维普资讯 http://www.cqvip.com

叶下珠有效部位对血栓形成的影响及其作用机制初探*

沈志强[1,2] 董泽军[1] 吴蓝鸥[2] 陈植和[2] 刘吉开[1**]

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

摘 要 采用 Born 方法和改良的 Hamburger 方法分别测定叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)含 corilagin 的有效部位(代号 PUW)在体内外对血小板聚集功能和对血小板与中性粒细胞之间粘附反应的影响;应用 Myers 方法评价 PUW 灌胃对小鼠尾静脉注射花生四烯酸(AA)引起猝死的保护作用;运用改良的 Charlton 方法及陈长勋等方法分别观察 PUW 灌胃对电刺激大鼠颈动脉血栓形成和下腔静脉血栓形成的影响;采用 Tomihisa 方法,观察 PUW 对大鼠尾尖出血时间的影响。结果显示,PUW 在体内外对 ADP、AA 或血小板活化因子(PAF)诱导的血小板聚集均无明显抑制作用;PUW 呈浓度依赖性明显阻抑 AA 激活的血小板与中性粒细胞之间的粘附反应,其半数抑制浓度(IC_{50})为 39.7 mg/kg。PUW(10、20 和 40 mg/kg)灌胃呈剂量依赖性显著减少 AA 致小鼠死亡的数量,明显延长电刺激大鼠颈动脉血栓形成时间,减轻大鼠下腔静脉血栓的干、湿重。20 mg/kg 的 PUW 对出血时间无明显影响,40 mg/kg 的 PUW 虽延长出血时间,但与阿司匹林(20 mg/kg)比较,出血时间明显缩短($P<0.05$)。本实验结果提示,PUW 灌胃在多种体内血栓模型中均具有明显的抗血栓形成作用,其机制可能与阻抑血小板和中性粒细胞之间的的粘附作用密切相关。

关键词 叶下珠;有效部位;血小板聚集;血小板;中性粒细胞;花生四烯酸;粘附反应;血栓形成;出血时间

叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)为大戟科一年生草本植物,作为一种传统的中草药常用来抗菌和抗病毒,民间主要用来治疗黄疸、肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿等症[1]。PUW 是从该植物中获得的水溶性有效部位(含 corilagin 60%以上)。Corilagin 在文献中被报道具有降血压和抗病毒作用[2~4],至于抗血栓活性在国内外均未见报道。血小板与血栓形成关系密切,而现代血栓形成新概念认为,血小板、中性粒细胞、血管内皮细胞之间的相互作用在血栓形成过程中起着重要作用[5]。因此,同时影响血小板及血小板与其它细胞间相互作用的抗血栓药物将更有价值。本研究着重研究了 PUW 的抗血栓作用,并从细胞分子生物学方面探讨其作用机制。

收稿日期:2002-10-05 修回日期:2002-11-22
*云南省自然科学基金资助项目(No:98C008Z)和科技部项目 2001CCC00600
Supported by projects 2001CCC00600 and Yunnan Natural Science Foundation(98C008Z)
**通讯联系人(Corresponding author)

1 材料

1.1 动物

健康家兔,体重 2~2.5 kg,由昆明医学院动物科提供;雄性 ICR 小鼠,体重约 25 g;健康成年 ICR 小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半;SD 大鼠,体重 250~300 g。上述动物均由云南省天然药物药理重点实验室动物室提供,合格证号:滇实动证字第 9805、9806 号。

1.2 试剂和药物

ADP 系瑞士进口分装,溶于磷酸盐缓冲液中,花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)均为 Sigma 公司产品。PAF 溶于含 0.25% BSA 的 Tris-NaCl 溶液中,pH 7.4。AA 溶于 100 mmol/L Na_2CO_3 溶液中。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。PUW 由本实验室按下列方法制备:取 20 公斤叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)全草(采自贵州),粉碎,用乙醇/水(1:1, V/V)提取三次,合并提取液,减压浓缩至干,得浸膏 4.1 kg。将浸膏

维普资讯 http://www.cqvip.com

用水溶解,通过大孔树脂,先用10%乙醇/水洗脱,再用25%乙醇/水洗脱,合并25%洗脱部分,减压浓缩至小体积,然后进行喷雾干燥得有效部位700 g,高压液相色谱分析含有效成分corilagin 60%以上。用前溶于0.9%的生理盐水中,并以100 mmol/L的Na_2CO_3调其pH值至7.0左右。阿司匹林结晶溶于50 mmol/L的Na_2CO_3溶液中,并用100 mmol/L的HCl将其pH值调至7.0。

1.3 主要仪器

SH-2智能血液凝聚仪(上海生化仪器厂);Olympus像差显微镜均属日本生产;电刺激仪(型号:SEN-7203,日本Nihon Kohden公司产品);超声血流量仪(型号:DVM-4200,日本Hayashi Denki公司生产)。

2 方法与结果

2.1 PUW对血小析聚集功能的影响

按文献方法[6],自清醒家兔颈动脉取血制备富血小板血浆(platelet rich plasma,PRP)和贫血小板血浆(platelet poor plasma,PPP)。体外试验采用Born比浊法[7],PRP先用不同浓度的药液孵育10 min,再加入ADP(3 μmol/L)、AA(0.35 mmol/L)或PAF(7.2 nmol/L),记录5 min内血小板的最大聚集率。体内试验,兔分3组,每组5只,即40 mg/kg PUW组,20 mg/kg阿司匹林组和等体积0.9%生理盐水组,上述各组份均灌胃给药。给药前自颈动脉取血一次,给药后30、60、120和240 min分别取血,同体外方法制备PRP和PPP,测定PUW在体内对血小板聚集性的影响。

结果显示,PUW无论在体外还是在体内对ADP、AA或PAF诱导的血小板聚集均无明显抑制作用(数据未提供)。

2.2 洗涤血小板的制备

自家兔颈动脉取血,同血小板聚集试验制备PRP,PRP继以3000 r/min离心10 min得血小板团块。用含1%小牛血清蛋白及1.4 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。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10%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,2000 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,最后悬浮于含1 mmol/L $CaCl_2$的Hanks液中,并调数2×10^6 cell/mL,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[8]等方法,即取50 μL血小板与100 μmol/L的AA 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,以反映粘附率大小。

结果表明,PUW和阿司匹林均显著降低粘附率,其IC_{50}各为39.7和9.3 mg/L(表1,2)。

表1 PUW对AA(100 μmol/L)激活的家兔血小板与中性粒细胞间粘附的影响

Table 1 Effect of PUW on the binding of arachidonic acid-stimulated platelets to leukocytes in rabbits

药浓 Medicine ρ(mg/L)	粘附率(%)Adhesion rate(%)
对照 Control	75.4±6.4
12.5	58.1±4.5
25	44.2±2.8*
50	32.7±3.1**
100	23.7±2.1**

$n=6$ 家兔(rabbits),$x\pm s$,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与对照组生理盐水比较(Comparison with saline).

表2 阿司匹林对AA(100 μmol/L)激活的家兔血小板与中性粒细胞间粘附反应的影响

Table 2 Effect of aspirin on the binding of arachidonic acid-stimulated platelets to leukocytes in rabbits

药浓 Medicine ρ(mg/L)	粘附率(%)Adhesion rate(%)
对照 Control	71.9±5.2
3.125	66.9±3.9
6.25	46.0±4.7**
12.5	29.0±1.2**
25	25.2±2.4**

$n=6$ 家兔(rabbits),$x\pm s$,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与对照组生理盐水比较(Comparison with saline).

2.5 PUW对花生四烯酸引起小鼠血栓的影响

小鼠禁食过夜,分成5组,每组15只。A组:

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.9%的生理盐水,B组:20 mg/kg 的阿司匹林,C-E组:分别为10、20和40 mg/kg 的PUW。上述组份均以0.1 mL/10 g体重灌胃,2次/d,共5次。末次给药后45 min,用Myers方法[9],即75 mg/kg花生四烯酸以5 μL/10 g体重于小鼠尾尖静脉注射。注毕后30 min内,计数各剂量组和对照组小鼠的存活数。数据以 χ^2 检验行统计学处理。

10、20和40 mg/kg PUW明显减少小鼠的死亡数,并具有较好的量效关系。20 mg/kg PUW组的动物死亡率与20 mg/kg阿司匹林组的相当(见表3)。

表3 PUW灌胃对小鼠尾尖静脉注射75 mg/kg花生四烯酸引起猝死的影响

Table 3 Protective effect of intragastric PUW against mouse sudden death induced by injection of 75 mg/kg arachidonic acid in tail vein

药物 Medicine	ρ (mg/kg)	死亡数/总数 Dead/Total	死亡率(%) Mortality(%)
生理盐水 Saline	——	12/15	80
PUW	10.0	8/15	53.3*
	20.0	5/15	33.3*
	40.0	4/15	20.7**
阿司匹林 Aspirin	20.0	5/15	33.3*

*$P<0.05$ 与生理盐水组比较(Comparison with saline);"死亡数"指注射花生四烯酸后30 min内死亡的动物数;"总数"指各组的动物总数。

2.6 PUW对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响

动物分成5组,每组8只。A组:0.9%的生理盐水作为对照组;B组:20 mg/kg的阿司匹林作为阳性对照;C-E组:10、20和40 mg/kg的PUW组。上述组份均以1 mL/100 g体重灌胃,2次/d,共5次。末次给药后45 min,用改良的Charlton方法[10],即分离大鼠左颈总动脉,置两根银制电极,超声探针置远心端。用电刺激器以1.5 mA的直流连续刺激大鼠颈动脉7 min。用超声血流量仪记录血栓形成时间(即从刺激开始至颈动脉血流量为"零"的时间,occlusion time,OT)。记录刺激开始后60 min内的血流量,如血管仍未栓塞,则以60 min作为最大血栓形成时间。

结果表明,10、20和40 mg/kg的PUW灌胃后,呈剂量相关性明显延长OT。20 mg/kg的PUW与等剂量的阿司匹林效果相当(表4)。

2.7 PUW对静脉血栓形成的影响

大鼠分为5组,每组10只。A组:0.9%的生理盐水组;B组:20 mg/kg的阿司匹林组;C-E组:10、20和40 mg/kg的PUW组。上述组份均以1 mL/100 g体重灌胃,2次/d,共5次。用陈长勋等方法[11]制作下腔静脉血栓模型。即于末次给药后45 min,用30 mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠。然后,沿腹中线打开腹腔,分离下腔静脉,在左肾静脉下方水平处结扎,并缝合腹腔,结扎1.5 h后,重新打开腹腔,取出下静脉腔中的血栓物质,置于平皿中称其湿重。然后,于烤箱内60 ℃烘烤20 h,称其干重。数据用 t 检验行统计学处理,比较组间显著性差异。

表4 PUW灌胃对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响

Table 4 Effect of intragastric PUW on electrically stimulated carotid arterial thrombosis in rats

药物 Medicine	ρ (mg/kg)	血栓形成时间 (min)Occlusion time(min)
生理盐水 Saline	—	17.7±0.8
PUW	10.0	27.0±2.6**
	20.0	35.0±2.6**
	40.0	39.0±3.6**#
阿司匹林 Aspirin	20.0	34.2±2.3**

$n=8$, $x\pm s$, **$P<0.01$ 与生理盐水组比较(Comparison with saline), #$P<0.05$ 与阿司匹林组比较(Comparison with aspirin)

结果显示,20和40 mg/kg的PUW明显减轻血栓的干、湿重(两剂量组之间无统计学差异),与20 mg/kg的阿司匹林组比较均无显著性差异($P>0.05$)。10 mg/kg的PUW对血栓的干、湿重均无明显影响(表5)。

表5 PUW灌胃对大鼠静脉血栓形成的影响

Table 5 Effect of intragastric PUW on rat venous thrombosis

药物 Medicine	ρ (mg/kg)	血栓重量(mg)Thrombus weight(mg)			
		湿重(mg) Wet weight (mg)	抑制率(%) Inhibition (%)	干重(mg) Dry weight (mg)	抑制率(%) Inhibition (%)
生理盐水 Saline	—	9.9±2.9	—	4.1±0.8	—
PUW	10.0	7.6±3.1	23.2	3.2±1.7	21.9
	20.0	2.9±2.0**	70.7	1.3±9.9**	68.3
	40.0	2.5±1.8**	74.7	1.4±0.7**	65.9
阿司匹林 Aspirin	20.0	2.2±2.3**	77.8	1.0±0.9**	75.6

$n=10$, $x\pm s$, *$P<0.05$, **$P<0.01$ 与生理盐水组比较

2.8 PUW对大鼠尾尖出血时间的影响

雄性SD大鼠分为4组,每组10只。A组:0.9%的生理盐水;B组:20 mg/kg阿司匹林;C-D组;20和40 mg/kg PUW。上述组份均以1 mL/100

维普资讯 http://www.cqvip.com

g体重灌胃,2次/d,共5次,于末次给药45 min后,距大鼠尾尖0.5 cm处横切。每30 s用滤纸轻擦出血处1次,并记录出血时间[12]。

结果表明,20 mg/kg的PUW不影响大鼠尾尖出血时间;40 mg/kg PUW及20 mg/kg的阿司匹林明显延长出血时间;与阿司匹林组比较,40 mg/kg的PUW组的出血时间显著缩短($P<0.05$)(表6)。

表6 PUW灌胃对大鼠尾尖出血时间的影响

Table 6 Effect of intragastric PUW on the bleeding time of rat tail tip

药物 Medicine	ρ (mg/kg)	出血时间(min) Bleeding time(min)
生理盐水 Saline	—	15.8±2.1
PUW	20.0	16.5±2.4#
	40.0	18.7±1.9**#
阿司匹林 Aspirin	20.0	23.4±3.1**

$n=10$, $x\pm s$, *$P<0.05$, **$P<0.01$ 与生理盐水组比较(Comparison with saline); #$P<0.05$ 与阿司匹林组比较(Comparison with aspirin)

2.9 PUW的急性毒性试验

按文献方法[13],取上述小鼠20只,雌雄各半,实验前禁食12 h,灌胃给药体积为0.4 mL/10 g,用最大允许浓度给20只动物一次性灌胃,进行最大耐受量实验。给药后连续观察14 d,记录不良反应及死亡情况。

PUW一次性灌胃后,小鼠仅于45 h内出现不同程度的反应迟钝、食欲减退等反应,连续观察14 d后,动物无一死亡,故确定PUW的最大耐受量为5.6 g/kg。

3 讨论

PUW是从叶下珠中获得的水溶性有效部位(含Corilagin 60%以上)。叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)作为一种传统的中草药常用来抗菌和抗病毒。本研究采用多种体内血栓形成模型,综合评价了PUW的抗血栓作用,并探讨其细胞分子生物学的作用机制。

本实验选用尾静脉注射AA形成微血栓模型,便于观察药物对清醒动物体内血小板性血栓形成的防治作用。AA注入体内后主要通过其代谢产物血栓素(Thromboxane A_2, TXA_2)引起微循环内(尤其是肺微循环)的血小板活化和血管收缩,形成广泛的血小板性微血栓,致使动物因呼吸衰竭而死亡[14]。PUW能明显减少动物死亡数,并具有剂量-效应相关性,表明PUW具有良好的防止体内血小板活化后血栓形成的作用。PUW无论在体外还是在体内均未表现出明显的抗血小板作用,提示PUW不是通过抑制血小板聚集功能而可能由其它途径来发挥抗血栓作用的。本研究发现,AA可活化血小板,进而促进该细胞与中性粒细胞之间发生粘附反应,PUW呈浓度依赖性阻抑这两种细胞之间的粘附反应,揭示PUW抑制AA引起的细胞间粘附作用与其减少AA至小鼠的死亡数密切相关。阿司匹林属环氧酶抑制剂,对AA诱导的血小板聚集功能具有抑制作用[15];PUW可以不通过抑制血小板聚集功能而表现出显著抗血栓作用,就其机制方面,可能有别于阿司匹林。本课题组正深入研究。

电刺激大鼠颈动脉形成的血栓与人体动脉血栓相似,其机理主要是损伤血管内皮,激活血流中的中性粒细胞和血小板,并促进这两种细胞间的粘附作用。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。PUW能明显延长电刺激大鼠颈动脉的OT,且具有较好的量效关系,提示PUW对电刺激大鼠颈动脉血栓形成及血管闭塞具有明显的抑制作用,同时提示PUW的抑制细胞间粘附反应是其抗动脉血栓的机制之一。

结扎大鼠下腔静脉,因缺血缺氧而活化中性粒细胞和血小板,同时激活凝血系统,而纤溶活性相对减弱[11]。PUW明显减轻下腔静脉血栓的干、湿重,表明PUW具有阻制静脉血栓作用。至于其机理,我们推测,PUW可能通过提高纤溶活性而发挥抗静脉血栓作用的。对此,本研究组将作进一步的深入探讨。

抗栓药物一般具有出血等不良反应。本实验结果表明,阿司匹林(20 mg/kg)明显延长大鼠尾尖出血时间,20 mg/kg的PUW对出血时间无明显影响,40 mg/kg的PUW虽延长出血时间,但与阿司匹林比较,出血时间明显缩短($P<0.05$)。这对减少在防治血栓性疾病过程中发生的出血等不良反应是十分有利的。又鉴于,PUW灌胃后,其急毒的最大耐受量为5.6 g/kg,明显低于阿司匹林的1.1 g/kg[16],因此,PUW作为口服制剂相对安全。

综上所述,PUW作为一种植物来源的有效部位,具有明显的抗血栓形成作用,同时出血不良反应及毒性较轻;PUW的抗栓作用与其阻抑血小板与中性粒细胞间的粘附反应密切相关。本研究为进一

维普资讯 http://www.cqvip.com

步研究 PUW 及其有效成份提供了实验依据。

参考文献

1 中药大辞典,上海:上海科学技术出版社,1977.1496~1497

2 Cheng J T, Lin T C, Hsu F L, Antihypertensive effect of corilagin in the rat. J Physiol Pharmacol, 1995, 73: 1425~1429

3 Lin T C, Hsu F L, Cheng J T, Antihypertensive activity of corilagin and chebulinic acid from *Lumnitzera racemosa*, J Nat Prod, 1993, 56: 629~632

4 Fujirebio Inc. JP4036239, 1992-02-06

5 Narcus A J, Safier L B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in haemostasis and thrombosis. FASEB J, 1993, 7: 516~522

6 Shen Z Q, Liang Y Chen Z h, Liu W p. Effects of copper-aspirin complex on platelet aggregation and thrombosis in rabbits and mice. J Pharmacy and Pharmacology, 1998, 50: 1275~1279

7 Born G V R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 1962, 194(4832): 927~929

8 Hmbueger S A, McEver R P. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. Blood, 1990, 75: 550~554

9 Myers A K, Forman G, Torres Duarte A P, Penhos J, Ramwell P. Comparison of verapamil and nifedipine in thrombosis models. Proc Soc Exp Biol Med. 1986, 183: 86~91

10 Charlton P A, Faint R W, Bent F *et al*. Evaluation of a low molecular weight modulator of human plasminogen activator inhibitor-1 activity. Thrombosis and Haemostasis, 1996, 75(5): 808~15

11 Chen CX, Jin R M, Li Y K, *et al*. Inhibitory effect of rhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis. Acta Pharmacol Sin, 1992, 13(2): 126~130

12 Tomihisa K, Masao K, Seiji K, *et al*. Thrombolitic activity of a novel modified tissue-type plasminogen activator, YM866, in a canine model of coronary artery thrombosis. Japan J Pharmacol, 1993, 63(6): 9~16

13 新药(西药)临床前研究指导原则汇编.中华人民共和国卫生部药政局.北京:人民卫生出版社,1993.198~199

14 Ogletree, M L. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A_2. Fed Proc, 1987, 46: 133~138

15 Shen Z Q, Li L, Wu L O, *et al*. Effects of copper-aspirin complex on plasma 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ level and platelet cytosolic calcium in rabbits. Platelets, 1999, 10: 345~348

16 Shen Z Q, Lei W Y, Li L, *et al*. Coordination of copper with aspirin improves its anti-inflammatory activity. Inflammopharmacoloy, 1998, 6: 357~362

EFFECTS OF THE FRACTION FROM *PHYLLANTHUS URINARIA* ON THROMBOSIS AND ITS MECHANISM

SHEN Zhi-qiang[1,2], DONG Ze-jun[1], WU Lan-ou[2], CHEN Zhi-he[2], LIU Ji-kai[1]

(1. *Kunming Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;

2. *Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College*, Kunming 650031, China)

Abstract Born's and modified Hamburger's methods were used to determine the effects of PUW (effective fraction containing 60% corilagin from *Phyllanthus urinaria*) on platelet aggregation and platelet-leukocyte adhesion, respectively. The protective effect of PUW against the mouse sudden death was observed by use of Myers' method; the effects of PUW were evaluated on electrically stimulated rat carotid arterial thrombosis and rat inferior vena cave thrombosis according to the methods of Charlton and Chen Changxun, respectively. Tomihisa's method was used to investigate the influence of PUW on bleeding time. The results showed that PUW had no effect on ADP-, arachidonic acid(AA)-, or platelet activating factor-induced platelet aggregation, *in vitro or in vivo*. PUW concentration-dependently inhibited the binding of AA-stimulated platelets to leukocytes with the medium inhibitory concentration of 39.7 mg/kg. Intragastric PUW significantly suppressed the mouse mortality, markedly prolonged the occlusion time, and decreased the wet and dry thrombus weight, in a dose dependent manner. 20 mg/kg of PUW showed no significant influence on the bleeding time of rat tail tip. 40 mg/kg of PUW prolonged the bleeding time whereas the bleeding time of PUW at 40 mg/kg was much shorter as compared with that of 20 mg/kg aspirin($P<0.05$). The results suggested that PUW had significant protection against thrombus formation in the multiple thrombotic models. The mechanism might be closely related to its inhibition of platelet-leukocyte adhesion.

Key words *Phyllanthus urinaria*; corilagin; platelet aggregation; platelets; leukocytes; arachidonic acid; adhesive reaction; thrombosis; bleeding time