 与模型组相比差异显著(P<0.01)

图 1 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠血沉的影响

Figure 1 The effect of lemon juice powder on ESR in rats with acute blood stasis

模型组相比,无论是低剂量组还是高剂量组,柠檬汁粉干预后大鼠的凝血酶原时间(PT)延长,且高剂量组有显著差异(P<0.01),而低剂量组是较显著差异(P<0.05);而活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶时间(TT)均有延长的,但无统计学差异;柠檬汁粉高剂量组大鼠的纤维蛋白原含量(FIB)低于模型组的,但无显著差异。说明柠檬汁粉主要通过外源性途径抑制血液凝固,与模型组相比 PT 时间分别延长了 14.32% 和 17.78%,具有一定的抗凝活性。

高, TXB $_2$ 含量均极显著降低,两者比值也极显著升高。且与阿司匹林组相比,柠檬汁粉高剂量组能极显著升高 6-酮-PGF1 α 含量,降低 TXB $_2$ 含量的效果也与阳性对照组相当。提示柠檬汁粉使 TXB $_2$ 含量减少,6-酮-PGF1 α 表达量增加,扩张血管,抑制血小板聚集,从而抑制血栓的形成。

2.5 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)和内皮素-1(ET-1)的影响

血管在 eNOS 作用下产生 NO,其具有扩张血管和抑制血小板功能的作用,而 ET-1 则是血管内皮细胞依赖性扩张受损的强大血管收缩剂^[15],可通过多种途径导致血管功能障碍。由表 4 可知,与正常组相比,模型组能较显著降低 eNOS 含量,升高 ET-1 含量,说明急性血瘀大鼠模型造模成功。与模型组相比,阿司匹林组和柠檬汁粉

表3 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠6-酮前列腺素F1 α 和血栓素B $_2$ 的影响[†]Table 3 The effect of lemon juice powder on 6-keto-PGF1 α and TXB $_2$ in rats with acute blood stasis

组别	6-酮-PGF1 α 含量/(ng·L ⁻¹)	TXB $_2$ 含量/(ng·L ⁻¹)	6-酮-PGF1 α /TXB $_2$
正常组	346.28±28.60	136.08±19.04	2.61±0.49
模型组	255.86±32.21**	276.48±13.56**	0.93±0.11**
阿司匹林组	360.48±43.76##	103.69±5.03##	3.49±0.49##
柠檬汁粉低剂量组	405.73±24.63##	126.53±7.94##	3.23±0.37##
柠檬汁粉高剂量组	472.67±26.50## [†]	106.14±2.63##	4.46±0.34##

[†] ** . 与正常组相比差异极显著(P<0.01); ## . 与模型组相比差异极显著(P<0.01);[†] . 与阿司匹林组相比差异极显著(P<0.01)。

表4 柠檬汁粉对急性血瘀大鼠内皮型一氧化氮合成酶和内皮素-1的影响[†]

Table 4 The effect of lemon juice powder on eNOS and ET-1 in rats with acute blood stasis

组别	eNOS 含量/(ng·mL ⁻¹)	ET-1 含量/(ng·L ⁻¹)
正常组	10.53±0.27	211.20±21.03
模型组	7.49±1.30*	263.66±28.28*
阿司匹林组	30.13±1.07##	218.13±2.52#
柠檬汁粉低剂量组	9.46±2.12	215.76±26.94#
柠檬汁粉高剂量组	20.22±1.49##	231.66±17.52

[†] * . 与正常组相比差异较显著(P<0.05); # . 与模型组相比差异较显著(P<0.05); ## . 与模型组相比差异极显著(P<0.01)。

高剂量组能极显著升高 eNOS 含量,而柠檬汁粉低剂量组能升高 eNOS 含量,但无显著差异;阿司匹林组和柠檬汁粉低剂量组能较显著降低 ET-1 含量,而柠檬汁粉高剂量组大鼠血清中 ET-1 含量比模型组的低,但无统计学差异。表明柠檬汁粉通过增加 eNOS 表达和活性水平,降低 ET-1 的含量来改善血管功能,从而抑制血栓的形成,且无剂量依赖关系。

3 结论

试验结果表明,柠檬汁粉能降低模型组大鼠全血黏度、减缓红细胞血沉速度,提高血液的流动性。凝血系统方面,柠檬汁粉只具有显著延长 PT 时间的作用,对 APTT、TT 和 FIB 的影响无显著差异,主要通过外源途径调节凝血系统,抑制模型大鼠血栓的形成;血管内皮损伤方面,柠檬汁粉能提高 6-酮-PGF1 α 和 eNOS 表达量,减少模型组 ET-1 含量,因此推断柠檬汁粉可能通过修复血管内皮细胞损伤,改善血管功能,从而抑制血栓的形成。试验还发现 300 mg/kg 柠檬汁粉能显著降低 TXB $_2$ 含量,说明柠檬汁粉能通过减少 TXB $_2$ 释放,抑制血小板功能,从而改善大鼠血栓形成。

今后需进一步针对柠檬汁粉的抗血栓功效成分进行深入研究;此外,试验未检测溶血栓相关指标,对凝血系统中相关凝血因子表达的影响等也有待继续探索。

参考文献

- [1] 吴巧凤,郝云云,严云良. 祛瘀清热颗粒对血瘀模型家兔血液流变学的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(3): 458-459.
- [2] 马兆成,朱春华. 柠檬与生活[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 5-12.
- [3] 赵学敏. 栖芬室藏中医典籍精选: 本草纲目拾遗[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2016: 13-15.
- [4] 萧步丹,周劲松. 岭南采药录考释[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2017: 122.
- [5] SENGUN I Y, KARAPINAR M. Effectiveness of lemon juice powder, vinegar and their mixture in the elimination of Salmonella typhimurium on carrots (*Daucus carota* L.)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(3): 301-305.
- [6] 陈岑. 活血化痰中药和食物抗血小板聚集活性评价及作用机制初探[D]. 重庆: 重庆大学, 2015: 31-42.
- [7] 赵玲,魏海峰,李雅莉,等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188-190.
- [8] 周玥,张娜,林太凤,等. 柠檬汁粉清除 DPPH 自由基能力及实验方法比较研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 176-178, 182.
- [9] 谢平耀. 黑莓籽和赤芍血栓作用机制研究[D]. 开封: 河南大学, 2016: 35-48.
- [10] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等. 大鼠急性血瘀模型造模方法的研究与评价[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1761-1765.
- [11] XIE Ping-yao, ZHANG Yong, WANG Xue-biao, et al. Anti-thrombotic effect and mechanism of *Rubus spp.* Blackberry[J]. Food Funct, 2017, 8(5): 2000-2012.
- [12] 罗亚敏,任小巧,宋慧荣,等. 藏药如意珍宝丸对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(6): 757-759.
- [13] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 25-26.
- [14] 杨晓君,穆合塔尔,包晓玮,等. 红花黄色素与双亚酸的抗血栓作用[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 264-266.
- [15] 卿即娜,陈红阳,尹琳洁,等. 血管内皮细胞衰老与心血管疾病的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(2): 161-168.