

穿心莲提取物抗血小板聚集与释放作用及其机理的研究*

同济医科大学同济医院内科(武汉 430030)

张瑶珍 唐锦治 张玉金 徐慧珍

内容提要 本研究对 63 例心、脑血管疾病患者进行了服药后 3 h 及(或)1 周的临床观察,发现穿心莲(APN)对 1 及 5 min 血小板聚集率均有明显抑制作用($P < 0.001$),且随用药时间延长(1 周后)疗效更显著。通过 20 名志愿者服药前后血浆及血小板 5-羟色胺(5-HT)测定证明 APN 能显著抑制血小板释放 5-HT($P < 0.01$)。透射电镜观察到无论体外加药还是服药后 APN 均能明显抑制 ADP 诱聚所致的血小板管导系统扩张及颗粒释放。其抗血小板聚集作用可能与激活血小板膜系统的腺苷环化酶,提高血小板内 cAMP 有关。

关键词 穿心莲 血小板聚集 血小板释放 5-羟色胺

1989 年谭获等初步报告了穿心莲 [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, APN] 粗提物的抗血小板聚集作用^①,近年来我们对 APN 全草作了进一步分离、提纯,制成胶囊剂,经体内、外试验证明了其抗血小板聚集,促进纤溶及降低血粘度的效果。本课题对 APN 提取物抗血小板聚集作用进行了系统的临床观察,并就其对血小板释放 5-羟色胺(5-HT)的抑制作用及对血小板超微结构的影响进行了研究,报告如下。

资料与方法

一、APN 胶囊 由 APN 全草提取物制成,同济医院药厂提供,每粒含生药约 4 g。

二、试剂 ADP(Sigma)用 1/15 mol 的磷酸缓冲液(BSP)稀释,终浓度 1.5 μ mol。5-HT 硫酸肌酐(上海化学试剂采购供应站,瑞士产),以重蒸馏水稀释成 1 μ g/ml 溶液,4℃避光保存。邻苯二甲醛/盐酸混合液(OPT/HCl):OPT(Fluka)用无水乙醇按 0.5%比例溶解,加 10 容积 8 N HCl 盛于棕色瓶中,4℃保存。

三、仪器 (1)血小板聚集仪: DAM-I 型双道聚集仪,江苏丹阳电子研究所生产。

(2)荧光分光光度计: 日立 F-3000 型。(3)透射电镜: 德国 OPTON EM 10CR。

四、对象与方法

1. APN 抗血小板聚集作用 对象系本院及军工总医院住院或门诊患者共 73 例,男 45 例、女 28 例,年龄 42~90 岁(平均 59.5 岁),其中冠心病 41 例,急性或陈旧性心肌梗塞 18 例,高血压病 7 例,心绞痛 3 例,脑溢血恢复期 4 例,分为治疗组 63 例,对照组 10 例。所有患者用 APN 治疗前至少 1 周末服过钙离子拮抗剂及其他影响血小板功能的药物。治疗组口服 APN 胶囊 6~8 粒/次,每日 3 次,分别于服药前、第 1 剂后 3 h 及(或)1 周后采静脉血置塑料管内,以 3.4%枸橼酸钠 9:1 抗凝,分离富血小板血浆(PRP)及贫血小板血浆(PPP)供测定血小板聚集用,对照组不服药,与服药组相同时间取血测受试日清晨,3 h 后及 1 周后血小板聚集率的变化。

2. 血浆及血小板 5-HT 测定 据夏云等的测定法^②略加修改。志愿者 20 名,男 8 名,女 12 名,年龄 42~64 岁(平均 52.5 岁),均系本院职工,无明显心、脑血管疾病,糖尿病及肾病。受试日清晨空腹服 APN 胶囊 6 粒,分别于服药前、服药后 3 h 抽静脉血,分离 PPP 及 PRP。取服药前后 PRP 各 1 份,每份 300 μ l(计数血小板),加入终浓度 1.5

*卫生部资助课题

μmol 的 ADP 诱聚 5 min 后立即用 50 μmol 的冰点 EACA 300 μl 终止反应, 以 1000 g/min 离心 10 min 取上清液 500 μl (其中含血小板聚集过程中释放的 5-HT), 用以测定服药前、后血小板释放 5-HT 的量; 另取服药前后 PPP 各 0.5 ml 测定血浆 5-HT 的变化。

3. APN 对 ADP 诱聚的血小板超微结构的影响 志愿者 1 名, 女, 53 岁, 本院职工。于受试日空腹采静脉血分离 PRP 一式 3 份及服药后 3 h PRP 1 份。体外试验: 取 PRP 500 μl + APN (终浓度 0.1 g/ml) 15 μl , 37°C 孵育 5 min 后再加 ADP 15 μl ; 对照组取 PRP 500 μl + BSP 15 μl + ADP 15 μl 。体内试验: 取服药后 3 h 的 PRP 500 μl + ADP 15 μl , 另取空腹血 PRP 500 μl + ADP 15 μl 作为对照, 常规分离血小板, 戊二醛、锇酸双固定, 脱水、包埋、制片、用醋酸双氧铀及柠檬酸铅双染色, 置透射电镜下观察其体外加药及服药后 3 h APN 对 ADP 诱聚的血小板超微结构的变化。

结 果

一、服药前后 3 h 及 1 周血小板聚集率的变化 见附表。对 63 例患者测定服药前血小板聚集率, 其中观察服药后 3 h 血小板聚集率 53 例(次), 服药后 1 周 33 例(次)。服药前、服药后 3 h、服药后 1 周依次为 1 min 的血小板聚集率: $47.979 \pm 12.018\%$, $41.344 \pm 11.547\%$, $33.084 \pm 9.110\%$, 差异有显著性 ($P < 0.001$), 服药后 3 h、1 周血小板聚集抑制率分别为 13.8%、31.0%; 5 min 的血小板聚集率分别为 $69.734 \pm 19.611\%$, $59.646 \pm 20.725\%$, $44.545 \pm 18.127\%$ ($P < 0.001$), 血小板聚集抑制率分别为 14.5%、36.1%。而对照组相应 3 次所测血小板聚集率分别为 1 min: $51.055 \pm 10.857\%$, $49.603 \pm 14.192\%$, $52.420 \pm 14.870\%$, 5 min: $82.648 \pm 9.178\%$, $74.462 \pm 14.831\%$, $78.939 \pm 16.427\%$, 各组间无显著性差异 (P 均 > 0.05)。可见 APN 对血小板聚集有显著

附表 服 APN 前后血小板聚集率及 5-HT 含量比较 ($\bar{x} \pm S$)

例次		血小板聚集率(%)		例数	5-HT	
		1 min	5 min		血浆(ng/ml)	血小板释放(ng/10 ⁹)
服药前	63	47.979 ± 12.018	69.734 ± 19.611	20	80.27 ± 49.62	600.54 ± 193.46
服药后 3 h	53	$41.344 \pm 11.547^{**}$	$59.646 \pm 20.725^{**}$	20	79.96 ± 57.74	$518.85 \pm 193.46^{*}$
1 周	33	$33.084 \pm 9.110^{**}$	$44.545 \pm 18.127^{**}$			

注: 与服药前比较, $*P < 0.01$, $**P < 0.001$

抑制作用, 并随着用药时间延长而加强, 总有效率 80.9% (51/63), 12 例无效者中 7 例为服药前血小板聚集率 $< 50\%$ 者。说明 APN 对服药前血小板聚集率 $< 50\%$ 者无明显抑制作用。

二、APN 对血浆及血小板释放 5-HT 的影响 见附表。共测志愿者 20 名, 其血浆 5-HT 服药后与服药前比较无明显差异 ($P > 0.05$); 血小板释放的 5-HT 服药后较服药前明显降低 ($P < 0.01$), 抑制率为 13.7%, 说明 APN 能显著抑制血小板 5-HT 的释放。

三、APN 对 ADP 诱聚的血小板超微结构的影响 见图 1~4。不论体外加入终浓度 0.1 g/ml 的 APN, 还是口服 APN 3 h 后,

均能显著抑制 ADP 诱聚所致的血小板激活、管导系统扩张及颗粒释放。

讨 论

一、APN 抗血小板聚集作用及机理 APN 抗血小板聚集作用迅速、强烈, 在服药后 3 h 已出现, 1 周后更明显, 其作用机理尚不十分清楚, 目前认为血小板聚集有两条主要途径⁽³⁾, 即血小板内源性 ADP 释放及血小板膜磷脂花生四烯酸(AA)的代谢产物 TXA_2 。ADP 在血小板膜上的受体之一与腺苷环化酶有关^(4, 5), ADP 通过抑制此酶降低 cAMP, 从而使血小板聚集。 TXA_2 也是通过抑制此酶降

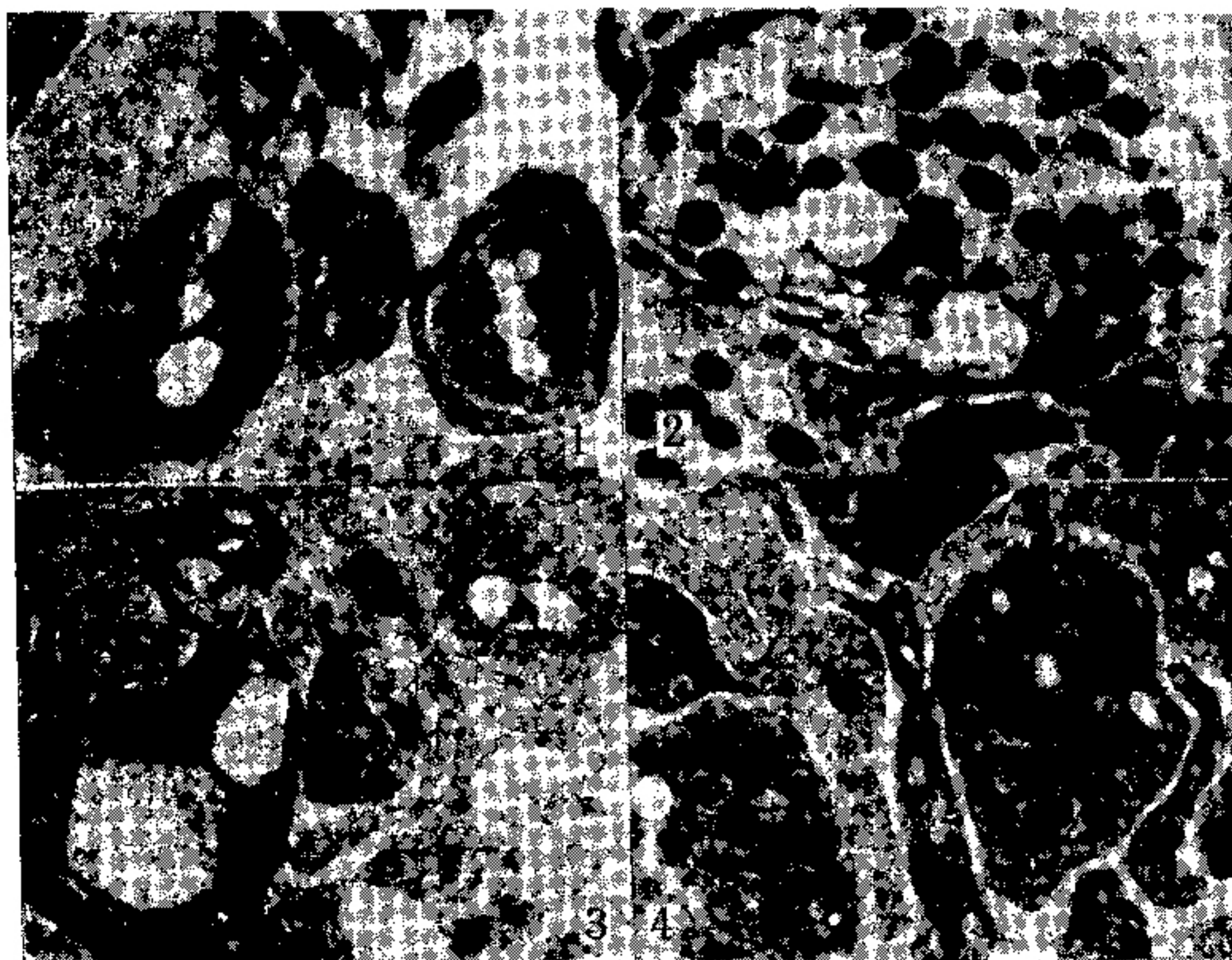


图1 体外试验对照, PRP+BSP 经 ADP 诱聚后, 血小板管导系统明显扩张, α 及致密颗粒罕见(释放), 血小板激活, 糖原颗粒大量出现。(×50000) 图2 体外实验: 加入终浓度 APN 0.1 g/ml 至 PRP 中经 ADP 诱聚后, 血小板管导系统呈封闭状态(少见扩张), 血小板内有大量 α 及致密颗粒, 糖原颗粒极少, 血小板未激活。(×100000) 图3 体内试验对照, 服药前 PRP 加入 ADP 诱聚后, 血小板管导系统扩张, α 及致密颗粒极少见(释放), 血小板被激活, 糖原颗粒大量出现。(×50000) 图4 体内试验, 服药后 3 h PRP 经 ADP 诱聚后血小板内有大量 α 及致密颗粒, 但颜色变浅, 管导系统扩张少见, 血小板内可见少许糖原颗粒, 血小板激活受抑制。(×63000)

低 cAMP 促进血小板聚集的。Zhao Huayue 等^[6]通过家犬心肌梗塞动物模型发现经 APN 处理的家犬血小板 cAMP 升高, 并通过冠心病患者口服 APN 观察发现其 TXA₂下降, PGI₂升高。已知 cAMP 可调节 PGI₂的合成, 而 PGI₂与 TXA₂含量的关系又能控制 cAMP 的水平, 决定血小板功能, 故 APN 降低血小板聚集率可能与激活血小板膜系统的腺苷环化酶; 提高血小板 cAMP 有关。

二、APN 对血小板释放功能及血小板超微结构的作用 本实验证明 APN 能显著地抑制血小板二相聚集, 后者乃与 AA 代谢途径的活化及血小板内 ADP 释放有关, ADP 及 5-HT 是血小板致密颗粒的内含物, 致密颗粒的释放功能可通过 5-HT 测定来判断; β -TG

是血小板 α 颗粒的内含物, 其血浆水平能客观地了解血小板释放功能的变化, 本课题证明 APN 能显著地抑制血小板内 5-HT 释放。Zhao Huayue 等^[6]已证明 APN 能抑制实验动物血小板 β -TG 的释放, 可见 APN 对血小板 α 及致密颗粒的释放均有抑制作用。此抑制作用与透射电镜所见血小板超微结构的变化相一致。由于血小板释放的 ADP 及 5-HT 均可增加血小板的活化反应, 导致血小板的进一步聚集, 释放产生正反馈效应, APN 抑制血小板释放, 打断了此正反馈环, 从而具有良好的抗血栓形成作用。

(对支持本工作的武汉军工总医院内科赵志立、单秀琴同志表示感谢)

(下转第 34 页)

(4)脑血流图和血脂检测结果则提示两组治疗均有所好转,但都无显著性差异。

实验研究

一、中风宁1号注射液对缺血性中风动物模型脑组织的影响 选用SD大白鼠60只,体重为250~320g,雌雄各半。制模方法采用改良李麟仙颈内动脉栓塞法⁽³⁾,术后将动物随机分为治疗、对照两组,治疗组予中风宁1号注射,每天1ml,对照组予维脑路通注射,每天1ml,均腹腔给药,7天后将动物断头处死,并将脑组织进行病理切片观察,发现治疗组药物改善脑内血供,减轻脑水肿作用明显优于对照组,病理报告结果:治疗组大鼠19只,病理改变程度轻度9只,中度9只,重度1只;对照组大鼠17只,轻、中、重度分别为5、8、4只。经Ridit法检验, $P<0.05$,两者之间有显著性差异,治疗组优于对照组。

二、中风宁1号注射液对小鼠抗缺氧、抗疲劳能力的影响 选用昆明种小白鼠60只。体重22~24g,均为雄性。先参考气虚型动物模型制作方法⁽⁴⁾制模,然后手术结扎一侧颈总动脉,制成气虚型缺血性中风动物模型,再将动物随机分为治疗组和对照组,治疗组予中风宁1号注射,对照组予维脑路通注射,治疗方法同实验一。7天后将两组动物同时放入水中,进行游泳耐疲劳试验,结果治疗组游泳运动时间为 121.48 ± 42.36 min,对照组平均游泳运动时间为 84.06 ± 56.00 min。经t检验,治疗组较对照组有显著性差异($P<0.01$),该结果表明中风宁1号注射液具有较强的抗缺氧、抗疲劳能力,并能提高脑组织的血流量。

讨论

在临床观察中,我们发现缺血性中风患者有以下特点:一是年龄多在45岁以上;二是多在安静或睡眠起床时发病;三是多有血瘀及气虚之表现。因此,我们认为该病的病机实质是气虚血瘀,治疗当以益气活血为主,此亦符合清代名医王清任的补阳还五汤之意。中风宁1号方即是以补阳还五汤加减而成,治病求因,辨证论治,故在临床取得较满意的疗效。

根据药理学检测,中风宁1号注射液中含有黄芪多糖、多种氨基酸、蛋白质、川芎嗪、阿魏酸、川芎总碱、葛根黄酮、大豆素和葛根素等成分。经现代药理学及有关资料介绍,黄芪多糖、氨基酸和蛋白质均有扶正补虚之功用;川芎嗪、阿魏酸、川芎总碱均有抗血栓形成作用;川芎嗪尚能提高血小板中cAMP含量,降低血小板表面活性,抑制血小板聚集,且能使已聚集的血小板解聚;葛根素则有降低血压作用;葛根黄酮则能使脑血流量增加,使异常的脑循环正常化,其他一些成分的功用尚有待于进一步的探讨。由于中风宁1号方含有以上多种成分,故其益气活血作用较为明显,有利于临床症状的改善。

参考文献

1. 孟家眉,等.脑血管疾病诊断要点.中华神经精神病杂志 1989; 22(3): 188.
2. 全国中风病协作组.中医中风病急诊诊疗规范,中医急诊通讯 1989; 1(1): 28.
3. 李麟仙.实验性缺血性脑卒中.昆明医学院学报 1987; 1(3): 309.
4. 上海医科大学动物实验中心.医学实验动物学.上海:上海科学技术出版社,1989: 118.

(上接第30页)

参考文献

1. 谭 获,等.穿心莲抗血小板聚集功能的研究.中西医结合杂志 1989; 9(9): 540.
2. 夏 云,等.血小板5-羟色胺与血浆5-羟色胺类物质荧光分光测定法.中华医学检验杂志 1989; 12(3): 176.
3. Wolfgang siess. Molecular mechanisms of platelet

activation. Physiological Reviews Printed in USA 1989; 69(1): 58.

4. Robert W,et al. Platelet receptors, hematology/Oncology. Clinics of North America 1990; 4(1): 27.
5. 阮长耿.血小板基础与临床.上海:上海科学技术出版社,1987: 14-18.
6. Zhao Huayue,et al. Antithrombotic effects of a Chinese medicinal herb for prevention of myocardial infarction. MMW 1990; 132: 40.