

阿司匹林与异钩藤碱合用的抗血小板聚集作用

张玮¹, 周元分¹, 郝星², 石京山¹, 谢笑龙^{1*} (1.遵义医学院药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563000; 2.遵义医学院附属医院心血管内科, 贵州 遵义 563000)

摘要: 目的 观察阿司匹林(ASP)与异钩藤碱(Iso)合用对家兔体外血小板聚集的影响。方法 通过体外血小板聚集实验, 采用比浊法测定 ASP 与 Iso 合用对胶原(Col)、凝血酶(Thr)及二磷酸腺苷(ADP)诱发的家兔血小板聚集率的影响。结果 ASP 与 Iso 合用可抑制由 Col(50 mg·L⁻¹)、Thr(3 U·mL⁻¹)及 ADP(15 μmol·L⁻¹)诱导的血小板聚集。结论 ASP 与 Iso 合用能协同抑制家兔体外血小板聚集。

关键词: 阿司匹林; 异钩藤碱; 血小板聚集

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)03-0295-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.009

Effects of Combination of Aspirin and Isorhynchophylline on Antiplatelet Aggregation

ZHANG Wei¹, ZHOU Yuanfen¹, HAO Xing², SHI Jingshan¹, XIE Xiaolong^{1*} (1.Department of Pharmacology of Zunyi Medical College and Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province, Zunyi 563000, China; 2.Department Cardiovascular of Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of the combination of aspirin(ASP) and isorhynchophylline(Iso) on rabbit platelet aggregation *in vitro*. **METHODS** The rabbit platelet aggregation induced by collagen(Col), thrombin(Thr), and adenosine diphosphate(ADP) *in vitro* was determined by Born method, respectively. **RESULTS** Combination of ASP and Iso concentration-dependently inhibited platelet aggregation induced by Col(50 mg·L⁻¹), Thr(3 U·mL⁻¹) and ADP(15 μmol·L⁻¹). **CONCLUSION** Combination of ASP and Iso has the effect of synergistic inhibition on platelet aggregation.

KEY WORDS: aspirin; isorhynchophylline; platelet aggregation

心脑血管疾病为常见病、多发病, 血小板聚集并最终导致血栓形成或栓塞是心、脑、外周血管疾病的共同病理基础。阿司匹林(aspirin, ASP)作为抗血小板治疗的基础药物, 已被广泛应用于防治各种血栓性疾病。生理状态下的血小板聚集是多因素共同作用的结果, 而 ASP 不能防止多种诱导剂联合使用引起的血小板聚集, 也不能抑制血小板聚集的全部途径^[1], 且长期使用 ASP 易发生胃溃疡、胃出血等严重消化系统损害。寻找能与 ASP 合用防治血栓性疾病的其他抗血小板药物成为重要的研究方向。异钩藤碱(isorhynchophylline, Iso)为传统中药钩藤的主要生物碱, 具有扩血管^[2]、降血压^[3-4]、抗血管成纤维细胞增殖及胶原合成^[5]、抑制血栓形成^[6]的作用。本实验以上述结果为线索, 研究 ASP 与 Iso 合用对胶原(collagen, Col)、凝血酶(thrombin, Thr)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导的血小板聚集的影响, 比

较 ASP 与 Iso 合用较该二药单用是否有增强作用, 旨在为该类药物的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物、药品和试剂

家兔, ♂, 体质量 2.5~3.0 kg, 由遵义医学院实验动物中心提供, 实验动物合格证号: 20100005。ASP(美国 Alfa Aesar 公司, 批号: D4831C), 用时蒸馏水配置; Iso(广西东兰制药厂, 批号: 20130615, 纯度: 99%); 异戊巴比妥(上海化学试剂公司); Col(北京索莱宝科技有限公司); ADP(华美生物工程公司); Thr(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 仪器

LBY-NJ2 血液凝聚仪(北京普利生仪器中心); KDC-2044 低速冷冻离心机(科大创新股份有限公司); 肝素钠管(购自由遵义医学院附属医院设备中心)。

作者简介: 张玮, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0851)28642405
(0852)8642405 E-mail: m13017407231@163.com

E-mail: zhangweizwszbd@163.com

*通信作者: 谢笑龙, 男, 教授 Tel:

2 方法

2.1 血小板的制备

家兔用 3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉 (30 mg·kg⁻¹), 颈动脉插管取血, 800 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清即得富血小板血浆 (PRP), 剩余部分 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清即得贫血小板血浆 (PPP), 用 PPP 调 PRP 血浆为 (400~450) × 10⁹·L⁻¹, 备用。

2.2 血小板聚集率的测定

每份取上述调好的 PRP 290 μL, 分别加入 ASP 使终浓度依次分别为 0.85, 1.69, 2.78 mmol·L⁻¹, Iso 浓度依次为 0.33, 0.65, 1.30 mmol·L⁻¹ 各 10 μL; ASP+Iso(0.85+0.33, 0.85+0.65, 0.85+1.30, 1.69+0.33, 1.69+0.65, 1.69+1.30, 2.78+0.33, 2.78+0.65, 2.78+1.30 mmol·L⁻¹) 各 5 μL; 空白组加入生理盐水 10 μL。37 °C 恒温孵育 5 min, 分别加入诱导剂 Col(50 mg·L⁻¹), Thr(3 U·mL⁻¹), ADP(15 μmol·L⁻¹) 均为终浓度, 记录血小板最大聚集率。

2.3 数据处理

血小板聚集抑制率/% = (空白管血小板聚集率 - 给药管血小板聚集率) / 血小板聚集抑制率 × 100%。协同效应用 Q 值表示^[7]: Q = 实测合并效应 / ($E_A + E_B - E_A \times E_B$)。 E_A , E_B 分别为两药单用时的效应。 $Q < 1$ 时为拮抗; $Q = 1$ 时为相加; $Q > 1$ 时为增强; $Q \geq 1$ 时总称为协同。

所有数据采用 SPSS17.0 软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

3 结果

ASP(0.85, 1.69, 2.78 mmol·L⁻¹) 或 Iso(0.65, 1.30 mmol·L⁻¹) 单用均可显著抑制 ADP 诱导的血小板聚集, ASP 和 Iso 的 IC₅₀ 值分别为 2.44, 1.79 mmol·L⁻¹, 结果见表 1。 1.69, 2.78 mmol·L⁻¹ 的 ASP 或 0.65, 1.30 mmol·L⁻¹ 的 Iso 单用可抑制 Thr, Col 诱导的血小板聚集。对 Thr 诱导的血小板聚集 ASP 和 Iso 的 IC₅₀ 值分别为 3.32, 2.50 mmol·L⁻¹, 对 Col 诱导的血小板聚集 ASP 和 Iso 的 IC₅₀ 值分别为 2.36, 1.73 mmol·L⁻¹。结果见表 2~3。

与单用 ASP 相比, ASP 与 Iso 合用(0.85+0.33, 0.85+0.65, 0.85+1.30, 1.69+0.65, 1.69+1.30, 2.78+0.65, 2.78+1.30 mmol·L⁻¹) 对 ADP 诱导的体

外血小板聚集具有抑制作用; 与单用 Iso 相比, ASP 与 Iso 合用各浓度组对 ADP 诱导的体外血小板聚集均具有抑制作用, 见表 1。

与单用 ASP 相比, ASP 与 Iso 合用(0.85+0.33, 0.85+0.65, 0.85+1.30, 1.69+0.33, 1.69+0.65, 1.69+1.30, 2.78+0.65, 2.78+1.30 mmol·L⁻¹) 对 Thr 诱导的体外血小板聚集具有抑制作用, 与单用 Iso 相比, ASP 与 Iso 合用(0.85+0.33, 0.85+0.65, 0.85+1.30, 1.69+0.33, 1.69+0.65, 1.69+1.30, 2.78+0.33, 2.78+0.65, 2.78+1.30 mmol·L⁻¹) 对 Thr 诱导的体外血小板聚集具有抑制作用, 见表 2。

与单用 ASP 相比, ASP 与 Iso 合用(0.85+0.33, 0.85+0.65, 0.85+1.30, 1.69+0.65, 1.69+1.30, 2.78+0.65, 2.78+1.30 mmol·L⁻¹) 对 Col 诱导的体外血小板聚集具有抑制作用; 与单用 Iso 相比, ASP 与 Iso 合用(0.85+0.65, 0.85+1.30, 1.69+0.33, 1.69+0.65, 1.69+1.30, 2.78+0.33, 2.78+0.65, 2.78+1.30 mmol·L⁻¹) 对 Col 诱导的体外血小板聚集具有抑制作用, 见表 3。

Q 值均 > 1 , 显示具有协同抑制作用, 见表 1~3。

表 1 ASP 和 Iso 对 ADP 诱导的家兔体外血小板聚集的影响 ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of ASP and Iso on the rabbit platelet aggregation induced by Col *in vitro* ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ mmol·L ⁻¹	血小板 聚集率/%	抑制率/%	Q 值
空白组	-	48.33±4.50	-	
ASP	0.85	41.81±1.88 ¹⁾	13.51±3.90	
	1.69	32.87±3.75 ¹⁾	32.00±7.75	
	2.78	20.74±2.63 ¹⁾	57.09±5.45	
Iso	0.33	46.45±1.17	3.89±2.43	
	0.65	40.61±2.34 ¹⁾	16.86±4.84	
	1.30	32.36±2.62 ¹⁾	33.05±5.42	
ASP+ Iso	0.85+0.33	35.35±2.58 ¹⁾	26.86±5.35 ²⁾	1.59
	0.85+0.65	30.25±4.35 ¹⁾	37.42±9.01 ²⁾	1.33
	0.85+1.30	26.80±4.01 ¹⁾	44.55±8.30 ²⁾	1.06
	1.69+0.33	28.24±4.53 ¹⁾	41.58±9.37 ³⁾	1.20
	1.69+0.65	24.15±4.54 ¹⁾	50.04±9.39 ²⁾	1.15
	1.69+1.30	20.64±3.65 ¹⁾	54.75±7.56 ²⁾	1.01
	2.78+0.33	17.46±2.43 ¹⁾	63.87±5.03 ³⁾	1.09
	2.78+0.65	15.54±2.81 ¹⁾	67.84±5.81 ²⁾	1.05
	2.78+1.30	13.56±2.93 ¹⁾	72.07±6.07 ²⁾	1.01

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与单用 ASP 组相比, ²⁾ $P < 0.05$; 与单用 Iso 组相比, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with ASP group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with Iso group, ³⁾ $P < 0.05$ 。

表2 ASP 和 Iso 对 Thr 诱导的家兔体外血小板聚集的影响($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of ASP and Iso on the rabbit platelet aggregation induced by Thr *in vitro*($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ mmol·L ⁻¹	血小板 聚集率/%	抑制率/%	Q 值
空白组	—	71.70±9.18	—	
ASP	0.85	67.74±1.84	5.52±2.56	
	1.69	55.51±6.19 ¹⁾	22.58±8.63	
	2.78	43.71±6.31 ¹⁾	39.04±8.81	
Iso	0.33	66.85±2.32	6.77±3.23	
	0.65	57.84±3.10 ¹⁾	18.71±4.32	
	1.30	51.19±5.96 ¹⁾	28.61±8.31	
ASP+ Iso	0.85+0.33	56.10±5.64 ¹⁾	21.76±7.86 ²⁾³⁾	1.83
	0.85+0.65	50.30±4.59 ¹⁾	29.85±6.41 ²⁾³⁾	1.29
	0.85+1.30	48.18±5.73 ¹⁾	32.80±7.99 ²⁾³⁾	1.01
	1.69+0.33	45.20±5.22 ¹⁾	36.96±7.28 ²⁾³⁾	1.33
	1.69+0.65	42.38±4.91 ¹⁾	40.90±6.85 ²⁾³⁾	1.10
	1.69+1.30	38.51±4.62 ¹⁾	46.47±6.44 ²⁾³⁾	1.04
	2.78+0.33	38.78±5.35 ¹⁾	45.91±7.46 ³⁾	1.06
	2.78+0.65	35.08±4.01 ¹⁾	51.07±5.59 ²⁾³⁾	1.01
	2.78+1.30	31.08±4.61 ¹⁾	57.71±6.43 ²⁾³⁾	1.02

注:与空白组相比, ¹⁾ $P<0.05$;与单用 ASP 组相比, ²⁾ $P<0.05$;与单用 Iso 组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with ASP group, ²⁾ $P<0.05$; compared with Iso group, ³⁾ $P<0.05$ 。

表3 ASP 和 Iso 对 Col 诱导的家兔体外血小板聚集的影响($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of ASP and Iso on the rabbit platelet aggregation induced by ADP *in vitro*($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ mmol·L ⁻¹	血小板 聚集率/%	抑制率/%	Q 值
空白组	—	41.70±4.64	—	
ASP	0.85	36.82±1.91	11.69±4.59	
	1.69	25.48±3.40 ¹⁾	38.89±8.15	
	2.78	18.68±2.41 ¹⁾	55.19±5.79	
Iso	0.33	38.29±1.04	8.17±2.49	
	0.65	29.62±4.34 ¹⁾	24.98±10.40	
	1.30	26.18±4.36 ¹⁾	37.21±10.45	
ASP+ Iso	0.85+0.33	31.48±4.55 ¹⁾	24.50±10.92 ²⁾	1.30
	0.85+0.65	25.28±4.03 ¹⁾	39.37±9.66 ²⁾³⁾	1.17
	0.85+1.30	21.18±3.29 ¹⁾	49.20±7.88 ²⁾³⁾	1.10
	1.69+0.33	22.18±3.25 ¹⁾	46.81±7.79 ³⁾	1.07
	1.69+0.65	18.38±2.34 ¹⁾	55.92±5.61 ²⁾³⁾	1.03
	1.69+1.30	14.57±1.81 ¹⁾	63.07±4.34 ²⁾³⁾	1.02
	2.78+0.33	16.83±2.05 ¹⁾	59.65±4.91 ³⁾	1.01
	2.78+0.65	13.79±2.51 ¹⁾	66.94±6.03 ²⁾³⁾	1.01
	2.78+1.30	12.52±2.58 ¹⁾	71.98±6.20 ²⁾³⁾	1.00

注:与空白组相比, ¹⁾ $P<0.05$;与单用 ASP 组相比, ²⁾ $P<0.05$;与单用 Iso 组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with ASP group, ²⁾ $P<0.05$; compared with Iso group, ³⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

血栓形成与血小板聚集增多、功能亢进相关。抑制血小板异常聚集的发生,对心脑血管性疾病及其他血栓栓塞性疾病的防治具有重要意义。目前,小剂量 ASP 已广泛应用于冠心病、脑缺血、脑梗塞等心脑血管疾病的防治。ASP 通过不可逆抑制血小板 COX-1 的活性减少 TXA₂ 的合成释放,起到抗凝作用。但血小板聚集形成血栓与机体内多途径多因子作用相关联,单一抗血小板药物的作用存在一定的局限性。而大剂量的 ASP 有促凝倾向,且对于需长期用药患者,ASP 可导致严重的消化道损伤,如上消化道大出血、无症状性溃疡等。因此,为增强疗效减少不良反应,寻求可与 ASP 配伍使用的抗血小板聚集药物日益受到关注。本研究选用 3 种致聚剂 Col、ADP、Thr 分别代表不同的血小板激活途径,观察 ASP 与 Iso 合用对血小板聚集的影响。结果显示,ASP 与 Iso 按一定比例合并使用,能明显对抗家兔体外血小板聚集,与两药相应剂量单用比较, Q 值在 1~1.83 之间,表明作用增强,呈协同效应。说明两药合用不但可以提高抗血小板聚集作用,而且推测通过调整比例减少 ASP 用量可减少其不良反应的发生。

REFERENCES

- [1] CHRONOS N A, WILSON D J, JANES S L, et al. Aspirin does not affect the flow cytometric detection of fibrinogen binding to, or release of alpha-granules or lysosomes from human platelets [J]. Clin Sci (Lond), 1994, 87(5): 575-580.
- [2] ZHANG W B, CHEN C X, SIM S M, et al. *In vitro* vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hook of *Uncaria rhynchophylla* [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2004, 369(2): 232-238.
- [3] 周吉银, 周世文, 贺燕. 异钩藤碱药理作用的最新研究进展 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 596-599.
- [4] ZHOU J Y, ZHOU S W. Isorhynchophylline: A plant alkaloid with therapeutic potential for cardiovascular and central nervous system diseases [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 617-626.
- [5] JIANG Y H, LI Y L, REN C J, et al. Uncaria extract inhibits VAF proliferation and collagen deposition induced by angiotensin II [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2012, 28(5): 659-664.
- [6] XIE X L, WU M, WU Q, et al. Effect of Isorhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2008, 43(4): 280-283.
- [7] LU A G, HU X J, REN Y J, et al. Effects of combination of aspirin and nimodipine on platelet aggregation [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 1998, 14(5): 422-424.

收稿日期: 2014-08-31