

龙蚕片对缺血性脑卒中大鼠的保护作用及机制研究

赵 瑞¹, 康晓刚^{2*} (1. 陕西省人民医院神经内一科, 西安 710068; 2. 空军军医大学西京医院神经内科, 西安 710032)

摘要:目的 观察龙蚕片(LCT)对缺血性脑卒中大鼠模型的保护作用及其作用机制。方法 ①采用光化学法建立大鼠缺血性脑卒中模型,观测 LCT 对大鼠行为学、脑含水量、脑梗死范围和脑组织病理学的影响;②采用大鼠双侧颈总动脉结扎法建立缺血性脑卒中模型,观测 LCT 对大鼠脑含水量及脑指数、毛细血管通透性及血清中细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)和 C-反应蛋白(CRP)的影响;③比较 LCT 处理前后对大鼠血小板聚集和黏附功能的影响。结果 ①对光化学法诱导模型的影响:LCT 高、中和低剂量组大鼠在 24 h 时行为状态与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),脑含水量明显低于模型组($P < 0.05$),病理学损害较轻。②对结扎法诱导模型的影响:与模型组比较,LCT 高、中和低剂量组能减少脑含水量及脑指数,可明显降低毛细血管通透性,差异有显著统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);LCT 高、中剂量组和阳性对照组均能显著降低血清中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);LCT 高、中和低剂量组的脑组织神经细胞浓缩及深染、神经胶质细胞肿胀及间质疏松程度均明显减轻;③LCT 灌胃给药后,能显著改善血小板聚集和黏附功能($P < 0.01$)。结论 LCT 对大鼠脑缺血有防治作用,可改善缺血性脑卒中大鼠的病理学损害,其作用机制可能是通过降低血清中细胞因子水平与毛细血管的通透性,减轻大鼠脑水肿以及改善大鼠血小板聚集和黏附功能等。

关键词:龙蚕片;缺血性脑卒中;细胞因子;大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1004-2407.2020.06.015

中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1004-2407(2020)06-0855-06

Protective effect of Longcan Tablets and its mechanism against ischemic stroke in rats

ZHAO Rui¹, KANG Xiaogang^{2*} (1. Department of Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Neurology, Xijing Hospital, the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To observe the protective effect of Longcan Tablets (LCT) and explore the mechanism against ischemic stroke in rats. Methods ①The model of ischemic stroke was established by photochemical method in rats, and the effects of LCT on behavior, brain water content, cerebral infarction area and histopathology were observed. ②The ischemic stroke model was established by bilateral common carotid artery ligation in rats, and the effects of LCT on brain water content, brain index, capillary permeability and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and C-reactive protein (CRP) were observed. ③The effects of LCT on platelet aggregation and adhesion were compared. Results ①The effect on photochemical induced model; the behavior of rats in LCT high, middle and low dose groups were significantly better than that of model group in 24 h ($P < 0.05$). The brain water contents of LCT high, middle and low dose groups were significantly lower than that of model group ($P < 0.05$), and the pathological damage were less than that of model group. ②The effects on the ligation induced model; compared with the model group, LCT high, middle and low dose groups could significantly reduce the brain water content and brain index, and significantly reduce the capillary permeability ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the contents of serum IL-6, IL-8 and TNF- α in LCT middle and high dose groups and the positive group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the brain tissue nerve cells of LCT high, middle and low dose groups were significantly lower than those of the model group, the degree of cell concentration and deep staining, the swelling of glial cells and the degree of interstitial porosity were significantly reduced. ③LCT could significantly improve platelet aggregation and adhesion function after intragastric administration ($P < 0.01$). Conclusion LCT has preventive and therapeutic effect on ischemic stroke in rats, and can improve the pathological damage of ischemic stroke rats. The mechanism of action may be related to reducing the level of serum cytokines and capillary permeability, reducing brain edema and improving platelet aggregation and adhesion function.

Key words: Longcan Tablets; ischemic stroke; cytokines; rat

缺血性脑卒中的发生由脑动脉血栓、动脉管腔狭窄、动脉粥样硬化、心源性栓子脱落、动脉粥样硬化斑块脱落和动脉炎等病因导致^[1]。针对此类疾病临床常采用控制病情、改善症状与康复治疗。龙蚕片(LCT)作为院内制剂临床应用多年,具有活血化瘀、

温经通络、祛风定惊及散结止痛等功效,对早期防治及改善脑血管疾病疗效显著,本研究运用大鼠缺血性脑卒中模型观察 LCT 对其防治作用,同时探讨其作用机制,为制剂的临床应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 独立换气笼盒饲养系统(IVC),上海绍丰实验动物设备有限公司;CBV-1500A 型高性能无菌实验台,上海瑞仰净化装备有限公司;HSC-2015L 型台式离心机,宁波新芝生物科技股份有限公司;

基金项目:陕西省重点研发计划项目(编号:2017ZDXM-SF-028)

作者简介:赵瑞,女,主治医师

* 通信作者:康晓刚,男,副主任医师

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>

Sartorius 电子天平,德国赛多利斯公司;LG-150 型冷光源,中科院西安光机所研制;XSN-R II 型血栓形成与血小板黏附两用仪,无锡电子仪器厂;PS24B 型双目体式显微镜,XN-2 型血液黏度自动计时仪和 BS631 型血小板聚集仪,均购自上海寰熙医疗器械有限公司。

1.2 试药 龙蚕片(LCT)药粉(批号 20181018),自制;消栓通络片(批号 20180906),吉林省正和药业集团股份有限公司;盐酸异丙肾上腺素注射液(ISO,批号 20181006,规格:2 mL:1 mg),上海禾丰制药有限公司;戊巴比妥钠(批号 180824),上海化学试剂厂;肝素钠(批号 20181012),上海山浦化工有限公司;白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)和 C 反应蛋白(CRP)测定试剂盒,均购自南京卡米洛生物工程有限公司;戊巴比妥钠(批号 180903),上海华蓝化学科技有限公司;虎红(批号 170612),北京索莱宝科技有限公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(批号 180816),青岛高科园海博生物技术有限公司;伊文思蓝(批号 E104208),二磷酸腺苷(批号 CB5741946),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

1.3 动物 SD 大鼠,体质量为 180~220 g,均由西安交通大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(陕)2017-002 号。

2 实验方法

2.1 LCT 对光化学法诱导的大鼠缺血性脑卒中模型的防治作用

2.1.1 大鼠的分组、造模及给药 取 SD 大鼠 60 只,随机分为假手术组(排除手术对实验的影响)、模型组(不给药,仅造模)、LCT 高、中、低剂量组(给予不同剂量 LCT 后造模)和阳性对照组(给予消栓通络片后造模),每组 10 只,各组灌胃给药 14 d,于末次给药后 1 h,除假手术组外其他各组均进行造模^[1]。大鼠给予 10 g·L⁻¹戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)行腹腔麻醉,经左侧颞部入路,在大鼠左耳及左眼外眦连线,近眼外眦 1/3 处垂直作长 2 cm 的弧形切口,分离颞肌,并切断颞弓,拉开下颌关节,在卵圆孔前上方用牙科钻作直径为 5 mm 的骨窗,切开硬脑膜可见大脑中动脉(MCA)近端跨越嗅束,选择 MCA 近端(起始部)和从嗅束至大脑下静脉间的一段 MCA 为光照部位,光照分两步,第一步将光纤移至 MCA 近端,将光纤所射出的光束垂直对准 MCA 起始部表面血管,距离 5 mm,经股静脉注入 15 g·L⁻¹虎红(2 μ L·g⁻¹) 5 min 后,持续光照 10 min;第二步将光纤移至 MCA 血管表面,注入半量的虎红,再持续照射 10 min,即

完成造模^[2]。

2.1.2 采用改良的 Berdson 评分分级法观察大鼠行为学 大鼠精神情况较差,活动减少,倦屈,记 1 分;将大鼠置于平面上,推其双肩,使其向对侧移动,如双侧阻力对等且有力,记 0 分,如不对等则根据轻、中、重度不同程度分别记为 1,2 和 3 分;提鼠尾,使其前肢伸展爬行,观察两前肢着地情况,对称记 0 分,若两前肢着地不对称,提鼠尾使其离开地面,观察两前肢屈曲情况,看有无腕屈曲、肘屈曲和肩内旋,每出现一项记 1 分,三者均出现记 3 分;将大鼠置于笼壁上,向后拉,观察其抓握笼壁的能力大小,从而判定两前肢的肌张力,若双侧肌张力对等且有力记 0 分,若不对称,根据手术对侧前肢肌张力下降程度分别记为 1,2 和 3 分;观察动物自发不停地向一侧转圈运动,出现记 2 分;满分为 11 分,分数越高,表示损伤越重^[2]。

2.1.3 脑含水量的测定 术后 24 h 大鼠断头,冰上取脑,去除嗅球、小脑及低位脑干,用预冷的生理盐水冲洗表面,吸干水分,从脑矢状缝垂直将脑分为左右两半球,分别称定质量,按公式计算:

$$\text{脑含水量}(\%) = (\text{光照侧脑质量} - \text{未光照侧脑质量}) \div (\text{未光照侧脑质量} \times 2) \times 100\%$$

2.1.4 观察脑梗死范围 术后 24 h 大鼠断头取脑,去除嗅球、小脑及低位脑干,在视交叉前后等分间隔 2 mm,连续做 6 个脑冠状切片,将其放入提前预热 37 °C 的含 20 g·L⁻¹2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)的生理盐水中,保温 15 min 后翻片,共染色 30 min,染色后正常组织为红色,脑梗死组织为白色,将其脑平面投射于密度均一的相纸上,将梗死部位从相纸中剪下,以质量求面积法称取梗死组织质量占全脑质量的百分比来表示脑梗死范围。

2.1.5 观察脑组织病理学 将 TTC 染色的脑片再浸入体积分数为 10% 的甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,HE 染色后用光镜观察。

2.2 LCT 对双侧颈动脉结扎法诱导的大鼠缺血性脑卒中模型的防治作用

2.2.1 分组、模型及给药 取 SD 大鼠 180 只,随机分为假手术组、模型组、阳性对照组以及 LCT 低、中、高剂量组,每组 30 只,共 6 组。连续灌胃给药 14 d,末次给药 1 h 后,大鼠给予 10 g·L⁻¹戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)行腹腔麻醉,暴露双侧颈总动脉并在其后留置缝合线,以备结扎,形成急性不完全脑缺血模型,假手术组不结扎双侧颈总动脉^[3-4]。

2.2.2 脑指数及脑含水量的测定 双侧颈总动脉结扎 3 h 后,大鼠断头,开颅取脑,称定质量,计算脑指数(脑指数=脑湿质量 \times 100 \div 体质量);取左侧后 2/3

大脑半球,称定湿质量,置于110℃烤箱中烤至质量不变,称定干质量,脑含水量计算公式同2.1.3项下。

2.2.3 毛细血管通透性的测定 假手术组在股静脉注射伊文思蓝 50 mg·kg⁻¹后立刻结扎双侧颈总动脉,其余5组均在结扎双侧颈总动脉前5 min注射。结扎3 h后,大鼠断头,开颅取脑,称定质量,浸泡于甲酸胺溶液中,在45℃恒温箱中温育72 h,待脑组织中色素全浸出,取色素液于620 nm波长处测定吸光度值A,以吸光度值A为横坐标(x)、浓度为纵坐标(y)进行线性回归,得标准曲线方程 $y = 26.53x + 0.13$, $r = 0.9968$,计算脑内伊文思蓝的含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

2.2.4 血清中TNF- α 、IL-6、IL-8和CRP的含量测定 腹主动脉取血处死大鼠,以3000 r·min⁻¹离心20 min,分离血清并冷冻于-80℃冰箱中。采用Elisa法检测血清中TNF- α 、IL-6、IL-8和CRP的含量。

2.2.5 脑组织病理学检查 经体积分数为10%的甲醛固定24 h后,冠状切取大脑,常规脱水,石蜡包埋制片,HE染色,光镜观察。

2.3 LCT对大鼠血小板聚集和黏附功能的影响

2.3.1 分组、给药及取血 将50只雄性SD大鼠随机分为模型组、LCT低、中、高剂量组和阳性对照组,每组10只。在未处理前,断尾采血1 mL,用36 g·L⁻¹枸橼酸钠抗凝贮存于4℃冰箱中,备用,用于血小板黏附功能的测定。连续灌胃给药14 d,于末次给药后10 min静脉注射10 g·L⁻¹戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)麻醉,仰卧固定,颈A插管,每只大鼠取1和2 mL血样,各2份,分别测定血小板聚集和黏附功能,以判断对血栓性疾病形成的影响。

2.3.2 血小板聚集功能测定 ①制备2种血浆:以1000 r·min⁻¹离心10 min制成富血小板血浆(PPP);以3000 r·min⁻¹离心15 min制成贫血小板血浆(PRP);②仪器测定:取0.45 mL PRP在仪器中调至“0”,再取0.45 mL PPP置于BS631型聚集仪的比色皿中,加入9 g·L⁻¹的ADP溶液50 μL ,开机测1和5 min以及最大聚集百分率(%)。

2.3.3 血小板黏附功能测定 给药前后抗凝血各1 mL,装入球形瓶中,安在血小板黏附化的旋转盘上,以3 r·min⁻¹旋转15 min,然后取出旋转未接触和旋转接触后的血液,以阿氏稀释液计算血小板总数,按照公式:血小板黏附率(%) = [(接触前血小板数 - 接触后血小板数) ÷ 接触后血小板数] × 100%,血小板黏附抑制率(%) = [(模型组黏附率 - 治疗组黏附率) ÷ 模型组黏附率] × 100%。

2.4 数据处理 采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素

方差分析,2组间比较采用t检验;以P < 0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 LCT对光化学法诱导的大鼠缺血性脑卒中模型的影响

3.1.1 LCT对MCA血栓大鼠行为学的影响 见表1。由表1可知,麻醉清醒后LCT低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠在24 h时的精神情况比模型组明显好转,行为学改变较轻,差异有统计学意义(P < 0.05或P < 0.01)。

表1 LCT对MCA血栓大鼠行为学的影响

Tab. 1 Influence of LCT on behavior of MCA thrombus rats (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	Berdson 评分/分		
	4 h	12 h	24 h
假手术组	—	—	—
模型组	8.20 ± 1.31	8.30 ± 1.57	8.50 ± 2.79
LCT 低剂量组	6.80 ± 1.40	6.40 ± 2.34 ^a	4.00 ± 1.58 ^a
LCT 中剂量组	6.40 ± 1.42	5.00 ± 1.42 ^a	3.80 ± 0.93 ^b
LCT 高剂量组	5.50 ± 1.59	4.00 ± 0.95 ^a	3.28 ± 1.31 ^b
阳性对照组	6.00 ± 1.31	3.80 ± 0.79 ^b	2.80 ± 0.79 ^b

注:与模型组比较^aP < 0.05, ^bP < 0.01。—表示未检测项。

3.1.2 LCT对MCA血栓大鼠脑含水量和脑梗死范围的影响 于MCA血栓形成后24 h,大鼠断头取脑,结果表明,LCT高、中和低剂量组脑含水量明显低于模型组,差异有统计学意义(P < 0.05或P < 0.01);经TTC染色以质量求面积法,可得出模型组脑梗死范围占全脑的9.01% ± 1.51%,而假手术组TTC染色脑组织呈红色。结果见表2、图1和图2。

表2 LCT对MCA血栓大鼠脑含水量和脑梗死范围的影响
Tab. 2 Effects of LCT on brain water contents and cerebral infarction area in MCA thrombus rats (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	脑含水量/%	脑梗死范围/%
假手术组	0.41 ± 0.10	—
模型组	7.43 ± 1.49 ^b	9.01 ± 1.51
LCT 低剂量组	7.06 ± 1.08 ^b	8.42 ± 1.51
LCT 中剂量组	5.06 ± 1.57 ^{bc}	7.06 ± 1.55 ^c
LCT 高剂量组	4.64 ± 1.07 ^{bd}	6.32 ± 1.05 ^d
阳性对照组	4.37 ± 1.21 ^{bd}	6.05 ± 1.34 ^d

注:与假手术组比较^bP < 0.01;与模型组比较^cP < 0.05, ^dP < 0.01。—表示未检测项。

3.1.3 大鼠MCA血栓形成后脑组织病理学改变 MCA闭塞术后24 h取材,从脑外观可见光照侧脑表面苍白,位于嗅束和大脑下静脉之间的一段大脑中动脉颜色变暗,呈断续;光照侧大脑半球明显肿胀、中线移位,见图1。在光镜下假手术组脑组织细胞未见明

显的病理学改变,模型组可见冠状切面出现明显的梗死灶,由尾状核、海马、纹状体至皮质 MCA 供血区,病灶边界清晰,HE 染色显示:①脑组织结构疏松,胶质纤维间隙增宽;②部分神经元细胞呈不同程度的缺血细胞改变;胞体缩小,呈三角形,核固缩,胞浆嗜酸性变;③细胞核浓缩,但未见明显的核碎裂、核溶解的神经元;④肿胀的神经元胞浆淡染,可见少数神经元细胞有空泡样改变;⑤局部脑组织可见有早期脑软化灶形成趋势,见图 2。

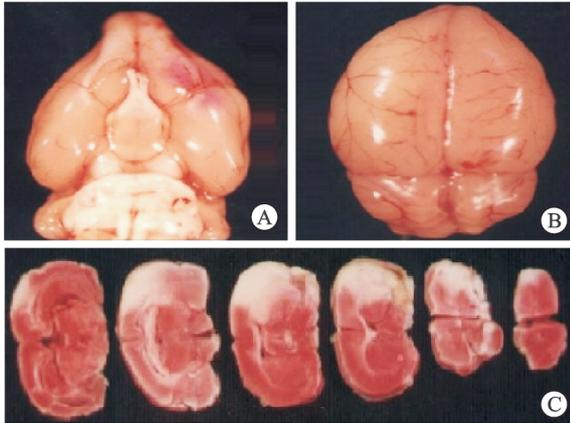


图 1 大鼠脑及其纵切面图

A. 24 h 后腹侧外观($\times 2$); B. 24 h 背侧外观($\times 2$); C. 24 h 病变染色。

Fig. 1 The brain and its longitudinal section

A. the ventral appearance after 24 h ($\times 2$); B. the dorsal appearance after 24 h ($\times 2$); C. the pathological staining at 24 h.

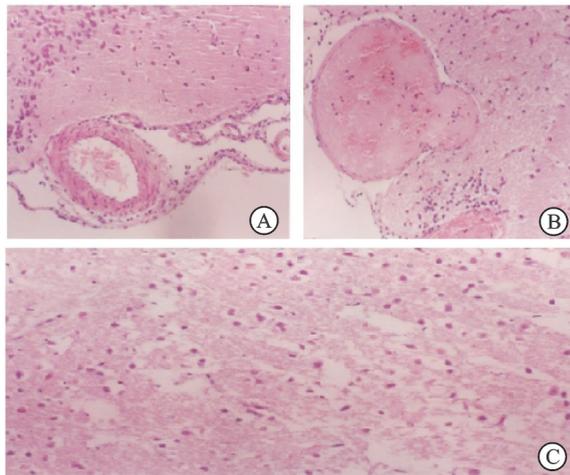


图 2 大鼠脑组织及血管图

A. 正常鼠($\times 100$); B. 病变鼠($\times 100$); C. 24 h 病变 HE 染色($\times 100$)。

Fig. 2 Rat brain tissue and blood vessels

A. normal mice ($\times 100$); B. diseased mice ($\times 100$); C. HE staining for 24 h lesions ($\times 100$).

3.2 LCT 对双侧颈总动脉结扎法诱导的大鼠缺血性脑卒中模型的影响

3.2.1 LCT 对脑含水量及脑指数的影响 见表 3。

由表 3 可知,与假手术组比较,模型组脑含水量及脑指数差异有显著统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,LCT 高、中和低剂量组脑含水量减少,差异有显著统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 LCT 对脑含水量及脑指数的影响

Tab. 3 Effects of LCT on brain moisture content and brain index ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	脑含水量/%	脑指数
假手术组	78.44 \pm 0.83	0.67 \pm 0.15
模型组	80.71 \pm 1.16 ^b	0.86 \pm 0.17 ^b
LCT 低剂量组	78.79 \pm 1.01 ^c	0.74 \pm 0.04 ^c
LCT 中剂量组	78.52 \pm 0.65 ^d	0.72 \pm 0.11 ^d
LCT 高剂量组	78.48 \pm 0.76 ^d	0.69 \pm 0.09 ^d
阳性对照组	78.82 \pm 1.09 ^c	0.70 \pm 0.07 ^d

注:与假手术组比较^b $P < 0.01$;与模型组比较^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

3.2.2 LCT 对毛细血管通透性的影响 各组脑内伊文思蓝的含量见表 4。由表 4 可知,模型组与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);LCT 低、中和高剂量组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明,缺血性脑卒中后毛细血管通透性增加,使脑内伊文思蓝的含量增加,LCT 低、中、高剂量组及阳性对照组给药后脑内伊文思蓝的含量明显减少。

表 4 LCT 对脑血管通透性的影响

Tab. 4 Effects of LCT on cerebrovascular permeability

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	脑内伊文思蓝含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
假手术组	3.50 \pm 1.09
模型组	5.42 \pm 1.76 ^b
LCT 低剂量组	4.40 \pm 0.79 ^{ac}
LCT 中剂量组	3.97 \pm 0.68 ^d
LCT 高剂量组	4.08 \pm 0.84 ^d
阳性对照组	3.90 \pm 0.72 ^d

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

3.2.3 脑组织病理学检查 镜下所见假手术组大鼠脑组织神经细胞正常,核膜清楚,核仁明显;模型组大鼠脑组织发生明显的病理性改变,神经细胞的胞浆和胞核浓缩,染色深,胞体变小,轴变和树突都呈锐角形状,神经细胞、毛细血管及小血管周围的空隙增宽,间质疏松,神经胶质细胞肿胀,其胞浆透量区增大,尤以室管膜周围的神经胶质细胞肿胀更明显。LCT 低、中和高剂量组的脑组织神经细胞浓缩及深染较脑缺血模型组明显减轻;神经胶质细胞肿胀及间质疏松程度均明显轻于阳性对照组。说明 LCT 对缺血性脑组

组织的病理变化有一定保护作用,能减轻病理改变。

3.2.4 LCT对大鼠血清中细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 和 CRP 的影响

与模型组比较,阳性对照组、LCT 低、中和高剂量组能显著降低血清 IL-6、IL-8 和

TNF- α 的含量,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与假手术组比较,LCT 高剂量组对 IL-6、IL-8、TNF- α 和 CRP 的含量影响不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

Tab. 5 Comparison of serum TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP contents in each group

($\bar{x} \pm s$)

组别	含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$			
	TNF- α	IL-6	IL-8	CRP
假手术组	1.40 \pm 0.18	0.74 \pm 0.18	0.74 \pm 0.16	349.54 \pm 27.89
模型组	2.87 \pm 0.33 ^a	1.75 \pm 0.24 ^a	1.87 \pm 0.26 ^b	225.33 \pm 20.26 ^a
LCT 低剂量组	2.20 \pm 0.23	1.28 \pm 0.20	1.35 \pm 0.19	343.88 \pm 22.34 ^c
LCT 中剂量组	1.83 \pm 0.22 ^c	0.95 \pm 0.19 ^c	1.18 \pm 0.21 ^c	289.61 \pm 21.32 ^c
LCT 高剂量组	1.63 \pm 0.18 ^c	0.89 \pm 0.22 ^c	1.02 \pm 0.14 ^c	268.19 \pm 19.54 ^c
阳性对照组	2.10 \pm 0.21 ^{ac}	1.06 \pm 0.14 ^{ac}	1.25 \pm 0.17 ^{ac}	245.81 \pm 23.06 ^{ac}

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较^c $P < 0.05$ 。

3.3 LCT对大鼠血小板聚集和黏附功能的影响

实验结果表明,LCT 能显著改善血小板的聚集和黏附功能。见表 6 和表 7。

表 6 LCT对大鼠血小板聚集功能的影响

Tab. 6 Effects of LCT on platelet aggregation in rats

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	聚集率/%		
	1 min	5 min	最大
模型组	22.66 \pm 1.05	40.20 \pm 2.29	46.00 \pm 9.40
LCT 低剂量组	18.44 \pm 0.90	35.02 \pm 1.92	39.54 \pm 6.05
LCT 中剂量组	15.02 \pm 0.97 ^b	27.83 \pm 1.66 ^b	28.40 \pm 3.06 ^b
LCT 高剂量组	14.16 \pm 1.15 ^b	26.38 \pm 2.01 ^b	26.26 \pm 5.82 ^b
阳性对照组	13.88 \pm 0.67 ^b	25.86 \pm 1.35 ^b	27.61 \pm 3.78 ^b

注:与模型组比较^b $P < 0.01$ 。

表 7 LCT对大鼠血小板黏附功能的影响

Tab. 7 Effects of LCT on platelet adhesion in rats

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血小板黏附率/%	血小板黏附抑制率/%
模型组	43.08 \pm 4.94	—
LCT 低剂量组	38.29 \pm 4.08	11.12
LCT 中剂量组	23.02 \pm 4.44 ^b	46.56
LCT 高剂量组	26.73 \pm 4.60 ^b	37.95
阳性对照组	30.86 \pm 3.72 ^b	28.37

注:与模型组比较^b $P < 0.01$ 。—表示未检测项。

4 讨论

缺血性脑卒中是中老年常见的脑血管疾病,是在脑血栓形成的基础上引起脑组织血流不足而导致的微循环障碍,容易引起神经细胞的不可逆损伤,其后产生的级联反应可引起自由基的改变、氧化应激和炎症反应等^[3-5]。LCT 由地龙、制天南星、丹参和僵蚕等组成,临床主治脑血栓引起的精神呆滞、口眼歪斜、肢体麻木和半身不遂等症,方中地龙有抗血小板凝

集、抗栓及增强纤溶的作用^[6-8];僵蚕有神经营养和保护作用^[9-10];制天南星有抗惊厥作用^[11-12];水蛭有很强的抗凝活性^[13-14];丹参能抑制血小板的聚集和抗凝等作用^[15-20]。

本研究结果显示,LCT 低、中、高剂量组和阳性对照组大鼠在 24 h 时较模型组精神明显好转,脑含水量和脑指数明显降低,病理学损害减轻,能降低毛细血管通透性以及血清细胞因子 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量,从而减轻炎症反应对神经系统的损伤^[21]。LCT 低、中和高剂量组能显著改善大鼠血小板的聚集和黏附功能($P < 0.01$)。结果表明,LCT 通过改善大鼠的精神状态,能减轻神经细胞与胶质细胞水肿,降低毛细血管通透性以及大鼠血小板的聚集和黏附功能等。通过上述作用机制达到对大鼠缺血性脑卒中的防治作用,为该制剂的临床应用与新药开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] 孙海欣,王文志.中国 60 万人群脑血管病流行病学抽样调查报告[J].中国现代神经疾病杂志,2018,18(2):83-88.
- [2] 魏锦慧.补肾强肝活血法治疗中风偏瘫的实验及临床研究[D].成都:成都中医药大学,2009:11.
- [3] 黄硕,张海林,张树泉.光化学法大鼠脑梗死模型的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2015,13(5):610-611,650.
- [4] 陈梦,汤轶波,赵玉青,等.中医药治疗脑缺血性疾病的实验研究进展[J].辽宁中医杂志,2018,45(4):890-892.
- [5] Jingbo Li, Yuxiang Cai. The dual effects of autophagy in myocardial hypertrophy[J]. Acta Cardiol, 2015, 70(4): 493-498.
- [6] 周晓,季倩,张汉明,等.地龙的研究进展[J].药学实践杂志,2015,33(5):396-400,410.
- [7] 何悦,肖会敏,康晓刚,等.地龙胶囊及其主成分对小鼠

- 移植瘤 S₁₈₀ 辐射增敏的研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 622-628.
- [8] 孟胜喜, 霍清萍. 地龙及其有效成分对神经系统疾病的作用[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(10): 933-936.
- [9] 仲海红, 陈炯华, 徐进友. 虫类药在后循环缺血性卒中治疗中的作用研究[J]. 陕西中医, 2019, 40(9): 1307-1309.
- [10] 李晶峰, 孙佳明, 张辉. 僵蚕的化学成分及药理活性研究[J]. 吉林中医药, 2015, 35(2): 175-177.
- [11] 聂容珍, 陈文政, 林嘉娜, 等. 天南星科有毒中药及炮制品的药效比较研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4): 53-56.
- [12] 林坤河, 韦建华, 邓超澄, 等. 炮制对天南星化学成分及药理作用的影响研究概况[J]. 广西中医药, 2018, 41(4): 73-75.
- [13] 顾成娟, 朴春丽, 吴学敏, 等. 降香、水蛭、川芎治疗微循环障碍经验——仝小林三味小方撮萃[J]. 吉林中医药, 2019, 39(11): 1466-1468.
- [14] 黄秋阳, 冷静, 甘奇超, 等. 水蛭及其制剂在心脑血管疾病中的应用[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1915-1920.
- [15] 代晓光, 苏长兰. 丹参化学成分及药理研究进展[J]. 中医信息, 2018, 35(4): 126-128.
- [16] 王春玲, 陈阿娣, 秦阳, 等. 丹参提取物抗动脉粥样硬化作用及机制的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(6): 8-10.
- [17] 刘慧颖, 姜长涛, 冯娟, 等. 丹参酮类化合物研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12): 1643-1647.
- [18] 刘江亭, 李慧芬, 崔伟亮, 等. 丹参研究述要[J]. 中医药学报, 2017, 45(6): 127-130.
- [19] 孟胜喜, 霍清萍. 丹参及其有效成分对神经系统的作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(3): 121-124.
- [20] 李坤, 林爱真, 杨媛, 等. 丹参酮生物合成分子调控机制的研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2018, 35(2): 367-375.
- [21] 刘艳. 中医药对缺血性脑血管病保护机制的临床研究进展[J]. 临床医药文献杂志, 2017, 4(102): 20194.

(收稿日期: 2020-04-27)

阿司匹林抑制肝癌细胞 HepG2 增殖及其机制研究

马颖¹, 马明², 马玲^{3*} (1. 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院肝胆外科, 乌鲁木齐 830001; 3. 新疆维吾尔自治区胸科医院, 乌鲁木齐 830001)

摘要:目的 探讨阿司匹林抑制肝癌细胞 HepG2 增殖及其机制。方法 用人肝癌细胞 HepG2, 将其分为观察组 1、观察组 2、观察组 3 和对照组, 3 组观察组分别使用终浓度为 5, 10 和 20 mmol · L⁻¹ 的阿司匹林进行治疗, 对照组给予等量的生理盐水, 观察阿司匹林对 HepG2 细胞增殖的抑制作用、不同浓度阿司匹林对 HepG2 细胞周期和凋亡的影响、HepG2 细胞中 X 的蛋白质 (Bax) 和 B 淋巴细胞瘤 bai-2 基因 (Bcl-2) 的 mRNA 及蛋白相对表达量的对比。结果 不同浓度的阿司匹林作用 24 和 48 h 后, 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用显著高于对照组 ($P < 0.05$), 随着药物浓度的增加, 抑制作用也随之升高; 不同浓度的阿司匹林作用 48 h 后对 HepG2 细胞增殖的抑制作用高于 24 h ($P < 0.05$); 不同浓度的阿司匹林 G0/G1 期的细胞百分比均高于对照组 ($P < 0.05$), 不同浓度的阿司匹林的凋亡率也高于对照组 ($P < 0.05$), 随着剂量的升高, HepG2 细胞周期也被明显抑制, 其凋亡率逐渐增加 ($P < 0.05$); Bax mRNA 和蛋白的相对表达量依次为: 观察组 3 > 观察组 2 > 观察组 1 > 对照组 ($P < 0.05$); Bcl-2 mRNA 和蛋白的相对表达量依次为: 观察组 3 < 观察组 2 < 观察组 1 < 对照组 ($P < 0.05$)。结论 阿司匹林可抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖, 其机制可能与 Bcl-2 与 Bax 的动态失衡有关, 通过 Bax 的过表达来促进肝癌细胞 HepG2 的凋亡及其对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。

关键词: 阿司匹林; 肝癌; 细胞增殖

DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2020.06.016

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1004-2407(2020)06-0860-04

Research of the aspirin inhibitory effect on HepG2 proliferation in hepatoma cells and its mechanism

MA Ying¹, MA Ming², MA Ling^{3*} (1. Medical Laboratory Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830001, China; 3. Chest Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of aspirin on the proliferation of HepG2 cells and its mechanism. Methods Human liver cancer cells HepG2 were divided into observation group 1, observation group 2, observation group 3 and control group. The observation group was treated with aspirin at a final concentration of 5, 10 and 20 mmol · L⁻¹. The drug was administered to observe the inhibitory effect of aspirin on the proliferation of HepG2 cells, and the effect of aspirin at different concentrations on the cell cycle and apoptosis of HepG2 cells. The Bax and Bcl-2 mRNA and protein expression in HepG2 cells was compared. Results After

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (编号: 2018D01C186)

作者简介: 马颖, 女, 主管技师

* 通信作者: 马玲, 女, 主管药师

<http://XBYZ.cbpt.cnki.net>