

百裕银杏内酯注射液与阿司匹林、氯吡格雷联用对家兔血小板聚集的影响

徐 露¹ 张太君²

(1. 重庆医科大学 生物化学与分子药理学重点实验室 重庆 400016; 2. 重庆市中医院 科技教育外事处, 重庆 400021)

[摘 要] 目的 观察百裕银杏内酯注射液分别与阿司匹林、氯吡格雷联用后对家兔血小板聚集的影响。方法 观察各组对 AA、ADP 及 PAF 诱导的家兔血小板聚集作用的影响, 以及 PAF 诱导下血小板超微结构和 PF-4 和 β -TG 水平的变化。结果 百裕银杏内酯注射液分别与阿司匹林、氯吡格雷联用后, 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, 使树突型血小板突起变少变短, 并使得 PF-4 和 β -TG 表达降低。结论 百裕银杏内酯注射液与阿司匹林、氯吡格雷联用后, 起到拮抗 PAF 诱导的血小板聚集的协同作用。

[关键词] 百裕银杏内酯; 血小板; PAF

[中图法分类号] R446.1 [文献标志码] A [文章编号] 1000-2715(2015)01-0025-04

DOI:10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2015.0006

The effects of bai yu ginkgolide injection combined with aspirin ,clopidogrel on platelet aggregation and ultra structure changes

Xu Lu¹ Zhang Taijun²

(1. The Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology in Chongqing Medical University ,Chongqing 400016 ,China; 2. GCP department in Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine ,Chongqing 400020 ,China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of bai yu ginkgolide injection combined with aspirin ,clopidogrel on platelet aggregation in rabbits. **Methods** In vitro experiments ,arachidonic acid (AA) , adenosine diphosphate (ADP) and platelet activating factor (PAF) induced platelet aggregation PAF also induced ultra - structure alterations. The platelet factor 4 (PF -4) and β - thromboglobulin (β - TG) levels were measured. **Results** bai yu ginkgolide injection combined with aspirin ,clopidogrel could inhibit PAF - induced platelet aggregation , reduce the number of aggregation - type platelets , result in fewer and shorter dendritic platelets after PAF and reduce the levels of PF -4 and β - TG significantly ($P < 0.01$) . **Conclusion** bai yu ginkgolide injection combined with aspirin ,clopidogrel could produce cooperative effects to prevent PAF - induced platelet aggregation.

[Key words] bai yu ginkgolide injection; platelet; PAF need one more time correction

百裕银杏内酯注射液主要由银杏内酯和白果内酯组成, 两者是银杏活血化瘀的主要有效成分。目前已有实验发现白果内酯和银杏内酯能明显抑制 PAF 介导的血小板的聚集, 证明了其为 PAF 受体拮抗剂^[1]。但是, 很多实验只是用单一的药物来研究, 没有同步采用几种药物联用的方法比较作用靶点及作用强弱的差异。由于药物联用抗血

小板聚集的治疗方法已在临床上广为使用, 因此本文就几种临床上常用的抗血小板聚集药物联用后对不同诱导剂下的抗血小板聚集效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 40 只健康日本大耳兔, 雌雄各半, 体重 (2.0 $\pm$ 0.2) kg, 由重庆医科大学实验动物

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目 (NO: cstc2012jjA10137) 。

[通信作者] 张太君, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中药制剂与临床, E-mail: 4345422@qq.com。

中心提供[动物合格证号:XCXK(渝)20090001]。

1.2 实验药物 百裕银杏内酯注射液(成都百裕制药,批号:20120303),阿司匹林(拜耳公司,批号:120504) 氯吡格雷(赛诺菲制药公司,批号:1A751)。

1.3 试剂和仪器 将花生四烯酸(AA)(sigma,批号:A9689)溶解在1%碳酸钠溶液中,终浓度为0.35 mmol/L;用磷酸盐缓冲液溶解ADP(sigma,批号:A2894),最终浓度为300 μ mol/L;用pH为7.6的Tris-NaCl溶液溶解血小板活化因子(PAF)(cayman,批号:012328),使得PAF终浓度为3.6 nmol/L,再加入小牛血清蛋白,使其浓度为0.25%;蒸馏水溶解枸橼酸钠(北京中杉金桥生物技术公司,批号:20130117)配成3.8%的浓度;兔血小板因子4(PF-4)ELISA试剂盒(FOCUS,批号:20130301);兔 β -血小板球蛋白(β -TG)ELISA试剂盒(FOCUS,批号:20130224)。多功能智能血液凝聚仪TYXN-96(上海通用技术研究所研制);S-3000N扫描电子显微镜(日本日立公司);酶标仪ELX-800(美国宝特公司)。

1.4 分组及给药方法 40只日本大耳白兔,采用随机数字表的方法,完全随机分为4组,每组10只,分为:①生理盐水组;②百裕银杏内酯与阿司匹林联用组;③百裕银杏内酯与氯吡格雷联用组;④阿司匹林与氯吡格雷联用组。百裕银杏内酯注射液按照0.51 mL/kg的剂量iv给药,阿司匹林和氯吡格雷分别以5.13 mg/kg与3.85 mg/kg的剂量灌胃,每日1次,连续7 d。

1.5 血小板聚集率的检测 给药7 d后,家兔心脏取血10.5 mL,分出1.5 mL全血于4℃静置4 h得血清,其余9 mL全血用3.8%枸橼酸钠以1:9的比例抗凝,离心机以800 r/min的转速离心,离心10 min后留取上清液,得到富血小板血浆(PRP),再从PRP取出100 μ L进行电镜检测,其余PRP用于血小板聚集率的检测;剩余的血浆再以3 000 r/min速度离心15 min,留取上清液,得到贫血小板血浆(PPP)。用PPP对PRP进行调节,使得血小板数目为 360×10^9 /L。用1 μ L AA、ADP及PAF进行诱导,

测定1 min、5 min及最大血小板聚集率,计算血小板聚集抑制率。血小板聚集抑制率的计算方法为:(生理盐水组MAX血小板聚集率-测验组MAX血小板聚集率)/生理盐水组MAX血小板聚集率 $\times 100\%$ 。

1.6 血小板的电镜观察 向硅化EP管中注入100 μ L PRP,加入1 μ L的PAF对血小板聚集进行诱导,15 min后,将PRP滴注于铺有方华膜的铜网上,于37℃下孵育10 min,超纯水冲洗后,加入3%戊二醛固定5 min,超纯水再次冲洗,待铜网上标本干燥后,在其表面喷一层厚度为20 nm的金膜,S-3000N电子显微镜扫描细胞形态,随机找到100个血小板进行观察,计算各型血小板比例。电镜下的血小板形态主要有4种:①圆形:圆或椭圆,体积较小而均一,核大,中央密,周边透明带低窄;②树形:从中央致密区发出了单个或多个足突,呈片状或细长状,有的有分枝;③展平形:中央核心致密且外围透明带宽,周边光滑或有突起;④聚集形:数个至几十个血小板聚集形成,大小不一,血小板相互连接或融合为一体,外周部血小板可见明显足突。

1.7 测定血清中PF-4和 β -TG的含量水平 将1 μ L的PAF加入到1.5 mL全血中,诱导PF-4及 β -TG释放,全血于4℃静置4 h得到上层血清,取200 μ L血清进行检测。具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,酶标仪对结果数据进行读取。

1.8 统计学处理 结果数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS20.0软件进行统计分析,各组间比较采用方差分析,当 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板聚集实验结果

2.1.1 AA诱导的血小板聚集实验结果 在AA诱导下,所有组别的最大血小板聚集率(血小板分析仪所显示)与生理盐水组相比,均有统计学意义($P < 0.01$)。百裕银杏内酯注射液与阿司匹林联用后,其PLT抑制率与阿司匹林与氯吡格雷联用后对血小板聚集抑制率相近(见表1)。

表1 AA诱导的血小板(PLT)聚集作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	给药剂量	1min	5min	MAX	PLT聚集抑制率(%)
生理盐水	2mL	33.45 $\pm$ 5.89	66.53 $\pm$ 9.61	67.14 $\pm$ 11.22	0.00%
百裕+阿司匹林	0.51mL/kg + 5.13mg/kg	36.29 $\pm$ 6.17	36.43 $\pm$ 6.57	42.85 $\pm$ 7.07**	36.17%
百裕+氯吡格雷	0.51mL/kg + 3.85mg/kg	38.23 $\pm$ 6.74	40.13 $\pm$ 6.30	55.02 $\pm$ 6.95*	18.05%
阿司匹林+氯吡格雷	5.13mg/kg + 3.85mg/kg	24.06 $\pm$ 5.11**	37.14 $\pm$ 5.60**	41.44 $\pm$ 6.29**	38.28%

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

2.1.2 ADP 诱导的血小板聚集实验结果 在 ADP 组以外,所有组别的最大血小板聚集率与生理盐水组相比,均有统计学意义($P < 0.01$,见表 2)。

表 2 ADP 诱导的血小板(PLT)聚集作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量	1min	5min	MAX	PLT 聚集抑制率(%)
生理盐水	2mL	35.83 ± 5.74	64.44 ± 9.25	66.98 ± 10.35	0.00%
百裕 + 阿司匹林	0.51mL/kg + 5.13mg/kg	40.83 ± 6.72	57.14 ± 6.62	62.08 ± 6.55	7.32%
百裕 + 氯吡格雷	0.51mL/kg + 3.85mg/kg	42.57 ± 6.42	41.41 ± 6.80	51.06 ± 6.61**	23.76%
阿司匹林 + 氯吡格雷	5.13mg/kg + 3.85mg/kg	24.06 ± 5.11**	37.12 ± 5.60**	41.44 ± 6.29**	38.13%

与生理盐水组比较,** $P < 0.01$ 。

2.1.3 PAF 诱导的血小板聚集实验结果 在 PAF 诱导下,除了阿司匹林与氯吡格雷联用组外,所有组别的最大血小板聚集率与生理盐水组相比,均有统计学意义($P < 0.01$)。百裕银杏内酯注射液与阿司匹林联用组的 PLT 抑制率最高(52.01%,见表 3)。

表 3 PAF 诱导的血小板(PLT)聚集作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量	1min	5min	MAX	PLT 聚集抑制率(%)
生理盐水	2mL	36.75 ± 6.16	68.43 ± 9.11	70.24 ± 11.45	0.00%
百裕 + 阿司匹林	0.51mL/kg + 5.13mg/kg	31.34 ± 6.59	32.65 ± 7.26**	33.70 ± 7.62**	52.01%
百裕 + 氯吡格雷	0.51mL/kg + 3.85mg/kg	40.40 ± 7.39	41.52 ± 7.32**	42.29 ± 7.58**	39.77%
阿司匹林 + 氯吡格雷	5.13mg/kg + 3.85mg/kg	35.60 ± 6.08	65.46 ± 9.55	66.37 ± 9.50	5.51%

与生理盐水组比较,** $P < 0.01$ 。

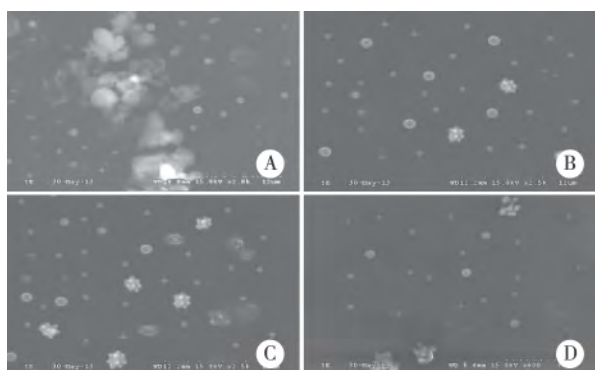
2.2 血小板电镜检测结果 通过 2000 倍扫描电镜,呈现出 4 种血小板形态:圆形、树形、展平形和聚集形。在 PAF 诱导下,百裕银杏内酯注射液与阿司匹林、氯吡格雷联用组,血小板大小比较一致,表面比较光滑,较少见到聚集型血小板。生理盐水组的

血小板发生强烈激活,表现为:血小板粘附力变强,有的血小板可粘附红细胞;血小板体积增大、形态不规则;呈芽孢状突出的伪足增多;聚集形血小板数量增多。阿司匹林与氯吡格雷联用组血小板大小不一,表面有伪足,聚集型血小板较多(见表 4 图 1)。

表 4 加入 PAF 后各组血小板形态比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血小板形态(%)			
	圆形	树形	展平形	聚集形
生理盐水	3.4 ± 0.8	7.6 ± 2.6	12.0 ± 3.2	77.0 ± 18.5
百裕 + 阿司匹林	34.0 ± 11.5**	14.7 ± 9.2*	23.6 ± 8.2**	27.7 ± 12.5**
百裕 + 氯吡格雷	35.9 ± 11.7**	20.4 ± 9.5**	15.3 ± 8.6	28.4 ± 10.7**
阿司匹林 + 氯吡格雷	4.8 ± 1.0	11.3 ± 4.7	20.6 ± 6.5**	63.3 ± 16.0

与生理盐水组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。



A: 生理盐水组; B: 百裕 + 阿司匹林组; C: 百裕 + 氯吡格雷组; D: 阿司匹林 + 氯吡格雷组。

图 1 加入 PAF 后各组血小板形态电镜图($\times 2000$)

2.3 血小板 PF-4 和 β -TG 检测结果 与生理盐水组相比,百裕银杏内酯注射液与阿司匹林、氯吡格雷联用组 PF-4 水平显著降低($P < 0.01$), β -TG 水平也显著降低($P < 0.01$)。PF-4 和 β -TG 水平降低,说明血小板释放功能受到抑制(见表 5)。

表 5 血小板 PF-4 和 β -TG 检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	PF-4($\mu\text{g/mL}$)	β -TG($\mu\text{g/mL}$)
生理盐水	1.748 ± 0.286	1.735 ± 0.276
百裕 + 阿司匹林	1.254 ± 0.169**	1.216 ± 0.134**
百裕 + 氯吡格雷	1.268 ± 0.151**	1.242 ± 0.150**
阿司匹林 + 氯吡格雷	1.631 ± 0.245	1.652 ± 0.243

与生理盐水组比较,** $P < 0.01$ 。

3 讨论

如今中国逐渐步入老龄化,血栓栓塞性疾病发病率呈上升趋势。在防治各种血栓相关的疾病方面,抗血小板聚集药物发挥着非常重要的作用。

血小板首先被激活是血栓形成的关键及始动机制,只有激活的血小板才会发生聚集随后形成血栓。血小板激活的诱导剂及途径较多,主要有: PAF、AA、ADP、5-羟色胺(5-HT)、前列腺素 G_2 、 $CaCl_2$ 、前列腺素 H_2 等^[2]。临床最常见及重要的抗血小板途径有以阿司匹林为代表的 AA 途径、以氯吡格雷为代表的 ADP 途径及银杏内酯为代表的 PAF 途径^[3]。联用抗血小板药治疗能够不同程度降低血小板聚集情况。目前已有研究证实阿司匹林和氯吡格雷联用对抗血小板聚集,具有协同作用^[4]。阿司匹林主要通过抑制环氧化酶(COX)不可逆地抑制血小板血栓素 A_2 (TXA_2) 的合成^[5]。氯吡格雷通过改变血小板膜结构,阻断纤维蛋白原与膜上糖蛋白 IIb/IIIa 的相互作用,从而抑制 ADP 诱发的血小板聚集^[6]。之前本课题组已做了研究,证实百裕银杏内酯主要是通过 PAF 途径发挥抗血小板聚集作用的,无 ADP 拮抗作用,该结果与报道相一致^[7]。

通过前期我们进行的实验^[8],我们发现:单用 0.51 mL/kg 剂量的百裕银杏内酯注射液对 AA、ADP 及 PAF 的 PLT 抑制率分别为 25.51%、13.87% 和 39.18%,通过本实验,我们发现:当百裕银杏内酯与阿司匹林联用后,显著提高了 AA 及 PAF 诱导下的血小板聚集抑制率;当百裕银杏内酯和氯吡格雷联用后,显著提高了 ADP 及 PAF 诱导下的血小板聚集抑制率;说明当 PAF 诱导后,百裕银杏内酯与阿司匹林和氯吡格雷联用均能起到协同作用,更能同时有效地拮抗 PAF 引起的血小板聚集情况,使抗血小板效果更为显著,另外明显地减少了电镜下激活的血小板细胞数量。

同为血小板特异蛋白的 PF-4(血小板第4因子)和 β -TG(血小板血栓球蛋白)存在于血小板的 α 颗粒内。当某种因素刺激血小板时,血小板被激活释放出 PF-4 和 β -TG^[9]。血小板被激活时, β -TG 高值和 β -TG/PF-4 比率升高; β -TG 和 PF-4 同时升高时,试管内(in vitro)血小板被激活的可能性较大^[10]。通过本实验发现,百裕银杏内酯与其他药物联用后均对 PAF 诱导后的血小板 PF-4 和 β -TG 水平有明显的抑制作用,且 β -TG/PF-4 比率较低,而单独联用阿司匹林和氯吡格雷却无此作用,该组 β -TG 和 PF-4 同时升高,说明出现了试管内血小板被激活的情况。

本基础实验的研究,对临床的抗血小板药物的选择及应用有重要的价值:在临床上,病人往往因为某些血栓性疾病需要长期服用阿司匹林和氯吡格雷,当两者联用后能有效抑制 AA 和 ADP 途径引起的血小板聚集情况。但是,有一部分病人会出现抵抗现象,使用阿司匹林和氯吡格雷无效,这可能与 AA 和 ADP 受体长期受到抑制后,受体上调,降低药物敏感性相关。当选用阿司匹林或氯吡格雷所产生的抗凝作用不明显的时候,因百裕银杏内酯的抗血小板作用途径不同于阿司匹林及氯吡格雷,可以考虑通过 PAF 途径进行治疗。本实验也证实了百裕银杏内酯注射液与阿司匹林和氯吡格雷联用后,其抗 PAF 诱导的血小板聚集效应明显,可作为临床用药参考。PAF 途径的药物研发为临床上抗血小板聚集用药提供了更多的机会。

【参考文献】

- [1] 沈嘉. 特异性 PAF 受体拮抗剂——银杏内酯 B 在 PAF 研究、药理研究和临床上的应用[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(1): 63-67.
- [2] Guerrero A T, Zarpelon A C, Vieira S M et al. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2013, 386(1): 51-59.
- [3] Stafforini D M, McIntyre T M. Determination of phospholipase activity of PAF acetylhydrolase[J]. Free Radic Biol Med 2013, 59: 100-107.
- [4] Singh P, Singh I N, Mondal S C et al. Platelet-activating factor (PAF) - antagonists of natural origin[J]. Fitoterapia 2013, 84: 180-201.
- [5] Patrono C, Renda G. Platelet activation and inhibition in unstable coronary syndromes[J]. Am J Cardiol, 1997, 80(5A): 17E-20E.
- [6] Gentm. Benefit of clopidogrel in patient with coronary disease[J]. Circulation, 1997, 96: 1-467.
- [7] Wang H, Qiu X Y, Yang L S. Experimental research on effects of ginkgolides made in China on cerebral ischemia injury in rats[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2002, 8(6): 17-18.
- [8] 徐露, 黄彦. 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[J]. 中国中医急症, 2014, 23(4): 638-643.
- [9] Madgula V L, Avula B, Yu Y B. et al. Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: in vitro and in vivo approaches[J]. Planta Med, 2010, 76(76): 599-606.
- [10] Kasperska-Zajac A. Recovery of platelet factor 4 (PF-4) and beta-thromboglobulin (β -TG) plasma concentrations during remission in patients suffering from atopic dermatitis[J]. Platelets 2010, 21(21): 522-524.

[收稿 2014-10-17; 修回 2014-12-02]

(编辑: 谭秀荣)