

表 3 结果提示:蜂毒素对 H₂皮下移植瘤具有明显的抑制作用,且随浓度增大,抑瘤作用逐渐增强。

表 3 蜂毒素对皮下荷 H₂肝癌小鼠的抑瘤及延长生存期作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Antitumor and prolonging survival time effect of melittin on subcutaneous inoculation mice with H ₂ hepatocarcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)					
组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	平均瘤重 /g	抑瘤率 %	生存期 /d	生命延长率 %
蜂毒素	4.5	0.33±0.13	84.3	24.18±1.89*	67.30
	3.0	0.64±0.07	69.5	18.09±1.70*	15.03
	1.5	2.03±0.41	3.3	16.09±1.38	9.04
环磷酰胺	30	0.07±0.02*	96.7	23.6±1.69*	57.06
对照	-	2.10±0.47	0	14.45±1.37	0

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本实验采用 MTT 法检测了蜂毒素对体外培养的小鼠肝癌 H₂细胞的杀伤作用,结果表明,8μg / mL 以上蜂毒素对 H₂细胞的抑制率均在 70% 以上,作用明显,且随药物浓度增加而增强。本实验还在体外实验的基础上,继续观察了蜂毒素对小鼠皮下 H₂细胞移植瘤的抑瘤效果。结果表明蜂毒素不但在体外可抑制 H₂细胞生长增殖,在体内亦能明显抑制移植瘤的生长,随药物浓度增大,抑瘤作用逐渐增强,同时明显延长了荷瘤小鼠的存活时间。

增殖细胞核抗原 (PCNA) 是真核细胞合成 DNA 所必需的一种酸性核蛋白,近年研究表明其

是 DNA 聚合酶的辅助蛋白之一,调控 DNA 的合成,并在细胞周期中起重要的调控作用^[5]。PCNA 在 G₁后期开始表达,并逐渐升高, G₁ / S 期交界处达到高峰, S 期持续高水平表达,到 G₂期明显下降。现已证明 PCNA 的合成与表达与细胞的增殖状态相关,其量的变化与 DNA 的合成一致。本研究结果发现,蜂毒素作用于 H₂细胞 24, 48 h 后,细胞平均荧光强度低于对照组,提示 H₂细胞经蜂毒素作用后,参与 DNA 合成的 PCNA 的表达明显下降,故推测影响 PCNA 的表达可能是蜂毒素抑制小鼠肝癌 H₂细胞生长和增殖的作用环节之一,确切的作用机制值得进一步探讨。

References

[1] Zhu H G, Tayeh I, Israel L, et al. Castagna M different susceptibility of lung cell to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1991, 5(2): 52-58.

[2] Ling C Q, Huang X Q, Liu L. The antitumor effect of melittin in vitro [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 612-614.

[3] Huang X Q, Ling C Q, Chen Z, et al. Apoptosis of human acute T lymphocyte leukemia cell line 6T-CEM induced by melittin [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 2001, 20(5): 39-41.

[4] Liu L, Ling C Q, Hu J H, et al. Isolation, purification and content determination of melittin from bee venom [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 609-611.

[5] Waga S, Hannon G J, Beach D, et al. The p^{ri}-inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [J]. *Nature*, 1994, 369(6481): 574-578.

泽兰有效部分对血小板聚集和血栓形成的影响

石宏志¹,高南南²,李勇枝¹,余竞光²,范全春¹,白桂娥^{1*}

(1. 航天医学工程研究所,北京 100094; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

摘要: 目的 研究泽兰有效部分 L-F04对血小板聚集和血栓形成的影响,探讨其活血化瘀作用机制。方法 用高分子右旋糖酐静脉推注造成大鼠血瘀证模型,观察泽兰 L-F04对二磷酸腺苷 (ADP) 诱导的大鼠体内血小板聚集以及体内动静脉旁路血栓、体外旋转环内血栓形成的影响。结果 L-F04 0.408, 0.204 g/kg 对模型组大鼠 ADP 诱导的体内血小板最大聚集率明显增加皆有显著的抑制,且呈剂量依赖关系;与对照组相比,血瘀模型大鼠体外血栓质量明显增加,长度仅有增加趋势, L-F04高、低剂量 (0.408, 0.204 g/kg) 皆有抗血栓形成作用, L-F04高剂量对血栓干质量、湿质量的减轻尤为明显; L-F04高、低剂量对实验性动静脉旁路血栓形成均有明显的抑制作用,抑制率分别为 27.41%, 27.14%。结论 泽兰 L-F04可显著抑制血小板聚集及体内、外血栓形成。

关键词: 泽兰; 血小板聚集; 血栓

中图分类号: R852.22; R286.32 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0923-04

* 收稿日期: 2002-12-18
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770899)
作者简介: 石宏志 (1970-),女,河北永清人,航天医学工程研究所助理研究员,硕士,毕业于中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所,研究方向为生药学、航天医学。Tel (010) 66362387 E-mail shihongz2002@yahoo.com.cn

Effects of active fractions L. F04 from ground part of *Lycopus lucidus* var. *hirtus* on platelet aggregation and thrombosis formation

SHI Hong-zhi¹, GAO Nan-nan², LI Yong-zhi¹, YU Jing-guang²,

FAN Quan-chun¹, BAI Gui-e¹

(1. Institute of Space Medico-Engineering, Beijing 100094, China; 2. Institute of Medicinal Plant, CAMS& PUMC, Beijing 100094, China)

Abstract **Object** To study the effects of active fraction L. F04 from the ground part of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Reg. on platelet aggregation and thrombosis formation and investigate its mechanisms of promoting blood circulation and removing blood stasis. **Methods** The effects of L. F04 on platelet aggregation induced by ADP *in vivo*, thrombosis of artery-vein side road and thrombus formed in rotary loop *in vitro* were examined, the rat model of blood stasis made by injecting high molecular weight dextran (HMWD) was used. **Results** L. F04 0.408 and 0.204 g/kg evidently inhibited the ADP-induced increase of platelet maximum aggregation rate *in vivo* in HMWD model, with a concentration-dependent manner. Compared with the control group, the thrombus weight in rat model of blood stasis was increased significantly and the length of thrombus was shown an increasing tendency. L. F04 0.408 and 0.204 g/kg both shown the anti-thrombosis effect. L. F04 0.408 g/kg showed better effects of lessening the thrombus dry weight and wet weight. Both L. F04 0.408 and 0.204 g/kg could inhibit the thrombosis of artery-vein side road, the inhibition rates are separately 27.41% and 27.14%. **Conclusion** *L. lucidus* var. *hirtus* F04 could significantly inhibit platelet aggregation and thrombosis formation.

Key words the ground part of *Lycopus lucidus* var. *hirtus* Reg.; platelet aggregation; thrombosis

泽兰是唇形科植物毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Reg. 的干燥地上部分,是常用的活血化瘀中药,其水煎剂能降低血液黏度、纤维蛋白原含量、红细胞压积及缩短红细胞电泳时间、减少红细胞聚集^[1],还有抑制血小板聚集、抗凝血和血栓形成^[2]、改善微循环^[1]、调节血脂代谢^[3]等作用。然而,国内外对泽兰有效部分及有效成分的药理学研究比较少^[4,5]。曾对泽兰的4个提取部分(乙醇提取部分、水提取部分、乙醇提取物水溶性部分、L. F04)进行初步筛选,确定其有效部分为L. F04(用CH₂Cl₂-H₂O分配后的中间层)^[4]。本实验旨在研究L. F04对血小板聚集和体内、外血栓形成的影响,并为进一步提取其有效成分,改进剂型,开发新药提供理论基础。

1 材料

1.1 动物: Wistar大鼠,雄性,由北京市海淀区通利实验动物养殖场提供。

1.2 试剂: 二磷酸腺苷(ADP),北京普利生科贸集团提供;戊巴比妥钠,化学纯,佛山市化工实验厂;枸橼酸三钠,分析纯,北京化工厂;肝素钠,效价150 U/mg,北京鼎国技术发展中心产品;高分子右旋糖酐(Dextran500),瑞典Pharmacia Biotech公司。

1.3 受试药品: 泽兰L. F04提取部分,褐绿色粉末,无味,4.08 mg/g生药,用时加入5% Tween-80助溶,配成均匀的混悬液,由中国医学科学院药用植

物研究所植化室余竞光教授提供;阳性药复方丹参片(每片含丹参浸膏0.215 g、三七0.141 g、冰片0.008 g),河北巨龙药业有限责任公司生产,规格: 4.568 g/10片,批号20000226。

1.4 仪器: LBY-NJ血液凝聚仪,北京普利生精密仪器研究中心生产;XSN-RI型体外血栓形成、血小板黏附两用仪,无锡县电子仪器二厂生产;AE-240电子天平,瑞士Mettler Toled公司生产。

2 方法

2.1 动物分组及给药: 实验分两批进行,第1批大鼠体重(180±20)g,50只,随机分为5组,每组10只: 正常对照组与高分子右旋糖酐模型组(以下简称高右模型组)ig等体积蒸馏水;L. F04高、低剂量组分别ig L. F04 0.408, 0.204 g/kg;阳性药复方丹参片组ig复方丹参片1.175 g/kg,每日ig 1次,连续10 d。末次给药后1 h,除正常对照组外,其余各组大鼠由尾静脉快速推注10%高分子右旋糖酐500 5 mL/kg 1 h后戊巴比妥钠45 mg/kg ip麻醉,颈总动脉取血3 mL,3.8%枸橼酸三钠1:9抗凝,测血小板聚集率;取血1.8 mL,不抗凝,做体外血栓形成实验。第2批大鼠体重240~260 g,41只,随机分为4组,正常对照组11只,其余各组10只,不采用高分子右旋糖酐造模,其余各组给药时间、方法及剂量皆与第1批相同。末次给药后1 h做体内血栓形成实验。

2.2 测量指标和方法

2.2.1 血小板聚集实验:比浊法。取血 3 mL,1 000 r/min 离心 6 min,吸取上层富血小板血浆 (Platelet-rich-plasma, PRP) 余下的血浆再以 3 000 r/min 离心 15 min,即得贫血小板血浆 (Platelet-poor-plasma, PPP) 以 PPP调 PRP使透光度在 30左右 (血小板数 $\times 10^8$ /mL),取 200 μ L PRP,加入磁棒,置仪器的恒温孔中 37 $^{\circ}$ C 预温 5 min,另取 200 μ L PPP备用。根据仪器提示,在测试通道中插入 PPP,自动调零后,换入 PRP,在电磁搅拌下,加入致聚剂 ADP (终浓度为 300 μ mol/L) 10 μ L,观察药物对 ADP诱导血小板聚集功能的影响,计算最大聚集率^[6]。

2.2.2 体外血栓形成实验:取血 1.8 mL,迅速放入内径为 4 mm 的硅胶管中,在体外血栓形成仪上以 17 r/min 37 $^{\circ}$ C 下旋转 10 min,旋转完毕立即取下圆环,倒出血栓,用滤纸吸去多余血液,直尺量血栓长度,分析天平称血栓湿质量 干燥箱 64 $^{\circ}$ C 烘烤 30 min,称血栓干质量^[6]。

2.2.3 体内血栓形成实验:大鼠戊巴比妥钠 45 mg/kg ip 麻醉,仰卧位固定于手术板上,分离右颈总动脉和左颈外静脉,在 3段聚乙烯管中放一长 12 cm 已称质量的手术丝线,肝素钠生理盐水 (50 U /mL) 充满聚乙烯管中,并按 50 U /mL注入静脉内,连通动、静脉环路,开放循环后计时 15 min,中断血流,迅速取出丝线称质量,减去丝线质量即为血栓湿质量,同时计算血栓形成抑制率^[7]。

2.3 数据处理:实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用第四军医大学卫生统计学教研室所编 SPLM 1.0版中文统计软件,用方差分析及 q 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 对 ADP诱导的大鼠体内血小板聚集的影响:高分子右旋糖酐静脉推注使 ADP诱导的大鼠体内血小板最大聚集率显著增加,与正常对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。泽兰 L. F04高、低剂量均可

使最大聚集率明显下降,与高右模型组相比有显著差异 ($P < 0.01$),且 L. F04的作用存在量效关系。阳性药复方丹参片也表现出良好的抑制血小板聚集作用,见表 1

表 1 L. F04对 ADP 诱导的大鼠体内血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of L. F04 on platelet aggregation induced by ADP in rats in vivo ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量 $I(g \cdot kg^{-1})$	血小板最大 聚集率 %	血小板聚集 抑制率 %
正常对照	—	30.92 $\pm$ 5.028	—
高右模型	—	63.30 $\pm$ 5.477 *	—
L. F04	0.204	50.52 $\pm$ 10.237 * ##	20.19
	0.408	41.66 $\pm$ 7.409 # # Δ	34.19
复方丹参片	1.175	37.84 $\pm$ 7.469 # $\Delta\Delta$	40.22

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与 L. F04小剂量组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs L. F04 low-dose group

3.2 对血瘀大鼠体外血栓形成的影响:注射高分子右旋糖酐所致血瘀证大鼠其血栓干质量、湿质量与对照组相比都明显增加 ($P < 0.05$),长度仅有增加趋势,泽兰 L. F04有减轻血栓质量的作用,高剂量组血栓干、湿质量与模型组相比有明显降低 ($P < 0.01$),低剂量组和复方丹参片组血栓湿重与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$),见表 2

3.3 对大鼠体内血栓形成的影响: L. F04高、低剂量组及阳性对照药复方丹参片组血栓湿质量与空白对照组比较,明显减轻 ($P < 0.05$),表明 L. F04及复方丹参片对体内血栓形成有明显的抑制作用, L. F04高、低剂量组间未显示出明显的量效关系,见表 3

4 讨论

从现代医学角度来看,中医的血瘀证与血栓形成密切相关。而血小板在止血和血栓形成过程中起关键性作用,血小板的黏附、聚集和释放是其在生理条件下止血功能的基本条件,也是其在病理情况下

表 2 L. F04对血瘀大鼠体外血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of L. F04 on thrombosis in blood stasis rats in vitro ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物 只	剂量 $I(g \cdot kg^{-1})$	血栓长度 /mm	血栓湿质量 /g	血栓干质量 /g
正常对照	8	—	117.25 $\pm$ 20.949	0.356 $\pm$ 0.148	0.083 $\pm$ 0.035
高右模型	10	—	137.25 $\pm$ 10.784	0.566 $\pm$ 0.127	0.145 $\pm$ 0.037
L. F04	10	0.204	113.90 $\pm$ 26.379	0.415 $\pm$ 0.187 [#]	0.101 $\pm$ 0.504
	10	0.408	105.34 $\pm$ 25.810	0.274 $\pm$ 0.127 ^{# #}	0.066 $\pm$ 0.023 [#]
复方丹参片	10	1.175	116.85 $\pm$ 23.788	0.351 $\pm$ 0.173 [#]	0.106 $\pm$ 0.035

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs normal control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

表 3 泽兰 L. F04对大鼠体内血栓形成的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of L. F04 on thrombosis

in rats *in vivo* ($\bar{x}\pm s$)

组 别	动物 /只	剂量 /(g·kg ⁻¹)	血栓湿重 /g	血栓形成抑 制率 %
正常对照	11	—	35.82± 10.88	—
L. F04	10	0.204	26.10± 9.97	27.14
	10	0.408	26.10± 7.16	27.41
复方丹参片	10	1.175	24.40± 9.90	31.88

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal control group

形成血栓的主要因素。观察泽兰 L. F04对血小板聚集和血栓形成的影响,是研究其活血化瘀作用机制的一个重要组成部分。本实验结果表明,泽兰 L. F04高、低剂量 ig 给药对血瘀证大鼠 ADP诱导的血小板聚集皆有显著的抑制作用,且呈剂量依赖关系,与预期结果相一致,并为确定 L. F04为泽兰活血化瘀作用的主要有效部分提供了进一步的证据

本实验结果还表明,泽兰 L. F04 0.408, 0.204 g/kg均能有效地减轻血瘀大鼠体外血栓湿、干质量及抑制大鼠体内血栓形成,其中高剂量组的抗血栓作用尤为显著。研究证实泽兰 L. F04不仅可以抑制血小板聚集,还通过阻抑凝血系统功能,减少血浆纤

维蛋白原含量来抑制血栓形成。同时 L. F04具有较强的改善红细胞变形能力、抑制红细胞聚集、降低血液黏度等特点^[5],说明 L. F04从多种途径、多种作用环节干预血栓形成过程。其中抑制血小板聚集起关键性作用。

References

[1] Liu X M, Gao N N, Yu S R, *et al.* Improving effects of Shing Bugleweed (*Lycopus lucidus*) on blood stasis syndrome of rabbit induced by simulating weightlessness [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(11): 501-503.

[2] Hu H J, Qi G R, Chen Y X, *et al.* Anticoagulation of herb *Lycopus lucydis* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1995, 11(6): 28-31.

[3] Zhang Y J, Kang B, Geng X F, *et al.* Study on effect depressing blood-lipid of *Herba Lycopy* [J]. *J Weifang Med Coll* (潍坊医学院学报), 1993, 15(1): 16-17.

[4] Gao N N, Tian Z, Li L L, *et al.* Studies on the blood-activating and stasis-resolving pharmacology of shing bugleweed (*Lycopus lucidus*) I. Effects of four extract fractions of shing bugleweed on the hemorrheology of rat [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(6): 352-355.

[5] Shi H Z, Gao N N, Li Y Z, *et al.* Effects of active fractions from *Lycopus lucidus* L. F04 on erythrocyterheology [J]. *Space Med Med Eng* (航天医学与医学工程), 2002, 15(5): 331-334.

[6] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.

[7] Xu L N, Ou Y R. Antithrombotic effects of sodium ferulate in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1981, 2(1): 35-37.

板蓝根中丁香酸的抗内毒素作用

刘云海,方建国,贡雪芃,谢 委*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院,湖北 武汉 430030)

摘 要: 目的 研究从板蓝根中分离出的丁香酸的抗内毒素作用。方法 将丁香酸配成 1% 水溶液,鲎试验法做抗内毒素定量测定;用内毒素致兔发热实验检测丁香酸体内抗内毒素作用;内毒素致小鼠死亡实验测定丁香酸保护作用。结果 0.334 mg/mL丁香酸可使 4 EU内毒素降为 0.777 EU,破坏率为 83.16%;1% 丁香酸溶液可使内毒素引起的兔热显著降低;使同等剂量脂多糖引起的小鼠死亡率由 68% 降为 20%。结论 丁香酸有抗内毒素作用。

关键词: 丁香酸; 抗内毒素; 板蓝根

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0926-03

Anti-endotoxic effects of syringic acid in *Radix Isatidis*

LIU Yun-hai, FANG Jang-guo, GONG Xue-peng, XIE Wei

(Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract **Object** To study the anti-endotoxic effect of syringic acid (SA) which was isolated from *Radix Isatidis* (Banlangen in Chinese, BLG). **Methods** SA was extracted and isolated from BLG and made to 1% solution. The content of SA-pretreated ET was quantitatively determined using Limulus Test. Then the ability of fever induction of endotoxin (ET) pretreated with SA was measured using endo-

* 收稿日期: 2002-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870872); 卫生部科学研究基金资助项目 (98-2-110)

作者简介: 刘云海(1942-),男,江苏如东人,主任药师,主要从事医院药学研究 Tel (027) 83649095 83624090

E-mail liuyunhaitong@yahoo.com.cn