

· 药理实验与临床观察 ·

水杉总黄酮对大鼠血小板聚集、血液流变性的作用及机制探讨

敖 英¹, 刘惟莞¹, 严常开², 石明健¹, 王红英^{1*}

(1. 武汉大学医学院 药理教研室, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉市武钢职工总医院 药械中心, 湖北 武汉 430080)

摘要: 目的 观察水杉总黄酮 (FMG) 对大鼠血小板聚集活性、血小板 5-HT 释放反应、血浆 NO 含量及血液流变性的影响。方法 比浊法测定大鼠血小板聚集活性、荧光光度法测定血小板 5-HT 释放反应、分光光度法测定血浆 NO 含量、血液流变全自动分析仪检测血液流变性。结果 FMG 抑制大鼠血小板聚集活性, 抑制血小板 5-HT 释放, 升高血浆 NO 含量, 降低急性血瘀大鼠的全血比粘度、血浆比粘度、红细胞电泳时间、红细胞压积、红细胞计数、血沉方程 K 值, 改善大鼠的血液流变性。结论 FMG 有抗血小板聚集活性、改善血液流变性的作用。其抗血小板聚集的作用机制可能与抑制血小板释放反应、增加体内 NO 合成及 Ca²⁺ 拮抗作用有关。

关键词: 水杉总黄酮; 血小板聚集; 5-HT 释放反应; 一氧化氮; 血液流变性

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)04-0327-03

Effect of total flavones isolated from *Metasequoia glyptostroboides* on platelet aggregation and hemorrheological properties in rats and research of its mechanism

AO Ying¹, LIU Wei-wan¹, YAN Chang-kai², SHI Ming-jian¹, WANG Hong-ying¹

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Wuhan University, Wuhan Hubei 430071, China;

2. Medicinal Instrument Center, Worker's General Hospital of Wuhan Steel Company, Wuhan Hubei 430080, China)

Abstract: **Object** To observe the effect of total flavones isolated from *Metasequoia glyptostroboides*

Hu et Cheng (FMG) on platelet aggregation, 5-HT of release, content of NO in plasma and hemorrheological parameters in rats. **Methods** Platelet aggregation was quantified by turbidimetry, release of 5-HT was assayed by fluorescence technique, and content of NO in plasma was determined by spectrophotometry. **Results** Inhibition of platelet aggregation and release of 5-HT, increase of NO content in plasma, as well as decrease of whole blood viscosity, plasma viscosity, red-cell electrophoresis time, red-cell specific volume, red-cell count and K value in ESR equation were observed in the acute blood stasis rat, thereby the rat's hemorrheological properties were improved. **Conclusion** FMG is able to inhibit the platelet aggregation and improve the hemorrheological parameters in acute blood stasis rat. The inhibition of release of 5-HT, increase of NO content in plasma and antagonistic action of Ca²⁺ may be the mechanism of its actions.

Key words: total flavones of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (FMG); platelet aggregation; 5-HT release reaction; NO; hemorrheological properties

血栓性疾病、心脑血管疾病往往存在血小板功能亢进及血液流变性的异常。抑制血小板聚集活性、改善血液流变性可有效防治此类疾病的发生、发展。水杉总黄酮 (total flavones of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng, FMG) 是中科院武汉植物研究所从古老杉属植物中提取的活性部位, FMG 具有抗心肌缺血、心律失常和心肌肥厚的作用^[1-4], 对心血管疾病有一定保护作用。本研究观察了 FMG 对大鼠血小板聚集活性和血液流变性的影

响, 进一步探讨其对心脑血管栓塞性疾病的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物和试剂: 阿司匹林由石家庄神威药业股份有限公司生产, 批号: 01030314; 水杉总黄酮 (FMG) 由中科院武汉植物研究所提供, 含量为 32%; 二磷酸腺苷 (ADP) 系 Sigma 公司产品; 凝血酶由武汉海特生化有限公司生产, 批号: 鄂医卫准字

* 收稿日期: 2001-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (No. 39970085)

作者简介: 敖 英 (1975-), 女, 湖北武汉人, 武汉大学医学院药理教研室助教, 在读硕士研究生, 主要从事心血管药理研究。

Tel: (027) 87331875

(92) 397 号;川芎嗪注射液由常州制药厂生产。

1.1.2 动物: Wistar 大鼠, 体重 220~250 g, 由湖北省卫生防疫站提供。

1.1.3 仪器: LBY-NJ2 型血小板聚集仪, 北京普利生公司产品; FASCO-3010A 全自动血液流变快速分析仪, 重庆大学维多生物工程研究所产品; 岛津 RF-540 型荧光分光光度计, 日本岛津公司产品; UV-120-02 型紫外分光光度计, 日本 Shimadzu 公司产品; 80-2B 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 血小板聚集活性测定: 32 只雄性 Wistar 大鼠随机分成 4 组, 分别 ig FMG 40, 20 mg/(kg · d)、阿司匹林 5 mg/(kg · d) 及等容量生理盐水, 连续 7 d。第 7 天 ig 1 h 后戊巴比妥钠 35 mg/kg 腹腔麻醉, 颈总动脉插管取血, 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝。800 r/min 离心 8 min, 取上层富血小板血浆 (PRP), 余血 4 000 r/min 离心 10 min, 取贫血小板血浆 (PPP), 用 PPP 调 PRP 至血小板数 $(6 \sim 7) \times 10^8$ /mL。每次取 PRP 200 μ L 于比浊杯中, 37 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 分别加诱导剂 ADP (4 μ mol/L)、凝血酶 (500 U/L) 诱导聚集, 按比浊法测定血小板聚集活性。

1.2.2 血小板 5-HT 释放反应测定: 32 只雄性 Wistar 大鼠, 分组、给药、取血、制备 PPP 和 PRP 同 1.2.1。凝血酶 (500 U/L) 诱导聚集 5 min 后, 立即置于冰浴中, 加 5% EDTA 10 μ L 终止反应。3 000 r/min 离心 10 min, 取上清为聚集后 PPP。用荧光光度法^[5]测定血小板 5-HT 释放率。

1.2.3 血浆 NO 含量测定^[6]: 取上组 PPP 200 μ L, 用双蒸水稀释至 3 mL, 分别加入 0.8% 对氨基苯磺酸、0.5% α -萘胺各 125 μ L, 室温反应 20 min, 540 nm 处测定吸光度值, 以标准曲线计算 NO₂⁻ 含量。标准管、空白管、样品管平行操作。

1.2.4 急性血瘀大鼠血液流变性的测定: 40 只 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 即对照组、模型组、FMG 高、低剂量组、川芎嗪组。各给药组分别 ig FMG 40, 20 mg/(kg · d), 对照组和模型组给予等容量生理盐水, 连续 7 d。末次给药后 1 h, 按文献^[7]制作急性血瘀模型。次晨取血 4 mL 放入肝素化的定量采血管中, 以 FASCO-3010A 全自动血液流变快速分析仪测定其血液流变学指标。

1.3 统计学分析: 全部资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 excel2000 软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 FMG 对血小板聚集活性的影响: FMG 各剂量组与对照组比较, ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集率分别降低, 有明显的抑制作用, 并具有一定量效关系, 结果见表 1。

表 1 FMG 对大鼠血小板聚集活性的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	剂量 (mg/kg · d)	例数	ADP		凝血酶	
			最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率
对照	-	8	56.60 \pm 6.28	-	75.96 \pm 9.64	-
FMG	40	7	44.80 \pm 5.42**	20.85	59.84 \pm 11.25**	21.22
	20	7	48.99 \pm 5.11*	13.43	62.00 \pm 7.86**	18.38
阿司匹林	5	8	46.64 \pm 6.97*	17.67	64.74 \pm 7.06*	14.77

与对照组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

2.2 FMG 对血小板 5-HT 释放反应和血浆 NO 含量的影响: FMG 各剂量组对凝血酶诱导的大鼠血小板 5-HT 释放率有明显抑制作用, 与对照组比较, 5-HT 释放率分别降低 39.30%、38.63% (*P* 均 < 0.01), 血浆 NO 含量分别升高 175.05%、122.16% (*P* 均 < 0.01), 结果见表 2。

表 2 FMG 对大鼠血小板 5-HT 释放率及血浆 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg · d)	例数	5-HT 释放率 (%)	血浆 NO 含量 (μ mol/L)
对照	-	8	34.83 \pm 8.85	5.01 \pm 0.43
FMG	40	7	21.24 \pm 6.93**	13.78 \pm 1.18**
	20	7	21.37 \pm 8.07**	11.13 \pm 2.21**
阿司匹林	5	7	23.73 \pm 6.91*	8.49 \pm 0.95*

与对照组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

2.3 FMG 对急性血瘀大鼠血液流变性的影响: 模型组与对照组比较, 全血比粘度、血浆比粘度、红细胞电泳时间、红细胞压积、血沉方程 *K* 值、红细胞计数均明显升高, 提示血瘀模型制作成功。与模型组比较, FMG 各剂量组对血瘀大鼠高、中、低切全血比粘度分别降低 14.25% (*P* < 0.01)、13.95% (*P* < 0.05)、9.11% (*P* < 0.05); 7.54% (*P* > 0.05)、13.90 (*P* < 0.05)、6.73% (*P* > 0.05); 血浆比粘度分别降低 8.95% (*P* < 0.01)、- 0.08% (*P* > 0.05); 红细胞电泳时间分别降低 14.25% (*P* < 0.05)、7.54% (*P* > 0.05); 红细胞压积分别降低 8.59% (*P* < 0.05)、11.80% (*P* < 0.01); 血沉方程 *K* 值分别降低 24.55% (*P* < 0.05)、28.76% (*P* < 0.01); 红细胞计数分别降低 11.92% (*P* < 0.05)、13.94% (*P* < 0.01), 结果见表 3。

3 讨论

近年来, 随着物质生活水平的提高和生活节奏的加快, 冠心病、高血压、脑血管疾病等发病率大大

表 3 FMG 对急性血瘀大鼠血液流变性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 (g/kg·d)	全血比粘度 (mPa·s)			血浆比粘度 (mPa·s)	红细胞电泳 时间(s)	红细胞压积 (L/L)	血沉方程 K 值	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$)
		高切 (200/s)	中切 (30/s)	低切 (3/s)					
对照	-	4.71 ± 0.44	6.03 ± 0.59	12.56 ± 1.20	1.59 ± 0.04	17.67 ± 1.66	0.46 ± 0.03	4.28 ± 0.65	4.97 ± 0.32
模型	-	5.27 ± 0.41*	6.74 ± 0.52*	13.65 ± 0.88	1.78 ± 0.07**	19.78 ± 1.54*	0.52 ± 0.03**	5.78 ± 1.12**	5.70 ± 0.61*
FMG	40	4.52 ± 0.70	5.80 ± 0.83	12.41 ± 0.88	1.62 ± 0.11	16.96 ± 2.63	0.47 ± 0.04	4.38 ± 1.13	5.02 ± 0.50
	20	4.87 ± 0.89	5.80 ± 0.74	12.73 ± 1.92	1.78 ± 0.21	18.29 ± 3.35	0.45 ± 0.01	4.11 ± 0.20	4.91 ± 0.11
川芎嗪	20	4.70 ± 0.41	6.15 ± 0.34	12.58 ± 0.63	1.69 ± 0.10	17.63 ± 1.52	0.45 ± 0.03	4.13 ± 0.64	4.89 ± 0.35

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

提高, 这些疾病的发生与血小板聚集、粘附等活性增高相关以外, 还与血液流变性异常、血液粘度增加、血细胞变形能力降低、聚集能力增强有关。本研究结果显示: FMG 能抑制 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集活性, 降低急性血瘀大鼠全血比粘度、血浆比粘度、红细胞电泳时间、红细胞压积、红细胞计数、血沉方程 K 值, 改善急性血瘀大鼠的粘、凝状态, 表明 FMG 有抗血小板聚集、改善血液流变性的作用。

血小板具有粘附、变形、分泌、释放、及聚集等功能。凝血酶等诱导剂与血小板膜上相应受体结合, 通过 G 蛋白偶联激活磷脂酶 C, 后者将 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP₂) 裂解为三磷酸肌醇 (IP₃) 及二酰甘油 (DG)。IP₃ 进入胞内, 促使血小板致密管系统释放 Ca²⁺, 使胞浆内游离 Ca²⁺ 浓度上升, 引起微丝收缩、血小板变形, 并促使静息血小板内低浓度 Ca²⁺ 条件下的酶活化。DG 留在膜上, 激活蛋白激酶 C, 引起颗粒分泌, 颗粒内容物如 ADP、TXA₂、5-HT 等向胞外释放, 纤维蛋白原受体 (α₂β₁) 变构, 露出结合部位, 共同导致血小板聚集即活化^[8]。而释放出的 5-HT 和 ADP 又可作用于膜上相应受体, 引起血小板进一步聚集^[9]。本研究表明: FMG 能抑制凝血酶诱导的 5-HT 释放反应, 提示其可以抑制凝血酶诱导的血小板活化。而对 5-HT 释放反应的抑制又可能为抗血小板聚集的机制之一。另外, Ca²⁺ 作为第二信使, 在血小板活化过程中起重要作用。以往研究表明 FMG 有降低组织总 Ca²⁺、细胞内 Ca²⁺ 和阻断 Ca²⁺ 通道^[2, 10]的作用, 提示其降低血小板聚集的作用可能与 Ca²⁺ 拮抗作用有关。但其具体机制仍需进一步探讨。

体内普遍存在精氨酸—氧化氮—环磷酸鸟苷代谢通路。NO 在心血管、神经和免疫系统中作为信使分子, 具有重要的生理病理作用。NO 具有抗血小板聚集、抗血小板和血细胞粘附, 抑制凝血酶和 TXA₂ 类似物诱导的血小板膜糖蛋白、p 选择素、CD65 和 GP IIb/IIIa 复合物表达增强的作用。其作用机制认

为系由精氨酸—氧化氮—环磷酸鸟苷代谢通路介导, 使血小板 cGMP 升高, 通过 cGMP 的第二信使作用, 调节收缩蛋白的磷酸化水平, 并使 Ca²⁺ 水平下降, 从而抑制血小板聚集^[11, 12]。FMG 增加大鼠血浆 NO 含量, 可能为其抗血小板聚集的机制之一。

综上所述, FMG 能改善血液流变性, 抑制血小板聚集。其抗血小板聚集作用机制可能与抑制血小板释放反应、增加血浆 NO 含量及 Ca²⁺ 拮抗作用有关。但其对心脑血管疾病的保护作用机制仍有待进一步深入。

参考文献:

- [1] 程虹, 刘惟莞, 陈翔, 等. 水杉总黄酮抗实验性心律失常的作用[J]. 湖北医科大学学报, 1999, 20(1): 28-29.
- [2] 杨晓茹, 刘惟莞, 石明健, 等. 水杉总黄酮抗实验性心肌梗厚作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 87-89.
- [3] 刘惟莞, 曾加雄, 石明健, 等. 水杉总黄酮对肾性高血压大鼠左室肥厚的作用[J]. 中草药, 2000, 31(11): 837-839.
- [4] 刘惟莞, 杨晓茹, 屠治本, 等. 水杉总黄酮抗实验性心肌梗厚及抑制心室 c-Fos 蛋白表达的作用[J]. 中草药, 2001, 32(4): 329-332.
- [5] 张均田. 现代药理实验法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [6] 丁虹, 彭仁琇, 黎七雄. 腹腔注射硝酸甘油小鼠心、脑、肾一氧化氮含量的变化[J]. 湖北医科大学学报, 2000, 21(1): 22-23.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [8] Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, et al. Proteinase-activated receptors [J]. Pharmacol Rev, 2001, 53(2): 245-282.
- [9] 李柏岩, 李文汉. 兔血小板释放的内源性 5-HT 对凝血酶诱导的血小板聚集和 ATP 释放的体外影响[J]. 中国药理学报, 1998, 19(4): 383-386.
- [10] 曾加雄, 刘惟莞, 石明健, 等. 水杉总黄酮对压力超负荷大鼠左室肥厚的作用[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 622-624.
- [11] Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory function of the vascular endothelium [J]. New Engl J Med, 1990, 323(1): 27-36.
- [12] Ignarro LJ, Ross G, Tillisch J. Pharmacology of endothelium-derived nitric oxide and nitrovasodilations [J]. West J Med, 1991, 154(1): 51-62.