

叶下珠有效部位静脉注射对动物血栓形成及凝血系统的影响

沈志强¹, 陈 蓬², 段 理³, 董泽军⁴, 陈植和¹, 刘吉开⁴

(1. 昆明医学院, 云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650031; 2. 昆明圣火制药有限责任公司, 云南 昆明 650217; 3. 昆明医学院第一附属医院放射科, 云南 昆明 650031; 4. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

[摘要] 目的: 探讨静脉注射叶下珠有效部位(含 corilagin 60% 以上, 简称 PUW) 的抗血栓作用及其机制, 同时评价 PUW 对凝血系统的影响。方法: 采用小鼠尾静脉注射花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 致肺微循环血栓、电刺激大鼠颈动脉血栓和结扎大鼠下腔静脉引起的血栓模型综合评价 PUW 的抗血栓形成作用; 利用玫瑰花结试验观察 PUW 对血小板与中性粒细胞之间黏附反应的影响; 评价 PUW 对家兔优球蛋白溶解时间 (euglobulin lysis time, ELT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 及白陶土部分凝血活酶时间 (kaolin partial thromboplastin time, KPTT) 和大鼠尾静脉出血时间的影响。结果: PUW 静脉注射可明显减少 AA 引起的小鼠死亡数、延长电刺激颈动脉闭塞时间并减轻下腔静脉血栓的湿重和干重; PUW 显著降低血小板-中性粒细胞之间的黏附率, 其半数抑制浓度为 39.7 mg/L。10 mg/kg 的 PUW 静脉注射明显缩短 ELT、延长 KPTT 和尾静脉出血时间, 对 PT 无明显影响。结论: PUW 静脉注射具有明显的抗血栓形成作用, 其机制与阻抑血小板-中性粒细胞间相互作用密切相关; PUW 有引起出血的倾向, 但与阿司匹林或尿激酶比较, 其出血的危险性明显减小。

[关键词] 叶下珠; 血栓; 凝血系统; 动物, 实验

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)02-0106-05

Effects of fraction from *Phyllanthus urinaria* on thrombosis and coagulation system in animals

SHEN Zhi-Qiang¹, CHEN Peng², DUAN Li³, DONG Zhe-Jun⁴, CHEN Zhi-He,¹ LIU Ji-Kai⁴

(1. Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan Province 650031, China; 2. Kunming Shenghuo Pharmaceutical Ltd Co, Kunming, Yunnan Province 650217, China; 3. Department of Radiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan Province 650031, China; 4. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan Province 650204, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of PUW (a fraction containing 60% corilagin from a Chinese herbal plant *Phyllanthus urinaria*) on thrombosis and coagulation system. Methods: Myers' method was used to evaluate the protection of intravenously administered PUW against the male mouse sudden death caused by injection of 75 mg/kg arachidonic acid in the tail vein; Charlton's method was modified to observe antithrombotic effect of PUW in rat electrically stimulated carotid artery thrombosis model; and the model of venous thrombosis was produced to investigate the antithrombotic effect of PUW. Rosette assay was used to observe the effect of PUW on platelet-neutrophil adhesion. The effects of PUW were monitored on euglobulin lysis time (ELT), prothrombin time (PT), kaolin partial thromboplastin time (KPTT), and bleeding time (BT) in rats, according to the methods of Kowalski, HUANG Zheng-Liang, and GU Yue-Fang, et al, respectively. Results: The results showed that PUW administered intravenously significantly decreased the mouse mortality, prolonged the occlusion time of rat carotid arteries, and reduced the wet and dry thrombus weight of the inferior vena cava, respectively. PUW markedly inhibited the binding of activated platelets to neutrophils, obtaining 39.7 mg/L of the medium inhibitory concentration. Intravenously administered PUW significantly shortened ELT, prolonged KPTT while had no influence on PT; PUW increased BT in rat tail tips but the BT caused by PUW was much shorter than that by aspirin or urokinase. Conclusion: It is suggested that PUW has the potential of antithrombosis due to its inhibition of platelet-neutrophil adhesion. PUW shows the tendency to bleeding, however, it could not cause serious bleeding side effect as compared with aspirin or urokinase.

KEY WORDS *Phyllanthus urinaria*; thrombosis; platelets; neutrophils; coagulation system

J Chin Integr Med, 2004, 2(2): 106-110, 122

叶下珠 (*Phyllanthus urinaria* L.) 为大戟科一年生草本植物, 作为一种传统的中草药常用来抗菌和抗病毒, 民间主要用来治疗黄疸、肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿等症^[1]。从该植物中获得的水溶性有

[基金项目] 国家科技部 863 项目 (No. 2001CCC00600); 云南省自然科学基金重点项目 (No. 98C008Z)

[作者简介] 沈志强 (1966-), 男, 博士, 副教授。

Correspondence to: SHEN Zhi-Qiang, MD, Associate Professor. E-mail: szq21cn@hotmail.com

效部位(含 corilagin 60 % 以上)简称 PUW。我们在筛选时发现,PUW 静脉注射具有较强的抗血栓作用,但对血小板聚集功能无明显影响。目前认为,血小板与中性粒细胞之间的相互作用与血栓形成密切相关,因此我们从细胞间相互作用的角度探讨其抗栓作用。由于抗栓药一般都表现出一定的致机体出血等不良反应,所以有必要就 PUW 对凝血系统的影响进行探讨。

本研究采用多种血栓模型综合观察静脉注射 PUW 的抗血栓形成作用及其机制,同时测定 PUW 静脉注射对优球蛋白溶解时间(euglobulin lysis time, ELT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、白陶土部分凝血活酶时间(kaolin partial thromboplastin time, KPTT)及大鼠尾静脉出血时间的影响,以综合评价 PUW 作为一种有苗头的抗栓药对凝血系统的影响。

1 材料与方 法

1.1 叶下珠有效部位的制备 取 20 kg 叶下珠全草(采自贵州),粉碎,用乙醇/水(体积比为 1 : 1)提取 3 次,合并提取液,减压浓缩至干,得浸膏 4.1 kg。将浸膏用水溶解,通过大孔树脂,先用 10% 乙醇/水洗脱,再用 25 % 乙醇/水洗脱,洗脱部分减压浓缩至小体积,然后进行喷雾干燥得有效部位 700 g,高压液相色谱分析含有效成分 corilagin 60 % 以上,此为叶下珠水溶性有效部位(简称 PUW)。

1.2 动物 SD 大鼠,体重 250 ~300 g; 雄性 ICR 小鼠,体重约 25 g; 健康成年 ICR 小鼠,体重 18 ~22 g,雌雄各半; 健康家兔,体重 2 ~2.5 kg,雌雄各半。上述动物均由昆明医学院实验动物中心提供(合格证号分别为:滇实动证字第 2001034 号、2001035 号和 2002082 号)。

1.3 药物和试剂 花生四烯酸(arachidonic acid, AA)系 Sigma 公司产品,临用前溶于 100 mmol/L Na_2CO_3 溶液中。从叶下珠植物获得的 PUW 由中国科学院昆明植物研究所开放实验室刘吉开教授提供,用前溶于 0.9 % 的生理盐水中,并以 100 mmol/L 的 Na_2CO_3 调其 pH 值至 7.0。尿激酶从丽珠集团丽宝生化制药公司购买,用前溶于蒸馏水中。阿司匹林结晶溶于 50 mmol/L 的 Na_2CO_3 溶液中,并用 100 mmol/L 的 HCl 将其 pH 值调至 7.0。PT 及 KPTT 测定试剂盒购自上海生物技术公司,PT 试剂国际敏感指数 ISI 值为 1.22。其它试剂均为国产分析纯。

1.4 主要仪器 电刺激仪(型号: SEN-7203),日本 Nihon Kohden 公司产品; 超声血流量仪(型号:

DVM-4200),日本 Hayashi Denki 公司生产; 四道血液凝聚仪(LBY-NJ2),北京普利生科贸集团生产; THZ-C 恒温摇床,江苏太仓实验设备厂生产。

1.5 PUW 静脉注射对小鼠肺微循环血栓形成的影响 雄性 ICR 小鼠禁食过夜后,分成 5 组,每组 15 只。A 组:予 0.9 % 的生理盐水; B 组:5 mg/kg 阿司匹林; C 组、D 组、E 组:分别为 2.5 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 的 PUW。上述各组均以 10 ml/kg 于小鼠尾静脉注射。10 min 后,按 Myers 等^[2]的方法,将 75 mg/kg 的花生四烯酸以 5 ml/kg 注入小鼠尾尖静脉诱发血栓形成。注毕后 30 min 内,计数各剂量组和对照组小鼠的存活数。以 χ^2 检验行统计学处理。

1.6 PUW 静脉注射对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响 雄性 SD 大鼠随机分成 5 组,每组 8 只。A 组:0.9 % 的生理盐水作为溶媒组; B 组:5 mg/kg 的阿司匹林作为阳性对照组; C 组、D 组、E 组:2.5 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 的 PUW 组。大鼠用 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,上述各组均以 2 ml/kg 从股静脉注射,10 min 后,用改良的 Charlton 等^[3]的方法,分离大鼠左颈总动脉,置两根银制电极,超声探针置远心端。用电刺激器以 1.5 mA 的电流刺激大鼠颈动脉 7 min。用超声血流量仪记录血栓形成时间(即从刺激开始至颈动脉血流量为“零”的时间)。记录刺激开始后 60 min 内的血流量,如血管仍未栓塞,则以 60 min 作为最大血栓形成时间。

1.7 PUW 静脉注射对大鼠下腔静脉血栓形成的影响 大鼠分为 5 组,每组 8 只。A 组:0.9 % 的生理盐水组; B 组:5 mg/kg 的阿司匹林作为阳性对照; C 组、D 组、E 组:2.5 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 的 PUW 组。用陈长勋等^[4]的方法制作静脉血栓模型。即用 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,然后沿腹中线打开腹腔,分离下腔静脉,在左肾静脉下方水平处结扎,并缝合腹腔。结扎下腔静脉 1 h 后,上述各组以 2 ml/kg 从右股静脉给药。再过 1 h 后,重新打开腹腔,取出下腔静脉中的血栓物质,置于平皿中称其湿重。然后,于烤箱内 60 °C 烘烤 20 h,称其干重。数据用 t 检验行统计学处理。

1.8 PUW 对洗涤血小板与中性粒细胞之间黏附作用的影响

1.8.1 血小板制备 大鼠颈动脉取血,以 2.7 % EDTA 抗凝,收集于塑料离心管中,血与抗凝剂体积比为 9 : 1。室温以 1 000 r/min 离心 10 min 得富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)。PRP 以 3 000 r/min 离心 10 min 得血小板团块。用含 1 %

小牛血清蛋白及 1.4 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤血小板 3 次, 最后悬浮于上述含 1 mmol/L CaCl_2 的 PBS 中。上述试验, 血小板数控制在 10^8 cell/ml 左右, 用台盼蓝排斥试验证实其成活率 >95%。

1.8.2 中性粒细胞的制备 在上述吸出 PRP 后的抗凝血中, 加入与 PRP 等体积的生理盐水, 再加入 1/6 体积的 6% 右旋糖酐 (Dextran T 500) 混匀。37℃ 静置 30 min, 沉淀红细胞, 将上层白细胞吸出, 轻浮于 3 ml 淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min 离心 30 min, 取出底部中性粒细胞, 加入 1 ml 双蒸水溶血 30 s, 使红细胞破膜, 再加 2 倍浓度的 PBS 1 ml, 然后离心 10 min, 中性粒细胞团块用 PBS 洗 3 次, 最后悬浮于含 1 mmol/L CaCl_2 的 Hanks 液中并调数 2×10^6 cell/ml, 用台盼蓝排斥试验证实其成活率 >95%。

1.8.3 玫瑰花结试验 用改良 Hamburger 等^[5]的方法, 取 50 μl 血小板与终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AA 37℃ 温育 15 min, 然后分别加入 0.9% 生理盐水或药液各 50 μl , 继续静置 15 min, 再加入中性粒细胞悬液 100 μl , 于 4℃ 振荡 30 min。取出少许细胞悬液, 在常规计数板上于 400 倍光镜下随机计数 100 个中性粒细胞, 其周围黏附有 2 个或 2 个以上血小板者为玫瑰花结试验阳性。每样本计数 3 次, 取其均值, 并计算花结形成百分率, 以反映黏附率大小。

1.9 叶下珠有效部位对家兔 ELT 的影响^[6] 健康家兔, 雌雄各半, 随机分为生理盐水组和 10 mg/kg PUW 组, 5 只/组。自家兔颈动脉取血于硅化的离心管中, 3.8% 枸橼酸钠抗凝(血与抗凝剂体积比为 9:1), 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min 得贫血小板血浆 (platelet-poor plasma, PPP), 冰浴保存待用。静脉注射前取血 1 次, 给药后 10 min、30 min、60 min 及 120 min 各取血 1 次。

取 0.5 ml PPP 加至预先冷却并含有 9 ml 蒸馏水的锥形离心管中, 再加入 1% 乙酸溶液 0.1 ml, 充分混匀后置 4℃ 冰箱内静置 15 min, 优球蛋白呈絮状沉淀析出, 3 000 r/min 离心 5 min 以分离沉淀。弃去上清液, 保留沉淀部分, 将离心管倒置在滤纸上约 2 min, 吸尽剩余酸液, 再将离心管置 37℃ 的摇床内, 加 0.5 ml pH 9.0 的硼酸-硼砂钠缓冲液(6.7 g 硼酸 + 13.4 g 硼砂钠, 用 1 L 蒸馏水溶解) 将优球蛋白部分溶解, 并用玻棒轻搅 1 min, 使沉淀彻底溶解, 再加 25 mmol/L CaCl_2 溶液 0.5 ml 混匀(纤维蛋白凝块形成), 管内液体开始凝固。记录从凝块开始形成至凝块完全溶解的时间, 即为 ELT。

1.10 PUW 静脉注射对 PT 和 KPTT 的影响^[7,8]

家兔随机分为生理盐水组、2 万 IU/kg 尿激酶组和 10 mg/kg PUW 组, 雌雄各半, 每组 6 只, 动物均一次性静脉注射。给药前颈动脉取血 1 次, 给药后 10 min、30 min、60 min 及 120 min 各取血 1 次。同前制备 PPP。用 LBY-NJ 血液凝聚仪同体外试验测定 PT 和 KPTT。

1.11 PUW 静脉注射对大鼠尾尖出血时间的影响 雄性 SD 大鼠分为 4 组, 每组 8 只, 即 0.9% 的生理盐水组、5 mg/kg 阿司匹林组、2 万 IU/kg 尿激酶组和 10 mg/kg PUW。各组均以 2 ml/kg 静脉注射, 15 min 后, 距大鼠尾尖 0.5 cm 处横切。每 30 s 用滤纸轻擦出血处 1 次, 并记录出血时间(即从横断尾尖开始至滤纸上未见血迹的时间, 单位为 min)^[9]。

1.12 PUW 静脉注射的小鼠急性毒性 取体重 18~22 g 的 ICR 小鼠, 静脉注射前禁食 12 h, 将小鼠随机分成溶媒组(生理盐水)和按不同剂间比设置的剂量组, 每组 10 只, 雌雄各半; 静脉注射给药体积为 20 ml/kg, 于 20 s 内注毕。给药后连续观察 14 d, 记录不良反应及死亡情况。采用 Bliss 机率单位法计算半数致死量 (50% of lethal dose, LD_{50}) 及 95% 的可信区间^[10]。

2 结果

2.1 肺微循环血栓致小鼠死亡情况 5 mg/kg 的阿司匹林静脉注射使小鼠死亡率由 80% 降到 26.7%。而 2.5 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 的 PUW 明显减少动物的死亡数, 且小剂量 (5 mg/kg) 的 PUW 与等剂量的阿司匹林作用相当(见表 1)。

表 1 叶下珠有效部位静脉注射对 75 mg/kg 花生四烯酸尾静脉注射引起小鼠突然死亡的保护作用

Tab 1 Protective effect of intravenously administered PUW against mouse sudden death induced by injection of 75 mg/kg arachidonic acid in tail vein

Group	Died/Total (Cases)	Mortality(%)
Saline	12/15	80
PUW(2.5 mg/kg)	6/15	40*
PUW(5 mg/kg)	3/15	20*
PUW(10 mg/kg)	3/15	20*
Aspirin(5 mg/kg)	4/15	26.7*

* $P < 0.05$, vs saline group

2.2 大鼠颈动脉血栓形成时间的变化 PUW 2.5~10 mg/kg 静脉注射均明显缩短颈动脉闭塞时间, 且 2.5 mg/kg 的 PUW 与 5 mg/kg 的阿司匹林作用相当, 10 mg/kg PUW 的作用较阿司匹林强(见表 2)。

表 2 叶下珠有效部位静脉注射对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响

Tab 2 Effect of intravenously administered PUW on electrically stimulated carotid arterial thrombosis in rats
($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Occlusion time(min)
Saline	8	8.3 ±1.4
PUW(2.5 mg/kg)	8	27.2 ±1.7**
PUW(5 mg/kg)	8	31.2 ±2.1**
PUW(10 mg/kg)	8	36.7 ±1.9**
Aspirin(5 mg/kg)	8	27.8 ±1.6**

** P < 0.01, vs saline group; P < 0.05, vs aspirin group

2.3 下腔静脉血栓干、湿重的变化 PUW (2.5 ~ 10) mg/kg 静脉注射均减轻血栓的湿重和干重, 10 mg/kg PUW 的作用强于 5 mg/kg 的阿司匹林(见表 3)。

2.4 血小板与中性粒细胞之间黏附率的变化 PUW 和阿司匹林均显著降低黏附率, 其半数抑制浓度 (50% of inhibitory concentration, IC₅₀) 各为 39.7 mg/L 和 9.3 mg/L。

2.5 ELT 的测定 PUW 静脉注射后 10 min 即明显缩短 ELT, 于 30 min 及 60 min 达最强效应, 至 120 min 时无明显作用(见表 4)。

表 3 叶下珠有效部位静脉注射对大鼠下腔静脉血栓形成的影响

Tab 3 Effect of intravenously administered PUW on rat inferior vena cava thrombosis

Group	n	Thrombus weight (mg)			
		Wet weight	Inhibition (%)	Dried weight	Inhibition (%)
Saline	8	10.3 ±1.8		3.8 ±0.7	
PUW(2.5 mg/kg)	8	6.0 ±1.1*	39.4	2.8 ±0.6*	31.7
PUW(5 mg/kg)	8	5.2 ±0.9**	44.4	2.2 ±0.7**	46.3
PUW(10 mg/kg)	8	3.7 ±1.0**	62.6	1.7 ±0.6**	58.5
Aspirin(5 mg/kg)	8	6.1 ±1.3**	38.4	2.9 ±0.5**	29.3

* P < 0.05, ** P < 0.01, vs saline group; P < 0.05 vs aspirin group

表 4 10 mg/kg 的叶下珠有效部位静脉注射对家兔优球蛋白溶解时间的影响

Tab 4 Effect of intravenously administered 10 mg/kg PUW on ELT in rabbits

Group	n	ELT (min)				
		0 min	10 min	30 min	60 min	120 min
Saline	5	141.3 ±4.1	139.5 ±3.8	149.4 ±7.4	149.4 ±9.4	143.9 ±8.2
PUW (10mg/kg)	5	145.9 ±13.5	125.9 ±13.5*	112.7 ±12.6**	111.4 ±17.1**	134.8 ±6.9

* P < 0.05, ** P < 0.01, vs saline group

2.6 PT 和 KPTT 的检测 PUW 和尿激酶静脉注射后对 PT 均无明显影响; 对 KPTT 的影响表现为, PUW 注射后 10 min 无明显影响, 给药后 30 ~ 120 min 均明显延长, 于 60 min 达最大延长效应; 尿激酶有延长 KPTT 的趋势, 但无统计学意义(见表 5、表 6)。

2.7 大鼠尾尖出血时间的测定 PUW、阿司匹林

及尿激酶均明显延长出血时间; 与尿激酶或阿司匹林组比较, PUW 组的出血时间均显著缩短 (P < 0.05) (见表 7)。

2.8 急性毒性试验 PUW 静脉注射给药的 LD₅₀ 及 95% 可信度的可信区间为 259.6 (222.4, 303.1) mg/kg。

表 5 10 mg/kg 叶下珠有效部位静脉注射对家兔血浆 PT 的影响

Tab 5 Effect of intravenously administered 10 mg/kg PUW on PT in rabbits

Group	n	PT (s)				
		0 min	10 min	30 min	60 min	120 min
Saline	6	13.7 ±2.5	12.8 ±1.6	14.3 ±2.4	11.6 ±2.7	12.4 ±2.7
Urokinase (20 000 IU/kg)	6	12.4 ±2.1	13.8 ±1.9	14.6 ±2.3	13.8 ±3.1	13.6 ±1.3
PUW (10 mg/kg)	6	13.4 ±2.2	13.6 ±2.6	13.1 ±1.6	12.4 ±2.7	13.4 ±3.6

表 6 10 mg/kg 叶下珠有效部位静脉注射对家兔血浆 KPTT 的影响
Tab 6 Effect of intravenously administered 10 mg/kg PUW on KPTT in rabbits

Group	n	KPTT (s)				
		0 min	10 min	30 min	60 min	120 min
Saline	6	33.8 ±3.5	37.6 ±4.3	36.1 ±3.7	34.2 ±4.1	41.5 ±5.4
Urokinase(20 000 IU/kg)	6	32.8 ±3.4	35.5 ±6.2	41.8 ±3.1	38.6 ±4.3	34.7 ±2.8
PUW(10 mg/kg)	6	35.7 ±4.4	43.1 ±5.4	50.1 ±7.8**	85.1 ±10.9**	57.5 ±9.4**

** P < 0.01, vs saline group

表 7 叶下珠有效部位静脉注射对大鼠尾尖出血时间的影响

Tab 7 Effect of intravenously administered PUW on bleeding time of rat tail tip

Group	n	Bleeding time (min)
Saline	8	16.4 ±3.1
PUW (10 mg/kg)	8	19.8 ±3.6*
Urokinase (20 000 IU/kg)	8	30.2 ±4.2**
Aspirin (5 mg/kg)	8	26.1 ±3.8**

* P < 0.05, ** P < 0.01, vs saline group; P < 0.05 vs urokinase group and aspirin group

3 讨论

本研究采用多种体内血栓形成模型,综合评价了静脉注射 PUW 的抗血栓作用,并探讨其细胞分子生物学的作用机制,同时评价 PUW 对凝血系统的影响。

本实验选用尾静脉注射 AA 形成微血栓模型,便于观察药物对清醒动物体内血小板性血栓形成的防治作用。AA 注入体内后主要通过其代谢产物血栓素 (thromboxane A₂, TXA₂) 引起微循环内 (尤其是肺微循环) 的血小板活化和血管收缩,形成广泛的血小板性微血栓,致使动物因呼吸衰竭而死亡^[11]。PUW 静脉注射能明显减少动物死亡数,并具有剂量-效应相关性,表明 PUW 具有良好的防止血栓形成的作用。我们在前期研究中发现,PUW 无论在体外还是在体内均无明显的抗血小板作用,提示 PUW 不是通过抑制血小板聚集功能而可能由其它途径来发挥抗血栓作用的。AA 可活化血小板,进而促进该细胞与中性粒细胞之间发生黏附反应,PUW 呈浓度依赖性阻抑这两种细胞之间的黏附反应,揭示 PUW 抑制 AA 引起的细胞间黏附作用与其减少 AA 致小鼠的死亡数密切相关。阿司匹林属环氧酶抑制剂,对 AA 诱导的血小板聚集功能具有抑制作用,与文献报道一致^[12]; PUW 可以不通过抑制血小板聚集功能而表现出显著抗血栓作用,其机制可能有别于阿司匹林。

电刺激大鼠颈动脉形成的血栓与人体动脉血栓相似,其机制主要是损伤血管内皮,激活血流中的中性粒细胞和血小板,并促进这两种细胞间的粘附作用。采用超声血流量仪替代点式温度计来判断血管闭塞时间,则排除了室温的影响,其结果更精确可靠。PUW 静脉注射能明显延长电刺激大鼠颈动脉的血管闭塞时间,且具有较好的量效关系,提示 PUW 对电刺激大鼠颈动脉血栓形成及血管闭塞具有明显的抑制作用,同时提示 PUW 抑制细胞间黏附反应是其抗动脉血栓的机制之一。

结扎大鼠下腔静脉,因缺血缺氧而活化中性粒细胞和血小板,同时激活凝血系统,而纤溶活性相对减弱^[4]。PUW 静脉注射明显减轻下腔静脉血栓的干、湿重,表明 PUW 具有阻止静脉血栓作用。我们推测,PUW 可能通过提高纤溶活性、缩短优球蛋白溶解时间、降低凝血活力而发挥抗静脉血栓作用。

PUW 明显缩短优球蛋白溶解时间、延迟抗凝血浆的凝固,提示 PUW 促进纤维蛋白溶解酶原转化为纤溶酶,从而加快纤维蛋白(原)的降解溶解,有助于防止血栓的进一步形成和延展。

PT 主要用于检测机体的外源性凝血系统,它的延长或缩短分别反映凝血因子、(凝血酶原)和(纤维蛋白原)的血浆水平减低或增高^[13];另一方面,KPTT 则检测机体的内源性凝血系统状态,它的延长或缩短分别反映凝血因子、前激肽释放酶、和的血浆水平减低或增高^[14]。PUW 对 PT 无明显影响,但明显延长 KPTT,提示 PUW 增强了机体的纤溶活性。

上述实验结果提示缩短 ELT 和延长 KPTT 可能是其具有较强溶栓作用的机制之一。KPTT 延长又提示机体具有出血倾向。临床上,应用溶栓药或抗凝药物时,一般使 KPTT 较正常对照延长 1.5 ~ 2.5 倍,这既可取得最佳疗效,又无严重出血问题^[15]。PUW 静脉注射后 30 ~ 90 min 内均明显延长 KPTT,但仍只为给药前的 2 倍左右,虽延长大鼠尾尖出血时间,但与阿司匹林或尿激酶比较,出血时间显著缩短。

(下转第 122 页)

CCRPs 的促进作用, 则细胞增生。

本研究发现, TNF- 刺激的 MC 中 p27 水平明显下降, 大黄素提高 TNF- 刺激的 MC 中 p27 水平, 随着大黄素剂量的增加, 其提高 p27 水平的作用愈强, 这些结果提示大黄素可提高 TNF- 刺激的 MC 中 p27 水平, 而 p27 水平的上升抑制了 G₁/S 的转换, 从而抑制 MC 的增生。Terada 等^[10]证实舒降之 (lovastatin) 通过提高 p27 蛋白水平抑制 MC 的增生, 该结果支持大黄素可能通过提高 p27 水平抑制 TNF- 刺激的 MC 增生。目前不清楚大黄素提高 MC 中 p27 水平的机制。有报道认为大黄素阻滞钙通道, 使钙内流受阻, 影响 CCRPs 的表达或降解^[11, 12], 从而可能引起 p27 水平的下降。

总之, 大黄素可使 TNF- 刺激的 MC [³H] TdR 掺入减少及 p27 水平升高, 随着大黄素剂量的增加, 其上述作用愈强, 提示 p27 水平上升可能在大黄素抑制 TNF- 诱导的 MC 增生中起重要作用。

[参考文献]

- 1 刘志红, 黎磊石. 大黄素对肾小球系膜细胞 PCNA 的影响[J]. 细胞生物学杂志, 1993, 15(4): 174-176.
- 2 戴春笋, 刘志红, 陈惠萍, 等. 大黄素与雷公藤酯醇联合治疗大鼠抗肾小球基底膜肾炎的试验研究[J]. 肾脏病透析与移植杂志, 2000, 9(2): 117-123.

(上接第 110 页)

因此, PUW 有引起出血的倾向, 但不会像阿司匹林或尿激酶等抗栓药造成严重的出血反应。

综上所述, PUW 作为一种植物来源的有效部位, 具有明显的抗血栓形成作用, 其抗栓作用与阻抑血小板与中性粒细胞间的黏附反应密切相关; 同时出血不良反应及毒性较轻。本研究为进一步研发 PUW 提供了实验依据。

[参考文献]

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977. 1496-1497.
- 2 Myers AK, Forman G, Torres Duarte AP, et al. Comparison of verapamil and nifedipine in thrombosis models[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1986, 183(1): 86-91.
- 3 Charlton PA, Faint RW, Bent F, et al. Evaluation of a low molecular weight modulator of human plasminogen activator inhibitor-1 activity[J]. Thromb Haemost, 1996, 75(5): 808-815.
- 4 Chen CX, Jin RM, Li YK, et al. Inhibitory effect of rhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1992, 13(2): 126-130.
- 5 Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils[J]. Blood, 1990, 75(3): 550-554.

- 3 刘冠贤, 叶任高, 谭志明, 等. 大黄素对狼疮性肾炎成纤维细胞生物学行为的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(3): 196-198.
- 4 王晓玲, 王俭勤, 夏延龄, 等. 大黄素对人肾成纤维细胞抑制作用的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2002, 3(11): 629-631.
- 5 Shankland SJ. Cell-cycle control and renal disease[J]. Kidney Int, 1997, 52(2): 294-308.
- 6 梅小斌, 崔若兰, 高从容, 等. Thyl 肾炎大鼠肾小球周期素激酶抑制剂 p27 的变化[J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17(5): 335-336.
- 7 梅小斌, 崔若兰, 高从容, 等. 周期素激酶抑制剂 p27 在肿瘤坏死因子- 诱导系膜细胞增生中的作用[J]. 中华内科杂志, 2002, 41(9): 599-601.
- 8 Shankland SJ, Pippin J, Flanagan M, et al. Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27^{Kip1} [J]. Kidney Int, 1997, 51(4): 1088-1099.
- 9 谌贻璞, 高进, 邢宝才, 等. 肾小球系膜细胞培养[J]. 北京医科大学学报, 1989, 21(4): 335-336.
- 10 Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, et al. Lovastatin inhibits mesangial cell proliferation via p27 [J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9(12): 2235-2243.
- 11 林秀珍, 马德禄, 崔荣芬, 等. 大黄素、番泻甙及大黄多糖对培养大鼠肝细胞内游离钙浓度的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(7): 419-421.
- 12 Short AD, Bian J, Ghosh TK, et al. Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(11): 4986-4990.

[收稿日期] 2004-01-16 [本文编辑] 周庆辉

- 6 Kowalski E. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis[J]. J Clin Pathol, 1959, 12(3): 215-218.
- 7 黄正良, 崔祝梅. 红花黄色素的抗凝血作用研究[J]. 中草药, 1987, 18(4): 22-25.
- 8 杨胜荣, 王林, 杨万松, 等. 重组葡激酶溶栓活性的实验研究[J]. 中国心血管杂志, 2001, 6(2): 75-77.
- 9 Kawasaki T, Katoh M, Kaku S, et al. Thrombolysis with intracoronary administration of YM866, a novel modified tissue-type plasminogen activator, in a canine model of coronary artery thrombosis[J]. Jpn J Pharmacol, 1993, 63(7): 319-325.
- 10 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 198-199.
- 11 Ogletree ML. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A₂ [J]. Fed Proc, 1987, 46(1): 133-138.
- 12 Shen ZQ, Li L, Wu LO, et al. Effects of copper-aspirin complex on plasma 6-keto-prostaglandin F₁ level and platelet cytosolic calcium in rabbits [J]. Platelets, 1999, 10(5): 345-348.
- 13 王鸿利. 防栓和溶栓治疗实验室监测的参考意见[J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(9): 498-499.
- 14 王鸿利. 凝血因子检测[A]. 见: 王鸿利, 包承鑫, 阮长耿. 血栓与止血检验技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 57-95.
- 15 汪钟, 郑中基. 现代血栓病学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 461-462.

[收稿日期] 2003-09-09 [本文编辑] 白玉金