

· 实验研究 ·

补阳还五汤对大鼠动脉血栓形成前后动脉血中血小板活化因子含量的影响*

张继平¹ 李长龄² 张玉萍¹ 郭欣欣² 文凤妮¹ 王银叶² 黄卫战¹ 王桂玲²

内容提要 **目的:**探讨补阳还五汤一次和连续灌服给药对大鼠实验性动脉血栓形成前后动脉血中血小板活化因子(PAF)含量的影响。**方法:**将雄性 Wistar 大鼠分别随机分为 3 组。用药组一次或连续(14 天,每天 1 次)灌服补阳还五汤水煎液(32g/kg、16g/kg);对照组一次或连续(14 天,每天 1 次)灌服地塞米松片溶液(1mg/kg、0.5mg/kg);空白组均灌服等体积蒸馏水(10ml/kg)。末次给药 2h 后,复制实验性动脉血栓模型,用 PAF 含量的生物测定法,测定血栓形成前后动脉血中 PAF 含量和血栓 OT 值、血栓干重及血栓-体重指数。**结果:**补阳还五汤一次给药对血栓形成前后动脉血中 PAF 含量和血栓 OT 值无明显影响;而连续给药能明显降低血栓形成后动脉血中 PAF 含量($P < 0.05$),并明显提高动脉血栓 OT 值($P < 0.05$),降低血栓干重和血栓-体重指数($P < 0.05$)。**结论:**补阳还五汤对病理状态下 PAF 代谢有一定的拮抗效应,并对动脉血栓的发生、发展有一定的抑制作用。

关键词 补阳还五汤 实验性血栓 血小板活化因子

Experimental Study on Effect of Buyang Huanwu Decoction on Arterial Blood Platelet Activating Factor Content Pre- and Post-Arterial Thrombosis of Rats Zhang Jiping, Li Changling, Zhang Yuping, et al Foshan Hospital of TCM, Guangdong (528000)

Objective: To explore the effect of Buyang Huanwu Decoction (BHD) on arterial blood platelet factor (PAF) content in pre- and post-arterial thrombosis of rats. **Methods:** Male Wistar rats were randomized into 3 groups, the BHD group treated with BHD 32 g/kg, or with BHD 16 g/kg daily for 14 days consecutively, the control group treated with dexamethasone 0.5 - 1 mg/kg and the blank group treated with distilled water 10 ml/kg. Arterial thrombosis was duplicated in the animals 2 hours after final medication, the blood content of PAF (by bioassay), dry weight (W) and occlusion time (OT) of thrombus, and weight of thrombus/body weight (TW/BW) ratio were observed. **Results:** Consecutive BHD treatment could markedly lower the arterial blood content of PAF after thrombosis, increase the OT value of thrombus, reduce the dry weight of thrombus and the TW/BW ratio ($P < 0.05$), while no influence was found in rats treated with BHD once. **Conclusions:** BHD has certain antagonistic effect on pathologic PAF metabolism, and inhibitory effect on pathogenesis and development of arterial thrombosis.

Key words Buyang Huanwu Decoction, experimental thrombosis, platelet activating factor

补阳还五汤是清代名医王清任创制的方剂,具有补气、活血、通络之功,临床广泛用于治疗和预防缺血

性脑血管病、冠心病、心肌梗塞等动脉栓塞性疾病。已有实验证明:补阳还五汤具有抑制二磷酸腺苷(ADP)和胶原诱导的血小板聚集,促进血栓溶解;改善血液流变性,降脂抗凝,抑制血管壁释放 von Willebrand 因子(vW 因子),促进内皮细胞释放组织型纤溶酶原活化素,抑制纤溶酶原活化素抑制物,防止血栓形成⁽¹⁾。但其对大鼠实验性动脉血栓形成前后动脉血中血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)含量的影响,尚

* 广东省中医药管理局科研基金资助课题(No. 93039)和国家中医药管理局科研基金资助课题(No. 93C029)的一部分

1. 广东省佛山市中医院中医药研究室(广东 528000); 2. 北京医科大学药学院药理学教研室

未见报道。本研究利用大鼠实验性动脉血栓模型,探讨补阳还五汤对实验性动脉血栓形成前后动脉血中 PAF 含量的影响。

材料与方 法

1 动物 Wistar 大鼠,体重 220~250g,5~6 月龄,雄性。由北京医科大学实验动物科学部提供。

2 药物与试剂 按《医林改错》原方所载的药味和配方比例,按每钱以 3g 换算⁽²⁾(生黄芪 120g,当归尾 6g,赤芍 4.5g,地龙、桃仁、红花、川芎各 3g),于北京同仁堂药店购得饮片,经北京医科大学药学院生药教研室蔡少青博士鉴定。按文献⁽³⁾方法制备补阳还五汤水煎液(含生药量分别为 3.2g/ml、1.6g/ml);地塞米松片(山西大同市生物化学制药厂,批号:950401)。试剂:PAF 标准品(Sigma 公司);明胶(Serva 公司);肌酸磷酸(CP, Serva 公司);肌酸磷酸激酶(CPK, 中国科学院上海生化所,批号:951023);阿斯匹林(ASA, 北京朝阳门药品分装厂,批号:920810);小牛血清白蛋白(BSA, 北京红星生化技术公司,批号:950321);磷脂酶 A₂(PLA₂, Sigma 公司);银杏苦内酯 B(浙江宁波立华制药有限公司,批号:961029)。其余试剂均为国产分析纯。

3 主要仪器 MPG-3D 型多能双通道血液凝聚仪(上海高机应用技术研究);BT87-3 型实验性体内血栓形成测定仪(包头医学院心血管研究所)。

4 动物分组及处理 用随机数字表法,按动物体重随机分为 3 组。一次性灌服给药者每组 11 只大鼠,用药组(A 组)灌服补阳还五汤水煎液(32g/kg);对照组(B 组)灌服地塞米松片溶液(1mg/kg);空白组(C 组)灌服等体积蒸馏水(10ml/kg)。而连续 14 天灌服给药者每组 13 只大鼠,用药组(D 组)灌服补阳还五汤水煎液(16g/kg);对照组(E 组)灌服地塞米松片溶液(0.5mg/kg);空白组(F 组)灌服等体积蒸馏水(10ml/kg),连续 14 天。

给药结束后将大鼠称重,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉(40mg/kg),末次给药 2h 后,按文献⁽⁴⁾方法复制实验性动脉血栓模型,记录血栓形成的堵塞时间(occlusion time, OT),并计算血栓干重和血栓-体重指数。动脉血的 PAF 含量测定用 PAF 含量的生物测定法⁽⁵⁾。

5 提取的 PAF 的鉴定 参照 Benveniste 法⁽⁶⁾:(1)PLA₂ 处理:将标准品 PAF 及提取物分别与 PLA₂ 温育(10μg/ml, 37℃, 30min),再观察对家兔洗涤血小板的聚集作用。(2)薄层层析(TLC):将标准品 PAF 和提取物在同一硅胶 G 板上点样展开(展开剂:氯仿:甲醇:水比例为 70:35:7),碘蒸气显色以确定 R_f 值,并将标准品和提取物同一 R_f 值组分刮下,经重新提取后观察致血小板聚集效应。(3)阻断 ADP(CP 1mmol/L CPK 10u/ml)的花生四烯酸(AA)/血栓素 A₂(TXA₂)(ASA 0.1mmol/L)介导的聚集途径后,观察标准品 PAF 和提取物对家兔洗涤血小板聚集反应。(4)特异性 PAF 受体拮抗剂银杏苦内酯 B 处理:于血小板悬液中加入 0.1mmol/L 银杏苦内酯 B, 37℃ 温育 20min 后,观察对加入标准品 PAF 及提取物的聚集反应。

6 统计学分析 所有资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SAS 统计处理软件在 IBM-PC 微机上进行分析,组间比较用单因素方差分析(F 检验);两组比较用 q 检验;血栓形成前后的 PAF 含量比较用配对 t 检验。

结 果

1 补阳还五汤对大鼠动脉血栓形成前后动脉血中 PAF 含量及动脉血栓 OT 值、血栓干重和血栓-体重指数的影响 见表 1。各组数据均呈正态分布,地塞米松片溶液长期给药组大鼠体重增长缓慢,明显低于补阳还五汤组和蒸馏水组($P < 0.01$)。动脉血栓形成前 PAF 含量各组间均无显著性差异($P > 0.05$),A

表 1 补阳还五汤对大鼠动脉血栓形成前后动脉血中 PAF 含量及 OT 值、血栓干重和血栓-体重指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	PAF 含量(mg/L)		动脉血栓 OT 值(s)	血栓干重(mg)	血栓-体重指数(mg/100g)
			血栓形成前	血栓形成后			
A	11	237 ± 6	1100 ± 180 [△]	2.0 ± 0.6	1.7 ± 1.0	1.01 ± 0.23 [△]	0.43 ± 0.10 [△]
B	11	242 ± 9	1.6 ± 0.8	2.2 ± 1.3	1000 ± 190	1.14 ± 0.21	0.47 ± 0.09
C	11	234 ± 16	2.2 ± 1.0	2.6 ± 1.5	960 ± 130	1.29 ± 0.27	0.55 ± 0.12
D	13	314 ± 39 [▲]	2.9 ± 2.0	3.2 ± 1.9 ^{○○}	1150 ± 170 [○]	1.19 ± 0.30 [○]	0.38 ± 0.09 [○]
E	13	248 ± 25 ^{○○}	3.5 ± 1.1	2.9 ± 1.9 [○]	1270 ± 180 ^{○○}	1.11 ± 0.30 ^{○○}	0.45 ± 0.11
F	13	320 ± 32	3.6 ± 1.5	5.0 ± 1.2 [*]	990 ± 130	1.65 ± 0.48	0.52 ± 0.16

注:与本组血栓形成前比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,[△] $P < 0.05$;与 E 组比较,[▲] $P < 0.01$;与 F 组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$

组血栓形成前后血液中 PAF 含量无显著性差异($P > 0.05$);而 D 组血栓形成后 PAF 含量明显低于 F 组($P < 0.05$),但与 E 组无明显差异($P > 0.05$),且 F 组 PAF 含量明显高于血栓形成前($P < 0.05$)。A 组动脉血栓 OT 值与 B 和 C 组比较,无显著性差异($P > 0.05$),而 D 组动脉血栓 OT 值明显高于 F 组($P < 0.05$);但血栓干重和血栓-体重指数 A 组明显低于 C 组, D 组明显低于 F 组($P < 0.05$)。

2 提取的 PAF 的鉴定 (1)PLA₂ 处理:提取物和标准品 PAF 与 PLA₂ 温育后致血小板聚集能力明显降低。(2)TLC:用硅胶 G 板展开法显示 PAF 的 R_f 值为 0.34,提取物与标准品 PAF 的 R_f 值一致,在 R_f 值 0.34 处刮下的组分经重新萃取后仍有致血小板聚集活性。(3)ASA 及 CP/CRK 处理:血小板悬液经阻断 AA/TXA₂ 和 ADP 介导的聚集途径,PAF 和提取物仍有致聚活性。(4)银杏苦内酯 B 处理:0.1mmol/L 银杏苦内酯 B 能完全抑制 6mg/L PAF 的致聚活性,同样加入提取物后也不发生聚集反应。

讨 论

许多严重危害人类健康疾病的发生发展与血栓形成密切相关,而对血栓性疾病的治疗措施中,保护血管内皮又为首要措施。血管内皮细胞在受到冷、热、电流、缺氧等多种理化因素刺激下,均可释放 PAF,PAF 是迄今发现体内最强的血小板聚集剂。PAF 与血小板、白细胞和血管内皮细胞的相互作用,在血栓形成过程中起着重要作用。是诱导血小板聚集的第三条途径^[7]。本研究结果表明:补阳还五汤对实验性动脉血栓形成前血液中 PAF 含量无明显影响,表明补阳还五汤对生理状态下大鼠血液中 PAF 代谢无明显影响;但对动脉血栓形成后动脉血中 PAF 含量有明显的降低作用,以长期灌服给药作用明显;且明显提高动脉血栓 OT 值,延长动脉血栓形成的潜伏期;降低动脉血栓的干重和血栓-体重指数,说明补阳还五汤对病理状态下大鼠动脉血中 PAF 含量的升高具有明显的抑制作用,对预防动脉血栓性疾病的发生发展有一定的积极意义。

有学者研究发现地塞米松对家兔内毒素休克时 PLA₂ 的活性及 PAF 含量的升高具有明显的抑制作用^[8]。补阳还五汤中的地龙煎剂静脉注射可引起大鼠血压明显下降,如果预先使用特异性 PAF 受体阻断剂 CV6209,可显著抑制地龙的降压作用,并且从地龙脂质中分离到一种类 PAF 物质,含量约 90~130ng/g,并随季节变化^[9,10];川芎能显著降低急性脑梗塞患者脑脊液中 PAF 含量^[11];川芎嗪对豚鼠实验性哮喘时血

浆 PAF 含量有明显的降低作用^[12]。本研究结果亦提示:地塞米松长期灌服给药能明显降低实验性动脉血栓形成后动脉血中的 PAF 含量;而补阳还五汤对 PAF 含量也有明显的降低作用,与地塞米松无明显差异,且对实验性血栓的治疗作用表现出多方面的综合效应,为补阳还五汤用于预防血栓性疾病的发生或再发提供了新的实验依据。国外目前对 PAF 拮抗剂的研究,多从特异的结构上或从天然植物中分离活性成分入手;而国内仅仅观察了川芎、海风藤、款冬花等单味中药对 PAF 的拮抗作用^[13],从整体水平观察中药复方对 PAF 代谢的拮抗作用尚为空白。从治疗血栓性疾病行之有效的中药传统复方中发掘抗 PAF 的方剂,从整体水平观察中药复方对 PAF 的拮抗作用,将更能体现中医学整体观念的思想,本研究在这方面作了有益的尝试。

参 考 文 献

1. 贺石林,彭延古,李安国,等.补阳还五汤对血液凝固影响的实验研究.湖南中医学院学报 1989;9(4):212—214.
2. 许济群,王绵之.方剂学.上海:上海科学技术出版社,1990:14—15.
3. 陈 奇,邓文龙,张世玮,等.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1994:67—68.
4. 李仪奎,王钦茂.中药药理实验方法学.上海:上海科学技术出版社,1991:145—146.
5. 刘宝军,郑茂荣,李少华,等.氮芥和地塞米松对人角朊细胞 PAF 的抑制作用.中华皮肤科杂志 1994;27(1):10—12.
6. 刘宝军,郑茂荣,周鼎耀,等.银屑病患者血和皮损处 PAF 生物测定.中华皮肤科杂志 1992;25(4):232—234.
7. Joseph R, Welch KMA, D'Andrea G, et al. Platelet-Activating factor and red blood cells. Thromb Res 1989;53:629—633.
8. 杜文华,李 著,陆松敏,等.脂酶 A₂ 抑制剂对家兔内毒素休克血中 PAF 活性的调节作用.第三军医大学学报 1995;17(6):489—491.
9. 程能能,马越鸣.地龙中降压的类 PAF 物质.中国中药杂志 1993;18(12):747—749.
10. 程能能,杉浦 隆之,福田 辉夫,等.地龙(蚯蚓)体内磷脂的组成和 PAF 的生物合成.药学学报 1992;27(12):886—890.
11. 刘 众.川芎对急性脑梗塞患者脑脊液中 PAF 含量的影响.第二军医大学学报 1991;12(2):153—155.
12. 于化鹏,李东升,府 军.过敏性哮喘豚鼠 PAF 的变化及川芎嗪的影响.中国病理生理杂志 1995;11(3):317—320.
13. 史玉俊.植物中的抗 PAF 成分.国外医药植物药分册 1990;5(4):146—149.

(收稿:1997-12-22 修回:1998-08-15)