

三七叶甙对兔血小板聚集功能的影响*

陈鹏¹, 胡晓立², 雷伟亚¹, 沈志强¹

(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. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650022)

摘要:应用 Born 氏比浊法分别测定三七叶甙(*Panax notoginseng* folium saponins)对花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)和腺苷二磷酸(adenosine diphosphate, ADP)诱导的兔血小板聚集功能的影响。实验结果表明:三七叶甙在体外显著抑制 ADP 诱导的血小板聚集,其半数抑制浓度(medium inhibitory concentration, IC₅₀)为 89.4 mg/L;三七叶甙静脉注射也能明显降低 ADP 诱导的兔血小板聚集率,且呈剂量-效应关系。提示三七叶甙体内外均明显抑制 ADP 诱导的兔血小板聚集,而对 AA 和 PAF 诱导的兔血小板聚集无明显影响。

关键词:三七叶甙;花生四烯酸;腺苷二磷酸;血小板活化因子;血小板;聚集

中图分类号:R 963 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2005)01-0082-04

三七(*Panax notoginseng*)是云南名贵中药,现从三七各部位分离得到 18 种 Dammarane 皂甙,这些皂甙可分为人参皂甙(ginsenoside) Rg, Rb, Ro 3 种类型^[1]。三七叶中以 Rb 型皂甙较多, Rg 型皂甙含量极少,经研究发现,三七叶甙具有镇静、镇痛及加速运动性疲劳的消除等作用。临床已用于治疗神经衰弱及偏头痛^[2]。

血小板活化聚集与血栓形成、动脉粥样硬化及其并发症的发生发展密切相关^[3],本实验探讨三七叶甙对血小板聚集功能的影响,以期为其临床应用范围的扩大提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康家兔,体重 2.0~3.0 kg,雌雄各半;由昆明医学院实验动物中心提供(合格证号:滇实动证字 2002082 号)。

1.2 药物与试剂 三七叶甙由云南省药物研究所提供,用前溶于生理盐水中(pH 7.0)。阿司匹林(aspirin, Asp)结晶, Sigma 公司产品,临用前溶于 100 mmol/L 的 Na₂CO₃ 中,以 HCl 调 pH 值至 7.0。

1.3 仪器 四道血液凝聚仪(LBY-NJ2 型,北京

普利生科贸集团)。

2 方法

2.1 富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)和贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)的制备^[4,5] 自家兔颈动脉取血,以 3.8%柠檬酸钠抗凝(V(血):V(抗凝剂)=9:1),收集于塑料离心管中,以 1 000 r/min 离心 9 min,取上层液即为 PRP,剩余血液继以 2 500 r/min 离心 10 min 取上层液得 PPP。实验过程中,PRP 中的血小板数应控制在约 5×10⁸ mL⁻¹。

2.2 血小板聚集体外试验^[4,5] 按 Born 比浊法进行血小板聚集性测定,用 PPP 300 μL 调零,于比浊管中加入 PRP 300 μL,不同浓度三七叶甙及阿司匹林药液各 10 μL,37℃ 温孵 5 min 后,分别加入 3 种诱导剂(AA 终浓度 0.35 mmol/L, ADP 终浓度 3 μmol/L, PAF 终浓度 7.2 nmol/L),并记录 300 s 内最大聚集率。血小板聚集抑制率按下式计算:抑制率(%)=[(1-给药管聚集率/对照管聚集率)]×100。

2.3 血小板聚集体内试验^[4,5] 健康家兔 30 只,

* 收稿日期:2004-07-20

基金项目:云南省天然药物药理重点实验室开放课题(98KZ02)。

作者简介:陈鹏(1974-),男,讲师,硕士,主要从事天然药物方面的研究。

沈志强(1962-),男,教授,博士。E-mail:szq21cn@hotmail.com。

随机分为 5 组,每组 6 只. A 组:等体积生理盐水;B 组:10 mg/kg 阿司匹林作为阳性对照;C~E 组:50,100 和 200 mg/kg 三七叶甙组. 给药前取血 1 次,然后按上述分组分别由兔耳缘静脉给药后,分别于 0.5,1,2 和 3 h 取血. PRP 和 PPP 制备及血小板聚集性测定同体外试验.

3 结 果

3.1 三七叶甙在体外对血小板聚集的影响 AA, ADP 和 PAF 在生理盐水组诱导的兔血小板 (PRP) 聚集率 (%) 分别为 72.3 ± 9.2, 69.4 ± 6.0 和 70.8 ± 4.6;三七叶甙对 ADP 诱导的兔血小板 (PRP) 聚集呈浓度依赖性抑制作用,其 IC₅₀ 为 89.4 mg/L,

但对 AA 和 PAF 诱导的兔血小板 (PRP) 聚集无明显抑制作用;阿司匹林体外只抑制 AA 诱导的兔血小板 (PRP) 聚集(表 1).

3.2 三七叶甙静脉注射对兔血小板聚集功能的影响 给药前,AA,ADP 和 PAF 诱导的兔血小板聚集率 (%) 分别为 71.5 ± 6.7,60.2 ± 5.5,69.1 ± 8.3.50,100,200 mg/kg 的三七叶甙于 i. v. 后 0.5 h 即明显抑制 ADP 诱导的兔血小板聚集,1 h 时抑制作用最为显著,药效至少可持续 3 h,但对 AA 和 PAF 诱导的兔血小板聚集无明显抑制作用;阿司匹林在体内同样明显抑制 AA 诱导的兔血小板聚集,但对 ADP 和 PAF 诱导的兔血小板聚集无抑制作用(表 2~4).

表 1 三七叶甙体外对 AA,ADP 和 PAF 诱导的兔血小板聚集功能的影响

Tab. 1 Effects of *notoginseng* folium saponins on rabbit platelet aggregation induced by AA,ADP and PAF

药物 / (mg L ⁻¹)	血小板聚集抑制率/ %			
	AA	ADP	PAF	
三七叶甙	20	1.2 ± 1.3	12.5 ± 3.9	0.9 ± 1.0
	40	2.6 ± 1.9	26.4 ± 2.8 *	1.3 ± 1.1
	80	3.1 ± 1.7	40.4 ± 6.3 **	1.8 ± 0.7
	160	5.4 ± 2.8	81.2 ± 5.4 **	1.9 ± 0.9
	320	8.3 ± 2.5	91.2 ± 3.6 **	2.1 ± 0.8
Asp	7.5	60.1 ± 7.9 **	1.2 ± 0.9	1.5 ± 1.0
	15	74.2 ± 8.8 **	1.6 ± 1.1	1.8 ± 1.2
	30	94.8 ± 5.9 **	1.9 ± 0.7	2.0 ± 0.8

n = 6, x ± s, *: P < 0.05; **: P < 0.01;与生理盐水组比较

表 2 三七叶甙 i. v. 对 AA 诱导的兔血小板聚集的影响

Tab. 2 Effects of interior *notoginseng* folium saponins on rabbit platelet aggregation induced by AA %

给药时间/ min	三七叶甙 (50 mg/ kg)	三七叶甙 (100 mg/ kg)	三七叶甙 (200 mg/ kg)	Asp (10 mg/ kg)
30	1.8 ± 1.2	1.3 ± 1.2	1.6 ± 0.9	54.8 ± 8.7 **
60	3.1 ± 0.8	4.4 ± 2.5	5.7 ± 3.1	72.2 ± 9.7 **
120	2.9 ± 2.1	3.6 ± 1.5	2.9 ± 1.8	90.5 ± 4.3 **
180	1.9 ± 1.0	2.2 ± 1.3	2.7 ± 1.2	72.5 ± 7.2 **

n = 6, x ± s, **: P < 0.01 与给药前比较;给药前血小板聚集率:71.5 ± 6.7

表 3 三七叶甙 i.v. 对 ADP 诱导的兔血小板聚集的影响

Tab. 3 Effects of interior *notoginseng* folium saponins on rabbit platelet aggregation induced by ADP %

给药时间/ min	三七叶甙 (50 mg/ kg)	三七叶甙 (100 mg/ kg)	三七叶甙 (200 mg/ kg)	Asp (10 mg/ kg)
30	26.3 ±6.7 *	37.7 ±11.0 **	46.9 ±9.2 **	7.7 ±2.2
60	45.9 ±8.4 **	53.2 ±9.5 **	63.4 ±7.8 **	11.3 ±3.3
120	35.5 ±5.6 **	47.1 ±8.0 **	51.2 ±10.2 **	13.5 ±4.9
180	32.9 ±4.0 **	36.2 ±4.3 **	48.0 ±7.5 **	12.7 ±3.3

$n = 6, x \pm s, * : P < 0.05, ** : P < 0.01$ 与给药前比较;给药前血小板聚集率:60.2 ±5.5

表 4 三七叶甙 i.v. 对 PAF 诱导的兔血小板聚集的影响

Tab. 4 Effects of interior *notoginseng* folium saponins on rabbit platelet aggregation induced by PAF %

给药时间/ min	三七叶甙 (50 mg/ kg)	三七叶甙 (100 mg/ kg)	三七叶甙 (200 mg/ kg)	Asp (10 mg/ kg)
30	2.3 ±1.1	3.9 ±1.8	5.1 ±1.0	1.8 ±1.2
60	2.8 ±0.8	3.0 ±1.2	5.5 ±1.5	3.8 ±1.5
120	2.1 ±0.7	2.5 ±1.6	4.8 ±1.3	6.2 ±2.8
180	1.4 ±1.1	3.1 ±1.0	3.8 ±0.6	4.5 ±1.9

$n = 6, x \pm s, P > 0.05$ 与给药前比较;给药前血小板聚集率:69.1 ±8.3

4 讨 论

血栓或血栓栓塞性血管阻塞,在冠心病、脑卒中、肺栓塞等临床重症的发病机制中起到非常关键的作用。血栓形成是血液在流动状态下,止血机制过度激活的一种病理性结局,是血小板、白细胞、内皮细胞等多细胞间相互作用的结果,而血小板的活化和聚集是其中重要因素之一^[6]。

在正常的循环血液中,血小板处于静息状态,而在某些生理或病理状态下,血小板可以被激活(activation)。血小板激活是指血小板在刺激物(诱导剂)作用下发生的各种改变,如变形、粘附和聚集等,这些改变可以先后出现,或以不同组合出现,或单独出现,其中血小板的活化聚集是血小板的重要改变形式^[7]。血小板活化聚集后,可导致血栓形成,血管痉挛,影响血液循环,产生缺血或梗死,从而促进疾病的发生和发展。因此研究药物对血小板活化聚集的影响,对于防治有关疾病和开发新药至关重要。

目前认为血小板活化聚集主要通过 3 条途径:AA 途径、ADP 途径和 PAF 途径^[8]。不同的诱导剂

通过不同的方式诱导血小板聚集,本实验选用 AA、ADP 和 PAF 作为血小板聚集的诱导剂,分别代表血小板活化的 3 条途径,观察三七叶甙对这 3 条途径的影响,探讨三七叶甙抗血小板聚集作用及范围。血小板聚集反应中的最终效应受体是 GP b/ a 分子,它与纤维蛋白原结合导致血小板的聚集。ADP 诱导的血小板聚集是通过一个与 G 蛋白偶联的 P2 嘌呤型受体,使 GP b/ a 分子活化,以便与纤维蛋白原结合。血小板 ADP 受体转导激活信号的过程尚不清楚,有证据表明其通过抑制腺苷酸环化酶活性及增加胞浆钙离子浓度参与血小板的聚集反应^[9]。实验结果表明,三七叶甙体内外均明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集。其作用机制推测可能和三七叶甙抑制血小板表面 GP b/ a 分子与钙依赖性纤维蛋白原受体的结合或抑制 ADP 与血小板膜受体的结合,产生抗血小板聚集作用,有待在进一步的实验中证实。

综上所述,三七叶甙能明显抑制血小板的聚集,因此其可望成为防治血栓性疾病的特色新药,具有较高的研究和应用价值。

参考文献:

- [1] 黎光南. 云南中药志(第1卷)[M]. 昆明:云南科技出版社,1990.
- [2] 杨权. 三七叶皂贰治疗偏头痛临床疗效观察[J]. 中西医结合杂志,1988,8(12):726—727.
- [3] MASSBERG S, SCHULZ C, GAWAZ M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome [J]. *Semin Vasc Med*, 2003, (2):147—162.
- [4] BORN GVR. Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal[J]. *Nature*, 1962, 194(2):927—929.
- [5] SHEN Zhi-qiang, DONG Ze-jun, CHEN Peng. Effect of plumbagin on platelet aggregation and platelet-neutrophil interactions [J]. *Planta Medica*, 2003, 69(6):605—609.
- [6] 李家增,贺石林,王鸿利. 血栓病学[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [7] 汪钟,郑植荃. 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.
- [8] PACKHAN M A. Role of platelet in thrombosis and hemostasis[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994, 72(6):278—285.
- [9] COLLIER B S. New antiplatelet agents:Platelet GP_{IIb/IIIa} antagonists[J]. *Thrombosis and Hemostasis*, 1995, 74(1):271—302.

Effects of *Panax notoginseng* folium saponins on rabbit platelet aggregation

CHEN Peng¹, HU Xiao-li², LEI Wei-ya¹, SHEN Zhi-qiang¹

(1. Yunnan Pharmacological Laboratories of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China;

2. Life Science School, Yunnan University, Kunming 650022, China)

Abstract: The effects of *notoginseng* folium saponins on rabbit platelet aggregation induced by AA, ADP and PAF were investigated by Born's method. It was showed that *notoginseng* folium saponins significantly inhibited platelet aggregation induced by ADP in vitro, and the IC₅₀ value (concentration resulting in 50% inhibition) was 89.4 mg/L. In vivo *notoginseng* folium saponins (50, 100, 200 mg/kg) also markedly inhibited rabbit platelet aggregation induced by ADP. It is suggested that *notoginseng* folium saponins concentration-dependently suppressed rabbit platelet aggregation induced by ADP, but not by AA and PAF.

Key words: *Panax notoginseng* folium saponins; AA; ADP; PAF; platelets; aggregation