

3.2 血竭总黄酮对大鼠实验性静脉血栓形成的影响: 血竭总黄酮 160 和 80 mg/kg 体重连续 ig 2 周, 可明显抑制大鼠实验性深静脉血栓形成。血栓的湿重、干重与模型组动物相比均有明显的降低 ($P < 0.01$), 且有一定的量效关系, 血竭总黄酮 40 mg/kg 体重组实验动物血栓的湿重、干重与模型组动物相比, 降低不明显 ($P > 0.05$)。结果见表 3。

3.3 血竭总黄酮对结扎冠脉所致大鼠急性心肌缺血引起的心电图改变及心肌梗死面积的影响: 血竭总黄酮 200, 100 mg/kg 体重, 每日 ig 一次, 连续灌胃 10 d, 可明显减少结扎冠状动脉所致大鼠急性心

表 3 血竭总黄酮对大鼠实验性静脉血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (n)	血栓重量及重量降低百分率			
			湿重 (mg)	降低 (%)	干重 (mg)	降低 (%)
模型	-	18	18.8 ± 5.7	-	6.7 ± 2.0	-
舒血宁	80	15	7.9 ± 4.1**	57.9	3.1 ± 1.7**	53.7
血竭总黄酮	160	15	7.5 ± 4.3**	60.1	3.0 ± 1.5**	55.2
	80	14	10.3 ± 6.4**	45.2	4.0 ± 2.3**	40.3
	40	13	14.7 ± 8.1	21.8	5.7 ± 2.8	17.2

与模型组比较: ** $P < 0.01$

肌缺血引起的心肌梗死面积, 并可降低由心肌缺血造成的肢体导联心电图 J 点的升高。结果见表 4。

表 4 血竭总黄酮对结扎冠脉所致大鼠急性心肌缺血引起的心电图改变及心肌梗塞面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (n)	梗死面积 (%)	J 点升高 (mV)			
				正常时	0 h	2 h	6 h
模型	-	15	24 ± 4	0.8 ± 0.6	6.7 ± 2.3	5.7 ± 2.0	5.0 ± 1.4
5-单硝异山梨醇酯	10	13	16 ± 7**	0.8 ± 0.6	6.0 ± 1.5	4.1 ± 1.2*	3.3 ± 1.2**
舒血宁	100	13	17 ± 6**	0.7 ± 0.5	6.2 ± 1.7	4.2 ± 1.7	3.6 ± 1.4*
血竭总黄酮	200	14	17 ± 5**	0.6 ± 0.6	5.5 ± 1.0	4.0 ± 1.5*	3.5 ± 1.8*
	100	15	19 ± 5*	0.6 ± 0.5	5.7 ± 1.6	4.3 ± 1.6*	3.6 ± 1.6*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

4 讨论

血竭在我国作为名贵中药已有 1 500 年的历史, 始载于南北朝时代的《雷公炮炙论》。《本草纲目》谓血竭能散滞血诸痛, 《本草经疏》亦有血竭为散瘀血、生新血之要药的论述^[3]。现代医学研究证实, 血竭具有改善机体微循环, 调节机体新陈代谢, 改善机体免疫功能等作用。既能活血化瘀, 又能收敛止血, 在治疗中医血症方面具有双向调节作用。血瘀一旦解除, 微循环改善, 血液畅通, 局部肿痛自然消失, 血供充足, 局部抗体必然增加, 失活组织也会自行分

离脱去^[4]。我们的实验表明, 血竭总黄酮能够明显的抑制血小板活性和血栓形成, 对于结扎冠脉所致的大鼠急性心肌缺血也有明显的改善作用。这为血竭对临床某些心血管疾病的治疗提供了实验依据, 并为阐明血竭的有效部位和活性成分提供了参考。

参考文献:

- [1] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [3] 李仲昆, 王衍. 血竭的开发应用[J]. 中草药, 1999, 30(6): 附 1.
- [4] 张茹. 对国产血竭的认识[J]. 中原医刊, 2000, 27(9): 59.

当归多糖硫酸酯对凝血和血小板聚集的作用

杨铁虹¹, 商 澎², 梅其炳¹, 贾 敏^{1*}

(1. 第四军医大学 基础部药理学教研室, 陕西 西安 710033; 2. 西安交通大学生物工程研究所, 陕西 西安 710049)

摘要: 目的 探讨当归多糖 (AP-0) 及其硫酸酯 (APS) 对凝血和血小板聚集的影响。方法 红外比浊法测定血小板聚集率、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT); 断尾法测出血时间; 玻片法测凝血时间; 肝素抗凝测血液流变学指标。结果 当归多糖及其硫酸酯显著延长凝血时间, 缩短出血时间; 显著性延长 TT 和 APTT, 而对 PT 影响较小; 显著升高 5 min 血小板聚集率; AP-0 显著升高低切全血粘度 (η_h), 增强红细胞 (RBC) 的聚集性 (AI); 而 APS 显著降低高、低切变率 η 、血浆粘度 (PV) 和 AI。结论 当归多糖及其硫酸酯有较强的抗凝血和止血作用, 其止血作用与其促进血小板聚集作用有关; 当归多糖硫酸酯对家兔血流变的改善作用较当归多糖的作用好。

* 收稿日期: 2002-04-15

作者简介: 杨铁虹 (1972-), 男, 陕西省西安市人, 博士研究生, 1995 年毕业于华西医科大学药学院, 获学士学位, 1995 年至今于第四军医大学药理教研室任教, 2000 年获医学硕士学位。主要从事中药药理研究。
Tel: (029) 3374555 E-mail: Tiejieongy1972@163.net

关键词: 当归多糖; 多糖硫酸酯; 血小板聚集; 凝血

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)11-1010-04

Effects of *Angelica polysaccharide* and its sulfates on coagulation and platelet aggregation

YANG Tie-hong¹, SHANG Peng², MEI Qi-bing¹, JIA Min¹

(1. Department of Pharmacology, Faculty of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China; 2. Institute of Bioengineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of *Angelica polysaccharide* (AP-0) and its sulfates (APS) on blood coagulation and platelet aggregation. **Methods** Infrared turbidimetric method was used to estimate platelet aggregation, prothrombin time (PT) and thrombin time (TT), actiated partial thromboplastin time (APTT); bleeding time (BT) was measured by cutting the mouse's tail and coagulate time (CT) was measured by glass method sheet; hemorheology was measured with heparin as anticoagulant. **Results** The AP-0 and APS prominently enhanced the platelet aggregation at 5 min (PAG [5]), while showed less effects on the maximum platelet aggregation (PAG [M]); they, especially APS-1, also markedly prolonged CT but shortened BT, both AP-0 and APS-1 significantly prolonged TT and APTT in all experimental dosage, while only APS-1 in high dosage (8.46 mg/kg) significantly prolonged PT; AP-0 increased the aggregation index (AI) of RBC and the whole blood viscosity (η_b) at shear rate of 5 s^{-1} at a dose of 2.00 mg/kg, however, unlike AP-0, APS-1 decreased AI and η_b at shear rate of 5 s^{-1} and 230 s^{-1} . **Conclusion** These results suggest that AP-0 and APSs have potent anticoagulant and haemostasis effects. The haemostasis effect is related to promoted platelet aggregation. Ameliorative effect of *Angelica polysaccharide sulfate* on hemorheology is better than that of *Angelica polysaccharide* itself.

Key words: *Angelica polysaccharide* (AP-0); polysaccharide sulfates; platelet aggregation; blood coagulation

近年来发现,多种天然或半合成的硫酸化多糖在体内、外实验中表现出不同程度的抗凝血活性,有的相当于或优于肝素^[1,2]。当归的活血化瘀作用历来被医家所重视,阿魏酸被认为是当归活血化瘀的有效成分之一,能够有效地抑制血小板的聚集^[3]。当归多糖是当归补血的主要成分之一,在抗凝血方面的研究未见报道。作者已提取理化性质良好的当归多糖^[4],并进行了硫酸酯化修饰,得到了8个不同取代度的硫酸化当归多糖^[5]。本实验研究当归多糖及其硫酸酯对凝血和血小板聚集的影响。

1 材料

1.1 药品与主要试剂:当归多糖(AP-0)和硫酸化当归多糖(APS-1~APS-8)为自制,用时以生理盐水溶解;腺苷二磷酸(ADP),上海丽珠东风生物技术有限公司;凝血酶试剂(批号:00101),凝血活酶试剂(批号:00101),部分凝血活酶试剂(批号:00105),参比血浆(批号:00104),上海华山医院。

1.2 仪器:TYXN-91型智能血液凝集仪,上海通用机电技术研究所;NXE-1型锥板式粘度计,WNG-201红外血浆粘度计,成都仪器厂。

1.3 动物:家兔,体重2.0~2.5 kg,雌雄不限;昆明种小鼠,体重18~22 g,雌雄各半,由本校实验动

物中心提供。

2 方法

2.1 对家兔血小板聚集的影响:家兔戊巴比妥钠按30 mg/kg麻醉,颈动脉插管采血,3.28%枸橼酸钠抗凝(1:9)。室温下1000 r/min离心15 min制备富血小板血浆(PRP,血小板计数为 $10^8/\text{mL}$);再3000 r/min离心15 min制备贫血小板血浆(PPP)。设对照组:PRP 200 μL +生理盐水10 μL ;给药组:PRP 200 μL +药物10 μL 。37 预热2 min后,搅拌加入ADP 10 μL (终浓度2 $\mu\text{mol/L}$)为诱导剂,记录5 min聚集曲线,观察最大聚集率(PAG[M])和5 min聚集率(PAG[5])。

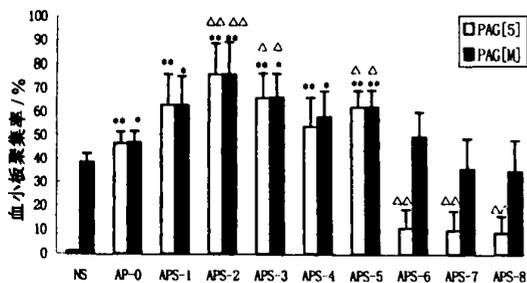
2.2 对小鼠出、凝血时间的影响:昆明种小鼠60只,体重(20.2±1.3)g,雌雄各半,分为6组,每组10只。ip生理盐水或AP-0,APS-1,APS-2,APS-4,APS-7,给药3 d,1次/d,末次给药后1 h断尾法^[6]测出血时间(BT),玻片法^[6]测凝血时间(CT)。

2.3 对家兔出、凝血时间和血流变的影响:从2.2实验结果可知,APS-1的抗凝活性最高,选取APS-1进行深入的抗凝血和血液流变学研究,同时与AP-0作比较。家兔24只,雌雄不限,体重(2.4±1.3)kg,随机分为6组。耳缘静脉连续给药3 d,

1次/d,末次给药后1h耳中央动脉采血,其中1.8 mL血以3.28%枸橼酸钠抗凝(1/9),3000 r/min离心10 min取血浆,按仪器使用手册方法测定凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT);另外约5 mL血肝素抗凝进行血液流变学检查。

3 结果

3.1 对家兔血小板聚集的影响:¹对PAG[M]的影响:在实验浓度下,AP-0和APS-6,APS-7,APS-8对PAG[M]的影响与生理盐水(NS)组没有显著性差异($P > 0.05$);而APS-1~APS-5对PAG[M]的影响与NS组相比有显著性差异($P < 0.05, 0.01$);与AP-0组相比(在实验用浓度下,各组的糖含量相同),APS-2,APS-3和APS-5有显著性差异。^④对PAG[5]的影响:与NS组相比,AP-0和APS-1~APS-5存在极其显著的差异;但与AP-0组相比,APS-2,APS-3,APS-5显著升高PAG[5],APS-1无影响,而APS-6,APS-7,APS-8显著降低PAG[5]。见图1。



与对照组比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;
与AP-0组比: $P < 0.05$ $P < 0.01$

图1 AP-0及APS对ADP(终浓度2 μmol/L)诱导的体外兔血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 对小鼠出、凝血时间的影响:¹对凝血时间的影响:AP-0,APS-1,APS-2,APS-4,APS-7在实验剂量下对凝血时间的延长与NS组比均有差异,其中APS-1差异极其显著。与相应剂量的AP-0(5 mg/kg,此剂量下AP-0和实验用APS-1,APS-2,APS-4,APS-7的糖含量相同)比较,APS-1对凝血时间的延长有统计学差异,表现出了更强的抗凝血活性。^④对出血时间的影响:在实验剂量下,AP-0,APS-1,APS-2,APS-4,APS-7均显著缩短出血时间($P < 0.05, 0.01$);与相应剂量的AP-0比较,APS-1,APS-2,APS-4,APS-7均显著缩短出血时间($P < 0.05, 0.01$),见表1。

3.3 对家兔出、凝血时间和血流变的影响

3.3.1 AP-0,APS-1对家兔出、凝血时间的影响:

表1 当归多糖及其硫酸酯对小鼠凝血时间和出血时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	CT (min)	BT (min)
对照	-	5.47 ± 1.02	10.66 ± 2.79
AP-0	5.0	7.11 ± 1.41*	6.44 ± 2.42*
APS-1	10.8	9.24 ± 1.63***	2.21 ± 1.64**
APS-2	11.0	8.79 ± 1.52**	1.95 ± 1.56**
APS-4	9.9	8.57 ± 1.77**	2.91 ± 1.78**
APS-7	8.3	8.00 ± 1.48**	3.58 ± 1.92**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;
与AP-0组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

与NS组比,AP-0和APS-1对TT和APTT影响较大,实验剂量下均有显著性差异($P < 0.05, 0.01$),而对PT影响较小,APS-1仅在8.64 mg/kg剂量有显著性差异($P < 0.01$)。APS-1 4.32 mg/kg剂量组与AP-0 2.00 mg/kg剂量组比(此时二者含糖量相同),对TT,APTT的影响有显著性差异($P < 0.05, 0.01$),而对PT的影响无统计学差异。见表2。

表2 AP-0和APS-1对兔TT,PT和APTT的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 (mg/kg)	TT (s)	PT (s)	APTT (s)
对照	-	13.8 ± 1.8	8.5 ± 1.0	20.7 ± 2.2
肝素	450 (U/kg)	> 60	15.35 ± 2.9**	> 300
AP-0	2.00	20.5 ± 2.6**	8.8 ± 1.2	26.8 ± 3.1*
APS-1	2.16	18.6 ± 2.3*	8.0 ± 0.9	49.6 ± 3.8**
	4.32	> 60	8.9 ± 1.4	124.9 ± 4.3**
	8.64	> 60	12.4 ± 1.8**	> 300

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;
与AP-0组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

3.3.2 AP-0,APS-1对家兔血流变的影响:AP-0在2.00 mg/kg剂量下显著升高切变率为5 s⁻¹时的全血粘度(η),增强RBC的聚集性(AI),与对照组比差异显著($P < 0.01$);不影响切变率为230 s⁻¹时的 η ,也不影响血浆粘度(PV)和RBC的变形性(TK)。APS-1在剂量为4.32,8.64 mg/kg时显著降低切变率为230,5 s⁻¹时的 η ($P > 0.05, 0.01$),在8.64 mg/kg时显著降低PV和AI($P < 0.01$);在实验剂量范围内,不影响TK。APS-1 4.32 mg/kg和AP-0 2.00 mg/kg剂量组比(此时二者含糖量相同),APS-1能显著降低切变率为5 s⁻¹时的 η 和AI($P < 0.01$)。见表3。

4 讨论

本研究发现,当归多糖及其硫酸酯在凝血方面表现出双向性调节作用,既有显著的抗凝血活性,又有明显的止血作用。其抗凝血作用主要是影响内源性凝血系统,各剂量下对APTT的延长作用显著,

表 3 AP-0 和 APS-1 对免血流变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 (mg/kg)	η_s (m pa. s)		PV	TK	AI
		230 s ⁻¹	5 s ⁻¹			
对照	-	5.70 ± 0.21	18.23 ± 1.13	1.47 ± 0.03	0.95 ± 0.04	3.20 ± 0.32
肝素	450 (U/kg)	5.20 ± 0.39	15.87 ± 1.32*	1.45 ± 0.04	1.00 ± 0.03	3.00 ± 0.53
AP-0	2.00	5.52 ± 0.18	34.24 ± 1.21* *	1.44 ± 0.03	1.02 ± 0.04	6.22 ± 0.42* *
APS-1	2.16	6.24 ± 0.61	19.50 ± 1.06	1.48 ± 0.06	1.08 ± 0.02	3.61 ± 0.22
	4.32	4.95 ± 0.54*	13.81 ± 1.43* *	1.43 ± 0.05	1.04 ± 0.01	2.76 ± 0.46
	8.64	4.47 ± 0.18* *	9.94 ± 0.19* *	1.36 ± 0.03* *	1.10 ± 0.03	2.21 ± 0.13* *

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 AP-0 组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

对外源性凝血系统影响较弱, 仅在较大剂量下对 PT 有显著的延长作用。止血主要与血小板功能有较大关系, 当归多糖及其硫酸酯能促进血小板聚集, 加之其对外源性凝血影响较小, 因此表现出显著的止血作用。这可能是它们止血的作用途径, 这与其抗凝血活性并不矛盾。当归多糖及其硫酸酯对 ADP 诱导的血小板聚集有增敏作用, 在只能诱发血小板第一相聚集即原发性聚集的 ADP 浓度下, 可以发生第二相即次发性聚集。对血小板聚集的影响与取代度有一定的相关性, 取代度较低时影响较小, 取代度较高时影响较大。在血液流变学方面, 当归多糖增高切变率时的全血粘度可能是其增高红细胞的聚集性所致, 这不利于改善血流动力学; 而经硫酸化修饰后在这方面与当归多糖的作用相反——降低高、低切变率时的全血粘度和红细胞的聚集性, 同时抗凝血活性显著提高, 有利于改善血流动力学。

有关构效关系的研究结果表明, 硫酸化多糖抗凝血活性的高低与多糖的相对分子质量, 硫酸根基的取代度及取代位置有关^[2,7-9]。Alban 等^[7]比较了 6 种不同取代度 (DS = 0.30 ~ 2.26) 的昆布多糖硫酸酯, 结果在一定范围内, 其抗凝血活性随取代度的增加而增强。Soeda 等^[8]体外实验证明, 过硫酸岩藻依聚糖刺激由组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 催化的纤溶酶原活化作用和增强抗凝血酶- (AT-)、肝素辅因子- (HC-) 对凝血酶的抑制作用, 其大小随相对分子质量的减小而减小。

关于硫酸化多糖的抗凝血作用机制, Alban 等^[7]认为昆布多糖硫酸酯由于分子中没有特定的戊糖单位, 不能与 AT- 特异性结合, 所以在 TT 实验和 Heptest 中活性较低。但是, 昆布多糖硫酸酯具有多负电荷特性, 而 AT- 由于分子中存在赖氨酸、精氨酸残基, 有高密度的正电荷, 二者可以非特异性结合, 从而激活 AT-, 故其在 APTT 试验中有相对较高活性。由此推测, 一定的阴离子电子密度对抗凝血作用是很必要的。还有报道^[10-12]指出, 有些硫酸化多糖 (如岩藻依聚糖, 硫酸皮肤素等) 是通过选择性激活 HC- 而非 AT- 发挥其抗凝血作用的。

参考文献:

- [1] Doctor V M, Lewis D, Coleman M, et al. Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates [J]. Thromb Res, 1991, 64(4): 413-425.
- [2] Franz G, Alban S. Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives [J]. Int J Biol Macromol, 1995, 17(6): 311-314.
- [3] Mei Q B, Tao J Y, Cui B. Advances in the pharmacological studies of *radix angelica sinensis* (Oliv) Diels (Chinese Dang-gui) [J]. Chin Med J, 1991, 104(9): 776-779.
- [4] 商潮, 杨铁虹, 贾敏, 等. 当归多糖的分离、纯化及分析鉴定 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1311-1314.
- [5] 杨铁虹, 贾敏, 商澎, 等. 当归多糖硫酸酯的合成及其对脾细胞增殖的作用 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(5): 432-434.
- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [7] Alban S, Kraus J, Franz G. Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity [J]. Arzneimittelforschung/Drugs Res, 1992, 42(8): 1005-1008.
- [8] Soeda S, Ohmagari Y, Shimenoh H, et al. Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities [J]. Thromb Res, 1993, 72(3): 247-256.
- [9] Dace R, McBride E, Brooks K, et al. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides [J]. Thromb Res, 1997, 87(1): 113-121.
- [10] Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi T, et al. Selective activation of heparin cofactor by a sulfated polysaccharide isolated from the leaves of *Artemisia princeps* [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(7): 643-649.
- [11] Church F C, Meade J B, Treanor R E, et al. Antithrombin activity of fucoidan [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 3618-3623.
- [12] Scully M F, Kakkar V V. Identification of heparin cofactor as the principal plasma cofactor for the antithrombin activity of pentosan polysulfate (SP54) [J]. Thromb Res, 1984, 36: 187-194.