

百裕银杏内酯注射液抑制家兔血小板聚集作用的实验研究*

徐露¹ 黄彦^{2△}

(1. 重庆医科大学生化与分子药理学重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆市中医院, 重庆 400021)

中图分类号: 文献标志码: 文章编号: 1004-745X(2014)04-0638-03

doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2014.04.031

【摘要】目的 观察不同剂量的百裕银杏内酯注射液对家兔血小板聚集功能、超微结构及 PF-4 和 β-TG 的影响。方法 将日本大耳兔分为百裕银杏内酯高、中、低剂量组及生理盐水组, 分别予相应药物静注 1 周, 采用体内实验法, 观察各组对血小板活化因子(PAF)诱导的家兔血小板聚集作用的影响, 以及血小板超微结构和 PF-4 和 β-TG 水平的变化。结果 百裕银杏内酯各剂量组较生理盐水组均能抑制 PAF 诱导的家兔血小板聚集, 减少聚集型血小板数量并使树突型血小板突起变少变短, 降低 PF-4 和 β-TG 的表达($P < 0.01$)。结论 百裕银杏内酯注射液能够抑制 PAF 诱导的血小板聚集, 抑制血小板的活化。

【关键词】 百裕银杏内酯注射液 血小板 血小板活化因子 电镜

The Effects of Bai Yu ginkgolide Injection on Platelet aggregation in rabbits XU Lu, HUANG Yan. *The Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology in Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*

【Abstract】 Aim: To observe the effects of Bai Yu ginkgolide injection on platelet aggregation, ultra structure and PF-4 and β-TG level in rabbits. **Methods:** Japanese big ear rabbits were randomly divided into Bai Yu ginkgolide Injection Low dose group, middle dose group, high dose group, and saline group, all of which were given corresponding treatment. In vivo experiments, when PAF induced platelet aggregation, platelet aggregation, ultra structure and PF-4 and β-TG level were observed. **Results:** Bai Yu ginkgolide injection could inhibit plate aggregation, reduce the number of aggregation type platelets and make fewer and shorter processes of dendritic platelets and reduce the level of PF-4 and β-TG significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bai Yu ginkgolide injection could antagonism PAF-induced platelet aggregation, inhibit the activation of platelets, and is a kind of important anti platelet aggregation drug.

【Key words】 Bai Yu Ginkgolide Injection; Platelet; PAF; Electron Microscopy

银杏内酯和白果内酯是银杏活血化瘀的有效成分^[1]。百裕银杏内酯注射液的主要成分为银杏总内酯(白果内酯、银杏内酯 ABC), 其活血化瘀作用较强, 对心脑血管疾病有显著疗效。为了证实百裕银杏内酯注射液对血小板细胞膜上的血小板活化因子(PAF)受体的抑制作用, 本实验进行了验证分析。现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1)实验动物。健康日本大耳白兔 40 只, 体质量(2.0±0.2) kg, 雌雄各半, 由重庆医科大学实验动物中心提供[动物合格证号 XCXK(渝)20020001]。(2)实验药物百裕银杏内酯(成都百裕制药, 批号

20120303)。(3)试剂和仪器。血小板活化因子(PAF)(购自 cayman, 批号 012328)溶解于含 0.25% 小牛血清蛋白且 pH 为 7.6 的 Tris-NaCl 溶液中, 其终浓度为 3.6 nmol/L; 枸橼酸钠(购自北京中杉金桥生物技术公司, 批号 20130117)溶于蒸馏水中, 浓度为 3.8%; 兔 β-血小板球蛋白(β-TG)ELISA 试剂盒(FOCUS, 批号 20130224); 兔血小板因子-4 (PF-4)ELISA 试剂盒(FOCUS, 批号 20130301); TYXN-96 多功能智能血液凝聚仪(购自上海通用技术研究所); 扫描电子显微镜 S-3000N(日本日立公司); ELX-800 酶标仪(美国宝特公司)。

1.2 分组及给药 随机将 40 只健康日本大耳兔随机分为 4 组, 每组 10 只。百裕银杏内酯高剂量组、百裕银杏内酯中剂量组、百裕银杏内酯低剂量组(以下分别简

* 基金项目: 重庆市中医院院内培育课题(2012-1-2-17)

△通信作者

称百裕高、百裕中和百裕低)分别以高(1.02 mL/kg)、中(0.51 mL/kg)、低(0.255 mL/kg)剂量静脉注射给药;生理盐水组以0.9%氯化钠注射液2 mL;各组给药均每日1次,连续1周。

1.3 检测血小板聚集率 每只家兔心脏取血10.5 mL,分出1.5 mL血浆取血清,其余9 mL血浆用3.8%枸橼酸钠以1:9比例抗凝,转速800 r/min离心10 min,取上清液,该上清液为富血小板血浆(PRP),将其分出100 μL PRP用于电镜检查,剩余PRP用于血小板聚集率的检测;剩余液体以转速3000 r/min离心15 min,去上清液为贫血小板血浆(PPP)。将PPP加入到PRP中,使PRP含有的血小板数目在 $360 \times 10^9/L$ 。检测在10 μL PAF诱导下PRP中的1 min、5 min及最大血小板聚集率。

1.4 血小板电镜观察 将预先得到的100 μL PRP放入硅化EP管里,再加入1 μL的PAF,作用15 min后,将PRP吸出滴在铺有方华膜的铜网上,在37℃下孵育10 min,超纯水冲洗后以3%戊二醛固定5 min,再用超纯水冲洗,铜网上的标本干燥后,在样本表面镀20 nm的金膜,用S-3000N扫描电镜观察100个血小板形态,计算出各型血小板比例。电镜下的血小板形态如下。(1)圆形:血小板呈圆形。体积小且一致,核心大,周边透明带低窄,中央致密。(2)树形:由中央致密区生成单个或多个足突,有时有分枝,呈细长或片状。(3)展平形:中央有致密的核心,外围有较宽透明带,周边较光滑或有小突起。(4)聚集形:由几个到几十个血小板组成的聚集体,其大小不等,可见血小板相互连接或完整融为一体,血小板在外周部的足突明显。

1.5 血清中PF-4和β-TG含量水平的测定 向1.5 mL血浆中加入1 μL的PAF,诱导PF-4和β-TG的释放,血浆于4℃静置4 h,取200 μL血清,按照试剂盒说明书进行检测,数据结果由酶标仪进行读取。

1.6 统计学处理 应用SPSS18.0统计软件。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示;采用两样本均数比较的t检验对各组血小板聚集率、血小板各型百分数、PF-4和β-TG含量进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板聚集实验结果 见表1。可见在PAF诱导下,将百裕高、百裕中、百裕低的最大血小板聚集率分

表1 各组PAF诱导的血小板聚集结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	1 min	5 min	MAX	血小板聚集抑制率
生理盐水组	8	2 mL	36.85±6.14	68.32±9.17	70.22±11.40	0.00
百裕低	8	0.255 mL/kg	28.16±5.42**	34.01±7.50**	42.69±7.26**	39.21
百裕中	8	0.51 mL/kg	25.09±5.26**	34.95±7.63**	42.71±7.25**	39.18
百裕高	8	1.02 mL/kg	24.42±5.04**	30.84±7.22**	39.49±7.38**	43.76

与生理盐水组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下同。

别与生理盐水组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),以上各组血小板聚集抑制率均有提高,说明高、中、低剂量的百裕银杏内酯注射液能对PAF诱导的血小板聚集产生抑制作用。

2.2 各组血小板电镜检测结果比较 见表2。在PAF诱导下,百裕高、百裕中、百裕低组聚集型血小板少见,血小板大小一致,细胞表面光滑。生理盐水组红细胞可粘附在血小板上、血小板形态不规律、体积增大、伸出伪足、聚集形血小板数增多。

表2 加入PAF后各组血小板形态比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血小板形态			
		圆形	树形	展平形	聚集形
生理盐水组	8	3.2±0.8	7.5±2.4	11.8±3.2	77.5±18.5
百裕低	8	33.5±12.6**	18.8±8.3**	36.2±14.4**	11.5±3.3**
百裕中	8	34.8±12.1**	22.2±8.0**	33.9±11.5**	9.1±4.6**
百裕高	8	40.7±15.3**	10.5±6.0	18.7±7.8*	30.1±10.0**

2.3 各组血小板PF-4和β-TG检测结果比较 见表3。与生理盐水组相比,百裕银杏内酯高、中、低各剂量组PF-4水平显著降低($P < 0.01$),β-TG水平也显著降低($P < 0.01$),说明其血小板释放功能受到抑制。

表3 血小板PF-4和β-TG检测结果($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	PF-4	β-TG
生理盐水组	8	1.733±0.294	1.740±0.215
百裕低	8	1.274±0.139**	1.236±0.170**
百裕中	8	1.216±0.117**	1.204±0.165**
百裕高	8	1.177±0.144**	1.129±0.158**

3 讨论

白细胞、血小板、内皮细胞、肺、肝和肾等多种细胞和器官能产生一种内源性脂质介质-PAF^[2]。PAF可以作为炎症介质参与许多病理生理调节^[3];还能作为最强的内源性血小板聚集剂,强烈地激活血小板,促进血小板聚集^[4]。PAF通过与靶细胞膜上的PAF受体结合而发挥作用^[5]。PAF受体阻断药能阻止PAF与受体结合,因此对与PAF相关的疾病可能具有治疗意义^[6]。

银杏叶提取物的主要成分是银杏萜内酯(GK),包括银杏内酯A、B、C、J和M(GKA、GKB、GKC、GKJ、GKM)等具有独特的药理作用和治疗价值^[7]。银杏内酯已被公认为PAF受体拮抗剂,大量研究证实其具有拮抗炎症介质PAF的药理作用^[8]。GK可以拮抗PAF诱发的兴奋性氨基酸(EAA)超常释放^[9],还具有脑保护的治疗效果,能修复由脑缺血引起的EAA和抑制性氨基酸(IAA)动态平衡失调^[10]。在外源性D-Asp负载情况下,缺血再灌时大鼠海马区的Ca²⁺依赖性PAF释放也可以被GKB抑制^[11]。

PF-4和β-TG均存在于血小板的α颗粒内,同为

(下转第643页)

心律失常5年余,常服可达龙,服药后好转,停药后即再发作,常反复,口干欲饮,心烦不安,腹胀,饭后明显,二便尚调,舌淡暗,苔薄黄腻,脉结代。2012年4月holter室早43615次,二联律2291阵,共36919次,三联律82阵共599次,成对102阵,阵发性室速7阵,共9个心动组成,最长室速见于9:03分由3个心动组成。处方:制半夏9g,青皮、陈皮各9g,茯苓9g,黄连3g,竹茹9g,枳实9g,胆南星9g,五味子5g,甘松9g,桃红9g,赤芍、白芍各9g,当归9g,川芎5g,柴胡3g,桔梗3g,川牛膝9g,鸡内金9g,炒麦芽15g,厚朴9g,莱菔子9g。7剂。10月4日二诊:晨起后早搏时作(5:00~6:00左右),白天早搏不明显,口干,夜寐尚安,腹胀,晨起时不明显,早饭后开始,至次日晨起后消失,胃纳可,

二便尚调,舌淡红,有剥苔,脉弦细,无结代。原方加减。原方改青皮、陈皮各12g,五味子9g,莱菔子15g,减白芍,加炒党参9g。7剂。10月11日三诊:复诊自觉早搏较前好转,仍有腹胀,午饭后明显,次日晨起后消失,胃纳可,夜寐欠安,大便每日1次,偏烂,小便尚调,舌淡,边尖略红,舌有裂纹,苔薄,条纹状黄腻苔,脉细弦。中药原方加减。原方加黄柏3g,干姜7g。复查holter。10月18日四诊:自觉胸闷心悸不显,复查心电图正常,胃纳可,夜寐欠安,梦多,舌淡红,中间苔薄白腻,有条纹,脉细弦,中医予原方加减。原方改黄连6g,茯苓15g。7剂。后随访,患者症状明显缓解,间断因他病来诊,心律失常病情稳定。

(收稿日期 2013-10-14)

(上接第639页)

血小板特异蛋白。在某种因素的刺激下,血小板被激活,能释放出PF-4和 β -TG^[12]。当血小板被激活时, β -TG表达增高,且 β -TG/PF-4比率也升高;当试管内血小板被激活时, β -TG和PF-4的表达同时升高^[13]。

百裕银杏内酯注射剂是一种新型的银杏叶提取物相关产品,由白果内酯、银杏内酯ABC组成,目前已在临床大量使用,对心脑血管基本有较好的治疗作用。本实验发现,当PAF作为血小板聚集剂而不是炎症因子的时候,百裕银杏内酯注射剂能显著地抑制PAF诱导的血小板聚集、改善血小板形态、抑制 β -TG和PF-4的表达水平。说明百裕银杏内酯注射剂是以PAF受体为靶点的抗血小板聚集剂,然而其临床抗血小板聚集效果还需要临床实验来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Kuribara H, Weintraub ST, Yoshihama T, et al. An anxiolytic-like effect of Ginkgo biloba extract and its constituent, ginkgolide-A, in mice [J]. J Nat Prod, 2003, 66(10):1333-1337.
- [2] Guerrero AT, Zarpelon AC, Vieira SM, et al. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2013, 1(386):51-59.
- [3] Garland RC, Sun D, Zandi S, et al. Noninvasive molecular imaging reveals role of PAF in 87 [J]. 2011, 25(4):1284-1294.
- [4] Stafforini DM, McIntyre TM. Determination of phospholipase activity of PAF acetylhydrolase [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 59(5):100-107.
- [5] Melnikova VO, Villares CJ, Bar-Eli M. Emerging roles of PAR-1 and PAFR in melanoma metastasis [J]. Cancer Microenviron, 2008, 1(1):103-111.
- [6] Sutovsky P, Plummer W, Baska K, et al. Relative levels of se-

men platelet activating factor-receptor (PAFR) and ubiquitin in yearling bulls with high content of semen white blood cells: implications for breeding soundness evaluation [J]. J Androl, 2007, 28(1):92-108.


- [7] Singh P, Singh IN, Mondal SC, et al. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin [J]. Fitoterapia, 2013, 84(6):180-201.
- [8] Liao HJ, Zheng YF, Li HY, et al. Two new ginkgolides from the leaves of Ginkgo biloba [J]. Planta Med, 2011, 16(77):1818-1821.
- [9] Kaminskaia GO, Abdullaev RI, Filippov VP. Biochemical characteristics of fluid and cells of bronchoalveolar washings in patients with extrinsic allergic alveolitis [J]. Probl Tuberk, 2002, 16(8):26-30.
- [10] Koch E. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts [J]. Phytomedicine, 2005, 1(12):10-16.
- [11] Wang H, Qiu XY, Yang LS. Experimental research on effects of ginkgolides made in China on cerebral ischemia injury in rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med (中国中医基础医学杂志), 2002, 8(6):17-18.
- [12] Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Increased concentration of platelet-derived chemokines in serum of patients with delayed pressure urticaria [J]. Eur Cytokine Netw, 2008, 19(2):89-91.
- [13] Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Effect of allergen-specific immunotherapy on plasma level of platelet factor 4 (PF-4) and beta-thromboglobulin (beta-TG), platelet activation markers in patients with house dust mite allergy [J]. Vaccine, 2007, 18(25):3595-3598.

(收稿日期 2014-01-22)

百裕银杏内酯注射液抑制家兔血小板聚集作用的实验研究

作者: 徐露, 黄彦, XU Lu, HUANG Yan

作者单位: 徐露, XU Lu(重庆医科大学生化与分子药理学重点实验室, 重庆, 400016), 黄彦, HUANG Yan(重庆市中医院, 重庆, 400021)

刊名: 中国中医急症 

英文刊名: Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine

年, 卷(期): 2014, 23(4)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgzyjz201404031.aspx