

参附注射液减轻血栓闭塞性脉管炎模型大鼠损伤的作用研究

洪芬芳^{1,2}, 贺长生³, 刘晓军⁴, 涂桂林², 郭发先¹, 杨树龙^{1*}

- (1. 南昌大学基础医学院生理教研室, 南昌 330006; 2. 南昌大学医学实验教学部, 南昌 330006;
3. 江西省井冈山市餐饮服务和保健食品化妆品监督所卫生监督科, 江西 井冈山 343600;
4. 江西省莲花县疾控中心疾控科, 江西 莲花 337109)

[摘要] **目的:**观察参附注射液(Shenfu injection, SF)对血栓闭塞性脉管炎(thromboangitis obliterans, TAO)模型大鼠的防治作用及其机制。**方法:**健康成年雄性 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 即假手术组、TAO 模型组、SF 低、中、高剂量(2.5, 5, 10 mg·kg⁻¹)组。采用月桂酸股动脉注射制作大鼠 TAO 模型。经尾静脉给予生理盐水或低、中和高剂量 SF, 连续 15 d。观察大鼠的体征变化、病理切片血栓分级、测定血小板数量、血浆血栓素 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮基-前列腺素 F_{1α} (6-keto-prostaglandin F_{1α}, 6-K-PGF_{1α})含量等指标。**结果:**SF 明显抑制血管内血栓形成; SF 中, 高剂量组血小板计数较模型组显著减少(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。另外, SF 中、高剂量组血浆 TXB₂ 也明显减少($P < 0.01$)而 6-K-PGF_{1α} 显著增加($P < 0.01$)。**结论:**SF 可能通过其加强对血小板聚集的抑制作用, 提高血管的抗血栓功能, 减少 TAO 模型大鼠血栓形成, 以及改善其病变体征。

[关键词] 血栓闭塞性脉管炎; 参附注射液; 血小板聚集; 血栓

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0222-05

[doi] 10.11653/syfy2013140222

Mechanism of Shenfu Injection Alleviating Lesions in Experimental Buerger's Disease Model Rats

HONG Fen-fang^{1,2}, HE Chang-sheng³, LIU Xiao-jun⁴, TU Gui-ling², GUO Fa-xian¹, YANG Shu-long^{1*}

(1. Department of Physiology of Basic Medical College, Nanchang 330006, China;

2. Department of Experimental Teaching, Nanchang University, Nanchang 330006, China;

3. Department of Catering Services And Health Food, Cosmetics Supervision Station
of Jinggangshan, Jinggangshan 343600, China;

4. Department of Disease Control, Disease Control Station of Lianhua County, Lianhua 337109, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism and the therapeutic effects of Shenfu injection (SF) on the rat models with buerger's disease or thromboangiitis obliterans (TAO). **Method:** Adult male Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operated group, TAO model group, SF low dose (2.5 mg·kg⁻¹), medium dose (5 mg·kg⁻¹) and high dose (10 mg·kg⁻¹) groups ($n = 8$). Rats were intravenously administered SF 2.5, 5, 10 mg·kg⁻¹ or saline once per day for 15 days. TAO model was prepared by injecting sodium laurate into the femoral artery of rats. Then we examined the alterations of pathological signs, pathologic grading of thrombus, blood platelet count, the contents of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-K-PGF_{1α}) in plasma following SF or saline treatment. **Result:** More physiological signs of lesions and higher grades of pathological thrombosis, the increase in the TXB₂ content, blood platelet count and the decrease of 6-K-PGF_{1α}

[收稿日期] 20121120(006)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研计划课题(2012A131);江西省卫生厅科技计划项目(20132018);江西省教育厅科研基金资助课题(GJJ09038, GJJ12073)

[通讯作者] * 杨树龙, 博士, 副教授, 从事外周血管生理与药理研究, E-mail: yangshulong@yahoo.cn

content in TAO model group were observed in our experiments; Compared with TAO model group, SF treatment significantly improved the physiological signs of lesions induced by sodium laurate injection and reduced the numbers of thrombus formation and the TXB₂ content, as well as blood platelet count but increased the 6-K-PGF_{1α} content. **Conclusion:** These results first suggest that SF can cause a significant therapeutic effect on experimental TAO model rats by its inhibiting platelet aggregation and enhancing anti-thrombus function of vessel endothelia.

[**Key words**] thromboangiitis obliterans; Shenfu injection; platelet aggregation; thrombus

血栓闭塞性脉管炎(thromboangiitis obliterans, TAO)又称 Buerger's 病,是肢体中、小动脉和静脉节段性炎性和增殖性病变引起的阻塞性、缺血性疾病^[1]。病变主要累及四肢远端的中、小动脉;伴行静脉和浅表静脉也常累及。病理变化为血管壁节段性、非化脓性炎症伴腔内血栓形成,管腔阻塞引起肢体缺血而产生疼痛。病程呈周期性发作,最后肢端发生坏疽、溃疡^[2]。自 1908 年由 Leo Buerger^[3]首次描述本病至今已过去一个世纪,其病因及发病机制尚未明确。参附注射液(Shenfu injection, SF)是红参和附子的提取物,是中医“回阳救逆”古方——参附汤经分离提取,灭菌制成。其主要成分是人参皂苷及乌头中有效成分水溶性生物碱。笔者^[4]早期研究表明 SF 可能通过激活和保护内源性氧自由基清除剂超氧化物歧化酶(SOD)活性,直接灭活氧自由基,增加一氧化氮(NO)含量,抑制白细胞(WBC)黏附和 Na⁺内流等机制,发挥其预防急性缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)肾损伤的作用。近年有文献报道 SF 在肢体 IR 损伤中也有很好的防治作用^[5-7]。由于 TAO 是肢体中、小动脉和静脉节段性炎性和增殖性病变引起的阻塞性、缺血性疾病,这样 SF 有可能在 TAO 的防治中发挥其独特的作用。此外,相对大量的临床中药治疗 TAO 的病例报道^[8-10],实验研究相对薄弱,对 TAO 深层次机制研究更少,且有关 SF 防治 TAO 的研究至今未见报道。

1 材料

1.1 药物与试剂 SF 注射液(雅安三九药业有限公司,批号 991202),月桂酸钠[国药集团化学试剂有限公司(中国西安)提供,批号 060112],血浆血栓素 B₂(thromboxane B₂, TXB₂)和 6-酮-前列腺素 1(6-K-PGF_{1α})检测放射试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 动物 健康 SD 大鼠 40 只,雄性,230~270 g,由南昌大学医学院实验动物中心提供。自由摄取水和食物。

1.3 仪器 5804 型低温离心机(Eppendorf 公司),紫外分光光度计(上海生化仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠按随机方法分为假手术组、TAO 模型组(简称模型组)、SF 低剂量组(2.5 mg·kg⁻¹)、中剂量组(5 mg·kg⁻¹)和高剂量组(10 mg·kg⁻¹)共 5 组,每组 8 只。

2.2 造模与给药 参照文献[11]方法制作 TAO 大鼠模型:将大鼠用 10% 水合氯醛 3.5 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,游离股动脉,夹闭阻断血流,假手术组注入 0.2 mL 生理盐水,其余大鼠注入 0.2 mL 月桂酸钠,快速医用胶封闭针孔。造模 3 d 后假手术组和 TAO 模型组经尾静脉给予生理盐水, SF 3 个剂量组经尾静脉给予 SF 注射液, SF 低、中、高剂量组分别为 2.5, 5, 10 mg·kg⁻¹。各组均按 5 mL·kg⁻¹ 体重剂量 iv, 连续 15 d。在实验结束后,用 10% 水合氯醛麻醉大鼠。自颈总动脉取血液样本,根据所测变量选用肝素、柠檬酸钠或 EDTA 抗凝。

2.3 指标检测

2.3.1 体征变化 观察大鼠患肢皮肤温度、颜色、动脉搏动、患肢肿胀程度、坏疽和木乃伊化的病变程度和范围。参照王军等[12]采用的分级标准分级, 0 级:正常; I 级:病变局限于趾甲部; II 级:病变局限于趾部; III 级:病变局限于足爪部; IV 级:病变局限于膝关节以下; V 级:病变发展到膝关节以上。

2.3.2 病理切片血栓分级 取大鼠右下肢, 10% 福尔马林液固定 3 d 后用 10% 硝酸脱钙,足趾、踝关节上、下及股部 4 个部位横断切片, HE 染色,对血栓进行分级^[12], 0 级:无血栓; I 级:1 个血栓; II 级:2~3 个血栓; III 级:4 个以上血栓。

2.3.3 血小板计数 由南昌大学医学院第二附属医院协助测定。

2.3.4 血浆 TXB₂ 和 6-K-PGF_{1α} 检测 按试剂盒说明测定。

2.4 统计方法 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件分析。两两比较的多重比较方法进行单因素方差分析显著性后,采用 Kruskal-Wallis H 检验用来比较各组大鼠病变的体征变化和血栓等级。 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

3 结果

3.1 局部体征变化 经股动脉注入月桂酸钠约 5 min 后即出现大鼠患肢整个足趾部变苍白, 然后大约 5 h 内变青紫。在此期间, 皮肤温度下降, 动脉搏动减弱或消失。第 2 天, 受影响的爪子的足趾变黑, 暗区向上扩展, 形成坏疽和木乃伊化。部分动物表现为患肢疼痛、跛行和曳行现象。15 d 内多数大鼠出现患侧坏疽部分脱落, 其中 TAO 模型组病变最为严重; 与 TAO 模型组比较, SF 中、高剂量组的病变明显减轻 ($P < 0.05$), 而假手术组未见类似病变, 见表 1。

表 1 参附注射液对 TAO 大鼠局部体征变化分级的影响 ($n = 8$) 只

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	病变分级					
		0	I	II	III	IV	V
假手术	-	8	0	0	0	0	0 ¹⁾
模型	-	0	0	0	1	3	4
SF	2.5	0	2	2	3	1	0 ¹⁾
	5	2	3	2	1	0	0 ¹⁾
	10	1	3	2	2	0	0 ¹⁾

注: 与 TAO 模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 病理检查 假手术组手术区组织有轻微粘连和轻度炎细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 但股动脉通

表 3 SF 对 TAO 大鼠血浆 TXB₂, 6-K-PGF_{1α} 和血小板计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TXB ₂ /ng·L ⁻¹	6-K-PGF _{1α} /ng·L ⁻¹	血小板计数/×10 ⁸ /mL
假手术	-	167.13 ± 10.61 ²⁾	174.09 ± 9.68 ²⁾	7.69 ± 0.26 ²⁾
TAO 模型	-	335.75 ± 32.29	64.32 ± 5.33	9.26 ± 0.20
SF	2.5	255.13 ± 13.05	75.63 ± 6.34	8.62 ± 0.25
	5	183.62 ± 12.92 ²⁾	152.86 ± 9.72 ²⁾	8.26 ± 0.29 ¹⁾
	10	197.17 ± 11.07 ²⁾	138.82 ± 12.45 ²⁾	8.22 ± 0.20 ²⁾

4 讨论

TAO 的病因, 发病机制和治疗困扰人类已 100 多年^[13-15]。本研究中, 笔者经大鼠股动脉注射月桂酸钠诱发血管炎成功制作 TAO 模型。Ashida 等人曾用此模型来研究人类 TAO 疾病^[11]。而其他研究组也发现, 大鼠股动脉注入月桂酸钠可以模拟显示 TAO 患者的症状和体征^[6]。在本实验中, 观察到, 大部分 TAO 模型大鼠呈典型的缺血后肢血管炎症状、股动脉结构改变与血栓形成或血管内皮细胞增殖。此结果与以前的报道一致^[8-10]。

Shirakura 等发现 TAO 模型大鼠中存在血液高凝状态^[16]。血小板聚集被认为是月桂酸诱发大鼠

畅, 内膜光滑, 血管内无血栓形成; 经注射月桂酸钠造模后, TAO 模型大鼠患肢动脉内均有不同程度血栓形成, 应用 SF 处理的 3 个剂量组大鼠的血栓数明显减少 ($P < 0.05$), 且 SF 中、高剂量组大鼠未发现血栓机化现象, 血栓再通数增多, 动脉内皮增生、中膜与外膜的炎细胞浸润程度较 TAO 模型组明显降低。见表 2。

表 2 参附注射液对 TAO 大鼠病理切片血栓分级的影响 ($n = 8$) 只

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血栓分级			
		0	I	II	III
假手术	-	8	0	0	0 ²⁾
模型	-	0	0	2	6
SF	2.5	1	2	3	2
	5.0	2	3	2	1 ¹⁾
	10.0	3	3	1	1 ¹⁾

注: 与 TAO 模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 SF 对 TAO 模型大鼠血浆 TXB₂, 6-K-PGF_{1α} 和血小板形成的影响 与假手术组相比, TAO 模型组大鼠血浆 TXB₂ 和血小板计数显著增加 ($P < 0.01$) 而 6-K-PGF_{1α} 显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, SF 中、高剂量组血浆 TXB₂ 和血小板计数显著减少 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 而 6-K-PGF_{1α} 显著增加 ($P < 0.01$); 但 SF 低剂量组未见明显改变。见表 3。

实验性 TAO 模型启动和进展的一个主要因素^[11]。在笔者制作的实验 TAO 模型大鼠中, 血浆 TXB₂ 作为血小板聚集和血管收缩强力诱导剂 TXA₂ 的稳定产物^[17] 显著增加; 而在血管内皮细胞中同时具有抑制血小板聚集和抗血栓形成功能的血浆 6-K-PGF_{1α} 含量明显降低。这一结果可能主要是由于 TXA₂ 的主要生产者血小板聚集增强, 以及血管的抗血栓功能障碍所致。

SF 是中国传统的回阳救逆古方, 研究显示它在大鼠肾脏、肝脏等器官 IR 损伤中有保护作用^[4, 17]。此外, SF 在预防和治疗肢体再灌注损伤中也非常有效^[5-7, 18]。然而, 迄今为止, 尚没有文献报道 SF 在实

验动物或人类 TAO 中的作用。现已证明 SF 通过参与改善微循环^[17],产生对大鼠移植肝 IR 损伤的保护作用。能够降低心肌酶升高的幅度,明显减少肢体 IR 诱导心肌损伤^[18]。本实验中,在月桂酸钠注射后 15 d,TAO 模型组大鼠股动脉中可见各种血栓,许多动脉被血栓闭塞。而低剂量 SF 轻度和中、高剂量显著减少血栓的数量和水平,再灌注频率在中、高剂量 SF 组也显著增加。首次表明,SF 预处理在防止 TAO 模型大鼠的病理进展方面效果明显。

为了进一步分析 SF 对这些 TAO 大鼠模型的作用机制,笔者检查了 SF 对血浆 TXB₂ 和 6-K-PGF_{1α} 的影响。笔者首先发现,与 TAO 模型组相比,中、高剂量 SF 组中 6-K-PGF_{1α} 明显增加, TXB₂ 下降。这些结果表明,SF 可以减少 TXA₂,提升 6-K-PGF_{1α} 水平,显示其加强 PGI₂ 对血小板聚集抑制作用,改善了血管抗血栓的功能。此结果与以前报道一致,该报道提示 SF 通过降低血浆 TXB₂,TXA₂ 和前列环素的比率,保护缺血再灌注损伤的肝组织^[19]。

总之,本实验首次显示,SF 可能通过其加强对血小板聚集的抑制作用,提高血管的抗血栓功能,进而减少 TAO 模型大鼠血管内血栓形成,以及改善其病变体征。因而为临床应用 SF 治疗 Buerger's 疾病提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Kikuchi N, Kanai M, Kita N, et al. Pregnancy complicated with Buerger's disease [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2006,94:62.

[2] 宋群,胡骥琼. 血栓闭塞性脉管炎的现状与治疗策略[J]. *华北煤炭医学院学报*,2006,8(4):469.

[3] Buerger L. Thrombo-angiitis obliterans: a study of the vascular lesions leading to presenile spontaneous gangrene [J]. *Am J Med Sci*,1908,136(4):567.

[4] 杨树龙,冯志强,邬丽莎,等. 参附注射液对家兔急性肾缺血再灌注损伤的预防作用及机理研究[J]. *中国病理生理杂志*,2003,19(3):353.

[5] 谢朝晖,李岩,严宛鸿,等. 参附注射液对大鼠肢体缺血再灌注后髓过氧化物酶、丙二醛和能量代谢酶的影响[J]. *中国中医药信息杂志*,2007,14(11):37.

[6] 黄卫,张应鹏,钟波,等. 参附注射液对缺血再灌注肢体保护作用[J]. *中国病理生理杂志*,2007,23(3):540.

[7] 余永华,戈燕,杨述华. 参附注射液对肢体缺血/再灌注脂质过氧化反应的影响[J]. *中华医学全科杂志* 2003,2(1):18.

[8] Nakata Y, Ban I, Hirai M, et al. Onset and clinicopathological course in Buerger's disease [J]. *Angiology*, 1976,27:509.

[9] Nielubowicz J, Rosnowski A, Pruszyński B, et al. Natural history of Buerger's disease [J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1980,21(5):529.

[10] Xu Y, Zhang R, Chen J, et al. Urocortin promotes the development of vasculitis in a rat model of thromboangiitis obliterans via corticotrophin-releasing factor type 1 receptors [J]. *Br J Pharmacol* 2009,157(8):1368.

[11] Ashida S, Ishihara M, Ogawa H, et al. Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats [J]. *Thromb Res*, 1980,18(1):55.

[12] 王军,王玉升,付蔓华,等. 脉络通冲剂抗血栓闭塞性脉管炎的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 1996,16(7):421.

[13] Olin J W. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease)[J]. *N Engl J Med*, 2000,343:864.

[14] Espinoza LR. Buerger's disease; thromboangiitis obliterans 100 years after the initial description[J]. *Am J Med Sci*, 2009,337(4):285.

[15] Quintas A, Albuquerque R. [Buerger's disease; current concepts][J]. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc*, 2008,15(1):33.

[16] Shirakura S, Higo K, Takeda M, et al. Antithrombotic effects of KW-3635, a thromboxane A₂-receptor antagonist, in guinea pigs[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, 65(2):93.

[17] Zhu W H, Leng X S, Zhu J Y. Effect of Shenfu injection on ischemia-reperfusion injury of rat liver graft. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international* [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*,2006,5(2):205.

[18] 黄卫,王剑利,张应鹏,等. 参附对肢体缺血再灌注损伤保护作用的时效及量效关系探讨[J]. *实用外科杂志*,2009,23(2):82.

[19] 彭松林,顾玺,戴朝六,等. 参附注射液对肝缺血再灌注大鼠血浆前列环素和血栓素 A₂ 及肝组织 ATP 酶的影响[J]. *中西医结合学报*,2007,5(4):427.

[责任编辑 聂淑琴]

肝胆两益汤镇静催眠作用及其机制研究

张岗强^{1,2}, 何昕³, 董宪喆², 刘屏^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国人民解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853;
3. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233030)

[摘要] **目的:**研究肝胆两益汤对小鼠的镇静催眠作用及其作用机制。**方法:**将KM小鼠随即分为正常组、安定组(1.3 mg·kg⁻¹)、百乐眠组(0.3 g·kg⁻¹组)和肝胆两益汤组(5.2, 2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹),按照10 mL·kg⁻¹ ig给药,连续给药7 d,正常组ig等量蒸馏水。观察肝胆两益汤对小鼠ip戊巴比妥钠阈剂量;采用转棒法观察肝胆两益汤对小鼠运动协调性的影响,观察肝胆两益汤对小鼠自主活动的影响;高效液相色谱法检测肝胆两益汤对小鼠脑组织中氨基酸类神经递质[天门冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly)和γ-氨基丁酸(GABA)]含量的影响。**结果:**肝胆两益汤2.6, 1.3 g·kg⁻¹组能显著缩短小鼠入睡潜伏期、显著延长小鼠睡眠持续时间和显著减低小鼠自主活动次数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而对小鼠运动协调性没有明显的影响。肝胆两益汤5.2 g·kg⁻¹组能显著升高小鼠脑组织中GABA, Asp, Glu的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 2.6 g·kg⁻¹组能显著增加小鼠脑组织中GABA, Gly的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而1.3 g·kg⁻¹组能显著升高小鼠脑组织中GABA的含量($P < 0.01$)。**结论:**肝胆两益汤有显著的镇静催眠作用,其作用机制可能与增加脑组织中抑制性氨基酸GABA和Gly的含量有关。

[关键词] 肝胆两益汤; 镇静催眠; 中枢神经递质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0226-04

[doi] 10.11653/syfy2013140226

Sedative and Hypnotic Activities of Gandan Liangyi Tang via the Elevation Effects on Amino Acids Neurotransmitters in Mice

ZHANG Gang-qiang^{1,2}, HE Xin³, DONG Xian-zhe², LIU Ping^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Department of Clinical Pharmacology, Center of Pharmacy, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 3. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the sedative and hypnotic effects of Gandan Liangyi Tang (GDLYT) and the potential mechanism in mice. **Method:** The KM mice were divided into seven groups: control group, diazepam group, Bailemian group, GDLYT 5.2, 2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹ dose groups, and mice were administrated once per day. The threshold dose of pentobarbital sodium was observed in mice. The locomotion activity was estimated, and the rotarod test was used to evaluate the effects of GDLYT. The contents of amino acids neurotransmitters including aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), γ-aminobutyric acid (GABA) in mice brain were determined by HPLC-FL. **Result:** The results showed that administration of GDLYT at 2.6, 1.3 g·kg⁻¹·d⁻¹ significantly shorted the latency period and lengthened the duration of sleep ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Besides, the locomotion activities were significantly reduced by GDLYT (1.3, 2.6 g·kg⁻¹·d⁻¹) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while the coordination of motion was no changed in mice after GDLYT treated. The results of

[收稿日期] 20130227(008)

[基金项目] 军队“十二五”中医药推广研发项目(10ZYZ141)

[第一作者] 张岗强, 硕士研究生, Tel:010-66936678

[通讯作者] *刘屏, 博士生导师, 研究员, 从事神经药理研究, Tel:010-66936676, E-mail:liuping301@126.com