

丹参在纤溶系统中的作用及其机制※

□ 谢文光* 魏钰书 (川北医学院附属医院 四川 南充 637000)

摘要 目的: 研究丹参是否能提高纤溶酶的活性, 促进纤维蛋白溶解。方法: 用纤溶激活试验、补体免疫溶血试验、红细胞 C3bR 功能表达调节试验、抗原抗体结合干预试验, 观察丹参不同制剂对纤溶、补体活性、红细胞 C3bR 功能、抗原抗体反应的影响。结果: ①不同丹参制剂在含有和不含纤溶酶原的纤维蛋白板上均未出现纤溶活性, 也未发现试验药物对 t-PA、u-PA 激活纤溶的增强作用。②丹参 ≥ 0.3 mg/ml、复方丹参片 ≥ 0.3 mg/ml、丹参注射液 ≥ 1.9 mg/ml 对 10 IU/ml t-PA、0.3 IU/ml u-PA 激活纤溶的抑制率均 $\geq 50\%$, 丹参 ≥ 4.0 mg/ml、复方丹参片 ≥ 3.6 mg/ml、丹参注射液 ≥ 18.8 mg/ml 均完全抑制 t-PA 激活纤溶。③丹参 ≥ 64.1 mg/ml、复方丹参片 ≥ 25.0 mg/ml、丹参注射液 ≥ 75.0 mg/ml 时引起羊红细胞溶解, 丹参 ≥ 0.641 mg/ml、复方丹参片 ≥ 1.25 mg/ml、丹参注射液 ≥ 30.0 mg/ml 抑制补体免疫溶血活性 $\geq 50\%$, 丹参 ≥ 6.41 mg/ml、复方丹参片 ≥ 10.0 mg/ml、丹参注射液 ≥ 75.0 mg/ml 完全抑制补体免疫溶血活性。④一定浓度的丹参制剂作用于 HRBC 后, 不影响 HRBC-Z 花环率, 但能导致 HRBC-C3bR 花环率极显著降低, 复方丹参片、丹参注射液在较高浓度时使 HRBC-C3bR 花环率增加, 在较低浓度时可减少 HRBC-C3bR 花环率。⑤丹参制剂在一定浓度范围, 分别抑制 Pg、C1INH、C4、ALb 的抗原抗体结合反应, 对 ALb、Pg 的抗原抗体结合反应抑制作用更强, 对 C3、PA 的抗原抗体结合反应无明显影响。结论: 丹参无直接纤溶活性, 未见增强纤溶激活和提高纤溶酶的活性。丹参在一定浓度范围, 能不同程度抑制 t-PA、u-PA 激活纤溶活性, 抑制补体免疫溶血活性, 使 HRBC-C3bR 活性减弱, 抑制 Pg、C1INH、C4、ALb 的抗原抗体结合反应。在纤溶和补体系统之间, 丹参可能主要作用于纤溶系统。

关键词 丹参 纤溶 补体活化 抗原抗体反应

丹参是中国传统医药中常用的活血化瘀中药之

一, 味苦、微寒, 归心、心包、肝经。功能活血祛瘀, 凉血消痈, 养血安神。主治月经不调, 经闭痛经, 瘕瘕积聚, 胸腹刺痛, 热痹疼痛, 疮疡肿痛, 心烦不眠, 肝脾肿大, 心绞痛。

※基金项目 国家自然科学基金面上项目资助 (项目批准号 30271658)

*作者简介 谢文光, 男, 副教授。主要从事中医、中西医结合临床免疫学研究工作。

有学者认为^[1]丹参能提高纤溶酶的活性, 促进纤

纤维蛋白溶解 (fibrinolysis, 简称纤溶)。近年来, 人们对机体的纤溶系统有许多新的认识, 为进一步阐明丹参等活血化瘀中药的作用机制提供了有益的线索。为此, 我们分别用组织型纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA) 和尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase - type plasminogen activator, uPA) 纤溶激活试验、补体免疫溶血试验、红细胞 C3bR 功能表达调节试验、抗原抗体结合干预试验, 观察丹参不同制剂的影响, 探索丹参在纤溶系统中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 被测药品来源于本院药剂科。6-氨基己酸 (EACA) 作为纤溶抑制剂对照。

1.1.2 标准 u-PA、凝血酶、纤维蛋白原 (含纤溶酶原) 试剂 (卫生部药品生物制品检定所)。标准 t-PA (英国国立生物标准与控制研究所)。不含纤溶酶原的纤维蛋白原 (Sigma 公司)。

1.1.3 溶血素 (卫生部上海生物制品研究所)。

1.1.4 冻干补体致敏及未致敏酵母菌试剂 (上海长海医院免疫室)。

1.1.5 纤溶酶原 (Pg)、C1 抑制剂 (C1INH)、补体成分 (C3、C4)、前白蛋白 (PA)、白蛋白 (ALb) 的抗血清及相应参考血清均购于卫生部上海生物制品研究所。

1.1.5 琼脂糖 (上海东海制药厂), 琼脂粉 (日本进口分装), 其它化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 纤溶激活试验^[2]

1.2.1.1 制备纤维蛋白琼脂板: 用 0.05 M pH 7.4 PBS、0.01 % Tween-20 (PBST 液) 配制 1% 琼脂, 溶化并恒至 60℃, 在搅拌下分别加入纤维蛋白原 (含或不含纤溶酶原) 1 mg/ml、凝血酶 0.1 NIH U/ml, 搅拌均匀倒 1.5 mm 厚的含纤溶酶原和不含纤溶酶原的纤维蛋白琼脂板, 冷凝后打孔 (孔径 3 mm) 备用。

1.2.1.2 药物对 t-PA 激活纤溶的影响: t-PA 用 PBST 液稀释成 80、40、20、10、5、2.5 IU/ml 作标准参照, 药物不同浓度、蒸馏水对照分别与 20 IU/ml t-PA 等量混合, 分别取 10 μ l 加入纤维蛋白板孔中, 放湿盒 37℃ 13 小时, 测量各孔溶解圈直径。以标准 t-

PA 活力单位的对数值与溶解圈直径绘制标准曲线或求得回归方程式, 计算药物孔和对照孔纤溶活力单位。以不加 t-PA 的各浓度药物测定药物浸液中是否含有激活纤溶物质或纤溶物质。

1.2.1.3 药物对 u-PA 激活纤溶的影响: u-PA 用 PBST 液稀释成 2.4、1.2、0.6、0.3、0.15、0.075 IU/ml 作标准参照, 药物不同浓度、蒸馏水对照分别与 0.6 IU/ml u-PA 等量混合, 以后的操作与药物影响 t-PA 激活纤溶的方法相同。

1.2.2 补体免疫溶血试验^[3]

1.2.2.1 致敏羊红细胞: 艾氏血球保养液保存 2 周内的绵羊红细胞, 用生理盐水洗 3 次, 沉淀的羊红细胞加等量 50 个凝集单位溶血素, 混匀, 37℃ 致敏 5 分钟。

1.2.2.2 致敏羊红细胞琼脂糖板: 生理盐水配制 1% 琼脂糖, 溶化并冷至 55 ~ 58℃, 按 0.5 % 加入致敏羊红细胞, 混匀, 倒 1.5 mm 厚平板, 冷凝后打孔, 孔径 3 mm, 孔距 5 mm。

1.2.2.3 药物对补体溶血活性的影响: 正常人新鲜血清用生理盐水稀释成 2 ~ 128 倍作为参照, 药物不同浓度、生理盐水对照分别与 8 倍稀释血清等量混合, 分别取 10 μ l 加入致敏羊红细胞琼脂糖板孔中, 放湿盒 37℃ 30 分钟, 观察并测量各孔溶血环, 计算药物孔和对照孔的补体溶血活力。测定不加血清的各浓度药物中是否含有溶血物质。

1.2.3 红细胞 C3bR 功能表达调节试验^[4]

1.2.3.1 影响 HRBC 的最小药物浓度测定: 新鲜 O 型正常人红细胞 (HRBC) 50 μ l 分别与不同浓度等渗药液或对照用生理盐水 100 μ l 混合, 置 37℃ 湿温箱 30 分钟。各管加 0.25 % 戊二醛水溶液 50 μ l 混合, 分别取适量加入血球计数池计数并分类各形态 HRBC (溶解、肿胀、聚集、球形、正常), 计算药物对 HRBC 有明显影响的最小药量。

1.2.3.2 药物影响 HRBC - C3bR 花环率测定: 取对 HRBC 形态和数量均无明显影响的不同浓度等渗药液 100 μ l, 用生理盐水 100 μ l 作对照, 分别加 HRBC 50 μ l 混合, 置 37℃ 湿温箱 30 分钟后, 各管加生理盐水 3 ml 洗涤, 2000 转/分离心 5 分钟, 倒弃上清液, 沥干, 沉淀用 700 μ l 生理盐水混匀, 分别取 50 μ l 于

两支试管。第 1 管加 50 μl $0.8 \times 10^8/\text{ml}$ C3b 致敏酵母菌，第 2 管加 50 μl $0.8 \times 10^8/\text{ml}$ 酵母菌，摇匀后放 37℃ 湿温箱 30 分钟，取出轻轻悬匀，分别加生理盐水 200 μl 、0.25 % 戊二醛 100 μl 轻轻悬匀，分别取适量加于血球计数池用高倍镜计数。一个 HRBC 结上二个或二个以上酵母菌或 C3b 致敏酵母菌为一朵花环，计数 400 个 HRBC，计算 HRBC-酵母菌花环 (HRBC-Z) 或 HRBC-C3b 致敏酵母菌花环 (HRBC-ZC) 百分率。

1.2.4 抗原抗体结合干预试验

1.2.4.1 采用琼脂单向免疫扩散法定量，参照试剂说明书分别制备各种抗血清的 1.5 mm 厚琼脂单向免疫扩散板，冷凝后以孔径 3 mm 打孔备用。

1.2.4.2 不同浓度药物、生理盐水对照分别与 12.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pg、34.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C1INH、262.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C3、125.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C4、50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PA、150.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ALb 的新鲜血清等量混合，分别取 10 μl 加入琼脂单向免疫扩散板孔中，放湿盒 37℃ 48 小时，测量各孔抗原抗体复合物沉淀圈直径。以相应参考血清的不同含量与沉淀圈面积值绘制标准曲线或求得回归方程式。计算药物孔和对照孔相应测定物的含量。

2 结 果

2.1 丹参制剂对纤溶激活活性的影响

2.1.1 在本实验稀释度范围，t-PA、u-PA 活力单位的对数值与溶解圈直径呈直线正相关 (γ 分别为 0.9997、0.9998)，不同浓度 t-PA、u-PA 批内、批间测定的变异系数均 $<10\%$ 。在不含纤溶酶原的纤维蛋白板上，t-PA、u-PA、稀释液、蒸馏水均不出现溶解圈。

2.1.2 不同丹参制剂在含有和不含纤溶酶原的纤维蛋白板上均未出现纤溶活性，也未发现试验药物对 t-PA、u-PA 激活纤溶的增强作用。2.5 mg/ml EACA 完全抑制 t-PA 激活纤溶，但此浓度 EACA 对 u-PA 激活纤溶无明显影响。

2.1.3 一定浓度丹参制剂抑制 t-PA、u-PA 激活纤溶。以完全抑制 t-PA 激活纤溶的药物最大稀释度计算药物最小浓度为完全量；药物与对照的纤溶活性比较，以抑制率 $\geq 50\%$ 的药物最大稀释度计算药物最小浓度为部分量。结果见表 1。

表 1 丹参制剂抑制纤溶激活的实验结果 (mg/ml)

药物	抑制 u-PA 激活 纤溶部分量	抑制 t-PA 激活纤溶 部分量	完全量
复方丹参片	0.3	0.3	3.6
丹 参	0.3	0.3	4.0
丹参注射液	1.9	1.9	18.8

2.2 丹参制剂对补体免疫溶血活性的影响

2.2.1 正常人新鲜血清在 2~64 倍稀释度范围出现浓度相关的完全透明溶血环，生理盐水对照孔不出现溶血环。

2.2.2 丹参制剂在一定浓度范围，自身具有溶血作用，抑制正常人新鲜血清补体免疫溶血活性。以完全抑制补体免疫溶血活性的药物最大稀释度计算的药物最小浓度为完全量；药物与对照的溶血活性比较，以抑制率 $\geq 50\%$ 的药物最大稀释度计算的药物最小浓度为部分量。结果见表 2。

表 2 丹参制剂抑制补体溶血活性的实验结果 (mg/ml)

药物	自身溶血最小量 纤溶部分量	抑制补体溶血 部分量	完全量
复方丹参片	25.0	1.25	10.0
丹 参	64.1	0.641	6.41
丹参注射液	75.0	30.0	75.0

2.3 丹参制剂对红细胞 C3bR 功能表达调节试验的影响。

2.3.1 当丹参 ≤ 3.2 mg/ml、复方丹参片 ≤ 1.2 mg/ml、丹参注射液 ≤ 7.5 mg/ml 时，对 HRBC 形态和数量均未见明显影响。

2.3.2 一定浓度的丹参制剂作用于 HRBC 后，不影响 HRBC-Z 花环率，但能导致 HRBC-C3bR 花环率极显著降低。其中，复方丹参片、丹参注射液在较高浓度时使 HRBC-C3bR 花环率增加，在较低浓度时可减少 HRBC-C3bR 花环率。结果见表 3。

表 3 药物致 HRBC-ZC 降低的实验结果

药物	浓度 mg/ml	测 次	HRBC-ZC (%, $\bar{x} \pm s$)	与对照组 比较 P 值
丹 参	0.8	4	7.1 \pm 2.0	<0.001
	0.4	2	14.9 \pm 0.8	<0.005
复方丹参片	0.6	4	36.5 \pm 2.7	<0.001
	0.3	4	38.9 \pm 2.9	<0.001
	0.1	4	14.1 \pm 2.5	<0.001
	8.0	4	31.3 \pm 1.1	<0.001
丹参注射液	4.0	4	36.1 \pm 4.0	<0.001
	2.0	4	14.3 \pm 1.1	<0.001
	0.5	4	9.4 \pm 1.2	<0.001
对 照 组	0	36	23.9 \pm 4.0	

2.4 丹参制剂干预抗原抗体结合反应

丹参制剂在一定浓度范围,分别抑制 Pg、C1INH、C4、ALb 的抗原抗体结合反应,对 C3、PA 的抗原抗体结合沉淀环的形成无明显影响。以与对照孔有显著差异的药物最大稀释度计算药物特异性抑制抗原抗体结合反应的最小浓度。结果见表 4。

表 4 丹参制剂抑制抗原抗体结合反应的实验结果 (mg/ml)

药物	Pg	C1INH	C3	C4	PA	ALb
复方丹参片	12.5	100.0	\	125.0	\	0.8
丹 参	1.6	64.1	\	128.2	\	0.4
丹参注射液	37.5	375.0	\	187.5	\	2.3

3 讨 论

丹参在《神农本草经》中被列为上品,称丹参能“主心腹邪气,肠鸣幽幽如走水,寒热积聚;破症除瘕,止烦渴,益气。”《妇人明理论》认为:“四物汤治妇人病,不问产前产后经水多少,皆可多用,惟一味丹参散,主治与之相同,盖丹参能破宿血,补新血,安生胎,落死胎,止崩中带下,调经脉,其功大类当归、地黄、芍药、芍药故也。”近代研究表明,丹参能改善不良的心脏功能,加强心肌收缩力而不增加心肌耗氧量,增加肢体和冠脉血流量,抗血栓形成和改善血瘀患者的血液流变学特征,促进组织的修复与再生,有明显的镇静作用,还有一定的抑菌作用。

本研究发现,不同丹参制剂均无直接纤溶活性,未见提高纤溶酶的活性。丹参在一定浓度范围,能不同程度抑制 t-PA、u-PA 激活纤溶活性。

产生抑制作用的抑制物是怎样的分子基团,是抑制 t-PA、u-PA 的纤溶激活活性,还是抑制纤溶酶的纤溶活性,尚待更深入研究。

我们研究发现,丹参制剂在一定浓度范围能抑制人血清补体免疫溶血活性,使 HRBC-C3bR 活性减弱。补体活性正常,能非特异抗微生物感染、溶解免疫复合物和免疫调理,细胞膜 C3bR 活性对清除免疫复合物和免疫调理起协同作用。过度的补体活化,可与凝血、纤溶、激肽系统相互作用而产生炎症损伤等一系列病理反应。丹参能抑制蛋清、角叉菜胶、甲醛性关

节肿胀,抑制甲醛性腹膜炎、巴豆油引起的小鼠实验性炎症肉芽肿,临床治疗关节肿痛、抗纤维化和斑痕形成、抗肿瘤、心血管疾病等,可能与抑制补体过度活化和调节细胞膜 C3bR 活性有重要关系。

本研究用抗原抗体结合干预试验发现丹参制剂在一定浓度范围,分别抑制 Pg、C1INH、C4、ALb 的抗原抗体结合反应,对 C3、PA 的抗原抗体结合沉淀环的形成无明显影响。与干预 C1INH、C4 的特异性抗原抗体结合反应相比,丹参对 Pg 的抗原抗体结合反应抑制作用更强。在纤溶和补体系统之间,丹参可能主要作用于纤溶系统。丹参抑制 ALb 的抗原抗体结合反应比对 Pg 更强,说明丹参中含有与 ALb 分子的某些抗原决定簇亲和力更强的对应结构,我们正在进一步研究。

临床上,为治疗血栓而大量应用纤溶酶原激活剂时,不仅发生出血,而且部分病例经溶栓后不久又再出现血栓,这与纤溶酶大量生成、消耗生理性的纤溶抑制剂、活化胶原酶等水解细胞外基质的蛋白水解酶、损伤血管内皮细胞有关。我们认为,丹参的纤溶抑制成分可能有防止过度纤溶反应和再度血栓形成的调节作用。

已知纤溶酶原激活剂和纤溶酶都是丝氨酸蛋白水解酶类,抑制纤溶的丹参可能也对属于丝氨酸蛋白水解酶类的凝血酶、弹性蛋白酶、激肽释放酶、胰蛋白酶、胆碱酯酶、部分补体成分等有抑制作用,这对调节凝血、纤溶、补体、激肽四大系统交互激活的平衡,对抗炎症反应等都具有重要意义。

参考文献

[1] 王振声,陈朝仕,杨祖才,等. 丹参的抗凝与纤维蛋白(原)溶解作用的体外实验研究. 中华内科杂志, 1976, 1 (6): 341-344.
[2] 谢文光,王会信,蒋滋慧,等. SDS-PAGE 及转移电泳法测定纤溶酶原激活剂的分子量. 军事医学科学院院刊, 1990, 14 (3): 228-230.
[3] 郝维善,高秀芳. 微量快速平板补体活性测定. 中华医学检验杂志, 1982, 5 (4): 206.
[4] 谢文光,魏钰书,周良玉,等. 治疗药物调节细胞膜 C3bR 功能的表达. 中国免疫学杂志, 1994, 10 (2): 90.