

API0134 对实验性动脉粥样硬化家兔血液凝固性和血栓弹力图的影响

王宏伟 赵华月 熊一力 向世勤
(同济医科大学同济医院心内科, 武汉 430030)

Effect of API0134 on the Changes of Blood Coagulation and Thrombelastogram in Experimental Atherosclerotic Rabbits

WANG Hong-Wei, ZHAO Hua-Yue, XIONG Yi-Li and XIANG Shi-Qin
(Department of Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim Observing the effects of API0134 on the changes of the platelet aggregation, thrombelastogram (TEG) and blood coagulation in experimental atherosclerotic rabbits.

Methods An atherosclerotic rabbits model fed by high cholesterol was established; and the platelet aggregation function, thrombelastogram and blood coagulation function were examined.

Results In model group produced by high cholesterol fed supplemented with injection of bovineserum albumin reflecting hypercoagulative state and suppressed fibrinolytic capacity showing enhanced platelet aggregation induced by platelet activating factor (PAF); shortened r and k values, and increased m, and ϵ values seen in TEG; markedly reduced activated partial thromboplastin time (APTT) and prologed euglobulinolysis time (ELT). Whereas in those group after the establishment of atherosclerotic model with successive feeding of API0134 for three days showed much improved coagulative and fibrinolytic parameters returning almost to normal.

Conclusion These findings indicate that the API0134 possess the effect of anti-platelet aggregation and anti-thrombus formation contributing to the explanation of one of the mechanism of antiatherosclerosis.

KEY WORDS Atherosclerosis; API0134; Platelet aggregation; Thrombelastogram; Blood coagulation

摘要 为探讨穿心莲抗动脉粥样硬化的可能机制, 用血小板聚集仪、血栓弹力描记仪和 ACL-200 型凝血仪分别观察了穿心莲成份 API0134 对实验性动脉粥样硬化家兔血小板聚集率、血栓弹力图和血液凝固性改变的影响。结果发现, 动脉粥样硬化模型家兔的血液呈高凝和低纤溶状态, 表现为血小板活化因子诱导的血小板聚集显著增强; 血栓弹力图的反应时间和凝固时间显著缩短, 血栓最大幅度和血栓弹力度显著增大; 部分凝血活酶时间明显缩短, 优球蛋白溶解时间显著延长。经 API0134 治疗 3 天后, 上述异常的血凝和纤溶参数显著改善, 基本恢复至正常水平。提示, API0134 具有抗血小板聚集、抗血栓形成和促进纤溶活性的作用, 这种作用可能是其抗动脉粥样硬化的机理之一。

关键词 动脉粥样硬化; 穿心莲成分; 血小板聚集; 血栓弹力图; 血液凝固

血液凝固性改变与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的形成和发展密切相关^[1]。既往研究已证明, 穿心莲提取物 APN 和穿心莲成分 API0134 可能抑制血小板聚集、促进纤溶和预防冠状动脉血栓形成^[2,3]。本文观察了 API0134 对实验性 As 家兔血液凝固性改变及血栓弹力图变化的影响, 旨在探讨 API0134 在动脉粥样硬化病理状态下的抗血栓作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

API0134 为色谱法分离的穿心莲有效成分,由本院药剂科植化室提供。血小板活化因子(platelet activated factor, PAF)为 Sigma 公司产品。胆固醇粉购自广州医药站化学试剂公司,为荷兰进口分装。牛血清白蛋白购自上海浦江应用生物化学研究所,德国进口分装。SPA-4 型多功能血小板聚集仪为上海科达仪器厂产品。血栓弹力描计仪 D 为德国 Hellige 公司产品。ACL-200 型全自动凝血仪为美国 ACL 公司产品。

1.2 家兔动脉粥样硬化模型建立

雄性日本大耳家兔(由同济医科大学医学实验动物中心提供)10 只,体重 2.0~2.5 kg。单笼基础饲料喂养,饮水不限。观察一周未见异常后,每只兔自耳缘静脉注射牛血清白蛋白 250 mg/kg,注射当日即开始 1%胆固醇喂饲。实验第 8 周末,随机取 2 只实验家兔,颈动脉放血处死,解剖后可见主动脉内膜均有动脉粥样斑块形成,表明模型已复制成功,可以开始 API0134 药物试验。

1.3 检测方法

于实验前(注射牛血清白蛋白前)和实验第 8 周末分别自兔耳中央动脉取血,做血小板聚集功能、凝血机能、血栓弹力图和有关血脂参数的检查。然后每只家兔继续饲喂 API0134,每天 150 mg/kg,早晚分次灌胃,连用 3 天。于末次灌药后 3 h,自耳中央动脉取血,重复做上述出血及凝血功能项目检测。

1.3.1 血小板聚集功能 按血小板聚集仪规程操作。取血后立即用 3.8%枸橼酸钠抗凝(血与抗凝剂体积比为 9:1),分离富血小板血浆和贫血小板血浆,用贫血小板血浆调血小板数至终浓度 $(4\sim5)\times10^{11}/L$ 。取富血小板血浆 200 μL ,37℃温育 5 min,加入 PAF 至终浓度 75 nmol/L 诱集。血小板聚集测定在取血后 3 h 内完成。

1.3.2 血栓弹力图 按血栓弹力描记仪 D 型的规程操作。取动脉血(3.8%枸橼酸钠抗凝) 0.5 mL,于取血后 2 h 内用全血复钙法进行血栓弹力图描记。测量血栓弹力图图形的反应时间(r 值)、凝固时间(k 值)、最大凝固时间(m 值)和血栓最大幅度(m_a 值),计算血栓弹力度(ϵ 值), $\epsilon=100\times m_a/(100-m_a)$ 。

1.3.3 凝血机能的生物化学检查 取血浆 1 mL,按 ACL-200 型凝血仪规程操作,测定部分凝血活酶时间和纤维蛋白原含量,并测定优球蛋白溶解时间。

1.4 统计学处理

所有检测指标均设自身对照,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用配对资料 t 检验。

2 结果

动脉粥样硬化家兔与实验前自身比较,PAF 诱导的 1 min 和 5 min 血小板聚集率均显著增高($P<0.01$);血栓弹力图的 r 值、k 值和 m 值显著缩短, m_a 值和 ϵ 值显著增大($P<0.01$);凝血活酶时间缩短,血浆纤维蛋白原含量增多($P<0.05$),优球蛋白溶解时间显著延长($P<0.01$)。

API0134 用药 3 天后,由 PAF 诱导的血小板聚集率显著降低,与用药前比较,1 min 和 5 min 血小板聚集抑制率分别为 19.2%和 23.8% ($P<0.01$);血栓弹力图的 r 值、k 值和 m 值显著延长, m_a 值和 ϵ 值显著减小($P<0.01$);凝血活酶时间显著延长($P<0.05$),优球蛋白溶解时间显著缩短($P<0.01$)。

药物实验结束后,8 只实验家兔经颈动脉放血处死,取出整条主动脉,行苏丹 IV 染色,用图像分析仪测主动脉内膜脂质斑块面积百分比(脂质斑块面积/主动脉总面积 $\times 100\%$)为 49.6 ± 18.4 。

Table 1. Change of concentration of plasma TC and TG in experimental atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$).

| Groups | n | TC | TG |
|---------|----|------------------|------------------------------|
| Control | 10 | 1.57 \pm 0.36 | 1.06 \pm 0.22 |
| Model | 10 | 16.84 \pm 2.95 | 1.83 \pm 0.34 ^a |

a: $P<0.01$, compared with control group.

Table 2. Effects of API0134 on platelet aggregation induced by PAF in experimental atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$).

| Groups | n | Platelet aggregation | | Inhibitory (%) | |
|-----------|----|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-------|
| | | 1 min | 5 min | 1 min | 5 min |
| Control | 10 | 54.7 \pm 9.1 | 74.8 \pm 6.4 | — | — |
| Model | 10 | 71.3 \pm 8.3 ^a | 89.5 \pm 8.2 ^a | — | — |
| Treatment | 8 | 53.1 \pm 6.9 ^b | 68.2 \pm 9.6 ^b | 19.2 | 23.8 |

a: $P<0.01$, compared with control group, b: $P<0.01$, compared with model group.

Table 3. Effects of API0134 on thrombelastogram in experimental atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$).

| Index | Control (n=10) | Model (n=10) | Treatment (n=8) |
|---------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| r(min) | 5.7±1.3 | 3.9±0.9 ^a | 5.8±0.8 ^b |
| k(min) | 4.8±0.8 | 2.6±0.7 ^a | 5.0±0.7 ^b |
| m(min) | 39.6±6.5 | 29.4±5.7 ^a | 40.1±5.5 ^b |
| m _a (mm) | 52.7±4.1 | 60.9±4.3 ^a | 53.6±3.8 ^b |
| c(%) | 111±11 | 155±12 ^a | 116±9 ^b |

a: $P<0.01$, compared with control group, b: $P<0.01$, compared with model group.

Table 4. Effect of API0134 on blood coagulation in experimental atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$).

| Index | Control (n=10) | Model (n=10) | Treatment (n=8) |
|----------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| PT(s) | 11.6±1.9 | 11.3±2.1 | 11.5±2.3 |
| TT(s) | 16.8±2.7 | 16.1±3.3 | 16.2±2.9 |
| FIB(g/L) | 2.45±0.43 | 3.10±0.38 ^c | 3.05±0.41 |
| APTT(s) | 28.9±5.4 | 21.0±4.7 ^c | 27.3±4.1 ^d |
| ELT(s) | 182±28 | 284±39 ^a | 193±32 ^b |

a: $P<0.01$, c: $P<0.05$, compared with control group, b: $P<0.01$, d: $P<0.05$, compared with model group. PT: prothrombin time, TT: thrombin time, FIB: fibrinogen, APTT: activated partial thromboplastin time, ELT: euglobulinlysis time.

3 讨论

动脉粥样硬化是心肌梗塞和缺血性脑梗塞的病理基础,高脂血症是As发生的主要危险因素。近年研究表明,血脂的质和量改变,又与血液凝固性变化密切相关^[4,5]。本组实验家兔的主动脉内膜脂质斑块面积百分比高达49.6%,表明As模型是成功的。本研究表明,在As家兔的血脂显著增高的同时,血液呈高度凝固倾向(简称高凝)和纤维蛋白溶解功能降低(简称低纤溶)状态,主要表现为PAF诱导的血小板聚集功能增强,血栓弹力图呈高凝图像,血浆纤维

蛋白原含量增多,凝血活酶时间缩短和优球蛋白溶解时间延长。因此提示,As模型家兔高凝和低纤溶内环境的形成,可能是As发生发展的重要环节之一。

本研究表明,中药穿心莲成分API0134对实验性As实验家兔血液的高凝低纤溶状态具有显著的逆转作用,表现为API0134能够抑制PAF诱导的血小板聚集,改变高脂血症所致的血栓弹力图高凝图像,并使优球蛋白溶解时间缩短和凝血活酶时间延长。因此认为,API0134的抗血栓作用,与其抗血小板聚集、促进纤溶和降低凝血活酶活性的药理作用有关。

已知API0134几乎对所有已知的血小板诱聚剂所诱导的血小板聚集均有不同程度的抑制作用^[2]。这种显著的抗血小板聚集特性,在国内目前开发的抗血小板药物中尚不多见。但其抗血小板聚集的机制,有待深入研究。

参考文献

1 Loscalzo J. The relation between atherosclerosis and thrombosis. *Circulation*, 1992, **86**(6): 95~99.

2 付良武,赵华月,熊一力,等. API0134对四种诱聚剂致血小板聚集的影响. *中国药理学通报*, 1995, **11**: 209~212.

3 付良武,赵华月,郭志凌,等. API0134对犬冠状动脉血栓形成致急性心肌梗塞的影响. *同济医科大学学报*, 1992, **24**(增刊): 103~106.

4 Moor E, Silveira A, Hooft F, et al. Cougulation factor mass and activity in young men with myocardial infarction at young age: role of plasma lipoprotein and factor genotype. *Arterioscler Thromb*, 1995, **15** : 655~659.

5 Oppel C, Clement C, Schwarz H, et al. Increased number of high sensitive platelets in hypercholesterolemia, cardiovascular disease, and after incubation with cholesterol. *Atherosclerosis*, 1995, **113** : 211~217.

(1997-12-02 收到, 1998-05-30 修回)