

三七三醇皂甙对动物血小板 功能及血栓形成的影响

国家医药管理局天津药物研究院(300193) 苏雅* 赵益柱 张宗鹏 岳南

摘 要 三七三醇皂甙(PTS)在体外(1~4mg/ml)和体内十二指肠给药(75~300mg/kg)都明显抑制由ADP、胶原、花生四烯酸(AA)诱导的大鼠及家兔血小板聚集,同时亦抑制胶原诱导大鼠血小板TXA₂释放,而对大鼠胸主动脉壁PGI₂生成无明显影响。PTS(50~200mg/kg)明显抑制大鼠实验性血栓形成,剂量与效应相关。提示:PTS抗血栓作用与其抑制血小板聚集和TXA₂释放有关。

关键词 三七三醇皂甙 血小板聚集 TXB₂ PGI₂ 血栓

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为五加科人参属植物的根。具滋补强壮、止血、活血化瘀、消肿止痛的功效^[1]。近年来研究三七有抗心绞痛、治疗血栓的作用^[2]。在三七活血有效成分的研究中,我们筛选出三七三醇皂甙(PTS)具有较强的抑制血小板聚集作用,鉴于血小板在心脑血管疾病发生发展中起着重要作用,我们观察了PTS对血小板功能和实验性血栓的影响。

1 实验材料

药物:PTS黄色粉末,溶于水,人参皂甙R_{g1}含量65%以上,由本院植化室提供。实验前用蒸馏水配成一定浓度的溶液使用。

阿斯匹林:做阳性对照药,由市场购买,用1%CMC配成混悬液和用1%Na₂CO₃调pH至6配成水溶液,两种剂型使用。

试剂:ADP(美国Sigma公司产),用生理盐水配制成1.06mmol/L溶液置冰箱备用。

胶原溶液:取家兔主动脉壁,按湿重100mg加1ml生理盐水磨成匀浆,以3000r/min离心20min,取上清液置冰箱备用。

花生四烯酸(AA 美国Sigma公司产):

用0.5mol/LNa₂CO₃溶液配成33mmol/L的钠盐溶液,置冰箱备用。

TXB₂及6-Keto-PGF_{1α}放免药盒:购于中科院基础所。

动物:大鼠、家兔,由我院动物室提供,合格证号,津实动设施准第001号。

2 方法与结果

2.1 PTS对血小板聚集功能的影响

2.1.1 体内实验:取雄性SD大鼠,体重180~220g,随机分为对照组和给药组,每组6~10只,戊巴比妥钠麻醉(40mg/kg,ip),十二指肠给药,对照组给等容量蒸馏水,阳性药对照组灌胃给予阿斯匹林,1h后腹主动脉取血(3.8%枸橼酸钠抗凝,抗凝剂和全血的比例为1:9),制备富血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP),调PRP血小板浓度为40万/mm³,取0.2mlPRP,采用比浊法^[3],在PAM-3型双通道血小板聚集仪(江苏省丹阳无线电厂产),观察对ADP、胶原、AA引起血小板聚集的影响。根据描记曲线,计算血小板聚集程度,结果采用两组均数统计分析t值法进行处理,结果如表1。PTS十二指肠给药明显抑制由诱导剂ADP、胶原、AA诱导

* Address: Su Ya, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, State Pharmaceutical Administration of China, Tianjin

的大鼠血小板聚集,并随剂量增加,作用增强。

表 1 PTS 对 ADP、胶原、AA 诱导的大鼠血小板聚集的影响

组别	剂量 (mg/kg)	血小板最大聚集百分数($\bar{x}\pm s$)		
		ADP(n)	胶原(n)	AA(n)
对照组		44.1 $\pm$ 8.3(10)	52.6 $\pm$ 9.1(10)	53.8 $\pm$ 14.0(10)
PTS	37.5	40.0 $\pm$ 8.5(8)		
PTS	75	33.9 $\pm$ 8.0*(9)	35.3 $\pm$ 13.6** (7)	40.3 $\pm$ 15.4(10)
PTS	150	27.9 $\pm$ 5.6*** (9)	31.4 $\pm$ 15.2** (7)	31.5 $\pm$ 18.6*** (9)
PTS	300		23.6 $\pm$ 12.6*** (7)	24.9 $\pm$ 13.4*** (10)
阿斯匹林	150	23.3 $\pm$ 8.7*** (7)	11.6 $\pm$ 16.4*** (7)	9.4 $\pm$ 10.5*** (6)

n:动物数,与对照组比较 *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001(下同)

2.1.2 体外实验:取雄性家兔,体重 2~2.5kg,戊巴比妥钠麻醉(30mg/kg,iv),颈总动脉取血(3.8%枸橼酸钠抗凝,抗凝剂与全血的比例为 1:9),按常规制备 PRP(血小板浓度 30 万/mm³)和 PPP。采用比浊法测定血

小板聚集程度,观察药物对 ADP、胶原和 AA 诱导血小板聚集的影响,结果见表 2。PTS 体外有明显抑制由 ADP、胶原、AA 诱导家兔血小板聚集作用,该作用与剂量呈相关性。

表 2 PTS 体外对 ADP、胶原、AA 诱导的家兔血小板聚集的影响

药物	终浓度 (mg/ml)	血小板最大聚集百分数($\bar{x}\pm s$)		
		ADP(n)	胶原(n)	AA(n)
对照		47.4 $\pm$ 4.0	52.8 $\pm$ 9.0	51.1 $\pm$ 7.6
PTS	1	39.7 $\pm$ 6.8*	48.7 $\pm$ 10.6	41.4 $\pm$ 19.3
PTS	2	29.7 $\pm$ 5.3***	30.9 $\pm$ 15.2*	36.3 $\pm$ 16.7
PTS	4	27.0 $\pm$ 7.3***	13.3 $\pm$ 11.7***	23.3 $\pm$ 16.7**
对照		56.4 $\pm$ 9.9	51.9 $\pm$ 4.8	56.3 $\pm$ 7.6
阿斯匹林	0.5			47.6 $\pm$ 16.3
阿斯匹林	1	50.6 $\pm$ 4.0	50.3 $\pm$ 5.9	38.1 $\pm$ 17.6
阿斯匹林	2	41.7 $\pm$ 7.3*	21.9 $\pm$ 10.1***	24.2 $\pm$ 16.2**
阿斯匹林	4	20.3 $\pm$ 4.0***	20.0 $\pm$ 5.5***	

n:实验次数,均为 6 次

2.2 PTS 对血小板释放功能的影响:用放免法测 TXA₂ 稳定代谢产物 TXB₂^[4]。取雄性 SD 大鼠体重 180~220g,随机分为 4 组,每组 6~7 只,戊巴比妥钠腹腔麻醉(40mg/kg),PTS 十二指肠给药,对照组给予等容量蒸馏水,阳性对照药阿斯匹林灌胃给药。1h 后腹主动脉取血(3.8%枸橼酸钠抗凝,抗凝剂与全血比例为 1:9),按常规制备 PRP 和 PPP,调 PRP 中血小板浓度至 40 万/mm³,采用上述比浊法进行血小板聚集实验,加诱导剂胶原,5min 后立即加终浓度为 60 μ g/ml 的消炎痛终止反应。聚集后的 PRP 和空白 PPP 以 3500r/min 离心 15min,取 50 μ l 上清液测 TXB₂ 含量,结果见表 3。PTS 可明显抑

制胶原诱导大鼠血小板 TXB₂ 的释放。

表 3 PTS 对胶原诱导大鼠血小板释放 TXB₂ 的影响

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	TXB ₂ 含量 (ng/2 $\times$ 10 ⁹ 血小板)
对照		7	119.6 $\pm$ 29.0
PTS	75	7	81.8 $\pm$ 53.5
PTS	300	7	79.6 $\pm$ 36.7*
阿斯匹林	150	6	55.7 $\pm$ 47.4*

2.3 PTS 对动脉壁前列环素(PGI₂)活性的影响:用放免法测 PGI₂ 稳定代谢产物 6-ke-to-PGF_{1 α} ^[5]。取雄性 SD 大鼠,体重 180~220g,随机分成 5 组,每组 5~9 只,戊巴比妥钠腹腔麻醉(40mg/kg),PTS 十二指肠给药,对照组给予等容量蒸馏水,阳性对照药灌胃给予阿斯匹林,1h 后迅速剪下胸主动脉置于

冰冷生理盐水中剥净周围结缔组织,切成约2mm 小段,称重。将动脉环加入磷酸缓冲液中(每4mg 组织加1ml 磷酸缓冲液),於37℃温育30min 后,立即取出组织放入冰浴中终止反应,取10μl 采用放免法测定温育液中前列环素(PGI₂)稳定代谢产物6-keto-PGF_{1α}含量。结果如表4。PTS 对大鼠胸主动脉壁PGI₂生成虽有增加趋势,但无显著影响,而阿斯匹林却可明显抑制其PGI₂活性。

表4 PTS 对大鼠胸主动脉壁 PGI₂ 活性的影响

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	6-keto-PGF _{1α} 含量 (pg/0.04mg)
对照组		9	318.9±100.1
PTS	75	9	333.3±100.5
PTS	150	9	371.0±126.5
PTS	300	9	384.4±120.7
阿斯匹林	150	5	36.4±58.3***

2.4 PTS 对大鼠实验性血栓的影响:取雄性SD 大鼠,体重300~350g,随机分成6组,每组7只,戊巴比妥钠腹腔麻醉(40mg/kg),十二指肠给药,对照组给予等容量蒸馏水,阿斯匹林灌胃给药,药后1h 采用动静脉旁路的方法^[6]进行手术,建立血循环。结果见表5,PTS 明显抑制大鼠实验性血栓,剂量增加,作用增强。

表5 PTS 对大鼠实验性血栓形成的影响

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	血栓湿重 (mg)
对照组		7	36.6±8.4
PTS	25	7	35.9±7.3
PTS	50	7	23.4±12.2*
PTS	100	7	19.6±10.9**
PTS	200	7	18.1±10.9**
阿斯匹林	300	7	23.4±11.2*

3 讨论

不同诱导剂引起血小板聚集,表明影响血小板活化的途径是多环节多方面的。本文选用ADP、胶原和AA 为诱导剂观察PTS 对血小板聚集功能的影响。结果表明,PTS 体内外均能明显抑制这三种诱导剂诱导的家兔和大鼠血小板聚集,提示PTS 抑制血小板的途径也是多环节多方面的。

血小板活化时释放的许多活性物质又促进血小板聚集,促进血栓形成。实验表明,PTS 能抑制TXA₂的释放,表明PTS 的抗血小板聚集作用也与抑制血小板释放活性物质有关。

TXB₂和6-keto-PGF_{1α}分别是TXA₂和PGI₂的稳定代谢产物,测定TXB₂和6-keto-PGF_{1α}的量直接反映了TXA₂和PGI₂含量的变化。TXA₂和PGI₂保持平衡是机体一种重要生理作用,PTS 能抑制血小板TXA₂的生成。对PGI₂的生成也有增加的趋势,但无统计学差异,此点与环氧酶抑制剂阿斯匹林抑制动脉壁PGI₂生成是有所不同的。能否通过增加体内给药剂量和次数而明显升高动脉壁PGI₂含量,有待进一步研究。

综上所述,PTS 抗血栓作用与其抑制血小板聚集和释放功能有关。

参 考 文 献

1 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册. 上海:上海人民出版社,1977. 54
2 张征忠. 中草药,1983,14(1):28
3 Born GVR. Nature,1962,194:927
4 Siess W, et al. Thromb Haemost,1981,45:204
5 Shi Y Q, et al. Acta Acad Med Sin,1986,8:310
6 徐叔云,等. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,1982. 845

(1996-03-12 收稿).

Effects of Panaxatriol Saponins Isolated from Sanchi

(*Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng*) on Animal Platelet Function and Thrombosis

Su Ya, Zhao Yigui, Zhang Zongpong, et al

Panaxatriol saponin (PTS), isolated from *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng*, 1~4mg/ml inhibited rabbit platelet aggregation induced by ADP, collagen and arachidonic acid respectively in vitro. In rat, PTS 75~300mg/kg intraduodenally inhibited dose-dependently platelet aggregation induced by these inducers, and

also inhibited platelet thrombonane A_2 release induced by collagen, but did not affect the formation of aortic wall PGI_2 , PTS 50~200mg/kg significantly inhibited experimental thrombosis in rats. These results showed that the anti-thrombosis action of PTS may be due to its inhibitory action on platelet aggregation and TXA_2 release.

淫羊藿甙的体外免疫调节作用研究[△]

山东医学科学院基础所免疫室(济南 250001) 赵 勇* 张 玲 王 芸 毛海婷 崔正言

摘 要 淫羊藿甙是从朝鲜淫羊藿中提取的主要单体。采用依赖细胞株法和乳酸脱氢酶 4h 释放法,分别检测了淫羊藿甙协同诱导 IL-2、IL-3、IL-6,及对 NK、LAK 细胞杀伤活性的影响。结果表明:淫羊藿甙可协同 PHA 诱导扁桃体单个核细胞产生 IL-2、3、6 呈剂量依赖关系,动力学观察表明:IL-2、IL-6 的分泌高峰时相为作用后 48h,IL-3 的分泌高峰时相为作用后 72h。淫羊藿甙可以提高扁桃体单个核细胞 NK、LAK 细胞杀伤活性;动力学观察表明:在诱导第 5 天时 LAK 细胞杀伤活性最强。提示淫羊藿甙是一种有效的生物反应调节剂。

关键词 淫羊藿甙 白细胞介素 2 白细胞介素 3 白细胞介素 6 NK 细胞 LAK 细胞

近年来,中药免疫调节作用的研究取得了很大进展,人们对中药的化学成分、结构和药效进行了深入的研究,发现了许多活性多糖和甙类物质^[1]。淫羊藿甙(icariin, ICA)是从朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)中提取的主要单体成分。文献报道^[2,3]:淫羊藿甙可以促进抗体的生成,对小鼠 Ts 细胞的产生有减弱作用。关于淫羊藿甙协同诱导白细胞介素 2、3、6,及对 NK、LAK 细胞杀伤活性的影响,尚未见文献报道。现报告如下。

1 材料

1.1 淫羊藿甙:从朝鲜淫羊藿(*E. koreanum* Nakai)中提取,纯度在 96%以上。

1.2 细胞因子:rIL-2,军事医学科学院基础所和中化生物技术研究联合研制,批号 940205。rIL-3 购于北京医科大学免疫学教研室。rIL-6,由山东省医学科学院肿瘤生物治疗中心田志刚博士赠送。

1.3 细胞株:CTLL-2 为 IL-2 依赖性细胞株,本室常规传代培养。TF-1 为人 IL-3 依

性细胞株,引自北京医科大学免疫学教研室。MH60·BSF2 为 IL-6 依赖性细胞株,引自日本大阪大学细胞工程中心。K₅₆₂为人红白血病细胞,本室常规传代培养。HL-60 为人急性早幼粒白血病细胞,引自中国医学科学院血液病研究所。

1.4 试剂:PHA 为广州医工所产品。MTT, 3-(4,5-二甲基噻唑-2-yl)-2,5-乙苯基-四唑溴盐〔3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide〕,Sigma。

2 方法

2.1 扁桃体单个核细胞的制备:扁桃体由山东医科大学附属医院耳鼻喉科门诊提供。三抗(青霉素 2000u/ml、链霉素 2000u/ml、二性霉素 B 25μg/ml)常规处理后,取组织块置于 200 目不锈钢网上研磨,细胞悬液层加于淋巴细胞分离液上,分离、洗涤,用培养液调细胞至适宜浓度,备用。

2.2 不同剂量 ICA 协同 PHA 诱导 IL-2、3、6 的观察:取 24 孔板,加入扁桃体单个核细

* Address: Zhao Yong, Institute of Basic, Shandong Provincial Academy of Medical Sciences, Jinan

[△] 山东省自然科学基金资助项目