

- 学报), 1989, 20(10): 453-455.
- [3] Cui J Y, Lin Z B. Effects of *Tremella fuciformis* polysaccharides on intracellular free calcium in murine spleen lymphocytes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, 32(8): 561-564.
- [4] Le Z P. Molecular base of cellular signal metabolism [J]. *Nat J* (自然杂志), 1999, 21(5): 258-263.
- [5] Sun D Y, Guo Y L, Ma L G. *Cell Signal Transduction* (细胞信号转导) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [6] Li M C, Lei L S, Liang D S, et al. Effect of *Ganoderma* polysaccharide on intracellular IP₃ and DAG in murine peritoneal macrophages [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1999, 15(5): 20-22.
- [7] Li M C, Lei L S, Liang D S, et al. Effect of *Ganoderma* polysaccharide on PKC activity in murine peritoneal macrophages [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(1): 36-38.
- [8] Zhang X, Xiang S L, Cui X Y, et al. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on the lymphocyte signal transduction system in mice [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1997, 13(5): 289-291.
- [9] Gao Q P, Seljelid R, Chen H, et al. Characterisation of cytokines and stimulating active acidic heteroglycan from *Tremella fuciformis* Berk [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 288: 135-137.
- [10] Ukai S, Hivose K, Kiho T, et al. Antitumor activity on sarcoma 180 of polysaccharide from *Tremella fuciformis* Berk [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20: 2293-2295.
- [11] Cui J Y, Lin Z B. Effects of *Tremella fuciformis* polysaccharides on the activity of IL-2, IL-6, TNF- α , and expression of their mRNA in mice [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1996, 28(4): 244-248.

重组水蛭素抗大鼠大脑中动脉血栓形成作用

周 琴, 任开环, 韩国柱*, 李卫平

(大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027)

脑血栓的发病率很高, 引起的后果相当严重, 抗脑血栓药物是当前研究的热点。近年, 国内外对重组水蛭素 (recombinant hirudin, rH)——一种由 65 个氨基酸组成的高效、特异的凝血酶抑制剂的研发取得了令人瞩目的进展^[1]。本课题组曾对国产 rH 的药效学和药动学进行了较深入的研究^[2,3], 证明其具有强大的抗凝、抗弥漫性血管内凝血 (DIC) 以及抗动静脉血栓形成作用。但有关其对脑动脉血栓形成的影响, 迄今未见报道。本研究利用化学法建立血栓模型以评价 rH 的抗大鼠大脑中动脉血栓形成作用。

1 材料与方法

1.1 动物: SD 大鼠, 280~300 g, 雄性, 大连医科大学动物中心提供。

1.2 受试药品与试剂: rH, 大连高生物制药有限公司提供, 批号 010805, 纯度>99%, 抗凝效价 16 000 ATU/mg, 相对分子质量 7 000, 经鉴定为 N-Hle¹-Thr²-63-desulfato-hirudin; 肝素, 北京奥博星技术责任有限公司产品, 批号 20010513; 三氯化铁 (FeCl₃), 北京市朝阳区通惠化工厂, 分析纯, 批号 950220; 红四氮唑 (TTC), 北京化工厂, 批号 20020809。

1.3 动物分组: SD 大鼠 78 只, 随机分成两大组。第一大组再分为 6 组, 每组 10 只。大脑中动脉

(MCA) 血栓形成模型组 (iv 生理盐水, 以 FeCl₃造模)、假手术组 (除不用 FeCl₃外, 其余步骤同其他组)、高、中、低剂量给药组 (分别 iv rH 1.0、0.5、0.25 mg/kg, FeCl₃造模) 和阳性药对照组 (iv 肝素 500 U/kg, FeCl₃造模)。第二大组亦再分为 6 组, 每组 3 只, 组别同第一大组, 于术后立即取脑, 作病理检查。

1.4 MCA 血栓形成模型制备: 仿文献方法^[4]。各组均于给药或生理盐水后 10 min 造模。大鼠用 12% 水合氯醛 (250 mg/kg, ip) 麻醉, 按 Tamura 等方法^[5]暴露右侧位于嗅束及大脑下静脉之间的一段 MCA, 置一小片塑料薄膜保护血管周围脑组织, 将吸有 50% FeCl₃溶液 5 μ L 的小片定量滤纸片贴在该段 MCA 上, 持续 30 min 后去掉滤纸片, 生理盐水冲洗局部组织, 逐层缝合, 回笼饲养。

1.5 行为学评分: 于术后 24 h 按文献方法对动物行为学进行评分^[4]。满分为 11 分, 分数越高, 动物的行为学障碍越严重。动物行为学评分采用盲法评分。

1.6 梗死范围测定: 术后 24 h, 将大鼠断头取脑, 去掉嗅球、小脑和低位脑干, 生理盐水冲洗后做冠状切片 5 片, 置 0.2% TTC 溶液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。正常脑组织被染成红色, 梗死组织成苍白色。将脑平片照相后, 采用 Image-Pro plus 软件分析系

* 收稿日期: 2004-04-12

作者简介: 周 琴 (1957—), 女, 辽宁大连人, 实验师, 主要从事心脑血管药理学研究。

* 通讯作者 Tel: (0411) 84720229 E-mail: hgzhx2236@sina.com

统,测定 5 个脑平面总梗死区占总脑平片的面积百分比。

1.7 病理学观察:术后立即取脑,置 10% 福尔马林中固定,脱水石蜡包埋,常规切片,HE 染色后在光镜下观察血栓形成情况。

1.8 统计方法:采用 SPSS 软件包进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠造模后 24 h 行为学改变:模型组术后表现不同程度的手术对侧前肢内收、肩内旋、肌张力降低,推右肩向对侧移动,抵抗阻力降低,甚至出现不停向一侧转圈现象;而给药组可见不同程度的症状减轻。由表 1 可见,rH 1.0、0.5 mg/kg 剂量组行为学评分远低于模型组且差异显著 ($P < 0.01$),rH 0.25 mg/kg 剂量组与模型组相比差异无显著性 ($P > 0.05$),rH 对行为学的改善呈剂量依赖性。肝素 500 U/kg 组的行为学评分亦低于模型组且差异显著 ($P < 0.01$)。假手术组未见行为学改变。

2.2 梗死范围:脑平片照相后可见模型组梗死面积主要累及大脑皮质外侧部、皮质下的尾状核、丘脑前部和外侧部及下丘脑的外侧部。给药组梗死面积随剂量增大而逐渐减小。由表 1 可见,血栓形成术后 24 h 脑梗死明显,模型组梗死面积与假手术组比较差异显著 ($P < 0.01$);rH 1.0、0.5、0.25 mg/kg 剂量组脑梗死面积与模型组相比差异均显著 ($P < 0.01$),且呈剂量依赖性。肝素亦有强大的抗血栓作

用。假手术组未见脑梗死发生。

表 1 大鼠 MCA 血栓形成后 24 h 行为学评分及脑梗死面积 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Score of behavioral science and area of cerebral infarct at 24 h after MCA thrombosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	行为学评分	梗死面积/%	抑制百分率/%
假手术	-	0	0	100
模型	-	6.5±1.58	11.08±3.89	0
rH	1.0 mg·kg ⁻¹	1.8±0.92* *	2.30±0.92* *	79.24
	0.5 mg·kg ⁻¹	3.0±1.05* *	4.23±2.33* *	61.82
	0.25 mg·kg ⁻¹	5.5±1.18	5.95±2.01* *	46.29
肝素	500 U·kg ⁻¹	1.5±2.27* *	1.22±2.37* *	88.99

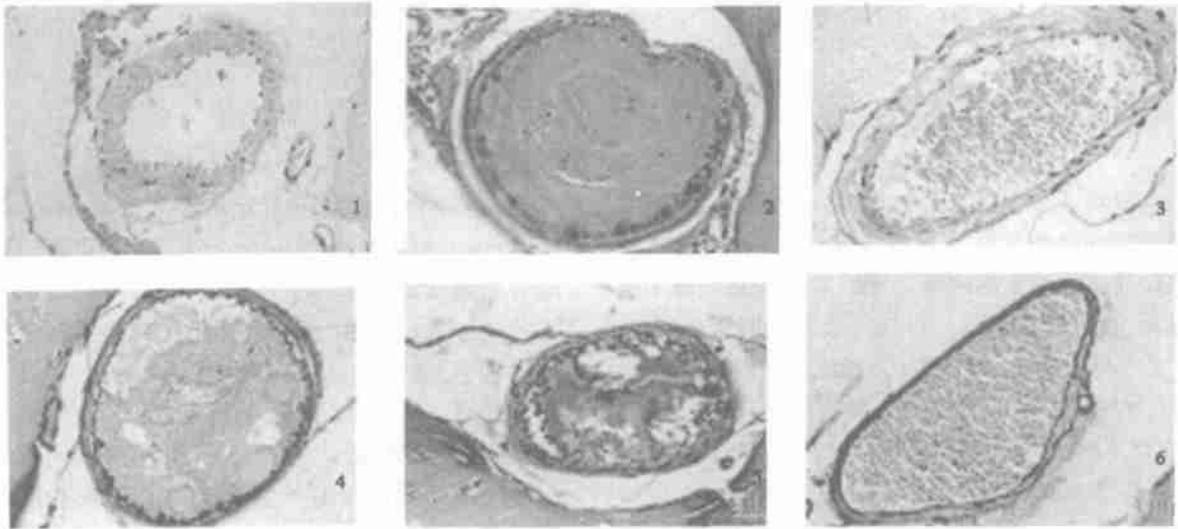
与假手术组比较: $P < 0.01$; 与模型组比较: * * $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs Sham group; * * $P < 0.01$ vs model group

2.3 病理检查:模型组 MCA 切片在光镜下可见血管内血栓形成,血栓成分主要为血小板、红细胞及纤维蛋白,表现为混合血栓的特征;rH 0.25 mg/kg 剂量组可见血栓形成出现裂隙,混合血栓中散在红细胞;rH 0.5 mg/kg 剂量组可见血栓形成明显减轻、疏松;rH 1.0 mg/kg 剂量组及肝素组未见血栓形成。结果见图 1。

3 讨论

rH 是活血化瘀中药水蛭的主要活性成分,具强大的抗凝、抗栓活性,是迄今为止世界上最为强大的凝血酶抑制剂^[1],但来源匮乏,本研究所用药品为基因重组 rH。rH 作用机制为高效、特异地与凝血酶结合从而使之失去裂解纤维蛋白原为纤维蛋白的能



1-假手术组 2-模型组 3-rH (1.0 mg/kg) 组 4-rH (0.5 mg/kg) 组 5-rH (0.25 mg/kg) 组 6-Heparin (500 U/mg) 组
1-Sham group 2-model group 3-rH (1.0 mg/kg) group 4-rH (0.5 mg/kg) group
5-rH (0.25 mg/kg) group 6-Heparin (500 U/mg) group

图 1 rH 对抗大鼠 MCA 血栓形成作用病理检查 (×400)

Fig. 1 Pathological examination of rH effect against MCA thrombosis in rats (×400)

力,进而阻止纤维蛋白的凝固,抑制血栓的形成;由于凝血酶还是调节多种细胞功能的活化剂,其可与血小板结合从而刺激血小板释放活性物质,导致血栓形成,故 rH 也可通过此途径抗血栓形成。

本研究采用 FeCl_3 作为化学物质损伤血管壁进而形成血栓。 FeCl_3 不仅价廉易得,且对血管的损伤作用可靠,已为不少学者采用^[6]。血管内膜被 FeCl_3 损伤后,暴露出内皮下胶原纤维,诱发血小板的黏附、聚集,继而形成血栓。文献报道 FeCl_3 引起的动脉血栓形成主要成分是血小板、红细胞及纤维蛋白等^[7]。本研究证实 rH 具有强大的抗 FeCl_3 诱发大鼠 MCA 血栓形成的作用。

另外,脑梗死急性期局部血小板聚集的同时血液凝固系统被活化,大量凝血酶产生并在脑血管内形成纤维蛋白血栓,同时,血小板黏附、聚集引起血管收缩从而导致脑微循环的障碍^[8]。Kawai 等给 MCA 闭塞大鼠模型应用新型选择性凝血酶抑制剂 (argatroban),发现用药 1 d 后,微血栓数目减少、脑血流改善、梗死灶缩小,3 d 后神经症状改善^[9]。本研究中 rH 亦可能通过此机制间接改善脑缺血程度。

致谢:南开大学汪和睦教授对本项研究给予热情支持与帮助。

References:

- [1] Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug [J]. *Thromb Res*, 1994, 74(1): 1-23.
- [2] Lu L, Li X Y, Han G Z, *et al.* Experimental study on *in vivo* anticoagulant activity of r-hirudin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 520-522.
- [3] Jiang S Y, Li G X, Han G Z. Pharmacokinetic study with r-hirudin in rats [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokin*, 2003, 3(2): 129-133.
- [4] Liu X G, Xu L N. A rat MCA thrombosis model for evaluation of thrombolytic and antithrombotic agents [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1995, 30(9): 662-667.
- [5] Tamura A, Graham P I, Mcvulloch J, *et al.* Fatal cerebral ischemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1: 53-56.
- [6] Margareta E, David G, Stefan E. Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rats [J]. *Thromb Res*, 1999, 94: 187-197.
- [7] Kurl K D, Jakubowski J A, Smith T. Antithrombotic mechanisms involved in prevention of ferric chloride-induced arterial thrombosis in rats [J]. *Proc Am Soc Exp Biol*, 1990, 4: A1228.
- [8] Yu Y F, Dong G S. White blood cell, platelet as well as thrombin and microcirculation dysfunction [J]. *Foreign Med Sci—Cerebrovasc Dis* (国外医学·脑血管疾病分册), 2001, 9(4): 222-224.
- [9] Kawai H, Yukis H, Sugimoto J, *et al.* Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 278(2): 780-785.

葛根素对糖尿病大鼠血清 sICAM-1、ox-LDL 和血浆 $\text{TNF-}\alpha$ 水平的影响

茅彩萍, 顾振纶*, 曹 莉, 许夕慧

(苏州大学医学院 药理教研室、苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

高血糖不仅是各型糖尿病的共同特征性病变,而且长期高血糖又往往导致高胰岛素血症,也是导致糖尿病血管病变的主要危险因素。研究发现细胞间黏附分子 (ICAM-1) 和氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 在糖尿病血管并发症如糖尿病动脉粥样硬化 (AS) 发生机制中起着至关重要的作用^[1,2]。肿瘤坏死因子 ($\text{TNF-}\alpha$) 能促进血管内皮细胞表达分泌

ICAM-1 等黏附分子,介导炎症细胞与内皮细胞的黏附^[3],而且这一作用在晚期糖基化终产物 (AGEs) 的协同作用下尤为突出^[4]。葛根素 (puerarin, Pue) 是从野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的根中提取的主要有效成分之一,现代药理学研究表明 Pue 具有活血化瘀、改善微循环、抑制醛糖还原酶活性等作用,临

* 收稿日期: 2004-04-02

基金项目: 江苏省中医药管理局科研基金资助项目 (H-028)

作者简介: 茅彩萍 (1968—), 女, 江苏张家港人, 副教授, 博士, 主要从事中药药理学研究。

Tel: (0512) 65125270 E-mail: Maocp1018@sina.com.cn

* 通讯作者 Tel: (0512) 65190599 E-mail: zhenlun@2003@163.com