

玉足海参多糖对家兔血小板聚集的影响

单春文、梁启兆、王强基¹ (第一军医大学药理教研室, 广州 510132)

提要 玉足海参多糖(HL-P)对枸橼酸钠和 EDTA-Na₂ 抗凝的 PRP 中的血小板无影响, 但对肝素抗凝时有弱的促聚集作用。HL-P 对洗脱的血小板有显著的促聚集作用, Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 加强此作用。HL-P 在一定程度上增强 ADP 诱导血小板聚集作用。但其非常显著地抑制凝血酶诱导的聚集作用。HL-P 减少血小板数。

关键词 玉足海参; 酸性多糖类; 血小板聚集; 腺苷二磷酸; 凝血酶类; 钙; 镁

玉足海参(*Holothuria leucospilota* (Brandt)) 酸性多糖(acidic polysaccharide, HL-P)来源于玉足海参体壁, 有抗凝血酶作用⁽¹⁾。其类似物刺参酸性粘多糖(Sjamp)有抗凝血酶和诱导血小板聚集作用⁽²⁾。本文报道 HL-P 对血小板功能的影响。

方法与结果

HL-P 为白色无定形粉末, mp 220-1°C, 纯度 99.5% 以上。HL-P 系由氨基半乳糖, 葡萄糖醛酸, 岩藻糖和硫酸基组成, 比值为 1:0.94:0.84:3.60。

HL-P 诱导血小板聚集作用 兔 5 只, 体重 2.2±SD 0.5 kg, ♀♂不拘, 心脏取血, 3.8% 枸橼酸钠抗凝(9:1), 制备富含血小板血浆(PRP), 以终浓度 2.56, 12.8, 64 和 320 μg/ml 的 HL-P 为诱导剂, 用比浊法^(3,4)观察血小板聚集。结果: 以上各浓度组与对照组一样不引起血小板聚集。兔 4 只, 体重 1.9±0.3 kg, ♂。心脏取血, 4% EDTA-Na₂ 抗凝(9:1), 操作同前。结果: 以上各浓度组不诱导血小板聚集。兔 7 只, 体重 1.9±0.2 kg, ♂。0.5% 肝素抗凝。结果: 64-320 μg/ml 有诱导血小板聚集作用(图 1)。

HL-P 增强 ADP 诱导的血小板聚集作用

1. 体外实验 兔 7 只, 体重 2.5±0.4 kg, ♀♂不拘, 心脏取血, 制备 3 ml PRP, 取 5

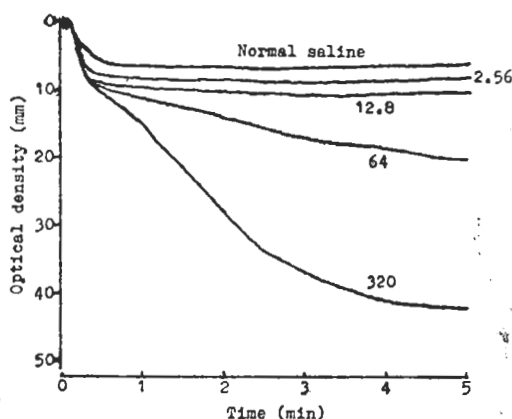


Fig 1. Platelet aggregation induced by acidic polysaccharide from *Holothuria leucospilota* (HL-P, final concentration μg/ml) in the rabbit platelet rich plasma with heparin anticoagulant. The blood with heparin was centrifuged at 120×g for 15 min to obtain PRP contained platelets $5 \times 10^5/\mu\text{l}$. Normal saline and HL-P 2.56-320 μg/ml were used as inducers.

支比浊管, 第 1 管加入 50 μl 生理盐水(NS), 第 2-5 管加入终浓度 2.56, 12.8, 64 和 320 μg/ml 的 HL-P 50 μl, 最后加入终浓度 ADP 8 μmol/L 进行比浊测定, 以曲线下降值(mm), 聚集率(以 NS 为 100%)和 5 min 的最大解聚率(以曲线回升值除以曲线下降值)进行 t 测验。结果: 64-320 μg/ml 促进 ADP 诱导血小板聚集作用, 而 12.8-320 μg/ml 抑制解聚作用(表 1)。

2. 体内实验 兔 13 只, 体重 1.8±0.3 kg, ♀♂不拘。暴露颈动脉。给药前和 iv HL-P 2 mg/kg 后 10, 60 和 360 min 颈动脉取血,

Tab 1. Effects of acidic polysaccharide from *Holothuria leucospilota* on platelet aggregation of rabbit. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

| | Adenosine diphosphate group | | | Thrombin-group | |
|----------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | Descent of curve (mm) | Proaggregation (%) | Disaggregation (%) | Descent of curve (mm) | Proaggregation (%) |
| In vitro | | n = 7 rabbits | | n = 6 rabbits | |
| Concn ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
| 0 | 49 \pm 21 | 100 \pm 43 | 37 \pm 33 | 93 \pm 13 | 100 \pm 14 |
| 2.56 | 53 \pm 21 | 108 \pm 43* | 23 \pm 25* | 76 \pm 12 | 82 \pm 13*** |
| 12.8 | 47 \pm 19 | 96 \pm 39* | 9.7 \pm 7.6** | 52 \pm 19 | 56 \pm 20*** |
| 64 | 60 \pm 17 | 122 \pm 35** | 3.4 \pm 4.1** | 30 \pm 17 | 38 \pm 18*** |
| 320 | 66 \pm 21 | 134 \pm 43*** | 0.9 \pm 1.4** | 16 \pm 12 | 17 \pm 13*** |
| In vivo | | n = 13 rabbits | | n = 10 rabbits | |
| Time (min) | | | | | |
| 0 | 39 \pm 24 | 100 \pm 62 | 53 \pm 30 | 77 \pm 18 | 100 \pm 23 |
| 10 | 43 \pm 18 | 110 \pm 46* | 28 \pm 29*** | 59 \pm 21 | 77 \pm 27*** |
| 60 | 39 \pm 20 | 100 \pm 51* | 34 \pm 25** | 62 \pm 19 | 81 \pm 25*** |
| 360 | 42 \pm 24 | 108 \pm 62* | 45 \pm 18* | 59 \pm 30 | 77 \pm 39*** |

调整血小板数为 $5 \times 10^5/\mu\text{l}$ 。其它操作同离体实验。结果：与给药前比，促进 ADP 诱导血小板聚集作用不显著，但给药后 10 和 60 min 能显著地抑制解聚集(表 1)。

HL-P 诱导悬浮在改良台氏液中血小板聚集作用

1. 诱导悬浮在无 Ca^{2+} 改良台氏液中血小板聚集作用 兔 6 只，体重 $2.2 \pm 0.5 \text{ kg}$ ，♀♂不拘。制备血小板⁽⁵⁾，用 pH 7.2 的 NS 洗两次，最后将血小板悬浮在无 Ca^{2+} 改良台氏液中。取 10 支比浊管，每 5 支一组，各加 0.5 ml 血小板悬浮液，第一组(无 Ca^{2+} 组)各管加入 50 μl NS，第二组各管加入终浓度为 78 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} 50 μl ，每组第一管都以 NS 为诱导剂，其余各管均以 HL-P 为诱导剂进行比浊测定。结果：HL-P 2.56-320 $\mu\text{g/ml}$ 有显著地诱导血小板聚集作用，且有 Ca^{2+} 组比无 Ca^{2+} 组的作用明显增强(表 2)。

2. 诱导悬浮在无 Mg^{2+} 改良台氏液中血小板聚集作用 兔 5 只，体重 $2.1 \pm 0.5 \text{ kg}$ ，♀♂不拘。血小板悬浮在无 Mg^{2+} 改良台氏液中。一组(无 Mg^{2+} 组)加 NS，另一组加 0.6 mmol/L 的 Mg^{2+} ，其余同前。结果：2.56-320 $\mu\text{g/ml}$ 有明显地诱导血小板聚集作用，且有 Mg^{2+} 组

Tab 2. Proaggregatory action of acidic polysaccharide from *Holothuria leucospilota* on rabbit blood platelets suspended in modified Tyrode's solution. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

| Final concn ($\mu\text{g/ml}$) | Fall in curve (mm) | | | |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|-----------------|
| | Ca^{2+} group (n=6) | Mg^{2+} group (n=5) | | |
| | 0 | 78 $\mu\text{mol/L}$ | 0 | 0.6 mmol/L |
| 0 | 12.3 \pm 4.8 | 12.8 \pm 3.9* | 11.8 \pm 2.3 | 12.6 \pm 1.7* |
| 2.56 | 44 \pm 35 | 66 \pm 32*** | 23 \pm 13 | 36 \pm 28* |
| 12.8 | 60 \pm 39 | 83 \pm 33*** | 33 \pm 10 | 61 \pm 29** |
| 64 | 70 \pm 32 | 93 \pm 22*** | 59 \pm 22 | 84 \pm 30*** |
| 320 | 72 \pm 33 | 97 \pm 20*** | 63 \pm 24 | 94 \pm 16*** |

比无 Mg^{2+} 组显著增强(表 2)。

HL-P 抑制凝血酶诱导血小板聚集作用

1. 体外实验 兔 6 只，体重 $1.9 \pm 0.4 \text{ kg}$ ，♀♂不拘。方法同前。血小板悬浮在无 Ca^{2+} 改良台氏液中，以终浓度为 0.08 IU/ml 的凝血酶为诱导剂进行比浊测定。结果：2.56-320 $\mu\text{g/ml}$ 的 HL-P 都非常显著地抑制凝血酶诱导的血小板聚集作用(表 1)。

2. 体内实验 兔 10 只，体重 $1.9 \pm 0.3 \text{ kg}$ ，♀♂不拘。给药前和 iv HL-P 2 mg/kg 后 10, 60 和 360 min 颈动脉取血，其余同离体实验。

调整血小板数为 $6 \times 10^5/\mu\text{l}$ 。结果：与给药前比，给药后各时间都非常显著地抑制凝血酶诱导血小板聚集作用(表 1)。

HL-P 对血小板数的影响 兔 15 只，体重 $1.7 \pm 0.2 \text{ kg}$ ，♀♂不拘。iv HL-P 2 mg/kg 前和后 10, 60 和 360 min 耳静脉取血，常规法计数血小板。结果：给药前血小板数 $(61 \pm 15) \times 10^4/\mu\text{l}$ ，给药后各时间依次为 $(49 \pm 14) \times 10^4$ ， $(46 \pm 12) \times 10^4$ 和 $(56 \pm 13) \times 10^4/\mu\text{l}$ ；减少率为 20 ± 8 ， 30 ± 18 和 $7 \pm 8\%$ 。与给药前比，10 和 60 min 差异非常显著($p < 0.01$)，360 min 差异显著($p < 0.05$)。

讨 论

HL-P 对去除血浆中 Ca^{2+} 、纤维蛋白原、凝血酶等凝血因子的洗脱的血小板有直接的促聚集作用，描记的聚集曲线类似 ADP，此作用能被 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 加强，且类似 Mg^{2+} 增强 ADP 的作用⁽⁵⁾。枸橼酸钠和 EDTA- Na_2 抗凝时，HL-P 对血小板聚集无影响，这不是因为去掉 Ca^{2+} 的结果，因为 HL-P 对无 Ca^{2+} 的洗脱血小板有明显的促聚集作用，可能是因为 PRP 中仍含有多种凝血因子干扰了 HL-P 的作用。肝素抗凝时 HL-P 有一定的诱导血小板聚集作用，这可能是由于肝素抑制了多种凝血因子，减少了某些凝血因子对 HL-P 作用的干扰。HL-P 能显著的抑制凝血酶促血小板聚集作用，反过来也说明凝血酶有对抗 HL-P 的作用。虽然还不清楚 HL-P 对 ADP 和凝血酶的影响为什么不同，但推测有两种原因：其一，二者的理化性质不同；其二，二者对血小板的作用环

节不同^(6,7)，HL-P 对二者的理化性质和作用环节影响不同。ADP 诱导血小板聚集后的解聚现象说明其作用有一定的可逆性，HL-P 可能增强了 ADP 与血小板膜结合能力，使解聚现象减弱。总之 HL-P 对血小板的影响是复杂的。

HL-P 抑制凝血酶的作用与樊绘曾等⁽¹⁾的报道是一致的；与它的类似物 Sjmp⁽²⁾也是一致的，不同之处本文是对血小板聚集而言，他们的报道是指的血液凝固。HL-P 在枸橼酸钠抗凝时对血小板的影响与 Sjmp 不同；减少血小板数的作用比 Sjmp⁽²⁾弱得多。

参 考 文 献

- 樊绘曾、陈菊娣、吕培宏、郝晓阁、李海棠、玉足海参酸性多糖的研究。药学学报 1983; 18 : 203
- 李家增、包承鑫、陈关珍、张桂珍、樊绘曾、陈菊娣。刺参酸性精多糖抗凝血酶活性及诱导血小板聚集作用。中国药理学报 1985; 6 : 107
- Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol (Lond)* 1963; 168 : 178
- 单春文、胡志军、梁启兆、刘菊芳。普鲁卡因胺对家兔和豚鼠血小板聚集的影响。中国药理学报 1986; 7 : 63
- Ardlie NG, Packham MA, Mustard JF. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in suspensions of washed rabbit platelets. *Br J Haematol* 1970 ; 19 : 7
- Figures WR, Niewiarowski S, Morinelli TA, Colman RF, Colman RW. Affinity labeling of a human platelet membrane protein with 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *J Biol Chem* 1981; 256 : 7789
- Jenkins CSP, Clemetson KJ, Ali-Briggs EF. Antibodies against platelet membrane glycoproteins. *Br J Haematol* 1983; 53 : 491

Effects of acidic polysaccharide from *holothuria leucospilota* on platelet aggregation in rabbits

SHAN Chun-Wen, LIANG Qi-Zhao, WANG Qiang-Ji

(Department of Pharmacology, First Military Medical College, Guangzhou 510132)

ABSTRACT Platelet aggregations induced by acidic polysaccharide from *Holothuria leucospilota* (Brandt) (HL-P) 2.56-320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *in vitro* and 2 mg/kg *iv* were observed in rabbits. The results showed that HL-P had no effect on the aggregation of platelet treated with anticoagulants, trisodium citrate or EDTA- Na_2 , and could mildly induce the aggregation of platelet treated with heparin. A significant proaggregatory effect on blood platelet suspended in modified Tyrode's solution was caused by HL-P, and poten-

tiated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . HL-P prompted ADP-induced platelet aggregation to a certain extent. However, HL-P produced a very significant inhibition on thrombin-induced platelet aggregation. The amount of platelets was diminished by HL-P.

KEY WORDS *Holothuria leucospilota*; acidic polysaccharides; platelet aggregation; adenosine diphosphate; thrombin; calcium; magnesium