

验利用 FeCl_3 造成大鼠中动脉血栓形成的模型, 观察了脑梗死的情况。结果表明, 注射用熊胆粉对缺血性脑损伤有明显的治疗作用, 改善了动物脑缺血的症状; 其对结扎双侧颈总动脉造成的不完全性脑缺血也有缓解作用, 抑制脑血管渗出增加, 对反复脑缺血再灌注损伤的动物能缓解脑水肿, 降低脑组织由于缺血而造成的 MDA 水平升高, 保护脑组织 SOD 活性, 避免由于自由基的增加而加重脑损伤。临床上脑缺血多由血栓的形成导致的, 本实验还观察了注射用熊胆粉对血栓形成的影响, 结果表明, 其可明显抑制动物体内外血栓的形成, 表现出明显的活血化瘀作用。同时也观察了注射用熊胆粉对血小板的影响, 发现其可降低血小板的黏附率及抑制 ADP 诱导的聚集率, 说明注射用熊胆粉可抑制血小板的聚集, 改善血液黏稠度, 也表明注射用熊胆粉抗血栓的机制可能与改善血小板的功能有关。

上述结果表明, 注射用熊胆粉可明显抑制动物体内外的血栓形成, 降低血液黏稠度, 改善血液流变

性, 抑制血小板的聚集, 降低血小板的黏附性, 改善血栓缺血组织的病变程度, 缓解脑水肿, 降低毛细血管的通透性, 由于其可增加脑血流量, 降低脑血管阻力, 因此可增加缺血区的供血, 在脑组织受损时, 降低 MDA 水平, 保护 SOD 的活性, 对脑缺血组织具有保护和治疗作用。

References:

- [1] Liu X G, Xu L N. A rat middle cerebral artery thrombosis model for evaluation of thrombolytic and antithrombotic [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1995, 30(9): 662.
- [2] Zhang G Q, Yu Z L. Change of Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase, SOD and MDA in rat brain after repeated brief ischemia-reperfusion [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27(8): 489.
- [3] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [4] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment in Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [5] Gu Y. Introduction of a simple method of seizing antithrombotic agents [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1991, 7(4): 371.

猪蹄甲与穿山甲抗小鼠骨髓微循环障碍作用的实验研究

张东伟¹, 付 敏², 彭贤文², 李 健², 宋 鹏², 崔 瑛³, 侯士良³

(1. 清华大学 化学系 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084; 2. 北京中医药大学 细胞与生化实验室, 北京 100029; 3. 河南中医学院, 河南 郑州 450008)

穿山甲为鲛鲤科动物穿山甲 *Mains pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲, 由于其具有较好的临床疗效而被广泛应用于内、外、妇、儿各科。但受生态环境影响和人为因素的破坏, 穿山甲野生资源日益匮乏, 药材供需矛盾比较突出, 限制其临床应用。猪蹄甲为猪科动物猪 *Sus scrofa domestica* Brisson 的蹄甲, 为畜牧业的副产品, 其资源丰富。现代研究表明猪蹄甲和穿山甲在临床应用、化学成分和药理作用等方面有一定相似之处^[1], 穿山甲有一定的抗小鼠微循环障碍的作用^[2]。在此基础上, 为研究猪蹄甲替代穿山甲的可能性, 本实验进一步研究了猪蹄甲和穿山甲抗小鼠骨髓微循环障碍的作用, 观察猪蹄甲和穿山甲在药理作用方面的相似性, 为猪蹄甲全面替代穿山甲提供一定的实验基础。

1 材料

- 1.1 动物: ICR 种雄性小鼠, 体重 (25 ± 2) g, 2~2.5 月龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。
- 1.2 穿山甲水煎液: 穿山甲为脊椎动物鲛鲤科穿山甲 *M. pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲, 按《中国药典》法砂烫醋淬炮制后, 粉碎成粗颗粒。取干燥穿山甲粉 200 g, 加水 600 mL 浸泡 1 h 后, 煮沸两次, 第 1 次 50 min, 第 2 次 30 min, 滤过。合并滤液, 并压榨药渣中滤汁, 一并浓缩至 200 mL (相当于含生药 1 g/mL, 总氨基酸质量分数 $\geq 50\%$), 置于 4 °C 冰箱, 冷藏备用。临用前稀释为 0.1 g/mL。
- 1.3 猪蹄甲水煎液: 猪蹄甲为猪科动物猪 *S. scrofa domestica* Brisson 的蹄甲, 洗净, 晒干后, 炮制方法同穿山甲, 取猪蹄甲粉 600 g, 煎煮方法同穿山甲, 滤液浓缩至 600 mL (相当于含生药 1 g/mL, 总氨基酸质量分数 $\geq 50\%$), 置于 4 °C 冰箱, 冷藏备用。

收稿日期: 2005-02-24

基金项目: 北京中医药大学大学生科学技术研究基金资助项目 (YD2002-001)

作者简介: 张东伟(1974—), 男, 河南洛阳人, 研究方向为中药作用的生化机制。E-mail: zhdw1006@163.com

临用时分别稀释为 1、2、4 g/mL。

1.4 主要试剂:乙醚、无水乙醇、甲醛、高铁氰化钾、氰化钾、磷酸二氢钾均购自北京化学试剂厂。⁶⁰Co-γ 射线源由军事医学科学院放射科学研究所提供。

1.5 仪器:7504 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),离心机(北京医用离心机厂),涡旋混合器(江苏泰县),电子天平(上海电子仪器厂)。

2 方法

2.1 显色剂的配制和保存:称取高铁氰化钾 200 mg、氰化钾 50 mg 和磷酸二氢钾 140 mg,溶于 1 000 mL 蒸馏水中,分装于 500 mL 棕色瓶中,在室温或 4℃ 冰箱内保存备用。

2.2 动物分组与造模:取健康 ICR 种小鼠 90 只,随机分为正常组、模型组、穿山甲组、猪蹄甲低、中、高剂量组,每组 15 只。其中正常组和模型组 ig 生理盐水(20 mL/kg);穿山甲组 ig 穿山甲水煎液(20 g/kg);猪蹄甲各组分别 ig 猪蹄甲水煎液(20、40、80 g/kg)。各组小鼠每日 ig 体积相等,实验期间自由饮水。ig 第 7 天后,除正常组外,其余各组进行⁶⁰Co-γ 射线照射^[3],剂量约为 0.5 Gy/min。全身照射总剂量为 4.0 Gy,⁶⁰Co-γ 照射后,称体重,继续按上述方法给药,照射后第 3 天称体重后脱臼处死,测定其骨髓血红蛋白水平、血清中血栓素 A₂(TXA₂)和前列腺素 I₂(PGI₂)的水平,并取左后腿股骨,进行组织形态学检查。

2.3 骨髓血红蛋白溶液的制备和测定:处死小鼠后,每只小鼠取股骨和胫骨各 1 根(右后腿),去净骨外软组织,用注射针头在骨两端打孔,用注射器将骨髓全部冲入盛有 5 mL 显色剂的试管内,通过 4 号针头将骨髓溶液移入离心管。每管加入乙醚 1 mL,盖上翻口塞。在振荡器强烈振荡 2~3 min,然后 3 000 r/min 离心 15 min,用吸管将脂肪层下的骨髓血红蛋白溶液吸入比色杯,在波长 540 nm 处测定吸光度(A)值,用显色剂调节零点。

2.4 血清中 TXA₂和 PGI₂的水平测定:小鼠眼眶取血,待血液凝固后,室温 3 000 r/min 离心 15 min,取其上清液即为血清,分装于 Ependorf 管 -20℃ 冻存备用。用放免法测定[TXA₂水平以血栓素 B₂(TXB₂)水平表示]。

2.5 骨髓病理切片和微血管反应评价^[3]:取小鼠的左后腿股骨,作病理检查。取中股骨,去净周围软组织,在 10% 甲醛溶液中固定,再按常规方法包埋、切片、HE 染色,用阿拉伯胶封片。病理切片由北京中医药大学组织胚胎学教研室制作及观察。

2.6 祛瘀作用的表示:药物的祛瘀作用可以通过测定骨髓中血红蛋白的量来表示,计算公式为:

$$\text{血红蛋白抑制率} = \frac{A_{\text{模型组}} - A_{\text{给药组}}}{A_{\text{模型组}} - A_{\text{正常组}}} \times 100\%$$

2.7 数据处理:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对小鼠体重的影响:经⁶⁰Co-γ 射线照射后,模型组小鼠体重与正常组小鼠体重相比,有一定程度的减轻趋势,且部分小鼠出现严重腹泻等反应。猪蹄甲和穿山甲组小鼠体重同正常组小鼠相比无明显差异,无明显腹泻现象。

3.2 对⁶⁰Co-γ 照射后小鼠骨髓血红蛋白水平的影响,见表 1。猪蹄甲和穿山甲均具有降低⁶⁰Co-γ 照射后小鼠骨髓血红蛋白水平的功效,其中穿山甲对以上指标改善较为显著($P < 0.01$)。中、高剂量猪蹄甲组与穿山甲组比较无统计学差异($P > 0.05$)。低剂量猪蹄甲组与中、高剂量组差异显著($P < 0.05$)。

表 1 猪蹄甲与穿山甲对骨髓微循环障碍小鼠血红蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 Effects of *S. scrofa domestica* and *M. pentadactyla* on hemoglobin level in mice with obstruction of marrow microcirculation ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	骨髓血红蛋白(A值)	抑制率/%
正常	—	0.038 2±0.007 9	—
模型	—	0.120 2±0.009 4**	—
穿山甲	20	0.061 9±0.007 8**△△#	71.09
猪蹄甲	20	0.077 7±0.007 3**△△▲▲	51.83
	40	0.066 1±0.004 9**△△▲#	65.98
	80	0.067 4±0.004 6**△△▲#	64.39

与正常组比较:** $P < 0.01$; 与模型组比较:△△ $P < 0.01$;

与穿山甲组比较:▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$;

与猪蹄甲(20 g/kg)组比较:# $P < 0.05$;表 2 同

** $P < 0.01$ vs normal group; △△ $P < 0.01$ vs model group;

▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs *M. pentadactyla* group;

$P < 0.05$ vs *S. scrofa domestica* (20 g/kg) group;

Table 2 is same

3.3 对小鼠血清中 TXB₂和 PGI₂水平的影响:见表 2。猪蹄甲和穿山甲能显著降低⁶⁰Co-γ 照射后小鼠血清 TXB₂水平及升高小鼠血清 PGI₂水平,其中穿山甲对以上指标改善较为显著($P < 0.01$)。中、高剂量猪蹄甲组与穿山甲组比较无统计学差异($P > 0.05$),低剂量猪蹄甲组与中、高剂量猪蹄甲组比较差异显著($P < 0.05$)。

3.4 小鼠骨髓病理检查结果:正常组的骨髓毛细血管壁清晰,可见内皮细胞完整,无出血现象。模型组小鼠骨髓内呈明显出血,血窦结构不清,明显扩张或

表2 猪蹄甲与穿山甲对骨髓微循环障碍小鼠血清 TXB₂ 和 PGI₂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Effects of *S. scrofa domestica* and *M. pentadactyla* on TXB₂ and PGI₂ level in mice serum with obstruction of marrow microcirculation ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TXB ₂ /(μg·mL ⁻¹)	PGI ₂ /(μg·mL ⁻¹)
正常	—	54.93±12.59	217.04±55.27
模型	—	114.41±16.32**	73.31±17.63**
穿山甲	20	81.23±7.17**△△	134.55±32.13**△△
猪蹄甲	20	93.63±9.55**△△▲▲	91.27±7.98**△△▲▲
	40	79.06±7.86**△△▲#	115.11±19.50**△△▲#
	80	77.06±14.1**△△▲#	125.04±27.58**△△▲#

破坏,血窦数减少,可见髓腔中心静脉扩张,窦状隙有形状和大小不一的出血灶。穿山甲组小鼠骨髓内毛细胞损伤与出血明显减轻;猪蹄甲低、中、高剂量组,未见明显的骨髓内出血,可见毛细血管壁结构,各剂量组间有一定差异,且中、高剂量组能明显地减轻窦状隙系统的破坏,降低微血管通透性,改善窦状隙系统血流状况,能明显地使骨髓微循环损害得到一定延缓和遏制。

4 讨论

骨髓微循环系统的基本功能是保证骨组织及细胞的物质交换,并与机体造血功能有密切联系。骨髓组织中除大量的造血细胞外,还有丰富的血管网络组成的骨髓微循环系统。⁶⁰Co-γ射线照射小鼠后可以造成骨髓内血窦结构的破坏,而致小鼠骨髓血红蛋白水平升高、血清中 TXA₂升高和 PGI₂降低等一系列微循环障碍表现。骨髓微循环系统的改变,也属于中医血瘀的一种表现。⁶⁰Co-γ射线照射小鼠,可引起骨髓血红蛋白水平升高及骨髓的血窦扩张,充血通透性增高。该模型成熟稳定,常用于治疗骨髓微循环药物的评价研究^[3]。PGI₂和 TXA₂均为花生四烯酸的代谢产物,它们对血液系统的药理作用相反,它们之间的相互平衡对于维护机体的正常血液循环有着重要的作用^[4,5]。而微循环障碍常表现为血清中 TXA₂升高和 PGI₂降低,导致 PGI₂和 TXA₂失衡。因此本实验选择以上指标进行研究,能较好地反映药物的作用。

穿山甲为活血消痈、消肿排脓之良药。《本草纲目》记载穿山甲:“除痰虐寒热,风痹强直疼痛,通经脉,下乳汁,消痈肿,排脓血,通窍杀虫”。现代研究证明穿山甲水煎液具有良好的抗微循环障碍的作用^[2]。本实验研究也证明,穿山甲水煎液能在一定程度上防治⁶⁰Co-γ射线造成的小鼠骨髓血窦结构损伤,显著降低血清 TXB₂(血清 TXB₂为血液中 TXA₂体外存在形式)水平和升高血清 PGI₂水平。

《本草从新》中记载:“猪悬蹄甲,治寒热痰喘,痘疮入目,五痔肠痈”。现代研究证明猪蹄甲对心血管系统及血液系统有显著影响^[6,7]。本实验研究也发现猪蹄甲低、中、高剂量均能预防⁶⁰Co-γ射线造成的小鼠骨髓血窦结构损伤以及调节血清中 TXB₂和 PGI₂水平,但猪蹄甲低剂量组作用不如中、高剂量组明显。

本实验研究表明:猪蹄甲和穿山甲均有一定的抗小鼠微循环障碍的作用,其机制可能在于改善小鼠微循环系统,让成熟的血细胞进入血管,促进小鼠骨髓静脉窦的修复,明显增加骨髓微血管数,扩张其微血管面积,改善红细胞的变形和取向能力^[8],从而发挥其活血化痰作用。而小鼠骨髓基质内细胞核因子-κB(NF-κB)与小鼠骨髓微环境基质细胞的抗辐射能力及造血功能恢复有关^[9,10]。穿山甲和猪蹄甲对骨髓微循环改善是否与调节小鼠基质内 NF-κB有关,有待于进一步探讨。猪蹄甲中、高剂量组与穿山甲组在抗小鼠骨髓微循环障碍方面无显著差异,这提示猪蹄甲在抗小鼠骨髓微循环障碍方面替代穿山甲具有一定的可能性,这为猪蹄甲全面替代穿山甲奠定了一定的实验基础。至于猪蹄甲能否全面替代穿山甲有待于进一步研究。

致谢:本实验在进行过程中得到了北京中医药大学团委董玲、范璐老师,科研处王伟、葛幼华、王志刚老师的大力支持,同时也得到了中日友好医院、军事医学科学院放射科学研究所的大力帮助。

References:

- [1] Cao Y, Lü Z L, Li W M, et al. Study on components of *Manis pentadactyla* Linnaeus and *Sus scrofa domestica* Brisson [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1989, 12(2): 34-36.
- [2] Liu W L, Sun H Y, Lu W, et al. Effects of promoting blood circulation and removing blood stasis of TCM on marrow microcirculation and supplying oxygen in the irradiated mice [J]. *Chin J Radiol Med Prot* (中华放射医学与防护杂志), 1997, 17(5): 341-345.
- [3] 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, 1994.
- [4] Persson J, Ekelund U, Grande P O. Endogenous nitric oxide reduces microvascular permeability and tissue edema during exercise in cat skeletal muscle [J]. *J Vasc Res*, 2003, 40(6): 538-546.
- [5] Sacerdoti D, Gatta A, McGiff J C. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2003, 72(1-2): 51-71.
- [6] Mei B L. Study on Fuxue Ning on functional uterine bleeding [J]. *Viscera Biochem Pharm* (脏器生化制药), 1980(3): 21-22.
- [7] Zhang C L. Advances in studies on animal nails using in medicine [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1994, 15(2): 153-155.
- [8] Xie L D, Zheng J J, Liu D H, et al. Effects of ⁶⁰Co on radiation deformation and oritation in the course of erythrocyte

- senescence [J]. *Chin J Hemorheol* (中国血液流变学杂志), 2000, 10(1): 4-8.
- [9] Zhu B, Luo J C, Guo Z H, *et al.* Changes of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in cultured bone marrow stromal cells after $^{60}\text{Co}\gamma$ -irradiation [J]. *Chin J Radiol Med Prot* (中华放射医学与防护杂志), 2000, 20(5): 317-320.

- [10] Nadjar A, Combe C, Laye S, *et al.* Nuclear factor kappaB nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse [J]. *J Neurochem*, 2003, 87(4): 1024-1036.

蚓激酶对实验动物血栓及相关血液学指标的影响

许超千¹, 焦军东¹, 孙宏丽¹, 龚冬梅¹, 杨宝峰^{1,2*}

(1. 哈尔滨医科大学 药理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省生物医药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 药理学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

近年来我国心肌梗死、血栓性疾病成为常见病、多发病, 发病率逐年提高, 并且留有较为严重的后遗症。目前临床上常用于治疗血栓性疾病的药物, 如尿激酶、链激酶等虽然具有较好的疗效, 但易引起出血。1983 年 Mihara 等首次从地龙(蚯蚓)中提取出蚓激酶, 作为治疗血栓性疾病的新药, 其疗效确切, 且不易引起出血^[1~3], 但由于蚓激酶提取工艺复杂, 因此临床应用较少。本室与九信科技实业有限公司经多年合作, 以蚯蚓为原料, 提取出蚓激酶。本实验通过对蚓激酶进行药效学的研究, 证明其有抗血栓作用, 为临床用药提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 药品和试剂: 蚓激酶: 哈尔滨医科大学药理教研室与哈尔滨九信科技实业有限公司共同研制, 每支 0.25 mg; 脉络宁注射液, 金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂提供, 批号 200202021; 二磷酸腺苷 (ADP), 美国 Biopool 公司提供, 批号 704N02。

1.2 实验动物: Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (300±50) g, 哈尔滨医科大学实验动物中心提供, 合格证号: 09-2-1。大耳白家兔, 雌雄兼用, 体重 (2.5±0.5) kg, 哈尔滨医科大学实验动物中心提供, 合格证号: 医动字: 9-4-1。

1.3 仪器: Librorael 型电子天平, 日本岛津; XBH-32A 型血小板黏附仪, 无锡医疗器械厂; LBY-NJ2 血液聚集仪, 北京普利生公司。

1.4 大鼠动静脉旁路血栓模型的建立: Wistar 大鼠 50 只, 随机分为空白对照组、蚓激酶大、中、小剂量 (8、4、2 mg/kg) 组、阳性对照组。空白对照组 iv 等量生理盐水; 蚓激酶各剂量组 iv 蚓激酶; 阳性对

照组 iv 脉络宁注射液 (22.5 mL/kg), 各组均采用舌下静脉给药, 给药后 5 min, 大鼠以戊巴比妥钠 0.05 g/kg ip 麻醉, 正中切开颈部皮肤, 钝性剥离右颈总动脉及左颈外静脉, 将事先充满肝素生理盐水 (50 U/mL) 的聚乙烯管 (分 3 段连结, 在中段放入长 5 cm 的 4 号手术线) 的一端插入左颈外静脉后, 从聚乙烯管注入肝素 50 U/kg, 夹住管壁, 将右颈总动脉近心端用止血夹夹住以阻断血流, 眼科剪剪一小口, 将聚乙烯管另一端插入右颈总动脉, 结扎。打开止血夹开放血流, 15 min 后中断血流, 迅速取下聚乙烯管, 取出手术线, 放在已称质量的滤纸上, 用分析天平称质量, 以总质量减去线质量和纸质量即得血栓湿质量, 然后将滤纸放入干燥箱 60 °C 干燥 1 h 后称质量, 以总质量减去线质量和纸质量即得血栓干质量。

1.5 家兔血小板数、血小板黏附率及聚集率的测定: 将健康家兔 40 只, 随机分为 5 组, 分别为空白对照组 (生理盐水 0.5 mL/kg)、蚓激酶 (1、2、4 mg/kg) 组和阳性对照药脉络宁注射液 (1.1 mL/kg) 组。取家兔称质量, 于耳缘 iv 药物, 8 min 后心脏取血 2.7 mL, 加入到预先加有 0.3 mL 3.8% 枸橼酸钠的试管中, 摇匀待用。取抗凝血 750 μ L, 加入容量为 5 mL 的玻璃球瓶中, 置于血小板黏附仪转盘上, 以 3 r/min 旋转 15 min。然后从抗凝管及玻璃球瓶中分别取血 20 μ L, 各加到盛有 0.38 mL 血小板稀释液的试管中进行血小板计数, 计算黏附率。将抗凝血以 500 r/min 离心 5 min, 制备富血小板血浆 (PRP), 剩余血浆经 3 000 r/min 离心 10 min, 制备贫血小板血浆 (PPP), 用 PPP 调 PRP 中血小板数

收稿日期: 2005-02-13

作者简介: 许超千 (1975—), 男, 黑龙江省哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。

Tel: (0451) 86669482 E-mail: xuchaoqian@ems.hrbmu.edu.cn

* 通讯作者 杨宝峰