

补阳还五汤对脊髓损伤大鼠血浆 血小板活化因子含量的影响

张继平^{1*}, 林爱华¹, 李蜀光¹, 文凤妮¹, 姚 晖¹, 谢伟贤¹, 王志彬², 李齐欢¹

(1. 广东省佛山市第二人民医院, 广东 佛山 528000; 2. 广东医学院, 广东 湛江 520423)

[摘要] 目的: 探讨补阳还五汤(BYHWD)对脊髓损伤(SCI)大鼠血浆血小板活化因子(PAF)含量的影响及BYHWD的中枢神经保护作用机制。方法: 采用Allen's 打击法制作中度SCI模型, 应用SPF级Wistar大鼠, 随机分为4组: 正常组和3个模型组, 即模型组、BYHWD组、金纳多组, 每组16只大鼠。模型组大鼠分别给予蒸馏水、BYHWD、金纳多水溶液, 正常组给予蒸馏水, 灌胃治疗2周后, 采用双抗体夹心法(ELISA法)检测血浆PAF含量, 并在造模前至造模后3周对SCI大鼠进行运动功能评分。结果: 造模1周后给药前BYHWD组、金纳多组与模型对照组动物运动功能评分显著低于正常对照组($P < 0.01$), 但3组间差异无统计学显著性。给药后1周、2周检测结果与模型组比较, BYHWD和金纳多组运动功能评分显著高于模型组, 低于正常组($P < 0.01$); 两个给药组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第3周末模型组PAF含量明显升高, BYHWD组可明显降低SCI大鼠血浆PAF含量, 其抑制作用较金纳多明显, 差异有显著性统计学意义($P < 0.01$)。结论: BYHWD可明显改善SCI大鼠后肢运动功能, 减少SCI大鼠内源性PAF含量, 发挥对损伤脊髓的保护作用, 其降低SCI大鼠血浆中PAF含量与改善其后肢运动功能相关。

[关键词] 补阳还五汤; 大鼠; 脊髓损伤; 血小板活化因子; 双抗体夹心法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)04-0047-03

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是由于外界直接或者间接因素造成的脊髓机械性损伤, 继而引发一系列级联放大的生化因素改变, 共同参与造成脊

髓的继发性损伤, 导致脊髓损伤节段以下神经支配的运动、感觉、括约肌功能障碍。继发性损伤所产生的脊髓损害远远超过原发性损伤, 但其具有可逆性, 人为干预可以控制, 而血浆血小板活化因子(Platelet Activating Factor, PAF)被认为是引发脊髓继发性损伤的关键因子之一, 所以, 阻断PAF引发的继发性病理损伤, 能够有效防治SCI。补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)出自晚清名医王清任的《医林改错》, 由生黄芪、当归尾、川芎、赤芍、地龙、桃仁、红花7味药组成, 现已被广泛应用于中枢神经系

[收稿日期] 2008-10-13

[基金项目] 广东省科技厅科技攻关资助项目(2004B36001009); 广东省中医药局资助课题(99636)

[通讯作者] * 张继平, Tel: (0757) 88032005; E-mail: fszjping@163.com

统疾病的治疗, 体外实验证明其具有抑制 PAF 受体活性的作用。本文采用双抗体夹心(ELISA)法, 检测 SCI 大鼠血浆 PAF 含量, 探讨 BYHWD 的中枢神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组方法 SPF 级 Wistar 大鼠 76 只, 雌雄各半, 体重(195 ± 10) g[南方医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(粤)2006-0015/2006B023/2006A052], 在南方医科大学实验动物中心实验室进行实验, 温度(23 ± 5) °C, 湿度(60 ± 15) °C 标准环境[实验动物设施合格证号: SYXK(粤)2006-0074]。实验大鼠先按性别分层, 然后根据体重采用随机数字表法分组, 其中正常组 16 只, 其它实验大鼠采用 Allen's 打击法制作中度 SCI 模型。造模完成后, 先观察 1 周, 待伤情稳定后, 参照改良的 Tarlov 评分标准, 选择后肢运动功能障碍评分为 2~3 分的模型大鼠 48 只, 随机分为模型组、BYHWD 组、金纳多组, 每组 16 只模型大鼠。

1.2 实验用药物及试剂

1.2.1 实验用药物 BYHWD: 选择由广东一方制药有限公司生产的中药配方免煎颗粒剂, 按照成人每日 1 剂的临床用量, 遵照原方配方比例, 取相当于生黄芪 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 4.5 g, 地龙、川芎、桃仁、红花各 3 g 生药饮片的免煎颗粒剂, 将免煎颗粒剂用蒸馏水溶解配成相当于生药饮片 2 g·mL⁻¹ 的免煎颗粒剂溶液; 金纳多片(银杏叶提取物片)由德国威玛舒培博士药厂, 批号: 8781006, 将金纳多片用研钵研碎后用蒸馏水配成 2.275 mg·mL⁻¹ 的金纳多溶液, 大鼠按照体表面积换算的成人临床等效剂量的 3 倍灌胃给药; BYHWD 组予 40 g·kg⁻¹·d⁻¹, 金纳多组予 45.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹; 正常组及模型组予蒸馏水, 给药体积均为 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 给药时间从术后 1 周起, 至术后 3 周末结束实验。

1.2.2 试剂 大鼠血小板活化因子(Rat PAF)酶联免疫(酶免)(ELISA)试剂盒, 由广州市达晖生物科技有限公司提供, 批号: 10100501。

1.3 中度 SCI 模型的制作 首先用 10% 水合氯醛 0.35 g·100 g⁻¹ 腹腔注射麻醉大鼠, 背部剪毛, 将动物俯卧固定于手术台上, 10% 的活力碘消毒, 以 T₁₂ 棘突为中心取背部正中切口, 长约 3 cm, 显露 T₁₁-L₁ 棘突及椎板。用特制的手术钳咬除 T₁₁ 下半 T₁₂ 全椎板及 L₁ 上半椎板, 以脊髓为中心显露直径约 2.8 mm

圆形区, 在硬膜表面垫一弯曲度与脊髓表面一致的塑料垫片。采用 Allen's 打击法, 用直径约 2.4 mm 重 5 g 的圆柱状重锤从 10 cm 高处, 沿细玻璃导管垂直下落, 打击垫片致 T₁₂ 脊髓急性挫伤, 致伤力为 5 × 10 gcf(gram·cm·force), 逐层缝合伤口。造模完成后, 每日肌注青霉素钠 2 万单位, 1 次·d⁻¹, 单笼管理饮食, 每 8 h 按摩膀胱排尿, 并用碘伏消毒伤口, 直至膀胱功能恢复。模型大鼠观察 1 周, 伤情稳定后, 模型组进行随机化分组, 每组 16 只; 并同时进行 SCI 大鼠后肢运动功能评分。

Tarlov 评分标准: 0 分 后肢无活动, 不能负重; 1 分 后肢可见活动, 不能负重; 2 分 后肢活动频繁或有力, 不能负重; 3 分 后肢可支持体重, 能走 1~2 步; 4 分 可行走仅有轻微障碍; 5 分 行走正常。

1.4 标本采集 用药结束后, 腹主动脉取血 3 mL, 枸橼酸钠(1:9)抗凝, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上层血清待测。

1.5 血浆 PAF 含量的检测 严格按照大鼠 PAF 双抗体夹心 ELISA 法说明书进行操作。

1.6 统计分析 计量资料数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 SPSS 10.0 软件, 采用单因素方差分析进行统计处理, 两两比较采用 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 SCI 大鼠后肢运动功能 Tarlov 评分结果 在造模前至造模后 3 周内, 正常组大鼠后肢运动功能正常, Tarlov 评分均为 5 分; 而 BYHWD 组与金纳多组评分随时间变化差异无统计学意义($P > 0.05$), 但与模型空白组及正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 各时间点组间比较结果为: 造模后 3 d, 模型组大鼠评分均显著降低, 与正常组比较差异有显著性统计学意义($P < 0.01$), 但模型组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 造模后 3 d~1 周, 各模型组大鼠后肢运动功能恢复缓慢; 灌胃给药后即造模后 1 周~3 周, 模型空白组大鼠后肢运动功能恢复不明显, 而模型用药组大鼠后肢运动功能恢复明显, 与模型空白组同时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 BYHWD 组与金纳多组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 SCI 大鼠血浆 PAF 含量 正常组大鼠血浆 PAF 含量维持在较低水平, SCI 模型组大鼠血浆 PAF 含量明显升高, 与正常组比较差异有显著性统计学意

义($P < 0.01$); BYHWD 及金纳多均可显著抑制 SCI 大鼠血浆 PAF 含量, 且以 BYHWD 的抑制作用最强, 二者比较差异有显著性统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 SCI 大鼠后肢运动功能 Tarlov 评分结果($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	各组大鼠损伤前后不同时间点 Tarlov 评分				
		0 d	3 d	1 周	2 周	3 周
正常组	—	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
模型组	—	5.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5 ¹⁾	2.2 ± 0.5 ¹⁾	2.3 ± 0.5 ¹⁾	2.5 ± 0.7 ¹⁾
BYHWT 组	40	5.0 ± 0.0	1.5 ± 0.5 ¹⁾	2.1 ± 0.5 ¹⁾	3.5 ± 1.0 ^{1,2)}	3.7 ± 1.1 ^{1,2)}
金纳多组	0.045 5	5.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5 ¹⁾	2.2 ± 0.5 ¹⁾	3.3 ± 0.7 ^{1,2)}	3.5 ± 1.1 ^{1,2)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 SCI 大鼠血浆 PAF 含量($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	PAF(pg/mL)
正常组	—	160 ± 12 ²⁾
模型组	—	203 ± 14 ¹⁾
BYHWT 组	40	153 ± 11 ^{1,2)}
金纳多组	0.045 5	185 ± 11 ^{1,2)}

3 讨论

PAF 是一种生物活性极强的多功能炎性脂质介质, 在中枢神经系统中, PAF 主要由神经元和神经胶质细胞产生, 被认为是引起脊髓继发性损害的关键性因子之一。临床研究发现, SCI 后患者全血 PAF 含量明显增高, 其增高程度与 SCI 的严重程度相关; 随着病情的改善, PAF 含量也逐渐恢复至正常水平^[1]。本文实验结果显示, 造模后 SCI 大鼠血浆 PAF 含量明显高于正常大鼠, 与文献^[1]报道结果一致, 且与其他炎性因子在 SCI 大鼠血浆中的表达变化规律一致^[2-3]。

SCI 后, 内源性 PAF 显著升高, 作为体内一种重要的炎性反应因子, 可直接收缩脊髓微血管, 并引起强烈的炎症反应, 促进花生四烯酸代谢通路形成血栓素 B₂、前列腺素和白三烯等, 三者为体内主要的炎症介质, 可引发炎症的级联放大反应; 可激活血小板、多形核细胞及血管内皮细胞, 使组织内多种血管活性递质和细胞因子释放增多, 导致脊髓微血管闭塞或痉挛, 生物膜损害及血管通透性增加, 使脊髓组织发生水肿, 损伤部位发生延迟性缺血^[4]; PAF 还被认为是目前作用最强的血小板聚集剂, 血小板在 PAF 的作用下, 促进局部微血栓形成^[5]; PAF 还可作为一种生物活性磷脂参与神经细胞兴奋性毒性凋亡, 所以, 阻断 PAF 引起的脊髓继发性病理损伤环节, 是 SCI 治疗的有效途径。

本文研究结果发现, BYHWD 可明显改善 SCI 大

鼠后肢运动功能, 并减少 SCI 大鼠内源性 PAF 含量, 发挥对损伤脊髓的保护作用, 其降低 SCI 大鼠血浆中 PAF 含量与改善其后肢运动功能相关; 虽然 BYHWD 与金纳多均可明显抑制 SCI 模型大鼠血浆 PAF 含量的升高, 但 BYHWD 的抑制作用更强, 其原因可能为: 金纳多作为银杏叶提取物, 其主要活性成分 BN52021 为血小板活化因子受体 (Platelet Activating Factor Receptor, PAF-R) 的特异性拮抗剂, 仅通过抑制内源性 PAF 与受体的结合而单纯阻断 PAF 所致的继发性损害; 而 BYHWD 是由七味中药配伍组成的复方制剂, 方中各单味药中的活性成分如川芎中的川芎嗪^[6]、红花中的红花黄色素^[7]、当归中的阿魏酸^[8]、赤芍中的赤芍苷^[9]等, 均可阻断 PAF 合成代谢的多种途径, 除具有降低 PAF 含量及 PAF-R 表达的作用外, 还具有抑制其他炎性因子如白介素-1、肿瘤坏死因子- α 、内皮素等促进 PAF 生成的作用, 其拮抗 PAF 的作用是以其所含多种活性成分通过多途径、多靶点的药物作用机制而产生整体综合调节作用的结果, 所以, BYHWD 在抑制 SCI 大鼠血浆 PAF 含量方面更具优势, 有利于发挥其对 SCI 的中枢神经保护作用。

[参考文献]

- [1] 肖建如, 陆永坚, 胡业丰, 等. 急性颈髓损伤患者血液三种缩血管活性介质的动态变化及其临床意义[J]. 中国急救医学, 1998, 18(1): 10-12.
- [2] Wang CX, Reece C, Wrathall JR, et al. Expression of tumor necrosis factor alpha and its mRNA in the spinal cord following a weight-drop injury[J]. Neuroreport, 2002, 13(11): 1391-1393.
- [3] 曹 苏, 陈 瑾, 沈施仁. 脊髓急性损伤早期患者血清 NO NOS IL-8 和 IL-6 的变化[J]. 江苏医药, 2008, 34(2): 123-124.
- [4] 向 强, 文 亮, 刘明华. 高血压脑出血血肿灶 PAF NO ET 的变化研究及临床意义[J]. 中国急救医学, 2006, 26(11): 812-814.
- [5] Rao GH. Role of platelet adhesion and aggregation in thrombus formation[J]. Thromb Haemost, 1998, 79(2): 454-455.
- [6] 吴洪华, 杨 成, 石增立, 等. 川芎嗪对缺氧缺血性脑损伤炎症细胞因子作用的实验研究[J]. 滨州医学院学报, 2007, 30(3): 161-163.
- [7] 王玉芹, 杨树东. 红花黄色素对 PAF 介导的中性粒细胞功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(4): 21-23.
- [8] 严 明, 欧阳静萍. 阿魏酸对 TNF- α 致内皮细胞 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 微循环学杂志, 2001, 11(4): 7-8.
- [9] 魏 晓, 朱德增, 龚燕芳, 等. 芍药甙对急性坏死性胰腺炎大鼠 NF- κ Bp65 及细胞因子表达的影响[J]. 胰腺病学, 2007, 7(3): 184-187.