

螺旋藻激酶对急性血瘀模型大鼠的影响*

黄媛恒¹, 覃斐章², 李映新², 原春兰³, 蒋丽梅³, 王琳³, 庞辉^{1△}

(广西医科大学:1. 基础医学院;2. 药学院;3. 第一临床医学院, 南宁 530021)

[摘要] **目的** 探讨螺旋藻激酶(SPK)对急性血瘀模型大鼠的血液流变学、血小板聚集率和环磷酸腺苷(cAMP)的影响。**方法** 40 只 SD 大鼠分为正常对照组、模型组、阿司匹林组和 SPK 高、低剂量组,灌胃给药 7 d,采用肾上腺素冰水浴刺激复制急性血瘀大鼠模型,应用全自动血流变测定仪检测全血黏度、血浆黏度、红细胞压积(Hct)、红细胞聚集指数(EAI)、红细胞变形指数(DI)和红细胞刚性指数(ERI),酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血浆 cAMP 的水平,采用二磷酸腺苷诱导大鼠血小板聚集,用比浊法测定最大聚集率。**结果** SPK 可以降低急性血瘀大鼠的全血黏度,血浆黏度、Hct、EAI 和血小板最大聚集率,升高血浆 cAMP 水平,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),对 DI 和 ERI 无明显影响。**结论** SPK 能明显改善急性血瘀大鼠血液流变学的异常变化且具有抗血小板聚集作用。

[关键词] 螺旋藻激酶;血瘀;血液流变学;血小板聚集;环磷酸腺苷

[中图分类号] R963

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)36-5047-02

The effects of Spirulina kinase in rats with acute blood stasis*

Huang Yuanheng¹, Qin Feizhang², Li Yingxin², Yuan Chunlan³, Jiang Limei³, Wang Lin³, Pang Hui^{1△}

(1. College of Basic Medicine; 2. College of pharmacy; 3. College of First Clinical Medical,

Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** In this study, the effect of Spirulina kinase(SPK) on hemorheology, platelet aggregation and cAMP in acute blood stasis rats model were investigated. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into normal control group, model group, aspirin group and the high and low dose of SPK groups. All treatments were performed by gavage once a day for 7 days. Subcutaneous injection of adrenalin combined with ice water bath were used to establish the acute blood stasis rat model. The whole blood viscosity, plasma viscosity, red blood cell hematocrit (Hct), erythrocyte aggregation index (EAI), red blood cell deformation index(DI) and erythrocyte rigidity index(ERI) were detected by automatic blood flow speed analyzer. Meanwhile, the level of cAMP was detected by ELISA method. Rat platelet aggregation induced by ADP and the maximum aggregation rate was measured by turbidimetry. **Results** Results showed that SPK could significantly decrease the whole blood viscosity, plasma viscosity, Hct, EAI and platelet aggregation rate, increase the level of cAMP compared with model group($P<0.05$), but had no effect on DI and ERI. **Conclusion** SPK can markedly improve the abnormal changes of hemorheology in acute blood stasis rats and inhibit the platelet aggregation.

[Key words] Spirulina kinase; blood stasis; hemorheology; platelet aggregation; cAMP

螺旋藻是天然海洋生物,广泛分布于中国广西、浙江、海南等省区,具有抗氧化、降血脂、抗衰老、抗损伤、提高免疫力等药理作用^[1]。笔者前期研究发现,螺旋藻经过发酵酶化干燥后,从中提取出一种具有蛋白激酶类活性成分,称为螺旋藻激酶(spirulina kinase, SPK),经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定为电泳纯,其相对分子质量为 40×10^3 ,属于丝氨酸蛋白酶,结构中不含二硫键^[2-3]。前期药理作用研究表明其具有一定抗血栓、抗凝血及保护血管内皮细胞作用^[4-6]。本实验拟通过肾上腺素与冰水刺激复制急性血瘀大鼠模型,观察 SPK 对血瘀证模型动物血液流变学、血小板聚集率的影响,并对血浆环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的水平进行了测定,为进一步开发 SPK 提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 清洁(SPF)级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体质量(200±20)g,由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCXK 桂 2009-0002,实验动物使用许可证 SCXK 桂 2009-0004。主要试剂:SPK 由本实验室自行提取;阿司匹林

肠溶片 100 mg/片购自拜耳医药保健有限公司,批号 BJ27607;盐酸肾上腺素注射液购自上海禾丰制药有限公司,批号 201512;二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)购自 Sigma 公司,批号 A2754;cAMP 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,批号 L151201132。主要仪器:SA9000 全自动血流变测试仪购自北京赛科希德科技发展有限公司;iMark 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;血小板功能检测仪 700 购自美国 Chrono-Log 公司;TGL-16A 冷冻离心机购自长沙平凡仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和给药 40 只 SD 大鼠分为 5 组,即正常对照组、模型组、阿司匹林组(0.1 g/kg)和 SPK 高、低剂量组(1.0、0.5 g/kg),正常组和模型组给予等体积的生理盐水,灌胃给药,每天 1 次,连续 7 d。

1.2.2 模型制备^[7] 第 6 天给药后 30 min,除正常对照组大鼠外,其余各组大鼠均皮下注射盐酸肾上腺素 0.8 mg/kg,2 h 后将大鼠浸入 0~5℃ 冰水中 5 min,2 h 后再按 0.8 mg/kg 皮下注射盐酸肾上腺素以复制急性血瘀模型,正常对照组大鼠仅皮下

注射等容积生理盐水且不予冰水刺激;所有禁食不禁水 12 h。

1.3 检测指标 第 7 天末次给药 30 min, 各组大鼠以水合氯醛腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 肝素抗凝全血用全自动血流变测定仪检测血液流变学指标; 包括全血黏度(1/s、50/s、200/s)、血浆黏度、红细胞压积(Hct)、红细胞变形指数(DI)、红细胞聚集指数(EAI)及红细胞刚性指数(ERI); 另取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血, 4℃, 3 500 r/min, 离心 15 min, 分离血浆, 用 ELISA 法检测 cAMP 水平, 按试剂盒说明书操作; 以 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 全血以 1 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液即为富血小板血浆, 余下部分以 3 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液即为贫血小板血浆, 按 Born 比浊法测定二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板最大聚集率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPK 对血瘀证模型大鼠血液流变学的影响 与正常对

表 2 SPK 对急性血瘀大鼠血浆黏度、Hct、EAI、DI、ERI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 血浆黏度(mPa/s) | Hct(%) | EAI | DI | ERI |
|----------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 正常对照组 | 1.22±0.03 ^a | 36.95±2.80 ^a | 6.45±0.38 ^a | 0.95±0.07 ^a | 5.24±0.44 ^a |
| 模型组 | 1.40±0.04 | 40.95±1.90 | 6.95±0.33 | 0.84±0.05 | 4.48±0.38 |
| 阿司匹林组 | 1.30±0.02 ^a | 37.38±2.67 ^a | 6.50±0.29 ^a | 0.88±0.05 | 4.61±0.36 |
| SPK 高剂量组 | 1.34±0.04 ^a | 37.60±2.59 ^a | 6.56±0.23 ^a | 0.89±0.07 | 4.66±0.39 |
| SPK 低剂量组 | 1.36±0.03 ^a | 39.03±2.16 | 6.92±0.26 | 0.87±0.05 | 4.60±0.39 |

^a: $P < 0.05$, 与模型组比较

2.2 SPK 对血瘀证模型大鼠血浆 cAMP 水平的影响 模型组大鼠血浆 cAMP 水平为(140.74±15.55) pg/L, 与正常对照组相比, 明显下降。与模型组比较, SPK 高剂量组(1.0 g/kg)能明显提高大鼠血浆 cAMP 水平, 见表 3。

表 3 SPK 对 ADP 诱导的急性血瘀大鼠血小板聚集率、血浆 cAMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 血小板聚集率(%) | cAMP(pg/L) |
|----------|-------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | 37.13±2.70 ^b | 172.64±23.27 ^a |
| 模型组 | 46.13±4.22 | 140.74±15.55 |
| 阿司匹林组 | 40.25±2.19 ^a | 169.71±16.00 ^a |
| SPK 高剂量组 | 42.25±2.55 ^a | 161.72±11.41 ^a |
| SPK 低剂量组 | 44.00±3.59 | 145.53±13.64 |

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较。

3 讨论

现代药理学研究表明, 血栓形成的重要原因有血管内皮细胞的损伤、血小板聚集及相关活化因子的释放, 纤溶活性的降低, 血液黏度的增大, 血流状态的改变等。目前临床上血液的浓、黏、凝、聚是造成血栓的主要原因。可见, 血液流变学的改变在血栓形成过程也起了关键作用, 它主要反映由于血液成分变化而带来的血液流动性、凝滞性和血液黏度的变化。血液流变学的异常在许多疾病的发生发展发挥重要的作用, 研究表明患高血压、高血脂、急性心肌梗死、冠状动脉疾病、脑卒中等人群均出现血液流变学异常^[8-11]。

血瘀就是一组血液循环障碍或血液流变学行为异常的疾病。皮下注射肾上腺素加冰水浸泡复制的大鼠急性血瘀模型, 表现出血液高凝、全血黏度增加等血液流变学的异常变化^[12]。血液流变学的改变通常应用全血黏度、血浆黏度、Hct、纤维蛋白原定量、DI 和 EAI 等指标来反映。血液里的细胞成分(血小板、红细胞)和血浆里的成分(糖、脂、纤维蛋白原)的变化会导致血液流变性的改变。全血黏度是反映血液流变性最重要的

指标, 受血浆黏度、血小板聚集性、Hct、红细胞聚集性和变形性等影响, 而血浆黏度由血浆蛋白浓度、形式决定。本研究结果显示急性血瘀大鼠血液流变学发生异常改变, 由 ADP 诱导剂诱导的血小板聚集率明显升高, SPK 可以降低急性血瘀大鼠的全血高、中、低切黏度, 降低血浆黏度、Hct 和 EAI, 以及抑制血小板的聚集。同时, 本实验观察了血瘀大鼠血浆 cAMP 的水平。cAMP 作为血小板的第二信使对血小板功能的调节起重要作用, cAMP 主要通过降低细胞内 Ca^{2+} 水平、抑制血小板肌球蛋白磷酸化、促进前列腺素 E2(PGE2) 和前列腺 A2(PGI2) 的合成、抑制血栓素(TXA2) 合成及抑制凝血酶与其受体结合等抑制血小板的活化^[13], 从而影响血小板聚集功能, 在血液高凝态和微循环障碍的发展过程中有重要的意义。因此当 cAMP 水平降低, 则可促进血小板聚集, 易致血液高凝态, 结果显示急性血瘀大鼠 cAMP 水平明显下降, SPK 可升高 cAMP 水平, 推断其抑制血小板聚集可能与之有关, 具体机制有待进一步研究。

2.2 SPK 对血瘀证模型大鼠 ADP 诱导血小板聚集率的影响 与正常对照组比较, 模型组大鼠血小板聚集率明显升高。与模型组比较, SPK 高剂量组(1.0 g/kg)对 ADP 诱导的血小板聚集率有明显抑制作用($P < 0.05$), 见表 3。

表 1 SPK 对急性血瘀大鼠全血黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 200/s | 50/s | 1/s |
|----------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 正常对照组 | 3.57±0.11 ^a | 4.44±0.13 ^a | 23.04±1.43 ^a |
| 模型组 | 3.95±0.15 | 4.78±0.11 | 27.45±1.11 |
| 阿司匹林组 | 3.66±0.21 ^a | 4.46±0.20 ^a | 23.83±2.04 ^a |
| SPK 高剂量组 | 3.72±0.20 ^a | 4.55±0.23 ^a | 24.38±1.31 ^a |
| SPK 低剂量组 | 3.78±0.13 ^a | 4.64±0.20 | 26.16±1.38 |

^a: $P < 0.05$, 与模型组比较

指标, 受血浆黏度、血小板聚集性、Hct、红细胞聚集性和变形性等影响, 而血浆黏度由血浆蛋白浓度、形式决定。本研究结果显示急性血瘀大鼠血液流变学发生异常改变, 由 ADP 诱导剂诱导的血小板聚集率明显升高, SPK 可以降低急性血瘀大鼠的全血高、中、低切黏度, 降低血浆黏度、Hct 和 EAI, 以及抑制血小板的聚集。同时, 本实验观察了血瘀大鼠血浆 cAMP 的水平。cAMP 作为血小板的第二信使对血小板功能的调节起重要作用, cAMP 主要通过降低细胞内 Ca^{2+} 水平、抑制血小板肌球蛋白磷酸化、促进前列腺素 E2(PGE2) 和前列腺 A2(PGI2) 的合成、抑制血栓素(TXA2) 合成及抑制凝血酶与其受体结合等抑制血小板的活化^[13], 从而影响血小板聚集功能, 在血液高凝态和微循环障碍的发展过程中有重要的意义。因此当 cAMP 水平降低, 则可促进血小板聚集, 易致血液高凝态, 结果显示急性血瘀大鼠 cAMP 水平明显下降, SPK 可升高 cAMP 水平, 推断其抑制血小板聚集可能与之有关, 具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王继平, 任景文, 武爱民. 螺旋藻营养和保健功效概述[J]. 包头医学, 2012, 36(3): 145-147.
- [2] 肖云晓, 陈高斯, 庞辉. 螺旋藻激酶分离提纯方法初探[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1399-1400.
- [3] 蒋皓, 陈高斯, 庞辉, 等. 螺旋藻激酶的酶学性质研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2512-2513.
- [4] 庞辉, 李小花, 陈高斯, 等. 螺旋藻激酶对大鼠动静脉环路血栓的溶栓作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 908-909.
- [5] 陈高斯, 李小花, 庞辉, 等. 螺旋藻激酶提取物对血栓形成的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 6(29): 1462-1464.
- [6] 王慧杰, 肖云晓, 庞辉, 等. 螺旋藻激酶(下转第 5051 页)

合增强转录活性^[10-12]。本研究发现重组的 Wnt3a 蛋白刺激大鼠 VSMCs 后可以增强 β -catenin Ser675 位点和 GSK-3 β Ser9 (抑制 GSK-3 β 的活性)位点的磷酸化,提示 Wnt3a 刺激可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。

VSMCs 迁移和增殖可以导致损伤的动脉内膜增生引起动脉粥样硬化加重和血管内再狭窄。这一系列过程受到细胞外基质、黏附分子及细胞表面的整合素家族等许多蛋白及信号通路的调节^[9,12]。ILK 是整合素受体下游信号一个重要的分子,它可以通过磷酸化使 GSK-3 β 失活,GSK-3 β 失活又可以导致 Wnt 信号传导通路靶基因的激活,从而调节细胞的增殖、分化及存活。ILK 还可以作为分子桥接蛋白与整合素结合,调节肌动蛋白和细胞骨架结构,影响细胞迁移和黏附^[13-16]。研究还发现 ILK 可以通过磷酸化使 GSK-3 β 失活,促进 β -catenin 核易位并激活经典的 Wnt 信号通路^[14-17]。本研究在大鼠 VSMCs 中研究发现 Wnt3a 不仅可以激活经典的 Wnt 信号通路,还可以增加 ILK 蛋白水平的表达,并促进 VSMCs 迁移和黏附,提示 Wnt3a 可以通过 ILK 调节 VSMCs 迁移和黏附。

本研究得出 Wnt3a 可以通过 ILK 调节 VSMCs 迁移和黏附,这有可能成为治疗血管疾病和评估预后一个重要的靶点,然而,血管疾病的发生机制复杂并涉及许多信号传导通路,将来还应该其他的细胞中和动物模型中进一步探讨 Wnt3a 信号及 ILK 的机制和作用。

参考文献

- [1] Van DV, Smits JF, Blankesteyn WM. The Wnt/frizzled pathway in cardiovascular development and disease; friend or foe? [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2/3): 338-345.
- [2] Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more [J]. *Circ Res*, 2010, 106(12): 1798-1806.
- [3] Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease; lessons from vascular development [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 350-357.
- [4] Ghatak S, Morgner J, Wickström SA. ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin-actin linkage [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(4): 995-1001.
- [5] Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 321-345.
- [6] Shin HR, Islam R, Yoon WJ, et al. Pin1-mediated modification

prolongs the nuclear retention of β -Catenin in wnt3a-induced osteoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5555-5565.

- [7] Amin N, Vincan E. The Wnt signaling pathways and cell adhesion [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17(1): 784-804.
- [8] Tan CW, Gardiner BS, Hirokawa Y, et al. Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31882.
- [9] Parmalee NL, Kitajewski J. Wnt signaling in angiogenesis [J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(7): 558-564.
- [10] Vargas DA, Sun M, Sadykov K, et al. The integrated role of Wnt/ β -Catenin, N-Glycosylation, and E-Cadherin-Mediated adhesion in network dynamics [J]. *PLoS Comput Biol*, 2016, 12(7): e1005007.
- [11] Marchand A, Atassi F, Gaaya A, et al. The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans [J]. *Aging Cell*, 2011, 10(2): 220-232.
- [12] Mill C, George SJ. Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2): 233-240.
- [13] Ho B, Hou G, Pickering JG, et al. Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(1): 278-288.
- [14] Ho B, Bendeck MP. Integrin linked kinase (ILK) expression and function in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 3(2): 174-176.
- [15] Moraes JA, Frony AC, Dias AM, et al. Alpha1beta1 and integrin-linked kinase interact and modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(2): 477-485.
- [16] McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase—essential roles in physiology and cancer biology [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 19): 3121-3132.
- [17] Lu C, Yu X, Zuo K, et al. Tripterine treatment improves endothelial progenitor cell function via integrin-linked kinase [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(3): 1089-1103.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-09-26)

(上接第 5048 页)

- 对肾上腺素损伤内皮细胞分泌 t-PA 和 PAI-1 的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(5): 1049-1053.
- [7] Liu L, Duan A, Tang YP, et al. Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 381-387.
 - [8] Toth K, Kesmarky G, Vekasi J, et al. Hemorheological and hemodynamic parameters in patients with essential hypertension and their modification by alpha-1 inhibitor drug treatment [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1999, 21(3/4): 209-216.
 - [9] Tsuda Y, Satoh K, Kitadai M, et al. Effects of pravastatin Sodium and simvastatin on plasma fibrinogen level and blood rheology in type II hyperlipoproteinemia [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 122(2): 225-233.

- [10] Bogar L, Juricskay I, Kesmarky G, et al. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 35(1/2): 99-103.
- [11] Kowal P, Marcinkowska-Gapińska A. Hemorheological changes dependent on the time from the onset of ischemic stroke [J]. *J Neurol Sci*, 2007, 258(1/2): 132-136.
- [12] Li X, Han Y, Wang W, et al. Effect of the carthamins yellow from *Carthamus tinctorius* L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8): 1797-1802.
- [13] 姬晓鹏, 蒋斌, 潘琳, 等. 复方丹参与丹参与对冠状动脉粥样硬化患者血小板活化抑制作用的比较 [J]. *中国药房*, 2010, 21(19): 1805-1806.

(收稿日期:2017-07-06 修回日期:2017-08-08)