

水蛭免加热提取物对高凝动物模型凝血系统及血小板聚集率的影响

张强宗, 刘俊田*, 史小莲, 李静莉
(西安交通大学医学院药理学教研室, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 观察水蛭免加热提取物对鞣花酸所致高凝动物模型凝血系统及血小板聚集率的影响。方法: 动物灌胃给药, 小鼠尾静脉注射鞣花酸制造高凝动物模型, 以剪尾法测定出血时间(BT); 眼球采血, 玻片法测定凝血时间(CT)。大鼠舌下静脉注射鞣花酸, 腹主动脉采血, 用试剂盒测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT), PT 法测定凝血因子 II 的活性, 按吴氏法测定循环血小板聚集率。结果: 水蛭免加热提取物能延长高凝模型小鼠的 BT、CT 和高凝模型大鼠的 PT、APTT, 抑制凝血因子 II 的活性, 降低血小板聚集率。结论: 水蛭免加热提取物对高凝模型动物具有抗凝血、抗血小板聚集作用。

[关键词] 水蛭免加热提取物; 高凝动物模型; 凝血因子; 血小板聚集率

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)05-0047-03

Effect of non-heating Leech Extract on Coagulation System and Platelet Aggregation in the Animal Model with Blood Hypercoagulable State

ZHANG Qiang-zong, LIU Jun-tian, SHI Xiao-lian, LI Jing-li

(Department of Pharmacology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Shaanxi Xi'an 710061)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of non-heating leech extract on coagulation system and platelet aggregation in the model of blood hypercoagulable state induced by ellagic acid in mice and rats. **Methods:** The model of blood hypercoagulable state was established by intravenous injection of ellagic acid in mice and rats. Bleeding time(BT), clotting time(CT), prothrombin time(PT), active part thrombin time (APTT), activity of coagulation factor II and platelet aggregation were examined to observe the effect of non-heating leech extract on coagulation system and platelet aggregation after oral administration. **Results:** Non-heating leech extract was able to prolong BT and CT in the model mice, PT and APTT in the model rats and to decrease activity of coagulation factor II and platelet aggregation in the model rats. **Conclusion:** Non-heating leech extract produces anticoagulant and antiplatelet aggregation actions in the animal model of blood hypercoagulable state.

[Key words] Non-heating leech extract; Animal model of blood hypercoagulable state; Coagulation factor; Platelet aggregation

水蛭具有破血、逐瘀、通经等药理作用。水蛭各种工艺的提取物及与其它中药构成的方剂, 在临床上广泛用于脑血栓、冠心病等的治疗, 是中药开发中的一个热点。本实验应用我室最近建立的高凝动物

模型^[1], 观察了水蛭免加热提取物对凝血系统及血小板聚集率的影响, 以期为临床应用提供进一步的理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 ICR 品系小鼠, 体重 18~22g, 雌雄兼用。SD 品系大白鼠, 体重 200~250g, 雌雄兼用, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

[收稿日期] 2005-02-03

[通讯作者] 刘俊田, Tel: (029) 82655188

1.2 实验药品 水蛭免加热提取物为环节动物蛭纲水蛭科宽体金线蛭 (*Hirudo nipponica* Whitman) 的市售干品,经免加热工艺提取得到黄褐色粉末,每克相当于原生药 4.15g,由厦门今润医药科学有限公司提供。肝素钠注射液,上海生物化学制药厂生产,批号 030501。

1.3 试剂 鞣花酸(ellagic acid),美国 Sigma 公司生产,批号 022K15831。将鞣花酸溶于 1mol/L 的氢氧化钠溶液中,再用 1mol/L 的盐酸溶液将其 pH 值调至 7.4 左右,最后用生理盐水定容。凝血酶原时间(prothrombin time, PT)试剂盒,上海太阳生物技术公司生产,批号 N06。活化部分凝血活酶时间(active part thrombin time, APTT)试剂盒,上海太阳生物技术公司生产,批号 LH009。乏因子 II 血浆试剂盒,美国太平洋公司生产,批号 2000-103。

1.4 实验仪器 培康 PK-B(1) 双通道血凝分析仪,中山市培康医疗电子有限公司生产。LXJ-64-01 型离心机,北京医疗仪器修理厂生产。H.H.S 型电热恒温水浴锅,上海医疗仪器总厂生产。

2 实验方法

2.1 水蛭免加热提取物对小鼠出血时间(BT)和凝血时间(CT)的影响 ICR 小鼠 60 只,体重 18~22g,随机分为 6 组,每组 10 只。正常对照组给等容积生理盐水;模型对照组只给一次鞣花酸;阳性对照组给肝素 1500u/kg;水蛭免加热提取物分别给 1.43g 生药/kg 2.86g 生药/kg 5.72g 生药/kg。肝素腹腔注射 1 次,水蛭免加热提取物灌胃给药,0.2mL/10g,每日 1 次,连续 3d。末次给药后 60min(肝素腹腔注射后 30min)和模型对照组一起,尾静脉注射 0.1% 的鞣花酸 0.15mL/10g。5min 后,用利剪将小鼠距尾尖 3mm 处剪断,待血液自行流出开始记时,每隔 30s 用滤纸吸去血滴一次,直至血流停止(以滤纸吸至无血迹时为准),此段时间为 BT。BT 最长观察 60min,超过 60min 继续出血者按 60min 计算^[2]。

尾静脉注射鞣花酸 5min 后,同时用弯镊迅速摘去一侧眼球,于载玻片两端各滴一滴血,直径 5mm。立即启动秒表,每隔一定时间用清洁针头自血滴边缘向里轻轻挑动 1 次,观察有无血丝挑起。从血液滴于载玻片表面开始至挑起血丝为止,所历时间即为 CT。CT 最长观察 30min,超过 30min 不凝固者按 30min 计算^[3]。

2.2 水蛭免加热提取物对大鼠 PT、APTT 的影响

SD 大鼠 48 只,体重 200~250g,随机分为 6 组,每组 8 只。正常对照组给等容积生理盐水;模型对照组只给一次鞣花酸。阳性对照组给肝素 1000u/kg;水蛭免加热提取物分别给 1g 生药/kg 2g 生药/kg 4g 生药/kg。肝素腹腔注射 1 次,水蛭免加热提取物灌胃给药,1mL/100g,每日 1 次,连续 3d。末次给药后 60min(肝素腹腔注射后 30min)和模型对照组一起,戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射麻醉。按 1.05mL/100g 舌下静脉注射 0.1% 的鞣花酸溶液。5min 后大鼠腹主动脉采血(3.8% 的枸橼酸钠抗凝,抗凝剂与全血之比为 1:9),立即以 3000r/min 离心 10min 分离血浆。用双通道血凝分析仪测定 PT、APTT。

2.3 水蛭免加热提取物对大鼠血浆 II 因子活性和血小板聚集率的影响 大鼠分组、给药及模型制造方式同 2.2。同法大鼠腹主动脉采血,分离血浆。按试剂盒说明,采用 PT 法用双通道血凝分析仪测定 II 因子活性。

另用 2 支 5mL 注射器腹主动脉采血,其中一支内含 2mL EDTA/福尔马林缓冲液,另一支内含 2mL EDTA 缓冲液。小心排去气泡,用另一支空注射器从插管抽得少量血液后,取下此注射器,并将含有上述液体的 2 个注射器顺次接在针头上直接从血管中采血 0.5mL,注射器抽入少量空气,在 30s 内将每个注射器同时翻转 4 次,使血液和缓冲液充分混匀。弃去注射器乳头部血液,将余下血液(2.4mL 左右)分别注入塑料试管内,室温下静置 15min。以 150r/min 离心 8min 分离 PRP,分别计数 EDTA/福尔马林缓冲液及 EDTA 缓冲液的 PRP 的血小板数量。结果以血小板聚集率表示,计算方法:血小板聚集率(%) = (1 - EDTA 福尔马林血小板数)/EDTA 血小板数^[4]。

2.4 数据处理与统计分析 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 水蛭免加热提取物对高凝模型小鼠 BT 和 CT 的影响(见表 1)

3.2 水蛭免加热提取物对高凝模型大鼠 PT 和 APTT 的影响(见表 2)

3.3 水蛭免加热提取物对高凝模型大鼠血浆 II 因子活性和血小板聚集率的影响(见表 3)

4 讨论

一个世纪前 Virchow 等提出血管壁异常、血流异常、血液成分改变是血栓形成的三要素。因此当内

表 1 水蛭免加热提取物对高凝模型小鼠 BT 和 CT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (/kg)	BT (min)	CT (min)
正常对照组	-	9.41 ± 1.18 ³⁾	1.20 ± 0.09 ¹⁾
模型对照组	-	5.24 ± 0.94	1.04 ± 0.14
肝素	1500u	58.8 ± 3.77 ³⁾	29.55 ± 0.63 ³⁾
水蛭免加热提取物大剂量组	1.43g	6.42 ± 0.37 ³⁾	3.45 ± 0.27 ³⁾
水蛭免加热提取物中剂量组	2.86g	6.03 ± 0.48 ¹⁾	2.78 ± 0.48 ³⁾
水蛭免加热提取物小剂量组	5.72g	5.84 ± 0.44	2.00 ± 0.25 ³⁾

与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (下同)。

表 2 水蛭免加热提取物对高凝模型大鼠 PT 和 APTT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (/kg)	PT (s)	APTT (s)
正常对照组	-	13.3 ± 0.9 ³⁾	29.6 ± 1.3 ³⁾
模型对照组	-	7.7 ± 0.9	23.9 ± 2.4
肝素	1000u	28.5 ± 2.1 ³⁾	49.3 ± 1.6 ³⁾
水蛭免加热提取物大剂量组	1g	20.3 ± 1.6 ³⁾	41.9 ± 2.7 ³⁾
水蛭免加热提取物中剂量组	2g	18.2 ± 1.2 ³⁾	38.6 ± 2.5 ³⁾
水蛭免加热提取物小剂量组	4g	16.4 ± 0.8 ³⁾	34.6 ± 1.4 ³⁾

表 3 水蛭免加热提取物对高凝模型大鼠血浆 II 因子活性和血小板聚集率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (/kg)	II 因子活性 (%)	血小板聚集率 (%)
正常对照组	-	97.2 ± 2.6 ¹⁾	17.3 ± 3.8 ³⁾
模型对照组	-	101.3 ± 3.4	27.1 ± 6.3
肝素	1000u	30.4 ± 5.5 ³⁾	15.1 ± 3.0 ³⁾
水蛭免加热提取物大剂量组	1g	43.9 ± 4.1 ³⁾	20.0 ± 3.5 ¹⁾
水蛭免加热提取物中剂量组	2g	62.5 ± 5.3 ³⁾	26.4 ± 3.6
水蛭免加热提取物小剂量组	4g	70.0 ± 6.9 ³⁾	33.0 ± 3.9

源性或外源性凝血系统活化、血液处于高凝状态时,很容易形成血栓甚至进一步发生弥漫性血管内凝血。基础和临床实验均表明重要脏器血栓栓塞性患者其血液是高凝的。血液高凝状态临床常以血瘀证为表现,因此可模拟“暴怒”、“寒邪”复制出黏、浓、凝、聚血瘀状态。但亦有无血瘀表现者,因此用血瘀证模型去评价抗凝血药物与临床实际还有一定的差距,需要一种稳定的模拟临床高凝状态的动物模型^[5]。本室将一定量鞣花酸静脉注射于小鼠,由于鞣花酸可激活内源性凝血系统和升高血小板聚集率,从而复制出血液高凝状态动物模型,试验证明该

模型具有一定的稳定性^[1]。

BT 的长短与毛细血管功能、组织收缩能力、组织因子、血小板的数量与功能、纤溶等因素有关,其中影响最大的是血小板和毛细血管功能。CT 的长短主要与各种凝血因子的含量和功能及抗凝血因子的活性有关。PT、APTT 分别是反映外源性和内源性凝血系统功能最常用的指标,当血液处于高凝状态时二者均缩短。无论内源性还是外源性凝血系统最终都通过激活凝血因子 II,使纤维蛋白原变为纤维蛋白,从而发生凝血。血小板通过提供磷脂表面,促进凝血进程,检测其聚集率的变化可反映血液的凝固改变及药物的抗血栓作用。由本实验的结果可见,水蛭免加热提取物可降低高凝模型动物凝血因子 II 的活性,延长 CT、BT、PT 和 APTT,降低血小板聚集率,说明具有抗凝作用。水蛭免加热提取物通过降低高凝动物模型 II 因子活性,降低血小板聚集率,抑制内源性和外源性凝血系统,降低血液高凝状态,可能是其抗血栓形成的重要机理之一。

已有实验表明^[6,7],水蛭免加热提取物在抑制大鼠静脉血栓形成、延长小鼠 CT 方面优于水提物。随着对水蛭药理作用研究的不断深入,免加热提取物将由于其制作工艺的优越性,在临床上会越来越广泛的用于血栓栓塞性疾病的预防与治疗,具有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] 张强宗,刘俊田,史小莲,等.一种新的抗凝血药物筛选模型的建立[J].血栓研究,待发表.
- [2] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991.503.
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993.483-484.
- [4] Wu kk, Hoak Jc. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency[J]. Lancet, 1974, 2(7886): 924-926.
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993.564.
- [6] 史小莲,刘俊田,李西宽,等.水蛭免加热提取物抗凝血作用及其机制研究[J].山东中医杂志,2003,22(11): 687-690.
- [7] 史小莲,刘俊田,李西宽,等.水蛭免加热提取物抗凝血及抗血栓作用[J].中药新药与临床药理,2004,15(2): 95-97.