

冰片对三氯化铁诱导的大鼠动脉血栓形成的抑制作用及机制

杨蕾, 李伟荣, 宓穗卿, 王宁生*

(广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨冰片的抗血栓作用。方法:用血栓形成实验、血小板聚集实验及血小板内钙离子浓度的测定,考察冰片对血栓形成、血小板 5-羟色胺(5-HT)含量、血小板聚集率及血小板内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。结果:ig 冰片粟米油溶液 $140\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 7 次能抑制三氯化铁诱导的大鼠动脉血栓形成($P < 0.05$),升高血小板内 5-HT 含量($P < 0.05$),抑制 5-HT 诱导的血小板聚集作用($P < 0.05$);在有或无细胞外钙存在时,冰片血清均能够明显抑制 5-HT 诱导的血小板胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。结论:冰片具有抗血栓作用,其机制可能与抑制血小板 5HT 释放和血小板聚集,抑制血小板胞浆 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有关。

[关键词] 冰片;抗血栓;5-羟色胺

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0164-04

Inhibitory Effects and Mechanism of Borneol on Arterial Thrombosis Induced by $FeCl_3$ in Rat

YANG Lei, LI Wei-rong, MI Sui-qing, WANG Ning-sheng*

(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the antithrombotic effect of borneol. **Method:** Thrombosis test, platelets aggregation, and determination platelet $[Ca^{2+}]_i$ were carried out to investigate the effects of borneol on the following indexes: weight of thrombus, the concentration of serotonin in platelets, platelet aggregation rate, and intracellular free calcium concentration in platelets. **Result:** Ig $140\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ borneol daily for 7 days inhibited arterial thrombosis induced by $FeCl_3$, increased the concentration of serotonin in platelets, and inhibited the platelet aggregation induced by 5-HT ($P < 0.05$); with or without the presence of extracellular Ca^{2+} , borneol inhibited the increased $[Ca^{2+}]_i$ induced by 5-HT. **Conclusion:** Borneol has anti-thrombosis, and its mechanism may be related to inhibitory effects for the release of platelet 5-HT, for platelet aggregation and for the increase of platelet $[Ca^{2+}]_i$.

[Key words] borneol; antithrombosis; serotonin

血栓形成引起血管阻塞是诱发心脑血管急症的主要机制,抗血栓治疗可降低一些心血管病的病残率和病死率,已成为当前心脑血管病治疗的重要策略。冰片为龙脑香的树脂和挥发油的加工成品,在许多心脑血管疾病的治疗方剂中均做为主要药物配

伍使用,现有文献记载的治疗心血管疾病的复方中,有 30 余首含有冰片,其中 8 首已被 2005 年版《中国药典》收录。但对冰片单独的抗血栓作用尚无报道,本实验研究冰片的抗血栓作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 $250 \sim 300\text{ g}$,购自广东省医学实验动物中心,合格证号 2004A021。

1.2 药物 冰片,购自广州市药材公司中药饮片厂,批号 20040902,临用前用粟米油配制成溶液。

[收稿日期] 2010-01-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30701100);广东省自然科学基金(04010029)

[通讯作者] * 王宁生, Tel: (020) 36585444, E-mail: nsw@adr.com.cn

1.3 试剂与仪器 5-HT 和 α -甲基-5-HT, 美国 Sigma 公司; 乙腈, 美国迪马公司; 甲醇, 美国 Merk 公司; 二磷酸腺苷 (ADP) 二钠盐, Alexis 公司; Fura-2/AM, 日本 Dojindo 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes), Amersco 公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA), 华美生物工程公司; 其他化学试剂均为国产分析纯, 实验用水为三蒸水。高效液相色谱系统 (包括 510 输液泵, 420 荧光检测器, Baseline810 色谱工作站), 美国 Waters 公司; LBY-NJ2 血小板凝聚仪, 北京普利生公司; LS-55 荧光分光光度计, 美国 Perkin-Elmer 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药 血栓实验中动物按体重随机分为 4 组, 假手术组、模型组、冰片 70, 140 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 冰片组 ig 冰片粟米油溶液, 假手术组和模型组, ig 同体积的粟米油溶液, 每日 8:00 和 20:00 分别给药 1 次, 连续给药 7 次。末次给药 30 min 后, 进行实验。血小板聚集实验仅设正常组和冰片 70, 140 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 给药方法与血栓实验相同。

2.2 冰片含药血清的制备 大鼠 ig 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 冰片粟米油溶液, 药后 30 min, 腹主动脉取血, 2 000 $\times g$ 离心 10 min, 分离血清, 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 灭活, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。对照组给予同体积的粟米油溶液, 制备对照血清。应用气相色谱法测得血清中含冰片 12.16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 FeCl_3 诱导大鼠颈动脉血栓形成模型 据文献方法改良^[1-3], 大鼠 20% 乌拉坦 5 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉后, 沿颈正中中线切开, 钝性分离右侧颈动脉 1 cm 长, 放入 0.6 cm 宽的封口胶条, 再用浸有 20% FeCl_3 溶液的滤纸条 (1.0 cm \times 0.5 cm) 环裹分离备用的颈动脉段, 并用封口胶条封住。15 min 后, 取下滤纸条。40 min 后, 结扎滤纸条两端血管, 精确剪下滤纸条包裹的血管段, 用洁净滤纸吸干血管内余血, 精确称量含血栓的血管湿重, 取出血栓后的血管再称重, 两者相减即为该 0.5 cm 长血管段内血栓的质量。假手术组用生理盐水代替 FeCl_3 浸泡的滤纸条。

2.4 血小板内 5-HT 的测定 腹主动脉取血 2% EDTA- Na_2 抗凝, 分离血小板, 计数并制备血小板沉淀。沉淀以纯水重悬, 加入内标 (α -甲基-5-HT), 去蛋白, 离心, 取 20 μL 注入高效液相色谱系统, 测定 5-HT。色谱条件为采用 Waters-510 泵; 色谱柱: NUCLEOSILR C_{18} 柱 (4 mm \times 250 mm, 10 μm); 荧光

激发波长 254 nm, 发射波长 360 nm, 增益 32 \times 。流动相为磷酸二氢钾 (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 内含 EDTA- Na_2 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH3.5): 甲醇: 乙腈 85: 10: 5, 用前经 0.45 μm 滤膜真空抽滤; 流速 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为室温。以每 10⁹ 血小板所含的 5-HT 的量表示血小板 5-HT 浓度。

2.5 血小板聚集率的测定 参照文献方法^[4], 按照 Born 氏比浊法, 将加有 300 μL PRP 和一个小磁棒的比浊管置于血小板聚集仪恒温孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min, PPP 调零后, 在搅拌情况下加入诱导剂诱导聚集。血小板聚集抑制率按下式计算:

$$\text{聚集抑制率} = (1 - \text{给药聚集率} / \text{对照聚集率}) \times 100\%$$

2.6 负载血小板悬液的制备及血小板胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定^[5-6] 大鼠麻醉后腹主动脉穿刺取血 8 mL, 用 ACD 溶液以 1:5 (ACD: 血) 抗凝, 76 $\times g$ 离心 15 min, 取上清即得 PRP, 将 PRP 以 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 得血小板沉淀, 用无 Ca^{2+} 的 Hepes 缓冲液洗 1 次, 450 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用无 Ca^{2+} 的 Hepes 缓冲液重新悬浮, 调整血小板密度为 (300 ~ 400) $\times 10^9$ 个 $\text{plt} \cdot \text{L}^{-1}$ 待测。取负载血小板悬液 1 mL, 在 LS-55 型双波长荧光分光光度计上作荧光测定, 固定发射波长于 490 nm, 采用改变波长的时间扫描, 记录 Fura-2 在激发波长 340 和 380 nm 处的荧光强度比值, 根据比值法公式计算血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

2.7 5-HT 诱导血小板胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定 负载后的血小板悬液随机分 3 组, 分别为空白血清组、冰片含药血清 1.2, 0.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组, 含药血清和空白血清在反应体系中的终体积浓度均为 10%。孵育 5 min 后, 加入 5-HT (终浓度 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定及计算同 2.4。

2.8 统计方法 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 软件包进行配对 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 冰片对 FeCl_3 诱导的血栓形成的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠颈动脉造模部位血管内充满血栓栓子, 血小板内 5-HT 含量明显降低 ($P < 0.05$), 说明 FeCl_3 可以明显诱发颈动脉血栓形成,

并同时伴有血小板 5-HT 含量降低。与模型组比较 高血小板 5-HT 含量 ($P < 0.05$), 见表 1。
冰片高剂量组能明显降低血栓重量 ($P < 0.05$) 和提

表 1 冰片对 FeCl₃ 诱导的大鼠动脉血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 /mg·kg ⁻¹	血栓重量 /mg	血栓抑制率 /%	5-HT 含量 /μg·10 ⁹ plts ⁻¹
假手术	-	-	-	1.87 ± 0.33 ¹⁾
模型	-	4.16 ± 0.73	-	1.24 ± 0.22
冰片	70	3.81 ± 0.56	8.4	1.33 ± 0.41
	140	2.99 ± 0.28 ¹⁾	28	1.69 ± 0.35 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 冰片对血小板聚集的作用 由表 2 可见,冰片对 ADP 诱导的血小板聚集抑制作用不明显,但冰片

高剂量组对 5-HT 增强 ADP 的诱导血小板聚集的作用有明显的抑制作用,抑制率为 17.04%。

表 2 冰片对血小板聚集的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ADP		ADP + 5-HT	
		最大聚集率/%	抑制率/%	最大聚集率/%	抑制率/%
对照组	—	56.60 ± 12.49	—	54.47 ± 10.30	—
冰片组	70	53.22 ± 9.05	5.97	50.29 ± 12.09	7.67
	140	54.39 ± 10.13	3.90	45.19 ± 11.33 ¹⁾	17.04

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 冰片对血小板胞浆 [Ca²⁺]_i 的影响 在细胞外液含有 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 的情况下,1.2 μg·mL⁻¹ 冰片含药血清能够明显抑制 5-HT 诱导血小板内 [Ca²⁺]_i 升高 ($P < 0.05$)。在细胞外液无钙的条件下,1.2 μg·mL⁻¹ 冰片含药血清也能够降低 5-HT 诱导的血小板释放 [Ca²⁺]_i,与相应浓度的空白血清比较有显著差异 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 冰片对 5-HT 诱导血小板胞浆内 [Ca²⁺]_i 变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /μg·mL ⁻¹	[Ca ²⁺] _i /nmol·L ⁻¹	
		有 Ca ²⁺	无 Ca ²⁺
空白血清	-	303.46 ± 219.94	115.76 ± 82.45
冰片含药血清	0.6	288.43 ± 152.06	106.89 ± 59.31
	1.2	179.57 ± 66.74 ¹⁾	86.71 ± 24.72 ¹⁾

注:与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

血栓形成受多种因素影响,如血管内膜损伤、血小板黏附聚集、凝血活性增高及血流缓慢等。FeCl₃ 诱导的动脉血栓属于内膜损伤引起血小板黏附、聚集、释放,致内源性凝血系统激活而形成的复合性血栓,与人类血栓疾病的发病机制比较相似,同时操作简便,结果稳定、重现性好,因此实验中选用此模型

来评价冰片抑制血栓形成的作用^[1-2]。但是高浓度 FeCl₃ 可以迅速导致动脉血管闭合,从而对抗血栓药物的评价。考虑到中药的作用一般比较缓和,为更有效的评价冰片对 FeCl₃ 诱导的动脉血栓的作用,实验中采用 20% 浓度的 FeCl₃,并于刺激产生 40 min 后取动脉血栓,成栓率 100%。实验结果显示冰片能抑制 FeCl₃ 诱导的大鼠颈动脉血栓形成。

血管内皮损伤时,循环中的血小板流在损伤部位黏附、聚集,血小板分泌、释放 5-HT 增加,5-HT 在血小板聚集、血栓形成过程中起到重要作用,它是血小板的弱诱聚剂,对血小板功能的影响可通过增强 ADP、肾上腺素等其他弱诱聚剂诱导血小板聚集的作用实现。Ca²⁺ 做为第二信使在血小板活化过程中起关键性的作用,它是血小板代谢与功能的重要调节因子,血小板的变形、聚集、释放反应中都伴有血小板胞浆内游离 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 的升高^[7],且 5-HT 能够浓度依赖地引起血小板胞浆内游离的 Ca²⁺ 浓度升高^[8]。高浓度的冰片能够升高血小板内 5-HT 含量,并且能够抑制 5-HT 对血小板聚集增强作用,抑制 5-HT 诱导的血小板内钙释放和外钙内流。冰片抑制 5-HT 对血小板的诱聚作用,可能是其

(下转第 170 页)

[参考文献]

- [1] 陈朝银,赵声兰,曹建新. 仙人掌营养成分的分析[J]. 营养学报,1998,20(1):111.
- [2] 韦启后,韦国锋,黄祖良,等. 仙人掌提取液对狗降血压作用的实验研究[J]. 右江民族医学院学报,2003,25(6):781.
- [3] 秦金,Janice MP, Marc AP. 自发性高血压大鼠心脏功能及血压的增龄性变化[J]. 西安医科大学学报,1995,16

(1):81.

- [4] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:249.
- [5] 陈修,陈维洲,曾贵云. 心血管药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:338.
- [6] 刘应柯,刘尚岭,郭桐生,等. 参龙降压灵对自发性高血压大鼠血压及血浆 ET、CGRP 的含量的影响[J]. 第一军医大学学报,2000,20(2):180.

[责任编辑 何伟]

(上接第 166 页)

实现抗血栓作用的机制之一。本研究结果也显示,高浓度的冰片虽具有抗血栓作用,但抑制作用也较弱,这可能符合冰片本身的特性“独行则势弱,佐使则有功”。

[参考文献]

- [1] 唐映红,梁燕,杨静,等. FeCl₃ 诱导的大鼠颈总动脉血栓模型血浆 TXA₂、PGI₂、抗凝和纤溶活性的变化[J]. 中国药理学通报,2006;22(11):1353.
- [2] 夏红梅,高云华,卞爱娜等. 动脉血栓模型建立的方法学研究[J]. 中国医学影像技术,2007;23(1):13.
- [3] Wang X, Xu L. An optimized murine model of ferric chloride induced arterial thrombosis for thrombosis research[J]. Thrombosis Research,2004;7(15):1.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版

社,2006.

- [5] 丁敏,钟梁. 用 Fura-2/AM 测定血小板胞浆游离钙浓度[J]. 大学化学,2004,19(4):48.
- [6] 尹松梅,陈晓琳,聂大年,等. 氯通道阻断剂对血小板胞浆游离钙和血小板聚集的影响[J]. 中华血液学杂志,2005,26(3):170.
- [7] Wockel L, Koch S, Stadler C, *et al.* Serotonin-induced platelet intracellular Ca²⁺ response in patients with anorexia nervosa[J]. Pharmacopsychiatry, 2008. 41(1): 10.
- [8] Turetta L, Donella-Deana A, Folda A, *et al.* Characterisation of the serotonin efflux induced by cytosolic Ca²⁺ and Na⁺ concentration increase in human platelets[J]. Cell Physiol Biochem, 2004. 14(4/6): 377.

[责任编辑 何伟]