维普资讯 http://www.cqvip.com

灯盏细辛有效部位对中性粒白细胞与血小板之间粘附和聚集的影响*

沈志强[1] 吴兰鸥[1] 陈植和[1] 刘吉开[2]

(1. 云南省天然药物药理重点实验室,昆明医学院 昆明 650031;
2. 中科院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘 要 采用 Peter 等方法评价灯盏细辛有效部位注射液对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的作用;应用玫瑰花结试验和 Born 氏法观察本品对大鼠中性粒细胞与血小板之间粘附和聚集的影响以探讨其抗血栓作用的细胞机制。结果表明,本品 50 mg/kg 使血栓形成时间从对照组的 17.7±0.8 min 延长到 35.7±2.6 min($P<0.05$);显著降低凝血酶激活的中性粒细胞与血小板间的粘附率,其 IC_{50}为 61.4 mg/L,且明显抑制激活的中性粒细胞或其上清液引起的血小板聚集,其 IC_{50}分别为 0.97 和 2.1 g/L,提示灯盏细辛有效部位具有较强抗血栓作用,其原理可能与抑制中性粒细胞与血小板之间的相互作用有关。

关键词 灯盏细辛;中性粒细胞;血小板;粘附;血小板聚集;血栓形成

灯盏细辛又名灯盏花,是菊科飞蓬属植物,灯盏花注射液(*Breviscapin* injection)是从灯盏细辛中提取的有效部位,主要含灯盏花总黄酮及其它水溶性有效部位,代表性成分为灯盏乙素,其结构式为 4,5,6-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸甙[1],现临床多用于治疗心脑血管缺血性疾病,晚近关于其抗血栓机制的研究大多侧重探讨其抗血小板活化作用。目前认为,血小板在血栓形成中只是因素之一,而中性粒细胞与血小板之间的相互作用在血栓形成与发展中的地位倍受关注[2],这为新作用机制抗栓药的研究开辟了新领域。本实验初步评价了本品对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响,并从细胞分子水平探讨其抗血栓形成的作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,由云南省天然药物药理重点实验室提供(合格证号:云卫动管 9805)。

1.2 药品及主要试剂

灯盏花注射液即灯盏细辛注射液,由昆明康普莱特制药有限公司提供,用前以生理盐水稀释,pH 值约 7.0。淋巴细胞分离液(比重 1.077)购自上海华精生物高科技有限公司。血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)和肉豆蔻佛波醇(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)均由 Sigma 公司提供。

1.3 仪器

电刺激仪(SEN-7203)、二道血流速度流量仪(DVM-4200 型)及 Olympus 像差显微镜均属日本生产;SH-93 型智能血液凝聚仪由上海生化仪器厂提供。

2 方法与结果

2.1 电刺激大鼠颈动脉血栓形成模型[3]

动物分 3 组,每组 6 只,即 0.9%生理盐水组,20 mg/kg 阿司匹林(Aspirin)组和 50 mg/kg 灯盏细辛组,各组动物均灌胃,给药 2 h 后用 2.0%戊巴比妥钠以 30 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,然后分离左颈总动脉,测定正常的血流量及血流速度,然后放置两根银制电极于血管两端,通以直流电刺激,并调电流 1.5 mA,连续刺激 7 min,同时于近头端测量血流量和速度。从刺激开始至血流量为零的时间为血栓形成时间(occlusion time, OT)。

50 mg/kg 的灯盏细辛使 OT 从对照组的 17.7±0.8 min 延长到 35.7±2.6 min,阿司匹林亦有显著作用(表 1)。

收稿日期:2000-03-13 修回日期:2000-06-21
* 云南省自然科学基金资助项目 No.98C066M
Project supported by Yunnan Natural Science Foundation No. 98C066M

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 灯盏细辛灌胃对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响

Table 1 Effect of *Breviscapin* injection on electrically-stimulated carotid arterial thrombosis in male rats

药液 Medicine	ρ(mg/kg)	栓塞时间(min)Occlusion time(min)
生理盐 Saline	—	17.7±0.8
灯盏细辛 *Breviscapin*	50	35.7±2.6*
阿司匹林 Aspirin	0	34.2±2.3*

n=6 雄性大鼠(rats),$\bar{x}\pm s$,* $P<0.05$ 与生理盐水比较。(Comparison with saline)

2.2 血小板制备

大鼠颈动脉取血,以 2.7% EDTA(做粘附试验)或 3.8%枸橼酸钠(做聚集试验)抗凝收集于塑料离心管中,血与抗凝剂体积比为 9∶1。室温以 1 000 r/min 离心 10 min 得富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP)。PRP 以 3 000 r/min 离心 10 min 得血小板团块。作粘附试验时,用含 1%小牛血清蛋白及 164 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤血小板 3 次,最后悬浮于上述含 1 mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS 中;作聚集试验时,血小板用 PBS 洗涤 3 次,最后悬浮于含 1 mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS 中。上述试验,血小板数控制在 10^8 cell/ml 左右,用胎盼兰排斥试验证实其成活率>95%。

2.3 中性粒细胞的制备

在上述吸出 PRP 后的抗凝血中,加入与 PRP 等体积的生理盐水,再加入 1/6 体积的 6%右旋糖酐(Dextran T 500)混匀。37 ℃静置 30 min,沉淀红细胞,将上层白细胞吸出轻浮于 3 ml 淋巴细胞分离液中,2 000 r/min 离心 30 min,取出底部中性粒细胞,加入 1 ml 双蒸水溶血 30 s,使红细胞破膜,再加 2 倍浓度的 PBS 1 ml,然后离心 10 min,中性粒细胞团块用 PBS 洗 3 次,最后悬浮于 Hanks 液中(溶媒组胞外含 1 mmol/L $CaCl_2$ 或 5 mmol/L EGTA 分别反应有钙或无钙的情况)并调数 2×10^6 cell/ml(作粘附试验)或 0.5×10^7 cell/ml(作聚集试验)并用胎盼兰排斥试验证实其成活率>95%。

2.4 玫瑰花结试验

改良 Hamburger[4]和 Jungi[5]等方法,即取 50 μl 血小板与凝血酶(0.2 U/L)37 ℃温育 15 min,然后分别加入 0.9%生理盐水或药液各 50 μl,继续静置 15 min,再加入中性粒细胞悬液 100 μl,于 4 ℃振荡 30 min。取出少许细胞悬液,在常规计数板上于 40 倍镜下随机计数 100 个中性粒细胞,其周围粘附有 2 个或 2 个以上血小板者为玫瑰花结试验阳性。每样本计数 3 次,取其均值,并计算花结形成百分率。

结果显示,胞外存在 1 mmol/L 的 $CaCl_2$ 或 5 mmol/L EGTA 时,溶媒组用凝血酶激活的血小板与中性粒细胞之间形成的玫瑰花结比率分别为 65.4%和 11.8%。在胞外含 1 mmol/L Ca^{2+} 时,灯盏细辛和阿司匹林均显著降低粘附率,其 IC_{50} 各为 61.4 和 16.6 mg/L(表 2、3)。

表 2 灯盏细辛对凝血酶(0.2 U/L)激活的大鼠血小板与中性粒细胞间粘附的影响

Table 2 Effect of *Breviscapin* on the binding of thrombin-stimulated platelets to leukocytes in rats

药液 Medicine ρ(mg/L)	粘附率(%)Adhesion rate(%)
对照 Control	65.4±6.4
25	51.3±3.7
50	33.4±3.2*
100	21.6±2.1**
200	14.6±2.3**

n=5 大鼠(rats),$\bar{x}\pm s$,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与对照组生理盐水比较。(Comparison with saline)

表 3 阿司匹林对凝血酶(0.2 U/L)激活的大鼠血小板与中性粒细胞间粘附的影响

Table 3 Effect of aspirin on the binding of thrombin-stimulated platelets to leukocytes in rats

药液 Medicine ρ(mg/L)	粘附率(%)Adhesion rate(%)
对照 Control	65.4±6.4
6.75	52.3±3.4
13.5	27.9±3.1*
27.0	17.7±1.6**
54.0	13.7±2.5**

n=5 大鼠(rats),$\bar{x}\pm s$,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与对照组生理盐水比较。(Comparison with saline)

2.5 血小板聚集性测定

2.5.1 激活的中性粒细胞上清液引起的血小板聚集

用 fMLP(2 μmol/L)或 PAF(1 μmol/L)于 37 ℃激活中性粒细胞 10 min,悬液再以 5 000 r/min 离心 1 min 得无细胞的中性粒细胞释放物质的上清液。将溶媒或不同浓度待测药液与洗涤血小板悬液于 37 ℃共同温育 10 min,然后加入 3 μl 中性粒细胞上清液并按 Born 氏比浊法[6]记录 5 min 内最大聚集率。

灯盏细辛明显抑制 fMLP 或 PAF 激活的中性粒细胞上清液引起的血小板聚集,IC_{50}分别为 0.97 和 2.1 g/L;阿司匹林在大于 540 mg/L 时亦无此效应(表 4)。

2.5.2 激活的中性粒细胞引起的血小板聚集

取 100 μl 上述 10^8 cell/L 血小板与 100 μl 0.5×10^7 cell/ml 中性粒细胞混合成 200 μl 的细胞悬液(含

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 mmol/L Ca^{2+})，搅拌下 37 ℃温育 2 min。将溶媒或药液加入上述混合液中作用 5 min，再加入 fMLP(2 μmol/L)，同上观察血小板聚集的变化。

表 4 灯盏细辛对 fMLP 或 PAF 激活的中性粒白细胞上清液引起血小板聚集的影响

Table 4 Effects of *Breviscapin* on platelet aggregation stimulated by the supernatant of fMLP(2 μmol/L)-or PAF(1 μmol/L)-activated leukocytes in rats

药液 ρ(g/L)	肉豆蔻佛波酯(fMLP)	血小板活化因子(PAF)
对照 Control	51.2±2.3	52.1±1.3
0.375	48.0±1.9	48.6±2.1
0.75	30.6±2.9*	40.0±1.2*
1.5	18.6±4.2**	25.6±3.6**
3.0	3.4±1.1**	16.2±1.5**

n=5 大鼠(rats)，$\bar{x}\pm s$，* $P<0.05$，** $P<0.01$ 与对照组生理盐水比较。(Comparison with saline)

从表 5 可见，灯盏细辛明显抑制 fMLP 刺激中性粒细胞直接引起血小板聚集作用，其 IC_{50} 为 1.1 g/L，而 540 mg/L 的阿司匹林则无作用。

表 5 灯盏细辛对 fMLP 激活的中性粒白细胞直接引起血小板聚集的影响

Table 5 Effects of *Breviscapin* on platelet aggregation stimulated by fMLP-activated leukocytes in rats

药液 ρ(g/L)	血小板聚集率(%)Platelet aggregation(%)
对照 Control	67.4±1.7
0.375	63.6±2.9
0.75	43.2±3.9*
1.5	26.6±1.7**
3.0	16.8±1.9**

n=5 大鼠(rats)，$\bar{x}\pm s$，* $P<0.05$，** $P<0.01$ 与对照组生理盐水比较。(Comparison with saline)

5 讨论

以往认为，血栓栓塞性疾病的病理生理过程主要涉及血小板数量和功能。晚近研究表明，血栓形成是由包括血小板、白细胞及内皮细胞等多细胞间相互作用所致[2]，因此有必要从多细胞多因子去探讨血栓的形成与发展，以阐明药物作用的新机制。国内就灯盏细辛的药理研究基本侧重其对血小板活化这一单一因素的探讨。本研究从白细胞与血小板之间的粘附和聚集等相互作用阐明了灯盏细辛具有较强抗血栓栓塞性疾病的细胞分子作用机制。

电刺激大鼠颈动脉所形成的血栓和人体动脉血栓相似。采用超声血流量仪替代点式温度计来判断 OT，则排除了室温的影响，其结果更精确可靠。灯盏细辛 50 mg/kg 明显延长动脉 OT，效果与 20 mg/kg 阿司匹林相当，表明灯盏细辛具有较强的抗动脉血栓形成作用，与文献报道灯盏细辛在其它血栓模型中的防治作用一致[7,8]。

本实验结果表明，灯盏细辛显著降低凝血酶激活的血小板与白细胞间的粘附率，提示灯盏细辛的抗栓作用与其抑制该两细胞间的粘附作用密切相关。在细胞外存在 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 时溶媒组的粘附率为 65.4%，而胞外含有 5 mmol/L 的 EGTA 时，则粘附率仅为 11.8%，说明激活的血小板与白细胞间的粘附是钙离子依赖性的，同时揭示灯盏细辛抑制二细胞间的粘附可能与阻抑血小板或白细胞内的钙动员有关。心肌梗塞患者的血循环中血小板-白细胞花结明显增加，加重梗塞程度的范围[9]，灯盏细辛能显著减少花结形成，显然为其防治缺血性心脑血管等疾病提供了又一科学依据。

白细胞通过释放的活性物质或与血小板直接接触引起血小板活化聚集。目前认为 fMLP 激活白细胞释放的组织蛋白酶 G、弹性蛋白酶和氧自由基等可引起血小板 5-羟色胺释放、内钙动员及花生四烯酸的代谢(如血栓素的产生)，其中以组织蛋白酶 G 的作用为主[10]。PAF 激活白细胞后，除上述物质产生外，尚有 PAF 释放。灯盏细辛对 fMLP 和 PAF 激活的白细胞所引起的血小板聚集均有显著抑制作用，表明其对上述物质的释放或生物效应均有不同程度的阻抑作用；与 fMLP 激活的白细胞相比，灯盏细辛对 PAF 的作用要弱，提示灯盏细辛抑制白细胞引起的血小板聚集的作用不仅与 PAF 有关，更与组织蛋白酶 G 有关。

灯盏细辛明显抑制 fMLP 激活的白细胞直接引起的血小板活化(fMLP 本身并不能激活血小板[11])，说明其在一定程度上抑制了白细胞的活化而因此阻抑了血小板的聚集。这种抑制多种细胞活化作用对血栓栓塞性疾病的防治是十分有利的。

与灯盏细辛不同的是，阿司匹林即使浓度高于 3 mmol/L 对 fMLP 或 PAF 激活的白细胞引起的血小板聚集均无明显作用，表明激活的白细胞或其上清液诱导血小板活化并不直接以花生四烯酸代谢通路介导，同时也揭示在现代血栓病的防治过程中，灯盏细辛有比阿司匹林更好的优越性。

本实验表明，灯盏细辛通过抑制白细胞与血小板间的粘附和聚集而发挥较强的抗血栓形成作用，这为其广泛用于缺血性心脑血管疾病提供了进一步的科学依据。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参考文献

1 国家医药管理局中药情报中心站. 植物药有效成分手册(第二版). 北京:人民卫生出版社,1986,946

2 Marcus AJ. neutrophiles inhibit platelet reactivity by multiple mechanisms: relevance to thromboregulation. J Lab Clin Med, 1990,116:138

3 Peter AC, Richard WF, Fiona B *et al*. Evaluation of a low molecular weight modulator of human plasminogen activator inhibitor-1 activity. Thrombosis and Haemostasis, 1996, 75: 808

4 Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophiles. Blood, 1990, 75:550

5 Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE *et al*. Platelet-leukocyte interactions: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes and related cell lines. Blood, 1986, 67:629

6 Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 1962, 194:927

7 赵佩琪,除济民,盛 净,等. 灯盏细辛对犬急性心肌梗塞时 AT-Ⅱ活性、tPA 和 PAI 的影响. 上海第二医科大学学报,1996,16:26

8 沈志强,雷伟亚,陈植和,等. 灯盏花总黄酮对血小板聚集和血栓形成的影响. 天然产物研究与开发,2000,12(1):23

9 Mullane KV, Rand N, Salmon JA *et al*. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anaesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by antiinflammatory drugs. J Pharmacol Exp Ther, 1984, 228:510

10 Oudinet JP, Sraer J, Bens M *et al*. Influence of polymorphonuclear leukocytes on the metabolism of arachidonate in human platelets. Thrombosis and Haemostasis, 1988, 60:59

11 Giovanni DG, Virgilio E, Grazyna R *et al*. Activated polymorphonuclear leukocytes stimulate platelet function. Thromb Res, 1990, Suppl Ⅺ:25

EFFECTS OF *BREVISCAPIN* ON LEUKOCYTE-PLATELET ADHESION AND PLATELET AGGREGATION STIMULATED BY ACTIVATED LEUKOCYTES

SHEN Zhi-qiang[1], WU Lan-ou[1], CHEN Zhi-he[1], LIN Ji-kai[2]

(1. *Yunnan Pharmacological Laboratories of Natural Products, Kunming Medical College*, Kunming 650031;
2. *Kunming Lastitute of Botany*, Knuming 650204)

Abstract Peter's method was used to evaluate the effect of *Breviscapin* in the model of electrically stimulated rat carotid arterial thrombosis; the effects of *Breviscapin* were investigated on leukocyte-platelet adhesion and platelet aggregation induced by activated leukocytes according to rosette assay and Born's method, respectively. The results showed that intragastric *Breviscapin* at 50 mg/kg prolonged the occlusion time from 17.7±0.8 min to 35.7±2.6 min($P<0.05$). *Breviscapin* significantly decreased the binding of thrombin-stimulated platelets to neutrophiles with an IC_{50} value of 61.4 mg/L. It markedly inhibited platelet aggregation stimulated by the supernatant of leukocytes or activated leukocytes. The IC_{50} values were 0.97 and 2.1 g/L, respectively. It is suggested that inhibition of *Breviscapin* on leukocyte-platelet interaction may contribute to its potent anti-thrombotic effects.

Key words *Breviscapin*; leukocytes; platelets; adhesion; platelet aggregation; thrombosis