

氢溴酸槟榔碱抗血栓作用的研究

唐菲, 王豪, 刘维俊 (海南省药物研究所, 海南 海口 571206)

[摘要] 目的: 研究氢溴酸槟榔碱对体内、外血栓的抗栓和溶栓作用。方法: 通过对体外人血凝块和对人血小板血浆凝块的溶解来考察氢溴酸槟榔碱的体外溶栓作用; 通过角叉菜胶引起小鼠尾静脉血栓形成的模型来考察氢溴酸槟榔碱体内抗栓的作用。结果: 氢溴酸槟榔碱能加速溶解体外人血凝块和血小板血浆凝块, 并具有剂量依赖性; 具有抗角叉菜胶引起的小鼠尾静脉血栓形成的作用。结论: 氢溴酸槟榔碱具有体内、外抗血栓作用。

[关键词] 氢溴酸槟榔碱; 血栓; 体外溶栓; 体内抗血栓

[中图分类号] R963 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2009)10-0791-03

Effect of arecoline hydrobromide on anti-thrombus

TANG Fei, WANG Hao, LIU Wei-jun (Academy of Medication of Hainan Province, Hainan Haikou 571206, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To study the effect of arecoline hydrobromide on anti-thrombotic *in vivo* and thrombolysis *in vitro*. **METHODS** The thrombolysis effect *in vitro* of arecoline hydrobromide was observed by dissolving human blood clot and thrombocyte hematoplasma clot. The antithrombotic effect *in vivo* was observed by building thrombus model of mice caudal vein, as thrombus was induced by injection of carrageenan. **RESULTS** The arecoline hydrobromide can accelerate dissolving *in vitro* human blood clot and thrombocyte hematoplasma clot in a dose-dependence manner; The arecoline hydrobromide has antithrombotic effect on mice caudal vein thrombus induced by injecting carrageenan. **CONCLUSION** The arecoline hydrobromide has obvious effect of inhibiting thrombus formation *in vivo* and resolving blood clot and thrombocy hematoplasma clot.

KEY WORDS arecoline hydrobromide; thrombus; thrombolysis *in vitro*; antithrombotic *in vivo*

由于血栓性疾病对人类的危害逐年提高, 因此, 对血栓的形成机制、血栓性疾病的诊断和抗血栓药物的研究尤为重要。有研究报道^[1], 槟榔碱能促进内皮细胞释放 t-PA, 抑制 PAI-1 的活性, 抑制血管平滑肌收缩和抑制血小板聚集等环节, 进而产生抗血栓作用。槟榔在海南有大面积种植, 海南的槟榔产量历年来占全国产量的半数以上, 但槟榔绝大部分供应给人们的嚼食, 药用的应用范围较小。本实验主要研究氢溴酸槟榔碱的体内、外抗栓和溶栓作用, 为进一步开发利用槟榔提供理论基础。

1 材料

氢溴酸槟榔碱(海南省药物研究所制剂室提供, 纯度95.0%, 规格: 5 g/瓶; 批号 070601); 健康人血(由海南省血液中心提供); 凝血酶(河南省中泰药业有限公司, 规格: 1 000 u/支, 批号 20040406); 血栓通注射液(哈尔滨圣泰制药股份有限公司, 规格: 35 g·L⁻¹, 批号 20040805); 健康 NIH 小鼠, ♀ ♂ 各半, 体质量 18~20 g; 健康大鼠, ♀ ♂ 各半, 体质量 180~200 g[湖北省实验动物研究中心, 生产合格证号: SCXK(鄂)2003-0005]。

2 方法与结果

2.1 氢溴酸槟榔碱的体外溶栓实验^[2]

2.1.1 对人血凝块的溶解作用 实验分为 5 组, 氢溴酸槟榔碱高、中、低剂量组(4, 2, 1 mg·kg⁻¹)、血栓通注射液组(24 mg·kg⁻¹)、生理盐水对照组。取健康人血 30 mL 于平皿中, 室温下凝固后, 切成均匀大小块状, 共 25 块, 用万分之一的电子天平称量, 记录数据。投入小试管中(每 5 支小试管为一组, 每支小试管各加 1.0 mL 药液), 将小试管置于 37℃ 恒温水浴。观察血凝块溶解情况, 5 h 后, 取出血凝块, 用滤纸吸干血块表面液体, 称量, 记录数据, 血凝块溶解率按以下公式计算: 血凝块溶解率(%)=(给药前血凝块质量-给药后血凝块质量)/给药前血凝块质量×100%, 各组进行 t 检验, 结果见表 1。

表 1 显示, 与生理盐水对照组比较, 氢溴酸槟榔碱各剂量组和血栓通注射液组对凝血块都有明显的溶解作用。

2.1.2 对人血小板血浆凝块的溶解作用 取健康人血 30 mL, 以 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上层血浆及中层血小板于平皿中, 然后加入凝血酶, 按

表 1 氢溴酸槟榔碱对人血凝块的溶解作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of arecoline hydrobromide on resolving blood dot($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 血凝块 数量/个 | 剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 溶解率 / % |
|------------|-------------|--|-------------------|
| 氢溴酸槟榔碱高剂量组 | 5 | 4 | 37.1 ± 5.3^a |
| 氢溴酸槟榔碱中剂量组 | 5 | 2 | 35.4 ± 8.2^a |
| 氢溴酸槟榔碱低剂量组 | 5 | 1 | 29.1 ± 16.9^b |
| 血栓通注射液组 | 5 | 24 | 38.5 ± 14.2^a |
| 生理盐水对照组 | 5 | 0 | 10.4 ± 7.9^a |

注:与生理盐水对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$

每 1 mL 血浆加 0.1 mL ($10 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$) 凝血酶的剂量, 混匀, 室温下让其凝固, 切成均匀大小的 25 块, 称量, 记录数据。将制好的血小板血浆凝块分别投入小试管中(每 5 支小试管为一组, 每支小试管各加 1.0 mL 药液), 将小试管置于 37°C 恒温水浴。观察溶解情况, 5 h 后取出血凝块, 用滤纸吸干血块表面液体, 电子天平称量, 记录数据, 血凝块溶解率(%) = (给药前血凝块质量 - 给药后血凝块质量) / 给药前血凝块质量 $\times 100\%$ 。各组进行 t 检验, 结果见表 2。

表 2 氢溴酸槟榔碱对血小板血浆凝块的溶解作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of arecoline hydrobromide on resolving thrombocyte hematoplasma($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 凝块的数量 / 个 | 剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 溶解率 / % |
|------------|--------------|--|--------------------|
| 氢溴酸槟榔碱高剂量组 | 5 | 4 | 46.0 ± 13.0^a |
| 氢溴酸槟榔碱中剂量组 | 5 | 2 | 38.3 ± 5.9^a |
| 氢溴酸槟榔碱低剂量组 | 5 | 1 | 32.40 ± 2.70^a |
| 血栓通注射液组 | 5 | 24 | 37.44 ± 5.65^a |
| 生理盐水对照组 | 5 | 0 | 5.60 ± 6.80 |

注:与生理盐水对照组比较, $^a P < 0.01$

表 2 显示, 与生理盐水对照组比较, 氢溴酸槟榔碱各剂量组和血栓通注射液组对血小板血浆凝块都有明显的溶解作用($P < 0.01$)。

2.2 氢溴酸槟榔碱对角叉菜胶引起小鼠尾静脉血栓形成的作用^[3] 实验分为 5 组, 氢溴酸槟榔碱高、中、低剂量组($36, 18, 9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、血栓通注射液组($24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、生理盐水对照组。

2.2.1 角叉菜胶血栓模型的制备 取健康♂小鼠, 体质量 $18 \sim 20 \text{ g}$, 在室温为 20°C 条件下, 皮下注射 0.1% 的角叉菜胶生理盐水溶液 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$, $3 \sim 14 \text{ h}$ 后观察, 小鼠尾部尖端出现暗红色血栓形成区, 并逐渐向尾根部扩大, 显微镜下观察结果为静脉血管扩张, 红细胞溶血, 皮下软组织有改变并有炎细胞浸润, 骨组织无异常改变, 肌肉发生变性(玻璃样变性)。

2.2.2 观察指标 血栓形成波及的长度。

取健康♂小鼠 50 只, 体质量 $18 \sim 20 \text{ g}$, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 各组分别灌胃给药, 每天 1 次, 连续 3 d(血栓通注射液组小鼠腹腔注射给药)。第 4

天, 给各组小鼠皮下注射 0.1% 的角叉菜胶生理盐水溶液 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$ 。再给各组小鼠灌胃给药一次, 观察注射角叉菜胶后 48 h 内, 各组小鼠血栓出现的时间和长度, 进行数据统计, 各组进行 t 检验, 结果见图 1、2 和表 3。

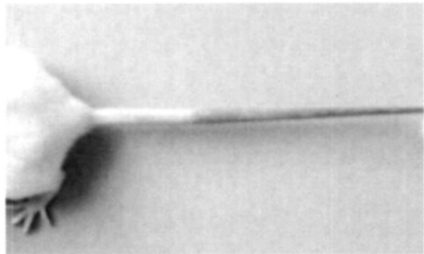


图 1 角叉菜胶小鼠尾静脉血栓模型

Fig 1 Caudal vein thrombus model by carrageenan

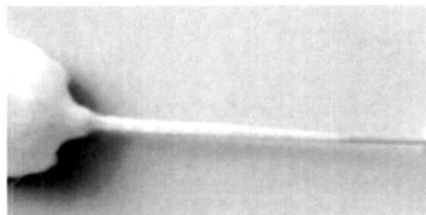


图 2 氢溴酸高剂量组小鼠的尾静脉血栓

Fig 2 Caudal vein thrombus of high dose arecoline hydrobromide

表 3 氢溴酸槟榔碱对小鼠尾静脉血栓的作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of arecoline hydrobromide on thrombus of mice caudal vein($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 / 只 | 剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 血栓长度 / cm |
|------------|------------|--|-----------------|
| 氢溴酸槟榔碱高剂量组 | 10 | 36 | 2.2 ± 4.2^a |
| 氢溴酸槟榔碱中剂量组 | 10 | 18 | 4.0 ± 6.9 |
| 氢溴酸槟榔碱低剂量组 | 10 | 9 | 6.1 ± 8.3 |
| 血栓通注射液组 | 10 | 24 | 2.2 ± 4.7^a |
| 生理盐水对照组 | 10 | 0 | 7.9 ± 6.3 |

注:与生理盐水对照组比较, $^a P < 0.05$

由图 1、2 和表 3 可见, 小鼠皮下注射角叉菜胶能引起尾静脉血栓, 小鼠尾部尖端出现暗红色血栓形成区, 并逐渐向尾根部扩大; 氢溴酸槟榔碱高剂量组的小鼠尾静脉血栓形成区域明显减少, 表明其具有抗角叉菜胶引起小鼠尾静脉血栓形成的作用, 与生理盐水对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

血栓为血液中纤维蛋白多聚体与血小板、红细胞等成分组成的复合物, 其生物学属性属于生物大分子有机物, 血栓形成机制涉及血管壁损伤、血小板凝聚、血液凝固性增加和血液流变学异常^[4]。因此, 设计了氢溴酸槟榔碱体外溶解血凝块、体外溶解血小板血浆凝块来考察其溶栓作用; 采用角叉菜胶致炎引起小鼠尾静脉局部血栓的形成来考查氢溴酸槟榔碱体内抗栓的作用。实验结果表明, 氢溴酸槟榔碱具有体外溶栓作用, 具有抗角叉菜胶引起小鼠尾

静脉血栓形成的作用, 并且具有剂量依赖性。实验进一步验证了槟榔碱抗血栓的作用。但其抗血栓的机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈冬梅, 慕邵峰, 汪海, 等. 激活血管内皮细胞己酰胆碱作用靶标的抗血栓作用及分子机制[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(5): 527.

[2] 杨振发, 曲敬来, 曾仲意, 等. 抗栓溶栓胶囊溶栓作用的体外实验研究[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(3): 164.
[3] 刘瑜, 董小黎. 血栓动物模型的建立[J]. 首都医科大学学报, 2002, 23(3): 279.
[4] 张建浩, 黄巧冰, 刘玉华, 等. 复方血栓通滴丸对大鼠体内血栓形成和体外溶栓作用[J]. 中药材, 2003, 26(12): 882.

[收稿日期] 2008-08-14

淫羊藿总黄酮与己烯雌酚联用对去卵巢大鼠胫骨松质骨和皮质骨的影响

许碧莲, 吴铁, 刘钰瑜, 陈文双 (广东医学院药理教研室, 广东 湛江 524023)

[摘要] 目的: 观察淫羊藿总黄酮(EF)与己烯雌酚(DES)联合用药对去卵巢大鼠胫骨松质骨和皮质骨的影响。方法: 4月龄♀SD大鼠80只, 随机分成8组, 每组10只。除基础组和假手术组大鼠外, 其余组行双侧卵巢切除术。基础组不给药, 在实验开始时将其处死取材; 假手术组和去卵巢组给予溶剂对照, 其余分别为DES组($22.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、EF组($300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、联合用药高剂量组($\text{EF } 300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} + \text{DES } 22.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、联合用药中剂量组($\text{EF } 150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} + \text{DES } 11.25\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、联合用药低剂量组($\text{EF } 75\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} + \text{DES } 5.625\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)均灌胃给药, 连续90d。大鼠处死后用骨组织形态计量学方法测量胫骨松质骨和皮质骨的动态和静态参数, 同时测量血清雌二醇和子宫内膜厚度。结果: 联合用药3个剂量组大鼠的胫骨上段骨小梁面积百分数、骨小梁数目均高于去卵巢组, 而骨小梁分离度、单位骨小梁周长破骨细胞数、骨转换率均低于去卵巢组($P<0.05$)。联合用药高剂量组的作用比单用DES强($P<0.05$), 而联合用药中、低剂量组的作用与DES相当($P>0.05$)。与去卵巢组比较, 联合用药3个剂量组大鼠胫骨中段皮质骨的动态和静态参数均无明显变化。联合用药3个剂量组大鼠子宫内膜厚度均小于DES组($P<0.05$)。结论: 淫羊藿总黄酮与己烯雌酚联合用药可有效预防去卵巢大鼠所致的胫骨松质骨丢失, 其预防骨丢失作用比单用DES强, 且对子宫刺激的作用比DES小。

[关键词] 淫羊藿总黄酮; 己烯雌酚; 骨质疏松; 去卵巢大鼠

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2009)10-0793-04

Effect of combination of *Epimedium pubescens* flavonoids and diethylstilbestrol on the proximal tibial metaphysis and tibial shaft in ovariectomized rats

XU Bi-lian, WU Tie, LIU Yu-yu, CHEN Wen-shuang (Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the effect of combination of *Epimedium pubescens* flavonoid (EF) and diethylstilbestrol (DES) on the proximal tibial metaphysis (PTM) and tibial shaft (Tx) in ovariectomized rats. **METHODS** Eighty 4-month-old virgin female Sprague-Dawley rats were randomly divided into 8 groups. Rats in basal group were sacrificed at age of 4.5 months in the beginning of the study. Rats in sham group were sham-operated and treated by daily oral gavage with vehicle. Rats in other six groups were bilaterally ovariectomized (OVX) and treated by either daily oral gavage with vehicle, or DES at $22.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, or EF at $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, or combination of EF and DES at different doses (combination of EF $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and DES $22.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, of EF $150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and DES $11.25\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, of EF $75\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and DES $5.625\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 90 days. After 90 days of treatment, rats were sacrificed by cardiac puncture under sodium pentobarbital anesthesia. Bone histomorphometric analysis of the proximal tibial metaphysis (PTM) and tibial shaft (Tx) was performed in undecalcified sections. Serum estradiol (E_2) and the uterine luminal epithelial thickness (ULET) was measured. **RESULTS** %Tb.Ar and Tb.N in all doses of combination of EF and DES groups was increased, while Tb.Sp, Oc.N and BFR/BV was decreased, compared with OVX group. The bone-protective effect of high dose of combination of EF and DES was significantly greater than that of DES alone, while the effects of low and medium doses of combination of EF and DES were identical to that of DES. There was no significant change in bone histomorphometric parameters of Tx observed in all doses of combination.

[基金项目] 湛江市科技攻关项目(编号: EK0541) [作者简介] 许碧莲, 女, 硕士研究生, 副教授, 电话: 0759-2388588, E-mail: gdm_cxu@126.com