

蜂胶可以有效地抑制四氧嘧啶致小鼠肝脏自由基浓度的升高

机体过量的自由基可以引发生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,产生 MDA和过氧化脂质,它们的含量变化可以定量反映生物膜如线粒体膜、细胞膜等的受损程度。从实验结果可知,蜂胶给药组和阳性对照组 MDA 的含量远低于模型对照组 ($P < 0.01$),但略高于正常对照组的水平。进一步表明,蜂胶在体内不仅有清除自由基的作用,对自由基引发的膜脂过氧化反应也有抑制作用。

综上所述,氧自由基可以引发小鼠肝微粒体发生脂质过氧化反应,其产物 MDA 的含量明显高于对照组 ($P < 0.01$),蜂胶可以抑制肝微粒体 MDA 含量的升高,表明蜂胶在体外可能通过清除氧自由基来保护肝微粒体。体内试验表明,蜂胶可以有效的抑制四氧嘧啶引发小鼠肝脏自由基的升高,降低肝脏 MDA 的含量,蜂胶对四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤有显著的保护作用。我们的研究表明,蜂胶是一种天然、安全的抗氧化剂,对化学物质致肝脏损伤具

有一定的保护作用

参考文献:

- [1] 王宗伟. 蜂胶的药理作用 [J]. 国外医学 植物药分册, 1997, 12 (4): 151-156.
- [2] 彭增起, 牛文娟, 常彦红. 蜂胶中的黄酮及类黄酮的保健作用 [J]. 中国养蜂, 1996, 4: 14-15.
- [3] Pascual C, Gonzalez R, Torricel R G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals [J]. J Ethnopharmacol, 1994, 41(1-2): 9-13.
- [4] 曹炜, 尉亚辉. 蜂胶抗氧化作用的研究 [C]. 张家界: 第五届全国自由基生物学与自由基医学研讨会论文集汇编, 2000.
- [5] Igor B. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation [J]. Chemical Pharm, 1989, 38(11): 1763-1767.
- [6] Beanchamp C. Superoxide Dismutase Improved assays and assay applicable gels [J]. Analytical Biochem, 1977, 44: 276-282.
- [7] 钱伯初. 蜂花粉对小鼠体外脂质过氧化的影响 [J]. 营养学报, 1989, 11(4): 355.
- [8] 翁玉春, 王荣平. 细胞和细胞膜内过氧脂质的微量测定 [J]. 细胞生物学杂志, 1985, 7(3): 54.
- [9] 袁勤生. 临苯三酚自氧化法测定 SOD 活性 [J]. 医药工业, 1983, 1: 10-13.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [11] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.

褐藻多糖硫酸酯的抗凝和纤溶活性

彭波¹, 许实波¹, 许东晖¹, 赵金华²

(1. 中山大学, 广东 广州 510275; 2. 深圳海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518054)

摘要: 目的 研究褐藻多糖硫酸酯 (FPS) 抗凝血和纤溶激活作用。方法 测定 FPS 对内源性和外源性凝血途径以及纤溶系统的影响。结果 FPS 对内源性和外源性凝血途径均有较强的抑制作用, 并且能够增强纤溶系统的活性。小鼠 ip FPS 40, 20, 10 mg/kg 后 30 min 与对照组相比, 血凝时间分别延长 126%, 302%, 83%。FPS 2.5, 5, 10 mg/ml 使大鼠离体凝血酶原时间比生理盐水对照组分别延长 20%, 162%, 456%。大鼠 10 mg/kg 舌下 iv 30 min 后取血, 用试剂盒测得其能使血浆 t-PA 活性提高达 10%。结论 FPS 具有较强的抗凝血作用, 其作用机制可能与肝素类似。

关键词: 褐藻多糖硫酸酯; 抗凝血; 促纤溶

中图分类号: R286.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1015-00

Anticoagulation and fibrinolysis activity of fucoidan

PENG Bo¹, XU Shi-bo¹, XU Dong-hui¹, ZHAO Jin-hua²

(1. Zhongshan University, Guangzhou Guangdong 510275, China; 2. Shenzhen Neptunus Biotechnique Stock CO., Ltd., Guangzhou Guangdong 518054, China)

Key words fucoidan (FPS); anticoagulation; fibrinolysis

近代研究表明, 存在于多种褐藻中的水溶性硫酸酯多糖具有抗凝血、调血脂和抗肿瘤等活性,

Springer 等人从墨角藻中分离的褐藻多糖硫酸酯在体内和体外实验中都表现出强抗凝活性。这些硫酸酯

收稿日期: 2000-02-27

作者简介: 彭波 (1973-), 女, 河北省唐山市人, 助教, 硕士学位。1992年考入中山大学生物系, 1996年保送攻读本校生理学专业硕士研究生, 研究方向为天然产物生理活性研究, 1999年毕业留任生物系动物生理研究室教师, 从事基础教学与科研工作。通讯地址: 广州市中山大学生命科学学院动物生理教研室, 邮编: 510275

多糖在临床应用中能对心脏、肾血管病,特别是对改善肾功能、挽救尿毒症患者有显著效果。我们研究了从海带目(Laminariales)海带科(Laminariaceae)海带属(Laminaria Lamx.)海带*L. japonica*中提取的褐藻多糖硫酸酯的抗凝血和促纤溶的药理学活性。

1 实验材料

1.1 样品:褐藻多糖硫酸酯(Fucoidan,简称FPS)是从海带*Laminaria japonica*中提取的一种天然硫酸酯多糖,由中国科学院海洋研究所徐祖洪教授提供。分子式:(C₆H₇O₃)[•]SO₄[•]M[M是金属离子K、Na、Ca_{1/2}、Mg_{1/2}等],平均分子量约7.7×10⁵u [粘度法、激光散射(拉曼光谱)法]。

1.2 试剂:藻酸双酯钠,沈阳市三环制药厂;肝素钠,徐州生物化学制药厂;凝血酶,珠海特区生物化学制药厂;t-PA和PAI-1活性测定试剂盒,上海医科大学分子遗传学研究室;CaCl₂(AR),广州化学试剂厂;柠檬酸钠,广州化学试剂厂生产;草酸钾(AR),广州化学试剂厂。

1.3 动物:18~20g NIH系小鼠(合格证号:97A018),250~300g SD系大鼠(合格证号:97A017),均由广东省医学实验动物中心提供;新西兰大白兔(合格证号:医动字26-97043号),由广东省南海市黄歧泌中威龙养殖场提供。

2 方法和结果

2.1 对小鼠凝血时间的影响:小鼠60只,雌雄兼用,随机分成6组,分组ip生理盐水(NS)0.1mL/10g, FPS 40, 20, 10mg/kg, 或 PSS 10, 5mg/kg 30min后,毛细管法测定凝血时间^[1],与生理盐水对照组进行显著性测定比较。结果表明,与生理盐水对照组(1.81±0.38)min的凝血时间比较, FPS 10, 20, 40mg/kg能够显著延长小鼠凝血时间,分别为(3.31±0.55)min (P<0.001), (7.28±1.23)min (P<0.001), (24.76±3.79)min (P<0.001)。阳性对照药 PSS 5, 10mg/kg也能显著延长小鼠凝血时间,分别为(7.73±0.84)min (P<0.001), (12.36±1.03)min (P<0.001)。

2.2 对复钙凝血时间的影响:制备0.1%草酸钾兔血浆^[2]。10支内径8mm试管,各加血浆0.1mL后分成4组,分别加0.1mL NS, 或 0.33, 0.11, 0.037mg/mL FPS或0.11mg/mL PSS 37℃水浴1min后,每管加入0.025mol/L CaCl₂溶液0.1mL,混匀,再水浴孵育,并开始计时。1min后每隔10s缓慢倾斜试管1次,记录纤维蛋白形成(液面不动)所需的时间,重复5次,取均值作为复钙凝血

时间,结果见表1。FPS 0.04, 0.11和0.33mg/mL可显著延长草酸钾兔血浆复钙凝血时间,且具有剂量依赖关系,PSS 0.11mg/mL亦能显著延长凝血时间。

表1 FPS对草酸钾兔血浆复钙凝血时间的影响

组别	剂量(mg/mL)	复钙凝血时间(min)
NS	-	2.14±0.16
PSS	0.11	10.87±0.38**
FPS	0.04	3.33±0.15**
	0.11	5.46±0.12**
	0.33	>60**

与NS组比较:*** P<0.001

2.3 对离体凝血酶原时间的影响:大鼠摘眼取血,3.8%枸橼酸钠1:9抗凝;3000r/min×10min离心分离血浆。将内径8mm洁试管分为5组,每管加入凝血活酶和25mmol/L CaCl₂各0.1mL后,分别加入0.1mL NS,或10, 5, 2.5mg/mL FPS, 或2.5mg/mL PSS。然后迅速加血浆0.1mL,混匀后置37℃水浴恒温,开动秒表,不断倾斜试管进行观察,当管内出现凝胶状纤维蛋白,液面不动时,停止计时。这段时间即凝血酶原时间^[3],结果见表2。FPS 2.5, 5, 10mg/mL均能显著延长管内出现凝胶状纤维蛋白的时间,且具有量效依赖关系。PSS 2.5mg/mL亦能显著延长该时间。

表2 FPS对大鼠离体凝血酶原时间的影响

组别	浓度(mg/mL)	凝血酶原时间(min)
NS	-	0.51±0.07
PSS	2.5	20.0±3.15**
FPS	2.5	1.57±0.29**
	5	8.8±1.02**
	10	23.7±3.55**

与NS组比较:*** P<0.001

2.4 简易凝血活酶生成试验:新西兰大白兔,颈动脉取血,每0.04mL血加入0.5mL蒸馏水中制备溶血液(内含血浆内各种凝血因子,用红细胞溶解后释放的磷脂代替PF₃);耳缘静脉给予受试样品14.8mg/kg后,重复前述过程制备第3份溶血液。分别加入0.5mL的1.8%氯化钠溶液(空白对照);含4mg/mL受试样品(体外给药组);1.8%氯化钠溶液0.5mL(体内给药组)。每份溶液中再加入0.025mol/L CaCl₂溶液0.25mL,混匀,置37℃水浴中。于2, 5, 8, 12, 16min各吸取溶血液0.1mL, 0.025mol/L CaCl₂溶液0.1mL,分别测定其使正常血浆凝固的时间,结果见表3。FPS体内给药14.8mg/kg, 体外给药4mg/mL均能显著延长血浆凝固时间,有抑制凝血活酶生成的作用。

2.5 凝血酶时间测定:大白兔颈动脉取血,全血迅

表 3 FPS对简易凝血活酶形成的影响 (s)

组别	剂量	2 min	5 min	8 min	16 min	12 min
NS	-	24.3 ± 2.9	23.8 ± 3.4	14.3 ± 2.9	9.5 ± 2.3	9.8 ± 1.7
FPS 体内	14.8 mg/kg	66.5 ± 7.5**	59.0 ± 5.7**	55.8 ± 5.1**	21.0 ± 2.2**	30.0 ± 4.4**
体外	4.0 mg/mL	432 ± 79**	36 ± 50**	212 ± 30**	40.0 ± 8.12**	51.0 ± 7.8**

与 NS组比较:*** P < 0.001

速以 2 500 r/min × 10 min 离心,制取贫血小板血浆;含凝血酶 10 U/mL Tris 缓冲液于 37℃ 下温育 20 min 作为凝血酶工作液;13 mm × 100 mm 试管内加入正常血浆 0.2 mL 后分为 7 组,分组加入 0.2 mL Tris 缓冲液或 0.5, 0.71, 1.0, 1.41, 2.0, 4.0 mg/mL 受试样品缓冲液,混合,温育 1 min 后,加入 0.2 mL 凝血酶工作液,并启动秒表;镍铬丝襪以每秒 2 次的频率在混合液内挑动,至形成凝块,停表,记录时间,即凝血酶时间^[4],结果见表 4 FPS 体外给药 0.71 mg/mL 即可显著延长血浆凝固时间,剂量为 1.41 mg/mL 时,超过 30 min 血浆才开始凝固,剂量为 2 mg/mL 时,血浆不凝固

表 4 FPS对凝血酶时间的影响

组别	剂量 (mg/mL)	凝固时间 (s)
NS	-	16.78 ± 0.64
FPS	0.5	16.77 ± 0.47
	0.71	22.05 ± 0.22**
	1	26.34 ± 0.33**
	1.41	> 30 min
	2	不凝
	4	不凝

与 NS组比较:*** P < 0.001

2.6 全血浆凝块溶解试验:结果见表 5 FPS 7.4 mg/kg 就可使血浆凝块溶解时间显著缩短

表 5 FPS对血浆凝块溶解时间的影响

组别	剂量 (mg/mL)	溶解时间 (h)
NS	-	> 48
FPS	7.4	28.3 ± 3.34
	14.8	21.8 ± 2.74

与 NS组比较:* P < 0.05

2.7 组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA)和纤溶酶原激活剂抑制物 (PAI-1)的活性测定试验:大鼠以 1% 水合氯醛 (350 mg/kg) ip 麻醉后,仰卧固定,分离右颈动脉,穿刺动脉留置导管固定,供采血用。以 0.13 mol/L 枸橼酸钠为抗凝剂,抗凝剂与全血之比为 1:9 试管 4℃ 预冷,动脉血入试管混匀后立即 4℃ 冰浴,2 500 r/min 离心 15 min,分离血浆,一部分血浆于 Ependoff 管中待测 PAI-1 活性,一部分血浆以等体积酸化液 (1 mol/L pH3.9 乙酸钠)酸化,以消除 PAI-1 活性对 t-PA 活性的影响,再于 Ependoff 管中待测 t-PA 的活性,待测血浆 - 70℃ 冰箱保存^[5]。FPS 舌下 iv,用药前及用药后 30 min

各采血 1 mL t-PA 和 PAI-1 活性测定按试剂盒说明书进行。在酶标仪上测定标准品及样品孔波长 405 nm 处吸光度 (A₄₀₅),以标准品制作标准曲线,计算待测样品的 t-PA 活性;PAI-1 活性测定法同 t-PA 实验结果表明,FPS 有使 t-PA 活性增强的作用。给药前的 t-PA 活性为 (205.25 ± 31.97) U/mL (n = 6, $\bar{x} \pm s$),10 mg/kg 舌下 iv FPS 30 min 后取血,用试剂盒测得其能够使血浆 t-PA 活性显著升高至 (424.83 ± 39.93) U/mL (P < 0.001);iv FPS 后,血浆中的 PAI-1 活性与给药前相比,差异无显著性 (给药前后分别为 (11.49 ± 1.62) 和 (11.64 ± 2.73) U/mL (n = 6, $\bar{x} \pm s$))

3 讨论

凝血过程可分为 3 个阶段,凝血酶原激活物的形成;凝血酶原被激活成凝血酶;纤维蛋白原转变成纤维蛋白。凝血酶原的激活有两种途径,即内源性途径和外源性途径^[6]。正常人和动物的血浆中存在着抗凝物质和纤溶系统,后者使凝血过程所形成的纤维蛋白变为可溶纤维蛋白分解产物,使已凝固的血块重新化为液体。t-PA 是纤溶系统中主要的激活物,其抑制物为 PAI-1 t-PA/PAI 比值是纤溶系统活性高低的主要指标之一,它们之间的生理平衡对调节血流通畅起重要作用^[7]。本研究发现 FPS 体内、体外均可显著延长血凝时间

血浆复钙凝血时间的测定是检验内源性凝血系统功能的简便方法,FPS 对剂量依赖性延长草酸钾兔血浆复钙凝血时间,表明 FPS 对内源性激活的凝血途径具有抑制作用。凝血酶原时间可以反映药物对于外源性凝血系统的影响。FPS 能够明显延长大鼠凝血酶原时间,并且具有剂量依赖性,说明 FPS 对外源性凝血过程也有抑制作用。血检查凝血第一阶段内源性途径的简易凝血活酶生成试验表明,其对凝血活酶的生成有抑制作用;检查第三期凝血过程中纤维蛋白原利用度的凝血酶时间测定法离体试验表明,随着剂量的增大凝血酶时间显著延长。

内源性和外源性激活的最终途径结果均为激活凝血酶而使纤维蛋白原凝结。鉴于 FPS 对两种途径形成的凝血均有抑制作用,且 FPS 与肝素一样,同为硫酸酯多糖,因此推测 FPS 的作用靶点可能类似

于肝素,即抑制凝血酶原的激活^[8]。

全血浆凝块溶解试验表明,其使凝块溶解时间缩短;t-PA 试验表明其能升高 t-PA 活性,提高 t-PA/PAI的百分比,表明 FPS 可能不仅能够抑制凝血途径,对纤溶途径还有激活作用。

参考文献:

[1] 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.
 [2] 许实波. 心血管生理药理实习指导 [M]. 广州:中山大学, 1993.
 [3] 王振生,李翠琴,徐振波,等. 茶黄烷醇类的抗凝促纤溶及抑制

血小板聚集的体外实验研究 [J]. 浙江医科大学学报, 1988, 17 (4): 149.
 [4] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1994.
 [5] 许云禄,刘广芬,王晴川,等. 静脉注射蕲蛇酶对大鼠血浆 t-PA和 PAI-1活性的影响 [J]. 福建医科大学学报, 1997, 31 (2): 137-138.
 [6] 周衍椒. 止血生理与临床 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1987.
 [7] 赵海霞. 组织型纤溶酶原激活研究进展 [J]. 国外医学 输血及血液学分册, 1995, 18 19.
 [8] Thoma D P. Anti-factor Xa activity of heparan sulphate [J]. Thromb Res, 1976, 14 509.

不同成熟度香蕉果肉抗胃溃疡作用研究

朱惠,林建峰,郑幼兰

(福建省医学科学研究所 药理室,福建 福州 350001)

摘要:目的 比较不同成熟度(5成熟、7成熟、8-9成熟、成熟)的香蕉果肉的抗溃疡作用。方法 采用大鼠水浸应激性胃溃疡和乙酸烧灼型胃溃疡模型。结果 7成熟香蕉果肉能使溃疡指数降低,溃疡面积变小,溃疡容积减少,与生理盐水对照组比较疗效显著;5成熟虽有疗效,但不如7成熟香蕉果肉;8-9成熟疗效较差,成熟无效。结论 7成熟香蕉果肉疗效最好,疗效与7成熟香蕉果肉(胃舒康)质量标准所控制含糖量 2.0%~5.5% 具有相关性。
 关键词:香蕉果肉;抗胃溃疡;果肉成熟度

中图分类号: R286.56 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1018-02

Studies on antigastrelceosis of pulp of *Musa paradisiaca* var. *sapientum* during different maturation

ZHU Hui, LIN Jian-feng, ZHENG You-lan

(Department of Pharmacology, Fujian Institute of Medical Science, Fuzhou Fujian 350001, China)

Key words *Musa paradisiaca* L. var. *sapientum* O. Kuntze antigastrelceosis; pulp during different maturation

香蕉系芭蕉科芭蕉属植物,主要含 2,4,6-三硝基苯二酚的 2-(3,4-二羟基苯)乙胺盐、三萜类成分 31-去甲环波罗酮、葡萄糖、果糖、蔗糖、淀粉及多种酶。我国南方部分省市及印度等国家与地区民间采用未成熟的香蕉果肉 (*Musa paradisiaca* L. var. *sapientum* O. Kuntze) 治疗胃溃疡。我们曾报道了胃舒良(7成熟香蕉果肉)对大鼠应激性、消炎痛性、幽门结扎性及慢性醋酸性实验性胃溃疡具有保护作用^[1]。本文主要研究不同成熟度的香蕉果肉对大鼠实验性胃溃疡的影响。

1 材料

1.1 药物:香蕉果肉干粉由福州市医科所提供,批

号 931105,不同成熟度香蕉果肉的含糖量分别是:5成熟 (A) 1.78%、7成熟 (B) 4.24%、8-9成熟 (C) 7.89%、成熟 (D) 16.3%。试验时将香蕉果肉 A B C D 干粉过 100 目筛,用蒸馏水配制成 200 mg/mL 混悬液。雷尼替丁:汕头市化学制药厂,批号 930503

1.2 动物:SD 大鼠,♀♂ 兼用,体重 200~250 g,购自中外合资上海 SIPPR/BK 实验动物有限公司,清洁级,合格证号 0001572

2 方法与结果

大鼠按性别、体重随机分为实验组和对照组。实验组分别给予不同成熟度的香蕉果肉 1~4 g/kg,