

补阳还五汤对大鼠静脉血栓形成前后静脉 血中血小板活化因子含量的影响*

张继平 张玉萍 文凤妮 黄卫战(广东省佛山市中医院 佛山 528000)
李长龄 郭欣欣 王银叶 王桂玲(北京医科大学药学院 北京 100083)

摘要 补阳还五汤可明显降低实验性静脉血栓形成后静脉血中 PAF 含量,而对血栓形成前静脉血中 PAF 含量无明显影响;明显降低静脉血栓形成百分率;减轻静脉血栓的干重和血栓-体重指数。

关键词 补阳还五汤 实验性血栓 血小板活化因子

* 国家中医药管理局科研基金(课题合同号 93C029)和广东省中医药管理局科研基金资助(课题编号 93039)

Buyang Huanwu Decoction's Effects on Rats'PAF Content in Blood Prior to and Following the Formation of Experimental Venous Thrombosis

Zhang Jiping, Zhang Yuping, Wen Fengni, Huang Weizhan

(Foshan Hospital of TCM, Foshan, 528000)

Li Changling, Guo Xinxin, Wang Yinye, Wang Guiling

(College of Pharmacology, Beijing Medical University, Beijing, 100083)

Abstract: The content of rats'PAF in venous blood was significantly decreased subsequent to the formation of experimental thrombosis after Buyang huanwu Decoction was given, while no effects were found at prior to thrombosis. The percentage of venous thrombosis occurrence was significantly lowered and the dry weight of venous thrombus and the thrombus body weight ratio were markedly reduced as well.

Key words: Buyang Huanwu Decoction, experimental thrombus, platelet activation factor (PAF)

补阳还五汤是清代名医王清任创制的方剂,具有补气、活血、通络之功,临床不仅广泛用于治疗和预防缺血性脑血管病、冠心病、心肌梗塞等动脉血栓栓塞性疾病,且亦常用于其它静脉血栓性疾病如深部静脉血栓等。血管内皮细胞是一种多功能细胞,它不仅具有抗凝功能,而且也参与促凝,血管内皮细胞在受到冷、热、电流、缺氧等多种理化因素刺激下,均可释放血小板活化因子(Platelet Activating Factor, PAF)^[1], PAF是一种对磷脂酶A₂(PLA₂)敏感的,与花生四烯酸(AA)代谢密切相关的脂质介质,是迄今发现体内最强的血小板聚集剂。PAF与血小板、白细胞和血管内皮细胞的相互作用,在血栓形成过程中起着重要作用。已有实验材料证明:补阳还五汤具有抑制ADP和胶原诱导的血小板聚集,促进血栓溶解^[2];防止血栓形成^[3]。但其对大鼠实验性静脉血栓形成前后静脉血中PAF含量的影响,国内外尚未见报道。本文利用大鼠实验性静脉血栓模型,探讨补阳还五汤对实验性静脉血栓形成前后静脉血中PAF含量的影响。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠,体重 220g~320g,由北京医科大学实验动物科学部提供。

1.2 药物与试剂 按《医林改错》原方所载的药味和配方比例,按文献每钱以 3g 换算^[4],(生黄芪 120g,当归尾 6g,赤芍 4.5g,地龙、桃仁、红花、川芎各 3g),于北京同仁堂药店购得饮片,经北京医科大学药学院生药教研室蔡少青博士鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao;地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (Perrier);桃仁为蔷薇科植物桃仁 *Prunus persica* (Linn.) Batsch;赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.;当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels;川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.;红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.。按文献方法^[5]制备补阳还五汤注射液(3.6g 生药/ml)和水煎液(3.2g 生药/ml 和 1.6g 生药/ml);地塞米松注射液(中国连云港东风制药总厂);地塞米松片(山西大同市生物化学制药厂);PAF 标准品(sigma);明胶(serva);肌酸磷酸(CP, Serva);肌酸磷酸激酶(CPK,中国科学院上海生化所);阿斯匹林(ASA,北京朝阳门药品分装厂);小牛血清白蛋白(BSA,北京红星生化技术公司);PLA₂(sigma);银杏苦内脂

B(浙江宁波立华制药有限公司)。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 MPG-3D 型多能双通道血液凝聚仪(上海高机应用技术研究所以)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 用随机数字表法,按动物体重随机分为 3 组。静脉给药 1 次;用药组舌下静脉注射补阳还五汤注射液(18g/kg);对照组注射地塞米松注射液(2.5mg/kg);空白组注射等体积的生理盐水(5ml/kg)。灌服给药(1 次和 1 次×14d):用药组灌服补阳还五汤水煎液(32 和 16g/kg);对照组灌服地塞米松片溶液(1 和 0.5mg/kg);空白组灌服等体积蒸馏水(10ml/kg)。

静脉注射药物 30min 后或末次灌服药物 2h 后,按文献方法^[6]复制实验性静脉血栓模型。在复制实验性血栓模型前后取静脉血 1ml,作实验性血栓形成前后静脉血中 PAF 含量测定^[7~8]。

2.2 提取 PAF 的鉴定 参照 Bcnvcniste 法^[9]①PLA₂ 处理:将标准品 PAF 及提取物分别与 PLA₂ 温育(10μg/ml, 37℃, 30min),再观察对家兔洗涤血小板的聚集作用,②TLC:将标准品 PAF 和提取物在同一硅胶 G 板上点样展开(展开剂为氯仿:甲醇:水, 70:35:7),碘蒸气显色以确定 Rf 值,并将标准品和提取物同一 Rf 值组分刮下,经重新提取后观察致血小板聚集效应。③阻断 ADP (CP1mM, CPK10U/ml) 和 AA/TXA₂ (ASA0.1mM)介导的聚集途径后,观察标准品 PAF 和提取物对家兔洗涤血小板的聚集反应。④特异性 PAF 受体拮抗剂银杏苦内脂 B 处理:于血小板悬液中加入 0.1mM 银杏苦内脂 B,37℃温育 20min 后,观察对加入标准品 PAF 及提取物的聚集反应。

2.3 统计分析 所有资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用单因素方差分析(F 检验),两两比较用 q 检验;血栓形成前后的 PAF 含量比较用配对 t 检验,血栓形成百分率的比较

用多个样本率比较的 χ^2 检验。

3 结果与分析

3.1 补阳还五汤对实验性静脉血栓形成前后静脉血中 PAF 含量的影响,见表 1。

表 1 补阳还五汤对实验性静脉血栓形成前后静脉血中 PAF 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	给药途径 与时间	剂量 (g/kg)	PAF 含量(ng/ml)	
			血栓形成前	血栓形成后
补阳还五注射液	iv	18	3.04±1.68	2.69±1.25
地塞米松注射液	×1d	2.5×10 ⁻³	2.67±1.91	3.09±1.24
生理盐水	—	—	3.16±1.03	3.51±1.92
补阳还五汤	ig	32	1.72±0.67	1.51±0.84
地塞米松片溶液	×1d	1.0×10 ⁻³	1.63±0.63	2.04±0.50
蒸馏水	—	—	1.58±0.69	2.08±0.96
补阳还五汤(11)	ig	16	1.52±1.26	1.77±1.45*
地塞米松片溶液	×14d	0.5×10 ⁻³	1.09±1.28	0.70±1.25**
蒸馏水(11)	—	—	1.57±1.21	3.15±1.06 ^Δ

注:与蒸馏水组比较 * P<0.05, ** P<0.01;

血栓形成前后比较^ΔP<0.05, () 内为动物数,其余每组均为 10 只(下表同)

地塞米松片溶液长期给药组大鼠体重增长缓慢,明显低于补阳还五汤组和蒸馏水组(P<0.01),补阳还五汤无论灌服还是静注对生理状态下大鼠静脉血中 PAF 含量均无明显影响;但静脉血栓形成后补阳还五汤长期灌服给药可明显降低静脉血中 PAF 含量,而静脉给药和 1 次灌服给药对血栓形成后静脉血中 PAF 含量影响不明显。

3.2 补阳还五汤对实验性静脉血栓形成百分率和静脉血栓重量的影响,见表 2。

表 2 补阳还五汤对实验性静脉血栓形成百分率和血栓重量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	血栓干重 (mg)	血栓-体重指数 (mg/100g·w)	血栓形成百分率(%)
补阳还五注射液	2.06±1.52*	0.73±0.56*	80
地塞米松注射液	2.25±1.62*	0.79±0.58*	90
生理盐水	4.06±1.83	1.47±0.65	90
补阳还五汤	3.22±2.55	1.16±0.98	80
地塞米松	4.01±3.20	1.41±1.05	90
蒸馏水	3.84±3.09	1.34±1.04	90
补阳还五汤(11)	1.88±1.99*	0.66±0.70*	54.6*
地塞米松	1.32±1.55*	0.62±0.74*	60.0*
蒸馏水(11)	3.74±2.01	1.38±0.80	90.9

注:给药途径与剂量同前

表2可知:补阳还五汤静脉给药和长期灌服给药均可明显降低静脉血栓的干重和血栓-体重指数,而1次灌服给药作用不明显;长期灌服给药可明显降低静脉血栓形成百分率,但静脉给药和1次灌服给药对静脉血栓形成百分率无明显影响。

3.3 提取的 PAF 的鉴定 ①PLA₂ 处理:提取物和标准品 PAF 和 PLA₂ 温育后致血小板聚集能力明显降低。②TLC:用硅胶 G 板展开法显示 PAF 的 Rf 值为 0.34,提取物与标准品 PAF 的 Rf 值一致,在 Rf 值 0.34 处刮下的组分经重新萃取后仍有致血小板聚集活性。③ASA 及 CP/CPK 处理:血小板悬液经阻断 AA/TXA₂ 和 ADP 介导的聚集途径,PAF 和提取物仍有致聚活性。④银杏苦内脂 B 处理:0.1mM 银杏苦内脂 B 能完全抑制 6ng/mlPAF 的致聚活性,同样加入提取物后也不发生聚集反应。

4 讨论

1972 年 Benveniste J 首次报道 PAF 以来^[10],现已知多种致炎因子,如机械、电流等物理刺激;组胺、白三烯等化学性刺激;低氧状态等均可使白细胞、血小板、血管内皮细胞等释放 PAF^[3],PAF 是迄今发现的体内最强的血小板聚集剂,其引起的体外经洗涤人血小板聚集的浓度仅为 ADP 的 1/500,AA 的 1/100^[11],其诱导的血小板聚集过程,不依赖于 ADP 或 AA 的代谢产物 TXA₂,因而被认为是诱导血小板聚集的第三条途径^[12]。

本文应用结扎下腔静脉复制实验性静脉血栓模型,观察补阳还五汤对血液中 PAF 含量的影响。结果表明:补阳还五汤对实验性静脉血栓形成前血液中 PAF 含量均无明显影响,表明补阳还五汤对生理状态下大鼠血液中 PAF 代谢无明显影响;但对静脉血栓形成后血液中 PAF 含量有明显的降低作用,尤以长期灌服给药作用明显;且明显降低静脉血栓形成百分率,降低静脉血栓的干重和血栓-体重指数,表明补阳还五汤对预防静脉血栓

性疾病的发生和发展具有一定的作用。本研究结果说明,对于中药复方的应用应针对病理机制、强调辩证施治,体现祖国医学“谨守病机,各司其属”的治疗观点。

国外目前对 PAF 拮抗剂的研究,多从特异的结构上或天然植物中分离活性成分入手;而国内仅仅观察了川芎、海风藤、款冬花等单味中药对 PAF 的拮抗作用^[13],从整体水平观察中药复方对 PAF 代谢的拮抗作用尚为空白。虽然在众多植物来源药物中寻找和发现新的 PAF 拮抗剂有着诱人的前景,但从治疗血栓性疾病行之有效的中药传统复方中发掘抗 PAF 的方剂,从整体动物水平观察中药复方对 PAF 的拮抗作用,将更能体现祖国医学整体观念的思想,因此本文的研究在这方面作了有益的尝试。

参考文献

- 1 Braquet P, Touqui L, Shen TY, et al. Perspectives in Platelet-activating Factor Research. *Pharmacol Rev*, 1987, 39(2):97~145
- 2 李安国,贺石林,邓常青,等.补阳还五汤对血管壁抗血栓功能的影响. *中西医结合杂志*, 1989, 9(9):545~547
- 3 贺石林,彭延古,李安国,等.补阳还五汤对血液凝固影响的实验研究. *湖南中医学院学报*, 1989, 9(4):212~214
- 4 许济群,王绵之主编. *方剂学*. 上海:上海科学技术出版社,1990,14~15
- 5 陈奇,邓文龙,张世玮,等. *中药药理研究方法学*. 北京:人民卫生出版社,1994. 67~68
- 6 李仪奎,王钦茂. *中药药理实验方法学*. 北京:人民卫生出版社,1993. 145~146
- 7 张敏,黎鳌,杨宗诚,等.PAF 在兔烟雾吸入伤中的致伤作用及粉防己碱的防治作用. *中华实验外科杂志*, 1993, 10(4):156~157
- 8 刘宝军,郑茂荣,李少华,等.氮芥和地塞米松对人角朊细胞 PAF 的抑制作用. *中华皮肤科杂志*, 1994, 27(1):10~12
- 9 Benveniste J. *Advances in prostaglandin thromboxane and leukotriene research*. vol 19. New

- York; Raven Prss, Ltd, 1989. 355~358
- 10 Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets; The role of IgE basophils and a platelet-activating factor. *J Exp Med*, 1972, 136(6):1356~1377
- 11 Amstead WM, Pourcyrous M, Mirro R, et al. Platelet activating factor: A potent constrictor of cerebral arteries in newborn pigs. *Circ Res*, 1988, 62:1~7
- 12 Joseph R, Welch KMA, D' Andrea G, et al. Platelet-Activating Factor and Red Blood Cells. *Thromb Res*, 1989, 53:629~633
- 13 史玉俊. 植物中的抗血小板活化因子成分. 国外医药. 植物药分册, 1990, 5(4):146~149
- (收稿:1997-12-24)