

清脂胶囊抑制热毒血瘀证模型大鼠血小板活化作用机理分析

赵 瑞, 聂淑琴, 杨 庆, 翁小刚

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要:目的: 研究清脂胶囊对大鼠两种内毒素攻击模型的血小板胞浆游离钙离子($[Ca^{2+}]_i$)浓度, cAMP, cGMP 含量及血浆中血栓素 B_2 , α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$, PGE_2 的影响。方法: 1. 给药 8 d 后腹腔注射内毒素(LPS)造模, 注射后分别于 6h, 24h 腹主动脉抗凝取血, 测定血小板 $[Ca^{2+}]_i$, 前列腺素 E_2 (PGE_2), α -酮-前列腺素(α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$)。2. 给药同时给高脂饲料 8d, 并于第 8d 注射 LPS 造模后 6h 腹主动脉取抗凝血, 测定血小板 cAMP, cGMP 含量, 血浆血栓素(TXB_2), α -酮-前列腺素(α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$)。结果: 清脂胶囊可以升高 LPS 造模 24h 大鼠血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 水平, 降低 24h 血浆 α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$ 水平。对于高脂加 LPS 造模大鼠明显提高血小板数量, 明显降低血浆 TXB_2 水平和改善 TXB_2/α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$ 比值。

关键词: 清脂胶囊; 内毒素损伤模型; cAMP; cGMP; 血栓素 B_2 ; α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$; 血小板

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0032-04

Inhibition Effects of Qingzhi Capsule on Platelet Activation and Aggregation in Rats with Attacked by LPS

ZHAO Rui, NIE Shu-qin, YANG Qing, WENG Xiao-gang

(Institue of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: Objects: To investigate the influence of Qingzhi capsule on platelet intracellular cAMP and cGMP levels, intracellular calcium of platelet ($[Ca^{2+}]_i$), plasma PGE_2 , TXB_2 and α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$ in two models of LPS attack in rats. Methods: Two kinds of model were established: after oral administration of Qingzhi capsule 8d, attack was induced by intraperitoneal injecting (i. p.) LPS; another model was established with high fat diet for 8d, then induced by i. p. LPS at the last day. At 6h or 24h of post-supplementation rats were anesthetized, blood was collected immediately from abdominal aorta. The levels of Plasma TXB_2 and α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$ was assayed by radioimmunoassay (RIA), cAMP and cGMP levels of platelet were assayed by RIA too. $[Ca^{2+}]_i$ were examined with flow cytometer. The level of Plasma PGE_2 was measured by enzyme-immunoassay (EIA). Results and Conclusion: Qingzhi Capsule increased the level of platelet $[Ca^{2+}]_i$ on 24h after LPS attack, Qingzhi Capsule improved the levels of Plasma PGE_2 and α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$ at 24h in the rats with only LPS attack. Qingzhi Capsule had strong effect on prevention of increasing TXB_2 . Results also indicated depressing of TXB_2/α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$ ratio in the rats with high fat diet and LPS attack.

Key words: Qingzhi Capsule; LPS attack; cAMP; cGMP; thromboxane B_2 (TXB_2); α -Ket α - $PGF_{1\alpha}$; Platelet

收稿日期: 2004-09-07

通讯作者: 聂淑琴, Tel: (010) 64065791, E-mail: nieshuqin@sina.com

com

清脂胶囊是由我所研制的降脂新药, 是由熟大黄, 枸杞子和肉苁蓉组方而成。药效学实验结果显示, 清脂胶囊对预防和治疗高脂血症多项指标有突出药效, 对动脉粥样硬化有显著预防作用。为了进

一步观察其对血液流变性的作用, 本试验就清脂胶囊对于单纯内毒素攻击模型的胞浆游离钙离子浓度和前列腺素水平的影响以及对于饲喂高脂饲料加内毒素损伤大鼠模型的血小板 cAMP, cGMP 含量及血浆血栓素 B₂, 6-酮-前列腺素 F_{1α} 水平和血小板计数进行研究, 揭示其在改善血小板聚集和血栓形成过程的作用环节和机理。

1 材料

1.1 动物与饲料 SD 种大鼠, 雄性, 体重 190 ± 10 克, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, SPF 级, 合格证号: SCXK(京) 2002-2003。动物实验条件符合二级标准; 大鼠普通饲料由北京九江口饲料厂加工, 高脂饲料(胆固醇 1%, 猪油 10%, 胆盐 0.25%, 胆酸钠 0.2%, 基础饲料 88.55%) 由中国人民解放军军事医学科学院试验动物中心加工, 许可证号: SCXK(军) 2002-0018 号。

1.2 药品与试剂 清脂胶囊由本所研制, 中日友好医院加工, 批号: 19961201。药物由大黄(*Rheum tanguticum* Maxim ex Balf. 青海产, 制熟), 枸杞子(*Lycium barbarum* L. 宁夏产), 肉苁蓉(*Cistanche deserticoday* Y. C. Ma 内蒙产) 按照 6: 3: 1 的比例组成。原料药经加工提取制成棕褐色粉末, 每克提取物相当于生药 2.5 克, 每克药粉含大黄酸不低于 4.44mg。阳性药物: 阿司匹林由北京太洋药业有限公司生产, 批号: H 11022079。羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 由北京东环联合化工厂生产, 批号: 971230。药物临用前用 0.5% 的羧甲基纤维素配制成不同浓度。细菌内毒素: 由 SIGMA 公司生产, 由大肠杆菌 055: B₅ 制备, 批号: 56H4096。TXB₂ 试剂盒(放免法), 6-Keto-PGF_{1α} 试剂盒(放免法) 购自北京科美东雅生物技术有限公司, 批号: 040625。Fluo-3(1mg) 购自北京岳泰科技有限责任公司。无钙 HEPES 缓冲液(130mmol/L NaCl, 5.4mmol/L KCL, 5.5mmol/L 葡萄糖, 100mmol/L HEPES, 0.8mmol/L MgSO₄ · 7H₂O, pH 值调至 7.40)。cAMP, cGMP 试剂盒(放免法) 试剂购于上海中医药大学同位素室, 批号: 041028。

1.3 仪器与设备 ZS-3 型半自动生化分析仪, 北京中生生物高科技公司; 台式高速冷冻离心机, 索福 ST21, 美国 DuPont 公司; 血小板聚集仪, DIC-PA3210, 日本制造; 智能放免 γ 测量仪, SN-695B 型, 上海核所日环光电仪器有限公司; 流式细胞仪为美国 Coulter 公司 Epics XL 型; HSS-IB 型恒温水浴, 成都仪器厂, 编号: 498035。

2 方法

2.1 大鼠内毒素损伤模型的建立 SD 大鼠, 饲喂普通饲料, 按体重随机分为正常组, 模型组, 阳性药组, 清脂胶囊 0.5g/kg, 清脂胶囊 1.0g/kg, 清脂胶囊 2.0g/kg 组。给药组按 2mL/100g 体重灌胃, 每日一次, 给药 8d; 正常组, 模型组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素; 阳性药物灌胃阿司匹林 30mg/kg。每 4d 称体重 1 次, 第 7d 下午四点禁食, 第 8d 晨灌胃给药一次, 药后 1h 正常组腹腔注射 0.9% 生理盐水, 其余各组腹腔注射 LPS 250μg/kg, 注射 LPS 后 5h 每组再灌胃给药一次, 于不同的时间点取血。

2.1.1 Ca²⁺ 的测定 造模后 6h, 24h 以 1g/kg 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 橘橼酸钠(1:9) 抗凝, 腹主动脉快速取血, 经反复混匀后放入加盖塑料离心管, 4h 内 800 转 15min 离心, 取富血小板血浆(PRP) 1mL, 离心弃去上清, 用无钙 HEPES 缓冲液洗 3 遍后, 加入缓冲液 1mL, 混匀取样 50μL 和 50μL Fluo-3(终浓度 20μmol/L) 37℃ 温浴 30min, 离心弃上清, 加入 400μL 生理盐水, 上机测定血小板[Ca²⁺]_i 浓度。

2.1.2 6-Keto-PGF_{1α} 和 PGE₂ 水平的测定 分离 PRP 后的余血以 3500 转 15min 离心, 取血浆用酶联免疫方法测定血浆 6-Keto-PGF_{1α} 和 PGE₂ 水平。

2.2 饲高脂饲料及 LPS 致内皮损伤模型的建立^[1]

SD 大鼠, 按体重随机分为正常组, 模型组, 阳性药组, 清脂胶囊 1.0g/kg, 清脂胶囊 2.0g/kg 组。正常组饲喂普通饲料, 其余各组均给予高脂饲料共 8d。给药组按 2mL/100g 体重, 灌胃给药 8d, 每日 1 次; 正常组, 模型组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素; 阳性药物灌胃阿司匹林 30mg/kg。每 4d 称体重 1 次, 第 7d 下午四点禁食, 第 8d 造模方法同 2.1, 造模后 6h 取血。

2.2.1 cAMP, cGMP 的测定^[3] 以 1g/kg 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 使用 EDTA-2Na⁺ 消炎痛抗凝, 按 120μL 抗凝剂取血 5mL, 腹主动脉快速取血, 按 2.1.1 制备富血小板血浆(PRP), 做血小板计数后, 离心弃去上清, 分离出血小板, 加入 pH4.75 的醋酸缓冲液, 混匀后经细胞破碎仪打碎后, 离心取上清 100μL 按试剂盒说明测定血小板 cAMP, cGMP 的浓度。并将每个动物测定的 cAMP 除以 cGMP 得到 cAMP/cGMP 比值。

2.2.2 血栓素和 6-酮-前列腺素的测定^[5] 上述分离 PRP 后的余血 3500 转 15min 离心, 取血浆用放免法测定血浆 TXB₂, 采用倍比稀释的方法取血浆 200μL, 用生理盐水稀释 4~8 倍测定, 结果乘以相应

稀释倍数得到最终浓度值。 $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 直接取血浆 200 μL 测定,并将每个动物测定的 TXB_2 除以 $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 得到 $\text{TXB}_2/\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 比值。

3.3 统计学处理 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计方法用 SPSS 软件包中单因素方差分析和组间 t 检验比较差异的显著程度。

4 结果

表 1 清脂胶囊对大鼠内毒素损伤模型 PGE_2 , $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$, 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

组别	剂量 (g/kg)	N	6h 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (荧光强度)	24h 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (荧光强度)	$\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ (pg/mL)	PGE_2 (pg/mL)
正常组	—	9	1.596 \pm 0.043	2.971 \pm 0.29	14.361 \pm 1.55 ¹⁾	53.176 \pm 3.96 ¹⁾
模型组	—	9	1.689 \pm 0.095	3.010 \pm 0.34	16.477 \pm 1.33	60.600 \pm 5.38
清脂胶囊	0.5	9	1.714 \pm 0.119	3.174 \pm 0.14	16.927 \pm 1.46	61.764 \pm 4.81
清脂胶囊	1.0	9	1.823 \pm 0.097 ³⁾	3.293 \pm 0.16	15.134 \pm 1.46	56.992 \pm 6.69
清脂胶囊	2.0	10	—	3.359 \pm 0.09 ¹⁾	13.789 \pm 1.75 ¹⁾	51.998 \pm 6.46 ¹⁾
阿司匹林组	0.03	9	1.770 \pm 0.123 ³⁾	3.447 \pm 0.39 ¹⁾	14.435 \pm 1.16 ¹⁾	56.619 \pm 3.62

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, (下同)。

4.2 对血小板 cAMP、cGMP 含量, PRP 中血小板计数的影响 腹腔注射内毒素可导致血小板 cAMP 水平降低, cGMP 水平升高, cAMP/cGMP 比值降低,与正常组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。阳性药物明显升高 cAMP 水平 ($P < 0.01$),同时升高 cAMP/cGMP 比值 ($P < 0.01$)。清脂胶囊具有升高 cAMP 水

4.1 对大鼠内毒素损伤模型 PGE_2 , $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 清脂胶囊可以升高造模 24h 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平,大剂量和阳性药物组与模型组比具有显著差异 ($P < 0.05$),对于 24h 血浆 $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 有降低作用 ($P < 0.05$)。大剂量组降低 PGE_2 与模型组比差异显著 ($P < 0.05$)。详见表 1。

平的趋势,但结果无显著性差异 ($P > 0.05$)。腹腔注射内毒素可导致大鼠血小板数量明显减少,与正常组比较具有显著的差异 ($P < 0.01$)。清脂胶囊和阿司匹林均可抑制血小板数量的减少,与模型组比较均有非常显著的差异 ($P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 清脂胶囊对大鼠高脂饲料及 LPS 致内皮损伤模型血小板 cAMP, cGMP 含量, PRP 中血小板计数的影响

组别	剂量 (g/kg)	N	cAMP (pmol/10 ⁹)	cGMP (pmol/10 ⁹)	cAMP/cGMP	PRP 的血小板计数 ($\times 10^{10}$ 个/L)
正常组	—	11	1.673 \pm 0.13 ²⁾	0.0167 \pm 0.0016 ²⁾	114.92 \pm 18.69 ²⁾	11.0 \pm 1.18 ²⁾
模型组	—	12	0.993 \pm 0.14	0.0567 \pm 0.0029	30.73 \pm 2.78	3.4 \pm 0.62
清脂胶囊	1.0	12	1.373 \pm 0.16	0.0317 \pm 0.0021	43.72 \pm 5.06	9.9 \pm 1.38 ²⁾
清脂胶囊	2.0	11	1.113 \pm 0.19	0.0417 \pm 0.003	39.19 \pm 4.76	8.4 \pm 1.6 ²⁾
阿司匹林组	0.03	11	1.973 \pm 0.09 ²⁾	0.0367 \pm 0.0023	74.06 \pm 5.10 ²⁾	12.0 \pm 3.1 ²⁾

表 3 清脂胶囊对大鼠高脂饲料及内毒素损伤模型血浆 TXB_2 , $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$, 及 $\text{TXB}_2/\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 比值的影响

组别	N	剂量 (g/kg)	TXB_2 (pg/mL)	$\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ (pg/mL)	$\text{TXB}_2/\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 比值
正常组	11	—	380.25 \pm 78.41 ²⁾	76.47 \pm 10.90 ¹⁾	5.36 \pm 1.34 ²⁾
模型组	12	—	2692.47 \pm 506.82	135.66 \pm 37.67	26.13 \pm 5.68
清脂胶束	12	1.0	317.03 \pm 67.05 ²⁾	102.35 \pm 21.13	3.33 \pm 1.01 ²⁾
清脂胶束	11	2.0	1158.15 \pm 397.55 ¹⁾	100.65 \pm 21.93	10.30 \pm 2.79 ²⁾
阿司匹林组	11	0.03	17.36 \pm 4.60 ^{2,3)}	29.62 \pm 5.40 ^{2,3)}	0.437 \pm 0.16 ^{2,3)}

4.3 对 TXB_2 , $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 及 $\text{TXB}_2/\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 比值的影响 模型组的动物 TXB_2 水平明显升高,与正常组比较具有极显著差异 ($P < 0.01$),而清脂胶囊 1g/

kg 组, 2g/kg 组明显抑制了 TXB_2 的升高,与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$)。其中清脂 1g/kg 组与模型组比较 ($P < 0.01$)。另一方面,模型组和清脂胶囊组的 $\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 水平均出现升高趋势,其中模型组与正常组比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。清脂胶囊和阳性药物能够明显降低 $\text{TXB}_2/\text{6-Keto-PGF}_{1\alpha}$ 的比值,与模型组比较差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。阳性药物与正常组比较也具有差异 ($P < 0.05$)。详见表 3。

5 讨论

清脂胶囊是具有确切降脂疗效的中药复方^[1],试验证明它还可以显著降低饲高脂饲料动物的全血

粘度,对热毒血瘀证模型大鼠的血液流变学有显著影响,能明显降低血小板聚集率和全血粘度同时具有内皮细胞保护作用^[10]。

本试验观察清脂胶囊对血小板活化的三个途径-cAMP/cGMP、TXA₂、Ca²⁺的影响。通过观察药物对于模型动物上述各类因子的浓度的影响,确定药物的效果和可能的作用途径。其中TXA₂主要由血小板和巨噬细胞合成,具有强烈的血小板聚集活性,其水平升高可以引起血小板的释放反应;PGI₂可以拮抗TXA₂的作用。血小板内的另一对重要信使物质是cAMP/cGMP,cAMP的浓度升高时可以抑制血小板的聚集,cGMP的作用与cAMP相反。而血小板内的Ca²⁺也是血小板代谢和功能的重要信号转导物质,浓度升高使血小板活化引起血小板的变形,聚集,释放。

清脂胶囊对于TXB₂途径作用最强,对于饲喂高脂饲料加内毒素损伤大鼠,造模后6h的血浆血栓素B₂水平升高具有明显抑制作用,可明显降低TXB₂/6-Ket α -PGF_{1 α} 的比值,抑制血小板减少;对于单纯内毒素攻击模型24h血浆PGE₂,6-Ket α -PGF_{1 α} 也具有明显的改善作用。清脂胶囊对造模6h的血小板cAMP具有升高趋势,cGMP含量影响则不显著,对于造模6h的cAMP/cGMP比值的改善作用也不明显。另一方面LPS造模可以使血小板[Ca²⁺]_i浓度升高,而清脂胶囊对于这一改变没有抑制作用。清脂胶囊大剂量和阳性药物甚至升高造模24h血小板[Ca²⁺]_i水平,清脂胶囊在这一环节的作用还有待进一步探讨。本

次试验结果证实了清脂胶囊在抗凝血和血栓形成方面具有的显著作用,为其今后在临床的应用提供了可靠的实验依据。

参考文献:

- [1] 聂淑琴,李铁林,薛宝云,等.脂复康胶囊对家兔试验性高脂血症及动脉粥样硬化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(5):23-25.
- [2] 丛玉隆,金朝,李向飞,等.口服精氨酸抑制血小板钙波动机制研究[J].中华检验医学杂志,2000,23(1):32-34.
- [3] 王宏伟,李树生,赵华月,等.API0134对高脂血症及家兔血栓形成及血小板信号转导物质的影响[J].中国动脉硬化杂志,2002,10(4):285-287.
- [4] 尹明,魏丽,李银平.环氧酶在心血管疾病中的研究现状[J].中国危重病急救医学,2000,12(11):698-701.
- [5] 肖建如.颈髓损伤患者血小板活化因子,血栓素B₂和6-酮前列腺F_{1 α} 测定及其意义[J].中国危重病急救医学,1998,10(3):164-167.
- [6] 张顺材.内毒素基础与临床[M].北京:科学出版社,2003.150-166.
- [7] 王振义.血栓与止血基础理论与临床[M].上海:上海科技出版社,1996.625-626.
- [8] 汪钟.现代血栓病学[M].北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社,1997.212-223.
- [9] 胡金麟.细胞流变学[M].北京:科学出版社,2000.71-75.
- [10] 史青,聂淑琴,杨庆.清脂胶囊对热毒血瘀证大鼠内皮功能及血流变学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(1):28-31.