

神昌注射液对脑栓塞大鼠血小板活化和血栓形成的影响

李翎*, 方永奇, 邹衍衍, 林双峰, 王丽新, 李小兵, 何玉萍
(广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 观察神昌注射液对脑栓塞大鼠血小板活化和血栓形成的影响。方法: 造大鼠大脑中动脉脑栓塞(MCAO)模型, 静脉给药 7 次后, 取血, 用流式细胞仪测 CD62P、CD63; 并观察肾静脉血栓形成及凝血时间。结果: 神昌注射液能降低脑缺血大鼠血液的 CD62P、CD63 表达率, 降低大鼠下腔肾静脉血栓的重量, 延长小鼠的凝血时间。结论: 神昌注射液能降低血小板活化功能, 减轻静脉血栓的形成, 延缓血液凝固, 是其治疗中风的药理学基础。

[关键词] 神昌注射液; 石菖蒲; 冰片; 脑栓塞; 血小板活化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0175-03

Effects of Shenchang Injection on Platelet Activation and Thrombosis in MCAO Rats

LI Ling*, FANG Yong-qi, ZOU Yan-yan, LIN Shuang-feng, WANG Li-xin, LI Xiao-bing, HE Yu-ping
(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] Objective: To observe effects of Shenchang Injection on platelet activation and thrombosis in MCAO rats. **Method:** The cerebral injury model induced by ischemia/reperfusion was made in rat by MCAO. Shenchang injection was given by iv for 7 times, then CD62p, CD63 were measured by flow-cytometry. Thrombosis and clotting time were observed. **Result:** Shenchang injection could decrease expression of CD62p and CD63 in blood, decline thrombosis in kidney vein, delay clotting time in MCAO rats. **Conclusion:** Shenchang injection is effect for antiplatelet activities and postponement of thrombosis by extending blood clotting. These are likely the pharmacological basis of the injection for treating stroke.

[Key words] Shenchang Injection; *Acorus tatarinowii* Schott; borneol; MCAO; platelet activation

神昌注射液主要由石菖蒲挥发油和冰片组成,

具有治疗脑中风、保护脑组织、抑制神经细胞凋亡的功效, 笔者曾报道, 石菖蒲挥发油有减轻大鼠脑水肿、抑制动物脑电的作用^[1]。本文进一步研究神昌注射液对血小板活化及血栓形成的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 NIH 小鼠, 动物合格证号

[收稿日期] 2009-10-09

[基金项目] 广东省科技厅攻关课题(2003C34403)

[通讯作者] * 李翎, Tel: (020) 36591225; E-mail: liling88800@126.com

[4] 区炳雄. 何首乌提取物改善小鼠记忆及对海马 C-Jun 表达的干预[J]. 中国临床康复, 2006, 10(23): 144.

[5] Chan YC, Wang MF, Cherl YC. Long-term administration of *Polygonum multiflorum* Thunb reduces cerebral ischemia-induced infarct volume in gerbils[J]. *Am J Chin Med*, 2003, 31(1): 71.

[6] 程小燕. 肾阴虚证客观化研究的现状与思考[J]. 陕西中医学院学报, 2006, 39(1): 63.

[7] 陈晓阳, 李晟, 邹志, 陈容, 秦莉花. 忧虑康液对肾阴虚抑郁模型大鼠脑 5-HT 和肾组织形态学的影响. 湖南中医杂志, 2010; 26(1): 42.

[8] Scavone, Timothy Alan, Cassiere, et al. Antiperspirant compositions containing Petrolatum [P]. 美国专利: 6979438, 2002-01.

2006A017; SPF 级雄性 SD 大鼠, 动物合格证号 2005A010。均购自广东省医学实验动物中心。

1.2 仪器与试剂 仪器: 流式细胞仪(美国 BECKMAN COULTE 公司 ALTRA 型), 四色荧光, 配套 EXPO 32 采集分析软件; BX50 显微镜(日本奥林巴斯); AE200 型电子分析天平(Mettler); 微量移液器(日本 NICHIRYO); BL-310 生物机能实验仪(成都泰盟电子有限公司)。试剂: 流式细胞试剂一抗: Hamster Anti-Mouse CD61: BD Pharmingen (批号 47554); Mouse Anti-Rat CD62P: Santa cruz biotechnology(批号 D2403); Mouse Anti-Rat CD63: BD Pharmingen (批号 32687); 二抗: Goat Anti-Mouse-Ig Fitc: Becton Dickinson (批号 47568)。

1.3 药物 神昌注射液, 批号 20060330, 广州中医药大学第一附属医院实验中心提供。临床用量 $30 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$; 阳性对照药醒脑静注射液, 无锡山禾药业股份有限公司, 批号 060301, 临床用量 $20 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$; 盐酸川芎注射液, 常州制药有限公司, 批号 0509131, 临床用量 $20 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠或小鼠随机分组, 每组 10 只。神昌注射液高、中、低剂量组、阳性对照组、模型对照组、假手术(或正常对照)组及口服对照组。阴茎背 iv, bid, 共给药 7 次。给药剂量: 高、中、低剂量组分别为等效剂量的 6.25、2.5、1 倍, 阳性对照及口服组为等效剂量的 2.5 倍。

2.2 大鼠大脑中动脉脑栓塞(MCAO)造模、给药以及 CD62P、CD63 表达率的测定^[2] 各组大鼠给药 5 次后, 造 MCAO 模型。缺血 120 min 后再灌注 24 h, 术后再给药 2 次, 末次给药 0.5 h 后, 取血测定 P-选择素(CD62P)、溶酶体蛋白(CD63)表达(测定方法如下)。假手术组只分离、暴露血管, 不结扎颈总动及颈外动脉, 不插入阻塞线。

CD62P 和 CD63 的测定 血液样本处理: 取血 2 mL, 1% EDTA-K2 抗凝, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min, 取富血小板血浆, 用 TES 洗 1 次($1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min), 1% 多聚甲醛固定, 置 4℃ 冰箱待测; 血小板膜受体的标记: 采用单克隆抗体间接荧光标记法。将固定后的血小板悬液 $1\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去固定液, 用 TES 洗 2 次, 去上清, 取血小板悬液(1×10^6), 加入 1:100 稀释的 CD62P、CD63 单克隆抗体(一抗) $100 \mu\text{L}$, 25℃ 避光孵育 30 min, 用 TES 洗 1

次, 分别加入 CD61(直标)及 CD62P、CD63 二抗各 $10 \mu\text{L}$, 同型对照加 IgG $10 \mu\text{L}$ (每份样本均设阴性对照), 25℃ 避光 30 min, 用 TES 洗 2 次, 加 TES 0.5 mL 待上机; 检测: 采用 488 nm 氩离子激光, 用 CD61-PE/SSC 双参数设门圈出血小板群, 在荧光直方图中将平行对照管的 CD62P、CD63 阳性表达率调在 2% 以下的位置上, 以确定阴性和阳性血小板的界限, 检测标本采集 10 000 个血小板, 用 EXPO 32 采集分析软件进行处理, 结果以阳性血小板百分率表示。

2.3 体内血栓形成试验^[3] 各组大鼠给药, 末次给药 30 min 后, 10% 水合氯醛($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉, 造左下腔静脉血栓模型。2 h 后, 观察有无血栓形成, 如有则取出, 60℃ 干燥 24 h 后称重。以血栓重量为指标。

2.4 凝血试验-毛细管法^[4] 各组小鼠给药, 末次给药 30 min 后, 用毛细管法测定凝血时间。

2.5 数据统计学处理 用 SPSS 软件对数据进行统计分析。

3 结果

3.1 神昌注射液对 MCAO 大鼠血小板活性的影响 与模型组比较, 神昌注射液能降低 CD62P、CD63 的表达, 以高、中剂量组作用最显著, 其余各组虽能降低 CD62P、CD63 表达, 但统计不显著(见表 1)。

表 1 神昌注射液对 MCAO 大鼠血液中血小板活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	CD62P/%	CD63/%
神昌注射液	17.5	$4.70 \pm 3.96^{2)}$	$7.42 \pm 10.54^{2)}$
	7.0	10.32 ± 12.11	$10.69 \pm 15.70^{1)}$
	2.8	13.86 ± 14.30	19.15 ± 18.32
醒脑静	4.75	15.22 ± 15.79	17.13 ± 16.28
神昌注射液口服	7.0	11.50 ± 8.28	20.93 ± 12.63
模型对照	-	17.42 ± 10.54	28.28 ± 19.11
假手术	-	13.61 ± 18.17	25.28 ± 23.87

注: 与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)

2.2 神昌注射液对大鼠血栓形成的影响 神昌注射液能降低大鼠静脉血栓的重量, 与模型对照组比较有显著差别, 随剂量增加血栓形成明显减少(见表 2)。

2.3 神昌注射液对小鼠凝血时间的影响 神昌注射液能延长小鼠的凝血时间, 与正常对照组比较有显著差别, 凝血时间随剂量增加而延长(见表 3)。

表 2 神昌注射液对大鼠静脉血栓的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	血栓干重 / mg
神昌注射液	17.5	2.12 ± 1.53 ²⁾
	7.0	2.37 ± 1.40 ²⁾
	2.8	2.79 ± 1.43 ¹⁾
川芎	4.75	1.59 ± 1.62 ²⁾
神昌口服液口服	7.0	2.37 ± 1.73 ¹⁾
模型对照	-	5.04 ± 1.79

表 3 神昌注射液对小鼠凝血时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / mL · kg ⁻¹	凝血时间 / s
神昌注射液	38.0	102 ± 32.2 ³⁾
	15.2	96 ± 44.3 ²⁾
	6.08	81 ± 49.1 ²⁾
川芎	18.75	69 ± 28.5 ¹⁾
神昌注射液口服	15.2	84 ± 50.6 ¹⁾
正常对照	-	45 ± 15.8

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$

3 讨论

缺血性中风在血栓的发生过程中, 血管内皮损伤, 胶原暴露, 血小板被活化, 微血管系统变形能力下降, 血管容易破裂, 导致血小板颗粒内容物释放, 使血小板胞浆内糖蛋白 CD62P 和 CD63 随着活化血小板的转移而与血小板质膜融合, 在血小板表面膜上表达^[5]。CD62P 能促进血栓形成^[6]。CD63 在静止血小板表面仅有极少量表达, 而在活化血小板表面大量表达, 血小板活化标记较 CD62P 更敏感^[7]。中风发病初期, 局部血小板聚集、形成纤维蛋白血栓, 血小板黏附、聚集引起血管收缩从而导致脑微循环的障碍^[8]。因此, 检测血小板的活化程度、血栓形成及凝血功能对评测中风有重要意义。

之前作者曾报道神昌注射液有明显降低缺血再灌注脑损伤大鼠脑组织 IL-6, IL-8 mRNA 表达^[9]、降低血浆内皮素含量的作用, 并能升高降钙素基因相关肽含量^[10], 本实验中, 假手术组 CD62P、CD63 表达率偏高, 可能实验中假手术组的动物伤害过大造成, 今后实验需加以注意。实验表明注射给药高、中剂量能降低 CD63 表达率, 高剂量还能降低 CD62P 表达率, 而注射用药中剂量对 CD62P 表达率和口服用药作用相当, 提示药物对血小板活化有一定抑制作用, 有一定剂量依从性, 是否药物对正常动物也有

抑制血小板活化的作用有待进一步研究。该制剂对血栓形成量和凝血时间有一定的影响, 各剂量均有减少血栓形成的作用, 注射和口服用药差异不大。各剂量均能延长血液凝固时间, 提示该制剂能抑制血小板黏附聚集, 减缓血栓的形成, 从而改善脑部血液循环, 有助于减少神经细胞、胶质细胞和血管的坏死, 减轻中风发生的程度, 上述结果部分揭示了神昌注射液治疗中风的药理学基础。

[参考文献]

- [1] 方永奇, 李翎, 邹衍衍, 等. 石菖蒲对缺血-再灌注脑损伤大鼠脑电图和脑水肿的影响 [J]. 中国中医急症, 2003, 12(1): 55.
- [2] Yenari MA, Iwayama S, Cheng D, *et al.* Mild hypothermia attenuates cytochrome c release but does not alter Bcl 2 expression or caspase activation after experimental stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(1): 29.
- [3] 俞桂新, 金若敏, 王峥涛. 豨莶草抗血栓有效组分筛选研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2005, 19(3): 39.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 484.
- [5] Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, *et al.* CD63 antigen a novel lysosomal membrane glycoprotein cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells [J]. J Biol Chem, 1990, 70: 838.
- [6] Blake GJ, Rdeker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation [J]. Circ Res, 2001, 89: 763.
- [7] Balabrica TM, Furie BC, Konstam MA, *et al.* Thrombus imaging in a primate model with antibodies specific for adaxial membrane protein of activated platelets [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 1036.
- [8] Yu YE, Dong GS. Leukocytes, platelets and thrombin extract on cerebral microcirculatory disturbance [J]. Cerebrovascular Diseases Foreign Medical Sciences, 2001, 9(4): 222.
- [9] 方永奇, 梁毅, 李翎, 等. 神昌注射液对脑栓塞大鼠 IL-6 IL-8 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 691.
- [10] 方永奇, 李翎, 林双峰, 等. 神昌注射液对脑栓塞大鼠 ET CGRP 及血脑通透性的影响 [J]. 中医药学刊, 2008, 26(12): 2542.