

- 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 ℃ 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

至 $4 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}/L$, 取 PRP 200 μL , 37 $^{\circ}C$ 温育 30 min 后, 加入诱导剂 ADP 2 $\mu mol/L$, 用血液聚集仪按比浊法测定血小板聚集率, 血小板聚集率测定均在 3 h 内完成。

1.6 家兔全血凝血时间的测定: 分组及给药方法同 1.5 项。给药 8 min 后, 割破家兔耳缘静脉, 擦干第一滴血, 再取自然流出的血液两大滴, 分开滴于一清洁玻片上 (直径 4~5 mm), 自血液滴在玻片上开始计时, 每隔 30 s 用 1 mL 注射器针头通过血滴并挑血液 1 次, 如见针尖挑起纤维蛋白丝, 停止计时, 记录时间。再挑动另一滴未挑过的血液作为对照, 并以前一滴血作为结果报告。

1.7 统计学处理: 各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 对大鼠血栓形成的影响: 与空白对照组相比, 蚓激酶各个剂量组均可使血栓的湿质量和干质量明显减轻, 且蚓激酶中剂量 (4 mg/kg) 组血栓湿质量与脉络宁注射液组相比差异显著 ($P < 0.05$), 优于脉络宁注射液组。由此可见蚓激酶可明显抑制大鼠

动静脉旁路血栓的形成。见表 1。

表 1 蚓激酶对大鼠血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of lumbrokinase on thrombosis

in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂 量	血栓湿质量/mg	血栓干质量/mg
对照	—	84.5 $\pm$ 23.3	27.6 $\pm$ 6.9
脉络宁	1.1 mL $\cdot$ kg ⁻¹	46.7 $\pm$ 5.6**	14.6 $\pm$ 3.5**
蚓激酶	2 mg $\cdot$ kg ⁻¹	40.6 $\pm$ 10.1**	16.4 $\pm$ 3.6**
	4 mg $\cdot$ kg ⁻¹	33.5 $\pm$ 14.1**▲	13.9 $\pm$ 2.2**
	8 mg $\cdot$ kg ⁻¹	38.4 $\pm$ 15.7**	14.5 $\pm$ 4.7**

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与脉络宁组比较: ▲ $P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs Mailuoning group

2.2 对家兔血小板数、血小板黏附率及聚集率的影响: 与对照组相比, 蚓激酶对家兔血小板数无影响, 但蚓激酶大剂量 (4 mg/kg) 组可以显著降低血小板的黏附率, 并同时降低血小板的聚集率; 其与脉络宁组相比, 对血小板的黏附率的降低差异显著, 效果优于脉络宁。见表 2。

2.3 对家兔全血凝血时间的影响: 与对照组比较, 蚓激酶大剂量 (4 mg/kg) 组可使家兔全血凝血时间延长, 与脉络宁组比较无明显差异, 结果见表 2。

3 讨论

表 2 蚓激酶对家兔血小板功能和全血凝血时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of lumbrokinase on platelet function and whole blood coagulation time in rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	剂 量	血小板数/ $(10^9 \cdot L^{-1})$	血小板黏附率/%	血小板聚集率/%	全血凝血时间/s
对照	—	351.25 $\pm$ 123.85	21.60 $\pm$ 9.34	46.64 $\pm$ 16.68	377 $\pm$ 193
脉络宁	1.1 mL $\cdot$ kg ⁻¹	347.00 $\pm$ 132.62	22.90 $\pm$ 11.84	31.80 $\pm$ 8.98*	585 $\pm$ 145*
蚓激酶	1 mg $\cdot$ kg ⁻¹	369.00 $\pm$ 92.27	24.29 $\pm$ 9.50	50.30 $\pm$ 13.50	445 $\pm$ 200
	2 mg $\cdot$ kg ⁻¹	381.13 $\pm$ 98.31	14.97 $\pm$ 10.44	45.88 $\pm$ 20.67	562 $\pm$ 220
	4 mg $\cdot$ kg ⁻¹	404.88 $\pm$ 99.69	7.03 $\pm$ 4.24**▲▲	29.29 $\pm$ 12.48*	569 $\pm$ 177*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与脉络宁组比较: ▲▲ $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs Mailuoning group

蚓激酶作为新型溶栓药物, 因其具有溶栓、抗凝、无毒等特点, 且在抑制血栓形成的同时不易引起出血, 近几年国内外都有相关报道^[4]。但由于蚓激酶是从蚯蚓体内提取, 而蚯蚓体内的纤溶组分十分复杂, 一方面随着蚯蚓的品种不同, 分离活性成分的难易度也不同; 另一方面这些活性组分的关系及其表现出的活性种类也十分复杂。Mihara 等^[5]从粉正蚓中分离得到 6 种具有纤溶活性的组分, 含有丰富的天冬氨酸和天冬酰胺, 很少有脯氨酸和赖氨酸。Sumi 等^[6]在粉正蚓的脂溶液中, 分离出 3 种对纤维蛋白板或血栓具有强溶解活性的组分, 其分子量分别为 40、21、15 kDa。这些资料表明蚯蚓体内的纤溶酶表现非常复杂, 提取相对困难。鉴于此, 目前市场只有口服蚓激酶, 而对注射用蚓激酶的研究较少, 缺乏详实的数据资料。本实验通过动物实验模型及血液

检验对注射用蚓激酶进行了较为深入的研究。

动静脉旁路血栓模型是研究药物溶栓、抑栓作用较为成熟的方法。此法反映整体动脉血流中血小板的黏附、聚集功能, 形成的血栓结构类似动脉中的白色血栓, 故与生理、病理情况比较接近。本实验中, 蚓激酶各个剂量组均可以显著减轻血栓的湿质量和干质量, 说明其具有抑制血栓形成的作用。

血栓形成的一个主要原因是血小板功能异常。蚓激酶可以抑制血小板聚集效应, 并且具有抗栓和增强纤溶的作用^[7]。本实验证实蚓激酶可以降低血小板黏附率和聚集率, 提示蚓激酶可以影响血小板功能, 进而抑制血栓的形成。但同时发现蚓激酶对血小板数无影响, 揭示可能与其在溶栓的同时不易引起出血有关。全血凝血时间涉及多种凝血因子, 反映内源性凝血。本实验发现蚓激酶大剂量 (4 mg/kg)

组可使家兔全凝血时间延长,揭示蚓激酶可以通过影响凝血因子抑制血栓的形成。蚓激酶由于静脉给药,起效时间短,可以较快发挥溶栓、抑栓的作用,在临床中具有较好的应用前景,此实验为蚓激酶进一步的临床应用提供了理论基础。

References:

- [1] Mibara H, Sumi H, Akazawa T, *et al.* Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm [J]. *Thromb Haemostas*, 1983, 50: 258-263.
- [2] Cotuk A. Lysozyme activity in the coelomic fluid and coelomocytes of the earthworm *Eisenta Foetida*, sav in relation to bacterial infection [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 1984, 78A: 467-474.
- [3] Tukowa L. Lytic activation coelomic fluid of *Eisenia* and *Lumbricus terrestris* [J]. *Dev Comp Immunol*, 1986, 10: 181-189.
- [4] Zhang Z X. Effects of crude extract of earthworm on promoting blood circulation to removing stasis [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1992, 12 (12): 741-743.
- [5] Mibara H, Sumi H, Yoneta T, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. *JPN J Physiol*, 1991, 41(3): 461-472.
- [6] Sumi H, Nake J, Mibara. A very stable and potent fibrinolytic enzyme found in earthworm *Lumbricus rubellus* antolyzate [J]. *Comp Biochem Physiol B; Comp Biochem*, 1993, 106B (3), 763-766.
- [7] Park Y, Ryu E, Kim H, *et al.* Characterization of antithrombotic activity of lumbrokinase-immobilized polyurethane valves in the total artificial heart [J]. *Artif Organs*, 1999, 23(2): 210-214.

白蚀丸对大鼠肠系膜微循环的影响

梁海清,田少鹏,陈丹曼

(广州中一药业有限公司 产品开发部,广东 广州 510140)

白蚀丸由紫草、补骨脂、何首乌、灵芝、丹参等10余味中药组成,临床上用于治疗白癜风病。为探讨其作用机制,本实验进行了白蚀丸对正常及右旋糖酐致急性微循环障碍活性大鼠微循环影响的研究。

1 材料

1.1 药品与试剂:白蚀丸,由广州中一药业有限公司生产,批号 E00020;白癜风丸,山西省临汾中药厂生产,批号 020512;戊巴比妥钠,进口分装,批号 F20020915,中国医药(集团)上海化学试剂公司提供;右旋糖酐 40 葡萄糖注射液,批号 02091507,安徽华源生物药业有限公司生产;其他药品均为市售合格药品。

1.2 动物:SD 大鼠,购自广东省医学动物实验中心,粤检证字 2002A024 号。

1.3 仪器:602 型超级恒温恒压浴槽,金坛市正基仪器有限公司生产;37XB—Z 型倒置显微镜,上海光学仪器六厂生产;BI2000 图像处理系统,四川成都泰盟科技有限公司生产;Olympus 摄影显微镜,日本 Olympus 公司生产。

2 方法与结果

2.1 统计学方法:数据采用 Microsoft Excel 2000 处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间行 *t* 检验。

2.2 对正常大鼠肠系膜微循环的影响:选取健康 SD 雄性大鼠 50 只,体重为 180~250 g,随机分成 5 组,即正常组,白蚀丸低、中、高剂量组,阳性对照组,每组 10 只大鼠。给药组分别 ig 给予白蚀丸 0.67、2.01、6.03 g/kg (相当于 70 kg 成人每天服用剂量 1、3、9 倍);阳性对照组 ig 给予 1.29 g/kg 白癜风丸 (分别相当于 70 kg 成人每天服用剂量的 3 倍);正常组 ig 给予同体积的生理盐水,每天定时给药 1 次,连续 30 d。参考文献方法^[1],实验前禁食不禁水 12~24 h,戊巴比妥钠 50 mg/kg ip 麻醉后,背部固定于手术台上,将下腹部毛剪净,于腹正中中线作 3~4 cm 长切口,轻轻拉出一段肠袢(回盲端)的肠系膜固定在与恒温恒压浴槽相连接的特制的有机玻璃微循环观察盒内(充满 37℃ 生理盐水),通过微循环显微镜(放大 40 倍)和显微图像处理系统观察记录大鼠肠系膜毛细血管数(*N*)、细动脉的血流速度(ABFV)、细静脉的血流速度(VBFV)、细静脉的血流状态(BFS)、细动脉管径(AD)、细静脉管径(VD)、毛细血管开放数(CN)(毛细血管开放数测定采用毛细血管网交叉点计数法)等指标。由于细动脉基本为线流,而细静脉肉眼可以看到颗粒感,故选取细静脉的血流状态作为评价指标;血流状态根

收稿日期:2005-02-20

作者简介:梁海清(1966—),男,主管药师,1989年毕业于第一军医大学医疗系,医学学士,曾先后从事临床、临床病理诊断及教学工作,现主要从事中药新药研究开发工作。