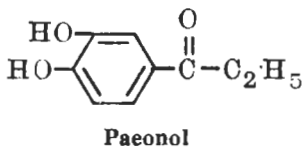


丹皮酚对兔实验性动脉粥样硬化及血小板聚集的抑制作用¹石琳、范盘生、方几希²、韩志新² (苏州医学院药理教研室、²组织胚胎教研室, 苏州 215007)

提要 用食饵性动脉粥样硬化(AS)模型, 研究丹皮酚的抗AS作用。结果造型加丹皮酚组主动脉内膜病变肉眼定级及形态学组化分析, 均比造型对照组显著减轻。表明ip丹皮酚100 mg/kg qd, 连续6 wk能明显抑制AS斑块形成, 其作用机理与抑制血小板聚集和释放反应有关。

关键词 丹皮酚; 动脉粥样硬化; 组织细胞化学; 低密度脂蛋白; 高密度脂蛋白; 血小板聚集

丹皮酚(paeonol)系芍药科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitag 及毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr 根皮中的活性成份, 已人工合成。丹皮酚及徐长卿具有镇痛消炎作用。非固醇类镇痛消炎药, 如保泰松、羟保泰松、氟灭酸等具有抑制实验性AS斑块形成作用⁽¹⁻³⁾。丹皮酚对AS斑块形成的影响如何尚未见报道。本文用食饵性AS模型研究丹皮酚对AS兔主动脉内膜斑块形成的影响, 并分析了丹皮酚对血小板聚集功能及血清脂质、脂蛋白胆固醇含量的影响。



材 料

丹皮酚磺酸钠注射剂系上海第一制药厂产品, ADP-Na系Sigma产品, 凝血酶由中国医科院天津血液病研究所提供, 胆固醇测定酶联试剂(含胆固醇氧化酶、胆固醇脂酶、辣根过氧化物酶)由上海医药工业研究院生化室提供。分离HDL及HDL亚组份用沉淀剂I及沉淀剂II均由广东普宁洪阳化剂室提供, 胆固醇标

准品经3次重结晶制成。

BS-631型血小板聚集仪系北京生化仪器厂产品。RF-510型荧光分光光度计系日本岛津产品。

兔18只, ♀♂各半, 体重 $2.1 \pm SD 0.3$ kg。

方法与结果

丹皮酚对食饵性AS斑块形成的影响

1. 复制AS模型及主动脉内膜病变定级 兔18只均分3组: 正常对照组: 喂普通饲料; AS造型对照组: 在普通饲料中每日每只加喂胆固醇1g复制AS模型。造型加丹皮酚组: 在AS造型的同时, 每日ip丹皮酚100 mg/kg, 每周6次, 连续6 wk。全部免于实验前空腹耳缘静脉取血测血脂、脂蛋白胆固醇。治疗6 wk后摘出主动脉, 2.5%戊二醛固定, 沿主动脉前壁中线纵行剪开, 经苏丹III染色后, 进行内膜斑块肉眼定级及形态学组织化学分析, 根据主动脉内膜病变从轻到重分为6级, 即0, 0.5, 1, 2, 3, 4级进行内膜病变定级。

结果表明, 内膜病变多发部位主要为主动脉根部, 特别是动脉分支开口处及环瓣区, 少数波及整个胸主动脉及腹主动脉。根据内膜病变肉眼定级的分析, 丹皮酚对兔主动脉内膜AS斑块形成有明显的抑制作用, 造型加丹皮酚组内膜病变比造型对照组内膜病变轻, 斑块少而小。按等级分组资料的Ridit检验进行统计处理, 两组间变化差异显著, $p < 0.05$ (表1)。

2. 主动脉内膜病变形态学组化分析 内膜病变肉眼定级后, 在主动脉根病变处切片, 用组化法测定AS病变中内膜增生、脂质沉积、结缔组织增生等程度及损伤范围的变化。用HE染色作一般组织学形态观察, 用Sudan III及ANAE(酸性 α -萘酚酞)染色显示脂斑及鉴别泡沫细胞的来源; 用orcein染色显示

1987年3月10日收稿 1988年6月1日接受

¹ 国家自然科学基金资助项目 No 3860706

Tab 1. Atherosclerotic plaque formation on aorta of rabbits treated with ip paeonol 100 mg/kg qd × 6 wk. n = 6 rabbits. **p < 0.05 vs atherosclerosis model.

Plaque severity	Cholesterol		1 g/d	
	Paeonol	0	0	0.1 g/kg
0		6	0	1
0.5		0	0	1
1		0	1	2
2		0	0	1
3		0	0	1
4		0	4	0
\bar{x}		0	3.33	1.25**

弹性纤维；用 Alcian blue 染色显示结缔组织基质物质粘多糖。

斑块内各组份的变化：正常对照组主动脉内膜光滑，内弹力膜完整，内皮紧贴内弹力膜排列整齐，Sudan III 及 ANAE 染色阴性，指示内膜无脂质浸润。中层弹力膜与平滑肌相间平行排列，外膜完整无异常。造型对照组内膜增厚约占动脉壁全厚的 1/4-1/3，内膜有缺损，内皮下泡沫细胞 4-7 层，Sudan III 及 ANAE 染色强阳性，提示有大量脂质沉积。病变多发于动脉分支处，该处内皮呈火山口样缺损，内弹力膜排列紊乱、断裂，缺损处可见中层平滑肌细胞侵入内迁，病变损坏处，中膜浅层部份平滑肌细胞核的走向垂直于内膜，内膜及中膜 Alcian blue 蓝染增多，提示基质物质粘多糖增多。造型加丹皮酚组除一例脂质浸润面积较大外，其余五例肉眼仅见脂点及脂纹，无斑块形成，病变内膜呈局灶性隆起，有泡沫细胞 1-2 层，脂质含量少，呈弱嗜 Sudan 性，尚未形成泡沫细胞，ANAE 染色阴性，局部内弹力膜断裂、缺损，但大多数病损区内皮细胞未见缺损，提示丹皮酚能抑制内膜病变形成。中层弹性膜排列规则，平滑肌与弹性膜平行未见异常，镜检结果与内膜病变肉眼定级结果一致。

丹皮酚对血清脂蛋白中胆固醇含量的影响
6 兔给药前、治疗 4 及 6 wk 停药后取血，按双沉淀法快速分离血清高密度脂蛋白(HDL)及

亚组份(HDL₃)⁽⁵⁾。按胆固醇氧化酶法测定血脂各组份中胆固醇含量⁽⁶⁾。分析指标有血清总胆固醇(TCh)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL_c)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL_c)及其亚组份胆固醇(HDL_{2c}、HDL_{3c})，按公式计算 LDL_c⁽⁷⁾及 HDL_{2c}⁽⁸⁾。

结果表明：口服胆固醇 4 wk，血清 TCh 及 TG 含量比造型前显著升高，提示实验性高脂血症模型复制成功。6 wk 后取血进行分析，造型加丹皮酚组血脂各组份中胆固醇含量与造型对照组无明显差异，LDL_c 有下降趋势但无统计学意义；HDL_c、HDL_{2c}、HDL_{3c} 有所上升但不显著(表 2)。

Tab 2. Serum cholesterol levels (mmol/L) in atherosclerotic rabbits treated with ip paeonol 100 mg/kg qd × 6 wk. n = 6 rabbits, $\bar{x} \pm SD$. *p > 0.05 vs untreated group

	Untreated	Treated
TCh	19.60 ± 0.77	19.38 ± 0.91*
TG	1.19 ± 0.45	1.25 ± 0.76*
LDL _c	18.17 ± 0.89	17.67 ± 0.54*
HDL _c	0.71 ± 0.18	0.77 ± 0.16*
HDL _{2c}	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.10*
HDL _{3c}	0.42 ± 0.16	0.50 ± 0.13*

丹皮酚对血小板聚集和释放反应以及血小板 cAMP 含量的影响

1. 体外给药对血小板聚集的影响 兔 12 只，颈总动脉取血制备血小板悬液，用凝血酶诱导血小板聚集，按比浊法测定血小板聚集性⁽⁸⁾。结果血小板悬液中分别加入丹皮酚 25, 50, 100, 200 μg/ml 后，对血小板聚集均有明显的抑制作用，抑制率分别为 21 ± 11(p > 0.05), 21 ± 7(p < 0.05), 51 ± 13(p < 0.05), 64 ± 20%(p < 0.05)。抑制效应与剂量有关。

2. 体内给药对血小板聚集的影响 大鼠 16 只，8 只鼠麻醉后舌下 iv 丹皮酚 50 mg/kg, 15 min 后腹主动脉取血制备血小板悬液，另 8 只鼠用等量生理盐水作对照。用凝血酶 0.25 U/ml 诱导血小板聚集，结果丹皮酚 iv 同样可以明显抑制血小板聚集(p < 0.01)。

3. 丹皮酚对鼠5-HT释放的影响 取洗涤的富血小板血浆 (PRP) 400 μ l, 用凝血酶 0.25 U/ml 诱导血小板释放反应观察加入丹皮酚 25, 50, 100, 200 μ g/ml 后 5-HT 释放量的变化, 用荧光分光光度计测 5-HT 荧光读数. 测试条件: 狭缝均选用 10 nm, 增益用硫酸奎宁 2.0 μ mol/L 调至 3; 激发光波长 365 nm, 发射光波长 480 nm. 测定结果按下式⁽⁹⁾计算: 5-HT 释放率 = 上清液 5-HT 含量 / (上清液 5-HT 量 + 血小板内 5-HT 量) \times 100%

结果表明, 丹皮酚能明显抑制大鼠内源性 5-HT 释放, 抑制效应与剂量相关 ($r = 0.974$), 随着剂量增大, 抑制释放作用逐渐加强 (图 1).

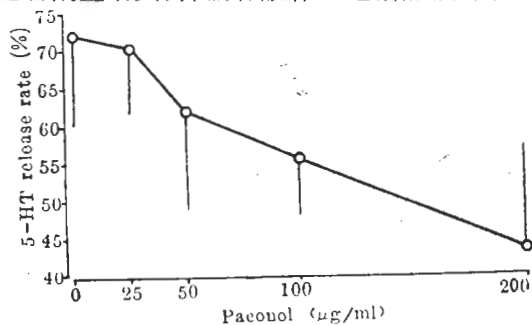


Fig 1. Effect of paeonol on endogenous 5-HT release of rat platelets. $n = 8$, $\bar{x} \pm SD$

4. 丹皮酚对兔血小板 cAMP 含量的影响 用竞争性蛋白结合分析法测血小板内 cAMP 含量变化⁽⁸⁾. 分析抑制血小板聚集剂量的丹皮酚对血小板内 cAMP 含量的影响.

结果血小板悬液加丹皮酚 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml 后, 剂量从 50 μ g/ml 以上血小板内 cAMP 含量均显著增高 (图 2).

讨 论

丹皮酚 100 mg/kg 连用 6 wk, 对兔动脉内膜斑块形成有明显的抑制作用, 抑制 AS 斑块形成的机理, 可能与抑制血小板聚集和释放反应及减少血小板活性物质释放有关. 近年的研究⁽¹⁰⁾表明, 血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 是致有丝分裂因子 (mitogen), 又是趋化因子, 对细胞 DNA 合成, 氨基酸转运和脂质代谢有明显影响. 当血小板活化后, PDGF 可随释放反应从

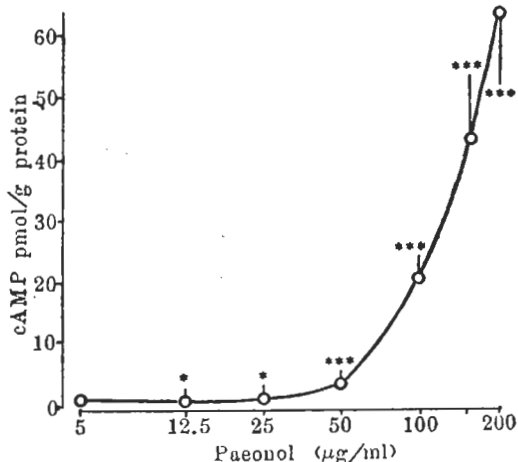


Fig 2. Effect of paeonol on cAMP concentration of rabbit platelets. $n = 8$, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

血小板 α -颗粒中释出, 促使血管中层平滑肌细胞向内皮下迁移、增殖并分泌结缔组织基质, 导致内膜病变发生和发展. 丹皮酚明显抑制血小板聚集和释放反应, 势必削弱或延缓 AS 病变成形.

脂质沉积是 AS 病变发生的重要环节之一, AS 病灶中的脂质主要以富含胆固醇的 LDL 形式沉积于动脉壁、LDL 含量增高, 可损伤内皮细胞, 刺激平滑肌细胞增生. 丹皮酚在抑制内膜 AS 斑块形成的同时, 血清脂蛋白胆固醇含量无明显改变, 提示丹皮酚抑制 AS 斑块形成, 不是通过调节血脂代谢途径来实现, 而非固醇类镇痛消炎药的作用⁽¹⁻³⁾一致.

参 考 文 献

- 1 Bailey JM, Makheja AN, Butler J, Salata K. Antiinflammatory drugs in experimental atherosclerosis. Part 4. Inhibition of atherosclerosis *in vivo* and thromboxane synthesis and platelet aggregation *in vitro*. *Atherosclerosis* 1979; 32 : 195
- 2 Koster JK, Gryglewski RJ. The effect of low-dose aspirin and dipyridamole upon atherosclerosis in atherosclerosis in the rabbit. *Artery* 1981; 9 : 405
- 3 Bailey JM, Bulter J. Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis. Part 6. Combination therapy with steroid and non-

- steroid agents. *Atherosclerosis* 1985; 54 : 205
- 4 Smith RL, Hilker DM. Experimental dietary production of aortic atherosclerosis in Japanese quail. *Ibid* 1973; 17 : 63
 - 5 李丹宇、庄汉忠、陈颢珠、浦寿月、诸骏仁。血清高密度脂蛋白亚组份的分离及其胆固醇含量的测定。上海第一医学院学报 1984; 11 : 241
 - 6 韩琴琴、严秀萍、庄汉忠。应用国产酶试剂测定血清胆固醇的方法。同上 1984; 11 : 181
 - 7 Yoshida Y, Wissler RM. Effects of normal lipidermic high-density lipoproteins on proliferation of monkey aortic smooth muscle cells induced by hyperlipidermic low-density lipoproteins. *Exp Mol Pathol* 1984; 41 : 258
 - 8 石琳、吴婵群、杨毓麟、梁中琴、刘世增、李尹民。原儿茶醛对血小板聚集性和血小板内 cAMP 含量的影响。苏州医学院学报 1982; 2 : 1
 - 9 秦正红、石琳。用荧光偏振方法研究槲皮素对血小板膜脂质流动性的影响。药学学报 1987; 22 : 491
 - 10 Antoniadis HN, Williams LT. Human platelet-derived growth factor: structure and function. *Fed Proc* 1983; 42 : 2630

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Nov; 9 (6) : 555-558

Inhibitory effects of paeonol on experimental atherosclerosis and platelet aggregation of rabbit

SHI Lin, FAN Pan-Sheng, FANG Ji-Xi¹, HAN Zhi-Xing¹ (Department of Pharmacology,

¹Department of Histology and Embryology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT Aortic intimal abnormalities in rabbits treated with paeonol (100 mg/kg ip, qd × 6 wk) were significantly less than in the atherosclerotic control group. The serum lipoproteins contents had no obvious difference in the two groups at the end of the experiment.

Paeonol clearly inhibited the platelet aggregation of rabbits *in vitro* (50, 100, 200 mg/ml PRP) and of rats *in vivo* (50 mg/kg iv) induced by thrombin. 5-HT re-

lease of platelet in rats was restrained by paeonol and the cAMP concentration of platelet in rabbits was significantly increased. These evidences suggest that the anti-atherogenic action of paeonol may be related to the inhibition of platelet aggregation and release.

KEY WORDS paeonol; atherosclerosis; histocytochemistry; LDL lipoproteins; HDL lipoproteins; platelet aggregation