

· 论 著 ·

荜茇酰胺对儿童抗凝、抗血小板聚集作用的体外实验研究*

郑 浩,高 飞,顾晓琼[△],刘云锋,皮 蕾,梁肖云
(广州市妇女儿童医疗中心检验科,广州 510623)

摘 要:**目的** 观察荜茇提取物荜茇酰胺(PL)对儿童具有抗血小板、抗凝作用,为临床用药提供实验依据。**方法** 抽取 30 名健康儿童静脉血,随机分为 5 组,分离富血小板血浆(PRP),取 PRP 分别加入二甲基亚砷(DMSO)作为空白组,加入阿司匹林(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)作为对照组,加入 PL(终浓度分别为 20、100、200 $\mu\text{mol/L}$)作为不同浓度 PL 组,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min,作用后 PRP 分别加入诱导剂二磷酸腺苷(ADP)终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$,胶原(Coll)终浓度 2.5 $\mu\text{g/mL}$,花生四烯酸(AA)500 $\mu\text{g/mL}$,采用比浊法在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下测定血小板聚集率。抽取静脉血分离血浆后分 5 组,将不同浓度 PL 分别与 3 组血浆混合,终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$,空白组将 1% DMSO 与血浆混合,对照组将肝素钠与血浆混合(35 U/mL),各组 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后上机检测纤维蛋白原(FIB)水平、凝血酶原时间(PT)及凝血酶时间(TT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)。**结果** 与对照组比较,PL(20、100、200 $\mu\text{mol/L}$)干预后对 AA、Coll 诱导的血小板聚集均有显著抑制作用($P<0.05$),PL 100 $\mu\text{mol/L}$ 、PL 200 $\mu\text{mol/L}$ 可以显著抑制 ADP 诱导的血小板聚集率($P<0.05$);PL 10 $\mu\text{mol/L}$ 、PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 干预后可以显著延长儿童血浆的 PT、APTT、TT 值($P<0.05$),但 FIB 未见明显变化。**结论** PL 能抑制儿童血浆的血小板聚集,抑制抗凝活性。

关键词: 荜茇酰胺; 抗血小板聚集; 抗凝

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2347-03

Inhibition of piperlongumine on platelet aggregation and blood coagulation for children in vitro study*

ZHENG Hao,GAO Fei,GU Xiaojiong[△],LIU Yunfeng,PI Lei,LIANG Xiaoyun

(Department of Clinical Laboratory,Guangzhou Women and Children's

Medical Center,Guangzhou,Guangdong 510623,China)

Abstract:**Objective** To observe the inhibition of piperlongumine in vitro on platelet aggregation and blood coagulation tests for children,to provide the experimental basis for clinical medication.**Methods** Venous blood samples from 30 children were randomly divided into 5 groups,and was centrifuge to separate platelet-rich plasma (PRP). After storing in 37 $^{\circ}\text{C}$ thermostat water bath for 5 minutes,the PRP which have been added DMSO as blank group,and added Aspirin (10 $\mu\text{mol/L}$)as control group,and added PL (20 $\mu\text{mol/L}$),PL(100 $\mu\text{mol/L}$),PL(200 $\mu\text{mol/L}$) as different concentrations of PL groups respectively,were induced by the addition of adenosine diphosphate (10 $\mu\text{mol/L}$),collagen(2.5 $\mu\text{g/mL}$) and the arachidonic acid(500 $\mu\text{g/mL}$). Then the platelet aggregation rate of the PRP from 5 groups could be measured by turbidimetry. Blood plasma isolated from venous blood was divided into 5 groups. In the PL groups,blood plasma were mixed up with PRP concentrations of which were 5,10,20 $\mu\text{mol/L}$. In the bland group,blood plasma were mixed up with DMSO (1%). In the control group,blood plasma were mixed up with heparin sodium(35 U/mL). After storing in 37 $^{\circ}\text{C}$ thermostat water bath for 5 minutes,fibrinogen(FIB),prothrombin time(PT),thrombin time(TT) and activated partial thromboplastin time of different groups were detected.**Results** Compared to the control group,the groups which were add PL with different concentrations (20,100,200 $\mu\text{mol/L}$) showed significant inhibition on platelet aggregation induced by AA and collagen($P<0.05$). PL with concentrations of 100 $\mu\text{mol/L}$ and 200 $\mu\text{mol/L}$ showed significant inhibition on platelet aggregation induced by ADP($P<0.05$). The PT,APTT,TT of blood plasma from children had been significantly prolonged by the intervention of PL 10 $\mu\text{mol/L}$ and PL 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$),however,no significant change of FIB was observed.**Conclusion** There are inhibitory effects of PL on platelet aggregation of blood plasma from children and anticoagulant activity in this study.

Key words: piperlongumine; anti-platelet aggregation; anticoagulant

阿司匹林(ASA)是抗血小板常用药,能使血小板环氧酶乙酰化,抑制血栓素 A2 合成^[1-2]。研究显示长期服用 ASA 的患者血小板聚集能力不能被很好地抑制,可能与存在阿司匹林抵抗(AR)有关^[3-4]。华法林是常用口服抗凝药,但易引起出血性疾病,包括胃肠道出血、脑出血等^[5-7]。荜茇有温中散寒、下气止痛等功效^[8]。荜茇酰胺(PL)分离自荜茇,具有抗凝、抗血小板等药理学作用^[9]。本研究在体外将 PL 应用于儿童血浆,检

测血小板聚集率以及凝血指标,旨在为 PL 应用于临床提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 10 月至 2016 年 10 月在本院健康体检的儿童 30 例,排除感染性疾病、肝、肾、心血管等疾病,排除药物过敏者。其中男 15 例,女 15 例;年龄 9 个月至 9 岁,平均年龄(4.5 $\pm$ 2.1)岁。本研究得到医院伦理委员会批准,同

意进行标本采集和临床资料的收集。全部纳入研究者均由临床医师提前征得监护人同意并填写知情同意书。

1.2 仪器与试剂 血小板聚集分析仪(美国 Helena 公司,型号:AggRAM);全自动凝血仪(法国 STAGO,型号:STA-R Evolution);离心机(北京白洋 320A);PL 为 Sigma 公司生产,批号:056M4723V;二磷酸腺苷(ADP)为美国 Helena 生产,批号:5366;胶原(Coll)为 Sigma 公司生产,批号:SLBJ0175V;花生四烯酸(AA)为美国 Helena 生产,批号:5364;活化部分凝血活酶时间(APTT)试剂盒为法国 STAGO 生产,批号:250596;凝血酶时间(TT)试剂盒为法国 STAGO 公司生产,批号:114565;纤维蛋白原(FIB)试剂盒为法国 STAGO 公司生产,批号:250387;凝血酶原时间(PT)试剂盒为法国 STAGO 公司生产,批号:250244。

1.3 方法

1.3.1 血小板聚集率测定 抽取静脉血 4 mL,枸橼酸钠抗凝(血与抗凝剂体积比为 9 : 1),轻轻混匀,1 000 r/min 离心 10 min,分离富血小板血浆(PRP),并计数血小板;剩余部分 3 000 r/min 离心 10 min,分离乏血小板血浆(PPP),用 PPP 将 PRP 调至血小板计数为 3×10^8 /mL。将 PRP 分为 5 组,空白组取 1%二甲亚砜(DMSO)与 PRP 混匀;而 PL 组取不同浓度 PL 与 PRP 混匀,采用剂量递增方案进行预实验,根据预实验结果选取终浓度分别为 PL 5 μ mol/L、PL 10 μ mol/L、PL 20 μ mol/L;对照组取 ASA 与血浆混匀,终浓度为 10 μ mol/L;37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后,放入血小板聚集仪检测孔内,分别加入诱导剂 ADP 终浓度 10 μ mol/L、胶原(Coll)终浓度 2.5 μ g/mL、AA 终浓度 500 μ g/mL,采用比浊法在 37 $^{\circ}$ C 条件下测定血小板聚集率。血小板聚集率用血小板最大聚集率表示,结果用抑制率表示。抑制率(%)=(空白组血小板聚集率-受试物处理组血小板聚集率)/空白组血小板聚集率 $\times 100\%$ 。

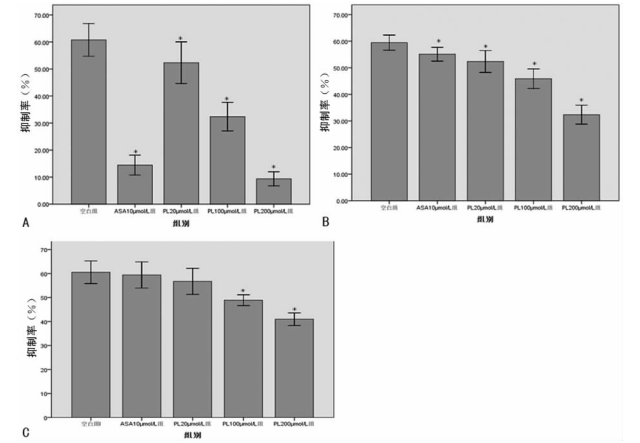
1.3.2 凝血指标测定 抽取静脉血 4 mL 枸橼酸钠抗凝,以 3 000 r/min 的速度离心 10 min,取分离血浆后分为 5 管,按血浆与药物 9 : 1 的体积比例分别加入 1%DMSO 作为空白组,加入 PL(终浓度分别为 5、10、20 μ mol/L)作为不同浓度 PL 组,加入肝素钠(35 U/mL)作为对照组,混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,上机检测 FIB、PT、TT、APTT。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 版本软件分析统计数据,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,PL 作用差异采用单因素方差分析,组间各指标差异的比较均采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各诱导剂对 PL 干预后儿童血小板聚集率的影响 AA 诱

导的血小板聚集率:对照组、PL 20 μ mol/L 组、PL 100 μ mol/L 组、PL 200 μ mol/L 组 AA 诱导的血小板聚集率与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而且 PL 干预后呈一定的量效关系趋势;对照组 Coll 诱导的血小板聚集率与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);PL20 μ mol/L 组、PL 100 μ mol/L 组、PL 200 μ mol/L 组 Coll 诱导的血小板聚集率与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),两组 PL 干预后呈一定的量效关系趋势;PL 100 μ mol/L 组与 PL 200 μ mol/L 组 ADP 诱导的血小板聚集率与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:A 表示不同浓度 PL 干预后 AA(500 μ g/mL)诱导的血小板聚集率;B 表示不同浓度 PL 干预后 Coll(2.5 μ g/mL)诱导的血小板聚集率;C 表示不同浓度 PL 干预后 ADP(10 μ mol/L)诱导的血小板聚集率;与空白组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 AA、Coll、ADP 对不同浓度 PL 干预后血小板聚集率的影响

2.2 各诱导剂对 PL 干预后儿童血小板聚集抑制率的影响 对照组、PL 20 μ mol/L 组、PL 100 μ mol/L 组与 PL 200 μ mol/L 组对 ADP 诱导血小板聚集的抑制率依次为 2.2%、6.3%、18.8%、31.2%;对 Coll 诱导的大鼠血小板聚集的抑制率依次为 7.3%、11.9%、22.8%、45.5%;对 AA 诱导的大鼠血小板聚集的抑制率依次为 76.5%、14.1%、46.9%、84.8%。ASA 组对 AA 和胶原诱导的血小板聚集有较大的抑制作用,对 ADP 诱导的血小板聚集抑制作用较弱;PL 干预后对 AA 和 Coll 诱导的血小板聚集均有较大的抑制作用,对 ADP 也有抑制作用,但不及 AA 和 Coll 作用明显,另 PL 对 ADP、AA 和 Coll 诱导的血小板聚集抑制率呈现一定的量效关系,见图 2 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 PL 干预后对儿童血浆 PT、TT、APTT、FIB 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PT(s)	TT(s)	APTT(s)	FIB(g/L)
空白组	30	13.20 $\pm$ 1.91	14.96 $\pm$ 2.35	30.55 $\pm$ 3.18	3.57 $\pm$ 0.95
PL 5 μ mol/L 组	30	13.37 $\pm$ 1.89	15.09 $\pm$ 2.34	30.61 $\pm$ 3.09	3.38 $\pm$ 0.80
PL 10 μ mol/L 组	30	15.07 $\pm$ 1.75 *	16.79 $\pm$ 2.60 *	33.26 $\pm$ 3.27 *	3.62 $\pm$ 0.94
PL 20 μ mol/L 组	30	18.76 $\pm$ 2.33 *	18.79 $\pm$ 3.10 *	35.76 $\pm$ 3.46 *	3.63 $\pm$ 0.97
肝素钠 35 U/mL 组	30	23.5 $\pm$ 13.84 *	18.32 $\pm$ 2.12 *	38.23 $\pm$ 3.23 *	2.94 $\pm$ 0.45 *

注:与空白组相比,* $P < 0.05$ 。

2.3 PL 干预后对儿童血浆 PT、TT、APTT、FIB 的影响 与对照组比较,PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 干预后可以显著延长儿童血浆中的 PT、APTT、TT 值($P<0.05$);PL 10 $\mu\text{mol/L}$ 干预后可以显著延长儿童血浆中的 PT、TT 值($P<0.05$),亦可延长 APTT 值,但作用不及 PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组显著($P<0.05$);PL 5 $\mu\text{mol/L}$ 、PL 10 $\mu\text{mol/L}$ 、PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 干预后,FIB 未见明显变化。见表 1。

3 讨 论

血栓的形成是一个逐渐发展的过程,其过程包括血小板的黏附、聚集和释放反应形成白色血栓;通过内源及外源凝血系统,由于 X 因子的激活导致凝血酶的形成而发生血液凝固和纤维蛋白网络血流中的红细胞、白细胞,最终形成血栓^[10]。ADP 等诱导剂与血小板膜相应受体结合,血小板产生活化信号,通过多种 G 蛋白转导信号从而导致血小板产生聚集和释放反应^[11];血小板是一期止血的基础,并为凝血系统活化、凝血酶的最终形成提供磷脂表面,而活化血小板可释放多种促凝物质^[12],因此血小板具有重要的止血和促凝作用。PL 具有抗血小板凝集的活性,研究发现,100 $\mu\text{g/mL}$ PL 对 Coll 引起的小板凝集的抑制率达到 30%;200 $\mu\text{g/mL}$ PL 对 AA、Coll、ADP 引起的小板凝集抑制率分别为 100%、59%、52%,对于凝血酶引起的小板凝集则没有影响,其作用机制可能与抑制环氧化酶活性以及减少凝血酶 A 的形成相关,但还需要更加深入的研究^[13-14]。本研究显示:PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、PL 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与 PL 200 $\mu\text{mol/L}$ 对 ADP 诱导血小板聚集的抑制率依次为 6.3%、18.8%、31.2%;对 Coll 诱导的大鼠血小板聚集的抑制率依次为 11.9%、22.8%、45.5%;对 AA 诱导的大鼠血小板聚集的抑制率依次为 14.1%、46.9%、84.8%,这与 Fontenele 等^[13]研究的结果相近,提示 PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 组、PL 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与 PL 200 $\mu\text{mol/L}$ 组可以明显抑制 AA 与 Coll 诱导的血小板聚集率;PL 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与 PL 200 $\mu\text{mol/L}$ 可以明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集率,并有一定的量效关系。

正常的凝血系统是二期止血的重要保证,PT、APTT、TT 及 FIB 是筛选凝血系统有无异常的重要指标。PT 主要用于检测机体的外源性凝血系统,它的延长或缩短分别反映凝血因子 VII、X、V、II 和 I 的血浆水平减低或增高。APTT 和 TT 的延长与内源系统凝血酶的抑制有关,其延长或缩短分别反映凝血因子 XII、XI、前激肽释放酶 V、II 和 I 的血浆水平减低或增高。本研究 PL(10、20 $\mu\text{mol/L}$)干预后可以显著延长儿童血浆中的 PT 值,表明外源凝血途径相关因子对 PL 敏感,其促凝活性可被明显抑制,并且 PL 10 $\mu\text{mol/L}$ 、PL 20 $\mu\text{mol/L}$ 干预后也可以显著延长儿童血浆中的 APTT、TT 值,这与 Lee 等^[15]的研究一致,提示 PL 对外源凝血途径似乎也有抑制作用,推测 PL 可能抑制凝血机制中的共同因子,其机制有待进一步研究。

儿科患者与成人患者在血栓形成的流行病学、病理生理学、对药物治疗的反应以及长期预后均有很大不同,本研究结果显示 PL 能抑制儿童血浆的血小板聚集,抑制抗凝活性,为将来中药葎茛作为抗栓药物应用于儿童抗栓治疗提供实验数据。

参考文献

[1] 徐宝元,要跟东,赵梦华. 儿科患者的抗栓治疗[J]. 中国小儿急救医学,2013,20(4):429-431.

[2] 李家增. 血栓形成机制[J]. 临床内科杂志,2004,21(12):793-795.

[3] Japanese Circulation Society Joint Research Group. Guidelines for diagnosis and management of cardiovascular sequelae in Kawasaki disease (JCS 2008) — digest version [J]. Circ Sep,2010,74(9):1989-2020.

[4] Fitzgerald R,Pirmohamed M. Aspirin resistance:effect of clinical,biochemical and genetic factors[J]. Pharmacol Ther,2011,130(1):213-225.

[5] 孙艺红. 华法林的临床应用与监测[J]. 中国实用内科杂志,2007,20(9):276-277.

[6] Miller CS,Grandi SM,Shimony A,et al. Meta-analysis of efficacy and safety of new oral anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban) versus warfarin in patients with atrial fibrillation[J]. Am J Cardiol,2012,110(1):453-460.

[7] Connolly SJ,Ezekowitz MD,Yusuf S,et al. RE-LY Steering Committee and Investigators;dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation[J]. N Engl J Med,2009,361(1):1139-1151.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:163.

[9] Park BS,Son DJ,Park YH,et al. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of Piper longum L[J]. Phytomedicine,2007,14(12):853-855.

[10] 陈蓉,谢梅林,周佳. 蛇床子素抑制血栓形成和血小板聚集的实验研究[J]. 中国药理学通报,2005,21(4):440-443.

[11] Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors[J]. Circ Res,2006,99(12):1293-1304.

[12] Leon C,Alex M,Klocke A,et al. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation [J]. Blood,2004,103(2):594-600.

[13] Fontenele JB,Leal LK,Silveira ER,et al. Antiplatelet effects of pipartine,an alkamide isolated from Piper tuberculatum: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity[J]. J Pharm Pharmacol,2009,61(4):511-515.

[14] Iwashita M,Saito M,Yamaguchi Y,et al. Inhibitory effect of ethanol extract of Piper longum L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A2 receptor[J]. Biol Pharm Bull,2007,30(7):1221-1225.

[15] Lee W,Yoo H,Ku SK,et al. Anticoagulant activities of piperlonguminine in vitro and in vivo[J]. BMB Rep,2013,46(10):484-489.

(收稿日期:2017-05-07 修回日期:2017-07-06)

