

异亚丙基莽草酸抗血栓作用的实验研究

王宏涛*, 靳洪涛, 孙建宁, 徐秋萍, 郭亚建

(北京中医药大学中药学院药理教研室, 北京 100102)

摘要: 目的 研究异亚丙基莽草酸(ISA)对大鼠动静脉环路血栓、大脑中动脉栓塞及血小板聚集的对抗作用及机制。方法 用动静脉环路血栓及三氯化铁致大鼠中动脉栓塞(MCAT)模型观察药物作用;并研究了ISA体内、外给药对血小板聚集的影响。结果 ISA 25, 50, 100 及 200 mg·kg⁻¹ ig 均可显著降低大鼠体外血栓重量;ISA 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ ig 可明显改善 MCAT 模型大鼠神经症状;ISA 100 及 200 mg·kg⁻¹ ig MCAT 模型大鼠脑梗塞范围分别下降 27.8% 和 31.6%;另外,ISA 体内、外给药对 ADP 和胶原诱导的血小板聚集有明显的抑制作用。结论 ISA 可能通过抗血小板聚集作用抑制血栓的形成。

关键词: 异亚丙基莽草酸; 血栓; 大脑中动脉; 脑缺血; 脑梗死; 血小板聚集

中图分类号: R965; R972.7 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)04 - 0245 - 04

莽草酸是从中药木兰科植物八角茴香(*Illicium verum* Hook. fil.)中提取的有效成分,我室最早发现其有抗血栓和减轻局灶性脑缺血损伤的作用^[1,2]。但由于其极性大口服不易吸收,相继合成其衍生物三乙酰莽草酸^[3]和异亚丙基莽草酸(3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid, ISA, 图1)。三乙酰莽草酸常温下为胶冻状,难溶于水;而异亚丙基莽草酸为无色片状结晶,水溶性较好,比三乙酰莽草酸更便于制剂应用。经过前期对比研究发现,两化合物抗血栓作用无明显差异。因此,本实验着重研究 ISA 对大鼠动静脉环路血栓、局灶性脑栓塞后脑梗死范围及正常大鼠和家兔血小板聚集的影响,观察 ISA 抗血栓作用及可能的机制。

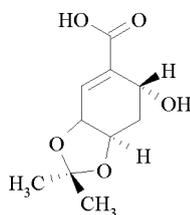


Figure 1 Chemical structure of ISA

材料与 方法

动物 体重 190 ~ 210 g, ♂, Wistar 大鼠,由中国

医学科学院动物中心提供;体重 2 ~ 3 kg, ♂, 大耳白兔,由北京海淀通利实验动物养殖场提供。

药品与试剂 异亚丙基莽草酸(ISA, 纯度 > 98%), 无色片状结晶,由北京中医药大学植化教研室郭亚建教授提供。阿斯匹林片(acetyl salicylic acid, ASA), 无锡 Astra 公司产品;尼莫地平(Nim)片剂,天津中央制药厂生产;乙酰水杨酸(化学纯),天津南开化工厂提供;FeCl₃ 及红四氮唑(TTC),北京化工厂产品;肝素、ADP 为 Sigma 产品;胶原,本室自制。

实验仪器 XTT 实体显微镜,云南光学仪器厂; AEG 220 电子分析天平,日本 Shimadzu 公司;低温离心机(400R),德国 Heraeus 公司;LG PAPER-1 血小板聚集及血凝测试仪,北京世帝科学仪器公司。

动静脉环路血栓 正常大鼠按表 1 随机分组, ig ISA, ASA 及对照组(等体积蒸馏水), qd, 连续给药 3 d。末次给药后 1 h ip 10% 水合氯醛 3.2 mL·kg⁻¹ 麻醉,仰卧位固定,分离右侧颈总动脉和左侧颈外静脉。在 10 cm 长的聚乙烯管中段放入一根提前称重的 7 号手术线(长约 8 cm)并充满生理盐水,其两端连接充满肝素的插管(长约 3 cm),一端插入颈静脉,另一端插入颈总动脉。打开动脉夹后,形成体外环路血流。15 min 后中断血流,迅速取出血栓称重,该重量减去丝线重量即得血栓湿重;血栓 60 °C 干燥 45 min,称重,该重量减去丝线重量即得血栓干重,并计算血栓抑制率。

大脑中动脉血栓模型的制备 大鼠随机分为 6 组,(1)假手术组;(2)MCAT 组;(3)ISA 50 mg·kg⁻¹

收稿日期: 2001-08-01

基金项目: 国家中医药管理局“十五”攻关项目(2001 BA701 A07 - 14)。

作者简介: 王宏涛(1972 -),男,博士。

* Tel: (010) 64711199 - 6084, E-mail: wht72@263.net

组;(4) ISA 100 mg·kg⁻¹组;(5) ISA 200 mg·kg⁻¹组;(6) NIM 5 mg·kg⁻¹组。3~6组大鼠 ip 10%水合氯醛溶液 0.4 mL·kg⁻¹麻醉。按 Tamura 等^[4]的方法,暴露大脑中动脉,将吸有 50%氯化铁溶液 10 μL 的小片定量滤纸敷在此段大脑中动脉上,30 min 后取下,缝合,回笼饲养。假手术组,除不滴加氯化铁溶液外,其余手术步骤同模型组。造模后立即 ig 1 次,60 min 后再给药 1 次。

大脑中动脉血栓模型大鼠行为检测 在术后不同时间(6,24 h),按 Bederson 等^[5]的方法,对动物进行行为评分,满分为 4 分,分数越高,动物的行为障碍越严重。

大脑中动脉血栓模型大鼠脑梗塞范围测定 动物经末次行为评分后,断头取脑。取手术侧(右侧)半脑,在 4℃下冠状切成 5 片。迅速将脑片置于 TTC 染液中(每 5 mL 染液中含 4% TTC 1.5 mL, 1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ 0.1 mL),37℃避光温孵 30 min 后置于 10%甲醛中避光保存。经染色后非缺血区为玫瑰红色,梗塞区为白色^[6]。将白色组织仔细挖下称重,以梗死组织重量占半脑重量的百分比作为脑梗塞范围。

体内给药血小板最大聚集率测定 大鼠随机分为 5 组,即对照组、ISA 50,100,200 mg·kg⁻¹和 ASA 50 mg·kg⁻¹组,ig 给药,qd,连续 3 d。对照组 ig 等体积蒸馏水。末次给药后 1.5 h 颈总动脉取血,3.8%枸橼酸钠抗凝(1:9),800 r·min⁻¹离心 8 min,分离(富血小板血浆)PRP,2 500 r·min⁻¹离心 15 min,分离贫血小板血浆(PPP),用 PPP 调 PRP 血小板浓度为(6~8)×10⁸·L⁻¹。取 300 μL PRP,加入诱导剂 ADP 4 μL(终浓度为 4 μmol·L⁻¹)或胶原 7.5 μL,按 Born 比浊法测定血小板最大聚集率。

体外给药血小板最大聚集率测定 按表 4 分组给药,即蒸馏水对照组,ASA 组(溶于 4%乙醇),4%乙醇组,给药组(药物溶于蒸馏水中,加入 PRP 后药物终浓度为 10⁻³~10⁻⁷ mol·L⁻¹)。兔麻醉取血同法制备 PRP(血小板浓度约为 4×10⁸·L⁻¹)。取 PRP 300 μL,加入药物 10 μL,37℃温育 10 min,加入诱导剂 ADP 5 μL 或胶原 7.5 mL,测定最大聚集率。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验判断差异的显著性。

结 果

1 ISA 对大鼠动静脉环路血栓形成的影响

大鼠动静脉短路后形成血栓,表 1 结果显示,ASA 50 mg·kg⁻¹和 ISA 25,50,100 及 200 mg·kg⁻¹给药 3 d 均可减轻大鼠体外血栓湿重和干重,且有剂量依赖关系。

Table 1 Effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid (ISA) given ig on thrombus formation in the arteriovenous shunt model in rats

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	Thrombus wet weight /mg	Percent inhibition / %	Thrombus dry weight /mg	Percent inhibition / %
Control	-	183 ± 53		42 ± 12	
ISA	200	107 ± 17 ^{**}	41.4	25 ± 4 ^{**}	40.2
	100	119 ± 23 ^{**}	34.9	28 ± 5 ^{**}	34.3
	50	130 ± 48 [*]	29.0	29 ± 12 [*]	30.7
	25	136 ± 39 [*]	25.5	32 ± 9 [*]	25.5
	12.5	144 ± 35	21.1	33 ± 8	21.0
ASA	50	128 ± 33 ^{**}	29.8	29 ± 8 ^{**}	31.0

ISA, at the dose of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg·kg⁻¹, ig, was administered for 3 d, qd. The control and ASA group were given, ig, distilled water and ASA 50 mg·kg⁻¹ respectively. The weight of arteriovenous shunt thrombus in rats was quantified. *n* = 10~12, $\bar{x} \pm s$. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control group

2 ISA 对大脑中动脉血栓模型大鼠行为的影响

大鼠大脑中动脉被阻塞后,由于缺血缺氧局部脑组织,神经受到严重损伤,手术对侧肢体出现了明显的行为学障碍。表 2 显示,模型组与假手术组比较行为学评分明显升高,而 ISA 50,100 及 200 mg·kg⁻¹和尼莫地平 5 mg·kg⁻¹对模型大鼠的行为障碍在手术后 6 h 和 24 h 均表现出明显的改善作用。

Table 2 Effect of ISA on neurologic deficits in rats after middle cerebral artery thrombosis (MCAT)

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	Neurologic score	
		6 h	24 h
Sham	-	0	0
Vehicle	-	3.5 ± 0.7 ^{△△}	3.1 ± 0.7 ^{△△}
ISA	200	1.8 ± 0.8 ^{**}	1.4 ± 0.5 ^{**}
	100	1.9 ± 0.7 ^{**}	1.6 ± 0.5 ^{**}
	50	2.4 ± 0.7 ^{**}	2.2 ± 0.8 [*]
NIM	5	2.6 ± 0.7 ^{**}	1.6 ± 0.6 ^{**}

ISA, at the dose of 50, 100 and 200 mg·kg⁻¹, ig, was administered for the first time instantly after MCAT, and in an hour for the second time. At the same time, the control and vehicle group were given, ig, distilled water. NIM, at the dose of 5 mg·kg⁻¹, ig, was given. The neurologic score of rats was measured at 6 h and 24 h after operation. *n* = 10~12, $\bar{x} \pm s$. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs vehicle group; △△ *P* < 0.01 vs sham group

3 ISA 对大脑中动脉血栓模型大鼠脑梗死范围的影响

大鼠大脑中动脉梗塞 24 h 后模型组出现了明显的梗死灶,假手术组无任何改变。ISA 100, 200 mg·kg⁻¹ 和尼莫地平 5 mg·kg⁻¹ 治疗组均可减小模型大鼠脑梗塞范围,表明 ISA 有一定的脑缺血保护作用。

4 ISA 体内给药对 ADP 和胶原诱导的大鼠血小板聚集的影响

大鼠连续 ig 3 d 后,血浆中加入 ADP 4 μL 和胶原 7.5 μL 诱导血小板聚集。结果表明 ISA 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ 和 ASA 50 mg·kg⁻¹ 对胶原诱导的血小板聚集抑制率分别为 14.9%, 30.8%, 48.4% 和 58.5%, 对 ADP 诱导的血小板聚集抑制率分别为 23.5%, 27%, 43.3% 和 28%, 显示有明显的剂量依赖性。

5 ISA 体外给药对 ADP 和胶原诱导的家兔血小板的聚集的影响

分离兔血小板,体外给药,观察药物对血小板聚集的影响。表 3 中溶剂组与对照组比较无显著差异,ISA 10⁻³ ~ 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 可明显降低 ADP 和胶原诱导的血小板最大聚集率,ISA 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 对胶原诱导的血小板聚集仍有明显的抑制作用。

Table 3 Effect of ISA on rabbit platelet aggregation *in vitro*

Group	Concentration / mol·L ⁻¹	ADP		Collagen	
		Maximum aggregation rate/ %	Percent inhibition / %	Maximum aggregation rate/ %	Percent inhibition / %
Control	-	63 ± 19	-	69 ± 16	-
Vehicle	4% alcohol	60 ± 20	-	60 ± 20	-
ISA	10 ⁻³	37 ± 21 ^{**}	41.5	32 ± 18 ^{**}	53.7
	10 ⁻⁴	44 ± 16 ^{**}	29.4	39 ± 18 ^{**}	43.6
	10 ⁻⁵	47 ± 19 [*]	24.4	48 ± 21 ^{**}	30.8
	10 ⁻⁶	50 ± 22	20.9	48 ± 19 ^{**}	30.1
	10 ⁻⁷	56 ± 22	10.1	56 ± 18	18.8
ASA	10 ⁻⁴	44 ± 19 ^Δ	27.1	42 ± 20 ^{ΔΔ}	38.3

ISA, was added to platelet rich plasma (PRP) at the concentration of 10⁻³ ~ 10⁻⁵ mol·L⁻¹, to determine the maximum aggregation rate of rabbit platelet. Distilled water was added to control group. The vehicle and ASA group were added 4% alcohol and ASA 50 mg·kg⁻¹, respectively. n = 12, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group; Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01 vs vehicle group

讨 论

动静脉旁路血栓类似于动脉中的白色血栓,能反映整体动脉血流中血小板的粘附聚集功能。有文献认为,除血液速度和血液粘度外,药物抑制此类血栓形成主要与抑制血小板粘附和聚集功能有关^[7]。

大脑中动脉血栓模型(MCAT)是在 Trauma 等^[4]建立的大脑中动脉阻断模型(MCAO)基础上改进而成,其神经症状、脑梗死范围等指标与大脑中动脉阻断模型基本接近。用三氯化铁诱导大脑中动脉血栓形成,三氯化铁损伤局部大脑中动脉血管内皮,进而激活血小板,导致局部血栓形成,最终大脑中动脉供血区出现梗塞。脑缺血后血小板激活,血小板在局部粘附聚集,导致脑组织局部微循环障碍加重,脑缺血更加严重。该过程中,血小板的激活也是关键环节之一。

因此,我们观察了药物对血小板聚集的影响,发现该药物对大鼠血小板聚集有较强的抑制作用,且呈剂量依赖关系。这可能是异亚丙基莽草酸抗血栓作用的主要机理之一。

血小板聚集在止血与血栓形成中具有关键作用,二磷酸腺苷(ADP)和胶原是人们发现较早,也是体内非常重要的血小板聚集诱导物质。研究认为^[8]血小板表面可能存在着两类 ADP 受体,一类受体与血小板变形以及 Ca²⁺ 离子通道有关;另一类与 G 蛋白(主要是 Gi 蛋白)偶联,影响细胞内信号传递,从而降低细胞内 cAMP 水平,促进致密管道系统 Ca²⁺ 进入胞浆和 Gp IIb ~ IIIa 复合物纤维蛋白原受体的暴露,最终导致血小板聚集。胶原诱导血小板聚集也依赖于血小板表面的胶原受体,但它激活血小板聚集是主要依赖血小板激活因子(PAF)途径实现的^[9]。黄丰阳等^[3]的研究发现三乙酰莽草酸对血小板的作用可能与其提高血小板内 cAMP 水平有关,异亚丙基莽草酸与其母核相同,因此推测异亚丙基莽草酸抗血小板的机制也可能与 G 蛋白偶联下的 cAMP 水平降低有关,这是我们需要更进一步明确的。

REFERENCES:

- [1] Ma Yi, Sun JN, Xun QP. Inhibitory effects of shikimic acid on platelet aggregation and coagulation [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(1): 1 - 3.
- [2] Ma Yi, Xun QP, Sun JN, et al. Antagonistic effects of shikimic acid against focal cerebral ischemia injury in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20(8): 701 - 704.
- [3] Huang FY, Xu QP, Sun JN, et al. Inhibitory effects of triacetylshikimic acid on platelet aggregation [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(5): 345 - 348.
- [4] Tamura A, Graham DI, McCullough J, et al. Focal cerebral ischemia in rats. 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral

- artery occlusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, **1** (1): 53 - 60.
- [5] Bederson JB, Pittis LH, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the mode and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, **17**(3): 472 - 476.
- [6] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, *et al.* Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1986, **17**(6): 1304 - 1308.
- [7] Christian G, Beatrice H, Catherine L, *et al.* Activation of ADP receptors and platelet function [J]. *Thromb Haemost*, 1997, **78**(1): 271 - 275.
- [8] Vargafting BB, Chignard M, Benveniste J. Present concept on the mechanism of platelet aggregation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1981, **30**(4): 263 - 271.
- [9] Umetsu T. Effect of 1-methyl-2-mercapto-5-(3-pyridyl)-imidazole (Kc-6141) anti-aggregating compound, on experimental thrombosis in rats [J]. *Thromb Haemost*, 1978, **39**(1): 74 - 80.

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE ANTI-THROMBOSIS EFFECT OF 3,4-OXO-ISOPROPYLIDENE-SHIKIMIC ACID

WANG Hong-tao, JIN Hong-tao, SUN Jiarr-ning, XU Qiu-ping, GUO Ya-jian

(Department of Pharmacology, College of Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid (ISA) against arteriovenous shunt and middle cerebral artery thrombosis (MCAT) in rats. **METHODS** Arteriovenous shunt model was adopted to measure thrombus weight; The neurologic deficit (ND) and the infarct size (IS) of the middle cerebral thrombosis (MCAT) model induced by FeCl₃ were observed; The effect of ISA on platelet aggregation rate of rat and rabbit by giving ISA *in vivo* and *in vitro* was studied. **RESULTS** ISA 25, 50, 100 and 200 mg•kg⁻¹ ig was shown to reduced the weight of thrombus in arteriovenous shunt model; ISA 50, 100 and 200 mg•kg⁻¹ ig for 2 times in 24 hours, attenuated the ND of rats subjected to MCAT; ISA 100 and 200 mg•kg⁻¹ reduced IS of rats after MCAT by 27.8% and 31.6%, respectively; ISA 50, 100 and 200 mg•kg⁻¹ ig inhibited platelet aggregation of normal rats; ISA 10⁻³ ~ 10⁻⁵ mol•L⁻¹, inhibited rabbit platelet aggregation *in vitro*. **CONCLUSION** ISA inhibited thrombosis by anti-platelet aggregation.

KEY WORDS: 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid; thrombosis; cerebral artery; cerebral ischemia; cerebral infarction; platelet aggregation