DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.02.001

粉防己碱对兔血小板聚集及形态的影响

钱月明 黄钺华（药理学教研室）

提 要 粉防己碱（Tet）在体外明显抑制ADP、胶原和花生四烯酸诱导的兔血小板聚集，其效应呈剂量依赖性。对胶原诱导的血小板形态改变及颗粒释放也有明显抑制作用。Tet与潘生丁伍用能明显加强它们对血小板聚集的抑制作用，而增加细胞外钙可减弱Tet对血小板聚集的抑制作用。

关键词 粉防己碱—药效学；血小板聚集—药物作用；血小板—超微结构；潘生丁—药效学；钙—生理学

粉防己碱(Tetrandrine；Tet)是中药粉防己（Stephania tetrandra S Moore）的有效成份之一。动物实验证实，它能扩张冠状血管、减少心肌耗氧及降低外周血管阻力。临床用于治疗高血压及冠心病心绞痛取得了一定的疗效[1]。由于血小板在动脉粥样硬化、冠心病的发生发展中具有重要作用，所以本文以兔富含血小板血浆为材料，观察了Tet对血小板聚集及形态的影响。

材料与方法

药物和试剂 Tet（浙江金华制药厂）。潘生丁（重庆第六制药厂）。花生四烯酸（arachidonic acid，AA）和ADP（Sigma公司）。胶原（用兔跟腱自制，10μl可诱导兔血小板聚集60～70%）。

血小板聚集测定 兔颈动脉取血，每9ml血加1ml 3.8%枸橼酸钠抗凝，离心分离富含血小板血浆（PRP，200×g，8min）及贫血小板血浆（PPP，1200×g，10min）。用PPP调整PRP使血小板计数在4×10^8/ml左右。实验前用PRP在血小板聚集仪（BS631型，北京生化仪器厂）上调零点，用PPP调最大透光幅度。加0.05ml药物液或盐水于0.45ml PRP中，1min后，以终浓度ADP 5μmol/L、终浓度AA 0.12mmol/L或胶原10μl为诱导剂，按比浊法[2]测定血小板聚集。

聚集%＝（PRP透光度/PPP透光度）×100%

聚集抑制%＝（对照聚集%－药物聚集%）/对照聚集%

血小板电镜超薄切片制备 仿Sawatzks法[3]，经Tet或盐水和/或胶原作用的PRP，加入等量与室温相同的磷酸缓冲的0.2%戊二醛固定液混匀，静置20min后离心（1200×g，15min），弃上清液保留血小板薄膜，加入磷酸缓冲的4%戊二醛固定液（pH7.4），室温下固定2h，弃固定液并用磷酸缓冲液轻轻冲洗血小板薄膜两次，各2min。加入1%四氧化锇固定液（pH7.4），在4℃下固定1h，弃固定液，用同样的缓冲液冲洗两次，各2min。在4℃下同一试管内用丙酮逐级（50%，70%，80%，95%，100%）脱水。常规包埋、制超薄切片。经醋酸铀及枸橼酸铅双重染色后，进行电镜观察。

结果

Tet对ADP、胶原或AA诱导的血小板聚集的影响 Tet对ADP、胶原或AA诱导的血小板聚集均有明显的抑制作用，其抑制效应呈剂量依赖性。Tet对ADP、胶原或AA诱导聚集的IC_{50}（聚集抑制率50%时的药物浓度）分别为38.9、30.3和44.3μg/ml（图1a、1b、1c）。

Tet与潘生丁联合应用对胶原诱导的血小板聚集的影响 Tet 50μg/ml与潘生丁100μg/ml分别单独作用于血小板，对聚集的抑制率各为70.9%和60.3%。当两者合用时，在6次实验中，其抑制率均达100%（图2）。经双因素方差分析（F检验）表明，两者有明显的交互作用（$P<0.02$）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

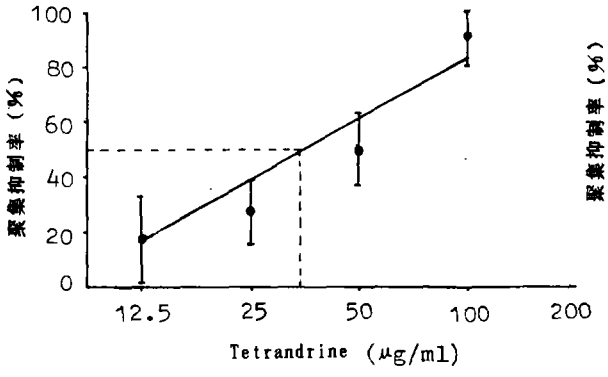


图1a Tet对ADP诱导的血小板聚集的影响

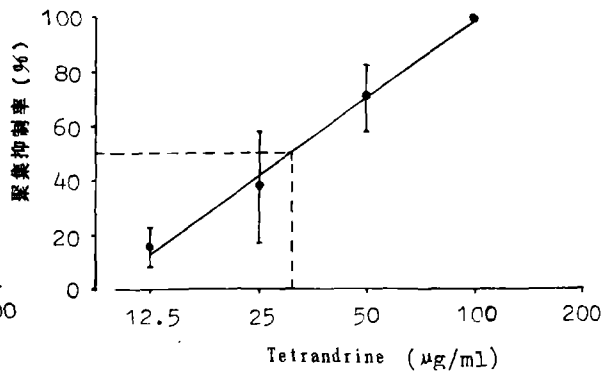


图1b Tet对胶原诱导的血小板聚集的影响

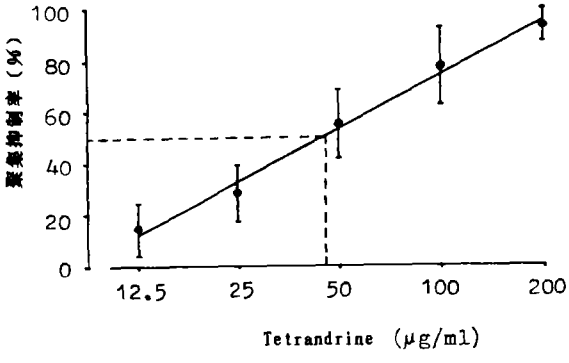


图1c Tet对AA诱导的血小板聚集的影响

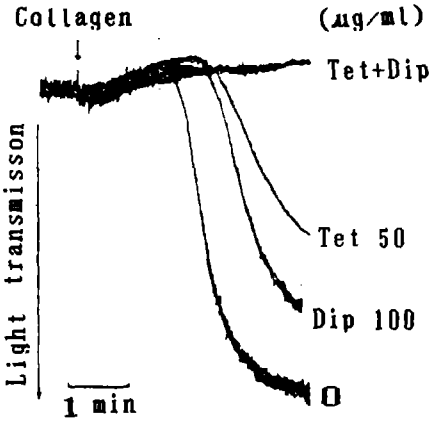


图2 Tet与潘生丁联合使用对血小板聚集影响的一次实验记录曲线

氯化钙对Tet抑制血小板聚集的影响 0.15 mmol/L 和0.5mmol/L $CaCl_2$ 对胶原诱导的聚集基本没有影响。Tet 50μg/ml 明显抑制血小板聚集，其抑制率为72.6%，加用 $CaCl_2$ 后，Tet 对血小板聚集的抑制作用明显减弱（图3）。提示钙可以对抗Tet的作用，且这种效应与 Ca^{2+} 浓度有关。

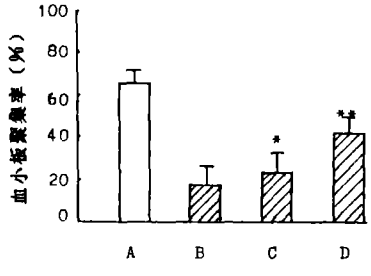


图3 $CaCl_2$ 对Tet抑制血小板聚集的影响

A—正常对照；B—Tet (50μg/ml)；
C—Tet (50μg/ml) + $CaCl_2$ (0.15mmol)；
D—Tet (50μg/ml) + $CaCl_2$ (0.5mmol)
与B组相比，*$P>0.05$ **$P<0.01$

Tet对血小板形态改变的影响 经胶原刺激后，血小板出现明显的激活现象，轻者伪足增加，形态不规则，重者血小板膜破坏，管道系统扩张，颗粒结构减少，甚至结构完全破坏，血小板间连成一片（图4）。而用Tet 50μg/ml 作用于血小板1 min后再用胶原刺激，其激活现象不明显，与未经胶原刺激的对照组血小板相似，血小板膜及细胞器结构正常，颗粒无明显减少（图5）。提示Tet抑制血小板受胶原刺激后的形态改变和释放反应。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

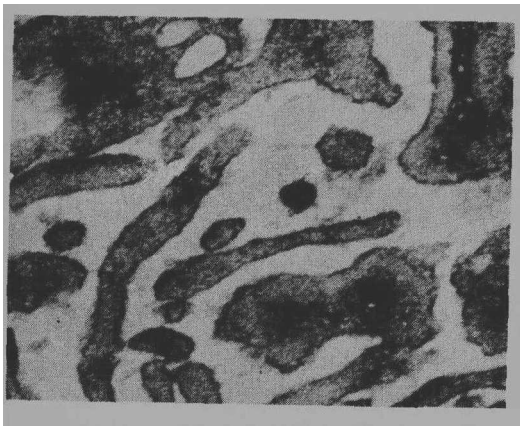


图 4 胶原刺激兔血小板发生形态改变 ×30 000

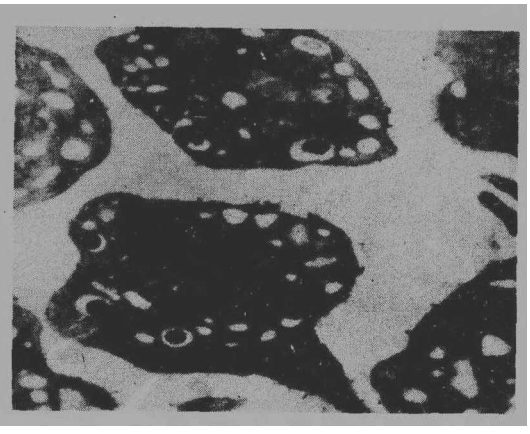


图5 胶原刺激经Tet预处理的兔血小板形态 ×3 0000

讨 论

本实验结果表明，Tet 在体外能明显抑制ADP、胶原或AA诱导的兔血小板聚集，其效应呈剂量依赖性。电镜观察血小板超微结构发现Tet抑制胶原诱导的血小板形态改变、保护结构完整以及抑制致密颗粒及α颗粒释放，从而为 Tet 抑制血小板功能提供了形态学依据。由于致密颗粒和α颗粒各自含有不同的物质，测定血小板5-HT 释放只能了解致密颗粒释放反应，而用电镜可以同时观察几种颗粒，但缺点是难以定量。

增加细胞外钙可以减弱 Tet 对血小板的抑制作用，表明 Tet 的作用与钙有关。由于这三种诱导剂在激活血小板时不引起钙内流[4]，所以 Tet 对血小板的作用可能主要不涉及到钙通道阻滞。有资料表明，Tet 对血小板的作用可能与其拮抗钙调蛋白有关（待发表资料）。

Tet伍用潘生丁明显加强它们各自对血小板聚集的抑制作用，提示临床联合使用这两种药物将有所裨益。然而，本研究为体外实验，Tet在体内是否抑制血小板尚待进一步研究。

（感谢组胚教研室郑世彬教授指导观察血小板超微结构）

参 考 文 献

1. 武汉医学院附一院内科心血管病组。汉防己甲素治疗冠心病心绞痛的初步疗效观察。武汉医学院学报 1976；（3）：110
2. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 1962; 194(4832):927
3. Sawatzks CL. Fixation and embedding of small volumes of platelets for transmission electron microscopy. J Clin Pathol 1980; 33(6):600
4. Murer EH. The role of platelet calcium. Semi Hematol 1985; 22(4):313

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of Tetrandrine on Aggregation and Morphological Changes of Platelets in Rabbits

Qian Yueming and Huang Yuehua (Department of Pharmacology, Third Military Medical College)

The effects of tetrandrine on the aggregation and morphological changes of platelets were studied by using the rabbit platelet-rich plasma prepared with centrifugation.

It was found that tetrandrine could markedly inhibit the platelet aggregation induced by ADP, collagen, and arachidonic acid with an IC_{50} (50% inhibitory concentration) of 38.9, 30.3 and 44.3 μg/ml respectively. The platelets pretreated with tetrandrine could not be stimulated to initiate morphological changes and granule release, and their normal structures were well preserved. In addition, dipyridamole could enhance but excessive amount of extracellular calcium could weaken the inhibition of tetrandrine on platelet aggregation.

Key words: Tetrandrine/pharmacodynamics; Platelet aggregation/drug effect; Blood platelets/ultrastructure; Dipyridamole/pharmacodynamics; Calcium/physiology

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net