

注射用血栓通体外对家兔血小板聚集的影响

王炎炎, 朱慧超, 李来来, 肖 扬, 王 怡*

天津中医药大学, 天津 300193

摘要:目的 研究注射用血栓通(冻干, 主要成分为三七总皂苷, 质量分数为95%)体外对二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)、血小板活化因子(PAF)诱导家兔血小板聚集的影响。方法 采用Born法, 检测ADP、AA、PAF诱导的家兔血小板聚集率。结果 与对照组比较, 注射用血栓通7.2、14.4 mg/mL组能显著抑制ADP、AA、PAF诱导的兔血小板聚集率($P < 0.01$), 注射用血栓通3.6 mg/mL组能显著抑制ADP诱导的兔血小板聚集率($P < 0.01$)。结论 注射用血栓通具有体外抑制家兔血小板聚集的作用。

关键词: 注射用血栓通; 血小板聚集; 三七总皂苷; 花生四烯酸; 血小板活化因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2669-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.018

Effects of Xueshuantong injection on platelet aggregation in rabbits *in vitro*

WANG Yan-yan, ZHU Hui-chao, LI Lai-lai, XIAO Yang, WANG Yi

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the effects of Xueshuantong injection (lyophilized, main component of *Panax Notoginsenosidum*, total content of 95%) on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP), arachidonic acid (AA), and platelet-activating factor (PAF) in rabbits. **Methods** Using the Born method, the platelet aggregation induced by ADP, AA, and PAF was detected. **Results** Compared with the control group, Xueshuantong injection (7.2 and 14.4 mg/mL) could significantly inhibit the platelet aggregation rate induced by ADP, AA, and PAF ($P < 0.01$), Xueshuantong injection (3.6 mg/mL) could significantly inhibit the platelet aggregation rate induced by ADP ($P < 0.01$). **Conclusion** Xueshuantong injection could inhibit the *in vitro* platelet aggregation of rabbits.

Key words: Xueshuantong injection; platelet aggregation; total saponins of *Panax notoginseng*; arachidonic acid; platelet-activating factor

心脑血管疾病包括缺血性冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)、脑卒中和周围血管病,是导致人类死亡的主要病因。血栓形成是心、脑血管疾病的病理基础,而血小板激活和聚集在其形成过程中起核心作用^[1]。抗血小板聚集药物具有抑制血小板的黏附、聚集和释放功能,因此抗血小板治疗有助于减少心、脑血管不良事件的发生^[2]。血小板活化主要有二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)和血小板活化因子(PAF)3条途径^[3]。抗血小板聚集药物主要包括血栓烷A₂(TXA₂)抑制药(阿司匹林)、ADP受体拮抗药(氯吡格雷)、磷酸二酯酶抑制药(双嘧达莫)、糖蛋白IIb/IIIa受体抑制药和其他抗血小板药物^[4-5]。抗血小板药物种类繁多,但均存在着不同程

度的毒副作用(胃肠道刺激、联合用药出血风险等)并且部分患者对于阿司匹林等药物存在着用药抵抗等。三七是五加科三七 *Panax notoginseng* (Burk.) f. H. Chen 的根^[6],其性温味甘,微苦,主入肝、胃经,具有化瘀止血、活血定痛的功能^[7]。三七总皂苷(total saponins of *Panax notoginseng*, PNS)为三七主要成分,是决定三七药效的最重要的活性成分^[8]。PNS具有扩张血管、降低心肌耗氧量、抑制血小板凝集、延长凝血时间、调血脂、清除自由基、抗炎、抗氧化等药理作用^[9-14]。因此,本实验旨在研究注射用血栓通(冻干,主要成分为PNS,质量分数为95%)对ADP、AA和PAF诱导家兔血小板聚集的影响,为注射用血栓通临床应用提供理论依据。

收稿日期: 2014-04-14

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项项目(2012ZX09102201-007); 广西科学研究与技术开发计划(14125008-2-5)

作者简介: 王炎炎(1983—),女,博士,研究方向为中药心血管药理。Tel: (022)59596163

*通信作者 王 怡,女,博士,研究员,博士生导师,主要从事中药心血管药理研究。Tel: (022)59596572 E-mail: vip_wangyi@126.com

1 材料与方法

1.1 药物及配制

注射用血栓通(冻干,以下简称血栓通),其含PNS 95%,规格150 mg/瓶,广西梧州制药(集团)股份有限公司,批号11010911,使用前氯化钠注射液稀释。阳性对照药阿司匹林,规格100 g, Sigma公司,批号A5376,使用前用氯化钠注射液溶解,配成0.65 mg/mL, 4℃保存备用。

1.2 血小板聚集诱导剂

二磷酸腺苷二钠盐,美国CHRONO-LOG公司,批号3407,规格2.5 mg, -20℃保存备用。花生四烯酸钠盐,美国CHRONO-LOG公司,批号4193,规格10 mg, -20℃保存。牛白蛋白100 mg,美国Sigma公司, 4℃保存。PAF, RBI公司,批号P-260, -20℃冰箱保存。

1.3 试剂

枸橼酸钠购于天津市北方化玻采购销售中心;盐酸利多卡因注射液购于湖北天药药业股份有限公司,批号H12021000;氯化钠注射液购于山东齐都药业有限公司。

1.4 主要仪器

570—VS血小板聚集仪,美国CHRONO-LOG公司;MIKRO 220R低温高速自动离心机,德国海蒂诗(Hettich)。

1.5 实验动物

健康大耳白家兔,雌雄各半,体质量2.0~2.6 kg,许可证号SCXK(京)2007-0003,普通级别,饲养于天津中医药大学实验动物中心,温度19~25℃,相对湿度40%~60%。

1.6 方法

1.6.1 样本采集 取血前1 d晚上8点开始禁食不禁水,取血前用3.8%枸橼酸钠润洗注射器,于家兔清醒状态下,采用利多卡因颈部局部麻醉,颈总动脉取血。血液以3.8%枸橼酸钠溶液抗凝(9:1),缓慢颠倒试管混匀。

1.6.2 血浆处理 血液1 000 r/min离心12 min,取上清部分得富血小板血浆(PRP),剩余部分3 000 r/min离心10 min,取上清部分得贫血小板血浆(PPP)。用全自动血细胞分析仪计数血小板,用PPP调PRP,使血小板计数为 $3.0 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^9$ 个/L。

1.6.3 血小板聚集曲线的描记 用570—VS血小板聚集仪测定血小板聚集率。按照Born氏比浊法,将加入250 μL检测标本的PPP反应杯放于PPP孔,

加入250 μL检测标本的PRP反应杯放于PRP孔,温育5 min,对照组加入生理盐水20 μL,阳性对照组加入阿司匹林20 μL(终质量浓度0.4 mg/mL),实验组加入血栓通(终质量浓度1.8、3.6、7.2、14.4 mg/mL),温育5 min,荧光基线稳定在100/0的位置。每个比色杯分别加入ADP、AA、PAF 3 μL,测定开始,6 min后停止。根据仪器描记出来的聚集曲线计算聚集率、斜率、聚集延迟时间,分析药物对血小板聚集的影响,并计算聚集抑制率。

聚集抑制率 = (对照组聚集率 - 给药组聚集率) / 对照组聚集率

1.7 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件包进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 体外对ADP诱导的正常家兔血小板聚集的影响

2.1.1 对ADP诱导的正常家兔血小板聚集率的影响 血栓通对ADP诱导的正常家兔血小板聚集均有抑制作用,其中血栓通1.8 mg/mL抑制作用显著($P < 0.05$),血栓通3.6~14.4 mg/mL抑制作用非常显著($P < 0.01$),见表1。

2.1.2 对ADP诱导的正常家兔血小板聚集曲线斜率的影响 血栓通对ADP诱导的正常家兔血小板聚集曲线斜率均有降低作用,其中血栓通1.8 mg/mL降低作用明显($P < 0.05$),血栓通3.6~14.4 mg/mL降低作用非常显著($P < 0.01$),见表1。

2.1.3 对ADP诱导的正常家兔血小板聚集延迟时间的影响 血栓通对ADP诱导的正常家兔血小板聚集有延迟作用,其中血栓通1.8 mg/mL能明显延迟血小板聚集($P < 0.05$),血栓通3.6~14.4 mg/mL能非常显著延迟血小板聚集($P < 0.01$),见表1。

2.2 体外对AA诱导的正常家兔血小板聚集的影响

2.2.1 对AA诱导的正常家兔血小板聚集率的影响 血栓通对AA诱导的正常家兔血小板聚集均有抑制作用,其中血栓通3.6 mg/mL抑制作用明显($P < 0.05$),血栓通7.2~14.4 mg/mL抑制作用非常显著($P < 0.01$),见表2。

2.2.2 对AA诱导的正常家兔血小板聚集曲线斜率的影响 血栓通对AA诱导的正常家兔血小板聚集曲线斜率有降低作用,其中血栓通3.6~14.4 mg/mL能显著降低血小板聚集曲线斜率($P < 0.01$),见表2。

表 1 血栓通体外对 ADP 诱导的正常家兔血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 1 Effect of Xueshuantong injection on ADP induced-platelet aggregation of rabbits *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	聚集率 / %	聚集抑制率 / %	聚集曲线斜率 / %	延迟时间 / s
对照	—	49.36 $\pm$ 6.26	—	88.70 $\pm$ 10.94	18.60 $\pm$ 2.88
血栓通	1.8	43.86 $\pm$ 7.32*	11.14	80.40 $\pm$ 5.38*	21.90 $\pm$ 3.73*
	3.6	41.64 $\pm$ 5.87**	15.63	77.00 $\pm$ 4.67**	22.70 $\pm$ 3.47**
	7.2	37.25 $\pm$ 7.81**	24.53	69.90 $\pm$ 13.76**	25.20 $\pm$ 4.26**
	14.4	25.93 $\pm$ 7.01**	47.47	50.60 $\pm$ 9.22**	31.30 $\pm$ 5.76**
阿司匹林	0.4	44.29 $\pm$ 6.32*	10.27	80.20 $\pm$ 6.23*	24.80 $\pm$ 4.21*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

表 2 血栓通体外对 AA 诱导的正常家兔血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 2 Effect of Xueshuantong injection on AA induced-platelet aggregation of rabbits *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	聚集率 / %	聚集抑制率 / %	聚集曲线斜率 / %	延迟时间 / s
对照	—	56.37 $\pm$ 5.41	—	85.70 $\pm$ 5.74	22.00 $\pm$ 3.59
血栓通	1.8	52.93 $\pm$ 9.17	6.10	81.60 $\pm$ 9.07	26.40 $\pm$ 4.60*
	3.6	51.07 $\pm$ 6.44*	9.40	74.30 $\pm$ 8.92**	28.90 $\pm$ 4.18**
	7.2	49.86 $\pm$ 5.24**	11.54	67.10 $\pm$ 9.18**	32.30 $\pm$ 4.32**
	14.4	43.35 $\pm$ 6.86**	23.10	53.40 $\pm$ 12.76**	40.50 $\pm$ 5.83**
阿司匹林	0.4	42.86 $\pm$ 8.50**	23.97	60.50 $\pm$ 8.98**	27.10 $\pm$ 3.00**

2.2.3 对 AA 诱导的正常家兔血小板聚集延迟时间的影响 血栓通对 AA 诱导的正常家兔血小板聚集有延迟作用, 其中血栓通 1.8 mg/mL 能明显延迟血小板聚集 ($P < 0.05$), 血栓通 3.6~14.4 mg/mL 能显著延迟血小板聚集 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 体外对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集的影响

2.3.1 对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集率的影响 血栓通对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集都有抑制作用, 其中血栓通 7.2~14.4 mg/mL 抑制作用非常显著 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.3.2 对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集曲线斜率的影响 血栓通对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集曲线斜率均有降低作用, 其中血栓通 7.2 mg/mL 能明显降低血小板聚集曲线斜率 ($P < 0.05$); 血栓通 14.4 mg/mL 能显著降低血小板聚集率曲线斜率 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.3.3 对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集延迟时间的影响 血栓通对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集有延迟作用, 其中血栓通 1.8 mg/mL 能明显延迟血小板聚集 ($P < 0.05$), 血栓通 3.6~14.4 mg/mL 能显著延迟血小板聚集 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 血栓通对 PAF 诱导的正常家兔血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Table 3 Effect of Xueshuantong injection on PAF induced-platelet aggregation of rabbits *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	聚集率 / %	聚集抑制率 / %	聚集曲线斜率 / %	延迟时间 / s
对照	—	63.54 $\pm$ 6.69	—	112.80 $\pm$ 17.96	13.90 $\pm$ 4.77
血栓通	1.8	62.93 $\pm$ 9.13	0.96	109.60 $\pm$ 14.13	16.40 $\pm$ 3.62*
	3.6	60.79 $\pm$ 8.53	4.33	103.80 $\pm$ 15.05	19.80 $\pm$ 3.85**
	7.2	54.92 $\pm$ 6.87**	13.56	93.50 $\pm$ 18.57*	21.40 $\pm$ 6.59**
	14.4	48.29 $\pm$ 6.64**	24.00	85.40 $\pm$ 15.16**	26.70 $\pm$ 5.85**
阿司匹林	0.4	57.24 $\pm$ 7.71*	9.91	95.20 $\pm$ 15.48**	20.90 $\pm$ 3.75**

3 讨论

冠状动脉综合征等血栓栓塞性疾病的发病率逐年增加。由于血小板聚集在血栓形成中发挥着关键作用^[15],因此抗血小板聚集治疗在防治血栓栓塞性疾病中具有重要的意义。血小板活化主要有ADP、AA和PAF 3条途径。其中ADP途径降低血小板中CAMP的水平^[16],并能刺激血小板颗粒释放分泌TXA₂^[17],激活纤维蛋白原受体,诱发血小板的聚集。AA则是一种中等强度的血小板聚集诱导剂,主要是通过环加氧酶的作用,经血小板中TXA₂合成酶的催化转变为TXA₂,促进颗粒释放ADP、5-羟色胺(5-HT)等,进一步增强血小板聚集^[18]。PAF是迄今所知作用最强的血小板活化剂,PAF诱导血小板聚集和释放的作用不依赖于环加氧酶催化的AA代谢途径和ADP释放。本实验针对血小板聚集时的不同通路,分别选择了ADP、AA、PAF为诱导剂。

活血化瘀中药在临床应用广泛,研究表明中药有效成分对抗血小板功能异常,在抑制或延缓血栓形成过程中发挥重要作用。随着中药现代化进程的加快,中药有效成分防治缺血性心脑血管疾病日益受到关注,对中药的抗血小板聚集作用的研究是现代中药研究的一个重要趋势。三七为五加科人参属植物三七的干燥根,具有止血不留瘀、活血不出血的功效。PNS为三七主要成分,具有扩张血管、降低心肌耗氧量、抑制血小板凝集、延长凝血时间、降血脂、清除自由基、抗炎、抗氧化等药理作用^[9-14]。

本实验对以PNS为主要成分的血栓通进行体外抗血小板聚集活性考察,实验结果表明,血栓通对3种诱导剂诱导的血小板聚集均有抑制作用,其中对AA、PAF引起的血小板聚集抑制作用相当,而对ADP诱导的血小板聚集的抑制作用强于其他2个模型。本实验结果表明注射用血栓通(冻干)体外可以不同程度抑制ADP、AA、PAF诱导的家兔血小板聚集。

参考文献

- [1] 吴小平,刘放.抗血小板聚集药物研究进展[J].西北药学杂志,2009,24(4):327-330.
- [2] 孙忠实,朱珠,肖燕萍.抗血小板药物的合理应用[J].药物警戒,2007,4(4):240-245.
- [3] Vermynen J, Badenhorst P N, Deckmyn H, et al. Normal mechanisms of platelet function [J]. *Clin Haematol*, 1983, 12: 107-110.
- [4] 曾拥军,陈孝东,毛成洁,等.缺血性卒中或短暂性脑缺血发作患者的卒中预防指南[J].国际脑血管疾病杂志,2006,(5):325-361.
- [5] 卜晓斐,刘鹏,付晓丽,等.噻吩并吡啶类抗血小板聚集药物研究概况[J].现代药物与临床,2012,27(1):43-48.
- [6] 朴春花.三七的药理作用研究进展概述[J].中国医药指南,2011,13(9):209-210.
- [7] 段寅慧,吴敏.三七总皂苷药理研究及临床应用研究[J].中医药信息,2014,31(2):108-110.
- [8] 李彦,陈文超,李炳.三七皂甙Rb₁对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马组织血红素加氧酶-1表达的影响[J].实用儿科临床杂志,2010,25(18):1422-1424.
- [9] 陈剑梅,郭洁文,李丽明.三七总皂苷对急性心梗后左室重构大鼠心功能的改善作用[J].中药新药与临床药理,2011,22(5):514-517.
- [10] 宋月英,闫玉仙,陈海生,等.三七总皂苷对缺血再灌注大鼠脑组织CaMK II β mRNA及蛋白的影响[J].中国老年学杂志,2011,31:835-837.
- [11] 任周新,孙建宁,赵辉,等.三七总皂苷对MCAO大鼠脑组织中粒细胞浸润及相关炎症因子的抑制作用[J].中成药,2009,31(9):1345-1347.
- [12] 王薇.三七总皂苷对脑出血患者血肿吸收及血浆基质金属蛋白酶-9的影响[J].中草药,2011,42(5):963-965.
- [13] 倪世容,徐正祯,王鑫.三七总皂苷降低兔肺缺血再灌注损伤和抑制细胞凋亡[J].基础医学与临床,2012,32(2):170-174.
- [14] 周燕,田磊,徐林,等.三七总皂苷对大鼠海马CA1区突触传递的作用及机制[J].中草药,2007,38(7):1032-1036.
- [15] 李丽,李艳红,王宁生.当归、红花与硫酸氢氯吡格雷抗血小板聚集的相互作用[J].中药新药与临床药理,2009,20(1):14-17.
- [16] Takasaki J, Kamohara M, Saito T, et al. Molecular cloning of platelet P2TAC ADP receptor: Pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y₁ receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 2001(3): 432-439.
- [17] Dorsam R T, Kunapuli S P. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 340-345.
- [18] 黄正安,邓义德,杨华.芹菜籽油对家兔血小板聚集的影响[J].陕西中医,2012,33(10):1427-1428.