

牛黄降压丸对正常大鼠血小板功能的影响 与作用机制的实验研究

任建勋, 林成仁, 王 敏, 徐 辉, 刘建勋*
(中国中医科学院西苑医院基础研究室, 北京 100091)

[摘要] 目的: 观察牛黄降压丸对正常大鼠血小板功能影响并探讨其作用机制。方法: 健康 SD 大鼠分别给予牛黄降压丸不同剂量(0.3, 0.15, 0.075 g·kg⁻¹)灌胃 7 d, 观察正常大鼠的血小板黏附率, 二磷酸腺苷二钠(ADP)诱导的血小板聚集率; 采用放免法检测血小板中钙调蛋白(CaM)含量以及 ADP 诱导的血小板聚集时血栓素 A₂(TXA₂)的释放。结果: 牛黄降压丸可以抑制正常大鼠血小板黏附及 ADP 诱导的血小板聚集, 降低血小板中 CaM 含量与 TXA₂ 的释放。结论: 牛黄降压丸通过对引起血小板活化功能的不同途径的干预, 抑制血小板的黏附及聚集。

[关键词] 牛黄降压丸; 血小板; 作用机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)11-0034-03

The Effect and Mechanism of Niu Huang Jiangya Capsule on the Function of Platelets in Rats

REN Jian-xun, LIN Cheng-ren, WANG Min, XU Hui, LIU Jian-xun*

(Xi Yuan Hospital, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Niu Huang Jiangya Capsule on the function of platelet in rats. **Methods:** Healthy SD rats were fed with Niu Huang Jiangya Capsule (0.3, 0.15, 0.075 g·kg⁻¹) for 7 days; then the platelet adhesion rates and the ADP-induced platelet agglutinate rate as well as the contents of CaM and TXA₂ in platelets were measured. **Results:** Niu Huang Jiangya Capsule could reduce the platelet adhesion rate and the ADP-induced platelet agglutinate rate, as well as the contents of CaM and TXA₂ in platelets. **Conclusion:** Niu Huang Jiangya Capsule can suppress platelet agglutinate and adhesion by intervening different pathways of platelet activation.

[Key words] Niu Huang Jiangya Capsule; platelet; mechanism

研究表明, 临床高血压病患者血小板黏附聚集能力增强, 血小板活化指标明显增高; 同时, 血小板活化又可促进高血压患者缺血性心、脑血管并发症的发生和发展, 预示着血管性疾病的危险性^[1]。因此对血小板活化功能进行有效的干预不仅可以保证降压疗效, 而且对高血压病的预后具有极大的益处。牛黄降压丸作为一种纯中药抗高血压药物, 通过抑

制交感神经兴奋性, 增强迷走神经活性^[2]; 直接特异阻断血管紧张素 II 受体-AT₁ 受体, 间接激活 AT₂ 受体而达到降压的目的^[3]; 但是否对血小板活化功能产生影响尚不清楚。本实验通过观察牛黄降压丸对正常大鼠血小板功能影响以及作用机制的探讨, 进一步研究牛黄降压丸降低血压、保护靶器官的作用机制。

1 材料与仪器

健康雄性 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 体重(200±20)g。由北京维通利华实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(京)2002-0003。牛黄降压丸(粉末), 天津

[收稿日期] 2007-04-02

[通讯作者] * 刘建勋, Tel: (010) 62886691, 62874049; E-mail: liujx0324@sina.com.cn

达仁堂公司提供,批号:060501。肠溶阿司匹林片,25 mg/片,青岛黄海制药有限责任公司生产,批号:国药准字 H37023121;复方丹参滴丸,27 mg/丸,天津天士力制药股份有限公司生产,批号:国药准字 Z10950111;二磷酸腺苷二钠(ADP),中国科学院上海生物化学研究所生产,批号:041011;EGTA,Amresco0732,北京拜尔迪生物公司分装;Tris,NOVON 公司提供,批号:ZZ02531;实验用消炎痛溶液,北京华英生物技术研究所提供;钙调蛋白(CaM)放免试剂盒与血栓素 B₂(TXB₂)放免试剂盒均由北京华英生物技术研究所提供。BS634 血小板聚集仪,北京生化仪器厂生产;RS-20 II型低温冷冻离心机,日本 TOMY SEIKO CO LTD 生产;梅特勒-托利多 Delta320pH 值测定仪,美国生产;漩涡振荡器,MS1 型,IKA 生产。

2 方法

2.1 对大鼠血小板黏附功能的影响 大鼠按体重随机分为 6 组,10 只/组:空白组、复方丹参滴丸组(450 mg·kg⁻¹)、肠溶阿司匹林组(100 mg·kg⁻¹)、牛黄降压丸大、中、小剂量组(0.3, 0.15, 0.075 g·kg⁻¹)。连续灌胃给药 7 d 后,2% 戊巴比妥钠水溶液腹腔注射麻醉(45 mg·kg⁻¹),心脏穿刺抽血 3 mL,3.8% 柠檬酸钠水溶液抗凝。取抗凝血 1.5 mL,加入容量 6 mL 的玻璃球中,玻璃球在自制旋转黏附仪上以 5 r·min⁻¹ 的速度旋转 8 min,在旋转前后分别进行血小板计数并计算血小板黏附率。

血小板黏附率(%) =

$$\frac{\text{圆球黏附前血小板数} - \text{圆球黏附后血小板数}}{\text{圆球黏附前血小板数}} \times 100$$

2.2 对 ADP 诱导大鼠血小板聚集功能的影响 大鼠连续灌胃给药 7 d 后,2% 戊巴比妥钠水溶液腹腔注射麻醉(45 mg·kg⁻¹),心脏穿刺抽血 3 mL,3.8% 柠檬酸钠水溶液抗凝。抗凝血液常温离心(200 × g, 9 min),吸取上清,即为富血小板血浆(PRP)。吸取上清后,继续常温离心(1 450 × g, 10 min),吸取上清,即为贫血小板血浆(PPP)。实验开始前血小板聚集仪预热 30 min,分别取一定量的 PRP 与 PPP 于比浊管中,将含有 PRP 与 PPP 比浊管放入聚集仪中,使其透光度调节到 70,以此做为标准。在其他各 PRP 管中分别加入搅拌棒与 1 mmol·L⁻¹ ADP(10 μL),测定 ADP 诱导的血小板聚集率的变化。

2.3 对大鼠血小板钙调蛋白(CaM)含量与血小板聚集释放 TXA₂ 的影响 大鼠连续灌胃给药 7 d 后,

3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉(10 mL·kg⁻¹),心脏穿刺抽血 6 mL,3.8% 柠檬酸钠水溶液抗凝。抗凝血液常温分离 PRP。取 PRP 350 μL,加入 1 mmol·L⁻¹ ADP 10 μL,同时放入搅拌棒,在磁力搅拌器上振荡 5 min,加入消炎痛溶液中止反应。中止反应后常温离心(1 200 × g, 5 min),取上清-20 °C 保存。另取 PRP 300 μL 常温离心(1 450 × g, 10 min),弃去上清得到血小板,加入 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(含有 1 mmol·L⁻¹ EGTA pH=7.0) 300 μL,振荡获得血小板悬液;血小板悬液 100 °C 水浴 5 min,常温离心(12 000 × g, 30 min),取上清加入 300 μL 4.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液稀释。-20 °C 保存,CaM 与 TXA₂ 均应用放免法检测。

2.4 统计学分析 实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性用 Student-Newman-Keuls 检验,方差不齐用 Tamhane's T2 检验。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血小板黏附功能影响 牛黄降压丸中剂量组与中药阳性药复方丹参滴丸组可以明显抑制大鼠的血小板黏附功能(与空白组比较 P < 0.05);而其他各组与空白组比较,无显著的统计学意义(P > 0.05)。见表 1。

表 1 牛黄降压丸对大鼠血小板黏附功能影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	血小板黏附率(%)
空白组	—	40.59 ± 9.89
复方丹参滴丸组	0.45	31.93 ± 13.46 ¹⁾
肠溶阿司匹林组	0.1	30.25 ± 12.45
牛黄降压丸组	0.3	35.65 ± 13.16
牛黄降压丸组	0.15	28.97 ± 12.75 ¹⁾
牛黄降压丸组	0.075	41.25 ± 6.87

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05(下同)

3.2 对 ADP 诱导大鼠血小板聚集功能的影响 牛黄降压丸大剂量组可以明显抑制 ADP 诱导大鼠的血小板聚集功能(P < 0.05)。其他各组与空白组比较,均数具有下降趋势,但无显著的统计学意义。见表 2。

3.3 对大鼠血小板内 CaM 以及聚集释放 TXA₂ 影响 牛黄降压丸各组与中药阳性药复方丹参滴丸组可以明显抑制在 ADP 的诱导下血小板聚集释放 TXA₂(与空白组比较 P < 0.05);同时牛黄降压丸小剂量组与复方丹参滴丸组可以明显降低大鼠血小板钙调蛋白(CaM)含量(与空白组比较 P < 0.05);其他各组

与空白组比较(除牛黄降压丸大剂量组),均数具有下降趋势,但无显著的统计学意义。见表 3。

表 2 牛黄降压丸对 ADP 诱导大鼠血小板聚集功能影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	血小板聚集率(%)
空白组	—	71.020 ± 10.787
复方丹参滴丸组	0.45	69.058 ± 15.544
肠溶阿司匹林组	0.1	66.580 ± 10.831
牛黄降压丸组	0.3	54.624 ± 12.644 ¹⁾
牛黄降压丸组	0.15	68.043 ± 13.310
牛黄降压丸组	0.075	62.749 ± 8.959

表 3 牛黄降压丸对大鼠血小板 CaM 以及聚集释放 TXA₂ 影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	TXA ₂ 含量(pg/mL)	CaM 含量(ng/mL)
空白组	—	94.4 ± 20.7	19.1 ± 15.1
复方丹参滴丸组	0.45	73.7 ± 16.8 ¹⁾	9.7 ± 6.4 ¹⁾
肠溶阿司匹林组	0.1	72.6 ± 24.1	12.3 ± 11.0
牛黄降压丸组	0.3	80.2 ± 14.1 ¹⁾	19.3 ± 14.8
牛黄降压丸组	0.15	78.7 ± 18.9 ¹⁾	15.3 ± 5.6
牛黄降压丸组	0.075	78.9 ± 24.6 ¹⁾	10.3 ± 10.3 ¹⁾

4 讨论

高血压时血流呈湍流状态、血管所受切应力改变导致血小板膜受损,引起血小板黏连、聚集并释放 ADP。ADP 通过与血小板上特异性受体相结合后促进血小板内释放 Ca²⁺。Ca²⁺ 浓度升高后通过 PLA₂ 作用于血小板膜上的不同磷脂酶底物使其生成花生四烯酸(AA)增多,AA 通过环氧化酶生成大量 TXA₂, TXA₂ 是血小板释放的目前已发现的强的缩血管、诱导血小板聚集物质之一^[4]; TXA₂ 一方面作用于血管平滑肌促血管强烈收缩,加重高血压;另一方面, TXA₂ 放大了不同活性物质引起的血小板活化和聚集效应,使活化的血小板合成与释放更多的 TXA₂ 形成恶性循环,促进血小板性血栓的形成。临床研究也表明了异常的血小板活化与高血压病及其并发症发生、发展的关系存在有密切的关系^[5]。阿司匹林是一种环氧化酶抑制剂,血小板环氧化酶较血管壁环氧化酶对其更敏感,认为小剂量阿司匹林抑制血

小板的环氧化酶,使 TXA₂ 生成减少,不影响 PGI₂。牛黄降压丸由牛黄、羚羊角、珍珠、水牛角浓缩粉、白芍、决明子、川芎、黄芩素、郁金、冰片、甘松、薄荷等组成。在以往的研究中具有镇静、安神、降压的作用。本实验结果表明牛黄降压丸能够明显抑制正常大鼠血小板黏附与 ADP 诱导的血小板聚集。其作用机制可能是抑制了 ADP 诱导血小板释放 TXA₂, 从而阻断了血小板活化、聚集与 TXA₂、ADP 释放之间的正反馈作用。同时, CaM 本身也直接参与血小板的活化过程。研究表明血小板内 Ca²⁺ 的升高可激活依赖于 CaM 的蛋白激酶,此激酶作用于肌球蛋白轻链激酶,使其蛋白磷酸化,从而引起血小板收缩、变形、颗粒集中与释放^[6]。所以抑制 CaM 活性能够阻止血小板伪足形成和活性物质的释放。通过本研究证实牛黄降压丸对大鼠血小板 CaM 的活性具有直接的抑制作用,从而达到抑制血小板聚集的目的。因此,可以认为对引起血小板活化功能的不同途径的干预,抑制血小板性血栓的形成也是牛黄降压丸产生降压作用的一个重要的机制。

[参考文献]

[1] Breddin HK, Lippold R, Bitmer M, et al. Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusions in healthy volunteers? Results of the HAPARG study[J]. *Atherosclerosis*, 1999, 144(1): 211-219.

[2] Yu SY. Effects on sympathetic nervous activity of Niu Huang Jiang Ya pellet on hypertension patients[J]. *China J China Mater Med*, 2004, 29(Suppl): 116-120.

[3] Yu SY, Yu ZA. The effects observation of Niu Huang Jiang Ya Capsule in improving the sex-life quality for hypertension patients[J]. *China J China Mater Med*, 2004, 29(Suppl): 114-116.

[4] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 下册, 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1143.

[5] 楼黎明, 杨莉, 徐慧连, 等. 高血压病患者血小板活化状态观察[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2006, 19(9): 554-555.

[6] 潘华珍. 肌醇磷脂研究的进展[J]. *生理科学*, 1998, 8(6): 437-439.