

也轻于模型 + NS 组,提示 VnA 减轻脑缺血性损伤与其阻断血管内皮细胞与白细胞的黏附,抑制中性白细胞的浸润,减轻缺血脑组织的炎症反应有关。

NO 作为多功能生物效应分子,不仅参与细胞的各种生理活动,而且在许多病理过程中也发挥了重要作用。合成 NO 的一氧化氮合酶 (NOS) 存在于脑组织细胞中。缺血早期主要表达结构型一氧化氮合酶 cNOS [cNOS 包括神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)]。已有研究表明 NO 在局灶性脑缺血病理过程中具有双重作用<sup>[9]</sup>,来自 eNOS 的 NO 通过保持局部脑血流起到有益作用,而 nNOS 激活后产生过量 NO 有神经毒性。正常情况下,含 nNOS 的阳性细胞散在于脑实质及脑血管表面,该种神经元约占全脑神经细胞的 2% 左右<sup>[10]</sup>。本研究显示,脑缺血-再灌注 24 h 时,nNOS 大量表达于缺血区神经元而未缺血区却较少表达亦证实了其毒性作用。许多研究已证实选择性 nNOS 抑制剂可减轻缺血性脑损伤。本实验目的之一是观察 VnA 脑保护作用是否有抑制 nNOS 机制参与,结果显示给药组与模型 + NS 组相比未见有显著性差异。

脑缺血的病理过程中有诸多因素参与,VnA 的脑保护作用具体作用于哪些环节有待进一步研究。

## References:

- [1] Li H, Gao G Y, Li S Y, *et al.* Effects of *Veratrum nigrum* alkaloids on central catecholaminergic neurons of renal hypertensive rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2000, 21 (1): 23-28.
- [2] Chung M I, Teng C M, Cheng K L, *et al.* An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum* [J]. *Planta Med*, 1992, 58(3): 274-276.
- [3] Han G Z. The study of effects of *Veratrum nigrum* alkaloids on antithrombus [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 18(2): 33-34.
- [4] Li W P, Gao D Y, Zhou Q, *et al.* Neuroprotective effects of VnA on rats with focal cerebral ischemia injury [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(8): 624.
- [5] Laing R J, Jakubowski J, Laing R W. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? [J]. *Stroke*, 1993, 24(2): 294-297.
- [6] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination [J]. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- [7] Bowes M P, Zivin J A, Rothleic R. Monoclonal antibody to the ICAM1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model [J]. *Exp Neurol*, 1993, 119 (1): 215-219.
- [8] Zhang R L, Chopp M, Jiang N, *et al.* Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(5): 1438-1444.
- [9] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(3): 132-139.
- [10] Bredt D S, Huang P H, Snyder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide [J]. *Nature*, 1990, 347: 768-770.

## 川芎嗪及其衍生物抗凝血活性的研究

夏承建,王松\*,朱鹤孙

(北京理工大学材料研究中心,北京 100081)

川芎嗪即四甲基吡嗪 (tetramethyl pyrazine, TMPZ),是从伞形科藻本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎中提取分离的生物碱单体,是川芎的主要有效成分,现已可人工合成<sup>[1]</sup>。临床上 TMPZ 主要用于治疗闭塞性脑血管疾病,如脑血栓、脑动脉栓塞等。实验研究表明其具有降压、抗肿瘤、扩张血管、抑制血小板聚集作用,并对已聚集的血小板有解聚作用<sup>[2,3]</sup>。本实验通过测定活化部分凝血激酶时间 (APTT)、凝血酶 (凝固) 时间 (TT) 以及凝血酶原时间 (PT) 3 种指标作为评价标准,初步研究 TMPZ、川芎嗪-1-氮氧化物 (TMPZO)、2-羟甲基-3,5,6-三甲基吡嗪 (TMPZ-OH)、3,

5,6-三甲基吡嗪-2-甲酸 (TMPZ-COOH)、川芎嗪-1,4-双氮氧化物 (TMPZO<sub>2</sub>) 5 种化合物的抗凝血活性。

### 1 材料

1.1 试剂:川芎嗪 (TMPZ),购自百灵威公司;磷酸川芎嗪,购自北京市燕京制药厂,白色结晶性粉末,批号 020401。30% 双氧水,购自天津市东方化工厂。采自健康人体的冰冻血浆,购自北京北太平庄血站。凝血酶、部分凝血活酶、凝血活酶、氯化钙溶液,均购自上海医科大学华山医院技协生物试剂公司。其余试剂均购自北京化学试剂公司,且均为分析纯。

\* 收稿日期:2003-12-18

基金项目:国家重点基础研究“973”项目 (G1999064705)

作者简介:夏承建(1978—),男,山东威海人,北京理工大学材料研究中心 2001 级硕士研究生,主要从事抗凝血材料的研究。

Tel: (010) 68949661(O) (010) 68943346 (H) E-mail: xchengjian @163.com

\*通讯作者 Tel: (010) 68949661 E-mail: wangsong @bit.edu.cn

1.2 仪器:半自动四通道凝血仪(美国 Coag-A-Mate XM),旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司),X-4 数字显示显微测定熔点仪(北京泰克仪器有限公司),PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),PE683 型红外分光光度计。

1.3 TMPZ 衍生物的合成:参照文献方法<sup>[4]</sup>分别制备 TMPZO,熔点为 102~105,其红外谱图的特征吸收为 1 300~1 305  $\text{cm}^{-1}$ ,与文献相符<sup>[5]</sup>;TMPZ-OH 熔点为 72~77,其红外谱图的特征吸收为 1 452,3 258  $\text{cm}^{-1}$ ;TMPZ-COOH,熔点为 112~117,其红外谱图的特征吸收为 1 720,3 436  $\text{cm}^{-1}$ ,与文献相符<sup>[4]</sup>;TMPZO<sub>2</sub>,熔点为 246,其红外谱图的特征吸收为 1 525  $\text{cm}^{-1}$ ,与文献相符<sup>[5]</sup>。

## 2 方法

2.1 不同 pH 值溶液的配制:量取一定量的盐酸溶液按 10 倍的比例稀释,并用 pH 计测试并调节溶液的 pH 值从 1.0~10.0。

2.2 TMPZ 及其衍生物溶液的配制:将 TMPZ、TMPZO、TMPZ-OH、TMPZ-COOH、TMPZO<sub>2</sub> 分别制成  $2.2 \times 10^{-5}$  mol/mL (此浓度为 TMPZ 溶液的饱和浓度)的溶液。

2.3 不同酸根与 TMPZ 所成盐溶液的配制:将 TMPZ 分别与盐酸、磷酸、硫酸、甲酸以 1:1 的摩尔比配成有效浓度为  $2.2 \times 10^{-5}$  mol/mL 的溶液。

2.4 样品溶液的抗凝血活性测定<sup>[6]</sup>:

2.4.1 APTT 的测定:0.1 mL 血浆加入 0.1 mL 测试样品溶液,预热(37) 3 min 后,加入 0.1 mL 部分凝血活酶活化 3 min,放至测试台加入 0.1 mL 氯化钙溶液(30 mmol/L),即可测出 APTT。

2.4.2 TT 的测定:0.12 mL 血浆加入 0.12 mL 测试样品溶液,预热(37) 3 min 后,放至测试台加入 0.12 mL 凝血酶,即可测出 TT。

2.4.3 PT 的测定:0.1 mL 血浆加入 0.1 mL 测试样品溶液,预热(37) 3 min 后,放至测试台加入 0.2 mL 凝血酶原的氯化钠水溶液,即可测出 PT。

## 3 结果

3.1 溶液的 pH 值对血浆凝血时间的影响:用盐酸配制不同 pH 值溶液,按 2.4 项方法在半自动四通道凝血仪上测定 APTT、TT 和 PT,结果见表 1。以 pH 值为 7 的空白血浆为参比,随着溶液酸性的逐渐增强,APTT 缓慢缩短,当 pH 值从 3.0 变为 1.0 时,APTT 又缓慢延长,当 pH 值为 1.0 时,测定值已经超过了设定值,所以当溶液的 pH 值在 2.0~

7.0 内变化时,对 APTT 没有影响。当溶液的碱性

表 1 pH 值对凝血活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 1 Effect of pH value on coagulability ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

| pH 值    | APTT/s     | TT/s       | PT/s       |
|---------|------------|------------|------------|
| 1.0     | >150       | >200       | >50        |
| 2.0     | 39.8 ± 0.2 | 15.0 ± 0.1 | 13.4 ± 0.2 |
| 3.0     | 36.0 ± 0.5 | 15.4 ± 0.1 | 11.9 ± 0.1 |
| 4.0     | 32.1 ± 0.4 | 15.3 ± 0.3 | 11.5 ± 0.3 |
| 5.0     | 33.9 ± 0.2 | 15.4 ± 0.2 | 11.6 ± 0.2 |
| 6.0     | 34.4 ± 0.2 | 16.8 ± 0.5 | 12.8 ± 0.3 |
| 7.0(空白) | 34.4 ± 0.4 | 17.1 ± 0.4 | 13.1 ± 0.0 |
| 8.0     | 33.5 ± 0.6 | 15.8 ± 0.2 | 12.4 ± 0.4 |
| 9.0     | 33.7 ± 0.2 | 18.2 ± 0.1 | 12.4 ± 0.2 |
| 10.0    | >150       | >200       | >50        |

逐渐增强时,APTT 先是缓慢缩短,而后又陡然延长,当 pH 值达到 10.0 时,APTT 已超过设定值,由此可见,当溶液的 pH 值在 2.0~9.0 内变化时,对 APTT 没有影响。同理可得,当溶液的 pH 值在 2.0~9.0 内变化时,对 PT 和 TT 亦没有影响。

3.2 TMPZ 及其衍生物对血浆凝血时间的影响:TMPZ 及其衍生物对 APTT、TT 及 PT 的影响结果见表 2。

表 2 TMPZ 及其衍生物对 APTT、TT 及 PT 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 2 Effect of TMPZ and its derivants on APTT, TT, and PT ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

| 样品                         | APTT/s         | TT/s          | PT/s          |
|----------------------------|----------------|---------------|---------------|
| TMPZ (pH5.0)               | 35.6 ± 0.6     | 17.0 ± 0.6    | 12.2 ± 0.1    |
| TMPZO (pH5.0)              | 36.7 ± 0.6 *   | 19.1 ± 0.2 ** | 12.4 ± 0.2    |
| TMPZO <sub>2</sub> (pH5.0) | 37.3 ± 0.4 **  | 19.8 ± 0.3 ** | 11.3 ± 0.2 *  |
| TMPZ-OH (pH5.0)            | 45.1 ± 0.8 **  | 20.7 ± 0.6 ** | 11.6 ± 0.6    |
| TMPZ-COOH (pH3.0)          | 111.2 ± 1.2 ** | 48.5 ± 1.0 ** | 34.0 ± 1.5 ** |
| 空白血浆                       | 34.6 ± 0.2     | 15.9 ± 0.5    | 12.2 ± 0.1    |

与空白血浆比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs blank plasma

由表 2 数据可知,与空白血浆相比,TMPZ 溶液对 TT、APTT 及 PT 并没有显著的影响,说明 TMPZ 溶液并不具有明显的抗凝血活性。

TMPZ 的单氮氧化物及双氮氧化物对 APTT、TT 的影响强于 TMPZ 溶液,总体来说对血浆凝血时间有一定的影响。虽然 TMPZ 的单氮氧化物及双氮氧化物的化学结构有些差别,但对血浆凝血时间的影响并无明显的差别,这说明 TMPZ 上氮氧化物的含量多少对血浆凝血时间并没有显著的影响,这与 TMPZ 对血小板的影响不同<sup>[7]</sup>。不过由于结构上的差别,使得 TMPZ 的氮氧化物凝血时间稍长于 TMPZ,由此可以推断出 TMPZ 所衍生出来化合物的官能团的不同可以影响血浆的凝血时间。

TMPZ-OH 对 APTT、TT 的影响比较明显,分

别比空白血浆延长 11 和 5 s;TMPZ-COOH 不仅对 APTT、TT 的影响非常显著,而且对 PT 的影响也十分明显,凝血时间都大大超过了空白血浆的凝血时间,分别比空白血浆的凝血时间延长 77、33 和 22 s,可见 TMPZ-COOH 的抗凝血效果非常好。

3.3 不同酸根与 TMPZ 所成盐对血浆凝血时间的影响:由于 TPMZ 的水溶性比较差(溶解度约为 3.9 mg/mL),故临床所用的 TMPZ 类抗栓药多为 TMPZ 的盐酸盐和磷酸盐,测定它们对血浆凝血时间的影响,结果见表 3。

表 3 不同酸根与 TMPZ 所成盐的抗凝血活性 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Anticoagulability of salification of various acid radicals and TMPZ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 样品   | APTT/s       | TT/s          | PT/s          |
|--|--------------|---------------|---------------|
| HCl·TMPZ (pH3.0)                             | 51.6 ± 0.4 * | 21.3 ± 0.2 *  | 14.9 ± 0.1 ** |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·TMPZ (pH2.0) | >150 **      | >200 **       | >50 **        |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·TMPZ (pH3.0) | >150 **      | 78.3 ± 0.9 ** | 43.4 ± 0.2 ** |
| HCOOH·TMPZ (pH3.0)                           | 58.9 ± 0.4 * | 20.9 ± 0.3 *  | 17.7 ± 0.1 ** |
| 空白血浆   | 36.1 ± 0.1   | 14.1 ± 0.1    | 11.6 ± 0.1    |

与空白血浆比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs blank plasma

无论从 TT 值、APTT 值还是 PT 值比较,在 TMPZ 摩尔浓度相同的情况下, TMPZ 的盐酸盐溶液的抗凝血活性好于 TMPZ 溶液, TMPZ 的含氧酸盐溶液的抗凝血活性明显好于盐酸盐。

#### 4 讨论

PT 是研究外源性凝血过程的指标,表示血浆中加入钙离子和组织因子后的血浆凝固时间。APTT 是研究内源性凝血过程的指标,表示血浆中加入适量的部分凝血活酶,使凝血因子得到充分的表面接触而完全活化,在钙离子作用下血浆凝固所需要的时间。而 TT 则表示在一定量血浆中直接加入凝血酶后血浆的凝固时间。

本研究表明 TMPZ-OH 具有明显的抗凝血活

性,其抗凝血作用主要是影响内源性凝血系统,而 TMPZ-COOH 则具有显著的抗凝血活性,其抗凝血作用不仅对内源性凝血系统有影响,而且对外源性凝血系统也有比较明显的影响。TMPZ-OH 与 TMPZ-COOH 仅仅相差一个官能团,一个是羟基,一个是羧基,而他们的抗凝血活性相差非常大,这说明 TMPZ 的衍生物侧基官能团的不同可以影响其抗凝血活性,而且官能团是羧基的衍生物的抗凝血活性强于羟基的抗凝血活性,其构效关系尚待研究。

本实验结果还表明 TMPZ-COOH 抗凝血活性强于 TMPZ 的甲酸盐,它们的抗凝血活性产生差异的原因可能为 TMPZ-COOH 羧基与吡嗪环上的氮发生了某种协同作用,而 TMPZ 的甲酸盐所含有的羧基与 TMPZ 的结合方式不同,由此产生了抗凝血活性的差异。具体的构效关系仍待进一步研究。

#### References:

- [1] Liang C C, Hong C Y, Chen C F, et al. Measurement and pharmacokinetic study of tetramethylpyrazine in rat blood and its brain tissue by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr (B)*, 1999, 724: 303.
- [2] Wang Z L, Guan C R, Chen M Q. The action of tetramethylpyrazine on cardiovascular system [J]. *Prog Physiol Sci (生理科学进展)*, 1992, 23(4): 313.
- [3] Yan F M, Luo R J. The effect of tetramethylpyrazine on vascular and blood constituent [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中医药学刊)*, 2002, 20(3): 368-369.
- [4] Chen X. The studies of tetramethylpyrazine on metabolic system [A]. *Dissertation of Master Degree of Beijing Medical University* [D]. Beijing: Beijing Medicine University, 1995.
- [5] Klein B, Berkowitz J, Pyrazines I. Pyrazine-*N*-oxides, preparation and spectral characteristics [J]. *Am Chem Soc*, 1959, 81: 5164-5165.
- [6] Dong L L, Liu W L. Laboratorial detection of anticoagulate and thrombolytic therapy [J]. *J Clin Med (临床内科杂志)*, 2000, 17(6): 382.
- [7] Sheu J R, Kan Y C, Hung W C, et al. The antiplatelet activity of tetramethylpyrazine is mediated through activation of NO synthase [J]. *Life Science*, 2000, 67: 937-947.

## 欢迎订阅 2005 年《中国医药工业杂志》

《中国医药工业杂志》是由上海医药工业研究院、国家发展和改革委员会医药工业信息中心站和中国化学制药工业协会主办的全国性医药科技刊物。本刊创刊于 1970 年,是“中国期刊方阵”入选期刊,继 1996、2000 年后,今年再次被确认入编 2004 年版《中文核心期刊要目总览》,是化工、药学类中文核心期刊、中国生物医学核心期刊、中国科技核心期刊和中国科学引文数据库来源期刊,曾获全国优秀科技期刊奖,上海市优秀科技期刊奖。多年来一直入选“CA 千种表”,并位于全国医药期刊的前列,还被中国生物学文摘、中国药文学文摘、中国化学文摘、*Analytical Abstracts* (分析文摘)、*Biological Abstracts* (生物文摘)等中外数据库和文摘所收摘。

主要栏目:合成药物与中间体、微生物药物与生化药物、中药与天然药物、药物制剂、药理与临床、药品质量与分析、制药装备与包装、药品管理与规范、实验技术、综述与专论、药物合成路线图解、有机合成文摘、生物技术文摘和信息广场。

本刊为月刊,每期 64 页,定价 8 元,全年 96 元。邮发代号:4-205。欢迎医药、生物、化工等行业的生产、科研、教学、经营管理以及卫生系统的临床药学人员到邮局订阅。漏订的读者请直接汇款至我刊编辑部,免收邮寄费。欢迎前来洽谈刊登广告。

地址:上海市北京西路 1320 号 《中国医药工业杂志》编辑部 邮编:200040 联系人:施厚权 电话:021-62897080  
传真:021-62890581 E-mail: fxb @pharmadl.com