

室试验结果表明, HSYA 为一血小板激活因子受体拮抗剂, 拮抗血小板激活因子的作用为 HSYA 抗血栓作用的机制之一。本实验结果表明 HSYA 可抑制 ADP 诱发的家兔血小板聚集, 延长 PT 及 RT, 提示该成分为红花抗血栓有效成分, 可阻断多种途径诱发的血栓形成反应。抑制血栓形成为红花活血化瘀的主要途径之一, 本研究结果对进一步阐明红花活

血化瘀作用机制, 指导开发相关新药具有重要意义。

#### References:

- [1] Zang B X, Jin M, Si N, et al. The antagonistic effect of hydroxysafflor yellow A against platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 696-699.
- [2] Wu W, Li J R, Chen W M, et al. Inhibition effect of flavones from *C. tinctorius* L. against PMN aggregation and adhesion induced by platelet activating factor [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(10): 743-745.

## 天麻醋酸乙酯提取物抗 ADP 诱导的家兔血小板聚集作用及机制

淤泽涛, 林青\*, 李秀芳, 代蓉, 孟保华, 何晓山, 王妍

(云南中医学院 药理教研室, 云南昆明 650200)

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Blume 的干燥块茎, 古名赤箭, 是传统的平肝息风药。现代药理学研究表明天麻及其制剂具有镇痛、镇静、催眠、延缓衰老、扩张血管、降低血黏度及抑制血小板聚集等作用<sup>[1]</sup>。本室前期研究发现天麻醋酸乙酯萃取部分(主要成分为以 4,4'-二苯酚甲烷、三聚对羟基苯甲醇等为主的酚性化合物)具有较强的抗血小板聚集作用, 本研究在前期工作基础上对天麻醋酸乙酯部分进行柱色谱分离, 筛选出活性最强的 b 段, 观察其对家兔血小板聚集的影响, 并探讨其作用机制。

### 1 材料

1.1 天麻的提取和分离: 药材由本院药植鉴定教研室张庆芝副教授鉴定为兰科植物天麻 *G. elata* Blume。取 10 kg 粉碎后, 用 95% 乙醇浸泡 6 h, 连续提取 3 次, 减压浓缩得到深褐色糖浆状醇提物 155 g。然后用醋酸乙酯、正丁醇、水萃取, 浓缩回收分别得到醋酸乙酯萃取部分 (143 g)、正丁醇萃取部分 (250 g)、水萃取部分 (100 g)。将醋酸乙酯萃取部分用硅胶柱色谱分离, 分别得到 a (6.7 g)、b (6.6 g)、c (1.8 g)、d (0.17 g)、e (0.6 g) 等 5 段, 经初步测定醋酸乙酯萃取部分 b 段[洗脱系统为氯仿-甲醇 (6:1)]有较强的抗血小板聚集作用, 故对其进行活性研究。

1.2 试剂与仪器: 阿司匹林, 由昆明友谊制药厂惠赠。维拉帕米, 上海禾丰制药有限公司产品, 批号: H31021343; 二磷酸腺苷 (ADP) 系 Sigma 公司产

品, 溶于生理盐水中。Fura-2/Am 购自 Sigma 公司, 用 DMSO 溶解后, -20℃ 避光保存, 质量浓度为 1 mg/mL, 使用时终浓度为 3 μmol/L。其他试剂均为 AR 级产品。HSS-1B 数字式超级恒温浴槽 (成都仪器厂), LBY-NJ2 血液凝聚仪 (北京普利生科贸集团), RF-5000 荧光分光光度计 (日本岛津), 台式低速离心机 (上海电机厂)。

1.3 实验动物: 日本大耳白兔, 体重 2~2.5 kg, 雌雄兼用, 由昆明医学院动物科提供, 动物合格证号: 滇实动证第 2005014 号。

### 2 方法

2.1 体外血小板聚集实验: 自清醒兔颈动脉取血, 以 3.8% 枸橼酸钠 (血与抗凝剂体积比为 9:1) 抗凝收集于塑料离心管中, 以 1 000 r/min 离心 10 min 得到上层液即富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP), 余下以 3 000 r/min 离心 10 min 得到贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP)<sup>[2]</sup>, PPP 用以调零和稀释 PRP 中的血小板数。实验过程中所有接触血小板的器皿均先进行硅化处理, 用比浊法<sup>[3]</sup>进行血小板聚集性测定, 记录血小板聚集率, 并以公式 [对照管聚集率 - 样品管聚集率] / 对照管聚集率 × 100% 计算药物对血小板聚集抑制率, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐用 *t* 检验, 方差不齐用 *t'* 检验 (下同)。

2.2 血小板细胞钙浓度 ([Ca<sup>2+</sup>]) 测定 (荧光法): 同上方法得到家兔 PRP, 以 3 000 r/min 离心 10

收稿日期: 2006-11-22

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2002c0057M)

作者简介: 淤泽涛 (1957-), 男, 教授, 硕士生导师, 长期从事药理与中药药理学教学和科研工作, 发表论文 51 余篇。

E-mail: yuzepu@126.com

\* 通讯作者 林青 Tel: (0871) 6554562 Fax: (0871) 6212252 E-mail: kminqing@yahoo.com.cn

min 得血小板团块,吹打血小板细胞使其悬浮温育的 HEPES 缓冲液中 (mmol/L, NaCl: 134, KCl: 2.9, NaHCO<sub>3</sub>: 12, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.26, MgCl<sub>2</sub>: 1, 葡萄糖: 5, HEPES 5 mmol/L 和 BSA 0.35%, pH 7.2)<sup>[2]</sup>, 洗涤血小板两次后,在 37 °C HEPES 缓冲液用终浓度 3 μmol/L Fura-2/Am 负载 45 min,以 3 000 r/min 离心 5 min,连续冲洗 3 次,去除细胞外残存的 Fura-2/Am,用缓冲液配成 4.0 × 10<sup>11</sup> ~ 5.0 × 10<sup>11</sup>/L 血小板悬浮测定液,取定量测定液分别加入溶媒和药物,用岛津 RF-5000 型双波长荧光分光光度计测定, E<sub>m</sub> 为 505 nm,发射光栅 10 nm, E<sub>x</sub> 分别为 340, 380 nm, 激发光栅 5 nm, 双波长下的荧光比值 (R)。先使细胞静息 1 min 后加 25 μmol/L ADP 20 μL, 5 min 后加入 0.1% Triton X-100 50 μL 破坏其细胞膜,测饱和状态下的最大荧光比值 (R<sub>max</sub>), 1 min 后加入终浓度 10 mmol/L EGTA 50 μL 完全络合 Ca<sup>2+</sup>, 测其最小荧光比值 (R<sub>min</sub>), 同步记录 E<sub>x</sub> 为 380 nm 条件下零 Ca<sup>2+</sup> 和饱和 Ca<sup>2+</sup> 的荧光强度 (Ff<sub>2</sub> 和 Fb<sub>2</sub>), 按公式<sup>[4]</sup>: [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = kd(R - R<sub>min</sub>/R<sub>max</sub> - R) (Ff<sub>2</sub>/Fb<sub>2</sub>) 计算出家兔血小板细胞在有无外钙 (CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/L) 下 ADP 诱导的血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, 前者反应细胞内钙释放和外钙内流引起的胞浆内的钙增加, 后者反应内钙释放。kd 值为解离常数 224<sup>[5,6]</sup>。

3 结果

3.1 天麻醋酸乙酯萃取部分分离物 b 段对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的影响: 当诱导剂 ADP 终浓度 5 μmol/L 时, b 段对 ADP 诱导的血小板聚集

具有抑制作用,且呈量效关系, IC<sub>50</sub> 值为 3.41 mg/mL。在质量浓度 6.6 mg/mL 时聚集率为 (5.78 ± 3.84)%, 与空白对照组相比差异具有非常显著性意义, 随着质量浓度的稀释, 抑制作用递减, 在质量浓度为 1.65 mg/mL, 其聚集率为 (39.28 ± 3.98)%, 与空白对照组相比差异无显著性意义。结果见表 1。

表 1 天麻醋酸乙酯萃取部分分离物 b 段对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Table 1 Effect of b-fraction of EtOAc extract from *G. elata* on rabbit platelet aggregation induced by ADP (x̄ ± s, n = 6)

组别	ρ/(mg · mL <sup>-1</sup> )	血小板聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
空白对照	-	46.45 ± 4.95	-
阿司匹林	2.5	23.64 ± 3.37**	50.94 ± 6.14
天麻醋酸乙酯萃	6.6	5.78 ± 3.84**	87.49 ± 7.28
取部分 b 段	3.3	32.85 ± 5.08**	29.46 ± 4.86
	1.65	39.28 ± 3.98	15.36 ± 3.27
	0.66	43.28 ± 4.63	6.78 ± 3.24

与空白对照组比较: \*\* P < 0.01

\*\* P < 0.01 vs blank control group

3.2 天麻醋酸乙酯萃取部分分离物 b 段对家兔血小板细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 影响: b 段在 6.6 mg/mL 时, 对 ADP 诱导的血小板细胞外钙内流与内钙释放和对照组相比差异均有非常显著性意义。浓度对半稀释后对细胞总 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、释放 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、胞外流入 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响相对减弱, 但与空白对照组相比差异均有非常显著意义。当质量浓度为 1.65 mg/mL 时仅对 ADP 诱导的外钙内流有明显影响, 对内钙释放无影响。结果见表 2。

表 2 天麻醋酸乙酯萃取部分分离物 b 段对家兔血小板细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响 (x̄ ± s, n = 5)

Table 2 Effect of b-fraction of EtOAc extract from *G. elata* on rabbit platelet [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (x̄ ± s, n = 5)

组别	ρ/(mg · mL <sup>-1</sup> )	静息 [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> /(nmol · L <sup>-1</sup> )	释放内 [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> /(nmol · L <sup>-1</sup> )	总 [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> /(nmol · L <sup>-1</sup> )	胞外流入 [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> /(nmol · L <sup>-1</sup> )
空白对照	-	102.54 ± 22.45	196.95 ± 16.98	487.05 ± 13.20	187.55 ± 10.45
维拉帕米	0.025	96.01 ± 12.78	145.00 ± 56.40	350.23 ± 21.20**	107.17 ± 67.65*
天麻醋酸乙酯萃	6.6	96.98 ± 7.56	57.56 ± 7.62**	196.30 ± 9.29**	41.76 ± 5.78**
取部分 b 段	3.3	92.46 ± 7.63	65.39 ± 26.60**	252.83 ± 45.71**	94.98 ± 40.92**
	1.65	92.89 ± 12.19	135.29 ± 36.89**	369.62 ± 16.76**	141.44 ± 33.13**
	0.66	95.57 ± 14.48	159.59 ± 27.50*	469.85 ± 27.46	214.68 ± 33.04

与空白对照组比较: \* P < 0.05 \*\* P < 0.01

\* P < 0.05 \*\* P < 0.01 vs blank control group

4 讨论

临床报道天麻可以明显改善与脑供血不足有关的某些疾病的症状, 而脑缺血、心肌缺血、动脉粥样硬化和外周血管病的血小板细胞中 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 水平显著升高<sup>[7]</sup>。本室的前期研究表明: 天麻醋酸乙酯萃取部分能明显抑制血小板聚集<sup>[8]</sup>, 本研究结果进一步表明其抑制血小板聚集的作用与抑制血小板外

Ca<sup>2+</sup> 内流有关。

在诱导血小板聚集的激活剂中, ADP 虽只是一种弱的激活剂, 但对其他激活剂如诱导致密颗粒释放、凝血酶、胶原所激发的血小板活性, ADP 则是一个必要的共同因子。研究资料表明 ADP 诱导血小板聚集还表现在对 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响, 它可以使血小板细胞上的钙离子通道开放, 引发胞外钙内流, 同时可以

激活磷脂酶 C, 促进 IP 分解, 产生三磷酸肌醇, 促使胞内的致密管道系统释放钙离子, 使  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 导致钙超载<sup>[9]</sup>。细胞外钙离子进入细胞内或细胞内钙库释放钙离子都可以引发钙波动, 表现为胞浆内钙离子浓度的变化, 最终引发相应的生物行为<sup>[10]</sup>。

本研究结果表明, 从天麻醋酸乙酯萃取部位中用硅胶柱分离出的 b 段对 ADP 诱导的血小板聚集具有明显的抑制作用,  $IC_{50}$  值为 3.41 mg/mL。b 段可明显抑制血小板细胞内总钙水平的升高, 对内钙释放和外钙内流均有明显的作用, 且呈现出剂量依赖性, 由此认为 b 段抑制 ADP 诱导的血小板聚集的机制是抑制细胞膜上的钙离子通道, 使  $[Ca^{2+}]_i$  内流受阻, 即通过抑制钙离子的内流达到抑制血小板聚集的作用; 同时也可能与其在胞质中抑制磷脂酶 C, 导致胞内的致密系统释放钙离子减少, 从而降低胞内  $[Ca^{2+}]_i$  有关。

References:

[1] Shang W F. Research progress on the effect of *Gastrodia elata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28 (10): 629-632.  
 [2] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's

Medical Publishing House, 2002.  
 [3] Born GVR. Aggregation of blood platelets by diphosphate and its reversal [J]. *Nature*, 1962, 194: 297.  
 [4] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 3440-3450.  
 [5] Wu X C. Concentration of liver cytoplasmic calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) was determined in rat by Fura-2/AM fluorescence technique [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 1995, 13 (3): 139-140.  
 [6] Al-Mohanna FA, Hallett M B. The use of fura-2 to determine the relationship between cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  and oxidase activation in rat neutrophils [J]. *Cell Calcium*, 1988, 9(1): 17-26.  
 [7] Wang R T. Anti-aggregative effect of rabbit platelet inhibitive effect and mechanism of the ethyl ferulate on rabbit platelet congregation induced by ADP [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2002, 238(6): 537-539.  
 [8] Lin Q, Li X F, Li W J, et al. Antiaggregation effects of fractions from *Gastrodia Rhizome* [J]. *J Chin Microcircul* (中国微循环), 2006, 10(1): 33-35.  
 [9] Cong Y L, Jin C, Li X F, et al. Oral L-argmmem reducing the peak value of platelet intracellular calcium oscillation induce by ADP [J]. *Chin J Lab Med* (中华检验医学杂志), 2000, 23(1): 32-34.  
 [10] Wong N D, Sciammarella M G, Polk D, et al. The metabolic syndrome, diabetes, and subclinical atherosclerosis assessed by coronary calcium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(9): 1547-1553.

## 双黄连粉针剂联合蒙脱石散剂治疗小儿轮状病毒肠炎的疗效观察

韩成林

(天津市宁河县医院, 天津 301500)

双黄连粉针剂由金银花、连翘、黄芩 3 味中药组成, 具有清热解毒、抗菌消炎、解除平滑肌痉挛、修复肠道、改善肠道循环、增强细胞和体液免疫功能等作用。蒙脱石散剂为天然的高效消化道黏膜保护剂, 其双八面体微粒, 对病毒、病菌、水分及毒素有强大的吸附固定作用, 分布于肠腔表面, 提高黏膜屏障对攻击因子的防御功能, 调节肠道微生态平衡。两药联用在治疗小儿轮状病毒肠炎环节上具有互补性和协同作用。本院儿科 2001 年至 2005 年 1 月, 收治小儿轮状病毒肠炎 171 例, 通过药物的联合、单独、对照治疗, 进行了疗效对比分析, 以寻求其较适合的治疗方法。

### 1 临床资料与方法

1.1 诊断标准及临床资料: 诊断符合秋季腹泻标准<sup>[1]</sup>的 171 例患儿列为观察对象: 年龄 3 个月~2

岁; 发病时间为每年 10 月~次年 1 月; 可伴有腹泻、呕吐、发热。脱水程度为轻度脱水 93 例, 中度脱水 67 例, 重度脱水 8 例; 大便稀水样或蛋花样便, 无脓血, 常规检查大多正常, 少数有少量白细胞  $\leq 5/HP$ , 大便细菌培养阴性; 采用 ELISA 检测粪便轮状病毒抗原 (IgM) 阳性。171 例患儿随机分为 4 组, 各组性别、年龄、临床表现均无显著差异。

1.2 分组: 将 171 例住院轮状病毒肠炎患儿, 随机分为联合用药组 46 例; 蒙脱石散剂 (法国博福-益普生制药集团) 治疗组 40 例; 双黄连粉针剂 (哈尔滨中药厂生产) 治疗组 42 例; 对照组 43 例。

1.3 治疗方法: 对照组 (I), 按病情给予常规治疗, 脱水者按脱水程度给予口服补液盐或静脉补液纠正及对症处理。双黄连粉针剂组 (II) 在常规治疗基础