

银杏内酯注射液和银杏内酯 ABC 对血小板活化因子诱导的家兔血小板聚集作用比较

季传平¹, 徐露², 李慧琴¹

1. 成都百裕制药股份有限公司, 四川 成都 610000

2. 重庆医科大学 生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016

摘要: 目的 观察银杏内酯注射液、银杏内酯 ABC 以及银杏叶提取物注射液 (EGb761) 对家兔血小板聚集功能、超微结构及 PF-4 和 β -TG 含量的影响比较。方法 将日本大耳兔分为对照 (生理盐水) 组、EGb761 (1.02 mL/kg) 组、银杏内酯 ABC (5.13 mg/kg) 组、银杏内酯注射液 (1.02 mL/kg, 以萜内酯计 5.1 mg/kg) 组、白果内酯 (5.13 mg/kg) 组, 分别 iv 相应药物 1 周。给药结束后, 家兔心脏取血, 观察 PAF 诱导下血小板聚集率; 电镜观察血小板超微结构; 试剂盒法观察 PAF 诱导下血清中血小板因子-4 (PF-4) 和 β -血小板球蛋白 (β -TG) 含量。结果 与对照组比较, EGb761 组、银杏内酯 ABC 组、银杏内酯注射液组血小板聚集率均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 白果内酯组无显著变化; 血小板聚集抑制率: 银杏内酯注射液 (43.76%) > 银杏内酯 ABC (35.3%) > EGb761 (26.52%) > 白果内酯 (5.48%)。与对照组比较, EGb761、银杏内酯 ABC、银杏内酯注射液均能减少聚集型血小板数量, 使树突型血小板突起变少变短。与对照组比较, 银杏内酯注射液和银杏内酯 ABC 均使 PF-4 和 β -TG 表达显著降低 ($P < 0.01$), EGb761 仅显著降低 β -TG 表达 ($P < 0.05$)。结论 银杏内酯注射液通过 PAF 途径发挥抗血小板聚集作用, 其作用强于银杏内酯 ABC, 可能是白果内酯发挥了协同增效作用。

关键词: 血小板活化因子 (PAF); 银杏内酯注射液; 银杏内酯 ABC; 白果内酯; 血小板因子-4 (PF-4); β -血小板球蛋白 (β -TG)

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 07- 1174 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.002

Comparison of effects of Ginkgolide Injection and Ginkgolide A, B, and C on platelet aggregation induced by PAF in rabbits

Ji Chuanping¹, XU Lu², LI Huiqin¹

1. Chengdu Baiyu Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 610000, China

2. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To observe the effects of Ginkgolide Injection, ginkgolide ABC and ginkgo biloba extract (EGb761) on platelet aggregation function, ultrastructure, and contents of PF-4 and β -TG in rabbits. **Methods** Rabbits were divided into control (physiological saline) group, EGb761 (1.02 mL/kg) group, ginkgolide ABC (5.13 mg/kg) group, Ginkgolide Injection (1.02 mL/kg, as terpene lactones 5.1 mg/kg) group, and bilobalide (5.13 mg/kg) group, respectively. The corresponding drugs were iv injected for one week respectively. After administration, the blood was taken in the heart of rabbits. The platelet aggregation rate induced by platelet activating factor (PAF) was observed, and the ultrastructure of the platelets was observed by electron microscope, and the content of platelet factor-4 (PF-4) and beta thromboglobulin (β -TG) in serum induced by PAF was observed by the kit method. **Results** Compared with control group, the platelet aggregation rates in group EGb761, ginkgolide ABC, and Ginkgolide Injection were significantly decreased ($P < 0.05$ and 0.01), and no significant changes were found in the group of bilobalide. The inhibition rate of platelet aggregation was Ginkgolide Injection (43.76%) > ginkgolide ABC (35.3%) > EGb761 (26.52%) > bilobalide (5.48%). Compared with control group, EGb761, ginkgolide ABC and Ginkgolide Injection could reduce the number of aggregated platelets and make dendritic protrusions shorter; Ginkgolide Injection and ginkgolide ABC significantly decreased the expression of PF-4 and β -TG ($P < 0.01$), and EGb761 only decreased the expression of β -TG ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginkgolide injection plays an anti-platelet aggregation effect through PAF pathway with better effect than ginkgolide ABC, which may be that ginkgolide plays a synergistic effect.

Key words: platelet activating factor (PAF); Ginkgolide Injection; ginkgolide ABC; bilobalide; PF-4; β -TG

收稿日期: 2018-05-21

第一作者: 季传平, 研究方向为预防医学。E-mail: 41159399@qq.com

银杏内酯注射液, 由成都百裕制药股份有限公司生产, 具有活血化瘀、通经活络的功能主治^[1], 其有效成分是白果内酯和银杏内酯 A、B、C。著名 Nakanishi K 在德国《应用化学》中明确指出^[2]: 白果内酯和银杏内酯是银杏叶的核心药效成分。银杏内酯早在 1985 年已被发现是血小板活化因子(PAF)受体的拮抗剂, 且银杏内酯 B 活性最强^[3]。白果内酯具有神经血管保护作用^[4-5], 但是对 PAF 拮抗作用报道较少。

前期研究证明^[6], 银杏内酯注射液能够抑制家兔中 PAF 诱导的血小板聚集, 抑制血小板活化, 且高剂量 1.02 mL/kg 作用最强。本研究旨在观察银杏内酯注射、银杏内酯 ABC、银杏叶提取物注射液(金纳多, EGb761)对 PAF 诱导的血小板聚集的效果及抑制率比较, 研究白果内酯和银杏内酯是否具有协同抗 PAF 作用。

1 材料

1.1 实验动物

日本大耳白兔 32 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, 实验动物生产许可证号为 SCXK(渝)2017-0001。

1.2 药物及主要试剂

银杏内酯注射液(规格 2 mL/支, 萜内酯 10 mg, 批号 20120303, 主要成分是 48%白果内酯和 51%银杏内酯 ABC)、银杏内酯 ABC(批号 20130325, 其中银杏内酯 A 23%、银杏内酯 B 67%、银杏内酯 C 10%)、白果内酯(批号 20130311), 均购自成都百裕制药股份有限公司。EGb761(阳性药, 银杏叶标准提取物, 购于台湾济生化学制药厂股份有限公司, 规格 5 mL:17.5 mg, 批号 G3230, 其有效成分为 24%的黄酮甙、6%的萜内酯类, 其中银杏内酯 3.1%)。

PAF(cayman, 批号 011219), 溶解在 pH 7.6 的含 0.25%小牛血清蛋白的 Tris-NaCl 溶液中, 终浓度为 3.6 nmoL/L; 枸橼酸钠(北京中杉金桥生物技术公司, 批号 20130117), 蒸馏水配成 3.8%的浓度; 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)。

1.3 主要仪器

TYXN-96 多功能智能血液凝聚仪(上海通用技术研究所研制); 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)。

2 方法

2.1 分组及给药方法

健康日本大耳白兔 40 只, 随机分为 5 组, 每组 8 只: 对照组、银杏内酯注射液组、EGb761 组、银杏内酯 ABC 组、白果内酯组。银杏内酯注射液按照 1.02 mL/kg 剂量(以萜内酯计 5.1 mg/kg) iv 给药, 银杏内酯 ABC 按照 5.13 mg/kg 的剂量 iv 给药, EGb761 按 1.02 mL/kg 的剂量 iv 给药, 白果内酯按照 5.13 mg/kg 的剂量 iv 给药, 对照组 iv 给予 0.9% 氯化钠注射液, 每天给药 1 次, 连续给药 7 d。

2.2 血小板聚集率检测

给药 7 d 后, 每只家兔心脏取血 10.5 mL, 分出 1.5 mL 血浆用于 PF-4 和 β-TG 含量的测定; 其余 9 mL 血浆用 3.8%枸橼酸钠 1:9 抗凝, 800 r/min 转速离心 10 min, 留取上清液, 该上清液为富血小板血浆(PRP); 分出 100 μL PRP 用于电镜检查, 其余 PRP 用于血小板聚集率的检测; 剩余部分 3 000 r/min 离心 15 min, 取贫血小板血浆(PPP)。用 PPP 调节 PRP, 使 PRP 血小板数目在 360×10⁹/L。测定并记录 1 μL PAF 诱导下 PRP 中的 1、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=(对照组最大血小板聚集率-测验组最大血小板聚集率)/对照组最大血小板聚集率

2.3 血小板电镜观察

将分离出的 100 μL PRP 置于硅化 EP 管中, 加入 1 μL 的 PAF 诱导血小板的聚集, 作用 15 min 后, 将 PRP 置于铺有 Formar 膜的铜网样品托上, 37 °C 孵育 10 min, 超纯水冲洗, 3%戊二醛固定 5 min, 再用超纯水冲洗干净, 待铜网上的标本自然干燥后, 在其表面镀一层 20 nm 的金膜, 电子显微镜 S-3000N 扫描观察细胞形态, 观察 100 个血小板, 计算各型血小板所占比例。电镜下血小板分型包括: (1) 圆形: 呈圆形或椭圆形, 体积小, 中央致密, 核心大, 周边透明带低窄。(2) 树形: 从中央致密区发出单个或多个足突, 细长或片状, 有时有分枝。(3) 展平形: 中央有致密核心, 外围透明带较宽, 周边光滑或有小的突起。(4) 聚集形: 常由数个至几十个血小板组成, 聚集体大小不等, 其中可见血小板相互连接, 有的完整融合成一体, 外周部血小板足突明显。

2.4 血清中 PF-4 和 β-TG 含量测定

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 °C 静置 4 h, 取 200 μL

血清,进行检测。具体操作按照试剂盒说明书进行,酶标仪读取结果数据。

2.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,采用两样本均数比较的 *t* 检验对各组血小板聚集率、血小板形态百分数及 PF-4 和 β -TG 含量进行统计学分析。

3 结果

3.1 血小板聚集实验

在 PAF 诱导下,与对照组比较,EGb761 组、银杏内酯 ABC 组、银杏内酯注射液组血小板聚集率均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$);而白果内酯组与对照组比较无统计学差异。结果表明,银杏内酯注射液组、银杏内酯 ABC 和 EGb761 组均对 PAF 诱导的血小板聚集产生抑制作用,血小板聚集抑制

率:银杏内酯注射液 (43.76%) > 银杏内酯 ABC (35.3%) > EGb761 (26.52%) > 白果内酯 (5.48%)。结果见表 1。

3.2 血小板电镜检测结果

在 2 000 倍的扫描电镜下主要观察到 4 种血小板形态:圆形、树形、展平形和聚集形。在 PAF 诱导下,EGb761 组、银杏内酯注射液组、银杏内酯 ABC 组血小板大小较一致,表面光滑,聚集型血小板较少见。对照组和白果内酯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。结果见图 1。

通过计数分析,与对照组比较,EGb761、银杏内酯 ABC、银杏内酯注射液组圆形、展平行血小板比例显著增加 ($P < 0.05, 0.01$),聚集形显著降低 ($P < 0.01$),结果见表 2。

表 1 PAF 诱导的血小板聚集作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Platelet aggregation induced by PAF ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	1 min 血小板聚集率/%	5 min 血小板聚集率/%	最大血小板聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
对照	—	36.85±6.14	68.32±9.17	70.22±11.40	—
EGb761	1.02 mL·kg ⁻¹	30.51±5.30*	48.48±8.79**	51.60±8.44**	26.52
白果内酯	5.13 mg·kg ⁻¹	35.60±6.08	65.46±9.55	66.37±9.58	5.48
银杏内酯 ABC	5.13 mg·kg ⁻¹	26.37±5.89**	40.67±8.48**	45.43±7.49**	35.30
银杏内酯注射液	5.10 mg·kg ⁻¹	24.42±5.04**	30.84±7.22**	39.49±7.38**	43.76

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

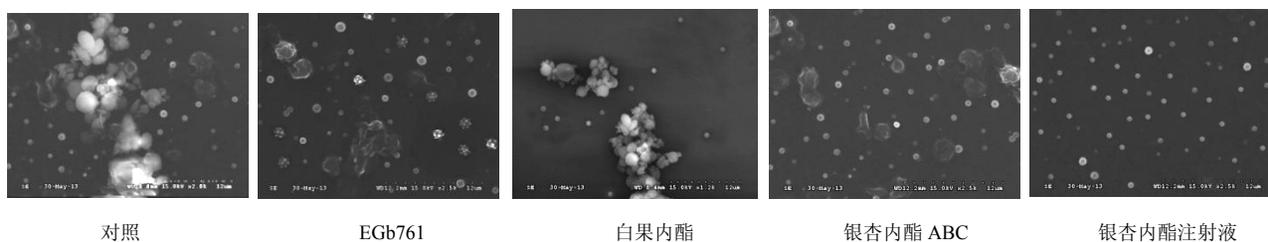


图 1 加入 PAF 后各组血小板形态电镜图 ($\times 2000$)

Fig. 1 Platelet ultrastructure of each group induced by PAF ($\times 2000$)

表 2 加入 PAF 后各组血小板形态比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of platelet morphology of each group induced by PAF ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	血小板形态/%			
		圆形	树形	展平形	聚集形
对照	—	3.2±0.8	7.5±2.4	11.8±3.2	77.5±18.5
EGb761	1.02 mL·kg ⁻¹	19.2±9.6**	23.4±9.0**	35.8±11.0**	21.6±10.4**
白果内酯	5.13 mg·kg ⁻¹	4.8±1.0	11.3±4.7	20.6±6.5**	63.3±16.0
银杏内酯 ABC	5.13 mg·kg ⁻¹	15.1±8.3**	12.6±6.8*	23.3±7.0**	49.0±15.2**
银杏内酯注射液	5.10 mg·kg ⁻¹	40.7±15.3**	10.5±6.0	18.7±7.8*	30.1±10.0**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.3 血小板 PF-4 和 β -TG 检测结果

与对照组比较, 银杏内酯 ABC 及银杏内酯注射液组 PF-4 水平显著降低 ($P < 0.01$); EGb761、

银杏内酯 ABC 及银杏内酯注射液 β -TG 水平也显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.05)。PF-4 和 β -TG 水平降低, 说明血小板释放功能受到抑制。见表 3。

表 3 血小板 PF-4 和 β -TG 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Determination of PF-4 and β -TG ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	PF-4/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	β -TG/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	—	1.733 \pm 0.294	1.740 \pm 0.215
EGb761	1.02 mL \cdot kg $^{-1}$	1.525 \pm 0.170	1.472 \pm 0.153*
白果内酯	5.13 mg \cdot kg $^{-1}$	1.489 \pm 0.228	1.504 \pm 0.244
银杏内酯 ABC	5.13 mg \cdot kg $^{-1}$	1.270 \pm 0.186**	1.394 \pm 0.176**
银杏内酯注射液	5.10 mg \cdot kg $^{-1}$	1.177 \pm 0.144**	1.129 \pm 0.158**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

动脉粥样硬化、动脉血栓及其他的心脑血管疾病的发生发展都与血小板的活化相关, 因此抗血小板聚集药物在防治相关疾病中发挥着越来越重要作用^[7]。常见的抗血小板途径有: 花生四烯酸 (AA)、二磷酸腺苷 (ADP) 和 PAF 途径。AA 途径代表药物阿司匹林主要通过抑制环氧化酶, 不可逆地抑制血小板血栓 A2 (TXA2) 的合成; ADP 途径的代表药物氯比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^[8]。阿司匹林和氯吡格雷被多个指南推荐并广泛用于临床, 但部分病人会发生抵抗, 使用阿司匹林和氯吡格雷效果不明显, 且增加卒中严重性和梗死面积^[9-10], 这就需要考虑选择替代药物或联合用药。

PAF 是 1972 年由 Benveniste 等^[11]发现, 是一种具有生物活性的脂质递质, 在体内有着类似激素的生物活性, 它存在于血小板聚集机制的最前端, 是不依赖 AA 和 ADP, 诱导血小板聚集的第 3 条途径^[12]。早前研究发现, 银杏内酯是 PAF 的拮抗剂, 其中银杏内酯 B 活性最强。而本实验发现, 银杏内酯注射液 (48%白果内酯和 51%银杏内酯 ABC, 以萜类内酯计剂量为 5.1 mg/kg) 通过 PAF 途径发挥抗血小板聚集作用, 作用强于银杏内酯 ABC (剂量为 5.13 mg/kg) 及银杏提取物, 从而证明白果内酯与银杏内酯 ABC 具有协同增效作用, 这与 Maerz 等^[13]结果一致, 表明了协同作用机制可能是白果内酯剂量依赖性地下调 PAF 受体 mRNA 的表达, 而不影响 PAF 乙酰水解酶, 从而整体下调 PAF 的信号

转导作用。此外本次研究结果显示, 银杏内酯注射液对 PAF 诱导后的血小板 PF-4 和 β -TG 水平有明显的抑制作用。而 EGb761 降低 β -TG 作用不明显。PF-4 和 β -TG 均存在于血小板 α 颗粒内, 当血小板受到刺激被激活时从血小板中释放出来。 β -TG 和 PF-4 同时升高时, 说明试管内血小板被激活的可能性较大。综上所述, 银杏内酯能显著抑制 PAF 诱导的血小板激活, 作用强于银杏内酯 ABC, 可能是白果内酯发挥了协同增效作用。另外, 之前本课题组已做了研究, 证实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^[14]。

动物研究显示, 脑缺血发生后 PAF 大量产生, 较对照组升高近 20 倍^[15]; Satoh 等也发现缺血性脑卒中患者 PAF 含量较健康对照组明显升高^[16], 提示病理状态下 PAF 大量产生。以上研究表明, 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和选择, 但仍需更多研究来进一步证实 PAF 途径是否会降低出血风险从而带来更大的获益。

参考文献

- [1] 张学非, 曹泽斌, 许治良, 等. 银杏内酯治疗脑缺血作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2943-2948.
- [2] Strømgaard K, Nakanishi K. Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba* [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43(13): 1640-1658.
- [3] Braquet P, Spinnewyn B, Braquet M, et al. BN 52021 and related compounds: A new series of highly specific PAF-acether receptor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L. [J]. Blood vessels, 1985, 16: 558-572.

- [4] DeFeudis F V. Bilobalide and neuroprotection [J]. *Pharmacol Res*, 2002, 46(6): 565-568.
- [5] 李思佳, 耿剑亮, 张悦, 等. 银杏药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(6): 731-741
- [6] 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(04): 638-639, 643.
- [7] 乔文豪, 王秀, 王佳丽, 等. 抗血小板药物药理作用和临床应用的研究进展 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(9): 1621-1625.
- [8] Yasmina A, de Boer A, Klungel O H, et al. Pharmacogenomics of oral antiplatelet drugs [J]. *Pharmacogenom*, 2014, 15(4): 509-528.
- [9] Lev E I, Patel R T, Maresh K J, et al. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(1): 27-33.
- [10] Oh M S, Yu K H, Lee J H, et al. Aspirin resistance is associated with increased stroke severity and infarct volume [J]. *Neurology*, 2016, 86(19): 1808-1817.
- [11] Benveniste J, Henson P M, Cochrane C G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelet, the role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor [J]. *J Exp Med*, 136(6): 1356-1377.
- [12] Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice [J]. *Prog Lipid Res*, 2000, 39(1): 41-82.
- [13] Maerz S, Liu C H, Guo W, et al. Anti-ischaemic effects of bilobalide on neonatal rat cardiomyocytes and the involvement of the platelet-activating factor receptor [J]. *Biosci Rep*, 2011, 31: 439-447.
- [14] 徐露, 张太君. 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 [J]. *遵义医学院学报*, 2015, 38(1): 25-28.
- [15] Lindsberg P J, Yue T L, Frerichs K U, et al. Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits [J]. *Stroke*, 1990, 21(10): 1452-1457.
- [16] Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, et al. Increased levels of blood platelet-activating factor (PAF) and PAF-like lipids in patients with ischemic stroke [J]. *Acta Neurol Scand*, 1992, 85(2): 122-127.