

脑络欣通对局灶性脑缺血大鼠凝血与纤溶系统的影响

王 健* 谭 辉 胡建鹏 何 玲 尹婷婷

安徽中医学院, 安徽省合肥市蜀山区梅山路 103 号, 230038

基金项目: 安徽省科技厅资助项目(100432); 康缘中医药科技创新基金项目(KYCX201010)

* 通讯作者: wangjian6301@163.com, (0551)5169179

[摘要] 目的 探讨脑络欣通对局灶性脑缺血再灌注大鼠凝血及纤溶系统的影响及其作用机制。方法 40 只 Wistar 大鼠中 10 只为正常组, 另 30 只采用线栓法制备大脑中动脉闭塞模型, 随机分为模型组、脑络欣通组和通心络组各 10 只。脑络欣通组给予 0.93g/ml 脑络欣通溶液, 通心络组给予 0.03g/ml 通心络溶液, 按 1ml/(100g·d) 连续 14 天灌胃, 模型组和正常组予以等量的生理盐水。给药后 14 天检测各组大鼠血浆纤维蛋白降解产物(FDP)、D-二聚体(D-D)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)和血浆纤维蛋白原(Fbg), 并进行神经功能缺损评分。结果 与模型组比较, 给药后 14 天脑络欣通组和通心络组神经功能缺损有明显减轻($P < 0.01$); 与脑络欣通组比较, 给药后 14 天后通心络组神经功能缺损差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 PT、APTT 和 TT 均明显缩短, Fbg、FDP、D-D 水平升高, 脑络欣通组和通心络组的 PT 也明显缩短、FDP 升高, 脑络欣通组 D-D 升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络欣通组和通心络组凝血及纤溶系统各指标差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 脑络欣通可以延长缺血后 PT、APTT 和 TT, 降低血浆 FDP、D-D 和 Fbg 水平, 可能是其治疗缺血性脑血管病并起到神经保护作用机制之一。

[关键词] 脑络欣通; 脑缺血; 凝血; 纤溶系统

Effect of Naoluo Xintong Liquid on the Coagulation and Fibrinolytic System in Rats with Focal Cerebral Ischemia

WANG Jian, TAN Hui, HU Jianpeng, HE Ling, YIN Tingting

(Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Province 230038)

ABSTRACT Objective To explore the effect and mechanism of Naoluo Xintong Liquid (liquid to free the network vessels of the brain and the heart) on the coagulation and fibrinolytic system in rats with focal cerebral ischemia. **Methods** Forty Wistar rats were selected and 10 rats were divided into normal group, other 30 were treated to make middle cerebral artery occlusion models with suture method. The models were randomized into three groups, i. e. model group, Naoluo Xintong group and Tongxinluo (liquid to free the network vessels of the heart) group, with 10 in each. Naoluo Xintong group and Tongxinluo group was given 0.93g/ml of Naoluo Xintong Liquid and 0.03g/ml of Tongxinluo Liquid respectively, 1ml/(100g·d) of intra-gastric administration for 14 consecutive days. The model group and normal group were given same amount of normal saline. Fibrin degradation product (FDP), D-dimer (DD), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (APTT) and plasma fibrinogen (Fbg) was detected and the neurological deficit was scored after 14 days of administration. **Results** Comparing with the model group, the neurological deficit was significantly relieved in Naoluo Xintong group and Tongxinluo group after 14 days of treatment ($P < 0.01$). There was significant difference in the neurological deficit between Naoluo Xintong group and Tongxinluo group after 14 days of treatment ($P < 0.05$). Comparing with the normal group, PT, APTT and TT was significantly shortened and Fbg, FDP and D-D was significantly increased in the model group, PT was significantly shortened and FDP was significantly increased in Naoluo Xintong group and Tongxinluo group, and D-D was significantly increased in Naoluo Xintong group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the model group, there were significant differences in the indexes of coagulation and fibrinolytic system in Naoluo Xintong group and Tongxinluo group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Naoluo Xintong could extend PT, APTT and TT and decrease the levels of FDP, D-D and Fbg, which may be relevant to its neuroprotective effect in treating ischemic cerebrovascular disease.

Keywords Naoluo Xintong liquid (liquid to free the network vessels of the brain and the heart); cerebral ischemia; coagulation; fibrinolytic system

脑络欣通是新安医家王乐旬先生针对缺血性脑血管病的临床验方, 本研究以凝血纤溶系统为切入点, 通过观察脑络欣通对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部

分凝血活酶时间(APTT)、血浆纤维蛋白原(Fbg)、纤维蛋白降解产物(FDP)及 D-二聚体(D-D)的影响, 从而探讨其对凝血及纤溶功能的作用机制, 为脑络欣通的临床应用和开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康 Wistar 大鼠 40 只, 体重 250 ~ 300g, 由南京医科大学饲养中心提供[许可证号: SCXK(苏)2008-0004]。于独立送风隔离笼具(康为 IR60)饲养, 笼内温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60%, 自然光照, 食水自取。

1.2 药物

脑络欣通复方由黄芪 30g, 红花 10g, 三七 4g, 当归 10g, 天麻 10g 等组成, 由安徽中医学院第一附属医院药剂科制备成颗粒, 3 包/袋, 10g/包, 批号: 20110627; 通心络胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司生产, 国药准字 Z19980015, 批号: 110819), 0.26g/粒。

1.3 主要试剂和仪器

4%多聚甲醛磷酸缓冲液(上海中试化工公司, 批号: 20111201); FDP 试剂盒(批号: 20110526)、D-D 试剂盒(批号: 20110310)由南京建成生物工程研究所提供; PT 测定试剂盒(批号: 0112091)、TT 试剂盒(批号: 0112121)、APTT 试剂盒(批号: 1011111)、Fbg 试剂盒(批号: 1011041)由四川迈克生物科技股份有限公司提供; Thermo-1510 酶标仪; BE-Compact 全自动凝血分析仪; 日立 7020 全自动生化仪; 新苗 DZF-6050 真空干燥箱; SIGMA 2-16PK 冷冻离心机。

1.4 动物分组、造模及给药

采用随机数字表法将大鼠分成正常组、模型组、脑络欣通组和通心络组 4 组, 每组 10 只。大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠制备参照 Longa 法^[1]加以改良。栓线制备: 1.5 号“红狼”尼龙鱼线截成每根长度为 50mm, 一端用蚊香火焰烧成圆钝, 在解剖镜下观察头端直径为(0.3 ± 0.02)mm 者留用并在 20mm 和 30mm 处打一结。分离大鼠右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA), 电凝 ECA 的分支(枕动脉、甲状腺上动脉), 把 ECA 远心端结扎两处。用微型无损动脉夹夹闭 CCA、ICA 和 ICA 的分支翼腭动脉(PPA)近心端。从 ECA 两结扎处中间将其剪断, 向下轻拉 ECA 使之与 ICA 成近似直线, 在 ECA 近游离端斜剪一“V”形切口, 快速插入栓线, 插入 ICA 约(18.0 ± 0.5)mm(至感觉有少许阻力为止), 阻断 MCA 血流, 造成局灶性脑缺血。脑络欣通组给予 0.93g/ml 脑络欣通溶液, 通心络组给予 0.03g/ml 通心络溶液, 按 1ml/100g

• d)连续灌胃 14 天, 给药剂量相当于成人等效剂量 7 倍; 模型组和正常组给予等量生理盐水。

1.5 神经功能缺损评分

参考 Longa 法^[1]于缺血 2h 再灌注及治疗后 14 天进行神经功能缺损体征评分。0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 向外侧转圈; 3 分: 向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。再灌注 2h 后通过神经功能评分判断脑缺血模型的成功与否, 2-3 分入选。

1.6 标本采集及指标检测

用 10%水合氯醛麻醉大鼠, 枸橼酸钠抗凝真空采血管通过腹主动脉取血, 以 3000r/min 离心 10min, 吸取上层, 制备待测血浆, -20°C 保存。每只另抽取无抗凝血 5ml 制备待测血清, -70°C 保存。ELISA 法检测血浆 D-D 和 FDP 水平, 自动血凝仪检测 Fbg、PT、APTT、TT, 各指标检验操作严格按试剂盒说明书。

1.7 统计学方法

数据统计分析应用 SPSS 17.0 统计学分析软件, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 经方差齐性检验后, 方差齐时用最小显著法(LSD)进行组间两两比较, 方差不齐时用 Games-Howell 法。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

表 1 示, 与正常组比较, 其他 3 组在缺血 2h 后再灌注及治疗后 14 天有不同程度的神经功能缺损; 与模型组比较, 治疗后 14 天脑络欣通组和通心络组神经功能缺损明显减轻($P < 0.01$); 与脑络欣通组比较, 治疗 14 天后通心络组神经功能缺损差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	缺血 2h 再灌注	治疗后 14 天
正常组	10	0	0
模型组	10	2.89 ± 0.08	2.16 ± 0.21
脑络欣通组	10	2.88 ± 0.09	$0.96 \pm 0.10^*$
通心络组	10	2.85 ± 0.06	$1.20 \pm 0.11^{*\Delta}$

注: 与模型组比较, $*P < 0.01$; 与脑络欣通组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠凝血及纤溶功能指标比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 PT、APTT 和 TT 均明显缩短, Fbg、FDP、D-D 水平升高, 脑络欣通组和通心络组 PT 明显缩短、FDP 升高, 脑络欣通组 D-D 升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 P

表 2 各组大鼠凝血及纤溶功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	Fbg(g/L)	FDP(μ g/ml)	D-D(mg/L)
正常组	10	12.622 $\pm$ 0.648	22.533 $\pm$ 2.730	38.800 $\pm$ 3.970	2.331 $\pm$ 0.305	1.846 $\pm$ 0.199	0.419 $\pm$ 0.052
模型组	10	8.509 $\pm$ 0.604**	17.550 $\pm$ 2.109**	31.470 $\pm$ 5.302**	2.742 $\pm$ 0.330**	4.254 $\pm$ 0.463**	0.617 $\pm$ 0.090**
脑络欣通组	10	11.093 $\pm$ 0.470**▲▲	21.640 $\pm$ 2.945▲▲	37.620 $\pm$ 3.586▲▲	2.272 $\pm$ 0.216▲▲	2.542 $\pm$ 0.318**▲▲	0.493 $\pm$ 0.078*▲▲
通心络组	10	11.009 $\pm$ 0.605**▲▲	20.770 $\pm$ 2.837▲	36.610 $\pm$ 3.599▲▲	2.397 $\pm$ 0.242▲▲	2.732 $\pm$ 0.298**▲▲	0.466 $\pm$ 0.067▲▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

<0.01);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组 PT、APTT、TT、Fbg、FDP、D-D 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脑络欣通组和通心络组各指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

血液凝固是由凝血因子参与的一系列蛋白质有限水解的过程,其关键是血浆纤维蛋白原转变为不溶的纤维蛋白。生理状态下血管常有轻微损伤发生,体内凝血系统也常有不同水平的激活,但血液并未凝固,这是由于体内存在抗凝和纤维蛋白溶解机制,能够防止正常状态下血液凝固,并对凝血反应加以适当的限制和调节,这就是简单的凝血—抗凝—纤溶系统之间的动态平衡。凝血功能亢进和纤溶功能下降是形成血栓的重要机制。纤维蛋白溶解的最终产物是 D-D,作为继发性纤溶之特有产物,它是凝血障碍唯一标志物^[2],是高凝状态和继发纤溶亢进的分子标志物,可有效标识稳定性纤维蛋白的出现。FDP 是纤维蛋白降解产物,具有阻止纤维蛋白单体交联和聚合、竞争凝血酶的抗凝作用以及抑制血小板聚集的作用,主要反映是否存在血栓形成或纤溶系统亢进,其阳性或增多见于继发性纤维蛋白溶解功能亢进、高凝状态及血管栓塞性疾病等^[3],故联合 D-D 的检测在临床上对于血栓性疾病更有诊断和判断溶栓疗效的价值。Fbg 作为凝血因子 I,它的升高可导致血液黏度增加,与 D-D 同步升高是反映血液高凝状态和血栓性疾病有价值的指标^[4]。PT 反映的是外源性凝血系统有无障碍,APTT 是检查二期止血的内源性凝血系统功能的一项可靠筛选试验。

脑络欣通主要由黄芪、红花、川芎、蜈蚣等组成,具有益气活血通络功效,对于气虚血瘀型中风疗效显著。通心络主要由人参、水蛭、赤芍、蜈蚣等组成,同样具有益气活血通络之功效,但两者仅蜈蚣一味药物相同,功效却相近,故选择其作为对照药很有研究意义。研究表明,中医不同的方药可以通过不同的途径和机制治疗缺血性脑血管病及起到神经保护作用^[5-7],本研究以凝血纤溶系统为切入点,探讨脑络

欣通过抗凝降纤起到对缺血性脑血管病的治疗作用。

本实验结果显示,模型组大鼠的 PT、APTT 和 TT 较正常组均缩短,Fbg、FDP 和 D-D 水平显著增加($P<0.01$),说明在局灶性脑缺血的情况下凝血功能增强,同时这又是血栓形成的重要机制。而脑络欣通组的 PT、APTT 和 TT 较模型组大鼠显著延长,Fbg、FDP 和 D-D 水平较模型组明显减少($P<0.01$),说明脑络欣通可以起到改善和调整凝血纤溶功能的作用。与模型组比较,治疗后 14 天脑络欣通组神经功能缺损有明显减轻($P<0.01$),说明通过改善和调整凝血纤溶功能而起到脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,是脑络欣通治疗缺血性脑血管病的一个重要途径,但其更深层次的作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] 康熙雄. 床旁检测临床应用手册[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 203.
- [3] 桂艺方, 张春雷, 韩伟平. D-二聚体和 FDPs 联合检测在血栓性疾病中的应用[J]. 大连医科大学学报, 2012, 34(1): 78-80.
- [4] 王俊宏, 丁樱, 任献青, 等. 雷公藤多苷加辨证中药对小儿过敏性紫癜性肾炎凝血机制的影响[J]. 中医杂志, 2012, 53(3): 212-214.
- [5] Wu CJ, Chen JT, Yen TL, et al. Neuroprotection by the Traditional Chinese Medicine, Tao-Hong-Si-Wu-Tang, against Middle Cerebral Artery Occlusion-Induced Cerebral Ischemia in Rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011; 803015.
- [6] Ye Y, Huang C, Jiang L, et al. Huanglian-Jie-Du-Tang extract protects against chronic brain injury after focal cerebral ischemia via hypoxia-inducible-factor-1 α -regulated vascular endothelial growth factor signaling in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(3): 355-361.
- [7] 黄月芳, 章正贤. 中医药防治缺血性中风的临床研究概况[J]. 中医杂志, 2011, 52(10): 885-888.

(收稿日期: 2012-05-10; 修回日期: 2012-08-07)

[编辑: 邓 媛]