

细胞增殖因素 IL-2 诱发的细胞增殖同样有显著的抑制作用。虽然芦荟大黄素对 IL-2 引起胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流均有抑制作用,但由于单纯内 Ca^{2+} 释放不能引起细胞增殖,而 Ca^{2+} 内流在 IL-2 引起细胞增殖中起关键作用,所以推测芦荟大黄素抑制 IL-2 引起细胞增殖与其抑制 IL-2 引起的胞外 Ca^{2+} 内流有关。Kuo 等^[13]报道过大黄素对 T 淋巴细胞增殖的影响,发现大黄素对 T 淋巴细胞的增殖有抑制作用,其作用机制与降低细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有关,这与本研究结果有一定的相似性,提示这一类药物可能有相似的作用机制。

关于 PHA 引起胞内 Ca^{2+} 升高的机制已经有较清楚的认识,PHA 结合于 T 细胞受体后激活 G 蛋白偶联的磷酸肌醇通路,引起胞内钙库释放 Ca^{2+} ,使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, Ca^{2+} 释放继而引起 T 细胞膜上 CRAC 通道开放,胞外 Ca^{2+} 流入,导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 进一步升高^[14]。本研究结果表明 IL-2 引起的 Ca^{2+} 升高由胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流组成,这一点与 PHA 相似,但 IL-2 引起的胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高发生在加入 IL-2 约 250~300 s 后,这与 PHA 不同,提示 IL-2 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的作用过程可能与 PHA 有差别,推测 IL-2 受体活化后可能需要通过细胞内一系列信号转导过程引起 IP₃ 产生,最终引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,该过程的详细机制还需要进一步的实验研究。芦荟大黄素对 IL-2 引起的胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流均有抑制作用,但药物作用具体的靶点和分子机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Lewis R S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19(1): 497-521.
- [2] György P, Zoltón V, Rezső G. Ionchannels and lymphocyte activation [J]. *Immunol Lett*, 2004, 92(1): 55-66.
- [3] Dolmetsch R E, Lewis R S, Goodnow C C, *et al.* Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration [J]. *Nature*, 1997, 386(6627): 855-858.
- [4] Winslow M M, Neilson J R, Crabtree G R, *et al.* Calcium signaling in lymphocytes [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(3): 299-307.
- [5] Zitt C, Strauss B, Schwarz E C, *et al.* Potent inhibition of Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels and T lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12427-12437.
- [6] Kovanen P E, Leonard W J. Cytokines and immunodeficiency disease: critical roles of the V_{α} dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15 and 21, and their signaling pathways [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202: 67-83.
- [7] 李淑娟,董晓华,武海霞,等. 大黄及其有效成分药理作用研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11(1): 76-78.
- [8] 王辉,董志勇,余奕,等. 大黄素影响巨噬细胞升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和释放 TNF α 的作用特征 [J]. 生物物理学报, 2002, 18(3): 345-349.
- [9] 李臣宇,李新,刘丽军,等. 芦荟大黄素对 T 淋巴细胞增殖和细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 876-880.
- [10] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Gaffen S L, Liu K D. Overview of interleukin 2 function, production and clinical applications [J]. *Cytokine*, 2004, 28: 109-123.
- [12] Wan Y Y, Flavell R A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory of T cells [J]. *Immunol Rev*, 2006, 211: 114-130.
- [13] Kuo Y C, Meng H C, Tsai W J. Regulation of cell proliferation inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polypogonum hypoleucum* Ohwi [J]. *Inflam Res*, 2001, 50(1): 73-82.
- [14] Kotturi M F, Hunt S V, Jefferies W A. Roles of CRAC and Ca^{2+} -like channels in T cells: more than one gatekeeper [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(7): 360-367.

六味地黄方及其配伍对血小板聚集的影响

赵越,叶宏军,余黎,卞慧敏*

(南京中医药大学药学院 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室,江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究六味地黄方及其配伍对血小板聚集率的影响。方法 以比浊法测定六味地黄方及其配伍对二磷酸腺苷 (ADP)、血小板活化因子 (PAF)、花生四烯酸 (AA) 诱导的家兔体外血小板聚集率的影响,运用荧光法

收稿日期: 2010-02-11

基金项目: 江苏省中药局科技项目 (LZ09002); 康缘中医药科技创新基金 (HZ0814KY)

作者简介: 赵越 (1986—), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士研究生, 主要从事中药心血管药理研究。

Tel: 15996254322 E-mail: hope.zy@163.com

* 通讯作者 卞慧敏 E-mail: hmbian@sina.com

观察血小板经 ADP 激活前后的 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。结果 六味地黄方及其配伍对 ADP、PAF、AA 诱导的家兔体外血小板聚集率均具有不同程度的抑制作用,且呈明显的量效关系;在终质量浓度为生药 9.26 mg/mL 时,除山药/茯苓药对外,均不同程度降低 ADP 激活的血小板释放 Ca^{2+} 的作用。结论 六味地黄方及其配伍均具有不同程度抗血小板聚集作用,其中以山茱萸/丹皮药对作用尤为显著,其抗 ADP 诱导血小板聚集的作用可能与抑制血小板内钙释放有关。

关键词:六味地黄方;血小板聚集;血小板内钙

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)12-2030-05

六味地黄方(LDF)是补肾滋阴的经典方,临床常应用该方治疗与预防高血压、冠心病、糖尿病、肿瘤、慢性肾炎等疾病^[1-2]。前期研究发现该方有抑制衰老加血瘀和阴虚血瘀证模型大鼠血小板聚集的作用,并能抗血栓形成^[3-4]。为进一步探讨该方抗血小板作用及其机制,本实验选择二磷酸腺苷(ADP)、血小板活化因子(PAF)、花生四烯酸(AA)为诱导剂,观察了六味地黄方全方及其配伍“三补”方、“三泻”方、山茱萸/丹皮、熟地/泽泻及山药/茯苓对血小板聚集功能的影响,并研究了血小板聚集与 $[Ca^{2+}]_i$ 释放的关系。

1 材料

1.1 药材:熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、丹皮及茯苓均购于南京药业股份有限公司中药饮片厂,经南京中医药大学吴启南教授鉴定:熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根的炮制加工品,山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎,泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎,丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。

1.2 药物制备:六味地黄方全方由熟地、山茱萸、山药、泽泻、丹皮、茯苓(8:4:4:3:3:3)组成;“三补”方由熟地、山茱萸、山药(2:1:1)组成;“三泻”方由泽泻、丹皮、茯苓(1:1:1)组成;山茱萸/丹皮药对由山茱萸、丹皮(4:3)组成;山药/茯苓药对由山药、茯苓(4:3)组成;熟地/泽泻药对由熟地、泽泻(8:3)组成。上述各方按比例配伍混合,分别进行水煎得水提液,滤过,浓缩至生药 1.0 g/mL,用时按原方中的比例稀释至等溶积。全方含丹皮酚 0.51 mg/g、马钱苷 0.52 mg/g;“三补”方含马钱苷 0.87 mg/g;“三泻”方含丹皮酚 1.73 mg/g;山茱萸/丹皮药对含马钱苷 1.93 mg/g;山药/茯苓药对含尿囊素 0.32 mg/g;熟地/泽泻药对

含 23-乙酰泽泻醇 B 0.08 mg/g。

1.3 动物:大耳白家兔,体质量 2.0~2.5 kg,雄性,由南京江宁县汤山青龙山动物繁殖场提供,实验动物使用许可证:SYXK(苏)2005-0009。

1.4 试剂:ADP(上海伯奥生物科技有限公司);PAF、AA(美国 Sigma 公司);Hepes(美国 Calbiochem 公司);无水氯化钙(南京化学试剂厂);EGTA(Sunshine 公司);TritonX-100(南京创瑞生物技术有限公司);Hepes 缓冲液(Hepes 1.19 g, NaCl 4.24 g, KCl 0.186 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.102 g, 葡萄糖 0.991 g, 溶解配成 500 mL);Fluor-3AM(含有 100 μ g Fluor-3 瓶中加入 DMSO 100 μ L 溶解);负载液(BSA 0.2 g, Hepes 0.12 g, 溶于 100 mL 的 RPMI 1640 溶液)。

1.5 仪器:LG-PABER-I 型血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司);莱卡倒置显微镜(德国莱卡公司);CO₂培养箱(Forma 公司);超净工作台(苏州净化设备厂);SPECTRA MAX GEMINI 荧光测定仪(美国 AD 公司)。

2 方法

2.1 六味地黄方及其配伍体外对家兔血小板聚集的影响:取大耳白家兔,局部麻醉,颈总动脉取血,离心,取上层富血小板血浆(PRP, 1 000 r/min, 10 min),剩余部分取贫血小板血浆(PPP, 3 000 r/min, 10 min)。聚集诱导剂用 PAF(终质量浓度 0.38 μ g/mL)、AA(终质量浓度 76.9 μ g/mL)、ADP(终质量浓度 5.54 μ g/mL)。PRP 中加入不同质量浓度的药物 10 μ L,对照组 PRP 中加入等量生理盐水,PPP 调零,用 LG-PABER-I 型血小板聚集凝血因子分析仪测定血小板聚集率^[5],计算药物对血小板聚集的抑制率。以药物质量浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,建立相关方程,通过方程计算抑制率为 50% 时的药物质量浓度(IC₅₀)。

聚集抑制率=(对照组聚集率-给药组聚集率)/对照组聚集率 $\times$ 100%

2.2 六味地黄方及其配伍对家兔血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响:取家兔,局部麻醉,颈总动脉取血,以 900

r/min 离心 10 min, 取 PRP。以无钙 Hepes 缓冲液, 洗涤血小板 2 次, 加入负载液, 将血小板计数后, 调整为 3.60×10^{11} /L。分别加入六味地黄方全方、“三补”方、“三泻”方、熟地/泽泻、山茱萸/丹皮及山药/茯苓提取液(终质量浓度 9.26 mg/mL), 空白管中加入等量的生理盐水; 以荧光分光光度计法测定^[5-6], 每管加入 1 mg/mL Fluor 3 AM 2 μ L (空白对照管其中一只加入等量的 DMSO), 设定检测激发波长 506 nm, 发射波长 526 nm, 读取荧光值(静息态 F); 加入终浓度 10 μ mol/L ADP, 即刻按上述方法读取荧光值(激活态 F); 加入 18% TritonX-100 充分振荡后加入终浓度为 1 mmol/L CaCl₂, 混匀 10 min, 读取荧光值($F_{\max}$); 加入 EGTA 液, 混匀, 读取荧光值($F_{\min}$)。按下式计算 $[Ca^{2+}]_i$ 。

$[Ca^{2+}]_i = k_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$

式中 k_d 为 Fluor 3 的解离常数, 在 20 $^{\circ}C$ 时, 按试剂说明书的 k_d 为 450 nmol/L, F 为经 ADP 激活前或激活后测得的荧光

值; $F_{\max}$ 为血小板用 TritonX-100 处理后, 在 1 mmol/L 细胞外 Ca^{2+} 存在下测得的最大荧光值; $F_{\min}$ 为加入 EGTA 后测得的最小荧光值

2.3 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用 SPSS 11.5 统计软件, 均数间比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA), q 检验。

3 结果

3.1 六味地黄方及其配伍体外对家兔血小板聚集率的影响: 六味地黄方及其配伍体外均不同程度降低 ADP、PAF 及 AA 诱导的家兔血小板聚集率的作用, 结果见表 1 和 2。

3.2 六味地黄方及其配伍对家兔血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响: 六味地黄方及其配伍在生药终质量浓度为 9.26 mg/mL 时, 均对静息态血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响; 在经 ADP 激活后, 除山药/茯苓外, 其余配伍均有明显的降低血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用, 与对照组比较, 差异显著。

表 1 六味地黄方及其配伍对 ADP、PAF、AA 诱导的家兔离体血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of LDF and its compatibility on ADP, PAF, and AA induced platelet aggregation rate in rabbit *in vitro* ($\bar{x} \pm s$)

组别	ρ (mg · mL ⁻¹)	最大血小板聚集率/ %			抑制率/ %		
		ADP	PAF	AA	ADP	PAF	AA
对照	0	47.59 ± 3.41 ^①	71.23 ± 4.50 ^④	66.98 ± 3.35 ^④	—	—	—
全方	37.04	13.30 ± 2.22 ¹⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾	27.25 ± 5.50 ¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾	6.72 ± 3.89 ¹⁾⁴⁾	72.05	61.75	89.97
	18.52	35.50 ± 6.19 ¹⁾³⁾⁵⁾⁷⁾	47.35 ± 4.84 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾	37.30 ± 3.82 ¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾	25.40	33.53	44.31
	9.26	45.62 ± 13.73 ⁴⁾⁶⁾	61.87 ± 5.53 ¹⁾⁵⁾	56.70 ± 4.60 ¹⁾³⁾⁷⁾	4.14	13.15	15.34
	4.63	—	67.20 ± 6.36	64.33 ± 3.81 ¹⁾³⁾⁵⁾	—	5.66	3.94
	2.315	—	—	65.52 ± 6.48 ^③	—	—	2.18
“三补”方	37.04	8.97 ± 2.24 ¹⁾⁴⁾⁷⁾	23.82 ± 4.09 ¹⁾²⁾⁴⁾⁷⁾	2.24 ± 1.88 ^{1)4)②}	81.15	66.57	96.66
	18.52	25.50 ± 4.37 ¹⁾²⁾⁴⁾⁷⁾	41.13 ± 3.91 ¹⁾²⁾⁴⁾⁷⁾	8.28 ± 3.21 ¹⁾²⁾⁵⁾⁷⁾	46.42	42.26	87.63
	9.26	45.34 ± 4.67 ⁴⁾⁶⁾	64.03 ± 6.61 ¹⁾⁵⁾	35.72 ± 4.07 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	4.73	10.11	46.67
	4.63	—	—	45.37 ± 7.04 ¹⁾²⁾	—	—	32.26
	2.315	—	—	65.52 ± 6.48 ^③	—	—	2.18
“三泻”方	37.04	25.58 ± 8.51 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾	50.30 ± 3.01 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	19.32 ± 5.28 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	46.25	29.39	71.16
	18.52	32.75 ± 4.85 ^{1)3)5)7)①}	57.20 ± 2.41 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾	47.08 ± 6.04 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	31.18	19.70	29.70
	9.26	39.44 ± 5.93 ^②	66.40 ± 4.58 ⁵⁾	60.18 ± 2.81 ¹⁾³⁾⁷⁾	17.13	6.79	10.14
	4.63	—	—	—	—	—	—
	2.315	—	—	—	—	—	—
熟地/泽泻	37.04	12.93 ± 1.21 ¹⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾	24.20 ± 4.74 ¹⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾	5.88 ± 1.82 ¹⁾⁴⁾	72.83	66.03	91.22
	18.52	26.58 ± 4.78 ¹⁾²⁾⁴⁾⁷⁾	39.58 ± 3.21 ¹⁾²⁾⁴⁾⁷⁾	41.22 ± 5.07 ¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾	44.15	44.43	38.46
	9.26	36.93 ± 6.63 ¹⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾	46.37 ± 5.68 ¹⁾²⁾³⁾	52.03 ± 3.99 ¹⁾³⁾⁷⁾	22.40	34.91	22.32
	4.63	—	63.80 ± 6.21 ¹⁾	61.30 ± 4.68 ¹⁾³⁾	—	10.44	12.50
	2.315	—	64.85 ± 2.62	64.30 ± 4.67	—	8.96	4.00
山茱萸/丹皮	37.04	3.73 ± 1.91 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	16.22 ± 7.49 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	3.65 ± 1.80 ¹⁾⁴⁾	92.16	77.23	94.55
	18.52	4.23 ± 1.98 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	29.42 ± 2.46 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	8.55 ± 1.73 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾	91.11	58.70	87.23
	9.26	19.35 ± 11.96 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	32.73 ± 1.75 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	13.92 ± 2.64 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	59.34	54.05	79.22
	4.63	42.90 ± 5.97	45.32 ± 8.34 ¹⁾	46.26 ± 9.16 ¹⁾	9.86	36.38	11.76
	2.315	—	68.95 ± 7.93 ^③	64.30 ± 4.67 ^③	—	3.21	3.99
山药/茯苓	37.04	35.13 ± 4.41 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	56.20 ± 5.27 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	53.80 ± 5.22 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	26.18	21.10	19.67
	18.52	40.63 ± 2.31 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	67.27 ± 3.53 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	62.13 ± 3.65 ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾	14.62	5.57	7.23
	9.26	51.67 ± 10.05 ^③	—	71.18 ± 318 ^{1)2)3)4)5)6)③}	—	—	—

1)~7) 分别表示在相同剂量下与对照、全方、“三补”方、“三泻”方、熟地/泽泻、山茱萸/丹皮、山药/茯苓比较: $P < 0.05$

①~④表示 $n = 8, 7, 4, 12$, 其他 $n = 6$

1)~7) indicate at same doses represent $P < 0.05$ vs control, QF, SBF, SXF, SZF, SDF, and SFF groups, respectively;

①~④represent $n = 8, 7, 4, 12$, respectively, others $n = 6$

表 2 六味地黄方及其配伍体外对 ADP、PAF 及 AA 诱导的家兔血小板聚集的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of LDF and its compatibility on ADP, PAF, and AA induced platelet aggregation in rabbit *in vitro*

组 别	$IC_{50}/(mg \cdot mL^{-1})$		
	ADP	PAF	AA
全方	28.12	29.73	21.48
“三补”方	23.82	26.96	14.14
“三泻”方	40.01	60.47	27.48
熟地/泽泻	23.56	24.89	21.03
山茱萸/丹皮	11.20	18.02	13.40
山药/茯苓	75.69	90.67	95.78

各配伍之间比较,经 ADP 激活的血小板 $[Ca^{2+}]_i$, 山茱萸/丹皮组最低,与除“三补”方以外的其他配伍差异均显著;“三补”方明显低于“三泻”方;山茱萸/丹皮明显低于熟地/泽泻及“三泻”方。按血小板经 ADP 激活后 $[Ca^{2+}]_i$ 由低到高的顺序排列为山茱萸/丹皮 < “三补”方 < 熟地/泽泻 < 全方 < “三泻”方 < 山药/茯苓,见表 3。

表 3 六味地黄方及其配伍对 ADP 激活的家兔血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Effect of LDF and its compatibility on ADP induced platelet $[Ca^{2+}]_i$ release in rabbit *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	$\rho/$ ($mg \cdot mL^{-1}$)	$[Ca^{2+}]_i/(nmol \cdot L^{-1})$		
		加 ADP 前	加 ADP 后	释放 $Ca^{2+}/(nmol \cdot L^{-1})$
对照	-	83.95 $\pm$ 10.49	182.82 $\pm$ 15.91	98.87 $\pm$ 15.83
全方	9.26	78.39 $\pm$ 8.28	138.28 $\pm$ 11.36 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾	49.89 $\pm$ 16.15 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾
“三补”方	9.26	76.79 $\pm$ 6.83	100.64 $\pm$ 10.67 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	23.85 $\pm$ 11.35 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾
“三泻”方	9.26	79.81 $\pm$ 10.26	157.88 $\pm$ 11.51 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	78.07 $\pm$ 14.42 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾
熟地/泽泻	9.26	81.09 $\pm$ 7.58	126.59 $\pm$ 13.36 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾	45.50 $\pm$ 17.79 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾
山茱萸/丹皮	9.26	75.64 $\pm$ 10.14	89.84 $\pm$ 9.12 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾	14.20 $\pm$ 13.06 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾
山药/茯苓	9.26	83.01 $\pm$ 10.63	167.81 $\pm$ 12.59 ²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾	84.81 $\pm$ 16.58 ²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾

1)~7) 分别表示与对照、全方、三补、三泻、熟地/泽泻、山茱萸/丹皮、山药/茯苓: $P < 0.05$

1)~7) represent $P < 0.05$ vs control, QF, SBF, SXF, SZF, SDF, and SFF groups, respectively

经 ADP 激活后血小板释放的 Ca^{2+} 浓度与药物对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的 IC_{50} 进行相关性分析,可见二者之间呈明显的正相关 ($Y=1.0599X+15.301$, $r=0.8367$),见图 1。

4 讨论

六味地黄方源于《小儿药证直诀》,是以补阴为主,方中重用熟地滋阴补肾,填精补髓为君药;佐药泽泻利湿而泄肾浊,并减熟地之滋腻;臣药用地黄肉温养肝肾,兼能涩精,山药健脾益阴,兼能固肾;分别佐以丹皮以清泄血中虚热,并泻君相之伏火,制山茱萸之温涩;茯苓淡渗脾湿,以助山药之补脾,又制山药

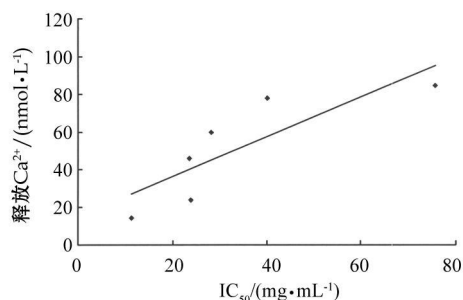


图 1 六味地黄方及其配伍对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的 IC_{50} 及血小板释放 Ca^{2+} 量之间的关系

Fig. 1 Relationship between IC_{50} of LDF and its compatibility on ADP induced platelet aggregation and content of released $[Ca^{2+}]_i$ in rabbit *in vitro*

之黏腻。六药合用,补中有泻,寓泻于补,通补兼施,以补为主,肾肝脾三阴并补,以补肾阴为主,构成通补开合之剂,共奏滋肾益精之功。依据方解,六味地黄全方拆方比较,以药物的补、泻关系分为“三补”方、“三泻”方,并以相应肝脾肾补泻关系的两味药组成药对,并与全方在不同诱导剂下,探讨对血小板聚集作用的影响。

ADP、PAF、AA、肾上腺素、凝血酶和胶原等都是血小板聚集的诱导剂,不同的诱导剂引起的聚集机制与表现有所不同。在本实验中,分别采用 ADP、PAF、AA 3 种诱导剂,以探讨六味地黄方及其配伍抗血小板聚集是否具有选择性。结果表明,六味地黄方及其配伍均有不同程度 ADP、PAF、AA 诱导的血小板聚集,由 IC_{50} 可比较不同药对之间的抗血小板作用的强弱趋势:对 ADP 诱导的血小板聚集强弱趋势是:山茱萸/丹皮 > 熟地/泽泻 > “三补”方 > 全方 > “三泻”方 > 山药/茯苓;对 PAF 诱导的血小板聚集强弱趋势是:山茱萸/丹皮 > “三补”方 > 熟地/泽泻 > 全方 > “三泻”方 > 茯苓;对 AA 诱导的血小板聚集强弱趋势是:山茱萸/丹皮 > 熟地/泽泻 > “三补”方 > 全方 > “三泻”方 > 山药/茯苓;说明其作用可能至少存在 ADP、PAF、AA 3 种途径。

Ca^{2+} 在血小板活化过程中具有重要作用。最终激活血小板均要通过升高血小板内钙这一“共同通路”^[7]。 Ca^{2+} 对于血小板来说不仅是构成 GP II b/IIIa 复合体所必需,也是信号跨膜传递的信使^[8]。在本实验中,六味地黄方全方及其配伍在终质量浓度为 9.26 mg/mL 时,除了山药/茯苓以外,均能够明显抑制 ADP 诱导的 Ca^{2+} 释放,说明了该方及其配伍抑制血小板聚集功能与抑制血小板致密管道系统的 Ca^{2+} 释放有关。在相同剂量时,抑制内钙释放

功能的作用强弱趋势是: 山茱萸/ 丹皮> “三补” 方> 熟地/ 泽泻> 全方> “三泻” 方> 山药/ 茯苓; 由 ADP 激活后 $[Ca^{2+}]_i$ 与对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的 IC_{50} 成正相关, 即药物对 Ca^{2+} 释放的抑制越强, 其抑制血小板聚集的作用越强, 提示该方及其配伍抑制血小板的 Ca^{2+} 释放功能, 是其抑制血小板聚集的机制之一。

综上所述, 六味地黄方及其配伍均具有抗血小板聚集的作用, 其中山茱萸/ 丹皮药对的作用较其他配伍更显著。

参考文献:

- [1] 邓红, 王新, 徐芳, 等. 六味地黄汤对糖尿病大鼠肾功能及细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1679-1682
- [2] 唐庆, 胡慧, 王全胜, 等. 六味地黄加味胶囊对糖尿病

肾病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性及结缔组织生长因子的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 77-81.

- [3] 龚婕宁, 卞慧敏, 魏凯峰, 等. 六味地黄方抗血栓作用机理研究 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3-4): 10-12
- [4] 叶宏军, 卞慧敏, 张启春, 等. 六味地黄汤对阴虚血瘀证模型大鼠血液流变性的影响 [J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 18(1): 14-16
- [5] 徐叔云, 卞如瀛, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [6] Heemskerk J W M, Willems G M, Rook M B, *et al.* Ragged spiking of free calcium in ADP-stimulated human platelets: regulation of puff like calcium signals *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Physiology*, 2001, 535: 625-635
- [7] Nesbitt W S, Giuliano S, Kulkarni S, *et al.* Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth [J]. *Cell Biol*, 2003, 160: 1151-1161
- [8] Offermanns S. Activation of platelet function through G protein coupled receptors [J]. *Circ Res*, 2006, 99: 1293-1304

1-甲氧基钩吻碱抗慢性疼痛作用

黄志毅, 刘铭, 沈洁, 苏燕评, 许盈, 俞昌喜*
(福建医科大学药学院 药理学系, 福建 福州 350004)

摘要:目的 1-甲氧基钩吻碱对福尔马林足底注射所致炎性痛及小鼠坐骨神经慢性压榨性损伤 (CCI) 所致神经病理性疼痛的作用。方法 建立小鼠福尔马林炎性疼痛模型, 以注射福尔马林后 1 h 内小鼠舔足时间为指标, 观察 1-甲氧基钩吻碱对炎性痛第二相痛反应的影响; 建立小鼠 CCI 模型, 于术后第 3 天至术后第 9 天 sc 1-甲氧基钩吻碱, 每天 2 次, 连续 7 d, 以双足热痛缩足潜伏期比值为指标, 观察 1-甲氧基钩吻碱对小鼠足底热痛缩足潜伏期的影响。结果 1-甲氧基钩吻碱具有显著对抗小鼠福尔马林致炎性疼痛第二相痛反应作用, 作用呈剂量依赖性, ED_{50} 为 4.59 mg/kg。1-甲氧基钩吻碱具有显著的抗 CCI 小鼠热辐射痛敏的作用, 镇痛效应呈剂量依赖性; 高剂量组小鼠给药后 2 d 显效, 镇痛疗效持续至停药后 36 h; 术后第 9 天, 1-甲氧基钩吻碱镇痛效应 ED_{50} 为 3.84 mg/kg。结论 1-甲氧基钩吻碱具有抗炎性疼痛作用与抗神经病理性疼痛作用。

关键词: 钩吻; 1-甲氧基钩吻碱; 炎性疼痛; 神经病理性疼痛

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)12-2034-04

严重的急、慢性疼痛困扰着数以千万计的患者, 又以慢性疼痛最为多见、最为严重。慢性疼痛主要有两种类型: 炎性疼痛和神经病理性疼痛。药物镇痛是目前临床上减轻病人疼痛的主要手段之一, 吗啡等阿片类镇痛药和阿司匹林等解热镇痛抗炎药最为常用。但阿片类镇痛药易产生耐受性、成瘾性以及呼吸抑制、减少胃肠蠕动等副作用; 阿司匹林等解热镇痛抗炎药镇痛效力弱, 胃肠道反应、胃溃疡、胃出血等不良反应严重, 其临床应用受限, 效果不甚理想^[1]。因此, 寻找能有效控制疼痛的新型镇痛药是

当前新药研发热点之一。

目前, 国内外许多科学家致力于从动植物取材, 开发新型镇痛药。我国中草药资源丰富, 富含药用天然活性成分。钩吻 *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth. 为马钱科植物胡蔓藤的全草, 俗称断肠草, 盛产于我国闽、粤、桂等地。钩吻提取物的主要有效成分为吲哚类生物碱, 包括钩吻素子、甲、寅、卯、辰、丙、丁、戊、己、庚以及胡蔓藤碱甲、乙、丙、丁等 10 多种单体, 其毒性大小不同^[2]。临床和基础研究表明^[3-4], 钩吻总生物碱具有显著的镇痛作

收稿日期: 2010-03-18

基金项目: 福建省改革与发展委员会产业技术开发项目 (2009); 福建医科大学重大科研项目 (ZD009)

作者简介: 黄志毅 (1984—), 男, 福建省厦门市人, 硕士研究生, 主要研究方向为神经精神药物药理学。

Tel: 15880268730 E-mail: hzybj@163.com

* 通讯作者 俞昌喜 Tel: (0591) 83569311 Fax: (0591) 83569311 E-mail: changxiyu@mail.fjmu.edu.cn