

• 实验研究 •

新灯盏花素体内抗血栓形成的作用

苏州医学院血栓与止血研究室 王兆钺 陈德春 何 杨 阮长耿

内容提要 新灯盏花素是植物灯盏花中一种有抗血小板作用的复盐成分。在家兔的主动脉血栓模型中能减轻血小板的破坏与5-羟色胺释放反应,对血栓形成有明显的抑制作用,这种作用与剂量呈正相关性。新灯盏花素对血小板与血管内皮细胞的花生四烯酸代谢物TXB₂与6-酮-PGE₁α的生成均有抑制作用。试验结果表明该药在体内有强烈的抗血栓效应。

新灯盏花素(简称83101)是从植物灯盏花中提取的复盐成分⁽¹⁾,在体外对多种诱导剂引起的人血小板聚集,释放反应与花生四烯酸代谢有强烈的抑制作用。近年来国内已报道了多种具有抗血小板作用的中草药有效成分,但这些研究都限于体外试验阶段,并不能代表药物在体内的效果。最近我们建立了家兔的主动脉血栓模型⁽²⁾,观察了83101对体内血栓形成的抑制作用,并对与血小板及凝血有关的多项指标进行了测定,报告如下。

材料与方法

一、主动脉血栓模型的制备与给药方法:我们改良Cattaneo的方法⁽³⁾,建立了主动脉血栓模型。83101由云南省药物研究所提供。选用体重2.5~3kg的健康雄性家兔,用25%乌拉坦(3ml/kg)静脉注射麻醉。切开右股动脉,插入一根聚乙烯管放血8ml,分别置于3.8%枸橼酸三钠与2%EDTA(Na₂)的二支涂硅试管中,全血1:9抗凝,离心(1000g)10分钟分离血浆;枸橼酸三钠抗凝血浆供凝血试验用,EDTA(Na₂)抗凝血浆供5-羟色胺(5-HT)与前列腺素测定用。另以140mg/kg剂量的83101注入9只家兔耳缘静脉;以350mg/kg剂量注入8只家兔。给药后30分钟将导管继续插入至主动脉弓(约35~37cm)。再等1小时与4小时后从颈总动脉插管取血8ml按上法处理,然后连续注入林格氏液(37°C)250~300ml,并同时切断左侧股动脉与股静脉放血,待股动、静脉流出的液体变清后,从右颈总动脉注入4%多聚甲醛150ml固定。将兔尸置4°C存12小时,然后取出从主动脉弓至腹主动脉分叉处的完整主动脉,切开后收集主动脉壁上与导管周围形成的血栓,称重,置10%福尔马林中固定,在光学显微镜下进行病理检查。对照组(7只家兔)除未注入83101以及未在插管后1小时取血外,其它处理方法与给药组相同。

二、血小板计数、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)与白陶土部分凝血活酶时间(KPTT)均按常规法测定。纤维蛋白原用双缩脲法测定⁽⁴⁾。

三、血浆5-HT测定:按万海英等⁽⁵⁾5-HT荧光光度测定法,用邻苯二甲醛(Fluka)激发荧光后在荧光光度计(岛津-510型)上测定,与5-HT标准品比较后即可推算出样本的5-HT含量。

四、血浆花生四烯酸代谢物测定:血栓烷B₂(TXB₂)、6-酮-前列腺素F_{1α}(6-酮-PGF_{1α})放射免疫测定均采用我室自制的试剂盒,前列腺素E₂(PGE₂)抗体由法国Maclouf博士惠赠,其余试剂由我室制备。按我室操作方法^(6,7)将血浆或标准品(Upjohn公司)、¹²⁵I标记物与相应的抗体以及少量γ球蛋白加入同一试管内,在4°C条件下反应12小时,加等量的25%聚乙二醇(分子量4000)后离心,将沉淀物用γ-免疫计数仪(二六二厂)计数,最后绘制出标准曲线并计算出血浆TXB₂、6-酮-PGF_{1α}或PGE₂的含量。

结 果

一、家兔主动脉血栓形成:小部分在动脉管壁上,大部分在导管周围,在腹主动脉分叉处与导管顶端处易形成血栓。血栓呈白色,不透明。对照组血栓较大,重量为44.37±20.74mg(M±SD,下同)。140mg/kg组血栓重量明显减轻,为26.68±13.16mg(P<0.05),350mg/kg组血栓重量仅为3.38±5.19mg(P<0.01),其中2只家兔的主动脉内无肉眼可见的血栓。光学显微镜检查显示对照组血栓中血小板数量较多,血小板梁宽度为10~15μm,140mg/kg组血栓中血小板数量较小,血小板梁宽度为0.2~0.6μm,350mg/kg组血栓中血小板数量最小,血小板梁宽度为0.2~0.3μm。但三组家兔的主动脉标本有相同程度的血管内皮损伤,以至动脉弓的病变较严重,并且局部都有附壁血栓形成。

二、对照组在插管后4小时血小板计数平均下降

31% ($P < 0.01$)。140mg/kg 组在插管后 1 小时与 4 小时的血小板数也有明显降低 ($P < 0.05$), 但下降幅度均为 22%, 低于对照组下降幅度。350mg/kg 组在插管后 1 小时与 4 小时血小板数平均减少 9% 与 12%, 经统计学处理无显著性差异 (表 1)。

三、对照组家兔血浆 5-HT 水平在插管后 4 小时比插管前明显增高 ($P < 0.05$), 而 140mg/kg 组与 350mg/kg 组家兔在插管后血浆 5-HT 水平无明显改变 (表 2)。

表 1 83101 对主动脉血栓的血小板数的影响
($M \pm SD$, 下同。万/ μ l)

n	插管前	插管后 1 小时	插管后 4 小时
140mg/kg 组 9	49.18 $\pm$ 7.68	38.56 $\pm$ 4.57*	38.46 $\pm$ 5.99**
350mg/kg 组 8	48.19 $\pm$ 4.04	43.73 $\pm$ 7.30	42.03 $\pm$ 5.35
对 照 组 7	51.3 $\pm$ 4.9	—	35.5 $\pm$ 4.1**

与插管前比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。n 为动物数, 下同

表 2 83101 对动脉血血浆 5-HT 与前列腺素的影响

		5-HT (ng/ml)	TXB ₂ (pg/ml)	δ -酮-PGF _{1α (pg/ml)}	PGE ₂ (pg/ml)
140mg/kg 组 (n=9)	插 管 前	164.48 $\pm$ 58.95	370.67 $\pm$ 265.38	31.36 $\pm$ 17.26	15.78 $\pm$ 13.87
	插管后 1 小时	164.6 $\pm$ 31.18	427.78 $\pm$ 330.63	28.97 $\pm$ 13.67	15.94 $\pm$ 6.65
	插管后 4 小时	172.9 $\pm$ 83.37	394.44 $\pm$ 235.75	46.57 $\pm$ 36.09	13.06 $\pm$ 10.65
350mg/kg 组 (n=8)	插 管 前	182.34 $\pm$ 24.98	443.75 $\pm$ 288.09	42.13 $\pm$ 21.45	17.75 $\pm$ 11.39
	插管后 1 小时	215.21 $\pm$ 50.09	445.0 $\pm$ 248.19	37.96 $\pm$ 17.78	15.69 $\pm$ 8.81
	插管后 4 小时	198.95 $\pm$ 37.46	438.12 $\pm$ 168.27	39.83 $\pm$ 16.9	21.88 $\pm$ 13.21
对 照 组 (n=7)	插 管 前	176.0 $\pm$ 21.7	311.88 $\pm$ 21.04	42.0 $\pm$ 22.97	15.9 $\pm$ 12.04
	插管后 4 小时	270.75 $\pm$ 52.29*	500.6 $\pm$ 134.03**	114.67 $\pm$ 58.1**	14.0 $\pm$ 7.98

与插管前比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

表 3 动脉血栓形成前后某些凝血试验的结果

		PT (s)	TT (s)	KPTT (s)	纤维蛋白原 (mg%)
140mg/kg 组 (n=9)	插 管 前	12.58 $\pm$ 0.56	17.28 $\pm$ 2.20	64.78 $\pm$ 9.96	394.40 $\pm$ 81.12
	插管后 1 小时	12.78 $\pm$ 0.91	17.22 $\pm$ 2.39	64.94 $\pm$ 10.55	334.22 $\pm$ 121.41
	插管后 4 小时	12.62 $\pm$ 0.95	17.89 $\pm$ 2.33	65.89 $\pm$ 8.61	350.56 $\pm$ 100.84
350mg/kg 组 (n=8)	插 管 前	13.88 $\pm$ 0.23	16.79 $\pm$ 2.23	54.31 $\pm$ 3.35	418.25 $\pm$ 60.74
	插管后 1 小时	14.15 $\pm$ 0.54	16.26 $\pm$ 2.27	58.31 $\pm$ 3.5	379.75 $\pm$ 38.34
	插管后 4 小时	14.61 $\pm$ 0.55	16 $\pm$ 0.91	55.88 $\pm$ 4.02	370.75 $\pm$ 62.97
对 照 组 (n=7)	插 管 前	14.75 $\pm$ 0.75	11.4 $\pm$ 1.1	33.17 $\pm$ 48.3	477.0 $\pm$ 97.2
	插管后 4 小时	14.7 $\pm$ 1.2	12.1 $\pm$ 0.7	34.0 $\pm$ 4.8	446.0 $\pm$ 83.2

四、对照组家兔插管后 4 小时血浆 TXB₂ 与 δ -酮-PGF_{1 α} 浓度明显升高 (P 值均 < 0.001)。140mg/kg 组与 350mg/kg 组在插管后 1 小时与 4 小时均无改变。140mg/kg 组在插管后 4 小时血浆 δ -酮-PGF_{1 α} 有增高趋势, 而大剂量组无改变。三组家兔血浆 PGE₂ 浓度在插管后都无变化 (表 2)。

五、与凝血机理有关的一些试验, 如 PT、TT 与 KPTT, 三组家兔在插管前后均无变化。三组家兔血浆的纤维蛋白原浓度在插管后都有降低的趋势, 但经统计学处理无显著性意义 (表 3)。

讨 论

近十余年来随着对血栓形成机理研究的进展, 人们已认识到血小板在动脉粥样硬化与血栓性疾病的发病中起着重要的作用⁽⁸⁾。因此希望能利用一些具有抗血小板作用的药物来治疗有关的疾病。国外在寻找新的抗血小板药物方面做了大量的、系统的研究工作⁽⁹⁾。国内学者也发现一些用于活血化瘀治疗的中药中的成分有很强的抗血小板作用, 但有关的药理学研究都只限于体外研究阶段。灯盏花是我国云南等地

用于治疗脑血栓的一种中草药, 83101 是从中分离出来的一种复盐成分⁽¹⁰⁾。我们曾在体外试验中发现, 83101 对 ADP、凝血酶、花生四烯酸与钙离子载体 A 23187 等多种诱导剂引起的血小板聚集、5-HT 释放反应与花生四烯酸代谢均有明显的抑制作用, 并且这种抑制作用与剂量呈正相关性⁽²⁾。因此我们进一步研究了 83101 在体内的抗血栓作用。动物的血栓模型有多种, 但一般都是采用 ¹¹¹In 或 ⁵¹Cr 标记的血小板通过测定血管损伤局部的放射强度推测血栓形成的情况, 不能进行肉眼与镜下的病理观察, 也不能同时对其它指标进行测定。我们根据 Cattaneo 等⁽⁴⁾的方法稍加改进, 通过插入导管引起血管壁内皮的损伤建立了家兔主动脉的血栓模型, 进行了与凝血因子、血小板以及血管内皮细胞有关的试验, 并进行了病理学方面的研究。83101 在 140mg/kg 的剂量下能使家兔主动脉血栓形成过程中血小板计数的下降程度减轻, 反映血小板活化的血浆 5-HT 与 TXB₂ 浓度也不再升高, 这说明血小板的破坏与活化减轻。病理检查也证实动脉血栓形成受到了部分抑制, 但这种部分抑制还不能达到临床上防治血栓形成的目的。因此我们又把药物剂量增加到 350 mg/kg, 结果对血栓形成的抑制效果达到 92%, 少数家兔的主动脉内已没有肉眼可见的血栓, 同时在插管以后血小板数量不再下降, 其它有关血小板活化的指标也无变化, 这表明血小板已无明显的破坏与活化。

6-酮-PGF_{1α} 是血管内皮细胞产生的前列环素 (PGI₂) 的稳定的衍化物。插管后家兔血浆 6-酮-PGF_{1α} 的明显增加反映了动脉管壁内皮细胞受到刺激与早期损伤。三组家兔的主动脉内皮损伤的程度在病理上是相同的, 但两种剂量的用药组血浆 6-酮-PGF_{1α} 浓度并不升高, 这提示 83101 不仅对血小板, 并且对内皮细胞的花生四烯酸代谢也有抑制作用。此外, 三组家兔内皮损伤程度相同, 但用药组血栓形成被明显抑制, 并且抑制强度与剂量呈正相关性。这说明在动脉血栓

模型中, 虽然内皮损伤是始动环节, 但血小板活化起着关键性的作用。

PGE₂ 不是血细胞或内皮细胞花生四烯酸代谢的主要产物。在血栓形成中血浆 PGE₂ 无变化, 一般认为与血栓关系不大。

在本试验中没有发现凝血活性有明显的异常, 可能是由于这些凝血指标敏感性不高, 尚不足以反映出血栓形成中凝血过程的改变。

动脉血栓, 包括心肌梗塞与脑血栓, 是动脉粥样硬化的常见的并发症。我们的研究表明 83101 除在体外有抗血小板作用外, 在体内也有很强的抗血栓作用, 是防治血栓性疾病一种新的、极有前途的中草药成分。

参 考 文 献

1. 张人伟, 等。灯盏花黄酮类成分的分离鉴定。中草药 1988; 19:199。
2. 何 杨, 等。主动脉血栓的动物模型制备。江苏医药 1987; 14:131。
3. Cattaneo A, et al. Effect of aspirin and sodium salicylate on thrombosis, fibrinolysis, prothrombin time and platelet survival in rabbits with indwelling aortic catheters. Blood 1983; 61:353。
4. 邓家栋, 等。血液病实验诊断。第 1 版。天津:天津科学技术出版社, 1985:258。
5. 万海英, 等。5-羟色胺的荧光测定法。江苏医药 1985; 11:662。
6. 王兆敏, 等。¹²⁵I-血栓烷 B₂ 放射免疫测定。苏州医学院学报 1986; 6(3):13。
7. 陈德春, 等。¹²⁵I-6-酮-PGF_{1α} 放射免疫分析。中华核医学杂志 1986; 6:174。
8. Sinzinger H. Role of platelets in atherosclerosis. Sem Thromb Hemostas 1986; 12:124。
9. Gordon JL. Ticlopidine, Quo Vadis? Basel, Birkhäuser, 1984:108。
10. Vermeylen J, et al. Normal mechanisms of platelet function. Clin Haematol. 1983; 12:107。

石家庄乐仁堂药厂新产品介绍

本厂具有多年生产经验, 检测手段齐全, 技术力量雄厚。近年研制的“悦年片”、“强力消炎胶囊”, 效果良好, 欢迎选购。

悦年片 冀卫药准字(85)190号 采用中药太行神草精制提炼而成, 适用于原发性高血压病及其心脑血管并发症等。临床观察 402 例, 总有效率 92.6%。该药对血清 β-脂蛋白和胆固醇均有显著降低作用。本品 1984 年获河北省卫生厅乙级成果证书, 1987 年获河北

省优秀新产品奖。

强力消炎胶囊 冀卫药准字(85)1885号 适用于急性牙龈炎、急性冠周炎、急性牙周脓肿、急性咽炎、急性扁桃体炎、外伤出血、外伤感染、疖、痈、脓疱疮、蚊虫叮咬感染及腮腺炎等, 临床治疗总有效率达 95% 以上, 治愈率达 58% 以上。本品毒性小, 抗菌谱较广, 服用剂量小, 见效快。

Genetic Characteristics in Yang(阳)Deficiency Patients

Feng Dongnian(冯栋年), Liu Yanling(刘燕玲)

Fourth People's Hospital, Xuzhou

With regard to genetic aspects, the authors determined the HLA typing in 50 cases of Yang deficiency(YD)-syndrome and 230 healthy controls. Rohrer index and costae arcuarial angle were also measured in 50 cases of YD syndrome and 60 healthy controls. The results showed that the distributional frequencies of HLA-B₈ ($P < 0.05$), CW₂ ($P < 0.01$), and A₉ ($P < 0.05$) in YD were significantly lower than those in normal controls. It reflected the genetic characteristics of YD syndrome indirectly. The YD patients had higher Rohrer index (more than 1.50) than normal controls. The costae arcuarial angle of YD group was 80 ± 14.35 degree (mean $\pm$ SD), and that of normal controls was 69.5 ± 11.83 degree. These indicated that fattiness was more often seen in the YD group.

(Original article on page 24)

Inhibitory Effects of New-Breviscapine on Thrombosis in Vivo

Wang Zhaoyue(王兆越), et al

Suzhou Medical College, Suzhou

New-Breviscapine is an anti-platelet compound with some kinds of salts extracted from a Chinese herb *Erigeron breviscapus*. In aortic thrombus formation in rabbits, the platelet 5-HT release reaction and platelet destruction could be reduced by the compound, meanwhile aortic thrombosis was inhibited with a clear correlation between drug dosage and its efficacy. It was shown that new-breviscapine could inhibit the production of TXB₂ and 6-keto-PGF₁ α by platelets and endothelial cells respectively. The data suggest that new-breviscapine has a significant inhibitory effect on thrombus formation in vivo through suppression of platelet functions.

(Original article on page 26)

Inhibitory Effects of Secretio Bufonis on the Carcinogenesis of Rat Trachea Contacted with Chick Embryonic Skin in Culture

Zhu Yinmei(祝银梅), Tian Hongsheng(田鸿生), et al

Dept. of Pathology, Hubei Medical College, Wuhan

The present investigation evaluated the inhibitory effects of Secretio Bufonis on the carcinogenesis of rat trachea contacted with chick embryonic skin (CES) in culture under inverted microscopy, light microscopy and scanning electron microscopy. The experimental results showed that the malignant cells of tracheal rings revealed an invasion into the CES in the group M but the group N and group S did not. It suggested that Secretio Bufonis might inhibit the carcinogenesis induced by MCA, reverse the atypical squamous metaplasia, promote the repair of tracheal mucosa and maintain normal differentiation of the rat tracheal epithelia. In addition, group M indicated the hyperplasia and metaplasia of some ciliated cells exposed to MCA.

The mechanism of Secretio Bufonis against lung cancer and the possibility of canceration of ciliated cells have been discussed.

(Original article on page 29)