

天麻成分抗花生四烯酸诱导的家兔体外血小板聚集活性研究^{*}

郭营营, 林 青, 李秀芳[△]

(云南中医学院, 云南昆明 650500)

[摘 要] 目的: 观察天麻成分抗花生四烯酸 (Arachidonic Acid, AA) 诱导的家兔体外血小板聚集作用, 明确其作用物质基础。方法: 以天麻乙酸乙酯部位分离提取得到的 B、C、D 成分以及天麻素为研究对象, 采用比浊法测定 4 个成分抗 AA 诱导的家兔体外血小板聚集作用。结果: 天麻 B、C、D 成分高浓度 ($0.4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 AA 诱导的家兔血小板聚集均有抑制作用, IC_{50} 分别为 0.104, 0.163, $0.263\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以天麻 B 成分抑制作用较强, 并呈现一定的浓度依赖。天麻素 5 个浓度组与对照组比, 对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的聚集率差异均无显著性意义。结论: 天麻 B、C、D 成分均具有一定的抗 AA 诱导的家兔体外血小板聚集作用, 以 B 成分抑制作用较强。在本研究浓度下, 天麻素作用不明显。

[关键词] 天麻; 成分; 花生四烯酸; 抗血小板聚集

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)05—0001—03

现代药理研究表明天麻、天麻成分及其制剂有扩血管, 降低血粘度及抑制血小板聚集等作用^[1]。课题组前期研究表明天麻提取物 G2 (乙酸乙酯部位) 具有显著的抗血小板聚集作用^[2], 但其活性成分尚不清楚。在后续的研究中, 课题组从天麻提取物 G2 部分分离纯化得到一组脂溶性酚性成分, 经初步活性筛选, 结果显示 B、C、D 成分具有一定的抗 AA 诱导的家兔体外血小板聚集作用, 本实验在前期研究基础上, 对天麻 B、C、D 成分及天麻素的抗 AA 诱导的家兔体外血小板聚集作用进行了考察。

1 材料

1.1 受试药物

天麻 B、C、D 成分由课题组提取分离, 经 HPLC 测定纯度均在 95% 以上; 天麻素购自上海百灵威科技有限公司, 批号: LotL6B0K01, 纯度 98%。

1.2 试剂及仪器

枸橼酸钠 (批号: A20120416); 花生四烯酸 (Arachidonic Acid, AA) 购自日本 TCI (批号: A0781); Na_2CO_3 (批号: A20120313); 吐温 (批号:

090711); 氯化钠注射液 (批号: A11011505); LBY—NJ2 四通道血小板聚集仪 (北京普利生科贸集团); 台式低速离心机 (上海电机厂)。

1.3 实验动物

日本大耳白兔, 体重 $2.0 \sim 2.5\text{kg}$, 雌雄兼用, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 动物合格证号: SCXK (川) 2008—24。

2 天麻 B、C、D 成分提取分离

2.1 天麻提取物 G2 部位的制备

天麻生药粗粉 (2kg), 用 95% 的乙醇浸泡 6h, 连续回流提取 3 次, 回流提取时间为每次 3h。获得总提取物 G1 后, 减压浓缩得到深褐色糖浆状醇提物, 取 G1 用蒸馏水溶解, 加入石油醚反复萃取至石油醚层无色, 合并几次萃取的石油醚层, 回收石油醚, 得到天麻提取物石油醚部分; 剩余水层加入乙酸乙酯反复萃取至乙酸乙酯层无色, 合并几次萃取的乙酸乙酯层, 回收乙酸乙酯, 得到天麻提取物 G2 部位。

2.2 G2 硅胶柱色谱分离

取 2.1 制得的 G2 部分以硅胶柱色谱分离, 用环己烷—乙酸乙酯溶剂系统梯度洗脱 ($100:1 \sim 10$

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目 (NO: 81160514); 教育部科学技术研究重点项目 (NO: 211174)

收稿日期: 2012—08—24 修回日期: 2012—09—21

作者简介: 郭营营 (1987~), 女, 河南永城人, 硕士研究生在读。研究方向: 中药药理研究与应用。△通讯作者: 李秀芳, E-mail: sofinelxf@163.com

:1), 经反复硅胶柱层析结合薄层层析, 分离得到化合物 B、C、D。

3 Bron 法^[3]测定血小板聚集功能

用 10% 的水合氯醛 3mL/kg 的剂量腹腔注射麻醉家兔, 自颈总动脉取血, 收集于一次性塑料试管中, 采用 3.2% 枸橼酸钠抗凝, 取血时试管内枸橼酸钠与取血量的比例为 1:9, 取后立即颠倒混匀。血液于室温以 1 000r/min 离心 10min 得到上层液即富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP), 取上清液后余下以 3 000r/min 离心 10min 得贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP)^[4], 用比浊法进行血小板聚集性测定, 记录血小板聚集率, 并以公式 [(对照管聚集率 - 样品管聚集率) / 对照管聚集率 × 100%] 计算药物对血小板聚集的抑制率。实验结果数据以 “均数 ± 标准差” 表示, 组间比较用 q 检验, Logit 法计算 IC₅₀。

4 结果

4.1 天麻 B 成分对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响

结果显示, 天麻 B 成分 (0.4, 0.2, 0.1mg · mL⁻¹) 对 AA 的家兔体外血小板均有抑制作用, IC₅₀ 为 0.104mg · mL⁻¹, 95% 的置信区间为 (0.07, 0.41)。与空白对照组比较差异有统计学意义 (P < 0.01), 详见表 1:

表 1 天麻 B 成分对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响 (n = 6)

组别	浓度 /mg · mL ⁻¹	血小板聚集率 /%	抑制率 /%
空白对照	—	60.83 ± 5.95	0
天麻 B 成分	0.4	5.33 ± 1.75**	91.18 ± 2.86**
	0.2	3.82 ± 1.65**	93.59 ± 2.98**
	0.1	1.80 ± 1.77**	97.12 ± 2.77**
	0.05	55.43 ± 10.62	9.00 ± 13.95
	0.025	60.35 ± 7.19	0.79 ± 6.29

注: 与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

4.2 天麻 C 成分对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响

结果显示: 天麻 C 成分 (0.4, 0.2mg · mL⁻¹) 对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集均有抑制作用, IC₅₀ 为 0.163mg · mL⁻¹, 95% 的置信区间为

(0.09, 0.39)。与空白对照组比较差异有统计学意义 (分别有 P < 0.01, P < 0.05), 详见表 2:

表 2 天麻 C 成分对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响 (n = 6)

组别	浓度 /mg · mL ⁻¹	血小板聚集率 /%	抑制率 /%
空白对照	—	60.83 ± 5.95	0
天麻 C 成分	0.4	1.70 ± 3.05**	98.11 ± 4.51**
	0.2	27.17 ± 27.93*	47.68 ± 39.93*
	0.1	55.53 ± 10.96	13.26 ± 11.38
	0.05	58.40 ± 8.91	5.66 ± 8.82
	0.025	61.73 ± 4.59	0.068 ± 2.76

注: 与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

4.3 天麻 D 成分对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响

结果显示: 天麻 D 成分 (0.4, 0.2mg · mL⁻¹) 对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集均有抑制作用, IC₅₀ 为 0.263mg · mL⁻¹, 95% 的置信区间为 (0.18, 0.55)。与空白对照组比较时差异有显著的统计学意义 (P < 0.01), 详见表 3:

表 3 天麻 D 成分对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响 (n = 6)

组别	浓度 /mg · mL ⁻¹	血小板聚集率 /%	抑制率 /%
空白对照	—	60.83 ± 5.95	0
天麻 D 成分	0.4	6.63 ± 3.32**	82.44 ± 17.96**
	0.2	49.05 ± 8.90**	21.03 ± 10.72**
	0.1	57.08 ± 6.32	7.52 ± 10.26
	0.05	61.37 ± 3.03	0.34 ± 8.36
	0.025	61.85 ± 4.84	-0.12 ± 5.19

注: 与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

4.4 天麻素对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响

结果显示: 天麻素 5 个浓度组对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集率与对照组相比差异无显著性意义, 表明天麻素对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集无明显影响。详见表 4:

表 4 天麻素对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集的影响 (n = 6)

组别	浓度 /mg · mL ⁻¹	血小板聚集率 /%	抑制率 /%
空白对照	—	60.83 ± 5.95	0
天麻素	0.4	54.72 ± 5.98	5.16 ± 10.25
	0.2	59.78 ± 9.79	-3.03 ± 12.10
	0.1	59.34 ± 7.07	-2.57 ± 8.89
	0.05	60.78 ± 2.96	-5.35 ± 4.68
	0.025	60.60 ± 4.46	-4.886 ± 4.07

注: 与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

5 讨论

血栓形成是血液在流动状态中由于血小板活化和凝血因子被激活而发生的异常凝固。血小板活化是动脉粥样硬化、心肌梗死、中风等多种心脑血管疾病的重要发病机制之一, 采用抗血小板药物治疗上述疾病呈现明显的改善作用, 因此, 研究药物抗血小板活化聚集的作用, 对于防治相关疾病以及开发新药至关重要^[5]。花生四烯酸 (AA) 是血栓烷 A₂ (TXA₂) 生物合成的前体, 其生理活性是诱导血小板聚集和降低血小板 cAMP 水平, 它是诱发血栓形成、脑缺血、休克等疾病的一种强效血小板聚集促进剂和血管收缩剂^[6]。抑制 AA 代谢的药物能对其代谢生成 TXA₂ 的中间环节发生阻断作用, 从而减少 TXA₂ 的生成及其对血管内皮细胞的损伤。课题组前期的研究提示, 天麻提取物 G₂ (乙酸乙酯部位) 具有一定的抗 AA 诱导的家兔体外血小板

聚集作用, 然而尚未见关于其活性成分的报道。本研究结果发现, 天麻 B、C、D 成分对 AA 诱导的家兔血小板聚集均有一定的抑制作用, IC₅₀ 分别为 0.104, 0.163, 0.263mg · mL⁻¹, 以 B 成分作用较强。天麻素是天麻的主要成分, 药典中天麻的含量测定也以天麻素作为标准^[7], 然而本实验中, 在同等浓度下, 天麻素对 AA 诱导的家兔体外血小板聚集作用不明显, 与课题前期研究结论相符^[8]。

[参考文献]

[1] Shang W F. Research progress on the effect of Gastrodia [J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 23 (1): 32-34.
[2] 林青, 李秀芳, 李文军, 等. 天麻提取物对血小板聚集的影响 [J]. 中国微循环, 2006, 10 (1): 33.
[3] Born GVR. Aggregation of blood platelets by diphosphate and its reversal [J]. Nature, 1962, 194: 297.
[4] Xu S Y, Bian R L, Chen X. Methodology Pharmacological Experiment (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
[5] De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willibrand factor to the rescue [J]. Blood Reviews, 2009, 113: 5049-5057.
[6] Tazawa R, Green ED, Ohashi K, et al. Characterization of the complete genomic structure of human thromboxane synthase gene and functional analysis of its promoter [J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 334 (2): 349-356.
[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 54-55.
[8] 孟保华, 李文军, 淤泽溥, 等. 天麻素对家兔体外血小板聚集的影响 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22 (3, 4): 46-47.

(编辑: 李 平)

The Study of the Anti-platelets Aggregation Effect of Compounds from Gastrodia Induced by AA in Vitro

GUO Ying-ying, LIN Qing, LI Xiu-fang

(Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500)

[ABSTRACT] Objective: To observe the effects of the compounds from gastrodia on anti-platelets aggregation induced by AA in vitro and define its material base. Methods: Anti-platelets aggregation effects of B、C、D separated from the ethyl acetate extracted parts of Gastrodia elata Blume and gasterodin were observed by light transmission in vitro. AA was used as inducers. Results: Compounds B、C、D all had some effects on anti-platelets aggregation at high concentration (0.4 mg · mL⁻¹), IC₅₀ is 0.104、0.163、0.263mg · mL⁻¹. The inhibition of compound B was much stronger and presented certain concentration dependence. Gasterodin had no significant effects on rabbit blood platelets aggregation induced by AA in vitro. Conclusion: Compounds B、C、D all had some effects on anti-platelets aggregation, among which, compound B was much stronger. Gasterodin had no significant effects at the same concentration.

[KEY WORDS] gastrodia; compound; AA; anti-platelet aggregation