

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.02.001

·专题·

莫诺昔对二磷酸腺苷诱导局灶性脑缺血再灌注大鼠血小板聚集的影响

程华¹, 孙芳玲¹, 王晓锋^{1,2}, 艾厚喜¹, 张丽¹, 陈乃宏², 王文¹

[摘要] 目的 观察莫诺昔对二磷酸腺苷(ADP)诱导的局灶性脑缺血再灌注大鼠血小板聚集指数的影响。方法 用线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。将 48 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 莫诺昔低、中、高剂量组(30 mg/kg、90 mg/kg、270 mg/kg)和阿司匹林组(10 mg/kg)。利用透光比浊法检测大鼠血小板聚集率。结果 与模型组相比, 高剂量莫诺昔组血小板最大聚集率显著降低($P<0.001$)。结论 莫诺昔具有抑制血小板聚集的作用。

[关键词] 莫诺昔; 二磷酸腺苷; 血小板聚集; 缺血/再灌注; 大鼠

Effect of Morroniside on Platelet Aggregation in Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats CHENG Hua, SUN Fang-ling, WANG Xiao-feng, et al. Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract: Objective To explore the effects of morroniside on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) in focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. **Methods** 48 Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group, model group, morroniside dose groups (30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg) and acetyl salicylic acid (ASA) group (10 mg/kg). The model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established in all rats except the sham group. Born's turbidimetry was used to measure platelet aggregation rate in rats of MCAO model (in vivo). **Results** Compared with the model group, the platelet aggregation decreased significantly in the morroniside high dose group ($P<0.001$). **Conclusion** Morroniside has the effect of anti-platelet aggregation in focal cerebral ischemia/reperfusion in rats.

Key words: morroniside; adenosine diphosphate; platelet aggregation; ischemia/reperfusion; rats

[中图分类号] R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)02-0101-03

[本文著录格式] 程华, 孙芳玲, 王晓锋, 等. 莫诺昔对二磷酸腺苷诱导局灶性脑缺血再灌注大鼠血小板聚集的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(2): 101-103.

我国脑卒中发病率居世界第一, 在我国居民死亡原因中位居首位, 为家庭和社会造成沉重的负担。缺血性脑损伤是脑卒中最常见的类型, 其病理机理复杂, 一直是神经科学领域研究的热点。缺血性脑损伤会导致血管内皮细胞损伤, 从而增加血小板相应受体的表达, 使血小板功能亢进, 形成血栓。因此, 抗血小板聚集、抗血栓治疗在预防缺血性脑损伤和急性心肌梗死等方面占据着不容忽视的地位。

中药山茱萸是山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉, 具有补肝益肾、涩精固脱的作用。本实验室对其有效成分山茱萸环烯醚萜苷进行进一步分离, 得到单体化合物莫诺昔(morroniside)。我们的前期研究发现, 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠具有神经保护作用^[1-5], 能减小脑梗死体积^[2], 增强皮层抗氧化^[3]、抗炎^[4]和抗凋亡能力^[5];

并在体外实验发现莫诺昔对二磷酸腺苷(ADP)诱导的家兔血小板聚集有一定作用^[6]。本文旨在探讨莫诺昔在体抗局灶性脑缺血大鼠血小板聚集的作用, 以便全面了解莫诺昔的药理作用, 深入探讨其治疗局灶性脑缺血的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只, 体重 260~280 g, 平均(260±20) g, 解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(军)2007-004。

1.2 药物

莫诺昔: 由本室从山茱萸中提取制备, 采用高效液相分析, 纯度约 98.5%, 蒸馏水溶解配制新鲜溶液; 阿司匹林(acetyl salicylic acid, ASA): SIGMA 公司, 蒸馏水溶解, 0.1 mol/L NaHCO₃调 pH 至 7.0。

基金项目: 1. 科技部“十二五”重大创新药专项(No. 2012ZX09102-201-016); 2. 国家自然科学基金(No. 81173575); 3. 国家自然科学基金(No. 30740053); 4. 北京市自然科学基金(No. 7062031); 5. 北京市教委科研基地-科技创新平台(No. 111219); 6. 北京市卫生系统高层次卫生技术人才(No. 2011-3-097)。

作者单位: 1. 首都医科大学宣武医院药物研究室, 北京市 100053; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京市 100050。作者简介: 程华(1988-), 女, 苗族, 贵州思南县人, 硕士研究生, 主要研究方向: 神经药理与中药药理。通讯作者: 王文。

1.3 试剂和仪器

二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP): SIG-MA 公司, 配制成 7.5 mg/ml 储存液, -20 ℃密封冻存, 使用终浓度为 10 μmol/L。SC-2000 高性能四通道血小板聚集仪: 北京赛科希德公司; Microfuge 低温离心机: 美国 Beckman 公司。

1.4 方法

1.4.1 模型制备 采用 Longa 等^[7]所介绍的大脑中动脉线栓模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)并稍加改进。大鼠术前禁食 12 h。10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 颈正中中线切口, 沿胸锁乳突肌分离肌肉和筋膜, 暴露右侧颈总动脉。分离右侧颈外动脉和颈内动脉。于近心端结扎颈总动脉, 且在颈总动脉分岔处结扎颈外动脉。动脉夹夹闭颈内动脉, 在近心端距颈总动脉分岔约 4 mm 处用眼科剪剪一斜行细小动脉切口, 将直径 0.28 mm 的栓线从颈总动脉插入颈内动脉约 18 mm, 此时栓线已进入大脑中动脉, 到达大脑前动脉起始部, 阻断大脑中动脉的所有血供, 造成大脑中动脉供血相关区的梗死灶。栓塞 30 min 后缓慢拔出栓线, 实现再灌注。假手术组 8 只大鼠除插入栓线深度为 10 mm 外, 其余操作与造模大鼠相同。

1.4.2 分组及给药 大鼠苏醒后提尾时出现对侧前肢内收屈曲, 爬行时向对侧转圈, 站立时向对侧倾倒等症状即为 MCAO 模型成功。随机将 MCAO 成模大鼠分为: 模型组, 莫诺昔低、中、高剂量组(30 mg/kg、90 mg/kg、270 mg/kg)和 ASA 组(10 mg/kg), 每组 8 只。采用灌胃给药, 每天 1 次, 连续给药 7 d。假手术组和模型组给予蒸馏水灌胃。

1.4.3 最大聚集率的测定 取末次给药后完成神经行为学评分的大鼠, 用 10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉, 腹主动脉采血, 与 3.8%枸橼酸钠按 9: 1(V/V)混匀, 230 g 离心 10 min 后取上清液即得富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP), 将剩余血液以 800 g 离心 10 min 后去上清液即得去血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP), 用 PPP 将 PRP 调为(400~500)×10⁹/L^[8]。各组 PRP 37 ℃恒温孵育 5 min, 测定时分别加入诱导剂 ADP(终浓度 10 μmol/L), 以 SC-2000 血小板聚集仪, 按透光比浊法^[9]测定 3 min 内血小板最大聚集率。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计处理。方差

齐性检验后, 采用单因素方差分析进行组间差异比较, 显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

与假手术组相比, 模型组血小板聚集率显著升高($P<0.001$)。莫诺昔灌胃用药 7 d, 中剂量组有抑制血小板聚集的趋势, 但与模型组比较无显著性差异($P>0.05$); 而莫诺昔高剂量组血小板聚集率与模型组比较显著降低($P<0.001$)。与模型组相比, ASA 组血小板聚集率显著降低($P<0.001$)。见表 1。

表 1 莫诺昔对 MCAO 模型大鼠 ADP 诱导血小板聚集的影响

组别	n	浓度(mg/kg)	最大聚集率(%)
假手术组	8	蒸馏水	20.60±5.40
模型组	8	蒸馏水	46.05±10.86 ^a
莫诺昔低剂量组	8	30	50.51±3.65 ^b
莫诺昔中剂量组	8	90	40.49±5.05 ^c
莫诺昔高剂量组	8	270	29.33±6.67 ^d
ASA 组	8	10	20.50±2.69 ^e
F			74.971
P			0.000

注: 与假手术组比较, a: $P=0.000$; 与模型组比较, b: $P=0.754$; c: $P=0.511$; d: $P=0.000$; e: $P=0.000$ 。

3 讨论

脑卒中是继心脏病和癌症之后的全球第三大疾病, 其中缺血性脑血管病患者在脑卒中患者中占极大比例, 有着高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点, 给社会和家庭造成巨大负担。缺血性脑血管病主要是由于一条或多条脑内动脉被血栓阻塞, 最终导致局部或者全脑供血不足甚至完全中断, 进而引起脑组织缺血、缺氧, 甚至发生梗死等一系列异常的病理和生化变化。目前确切有效的治疗缺血性脑血管病的方法就是尽早溶栓^[10]。

血小板聚集功能在病理性血栓形成过程中起着重要的作用, 而 ADP 受体拮抗剂(氯吡格雷)、血栓素 A₂ 抑制剂(阿司匹林)、磷酸二酯酶抑制剂(双嘧达莫)、糖蛋白 II b/III a 受体抑制剂(替罗非班)等抗血小板聚集药物预防和治疗缺血性脑血管病的疗效已经得到临床证实。但此类药物选择性较差, 容易产生消化性溃疡、腹泻、头晕、皮疹等不同程度的不良反应。因此, 研制选择性高、不良反应少、作用强的新型抗血小板聚集药物成为了近年来药物研究的热点。

利用中医活血化瘀方剂来治疗脑血管病历史悠久, 其中一些中药有效成分及单体化合物如阿魏酸乙酯、莪术二酮、银杏内酯等已经被证实能够通过抑制

血小板聚集达到活血化瘀的疗效。

各种不同的内源性诱导剂如 ADP、血小板活化因子、花生四烯酸等均可诱导体内血小板聚集反应。前期实验表明,莫诺苷对 ADP 诱导血小板聚集的抑制作用选择性最强^[6]。血小板膜上有着丰富的表面 ATP 酶,是防止血小板凝聚所必须的。ADP 通过抑制表面 ATP 酶活性来使血小板发生聚集。另外 ADP 还可以使血小板暴露出磷脂表面,通过 Ca^{2+} 搭桥使血小板相互凝聚。本文采用 ADP 作为诱导剂诱导 MCAO 模型大鼠的血小板聚集,莫诺苷高剂量组(270 mg/kg)给药 7 d 可以显著降低 MCAO 模型大鼠的血小板聚集率,表明莫诺苷可能通过抑制血小板聚集发挥抗血栓作用。

由于体内血小板聚集进一步形成血栓的机制很复杂,莫诺苷抗血小板聚集治疗缺血性脑血管病的作用仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Wang W, Xu J, Li L, et al. Neuroprotective effect of morroniside on focal cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res Bull, 2010, 83(5): 196-201.
- [2] 刘秀平,许栋明,王文,等. 莫诺苷对大鼠局灶性脑缺血模型脑梗死体积的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(10): 913-915.
- [3] 艾厚喜,李蕾,许栋明,等. 莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层总抗氧化能力影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(9): 833-834.
- [4] 艾厚喜,汪莹,许栋明,等. 莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层 IL-1 β 的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(10): 928-930.
- [5] 汪莹,高东明,许栋明,等. 莫诺苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Caspase-3 活化程度的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(9): 801-802.
- [6] 王晓峰,陈乃宏,王文. 莫诺苷对家兔血小板聚集的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(11): 1029-1030.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Li HX, Han SY, Wang XW, et al. Effect of the carthamins yellow from *Carthamus tinctorius* L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 1797-1802.
- [9] Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets [J]. Physiology, 1963, 168: 178-195.
- [10] Lyden P, Lu M, Jackson C, et al. Underlying structure of the National Institutes of Health Stroke Scale: results of a factor analysis. NINDS tPA Stroke Trial Investigators [J]. Stroke, 1999, 30(11): 2347-2354.

(收稿日期:2012-09-05)