

表 4 注射用舒血宁对大鼠全脑缺血再灌注模型的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Shuxuening Injection in global cerebral ischemia/reperfusion of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	脑指数/ %	脑含水量/ %	LDH/ (U·L ⁻¹)×10 ⁵	CPK/ (U·L ⁻¹)×10 ⁵
假手术	—	0.566±0.031	78.7±0.5	1.40±0.67	12.5±4.3
模型	—	0.604±0.035 [#]	79.4±0.7 [#]	0.77±0.28 [#]	6.2±2.0 [#]
注射用丹参	70	0.570±0.030 [*]	78.8±0.6 [*]	1.30±0.45 ^{**}	11.4±6.9 [*]
注射用舒血宁	25	0.562±0.032 [*]	78.8±0.4 [*]	1.33±0.47 ^{**}	11.8±4.5 ^{**}
	12.5	0.563±0.029 [*]	78.5±1.0 [*]	1.16±0.35 [*]	9.8±4.3 [*]
	6.25	0.562±0.041	78.9±0.6	1.15±0.58	8.0±3.2

与假手术组比较: [#] $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs Sham group

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

异常是药物治疗的主要目标^[6]。脑缺血实验模型按局部解剖学通常分为全脑缺血和局部脑缺血两大类。本实验采用的 4 种模型中,小鼠急性不完全性脑缺血、大鼠双侧颈总动脉结扎、小鼠中动脉栓塞属局部脑缺血模型,大鼠四动脉结扎属全脑缺血模型。实验结果表明,注射用舒血宁给药组能明显延长小鼠存活时间,降低大、小鼠脑缺血后的脑指数,改善脑

水肿程度,降低脑组织中的 LDH、CPK 的释放。脑梗死面积和神经学行为指标更从整体水平反映了注射用舒血宁改善小鼠神经行为,缩小脑梗死面积,有明确的抗实验性脑缺血作用。

缺血性脑血管疾病是一种多危险因素的疾病,且各因素错综复杂。本实验表明注射用舒血宁对实验动物脑缺血的保护作用机制还待进一步的深入研究。

References:

- [1] He T, Ming L. Protective effects of extract of *Astragalus* on injuries of global cerebral ischemia and reperfusion in rats and anoxia in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(5): 576-580.
- [2] Ren J, Jia Z P. Protective effects of *Ginkgolides* on three types of cerebral ischemic models in rats [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2005, 16(1): 41-45.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [4] Han Y, Liu N. The change of the content of interleukin-8 after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2005, 13(2): 155-157.
- [5] Liu J, Yao C S. The effect of ischemic preconditioning on the expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2004, 21(6): 510-512.
- [6] Li X Y, Tu C C. Study of protective effect of pentoxifylline (PTX) on acute cerebral ischemia in mice [J]. *Acta Acad Med Jiangxi* (江西医学院学报), 2003, 43(6): 37-39.

羟基红花黄色素 A 抗凝作用的研究

臧宝霞,金 鸣*,李金荣

(首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所 药理研究室,北京 100029)

红花为菊科植物 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,为活血化瘀代表药,常用于治疗冠心病、脑血栓等心脑血管疾病。羟基红花黄色素 A (hydroxy-safflor yellow A, HSYA) 是红花主要有效成分,具抗血小板激活因子的作用^[1],红花黄色素为红花抗血栓有效部位^[2]。红花黄色素所含主要成分为 HSYA,为了探索红花抗血栓形成的有效成分,本实验观察了 HSYA 抑制血小板聚集及抗凝的作用,以探讨红花活血化瘀的机制。

1 材料与方法

1.1 仪器:Chrono-Log 型血小板聚集仪。

1.2 药品与试剂:HSYA 为本研究室以红花水提液经大孔树脂-葡聚糖凝胶柱色谱法制备,质量分数

为 97%;ADP 钠盐为 BM 公司进口分装,以生理盐水配成 2 mmol/L 溶液, -30℃ 保存,用前解冻;冻干含钙组织凝血活酶,上海荣盛生物技术有限公司产品,肝素为北京鼎国生物科技发展中心产品,香丹注射液为雅安三九药业有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物:雄性新西兰家兔为合格动物,体重 3~4 kg,中国药品生物制品检定所提供;清洁级 Wistar 大鼠为维通利华公司提供,体重 300 g。

1.4 HSYA 抑制 ADP 诱导家兔血小板聚集试验:家兔耳正中动脉取血,枸橼酸钠抗凝,120×g 离心 5 min,取富血小板血浆 (PRP),下层 1 100×g 离心 10 min 得贫血小板血浆 (PPP),用 PPP 稀释

收稿日期:2006-10-23

作者简介:臧宝霞(1961—),女(满族),北京人,主任药师,医学硕士,研究方向为中药红花活血化瘀作用机制的研究。

Tel: (010) 64456481 64456308

* 通讯作者 金 鸣 Tel: (010) 64456308 E-mail: jinzang@public3. bta. net. cn

PRP 得 4.5×10^{11} /L 血小板混悬液备用。取 180 μ L PRP 置比浊管中加入 HSYA 液 (终浓度为 4.0、7.9、15.8、31.7 mmol/L) 40 μ L, 37 $^{\circ}$ C 预热后加入 2 mmol/L ADP 5 μ L, 记录血小板聚集曲线, 以等体积蒸馏水代替 HSYA 为溶剂空白。依下式计算药物血小板聚集抑制率。

抑制率 = (空白管血小板最大聚集率 - HSYA 管血小板最大聚集率) / 空白管血小板最大聚集率 $\times 100\%$

1.5 HSYA 对大鼠血浆凝血酶原时间 (PT) 的影响: 大鼠腹主动脉取血, 枸橼酸钠抗凝, 1 100 $\times g$ 离心 10 min, 分离 PPP 置冰浴中备用。依试剂盒方法实验, 酶标板置 37 $^{\circ}$ C 水面上, 每孔加入待测血浆 50 μ L, 给药管加 HSYA 药液 (终浓度为 8.4、16.8、33.7、67.3 mmol/L) 或香丹注射液 (终浓度为 1/4、1/8 香丹注射液) 50 μ L, 溶剂对照管以同体积蒸馏水代替药液, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 1 min, 迅速加入 37 $^{\circ}$ C 含钙组织凝血活酶溶液 100 μ L, 立即混匀, 加酶时开动秒表, 以钢丝轻轻搅动约 4 s 后, 每隔 2 s 向上挑动, 至生成固体细丝终止计时即为 PT。

1.6 HSYA 对大鼠血浆复钙时间 (RT) 的影响: 取血方法同 1.5, 120 $\times g$ 离心 5 min, 分离 PRP 置冰浴备用。37 $^{\circ}$ C 酶标板每孔加入待测血浆 50 μ L, 给药管加 HSYA 药液 (终浓度为 16.4、24.6、36.9、55.3 mmol/L) 或肝素 (终体积分数为 0.07%) 50 μ L, 溶液对照管以同体积蒸馏水代替药液, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 1 min, 加入 0.025 mol/L CaCl_2 溶液 50 μ L 混匀, 加入 CaCl_2 时开动秒表, 于血浆凝固前 1 min 每隔 10 s 以钢丝挑动 1 次, 至生成固体细丝终止计时即为 RT。

1.7 数据处理方法: 所有数据均用 SPSS 10.0 软件以方差分析及 q 检验法统计分析。

2 结果

2.1 HSYA 抑制 ADP 诱导家兔体外血小板聚集作用: 结果见表 1。HSYA 抑制 ADP 诱导的家兔血小板聚集作用具明显的量效关系, 当 HSYA 浓度为 31.7 mmol/L 时, 其血小板聚集率已很低为不到 10%, HSYA 抑制家兔血小板聚集的 IC_{50} 约为 16 mmol/L, 提示此成分可通过抑制血小板的聚集缓解血栓形成。

2.2 HSYA 延长大鼠离体血浆 PT 的作用: 表 2 结果可见, HSYA 能明显地延长大鼠离体血浆 PT 且呈明显的量效关系。以香丹注射液与 HSYA 条件一致情况下进行平行试验。结果表明 HSYA 浓度为 67.3 mmol/L 时, 其延长 PT 的作用强度与香丹注

射液相近。

2.3 HSYA 延长家兔离体血浆 RT 的作用: 表 3 结果可见, HSYA 能明显地延长大鼠离体血浆 RT 且呈明显的量效关系, 55.3 mmol/L 即 3.4% HSYA 延长 RT 的作用与 0.2% 的肝素相当, 提示 HSYA 的抗凝作用远较肝素为弱。

表 1 HSYA 抑制 ADP 诱导家兔体外血小板聚集的作用
Table 1 Effect of HSYA against rabbit platelet aggregation induced by ADP *in vitro*

组 别	C/ (mmol $\cdot$ L $^{-1}$)	样本数	血小板最大 聚集率/%	血小板聚集 抑制率/%
空白	—	3	44.5 $\pm$ 7.2	—
HSYA	4.0	3	36.7 $\pm$ 3.0*	16.8
	7.9	4	29.0 $\pm$ 4.2***	34.8
	15.8	2	22.5 $\pm$ 0.7***	49.4
	31.7	3	9.7 $\pm$ 1.5***	79.6

与空白管比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs blank tube

表 2 HSYA 对大鼠离体血浆 PT 的影响 ($n=4$)
Table 2 Effect of HSYA on plasma PT of rat *in vitro* ($n=4$)

组 别	C/(mmol $\cdot$ L $^{-1}$)	PT/s
H $_2$ O	—	16.0 $\pm$ 0.7
1/8 香丹注射液	—	45.3 $\pm$ 0.8***
1/4 香丹注射液	—	>100***
HSYA	8.4	20.8 $\pm$ 0.6***
	16.8	25.1 $\pm$ 0.9***
	33.7	50.3 $\pm$ 0.7***
	67.3	>100***

与 H $_2$ O 对照管比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs H $_2$ O control tube

表 3 HSYA 对家兔离体血浆 RT 的影响 ($n=4$)
Table 3 Effect of HSYA on plasma RT of rabbit *in vitro* ($n=4$)

组 别	C/(mmol $\cdot$ L $^{-1}$)	RT/s
H $_2$ O	—	152 $\pm$ 1.6
HSYA	16.4	183 $\pm$ 1.6***
	24.6	244 $\pm$ 1.8***
	36.9	392 $\pm$ 2.6***
	55.3	>600***
0.07% 肝素	—	>600***

与 H $_2$ O 对照管比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs H $_2$ O control tube

3 讨论

本实验结果表明, HSYA 对 ADP 诱导的家兔血小板聚集具明显的抑制作用, 且可明显延长大鼠血浆 PT 和家兔血浆 RT, 提示该药对内源性 & 外源性凝血系统均具抑制作用。

红花在临床上主要以水煎液入药, 红花黄色素为红花水溶性组分, 为红花抗血栓有效部位。本研究

室试验结果表明, HSYA 为一血小板激活因子受体拮抗剂, 拮抗血小板激活因子的作用为 HSYA 抗血栓作用的机制之一。本实验结果表明 HSYA 可抑制 ADP 诱发的家兔血小板聚集, 延长 PT 及 RT, 提示该成分为红花抗血栓有效成分, 可阻断多种途径诱发的血栓形成反应。抑制血栓形成为红花活血化瘀的主要途径之一, 本研究结果对进一步阐明红花活

血化瘀作用机制, 指导开发相关新药具有重要意义。

References:

- [1] Zang B X, Jin M, Si N, *et al.* The antagonistic effect of hydroxysafflor yellow A against platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 696-699.
- [2] Wu W, Li J R, Chen W M, *et al.* Inhibition effect of flavones from *C. tinctorius* L. against PMN aggregation and adhesion induced by platelet activating factor [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2002, 37(10): 743-745.

天麻醋酸乙酯提取物抗 ADP 诱导的家兔血小板聚集作用及机制

淤泽涛, 林青*, 李秀芳, 代蓉, 孟保华, 何晓山, 王妍

(云南中医学院 药理教研室, 云南 昆明 650200)

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Blume 的干燥块茎, 古名赤箭, 是传统的平肝息风药。现代药理学研究表明天麻及其制剂具有镇痛、镇静、催眠、延缓衰老、扩张血管、降低血黏度及抑制血小板聚集等作用^[1]。本室前期研究发现天麻醋酸乙酯萃取部分(主要成分为以 4,4'-二苯酚甲烷、三聚对羟基苯甲醇等为主的酚性化合物)具有较强的抗血小板聚集作用, 本研究在前期工作基础上对天麻醋酸乙酯部分进行柱色谱分离, 筛选出活性最强的 b 段, 观察其对家兔血小板聚集的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 天麻的提取和分离: 药材由本院药植鉴定教研室张庆芝副教授鉴定为兰科植物天麻 *G. elata* Blume。取 10 kg 粉碎后, 用 95% 乙醇浸泡 6 h, 连续提取 3 次, 减压浓缩得到深褐色糖浆状醇提物 155 g。然后用醋酸乙酯、正丁醇、水萃取, 浓缩回收分别得到醋酸乙酯萃取部分 (143 g)、正丁醇萃取部分 (250 g)、水萃取部分 (100 g)。将醋酸乙酯萃取部分用硅胶柱色谱分离, 分别得到 a (6.7 g)、b (6.6 g)、c (1.8 g)、d (0.17 g)、e (0.6 g) 等 5 段, 经初步测定醋酸乙酯萃取部分 b 段[洗脱系统为氯仿-甲醇 (6:1)]有较强的抗血小板聚集作用, 故对其进行活性研究。

1.2 试剂与仪器: 阿司匹林, 由昆明友谊制药厂惠赠。维拉帕米, 上海禾丰制药有限公司产品, 批号: H31021343; 二磷酸腺苷 (ADP) 系 Sigma 公司产

品, 溶于生理盐水中。Fura-2/Am 购自 Sigma 公司, 用 DMSO 溶解后, -20℃ 避光保存, 质量浓度为 1 mg/mL, 使用时终浓度为 3 μmol/L。其他试剂均为 AR 级产品。HSS-1B 数字式超级恒温浴槽 (成都仪器厂), LBY-NJ2 血液凝聚仪 (北京普利生科贸集团), RF-5000 荧光分光光度计 (日本岛津), 台式低速离心机 (上海电机厂)。

1.3 实验动物: 日本大耳白兔, 体重 2~2.5 kg, 雌雄兼用, 由昆明医学院动物科提供, 动物合格证号: 滇实动证第 2005014 号。

2 方法

2.1 体外血小板聚集实验: 自清醒兔颈动脉取血, 以 3.8% 枸橼酸钠 (血与抗凝剂体积比为 9:1) 抗凝收集于塑料离心管中, 以 1 000 r/min 离心 10 min 得到上层液即富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP), 余下以 3 000 r/min 离心 10 min 得到贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP)^[2], PPP 用以调零和稀释 PRP 中的血小板数。实验过程中所有接触血小板的器皿均先进行硅化处理, 用比浊法^[3]进行血小板聚集性测定, 记录血小板聚集率, 并以公式 [对照管聚集率 - 样品管聚集率] / 对照管聚集率 × 100% 计算药物对血小板聚集抑制率, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐用 *t* 检验, 方差不齐用 *t'* 检验 (下同)。

2.2 血小板细胞钙浓度 ($[Ca^{2+}]$) 测定 (荧光法): 同上方法得到家兔 PRP, 以 3 000 r/min 离心 10

收稿日期: 2006-11-22

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2002C0057M)

作者简介: 淤泽涛 (1957—), 男, 教授, 硕士生导师, 长期从事药理与中药药理学教学和科研工作, 发表论文 51 余篇。

E-mail: yuzetao@126.com

* 通讯作者 林青 Tel: (0871) 6554562 Fax: (0871) 6212252 E-mail: kmingqing@yahoo.com.cn