

叶下珠有效部位对凝血系统的影响

沈志强^{1,2}, 陈 蓬³, 段 理⁴, 董泽军¹, 刘吉开^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2. 昆明医学院 云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650031; 3. 昆明圣火制药有限公司, 云南 昆明 650217; 4. 昆明医学院第一附属医院 放射科, 云南 昆明 650031)

摘要:目的 探讨叶下珠含 corilagin (1-酰-3, 6-六羟基联苯二甲酰基葡萄糖) 有效部位的水溶性部分 (简称 PUW) 对凝血系统的影响。方法 采用 Kowalski、黄正良及顾月芳等方法观察 PUW iv 对家兔优球蛋白溶解时间 (euglobulin lysis time, ELT)、全血凝血时间、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、白陶土部分凝血活酶时间 (kaolin partial thromboplastin time, KPTT) 及大鼠尾尖出血时间的影响。结果 PUW iv 明显缩短 ELT, 在体内外均延长 KPTT, 对 PT 无明显影响; PUW 对家兔全血凝血时间亦无影响, PUW 虽延长大鼠尾尖出血时间, 但与尿激酶或阿司匹林比较, PUW 组的出血时间显著缩短。结论 PUW 缩短 ELT 和延长 KPTT 是其具有明显的纤溶作用的原因之一; 作为一种有苗头的抗栓药, PUW 有引起出血的倾向, 但不会造成严重的出血不良反应。

关键词: 叶下珠水溶部分; corilagin; 优球蛋白溶解时间; 凝血酶原时间; 白陶土部分凝血酶原时间

中图分类号: R 286. 32

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)05-0539-04

Effects of active fraction from *Phyllanthus urinaria* on coagulation system

SHEN Zhi-qiang^{1,2}, CHEN Peng³, DUAN Li⁴, DONG Ze-jun¹, LIU Ji-kai¹

(1. Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; 2. Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China; 3. Kunming Shenghuo Pharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650217, China; 4. Department of Radiation, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of PUW (an active fraction containing 60% corilagin from *Phyllanthus urinaria* L. water solution) on coagulation system. **Methods** The methods of Kowalski, Huang Zhengliang, and Guyuefang *et al.* were used to observe the effects of PUW on euglobulin lysis time (ELT), coagulation time, prothrombin time (PT), kaolin partial thromboplastin time (KPTT) in rabbits, and bleeding time (BT) in rats. **Results** The results showed that iv PUW significantly shortened ELT, prolonged KPTT, while had no influence on PT; PUW increased BT in rat tail tip, but the BT caused by PUW was much shorter than that by aspirin or urokinase. **Conclusion** It is suggested that the decrease of ELT and increase of KPTT might be contributed to the potent thrombolytic effect of PUW. PUW shows the tendency to bleeding, however, it could not cause serious side effect of bleeding as compared with aspirin or urokinase.

Key words: *Phyllanthus urinaria* L.; water solution (PUW) corilagin; euglobulin lysis time (ELT); coagulation time; prothrombin time (PT); kaolin partial thromboplastin time (KPTT)

叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 为大戟科一年生草本植物, 作为一种传统的中草药, 常用于抗菌和抗病毒, 民间主要用于治疗黄疸、肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿等症。从该植物中获得的水溶性有效部位, 简称 PUW (含 corilagin 60% 以上, corilagin 的化学名称: 1-酰-3, 6-六羟基联苯二甲酰基葡萄糖)。本研究组前期报道, PUW 具有明显的抗血栓形成作用^[1]和较强的溶栓作用, 其机制与其抑制血小板和

中性粒细胞之间的相互作用及抑制纤溶酶原激活物抑制物活性同时提高纤溶酶原激活物活性等密切相关。由于抗栓药一般都表现出一定程度的出血等不良反应, 因此有必要探讨 PUW 对凝血系统的影响。本研究观察 PUW 对家兔优球蛋白溶解时间 (euglobulin lysis time, ELT)、全血凝血时间、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 和白陶土部分凝血活酶时间 (kaolin partial thromboplastin time,

* 收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30225048); 科技部项目 (2001CCC00600)

作者简介: 沈志强 (1967—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物与心血管药理学, 于国内外发表论文 30 余篇。

Tel: (0871) 5332956 E-mail: szq21cn@hotmail.com

* 通讯作者 Tel: (0871) 5216327 E-mail: jkl@public.km.yn.cn

KPTT) 及大鼠尾尖出血时间的影响, 进一步研究 PUW 的纤溶活性并综合评价 PUW 作为一种有苗头的抗栓药对凝血系统的影响。

1 材料

1.1 动物: 健康家兔, 雌雄各半, 体重 2 ~ 3 kg; 雄性 SD 大鼠, 体重 250 ~ 300 g, 均由昆明医学院实验动物中心提供, 合格证号: 滇实动证字第 2002082 号和 2001034 号。

1.2 药物与试剂: PUW (含 corilagin 60% 以上) 的提取分离同文献报道^[1]。用前以生理盐水溶解, 100 mmol/L Na₂CO₃调 pH 值至 7.0。尿激酶从丽珠集团丽宝生化制药公司购买, 规格 1.0 × 10⁵ U/瓶, 批号 990301, 用前溶于生理盐水中。阿司匹林, 规格 100 mg/瓶, 批号 980818, 由昆明制药厂提供。PT 及 KPTT 测定试剂盒购自上海生物技术公司, PT 试剂国际敏感指数 ISI 值为 1.22。

1.3 主要仪器: LBY—NJ2 四道血液凝聚仪, 北京普利生科贸集团产品。THZ—C 恒温摇床, 江苏太仓实验设备厂生产。

2 方法与结果

2.1 对家兔 ELT 的影响^[2]: 健康家兔, 雌雄均用, 随机分为生理盐水组, 2.5, 5, 10 mg/kg PUW 组和 20 000 U/kg 的尿激酶组, 每组 5 只。各组均 iv 给

表 1 PUW 对家兔 ELT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组 别	剂 量	ELT/m in				
		给药前	10 min	30 min	60 min	120 min
生理盐水	—	141.3 ± 4.1	139.5 ± 3.8	149.4 ± 7.4	149.4 ± 9.4	143.9 ± 8.2
PUW	2.5 mg · kg ⁻¹	146.3 ± 6.7	140.5 ± 9.9	139.8 ± 15.2	152.4 ± 8.2	136.5 ± 14.3
	5 mg · kg ⁻¹	142.3 ± 13.6	136.4 ± 8.9	129.6 ± 11.4*	122.7 ± 9.4*	149.5 ± 6.8
	10 mg · kg ⁻¹	145.9 ± 13.5	125.9 ± 13.5*	112.7 ± 12.6**	111.4 ± 17.1**	134.8 ± 6.9
尿激酶	20 000 U · kg ⁻¹	140.0 ± 21.6	120.8 ± 18.1*	109.5 ± 11.4**	138.6 ± 14.2	139.7 ± 9.6

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group

2.2.1 体外实验^[3,4]: 取 PT 凝血活酶和 KPTT 冻干品各 1 支, 加 2 mL 蒸馏水轻摇溶解。将生理盐水或不同浓度的 PUW 药液与 PPP (2.1 项制备) 37 温育 2 min 后取出 100 μL, 加入 37 预温的凝血活酶 100 μL, 于四道血液凝聚仪测试, 凝固终点时自动停止计时, 以测定 PUW 在体外对 PT 和 KPTT 的影响。结果表明, 在体外 PUW (62.5 ~ 250 mg/L) 对 PT 无明显影响 ($P > 0.05$), 在 500 mg/L 时显著延长 PT; 对 KPTT 则具有浓度相关性明显延长作用, 见表 2。

2.2.2 体内实验^[3,4]: 家兔分组同 2.1 项, 每组 6 只, 均一次性 iv 给药。给药前及给药后 10, 30, 60

药, 并分别于给药前及给药后 10, 30, 60, 120 min 自家兔颈动脉取血于硅化的离心管中, 3.8% 枸橼酸钠抗凝 (9 1), 4 , 1 000 × g 离心 10 min, 得贫血小板血浆 (platelet-poor plasma, PPP), 水浴保存待用。取 0.5 mL PPP 加至预先冷却并含有 9 mL 蒸馏水的锥形离心管中, 再加入 1% 醋酸溶液 0.1 mL, 充分混匀后置 4 冰箱内静置 15 min, 优球蛋白呈絮状沉淀析出, 1 000 × g 离心 5 min 以分离沉淀。弃去上清液, 将离心管倒置在滤纸上约 2 min, 吸尽剩余酸液, 再将离心管置 37 的摇床内, 加 0.5 mL pH 9.0 的硼酸-四硼酸钠缓冲液 (6.7 g 硼酸+ 13.4 g 四硼酸钠, 用 1 L 蒸馏水溶解) 将优球蛋白部分溶解, 并用玻棒轻搅 1 min, 使沉淀彻底溶解, 再加 25 mmol/L CaCl₂溶液 0.5 mL 混匀 (纤维蛋白凝块形成)。管内液体开始凝固。记录从凝块开始形成至凝块完全溶解的时间, 即为 ELT。结果显示, 10 mg/kg PUW iv 后 10 min 即明显缩短 ELT, 于 30 及 60 min 达最强效应, 至 120 min 时无明显作用; PUW 5 mg/kg 于给药后 30 和 60 min 明显缩短 ELT; 2.5 mg/kg PUW 对 ELT 无显著影响; 尿激酶 iv 后 10 和 30 min 均显著缩短 ELT, 但 60 min 后则无明显影响, 见表 1。

2.2 对家兔 PT 和 KPTT 的影响

表 2 PUW 在体外对家兔 PT 和 KPTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of PUW on PT and KPTT in rabbits <i>in vitro</i> ($\bar{x} \pm s, n = 6$)			
组 别	浓度/(mg · L ⁻¹)	PT/s	KPTT/s
生理盐水	0	13.1 ± 1.0	37.4 ± 5.5
PU W	62.5	12.2 ± 1.5	67.5 ± 11.4**
	125	11.8 ± 1.9	105.4 ± 13.6**
	250	11.4 ± 2.5	155.1 ± 22.9**
	500	20.5 ± 4.1**	162.4 ± 13.3**

与生理盐水组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs NS group

及 90 min 分别取血。PPP 制备同体外试验。用四道血液凝聚仪同体外试验测定 PT 和 KPTT。结果显

示: 2.5 ~ 10 mg/kg PUW 和 20 000 U/kg 尿激酶 iv 后对 PT 均无明显影响; 对 KPTT 的影响表现为: 2.5 mg/kg PUW 仅于给药后 30 min 表现出—过性的延长作用, 5 mg/kg PUW 给药后 30 和 60

min 均显著延长 KPTT, 10 mg/kg PUW 给药 10 min 无明显影响, 给药后 30 ~ 90 min KPTT 均明显延长, 于 60 min 达最大延长效应; 尿激酶有延长 KPTT 趋势, 但无统计学意义, 见表 3 和 4。

表 3 PUW 在体内对家兔 PT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of PUW on PT in rabbits *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂 量	PT/s				
		给药前	10 min	30 min	60 min	90 min
生理盐水	—	13.7 ± 2.5	12.8 ± 1.6	14.3 ± 2.4	11.6 ± 2.7	12.4 ± 2.7
PUW	2.5 mg · kg ⁻¹	14.1 ± 1.9	13.2 ± 3.4	13.6 ± 2.8	12.7 ± 3.3	13.5 ± 2.2
	5 mg · kg ⁻¹	13.6 ± 4.1	12.9 ± 3.5	13.0 ± 2.2	14.6 ± 3.7	13.2 ± 2.6
	10 mg · kg ⁻¹	13.4 ± 2.2	13.6 ± 2.6	13.1 ± 1.6	12.4 ± 2.7	13.4 ± 3.6
尿激酶	20 000 U · kg ⁻¹	12.4 ± 2.1	13.8 ± 1.9	14.6 ± 2.3	13.8 ± 3.1	13.6 ± 1.3

表 4 PUW 在体内对家兔 KPTT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of PUW on KPTT in rabbits *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组 别	剂 量	KPTT/s				
		给药前	10 min	30 min	60 min	90 min
生理盐水	—	33.8 ± 3.5	37.6 ± 4.3	36.1 ± 3.7	34.2 ± 4.1	41.5 ± 5.4
PUW	2.5 mg · kg ⁻¹	36.9 ± 5.2	40.6 ± 2.9	46.5 ± 4.6*	39.8 ± 5.2	36.3 ± 4.1
	5 mg · kg ⁻¹	33.6 ± 3.5	42.5 ± 4.4	48.3 ± 6.1*	62.4 ± 7.3**	60.4 ± 5.8**
	10 mg · kg ⁻¹	35.7 ± 4.4	43.1 ± 5.4	50.1 ± 7.8**	85.1 ± 10.9**	57.5 ± 9.4**
尿激酶	20 000 U · kg ⁻¹	32.8 ± 3.4	35.5 ± 6.2	41.8 ± 3.1	38.6 ± 4.3	34.7 ± 2.8

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group

2.3 对家兔全血凝血时间的影响^[5]: 家兔分组及给药方法同 2.1 项(每组 4 只), 各组于给药前自家兔颈动脉取血 1 mL, 轻轻沿试管壁(内径 8 mm, 长 10 cm) 放入试管内, 给药后 10, 30, 60 及 90 min 再分别取血。当血液吸进注射器即开始计时, 每隔 30 s 轻轻倾斜试管 1 次, 角度 30°; 观察血液是否流

动, 直至试管倾斜到 90°; 血液不再流动而完全凝固为止, 该段时间即为凝血时间。结果表明, 2.5 ~ 10 mg/kg PUW iv 后均有延长凝血时间趋势, 但无统计学意义($P > 0.05$, 与给药前比较), 尿激酶明显延长家兔全血凝血时间, 见表 5。

2.4 对大鼠尾尖出血时间的影响: 雄性 SD 大鼠随

表 5 PUW 对家兔全血凝血时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of PUW on blood coagulation time in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂 量	全血凝血时间/s				
		给药前	10 min	30 min	60 min	90 min
生理盐水	—	138.5 ± 16.3	142.6 ± 22.4	137.6 ± 16.4	142.5 ± 21.3	129.6 ± 17.2
PUW	2.5 mg · kg ⁻¹	149.5 ± 13.5	142.9 ± 5.7	154.6 ± 16.4	149.6 ± 11.7	152.3 ± 10.7
	5 mg · kg ⁻¹	136.9 ± 9.6	153.2 ± 12.4	161.2 ± 13.8	162.2 ± 21.3	153.2 ± 16.4
	10 mg · kg ⁻¹	142.2 ± 18.9	163.7 ± 19.9	162.5 ± 23.2	168.5 ± 17.1	150.2 ± 11.9
尿激酶	20 000 U · kg ⁻¹	136.5 ± 12.4	179.8 ± 21.6*	193.7 ± 4.3**	176.2 ± 24.3*	166.2 ± 15.4

与给药前比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs same group before iv

机分为 6 组, 每组 8 只, 即生理盐水组, 2.5, 5, 10 mg/kg PUW 组, 5 mg/kg 阿司匹林组和 20 000 U/kg 尿激酶组。各组均以 0.5 mL/100 g iv 给药, 15 min 后, 距大鼠尾尖 0.5 cm 处横切。每 30 s 用滤纸轻擦出血处 1 次, 并记录出血时间^[6](即从横断尾尖开始至滤纸上未见血迹的时间段)。结果表明, 5, 10 mg/kg PUW、阿司匹林及尿激酶均明显延长出血时间; 与尿激酶或阿司匹林组比较, PUW 组的出

血时间均显著缩短($P < 0.05$), 见表 6。

3 讨论

本研究组前期报道 PUW 具有明显的抗血栓作用^[1], 本实验进一步观察 PUW 对凝血系统的影响, 以评价其可能的应用潜势。本实验结果表明, PUW 明显缩短 ELT、延迟抗凝血浆的凝固, 提示 PUW 促进纤维蛋白溶解酶原转化为纤溶酶, 从而加快纤维蛋白(原)的降解溶解, 并因此产生纤溶作用。

表 6 PUW 对大鼠尾尖出血时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 6 Effects of PUW on BT in rat tail tip ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂 量	出血时间/min
生理盐水	—	16.4±3.1
PUW	2.5 mg/kg	17.2±3.3
	5 mg/kg	19.2±4.8* [#]
	10 mg/kg	19.8±3.6* [#]
尿激酶	20 000 U/kg	30.2±4.2**
阿司匹林	5 mg/kg	26.1±3.8**

与生理盐水组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
与尿激酶或阿司匹林组比较: [#] $P<0.05$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs NS group
[#] $P<0.05$ vs urokinase or aspirin group

PT 主要用于检测机体的外源性凝血系统, 它的延长或缩短分别反映凝血因子 、 、 、 (凝血酶原) 和 (纤维蛋白原) 的血浆水平减低或增高^[7]; 另一方面, KPTT 则检测机体的内源性凝血系统状态, 它的延长或缩短分别反映凝血因子 、 、 前激肽释放酶(PK)、 、 和 的血浆水平减低或增高。PUW 对 PT 无明显影响, 但明显延长 KPTT, 提示 PUW 增强了机体的纤溶活性。

上述实验结果提示缩短 ELT 和延长 KPTT 可能是 PUW 具有较强溶栓作用的机制之一。KPTT 延长又提示机体具有出血倾向。临床上, 应用溶栓药或抗凝药物时, 一般使 KPTT 较正常对照延长 1.5~2.5 倍, 这既可取得最佳疗效, 又无严重出血

问题。PUW iv 后 30~90 min 内均明显延长 KPTT, 但仍只为给药前的 2 倍左右, PUW 对家兔全凝血时间无明显影响, 在体内外对血小板聚集功能无明显抑制作用^[2], 虽延长大鼠尾尖出血时间, 但与阿司匹林或尿激酶比较, 出血时间显著缩短。因此, 纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) PUW 有引起出血的倾向, 但不会像抗凝药或阿司匹林、尿激酶等抗栓药造成严重的出血反应, 这对其今后的临床应用是十分有利的。

References:

[1] Shen Z Q, Dong Z J, Wu L O, *et al.* Effects of PUW on thrombosis and its mechanisms [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(1): 46-50.

[2] Kowalski E. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis [J]. *J Clin Path*, 1959, 12(3): 215-219.

[3] Huang Z L, Wang K. Anti-coagulation of safflower yellow pigment [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1987, 18(1): 24-26.

[4] Gu Y F. Mechanism investigation of charred human hair raw crystalline [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 1987, 3(1): 19-22.

[5] 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, 1995.

[6] Tomihisa K, Masso K, Seiji K, *et al.* Thrombolysis with intracoronary administration of YM866, a novel modified tissue-type plasminogen activator, in a canine model of coronary artery thrombosis [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1993, 63(7): 319-325.

[7] Wang H L. Reference advice of laboratory monitoring in anti-thrombosis and thrombolysis [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1995, 16(6): 498-499.

抗 EB 病毒口服液对 EB 病毒抗原表达的抑制作用及其细胞毒作用

刘宗潮¹, 简少文¹, 李华忠², 欧景才^{2*}, 谢冰芬¹, 李 端¹, 冯公侃¹
(1. 中山大学 肿瘤防治中心, 广东 广州 510060; 2. 广东省 177 医院, 广东 广州 510317)

摘 要: 目的 观察抗 EB (Epstein-Barr) 病毒口服液对 EB 病毒抗原表达的影响及对鼻咽癌 CNE₂ 细胞的细胞毒作用。方法 用间接荧光法测定抗 EB 病毒口服液对 Raji 细胞早期抗原 (early antigen, EA) 表达及 B₉₅₋₈ 细胞病毒壳抗原 (virus capsid antigen, VCA) 表达的影响; 用 MTT 法测定其对鼻咽癌 CNE₂ 细胞的细胞毒作用。结果 抗 EB 病毒口服液在无毒的浓度下, 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 抗原表达有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 值为 0.667 mg/mL; 对 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 抗原表达有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 值为 0.89 mg/mL; 对正丁酸钠激发的 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 抗原表达亦有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 为 1.4 mg/mL。抗 EB 病毒口服液对人鼻咽癌细胞 CNE₂ 的 IC₅₀ 为 7.57 mg/mL。结论 抗 EB 病毒口服液能抑制 EB 病毒抗原的表达, 在较高的浓度下对鼻咽癌细胞 CNE₂ 具细胞毒作用。

关键词: 抗 EB 病毒口服液; EB 病毒; 抗原表达; 鼻咽癌

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)05-0542-04

* 收稿日期: 2003-09-08
基金项目: 国家“十五”科技攻关计划重大项目基金资助 (2001BA701A 07-10); 中山大学重点学科课题基金联合资助 (98096)
作者简介: 刘宗潮 (1937—), 男, 研究员, 主要从事抗肿瘤药物及其药理作用研究。
Tel: (020) 87343149 Fax: (020) 87343392 E-mail: zongchaoliu@yahoo.com
* 通讯作者 Tel: (020) 84219338-20001