

补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血小板 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白的影响

徐榆林¹, 秦莎莎², 祝赫², 黄海艳², 郑丽娟³, 朱原³, 姚晖⁴, 张继平^{1,4*}

(1. 广东医科大学药学院, 广东湛江 524023; 2. 广东药科大学中药学院, 广州 510006;
3. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 4. 南方医科大学附属佛山医院, 广东佛山 528000)

[摘要] **目的:**探讨补阳还五汤预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠体内血小板活化信号通路中酪氨酸激酶(Src), 蛋白激酶 B(Akt) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK) 蛋白及其磷酸化表达的影响。**方法:**将 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、硫酸氢氯吡格雷组($7.81 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和补阳还五汤高、中、低剂量组($29.69, 14.84, 7.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。连续灌胃 *ig* 给药 14 d 后, 大脑中动脉线栓法复制脑缺血再灌注损伤模型, 并神经功能缺损评分; 氯化三苯基四氮唑(TTC) 染色法测算脑梗死体积; 蛋白质免疫印迹法(Western blot) 检测血小板活化信号通路中 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白及其磷酸化表达情况。**结果:**与模型组比较, 补阳还五汤各组及硫酸氢氯吡格雷组能明显降低脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能缺损评分和脑梗死体积比($P < 0.05$); 补阳还五汤不同剂量明显降低 Src, Akt 和 p38 MAPK 磷酸化水平($P < 0.05$); 硫酸氢氯吡格雷明显降低 Src 和 Akt 磷酸化水平($P < 0.05$); 各组大鼠血小板 Src, Akt 和 p38 MAPK 总蛋白表达水平无统计学差异。**结论:**补阳还五汤预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑组织保护作用, 一定程度上是发挥抗血小板活化的作用, 且可能与抑制 Src 家族激酶, PI3K-Akt 和 p38 MAPK 信号通路有关。

[关键词] 补阳还五汤; 脑缺血再灌注; 血小板活化; Src; Akt; p38 MAPK

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0135-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050135

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1153.048.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 11:53

Effect of Buyang Huanwu Tang on Platelet Proteins Src, Akt and p38 MAPK of Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Rat

XU Yu-lin¹, QIN Sha-sha², ZHU He², HUANG Hai-yan², ZHENG Li-xian³,
ZHU Yuan³, YAO Hui⁴, ZHANG Ji-ping^{1,4*}

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

3. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

4. Foshan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Foshan 528000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of pre-treatment with Buyang Huanwu Tang (BHT) on Src, Akt and p38 MAPK proteins and their phosphorylation expressions *in vivo* platelet activation signaling pathways of rats with cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Method:** SD rats were randomly divided into blank control group, sham-operation group, model group, Clopidogrel Hydrogen Sulfate group ($7.81 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose, medium-dose and low-dose BHT group ($29.69, 14.84, 7.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). After oral administration with drugs for 14

[收稿日期] 20160622(018)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2013010012284); 广东省中药局中医药强省课题(20132029); 佛山市科技发展专项(2012AA100111); 佛山市医学类科技攻关项目(201208079); 佛山市产学研专项(2011BC100011); 佛山市科技创新专项(2013AG10012)

[第一作者] 徐榆林, 在读硕士, 从事中药药理学研究, Tel:15015651319, E-mail: fsxuyulin@163.com

[通讯作者] * 张继平, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药复方药理研究, Tel:0757-88032005, E-mail: fszjping@163.com

d, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) method was used to replicate the model of cerebral I/R injury, neurological deficit scores were measured. Besides, 2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining method was used to calculate the volume of cerebral infarction; Western blot was used to measure platelet activation signaling pathways Src, Akt and p38 MAPK protein and their phosphorylation expressions. All the data were gathered after 14 days of continuous *ig* administration. **Result:** Compared with the model group, BHT at different doses and Clopidogrel Hydrogen reduced neurological deficit score and infarct volume percentage significantly in rats with cerebral I/R injury ($P < 0.05$). BHT at different doses could significantly decrease Src, Akt and p38 MAPK phosphorylation levels ($P < 0.05$). Clopidogrel Hydrogen dramatically reduced Src and Akt phosphorylation levels ($P < 0.05$). Each group showed no statistical difference in total protein expression of Src, Akt and p38 MAPK. **Conclusion:** Pre-treatment with BHT had a cerebral protective effect on rats with cerebral I/R injury, which is partially attributed to its anti-platelet activation effects, and may be related with the inhibition of Src family kinases, PI3K-Akt and p38 MAPK signaling pathway.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; cerebral ischemia-reperfusion (I/R); platelet activation; Src; Akt; p38 MAPK

缺血性脑血管病 (ischemic cerebral vascular disease, ICVD) 是严重危害人类健康的常见、多发病症,包括短暂性脑缺血、脑栓塞和脑梗死等,在临床上应用活血化瘀法治疗具有肯定的疗效^[1-2]。补阳还五汤是目前 ICVD 防治应用中频率最高的中药方剂,用于缺血性脑卒中和出血性脑卒中恢复期的预防或治疗,以改善中风后遗症^[3-4]。前期研究显示补阳还五汤能降低全血黏度^[5],与模型组比较,补阳还五汤高剂量组在切变率为 $30 \cdot s^{-1}$, $10 \cdot s^{-1}$, 低剂量组在切变率 $150 \cdot s^{-1}$, $30 \cdot s^{-1}$, $10 \cdot s^{-1}$ 时有统计学意义。同时补阳还五汤也具有抗血小板活性,主要机制为抑制由二磷酸腺苷 (ADP), 胶原, 血小板活化因子 (PAF) 诱导的血小板聚集^[6-7]、促进前列环素 I_2 (PGI₂) 合成^[8] 等,但从蛋白激酶水平上研究其抗血小板活化的信号转导通路机制未有文献报道。本研究通过补阳还五汤不同剂量预处理 14 d 后复制急性脑缺血再灌注损伤大鼠模型,检测血小板活化信号通路中酪氨酸激酶 (Src), 蛋白激酶 (Akt) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 蛋白及其磷酸化表达情况,探讨该方抗血小板活化可能的信号转导通路。为该方临床预防应用和将来开发更理想的抗血栓药物提供实验依据,也为其中药药效学提供明确的理论基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 140 只,体重 250 ~ 320 g, 广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物合格证号 SCXK (粤) 2013-0020; 动物实验设施是由广州中医药大学实验动物中心提供,动物实验设施许可证号 SYXK (粤) 2013-0085。本研究获得广

州中医药大学实验动物伦理委员会批准 (大学城-20150427), 所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 硫酸氢氯吡格雷片研磨成粉并超声溶解,按照人的临床剂量 $75 \text{ mg} \cdot (60 \text{ kg})^{-1}$ 折算成大鼠的剂量为 $7.812 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 配成 $0.781 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯吡格雷水溶液备用。硫酸氢氯吡格雷片 [赛诺菲 (杭州) 制药有限公司, 批号 4A752]; 补阳还五汤由颗粒剂按照《医林改错》所载的药味和配比 [黄芪 (生) 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 4.5 g, 地龙、桃仁、红花、川芎各 3 g, 共 142.5 g], 按照人的临床剂量 $142.5 \text{ g} \cdot (60 \text{ kg})^{-1}$ 的 2, 1 和 1/2 倍折算成大鼠的剂量为 29.69, 14.84, 7.42 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量组,取相当于饮片等量的各味药颗粒剂混合后, 100 °C 蒸馏水配制成补阳还五汤水溶液备用。补阳还五汤配方颗粒剂: 黄芪颗粒剂 (批号 503356T), 当归尾颗粒剂 (批号 403499T), 赤芍颗粒剂 (批号 410100T), 地龙颗粒剂 (批号 502146T), 川芎颗粒剂 (批号 501468T), 桃仁颗粒剂 (批号 501081T) 和红花颗粒剂 (批号 412009T), 均购自广东一方制药有限公司。兔抗大鼠 Akt 磷酸化, Akt (Ser473), 磷酸化 p38 MAPK (Thr180/Tyr182), p38 MAPK, 磷酸化 Src (Tyr416), Src 单克隆抗体, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 201504, 201504, 201504, 201504, 201503, 201503, 201504); 高灵敏化学发光检测试剂盒 (上海七海复泰生物科技有限公司, 批号 20150716)。

1.3 仪器 3-30K 型高速冷冻离心机 (德国 Sigma

公司), ELx800 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司), Mini-PROTEAN4 型垂直电泳仪及 Bio-Rad ChemiDoc™ XRS 型化学发光成像系统(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 140 只 SD 大鼠按照完全随机法分为 7 组, 每组 20 只, 正常组、假手术组和模型组[灌胃(*ig*)等量生理盐水], 硫酸氢氯吡格雷组(*ig* 7.81 mg·kg⁻¹), 补阳还五汤高、中、低剂量组(分别 *ig* 29.69, 14.84, 7.42 g·kg⁻¹)。适应性饲养 1 周后, 每天 *ig* 给药 1 次, 持续 14 d 后禁食不禁水 12 h, 末次给药 2 h 后进行造模。

2.2 模型复制 在 SD 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)麻醉, 参照文献[9]方法, 颈右侧部纵向切开皮肤, 钝性分离皮下组织并分离出右侧颈总动脉(CCA), 颈外动脉(ECA), 颈内动脉(ICA)。结扎 CCA 近心端, 线栓通过 CCA 剪口进入 ICA 及延伸部分, 阻塞大脑中动脉(MCA), 固定栓线, 2 h 后抽出栓线再灌注 6 h, 造成大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠模型。假手术组分离右侧颈部血管并结扎 CCA 近心端, 但不进行栓塞处理。

2.3 检测指标

2.3.1 神经功能评分 待大鼠醒后 2 h, 按照 Longa 等^[10]的 5 级 4 分法对大鼠神经功能缺失进行评分。符合 2~4 分, 爬行时向左转圈(追尾现象), 严重时向左跌倒, 提尾时左前肢内收屈曲则可判定造模成功, 不符合者剔除。

2.3.2 脑梗死体积测定 断头处死后取脑, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 4 ℃生理盐水冲洗放入 -20 ℃冰箱。约 30 min 后取出鼠脑, 间隔 2 mm 连续冠状切片, 参照文献[9]方法, 用 2% 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色, 待脑片未梗死区域变为红色即取出, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h。用数码相机拍取照片后, 使用 Image Pro Plus 图像分析软件处理, 计算大鼠脑梗死面积。每个脑片的正反两面各测算脑梗死面积和脑片面积, 计算百分比值后求均值, 作为脑梗死面积率。

脑梗死面积率 = 全部脑梗死面积/全部脑片面积 × 100%

2.3.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测血小板活化信号通路 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白及其磷酸化表达情况 3.8% 枸橼酸钠抗凝全血, 100 × g 下离心 10 min 制得富血小板血浆(PRP)。吸取 3/4 的上清白膜液, 移入另一洁净 2 mL 离心管中, 再次 400 × g 离心 10 min, 分离得贫血小板血浆(PPP)和

血小板层。弃上清, 血小板悬浮于 pH7.4 不含钙镁离子的台氏液(Tyrode's buffer)中并调整最终密度至 2 × 10⁸ 个血小板/mL, 立即加入 SDS 裂解液冰上裂解 30 min, 低温 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min 提得血小板蛋白^[11]。取上清, BCA 法进行蛋白浓度的测定。血小板裂解液加入 5 × loading buffer, 95 ℃煮沸 10 min; 在 SDS-PAGE 垂直板内每孔上样 50 μg 蛋白样品, 进行电泳, 湿法电转至 PVDF 膜上, 用 5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h; TBST 洗膜 3 次, 将 PVDF 膜分别放入稀释好的一抗(1:1 000 BSA 封闭液稀释)中, 4 ℃孵育过夜; TBST 洗膜 4 次后将 PVDF 膜放入二抗(1:2 000 BSA 封闭液稀释)中室温避光孵育 1 h; TBST 洗膜 4 次后 ECL 显色并在化学发光成像系统中成像; Image pro plus 图像分析软件测定条带的积分吸光度 IA 值, 并用内参校正各自磷酸化蛋白和总蛋白的 IA, 即相对光密度表示蛋白相对表达水平。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布的计量资料以“median”表示。多组间资料比较采用单因素方差分析检验或 Kruskal-Wallis 单因素方差分析, 组间资料比较采用 SNK-*q* 检验或者 Nemenyi 检验(非参数检验两两比较), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

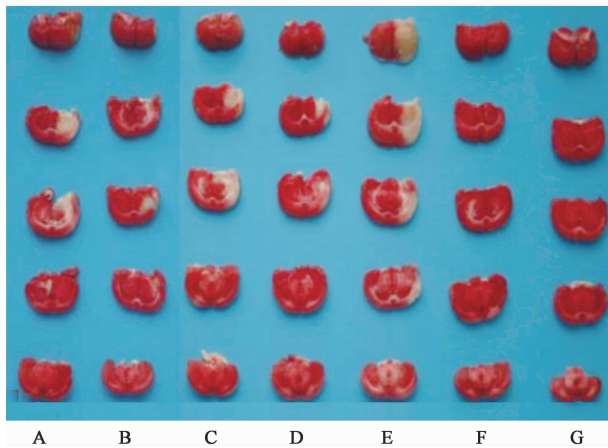
3 结果

3.1 对大鼠神经功能缺损评分和脑梗死体积比的影响 与正常组和假手术组比较, 模型组的神经功能缺损评分和梗死体积比均有增大($P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤高、中、低剂量组以及硫酸氢氯吡格雷组的神经功能缺损评分、梗死体积比明显降低($P < 0.05$), 表明各给药组可以减轻急性脑缺血再灌注损伤对大鼠的大脑损害。见图 1 和表 1, 2。

表 1 补阳还五汤对大鼠神经功能损伤评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)
Table 1 Effect of Buyang Huanwu Tang on scores of nerve function injury in rats($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	神经功能损伤评分/分
正常	-	0
假手术	-	0
模型	-	2.63 ± 0.52 ^{1,2)}
补阳还五汤	29.69	1.75 ± 0.71 ³⁾
	14.84	1.25 ± 0.46 ³⁾
	7.42	2.00 ± 0.75 ³⁾
硫酸氢氯吡格雷	7.81 × 10 ⁻³	1.38 ± 0.74 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与假手术组比较²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2, 图 2 同)。



A. 补阳还五汤 29.69 g·kg⁻¹组; B. 补阳还五汤 14.84 g·kg⁻¹组; C. 补阳还五汤 7.42 g·kg⁻¹组; D. 硫酸氢氯吡格雷组; E. 模型组; F. 假手术组; G. 正常组(图 2 同)

图 1 补阳还五汤对大鼠脑组织 TTC 染色情况的影响
Fig.1 Effect of Buyang Huanwu Tang on TTC staining of brain tissue in rats

3.2 对大鼠血小板活化信号通路 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白及其磷酸化表达影响 大鼠血小板活化信号通路 Src, Akt 和 p38 MAPK 在各组中的总蛋白表达水平无统计学差异, 而其蛋白磷酸化水平均发生不同程度的变化; 与假手术组比较, 模型组的 Src 和 Akt 磷酸化水平明显升高 ($P < 0.05$), 表明该脑缺血再灌注损伤模型使大鼠血小板 Src 和 Akt 信号

表 2 补阳还五汤对大鼠脑梗死体积比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on volume ratio of cerebral infarction in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	梗死面积率/%
正常	-	0
假手术	-	0
模型	-	16.04 ± 7.80 ^{1,2)}
补阳还五汤	29.69	10.62 ± 6.49 ³⁾
	14.84	8.74 ± 4.03 ³⁾
	7.42	8.85 ± 4.95 ³⁾
硫酸氢氯吡格雷	7.81 × 10 ⁻³	6.44 ± 4.78 ³⁾

转导通路被激活。而模型组的 p38 MAPK 磷酸化水平变化无统计学差异, 且假手术组和模型组的 p38 MAPK 磷酸化水平与正常组的 p38 MAPK 磷酸化水平变化有统计学差异 ($P < 0.05$), 表明手术操作可引起 p38 MAPK 信号转导通路激活, 脑缺血再灌注损伤模型对 p38 MAPK 信号转导通路影响较小; 与模型组比较, 补阳还五汤高、中、低剂量组的 Akt 和 p38 MAPK 磷酸化水平明显降低 ($P < 0.05$), 补阳还五汤中、低剂量组的 Src 磷酸化水平明显降低 ($P < 0.05$), 硫酸氢氯吡格雷组的 Src 和 Akt 磷酸化水平明显降低 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 补阳还五汤高、中剂量组的 Akt 磷酸化程度差异无统计学意义, 硫酸氢氯吡格雷组的 Src 和 Akt 磷酸化程度差异无统计学意义。见图 2。

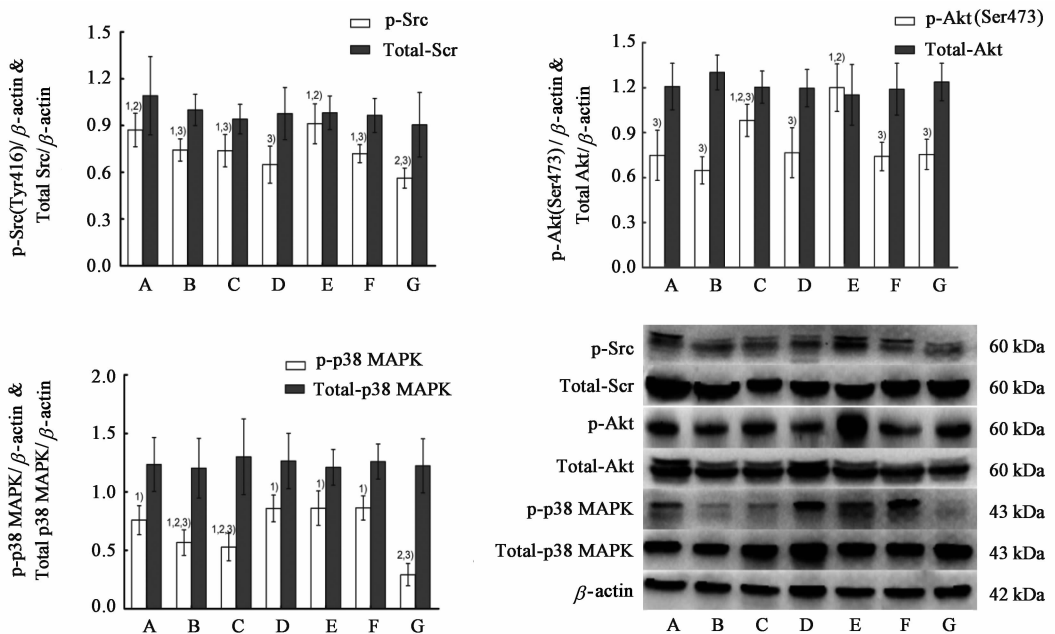


图 2 补阳还五汤对大鼠血小板 Src, Akt 和 p38 MAPK 的磷酸化水平与总蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.2 Effect of Buyang Huanwu Tang on phosphorylation levels and expression of total protein of Src, Akt and p38 MAPK in rats platelet ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

补阳还五汤对于急性脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,并能降低脑梗死面积^[12-14]。本研究同样发现,补阳还五汤不同剂量均能不同程度地降低大鼠神经功能缺损评分和脑梗死体积,中剂量效果接近硫酸氢氯吡格雷。硫酸氢氯吡格雷是防治缺血性脑血管病(ICVD)的有效药物,可抑制血小板的活化,阻止血小板源性血栓的形成,从而对 ICVD 起预防和治疗作用。

血小板活化有多种途径,常见的有内皮下基质损伤暴露出的胶原,凝血因子活化产生凝血酶以及血小板活化后自身颗粒分泌 ADP,凝血酶,血栓素 A₂(TXA₂)和血管性血友病因子(vWF)等。这些分子均与血小板上相应的受体结合,激活下游的信号转导磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K),二酰甘油-蛋白激酶 C(database availability group-protein kinase C, DAG-PKC),MAPK 等通路,最终传递至血小板表面糖蛋白 II b/III a 受体(GP II b/III a),血小板通过纤维蛋白桥联而聚集。此为整合素 α II b β_3 (即 GP II b/III a)“由内-向外”的信号转导过程。活化的整合素 α II b β_3 将引起下游 Src 家族激酶成员 c-Src,酪氨酸激酶 Syk,磷脂酶 C γ 2(PLC γ 2)的磷酸化以及颗粒分泌 ADP 和 TXA₂ 等,最终使血小板聚集、交联和释放等反应强度最大化,稳定血栓。此为整合素 α II b β_3 “由外-向内”的信号转导过程^[15]。

Src 家族激酶,PI3K-Akt 和 p38 MAPK 信号转导是血小板“由内-向外”和“由外-向内”的信号转导过程中 3 个重要通路。目前已报道大鼠血小板表达 4 种 Src 家族激酶分子,c-Src, Fgr, Fyn 和 Lyn。Src 家族激酶在调解血小板对血管损伤作出快速反应中起到关键作用,参与了由 vWF,胶原早期信号或整合素 α II b β_3 “由外-向内”信号的转导过程^[16],其中 Fyn 和 Lyn 均与 GPVI 亚基相互作用,当胶原与 GPVI 结合后,Fyn 和 Lyn 即被活化并磷酸化胶原受体复合物 GPVI-FcR γ 链,再通过 Syk 引发一系列酪氨酸磷酸化,进而激活 PI3K-Akt 等通路,最终至 α II b β_3 与纤维蛋白发生黏附、聚集反应。c-Src 与整合素 α II b β_3 的 β_3 尾段相互作用,使得活化的 α II b β_3 “由外-向内”的信号向下游传导,导致血小板颗粒分泌,从而使血小板聚集、交联和释放等反应强度最大化,稳定血栓^[17]。在血小板的激活过程中,PI3K 发挥了很重要的作用,参与了由 ADP,vWF,胶原介导或整合素 α II b β_3 “由外-向内”的信号转导过程^[15,18]。

Akt(又名蛋白激酶 B,PKB)是 PI3K 下游的重要靶点分子,PI3K 激活后,Akt 在苏氨酸和丝氨酸(Thr308/Ser473)的调节位点发生磷酸化,然后磷酸化内皮型一氧化氮合酶(eNOS)产生一氧化氮(NO),激活 NO-cGMP-PKG 通路 NO 和 cGMP 在血小板活化具有双向性,在低浓度 NO 和 cGMP 下随激动剂而激活,在浓度高 cGMP 下被抑制^[19-20],进而活化 p38 MAPK 通路^[21],导致颗粒分泌和血小板聚集的第 2 个高峰。Akt 的磷酸化是 PI3K 通路激活的标志,而 Akt 完全活化需要 Ser473 磷酸化^[22],因此本研究把测定 P-Akt(Ser473)水平代表 Akt 磷酸化的整体水平。MAPK 家族分子可以分为三类 ERKs, JNKs 和 p38 MAPKs,血小板中表达 JNK1, p38 MAPK 和 ERK1, ERK2, 这些分子跟血小板活化后自身产生和释放血栓素 A₂(TXA₂)有关^[23]。其中 p38 MAPK 参与了由 vWF 或胶原介导的信号转导过程,传递上游 PI3K-Akt 信号,活化下游磷脂酶 A2(PLA2),PLA2 在细胞膜上释放花生四烯酸(AA),AA 经血栓素合成酶 1 转变为 TXA₂。TXA₂ 通过一系列反应使胞浆 Ca²⁺ 浓度升高并活化 DAG-PKC 通路,最终至 α II b β_3 与纤维蛋白发生黏附、聚集反应^[23-24]。

本研究通过补阳还五汤预防给药,并复制急性脑缺血再灌注损伤大鼠模型,观察补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠体内血小板活化信号通路中 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白及其磷酸化表达影响,发现脑缺血再灌注损伤模型使大鼠血小板 Src 和 Akt 蛋白磷酸化表达上调,而对 p38 MAPK 蛋白磷酸化无影响或影响甚微,表明该模型可使 Src 家族激酶和 PI3K-Akt 信号通路激活增强,对 p38 MAPK 信号通路无影响或影响甚微;补阳还五汤各剂量组能显著的抑制 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白磷酸化,高、中剂量组的 Akt 磷酸化程度基本恢复至正常组水平,表明补阳还五汤可能通过抑制 Src 家族激酶, PI3K-Akt 和 p38 MAPK 信号通路来发挥抗血小板作用;硫酸氢氯吡格雷组能显著抑制 Src 和 Akt 蛋白磷酸化,磷酸化程度基本恢复至正常组水平,但对 p38 MAPK 蛋白磷酸化无影响,表明硫酸氢氯吡格雷可能通过抑制 Src 家族激酶和 PI3K-Akt 信号通路来发挥抗血小板作用。

目前现有的抗血小板药物如阿司匹林、硫酸氢氯吡格雷或盐酸替罗非班等都是靶向一个或几个血小板靶点,最终使 GP II b/III a 受体功能下调。阿司匹林和氯吡格雷只能各自抑制由 TXA₂ 和 ADP 介导的血小板激活,并不能阻断由凝血酶或胶原等直接

诱导的血小板聚集。盐酸替罗非班通过竞争性地与 GP II b/III a 受体结合,在抗栓的同时也阻碍了生理性止血的过程,出现出血并发症,使得这类药物未能较好地临床推广,而补阳还五汤通过抑制 ADP, 胶原, PAF 诱导的血小板聚集^[6-7]、促进 PGI₂ 合成^[8]、抑制凝血酶诱导血管内皮细胞表达组织因子和释放 vWF 并促进表达 NO^[25],改善脑卒中患者纤溶活性和促进纤溶功能^[26]等多环节、多途径、多靶点作用于脑血栓形成复杂的病理环节,在临床应用具有肯定的疗效和独特的优势^[27]。本研究也发现补阳还五汤通过多种途径调节脑缺血再灌注损伤大鼠体内血小板活化,可能与抑制 Src 家族激酶, PI3K-Akt 和 p38 MAPK 信号通路有关。

【参考文献】

[1] 李桂玲. 活血化瘀法治疗缺血性脑血管病 45 例[J]. 中国实用医药, 2011, 6(36): 173-174.

[2] 王凤琴, 陈岑, 夏之宁, 等. 血小板在活血化瘀中药研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 2993-3003.

[3] 陈冬, 杨洁红. 补阳还五汤抗脑缺血作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 72-74.

[4] 姜莉, 王馨, 吴晓光, 等. 补阳还五汤对脑出血的治疗作用及机制研究[J]. 河北医学, 2015, 21(11): 1907-1910.

[5] 王日生, 蔡俊, 张继平. 补阳还五汤对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5): 725-727.

[6] 姚晖, 张继平, 陈芝喜, 等. 补阳还五汤及黄芪体外对家兔血小板活化因子受体活性的影响[J]. 中医杂志, 2006, 47(8): 613-615.

[7] 宫丽, 张继平, 李齐欢, 等. 补阳还五汤家兔含药血清对 PAF 诱导的家兔血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 60-61.

[8] 杨静, 梁燕, 张淑萍, 等. 补阳还五汤及有效部位生物碱和苷对动脉血栓形成大鼠血浆血栓素 A₂、前列腺素的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 28-30.

[9] 马贤德, 孙宏伟, 柴纪严, 等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(6): 1200-1201.

[10] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[11] Cevik O, Adiguzel Z, Baykal A T, et al. The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(12): 6721-6727.

[12] 蔡俊, 张继平, 姚晖, 等. 补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 122-126.

[13] 祝赫, 黄海艳, 张继平, 等. 补阳还五汤预处理对脑缺血再灌注大鼠脑组织海马区 Akt 磷酸化水平的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(4): 451-455.

[14] 朱原, 蔡俊, 徐榆林, 等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠 PTEN mRNA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 135-138.

[15] LI Z, Delaney M K, O'Brien K A, et al. Signaling during platelet adhesion and activation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(12): 2341-2349.

[16] Senis Y A, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation[J]. Blood, 2014, 124(13): 2013-2024.

[17] WU Y, Span L M, Nygren P, et al. The tyrosine kinase c-Src specifically binds to the active integrin α II b β ₃ to initiate outside-in signaling in platelets [J]. J Biol Chem, 2015, 290(25): 15825-15834.

[18] Guidetti G F, Canobbio I, Torti M. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis [J]. Adv Biol Regul, 2015, 59(3): 36-52.

[19] Marjanovic J A, Stojanovic A, Brovkoych V M, et al. Signaling-mediated functional activation of inducible nitric-oxide synthase and its role in stimulating platelet activation [J]. J Biol Chem, 2008, 283(43): 28827-28834.

[20] ZHANG G, XIANG B, DONG A, et al. Biphasic roles for soluble guanylyl cyclase (sGC) in platelet activation [J]. Blood, 2011, 118(13): 3670-3679.

[21] LI Z. Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin α II b β ₃ [J]. Blood, 2005, 107(3): 965-972.

[22] Woulfe D S. Akt signaling in platelets and thrombosis [J]. Expert Rev Hematol, 2014, 3(1): 81-91.

[23] Cuadrado A, Nebreda A R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling[J]. Biochem J, 2010, 429(3): 403-417.

[24] Coulon L, Calzada C, Moulin P, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A₂ cascade in hydroperoxide-stressed platelets [J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(6): 616-625.

[25] 文志斌, 尚改萍, 何晓凡, 等. 补阳还五汤对凝血酶诱导血管内皮细胞释放 NO, vWF, TFPI 及表达组织因子的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(4): 315-318.

[26] 吴常青, 汪春彦, 邵旭, 等. 补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中草药, 2011, 42(1): 114-117.

[27] 刘绛云, 陈炯华. 缺血性脑血管病中药药理学研究的最新进展[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2858-2860.

【责任编辑 周冰冰】