

• 实验研究 •

毛冬青甲素对血小板功能和形态的影响

中国医学科学院基础医学研究所

汪 钟 杜金香* 朱国强 游美梅

内容提要 本文观察到毛冬青甲素体外给药, 能抑制 ADP、胶原诱导的人、兔血小板聚集和 5 羟色胺释放, 剂量与效应相关。药物抑制 ADP 诱导的聚集和释放反应较强, 给大鼠体内给药, 也明显抑制血小板聚集。电镜下超微结构研究表明, 正常大鼠血小板呈椭圆形, 颗粒清晰可见, 给注射盐水大鼠的 PRP 中加入 ADP, 血小板从分散变为明显聚集, 甚至互相融合, 但颗粒仍存在, 若给静脉注射毛冬青甲素大鼠的 PRP 中加入 ADP, 则血小板的超微结构除偶见伪足形成外其余与正常大鼠无明显差别。

毛冬青 (*Ilex pubescens* Hook. et Arn) 系冬青科植物, 毛冬青甲素系从毛冬青中分离出的一种有效成份。临床观察证实对脑血栓、心肌梗塞、脉管炎有较好的疗效。药理实验初步表明: 在体外有抗血栓形成, 抑制血小板粘附和 ADP 诱导的聚集作用。

本文主要报道体外给药对胶原、ADP 诱导人、家兔血小板聚集和 5 羟色胺 (5 HT) 释放反应的影响, 体内给药对大鼠血小板聚集和超微结构的影响。

材 料

毛冬青甲素 (粉剂) 由广州市医药工业研究所提供。

二磷酸腺苷 (ADP) (西德 Mannheim, GmbH)。
C¹⁴-5HT (Amersham England)。

胶原 (自制: 取 1 g 家兔跟腱剪碎加 5 ml 生理盐水制成匀浆, 离心取上清液)。

血小板聚集仪 (BS 631 型, 北京生化仪器厂)。

方 法

一、血小板聚集性测定

1. 体外实验: 家兔体重 2.5~3 kg, 清醒状态下从颈动脉放血。人血采自健康自愿献血者, 至少二周内未服用阿斯匹林、消炎痛等药物, 3.8% 枸橼酸钠抗凝 (血与抗凝剂之比为 9:1), 离心 (1,000rpm, 8 分钟) 分离富含血小板血浆 (PRP), 用不同浓度的毛冬青甲素分别与 0.45ml 的人或兔 PRP 在 37°C 温育 15

分钟, 生理盐水对照。含各种浓度毛冬青甲素的 PRP 的 pH 为 7.6, 与对照组相似。按比浊法测定^①血小板聚集程度。每个标本首先摸出胶原或 ADP 的阈剂量, 所谓阈剂量即引起兔 PRP 至少产生 40% 以上聚集的最小剂量, 引起人 PRP 至少产生 60% 以上聚集的最小剂量。然后观察药物对 ADP 或胶原诱导 PRP 聚集的影响, 计算药物对血小板聚集的抑制百分率。

2. 体内实验: 大鼠体重 150g~200g, 异戊巴比妥钠 100mg/kg 腹腔注射进行麻醉。分离颈总动脉, 给药前自颈总动脉取血作为对照, 然后于股静脉注射毛冬青甲素 25mg/kg。注射后将动物分为三组, 分别于给药后 5 分钟、30 分钟、60 分钟从腹主动脉取血, 制备 PRP, 其他步骤同体外试验。观察药物进入机体后不同时间对 ADP (10⁻⁵M) 诱导血小板聚集的抑制作用。计算血小板聚集抑制百分率。

二、血小板 C¹⁴-5 HT 释放反应测定

操作方法见前文^②, 主要步骤为将含 C¹⁴-5 HT 的兔 PRP 0.45ml (每毫升 PRP 中加入 0.1μCi 的 C¹⁴-5 HT 生理盐水溶液) 与 0.05ml 不同浓度的毛冬青甲素或生理盐水温育 15 分钟, 加入 ADP 或胶原后在 37°C 搅拌 5 分钟, 迅速放置冰浴并加 10μl 5% EDTA 终止反应, 离心 (12,000rpm, 4 分钟), 取 0.1ml 上清液加入 10ml 甲苯闪烁液计数即对照或药物计数。取 0.5ml 含 C¹⁴-5 HT 的对照 PRP 按上述速度离心, 然后再取 0.1ml 上清液加 10ml 甲苯闪烁液计数为上清计数。取 0.1ml 含 C¹⁴-5 HT PRP 加 10ml 甲苯闪烁液计数为总计数。药物抑制血小板 C¹⁴-5 HT 的释放率按以下公式计算。

* 北京第二医学院药理教研室

$$\text{摄取百分率} = \frac{\text{总计数} - \text{上清计数}}{\text{总计数}} \times 100$$

对照或药物释放百分率 =

$$\frac{\text{样品(对照或药物)计数} - \text{上清计数}}{\text{总计数} - \text{上清计数}} \times 100$$

释放抑制百分率 =

$$\frac{\text{对照释放百分率} - \text{样品释放百分率}}{\text{对照释放百分率}} \times 100$$

三、血小板超微结构观察

大鼠静脉注射生理盐水或毛冬青甲素 25mg/kg, 5 分钟后分别取血制备 PRP, 样品共分以下 4 组: 1 组静脉注射生理盐水; 2 组静脉注射生理盐水, 5 分钟后加 ADP 放置聚集仪内再搅拌 5 分钟; 3 组静脉注射毛冬青甲素; 4 组静脉注射毛冬青甲素 5 分钟后加 ADP 放置聚集仪内再搅拌 5 分钟。然后将以上四组标本用 5% 戊二醛固定血小板, 用 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.2) 洗去戊二醛, 再以 1% 锇酸固定, 用同样方法将血小板洗净, 脱水包埋作超薄切片 (厚度为 400~500Å), 以饱和醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色后用 JEM-100B 电子显微镜观察 (分辨率为 20Å) 血小板超微结构。以上各组动物均为 4 只, 每只动物两个铜网。

实验结果

一、毛冬青甲素对兔体外血小板聚集和释放反应的影响

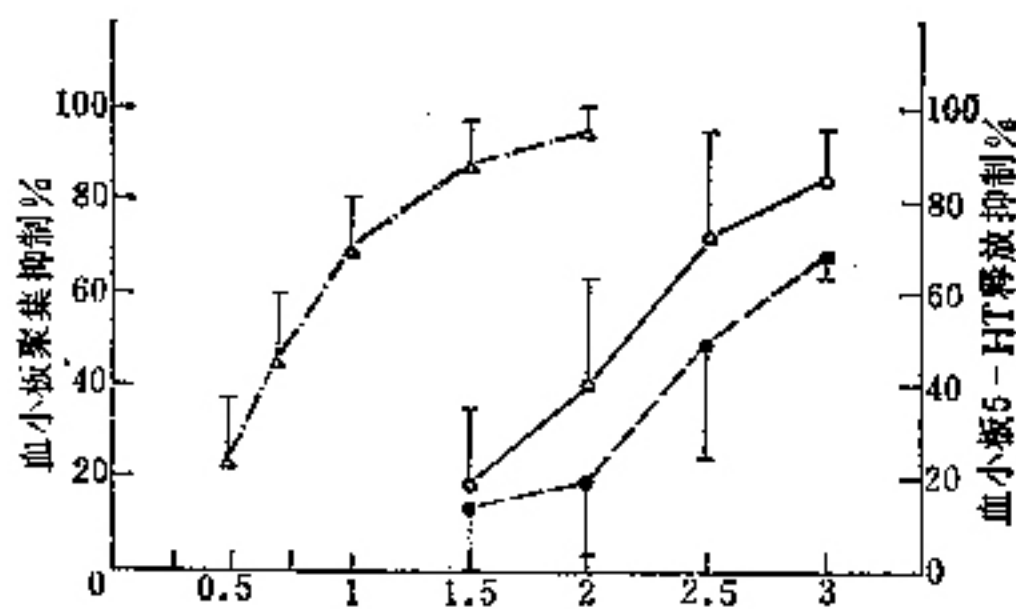


图1 毛冬青甲素对 ADP、胶原诱导的兔血小板聚集和对胶原诱导的兔血小板释放 5HT 反应的影响 (以上结果为四次实验的平均值±标准差)

△—△: ADP 诱导聚集; ○—○: 胶原诱导聚集; ●—●: 胶原诱导 5HT 释放

图1表明毛冬青甲素明显抑制 ADP ($5 \times 10^{-6} \sim 10^{-5}M$)、胶原 ($5 \sim 10\mu l$) 诱导的兔血小板聚集, 抑制效应与剂量相关。药物对 ADP、胶原诱导的血小板聚集的 ED_{50} 分别为 0.75mg 和 2.15mg。

毛冬青甲素在抑制胶原诱导血小板聚集的同时也抑制血小板 C^{14} -5HT 释放反应, 剂量与效应相关, 药物对胶原诱导血小板释放 C^{14} -5HT 反应的 ED_{50} 为 2.5mg。用 ADP 诱导兔血小板聚集时未观察到血小板释放 C^{14} -5HT 反应。

二、毛冬青甲素对人体外血小板聚集和 5HT 释放反应的影响

毛冬青甲素也明显抑制体外人血小板的聚集性, 剂量与效应相关, 药物对 ADP 诱导的聚集作用较胶原为强。3mg/ml 完全抑制 ADP 诱导的聚集, 但对胶原诱导聚集的抑制率只有 40% 左右, 表明毛冬青甲素对诱导剂 ADP 较敏感。此外, 无论 ADP 或胶原均可引起人血小板释放 5HT, 释放率为 50% 左右。当毛冬青甲素 0.5mg/ml 与 PRP 孵育后, ADP 和胶原诱导血小板释放 5HT 的百分率分别为 19 和 38, 当药物剂量增加到 3mg/ml 时, 上述两种诱导剂引起血小板释放 5HT 的百分率也相应分别减少到 7 和 23, 与聚集实验结果相似, 药物对 ADP 诱导的 5HT 释放抑制更为明显。

三、毛冬青甲素对大鼠体内血小板聚集的影响

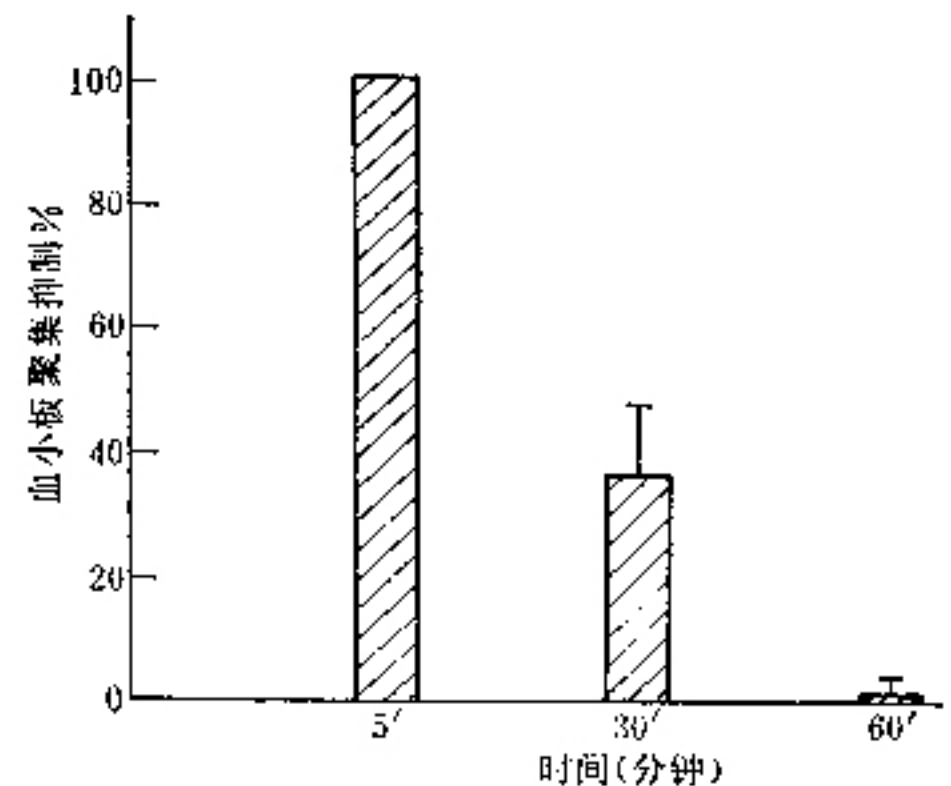


图2 毛冬青甲素 25mg/kg 静脉注射对大鼠血小板聚集的抑制作用 (以上结果为五次实验结果的平均值±标准差)

图2表明毛冬青甲素在大鼠体内具有明显抑制 ADP ($10^{-5}M$) 诱导的血小板聚集作用, 抑制强度与药物在体内的作用时间相关, 给药 5 分钟后聚集抑制率均为 100%, 随着药物在体内代谢时间增长其抑制作用逐渐减弱, 至 60 分钟抑制效应基本消失。

四、毛冬青甲素对大鼠血小板超微结构的影响

照片一表明大鼠静脉注射生理盐水 5 分钟后血小板呈椭圆形, 颗粒清晰可见。取静脉注射生理盐水 5 分钟后的大鼠 PRP, 与 ADP 在 $37^{\circ}C$ 搅拌条件下作

用 5 分钟, 血小板则由分散变为明显聚集, 形态不规则, 但颗粒依然存在(照片二)。照片三表明大鼠静脉注射毛冬青甲素 25mg/kg 5 分钟后, 血小板形态与正常无明显区别。这种含药物的 PRP 与 ADP 再作用 5 分钟后血小板除偶见伪足形成外其它与正常相似, 呈分散状态(照片四)。

讨 论

本文结果表明毛冬青甲素对胶原诱导的家兔血小板聚集和 5-HT 释放反应都有明显的抑制作用, 无论兔或人的血小板, 药物对 ADP 诱导聚集的抑制作用均较胶原为强, 以兔为例, 药物抑制胶原诱导聚集的 ED_{50} 为 ADP 的 3 倍。

用 ADP 诱导家兔或大鼠血小板聚集时, 没有观察到 5-HT 释放反应, 同样, 在电镜下, ADP 虽使大鼠血小板相互紧密聚集在一起, 但颗粒仍清晰可见, 这与胶原引起家兔血小板聚集时可以释放 5-HT 及电镜下呈现血小板内颗粒消失显然不同⁽³⁾。相反, 当 ADP 诱导人血小板聚集时, 可以观察到 5-HT 释放反应。表明血小板释放 5-HT 存在种属差异。

给大鼠静脉注射毛冬青甲素 25mg/kg, 也明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集, 与体外结果相符, 也与前文报道的药物在体内能抑制花生四烯酸钠盐诱导家

兔血小板聚集相符⁽⁴⁾。

本文在体外聚集试验中所用诱导剂的剂量为阈剂量, 用阈剂量的好处是不同个体对诱导剂的敏感性不同, 如选用固定剂量, 对某些动物可能由于诱导剂用量过大而人为地减弱了药物的抑制效应。

总之, 毛冬青甲素无论体外或体内给药对多种动物(人、兔、大鼠), 多种诱导剂(ADP、胶原、花生四烯酸)均有抑制血小板聚集作用。对血小板释放 5-HT 和超微结构也有影响。

(本文照片见封三)

参 考 文 献

1. Born GVR. Aggregation of blood Platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194:927—929.
2. Wang Zhong, et al. Effect of a medicinal Chinese herb on human platelet function. *Thrombosis and Haemostasis* 1982; 48:301.
3. 时其煌, 等. 冠心 II 号对家兔血小板释放 5-羟色胺含量和超微结构的影响. *中西医结合杂志* 1981; 1(2):90.
4. 杜金香, 等. 毛冬青甲素对兔血小板生成血小板 α_2 作用的研究. *北京第二医学院学报* 1983; 2:120.

中医望诊法诊断消化道癌的研究(摘要)

江西上饶地区医院肿瘤科 潘德年 黎昌琦

1978 年以来, 我们采用设观察组、对照组(健康和非癌组)的临床验证方法, 通过 800 例的验证, 找出了与消化道癌有关的六诊九项指标。六诊: 眼、耳、舌、唇、体、甲。九项: 眼球结膜血管异向和深层静脉显露; 耳穴观察胃、肠、食管、肝区的隆起和凹陷; 青紫舌; 下唇紫斑; 体表白斑和肩背部长毛; 指甲床的纵横紫纹。结果癌组与非癌组、健康组比较, 经统计学处理, 差别有非常显著性意义。

由于用单项检查癌症检出率较低, 诊断范围较小, 故用六诊九项综合判断法可提高癌症检出率及扩大诊断范围。在数理统计(相关分析和判别分析)的基础上, 将中医望诊法初步应用于临床诊断。经大量的临床实践, 总结出如下诊断方法: 1. 四诊阳性以上者可初定癌症; 二诊阳性以下者不考虑癌症。2. 定位诊断有耳穴定位、舌诊定位和综合定位法。

为进一步考查其临床应用价值, 我们在 1983 年 11 月到省市 11 个医院进行了 101 例考核。考核中由双方医院医生监考, 并由监考医生选择确诊病例(不一定是癌症)。被考医生不问病史, 不查体, 不了解任何临床情况, 只采用中医望诊法作出诊断, 再由双方监考医生核对病理诊断得出符合与否的结论。结果: 中医望诊法诊断符合率 78.2%。

1983 年 12 月 26~28 日在上饶市召开了有主管部门和省地市 16 个单位的 26 名中西医专家教授和科研人员参加的成果鉴定会。会议认为: 本法继承和发扬了中医学遗产, 体现了中医特点, 丰富了中医望诊对消化道癌诊断内容。具有简便、易行、经济、可靠的优点, 为广大城乡提供了一种肿瘤普查初筛手段和临床辅助诊断方法。