

地龙提取液的活血化癥作用

山西医学院(太原 030001)

生化教研室 张祖珣 钟良玮 郑国平 王惠珍 赵建滨 单鸿仁

中心实验室 王峰峰

内容提要 为研究地龙的活血化癥作用及其机制, 本实验应用地龙组织提取液给家兔静脉注射, 测定其血浆纤维蛋白原含量及优球蛋白溶解时间的变化, 结果均明显减少($P < 0.01$)。将该提取液进一步萃取, 制备含多种纤溶酶的酶液, 给家兔静脉注射, 测定其血液流变学多项指标变化。结果表明血小板聚集百分率、全血及血浆粘度、红细胞刚性指数均显著降低($P < 0.01$)。说明地龙酶提取液通过促纤溶、抑制血小板聚集、增强红细胞膜稳定性等机制, 起到良好的活血化癥作用。

关键词 地龙 纤溶酶 血液流变学

心、脑血管系统疾病中的脑血栓、冠心病及动脉粥样硬化等是严重威胁人类健康的重要疾病。这不仅与血管硬化、狭窄等有关, 而且血液的高粘、高凝状态以及血细胞刚性增强、血小板聚集性增强等又进一步阻碍血液的正常流动, 使组织有效灌流量降低, 影响正常代谢, 甚至在血管狭窄处促使血栓形成, 引起更严重的后果。为防治以上病理改变, 本组对多种活血化癥中草药经实验筛选, 认为新鲜地龙组织提取液效果好, 药源广, 便于制备应用, 并已从中分离出多种溶解血栓的酶类^[1,2]。将含多种溶栓酶的地龙提取液给家兔注射, 测定其注射前后血液的变化, 以探讨地龙提取液的活血化癥作用及其机制。

材料与方法

一、材料 (1)地龙: 为人工养殖的正蚓科双胸蚓属(Lumbricidae Bimastos)。(2)家兔: 为健康杂种兔, 30只, 雌雄各半, 2.5~3.0kg/只。(3)主要试剂: 二乙基氨基乙基纤维素(DEAE-纤维素DE-52, Whatman产品); ADP(美国Chrono-Log公司产品), 其余试剂为国产分析纯。

二、主要仪器 低温高速离心机(湘西离心机厂); 紫外分光检测记录仪(日本Shimadzu公司); 部分收集仪(上海医疗器械十厂); M400型自动平衡血小板聚集仪(美国Chrono-Log公司); NXE-1型锥板式粘度计(成都仪器厂); 冻干机(日本真空技术株式会社)

三、地龙组织水溶性提取液的制备

1. 地龙粗提液 将活地龙放入水中, 使其消化道污物排出洗净, 用总量为2.5倍量的 pH8.0、0.2mol/L

的磷酸盐缓冲液制成匀浆, 于低温下抽提, 然后于4°C、13000rpm离心20min, 取上清即为地龙粗提液。

2. 地龙纤溶酶制剂 取地龙粗提液加硫酸铵分段盐析, 取纤溶活性高的, 即30~60%硫酸铵饱和度的沉淀部分, 以少量pH8.0、0.01mol/L的Tris-HCl缓冲液(下简称缓冲液)使之溶解后, 透析除盐(以5%醋酸钼检测 SO_4^{2-} 阴性), 再用缓冲液平衡至pH8.0。将以上透析除盐的样品经DEAE-纤维素(DE-52)离子交换柱层析, 制备含多种纤溶酶制剂^[3]。层析中用紫外检测仪于280nm监测描记。先用缓冲液洗脱杂蛋白至基线后, 改用含NaCl 0~0.5mol/L的缓冲液进行梯度洗脱, 分管收集含蛋白部分。用纤维蛋白平板法^[4], 分别从各管含蛋白的收集液中取样, 点在纤维蛋白平板上, 观察测定溶圈面积, 检测洗脱收集液中有纤溶活性的部分。由此确定出含0.05~0.30mol/L NaCl的缓冲液梯度洗脱的蛋白组分纤溶活性强。为了大量制备地龙纤溶酶制剂, 我们以上述分离提取流程为依据, 将大量DEAE-纤维素在烧杯内活化处理, 缓冲液平衡后, 去掉多余液体, 加入待分离样品, 混匀, 置4°C冰箱过夜。然后弃去上清, 分次加入相当于样品液2倍量的含0.05mol/L NaCl的缓冲液, 混匀, 静置, 弃去上清, 除杂蛋白。再同样加入含0.30mol/L NaCl的缓冲液, 混匀, 洗脱所需要的含纤溶酶的蛋白质, 即静置后取上清。然后透析除盐(用1%AgNO₃检测Cl⁻阴性), 用缓冲液平衡至pH8.0备用。另外从中取样测蛋白含量(Lowry法)与酶活力^[5]。

本实验中纤溶酶制剂蛋白含量为1.18mg/ml, 酶活力为16.6U/ml, 比活力为14U/mg蛋白。

四、实验方法

1. 取家兔10只, 注药前耳静脉采血为自身对照, 然后静脉注射地龙粗提液 1 ml/kg, 2 h及 6 h后再各采血 1 次。以上各次采血均用 3.8% 柠檬酸钠抗凝, (V/V=10:1), 2000rpm离心10min, 分离血浆供测定血浆纤维蛋白原及优球蛋白溶解时间用。

血浆纤维蛋白原测定: 按Quick法⁽⁶⁾。

优球蛋白溶解时间测定: 按Sherry法⁽⁷⁾。

2. 另取家兔20只, 注药前耳静脉采血 5 ml, 其中 2 ml同上用柠檬酸抗凝, 用于血小板聚集试验; 另 3 ml用肝素抗凝, 用于测定血液、血浆粘度等, 以上作为药前自身对照。随后按 1 ml/kg耳静脉注射地龙纤溶酶制剂, 4 h后再如上采血测定。

3. 血液流变学检测 采血及分装血样器皿均硅化处理。(1)血小板聚集试验: 分离富血小板血浆(800 rpm, 5 min)及贫血小板血浆(3000rpm, 10min), 以ADP为致聚剂(4 μ mol/0.45ml), 于37°C恒温下, 测 5 min血小板最大聚集百分率。(2)血液、血浆粘度等测定, 测RBC比积(HCT), 在RBC比积相等条件下, 测不同切变率(5.75~230s⁻¹)下的粘度值, 可得出: 低切变率(以11.5s⁻¹计)血液粘度; 高切变率(以230s⁻¹计)血液粘度; 血浆粘度; RBC聚集指数⁽⁸⁾ (低切变率血液粘度/高切变率血液粘度); RBC刚性指数⁽⁹⁾为(全血粘度-血浆粘度)/血浆粘度 $\times \frac{1}{HCT}$ 。

各组均采用自身对照, 配对t检验方法。

结 果

一、地龙粗提液对家兔血浆纤维蛋白原及纤溶活性的影响 见表1。

表1 地龙粗提液对家兔血浆纤维蛋白原及纤溶活性的影响 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

组别	兔数	纤维蛋白原 (mg/dl)	优球蛋白溶解时间 (h)
药前	10	601.23 $\pm$ 35.49	2.387 $\pm$ 0.098
药后2h	10	513.39 $\pm$ 71.00**	1.345 $\pm$ 0.195*
药后6h	10	434.42 $\pm$ 47.86*	1.618 $\pm$ 0.199*

注: 与药前相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

地龙粗提液有显著降低血纤维蛋白原的作用, 并使优球蛋白溶解时间显著缩短($P < 0.01$), 证实其纤溶活性增强是由于纤溶酶或激酶活性增强所致。

二、地龙纤溶酶制剂对家兔血液流变学的影响 见表2。

地龙纤溶酶制剂具有明显改善血液流变学特性的

表2 地龙纤溶酶制剂对家兔血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

项 目	兔数	药 前	药后4h
血小板聚集最大百分率(%)	20	10.63 $\pm$ 1.18	2.69 $\pm$ 0.60*
低切血液粘度(mPa/s)	20	11.05 $\pm$ 0.77	7.68 $\pm$ 0.66*
高切血液粘度(mPa/s)	20	4.72 $\pm$ 0.19	3.63 $\pm$ 0.23*
血浆粘度(mPa/s)	20	2.53 $\pm$ 0.05	2.37 $\pm$ 0.05**
红细胞聚集指数	20	2.35 $\pm$ 0.15	2.21 $\pm$ 0.16***
红细胞刚性指数	20	3.08 $\pm$ 0.21	1.85 $\pm$ 0.20*

注: 与药前比较* $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, *** $P > 0.05$

作用, 用药后血小板聚集性显著降低($P < 0.001$); 全血粘度降低($P < 0.001$), 血浆粘度降低($P < 0.01$)。高切变率下血液粘度反映红细胞刚性⁽⁹⁾, 加之用药后红细胞刚性指数降低非常显著($P < 0.001$), 可以认为该制剂有稳定红细胞膜, 保持其良好变形性的作用。红细胞聚集指数变化不显著, 表明该制剂对红细胞表面成分及其表面电荷无明显影响。

讨 论

以上实验结果表明, 地龙组织水溶性提取液以及进一步萃取的纤溶酶制剂含有多种成分, 至少通过以下机制起到良好的活血化瘀作用。(1)纤维蛋白原是升高血浆及全血粘度的重要因素之一, 其含量增高可使血液呈高凝状态, 在纤溶酶和激酶作用下, 血中纤维蛋白原(及纤维蛋白)可降解减少, 使血液粘度降低, 血循环得到改善。(2)血小板聚集功能是提高血液粘度的又一重要因素, 它在凝血和血栓形成过程中起始动作用。地龙溶栓酶制剂使血小板聚集百分率显著降低, 同时降低血液粘度, 防止血栓形成, 促进微循环。(3)RBC刚性指数增加会妨碍红细胞通过微循环血管, 增加血流阻力。而地龙纤溶酶制剂能显著降低RBC膜刚性指数, 即提高RBC膜的稳定性与变形能力, 从而降低微循环阻力, 促进血液循环进行。

已知地龙溶栓酶制剂中含有数种溶栓酶, 使血浆中纤维蛋白及纤维蛋白原降解, 但以上多项血液流变学变化不单由此造成, 其详细作用机理尚有待进一步探讨。

参 考 文 献

1. 程牛亮, 等。双胸蚓纤溶酶的纯化及性质。生物化学杂志 1989; 6(2):186。

2. 郑国平, 等. 蚯蚓组织纤溶酶原激活物的提取、纯化及其活性的研究. 第六次全国生化会议论文汇编(南京). 1988: 69.
3. William B Jakoby. Methods in Enzymology. Vol34. London: Academic Press, 1974:426.
4. Astrup T, et al. Fibrinplate method for estimating fibrinolytic activity. Arch Biochem Biophys 1952; 40:346.
5. 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 第

二版. 北京: 人民教育出版社, 1983:73, 151.

9. Quick A. Hemorrhagic Diseases, 1st ed. Philadelphia, 1957:379, 436.
7. Sherry S, et al. Studies on enhanced fibrinolytic activity in man. J Clin Invest 1959; 38:810.
8. 廖福龙, 等. 临床血液流变学. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1987:111, 193.
9. 陈文杰. 血液流变学. 天津: 天津科学技术出版社, 1987: 4—7, 83.

中西药物治疗消炎痛引起的多汗症状临床观察

北京中日友好医院肿瘤科(北京 100029)

李佩文 张代钊 蔡光荣 万冬桂 李 学

癌性发热是恶性肿瘤常见症状, 尚无特效药物治疗, 消炎痛是常用药物之一, 但该药普遍引起多汗症状, 产生诸多不适。经观察以五味子、浮小麦、诃子为主方的中药对消炎痛引起的多汗症状止汗效果良好, 传统方剂牡蛎散以及西药非那根也有止汗作用, 现将三组药物的止汗效果加以比较, 初步观察如下。

资料和方法 晚期恶性肿瘤患者 62 例, 其中男 54 例, 女 8 例。年龄 35~76 岁, 平均 56.4 岁。其中肺癌 52 例, 食管癌 10 例。临床分期均属Ⅱ期以上患者。发热时间连续 3 天以上, 每日测体温至少有 1 次在 37.5℃ 以上, 查白细胞总数及中性粒细胞无过高现象, 近口无感冒及炎症发生, 无药物热史, 临床诊断为癌性发热。给予消炎痛 25mg, 每日 2 次, 连续 2 日发汗者给予止汗治疗。癌性发热患者服用消炎痛后按出汗量分为三等: 微汗: 前额或胸背微微见汗, 手摸有潮湿感。大汗: 前额可见汗珠, 全身大汗沾湿衣被。有汗: 介于微汗及大汗之间。

62 例患者随机分为 3 组, 各组性别、年龄、病种、病理及分期无显著差异。其中五味子组 42 例(大汗 12 例, 有汗 19 例, 微汗 11 例), 方药为五味子 15g、浮小麦 60g、诃子 15g, 可随症加减其他中药, 但不用发汗及止汗中药。牡蛎散组 10 例(大汗 3 例, 有汗 5 例, 微汗 2 例), 方药为黄芪、麻黄根、牡蛎各 30g, 加减中药条件同上组。非那根组 10 例(大汗 3 例, 有汗 4 例, 微汗 3 例), 口服该药 25mg, 每日 2 次, 与消炎痛同服。

结 果 经中西药物治疗后出汗好转程度达 1 个等级者为有效, 2 个等级者为显效, 不变或加重者为无效。结果: 五味子组 42 例中显效 16 例, 有效 22 例, 无效 4 例, 有效率 90.5%。牡蛎散组 10 例中有效 6 例, 无效 4 例, 有效率 60.0%。非那根组 10 例中显效

1 例, 有效 5 例, 无效 4 例, 有效率 60.0%。五味子组分别与牡蛎散组及非那根组比较, $\chi^2=6.03$, $P<0.05$ 。从止汗效果时间分析, 五味子组及牡蛎散组见效时间缓慢, 均在 24h 以后发挥作用。但作用时间持久, 止汗效果稳定, 非那根止汗作用迅速、时间短暂, 有嗜睡、困乏及口干的副作用。

三组共有止汗无效者 12 例, 这些患者以病程偏晚、补液量大及放疗化疗次数多为特点, 中医指标以气血双亏者为多。

讨 论 消炎痛及茶普生是治疗癌性发热的首选药物, 这类解热镇痛药主要通过增加散热来使体温下降, 表现为皮肤毛细血管扩张和出汗增加, 大量出汗会丢失钾、钠、氯等多种离子, 引起电解质紊乱, 因此, 在纠正胶体渗透压及离子渗透压的同时, 讨论药物止汗问题是治疗癌性发热的现实问题。

五味子组治疗消炎痛引起多汗症状优于其他两组, 且无明显毒副作用。五味子味酸性温, 入肺肾经, 是生津止汗的重要药物, 对阴虚盗汗及阳虚自汗都有作用。浮小麦味甘性凉, 养心敛汗, 也常用于治疗盗汗及自汗。诃子苦酸性温, 入肺、大肠经, 是收涩要药, 并有抗实验性肿瘤作用。这三味药配合, 从性味、归经及现代药理研究, 认为对患者止汗固表是有益的。

牡蛎散敛汗固表, 是治疗体虚汗出的常用方剂, 但对阴虚火旺的盗汗不如当归六黄汤, 对大汗亡阳者不如参附汤, 今用于消炎痛所致的肿瘤患者多汗症状, 疗效不如五味子组。非那根属于抗组织胺类药物, 具有中枢性抗胆碱作用, 能够阻止皮肤毛细血管扩张及通透性的增加, 临床表现有体温下降及汗液减少, 且作用迅速, 口服不到半小时即可生效, 但有嗜睡等中枢抑制现象, 影响其广泛应用。

in B lymphocyte transformation ($P < 0.05$ & $P < 0.01$). The discussion indicated that Liu Wei *Rehmannia* Oral Liquid is effective in protecting the functions of hematopoiesis, immunity, heart, liver and kidney during chemotherapy, which provides an objective data for the clinical application.

Key words Liu Wei *Rehmannia* Oral Liquid, side-effect of drugs of anti-tumor chemotherapy
(Original article on page 734)

Application of Mixture of Reinforcing Qi and Promoting Blood Circulation to Prevent Hepatic Fibrosis due to BSA Immunologic Injury

Fang Bu-wu(方步武), Zhu Qi-gui(朱起贵), Zhu Ji-neng(竺稽能), et al
Affiliated Hospital of Hubei College of TCM, Wuhan(430061)

44 Wistar female rats were divided randomly into 4 groups—normal control(I), case control(II), reinforcing Qi and promoting blood circulation(III) and nourishing Yin and promoting blood circulation(IV). After 4 times of bovine serum albumin(BSA) shock injection, the group III and the group IV were medicated through gastric intubation for 40 days respectively with 300% mixture of reinforcing Qi and promoting blood circulation and 300% mixture of nourishing Yin and promoting blood circulation. The results suggest the mixture of reinforcing Qi and promoting blood circulation has the function of alleviating pathological changes of liver, reducing the content of liver collagen, improving erythrocytic function of clearing away immune complexes and regulating humoral immune response.

Key words bovine serum albumin, liver fibrosis, reinforcing Qi, promoting Blood circulation.
(Original article on page 738)

Effects of Crude Extract of Earthworm on Promoting Blood Circulation to Removing Stasis

Zhang Zu-xun(张祖珣), Wang Feng-feng(王峰峰), et al
Shanxi Medical College, Taiyuan(030001)

The crude extract of earthworm which has a thrombolytic effect could significantly decrease the plasma fibrinogen content and euglobulin lysis time ($P < 0.01$). An enzymatic preparation, containing many fibrinolytic enzymes, was prepared from the crude extract by ammonium sulphate precipitation and DEAE-cellulose chromatography. When administered in rabbits, the enzymatic preparation had an effect in hemorheology improvement. The experiment shows the enzymatic preparation could obviously lower the aggregation of platelets, decrease the viscosity of whole blood and plasma as well as the index of erythrocyte rigidity significantly ($P < 0.001$). All these effects demonstrated its ability in promoting blood circulation to remove stasis.

Key words earthworm, fibrinolytic enzyme, hemorheology.
(Original article on page 741)