

nism of ginsenoside Rg1 on myocardial remodeling in an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 16.

[8] 马文东, 张丽娟, 罗玲, 等. 抗纤维化短肽对血清诱导的心脏成纤维细胞增殖和胶原合成与I、III型胶原表达抑制作用的实验研究[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2008, 10(3): 291-293.

[9] 朱翠, 丁丽华, 曾宪垠, 等. TGF-β/Smads 信号转导通路的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(4): 604-607.

[10] Shen N N, Li X G, Zhou T, et al. Shensong Yangxin Capsule prevents diabetic myocardial fibrosis by inhibiting TGF-β1/Smad signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157(18): 161-170.

[11] Fan Y H, Dong H, Pan Q, et al. Effects of arginine vasopressin on differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55(5): 489-495.

[12] 张保刚, 王晓晔, 董亮, 等. 丹皮酚体外抑制 TGF-β 诱

导的成纤维细胞增殖的研究[J]. *天津医药*, 2008, 36(9): 704-705.

[13] Ma Y L, Bates S, Gurney A M. The effects of paeonol on the electrophysiological properties of cardiac ventricular myocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 545(3): 87-92.

[14] Zhang J Y, Li P, Li Y K. Protective effects of paeonol, paeoniflorin and their compatibility on *in vitro* cultured cardiomyocytes suffering from hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Chin J Integr Tradit Western Med*, 2012, 32(4): 510-514.

[15] Wang X M, Wang S X, Hu L M. Neuroprotective effect of *Panax notoginseng* saponins and its main components [J]. *World J Neurosci*, 2014, 4(1): 12-17.

[16] 陈剑梅, 郭洁文, 李丽明. 三七总皂苷对急性心梗后左室重构大鼠心功能的改善作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(5): 514-517.

[17] Chen S X, Liu J L, Liu X Y, et al. *Panax notoginseng* saponins inhibit ischemia-induced apoptosis by activating PI3K/Akt pathway in cardiomyocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 263-270.

补阳还五汤对急性脑缺血大鼠血清 CD63 和 CD62P 因子表达的影响

黄志恩^{1,2}, 李茹冰^{1*}, 姚晖^{2*}, 朱永坤³, 陈艳⁴

(1. 南方医科大学附属广州军区广州总医院药学部, 广东 广州 510010; 2. 南方医科大学附属佛山医院药学部, 广东 佛山 528000; 3. 东莞市第三人民医院药学部, 广东 东莞 523326; 4. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 目的 探讨补阳还五汤(黄芪, 当归尾, 赤芍, 地龙、桃仁、红花、川芎)对急性脑缺血大鼠血清溶酶体颗粒糖蛋白 63 (CD63) 和血小板 α 颗粒膜糖蛋白 140 (CD62P) 细胞因子的影响。方法 采用大脑中动脉线栓法建立大鼠急性局灶性脑缺血模型。将 SPF 级 SD 雄性大鼠 100 只随机均分为假手术组和模型组(生理盐水), 氯吡格雷组 [6.75 mg/(kg·d)], 补阳还五汤高 [26 g/(kg·d)]、低剂量组 [6.5 g/(kg·d)]。连续给药 14 d 后观察和比较各组大鼠神经功能评分、脑梗死面积和血清 CD63 和 CD62P 水平变化情况。结果 与模型组相比, 氯吡格雷组、补阳还五汤高剂量组均能显著降低动物的神经功能评分 ($P < 0.01$)、增加体质量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 和减少脑梗死面积 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。酶联免疫法结果显示, 模型组大鼠血清 CD63、CD62P 均较假手术组升高, 补阳还五汤高、低剂量组与模型组比较, 均能降低 CD63 和 CD62P 水平, 差异有显著性 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 尤以高剂量组较为明显。结论 补阳还五汤可能下调 CD63、CD62P 因子表达, 减轻急性脑缺血模型大鼠的神经功能损伤和减少脑梗死面积。

关键词: 补阳还五汤; 大鼠; 急性脑缺血; CD63; CD62P

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)04-0735-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.004

收稿日期: 2015-08-24

基金项目: 广东省中医药管理局中医药强省课题 (20121088)

作者简介: 黄志恩 (1981—), 女, 硕士生, 主管药师, 从事神经内科临床药学工作。Tel: (0757) 88032029, E-mail: mabel5789@163.com

* 通信作者: 李茹冰 (1971—), 女, 博士, 副主任技师, 从事药理学研究工作。Tel: (020) 88654185, E-mail: lrb90927@126.com
姚晖 (1973—), 男, 博士, 主任药师, 从事临床药学研究工作。Tel: (0757) 88032029, E-mail: fsyahui@126.com

Influence of Buyang Huanwu Decoction on expressions of CD63 and CD62P in rat with acute cerebral ischemia

HUANG Zhi-en^{1,2}, LI Ru-bing^{1*}, YAO Hui^{2*}, ZHU Yong-kun³, CHEN Yan⁴

(1. Department of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command, Affiliated Hospital of the South Medical University, Guangzhou 510010, China; 2. Department of Pharmacy, The Affiliated Foshan Hospital of South Medical University, Foshan 528000, China; 3. Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Dongguan, Dongguan 523326, China; 4. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the influence of Buyang Huanwu Decoction (BHD) (*Astragali Radix*, the roots of *Angelicae sinensis Radix*, *Paeoniae Radix rubra*, *Pheretima*, *Persicae Semen*, *Carthami Flos*, *Chuanxiong Rhizoma*) on the expressions of CD63 and CD62P in rat with acute cerebral ischemia. **METHODS** The acute focal cerebral ischemia models were established by middle cerebral artery occlusion. The specific pathogen free SD rats were randomly and equally divided into sham operation and model (distilled water), Clopidogrel [6.75 mg/(kg·d)] and high-dose [26 g/(kg·d)], low-dose [6.5 g/(kg·d)] BHD groups. After consecutive administration for 14 d, the observation and comparison were made of the neurological score, cerebral infarction area and serum levels of CD63 and CD62P. **RESULTS** Compared with the model group, Clopidogrel group and high-dose BHD group could significantly increase the weight ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduce the neurological score ($P < 0.01$) and decreased the cerebral infarction area of rats ($P < 0.01$, $P < 0.05$). ELISA results showed that rat serum CD63 and CD62P in the model group were elevated in contrast to the sham operation group. Compared with the model group, the levels of CD63 and CD62P in high-dose and low-dose BHD groups were lower ($P < 0.01$, $P < 0.05$), especially in the high-dose BHD group. **CONCLUSION** Buyang Huanwu Decoction can reduce cerebral ischemic damage and decreases the cerebral infarction area in rat with acute focal cerebral ischemia. Its mechanism may be associated with down-regulating the levels of CD63 and CD62P.

KEY WORDS: Buyang Huanwu Decoction (BHD); rat; acute cerebral ischemia; CD63; CD62P

缺血性卒中是各种原因引起的脑部血液供应障碍, 导致脑组织缺血缺氧性坏死, 脑缺血后血管炎症反应和脑微循环功能改变影响着脑卒中的病情进展及预后。血小板在缺血性脑卒中的发生和发展中扮演着重要的角色, 其活化程度与病情的严重程度和预后密切相关。溶酶体颗粒糖蛋白63 (CD63) 和血小板 α 颗粒膜糖蛋白140 (CD62P, 也称P选择素) 是血小板活化和释放的产物, 是体内血小板活化程度和血栓形成的标志物, 它们的高表达可能会加重脑缺血损伤^[1-2]。补阳还五汤出自清代王清任的《医林改错》, 具有益气、活血、通络等作用, 是改善脑缺血局部微循环, 减轻脑水肿及氧自由基损伤, 促进神经功能恢复, 是治疗脑梗塞和脑梗塞后遗症的经典的名方^[3]。本研究采用急性局灶性脑缺血大鼠模型, 研究补阳还五汤对急性脑缺血大鼠血清中CD63和CD62P细胞因子表达的影响, 探讨其对急性缺血性脑卒中损伤的保护机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠, 体质量200~250 g, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证号SCXK(浙)2014-0001。动物在手术前1周领回, 安静环境饲养, 自由进食及饮水, 光照周期采用自然节律。实验过程中对动物的饲养、给药、手术及取材, 均遵循实验动物管理规定。

1.2 药物与制剂 补阳还五汤颗粒剂水溶液制备: 根据清·王清任《医林改错》原方所载的药味和配方比例(按文献每钱以3 g换算)进行制备。处方: 生黄芪120 g, 当归尾6 g, 赤芍4.5 g, 地龙、桃仁、红花、川芎各3 g。换算为中药颗粒的用量为黄芪24 g(批号312506T, 规格2.0 g: 10 g, 每袋装量与相当于饮片量, 以下均同), 赤芍0.9 g(批号310263T, 规格2.0 g: 10 g), 当归尾1.5 g(批号1307117, 规格1.5 g: 6 g), 川芎0.65 g(批号312502T, 规格1.3 g: 6 g), 地龙

0.3 g (批号 312360T, 规格 1.0 g : 10 g), 桃仁 0.6 g (批号 312159T, 规格 2.0 g : 10 g), 红花 0.48 g (批号 311396T, 规格 0.8 g : 5 g), 以上颗粒均由广东一方制药有限公司提供。取各味药颗粒剂混合后, 用 100 °C 蒸馏水配制成补阳还五汤水溶液备用。硫酸氢氯吡格雷片 (75 mg/片, 赛诺菲 [杭州] 制药有限公司, 批号 2A183)。

1.3 试剂 2,3,5-氯化三苯基四氮哇 (TTC) (美国 Sigma 公司); 10% 水合氯醛 (上海白鹤化工厂); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (称取 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 1.56 g, KH₂PO₄ 0.4 g, 定容至 1 000 mL, pH 7.4, 高压灭菌备用); 大鼠 CD63、CD62P 酶联免疫吸附试剂盒均由美国 RB 公司提供; 其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器 HSS-1 数字式超级恒温浴槽 (成都仪器厂); BP121S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); 医用低温电冰箱 (日本日立公司), 微孔板扫描酶标仪 (MQX200 型, 美国 BioTek Instrument 公司); 低速控温离心机 (美国 Thermo Scientific); AV-P960C 数字展示台 (日本 Victor Company of Japan, Limited)。

2 方法

2.1 分组与给药 按照实验动物与人按体表面积等效量换算比率计算大鼠用量。雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 20 只, 模型组、假手术组、氯吡格雷组 [6.75 mg/(kg · d)]、补阳还五汤高剂量组 [26 g/(kg · d)]、补阳还五汤低剂量组 [6.5 g/(kg · d)], 动物按体表面积计算灌胃给药 10 mL/kg。模型组和假手术组给予相同体积的生理盐水。术后第 2 天开始给药, 连续给药 14 d。

2.2 动物模型制备与评价 采用大鼠大脑中动脉线栓法 (MCAO) 复制大鼠局灶性脑缺血模型^[4]。大鼠用 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰位固定后, 颈正中切口, 钝性分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA), 并分离迷走神经。由 CCA 分叉处向头端依次游离, 并结扎右侧 CCA 近心端、ECA 及其所有分支动脉, 使其主干游离备用。然后分离右侧 ICA, 沿 ICA 向下分离翼腭动脉, 根部结扎该分支, 仅保留 ICA 入颅骨主干。在 ECA 近端备线, 用无损伤动脉夹暂时夹闭其远端, CCA 分叉处做一切口, 插入 4~0 尼龙线, 推进 17~20 mm 时可感阻力, 表明栓线头端已经通过大脑中动脉 (middle carotid artery, MCA) 的起始处, 阻断 MCA 部

分血流来源, 缝合皮肤, 此时即完成一侧 MCAO。假手术组除不插线外, 其余步骤同上。术后将大鼠置于铺好清洁垫料的饲养箱内自由饮水进食。分别于术后 4、8、24 h 对大鼠进行神经功能评分, 根据 Zea Longa^[4] 的五分制评分标准, 满分为 5 分, 分数越高, 动物行为障碍越严重。符合 2、3、4 分, 并且与正常动物明显存在差异, 则可证明模型造模成功。神经功能评分标准: 0 分, 无神经损害症状; 0.5 分, 表现为竖毛, 轻度运动障碍; 1.0 分, 表现为不能伸展对侧前爪, 运动障碍; 2.0 分, 表现为行动不协调, 屈曲姿势, 旋转运动; 3.0 分, 表现为向对侧倾倒; 4.0 分, 表现为痉挛, 昏睡, 意识丧失; 5.0 分, 死亡。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠的一般状况 给药期间密切观察毛发光泽、精神状态、活动、饮食及大小便, 每周称体质量, 记录体质量变化情况。分别于术后 1、7、14 d 对缺血大鼠进行神经功能评分。

2.3.2 梗死面积测定 末次灌胃后 2 h, 将动物断头取脑; 去掉嗅球、小脑和低位脑干, 冠状均切 4 刀, 共 5 片; 5 片脑组织放置 0.25% TTC 溶液中, 37 °C 避光孵育 30 min 染色, TTC 可以和活性细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶反应, 生成红色的甲贲, 因此被用来表示细胞的活力; 10% 福尔马林固定 4 h; 拍照, 经染色后正常组织呈红色, 梗死部位呈白色; 观察结果并用 AV-P960C 数字展示台拍照分析, 根据面积和切片间隔, 采用 ImageJ 软件计算出脑片上梗塞灶体积占全脑体积的百分比, 进行比较。

2.3.3 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 CD63 和 CD62P 含量 末次灌胃后 2 h, 腹主动脉取血约 5 mL, 3 000 r/min, 离心 30 min, 吸取血清, 血清于 -20 °C 冰箱保存备测。CD63 和 CD62P 含量测定参照试剂盒说明书。

2.4 统计学分析 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用统计软件 SPSS 13.0 进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 如有显著性差别, 则组间两两显著性比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

3 结果

3.1 大鼠的一般状况 术后模型组动物一般状态较差, 活动较少。体质量方面, 大多数动物体质量有所下降。补阳还五汤高剂量组和氯吡格雷组不同程度地改善 MCAO 大鼠的一般情况, 体质量有所

增加, 给药第7天及第14天, 氯吡格雷组和补阳还五汤高剂量组动物体质量明显增加, 与模型组比

较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

表1 MACO术后各组大鼠不同时间点体质量变化和神经功能损伤的影响 ($n = 10$)

Tab. 1 Effects of weight and neurological scores of rats after MACO at different time points ($n = 10$)

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	0 d		1 d		7 d		14 d	
		体质量/g	体质量/g	神经功能评分/分	体质量/g	神经功能评分/分	体质量/g	神经功能评分/分	
假手术组	-	247.7 ± 13.95	225.7 ± 6.39	0	240.7 ± 6.56	0	275 ± 7.45	0	
模型组	-	243.6 ± 13.09	173 ± 9.24 [#]	3.4 ± 0.52	154 ± 7.49 [#]	2.9 ± 0.57	144.3 ± 17.5 [#]	2.5 ± 0.53	
氯吡格雷组	6.75 × 10 ⁻³	243.8 ± 9.96	173.5 ± 13.55	3.5 ± 0.53	166.7 ± 8.41 [*]	2.1 ± 0.56 [*]	165.3 ± 8.27 ^{**}	1.6 ± 0.69 ^{**}	
补阳还五汤高剂量组	26	247.8 ± 8.16	172.1 ± 10.63	3.5 ± 0.52	166.5 ± 8.05 [*]	2.5 ± 0.53	157.6 ± 9.2 [*]	1.5 ± 0.53 ^{**}	
补阳还五汤低剂量组	6.5	248.7 ± 3.74	172.7 ± 9.54	3.3 ± 0.48	159.8 ± 6.32	2.7 ± 0.67	141.7 ± 7.87	2.3 ± 0.48	

注: 与假手术组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

神经功能评分方面, MACO术4h后, 与假手术组相比, 各组动物清醒后均表现出明显的神经运动功能障碍, 如痉挛、对侧倾倒、旋转运动等, 提鼠尾可见其左前肢收紧贴胸壁, 左侧肢体肌力下降, 行走时偏向左侧, 各组严重程度相似; 8、24h后, 动物死亡率大大增加。连续给药治疗后, 与模型组相比, 各给药组大鼠的神经功能损害症状均有所减轻。给药第7天氯吡格雷组动物的神经功能评分显著减少 ($P < 0.05$); 给药14d, 氯吡格雷组和补阳还五汤高剂量组动物神经功能评分明显下降, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3.2 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑梗塞面积的影响 脑梗死面积是评价脑缺血损伤程度较为直观、准确的指标。假手术组脑组织均呈现深红色(正常脑组织); 模型组, 氯吡格雷组, 补阳还五汤高、低剂量组的大脑左侧均有不同程度的苍白色脑梗死组织区(梗死损伤灶), 如图1所示。梗死面积计算比较结果表明, 氯吡格雷组、补阳还五汤高剂量组脑梗死灶面积明显低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 补阳还五汤低剂量组平均梗死面积低于模型组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表2。

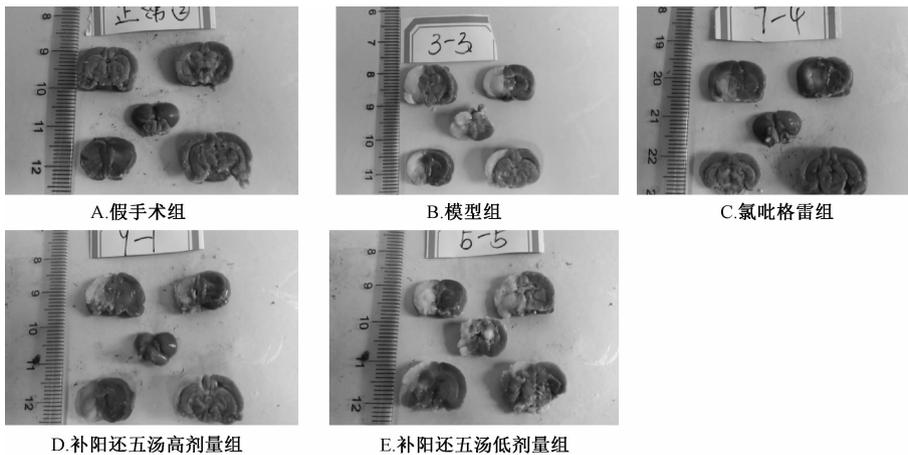


图1 TTC染色下各组大鼠脑组织标本

Fig. 1 Brain tissue of all groups rats in TTC staining

表2 补阳还五汤治疗后脑组织梗死面积结果 ($n = 10$)
Tab. 2 Influence of Buyang Huanwu Decoction in acute cerebral ischemia rats on infarct size ($n = 10$)

组别	剂量/[g·(kg·d) ⁻¹]	梗死面积/%
假手术组	-	0
模型组	-	42.57 ± 8.73
氯吡格雷	6.75 × 10 ⁻³	24.11 ± 6.48 ^{**}
补阳还五汤高剂量组	26	31.07 ± 6.43 [*]
补阳还五汤低剂量组	6.5	38.48 ± 9.49

注: 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测脑缺血大鼠血清中CD63和CD62P的表达 模型组大鼠血清CD63和CD62P含有量均较假手术组显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 氯吡格雷组, 补阳还五汤高、低剂量组均能降低CD63、CD62P水平, 差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 且CD63、CD62P水平随补阳还五汤剂量增加而降低, 高、低剂量组比较差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说

明氯吡格雷和阳补还五汤均能降低急性脑缺血大鼠血清 CD63、CD62P 水平。

表 3 补阳还五汤对急性局灶性脑缺血大鼠血清 CD63 和 CD62P 含有量的影响 (n = 6)

Tab. 3 Effects of Buyang Huanwu Decoction in acute cerebral ischemia rat on CD63 and CD62P (n = 6)

组别	剂量/ [g·(kg·d) ⁻¹]	CD63/ (ng·mL ⁻¹)	CD62P/ (ng·mL ⁻¹)
假手术组	-	35.43 ± 1.97	13.56 ± 1.02
模型组	-	57.15 ± 2.76 [#]	19.05 ± 1.41 [#]
氯吡格雷组	6.75 × 10 ⁻³	38.65 ± 1.86 ^{**}	14.62 ± 1.03 ^{**}
补阳还五汤高剂量组	26	45.73 ± 3.45 ^{**△△}	14.08 ± 1.82 ^{**△}
补阳还五汤低剂量组	6.5	53.48 ± 3.33 [*]	16.41 ± 1.73 [*]

注：与假手术组比较，[#]P < 0.01；与模型组比较，^{*}P < 0.05，^{**}P < 0.01；与低剂量组比较，[△]P < 0.05，^{△△}P < 0.01

4 讨论

在急性缺血性脑卒中时梗死中心区的缺血缺氧造成了自由基产生、兴奋性氨基酸递质和血小板活性因子的释放、脑水肿等引起脑神经元代谢紊乱，大量钙离子内流，使细胞超载线粒体钙离子沉着，发生不可逆性神经元死亡^[5-6]。血小板活化在血栓性疾病中起着关键的作用，其活化程度与卒中患者的疾病进展、神经功能康复及预后均有影响。国内外指南均有推荐急性卒中患者服用抗血小板药物治疗，但抗血小板药物治疗时颅内及胃肠道出血等不良反应有所增加，限制了在临床上的长期使用。中药因口服安全、有效而日益受到人们的青睐。补阳还五汤是治疗缺血性脑损伤的经典名方，主要治疗气虚血瘀型中风，具有抗血小板活化、抗氧化、神经保护等作用，能通过多种途径对抗缺血性脑血管病的不良损伤，促进卒中患者的神经功能康复，临床上广泛应用于缺血性脑卒中的预防和治疗^[7-9]。本课题组多年来对补阳还五汤体内对血小板活化因子 (PAF) 的影响做了大量的研究工作，探讨了该方对血小板的功能和 PAF 代谢、受体活性等的影响，揭示了该方拮抗血小板活性的作用机制。研究显示：补阳还五汤能够通过降低体内 PAF 含量、抑制 PAF 受体活性、PAF 诱导血小板聚集、上调磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 通路中 AKT, P-AKT 蛋白的表达和促进 AKT 的磷酸化等作用而抑制血栓形成，从而发挥脑保护的作用^[10-14]。本研究采用大鼠大脑中动脉线栓法 (MCAO) 复制大鼠局灶性脑缺血模型，发现使用补阳还五汤显著降低神经功能评分，对急性脑缺血大鼠的神经功能损害和脑组织梗死面积均有明显改善。

血小板在止血和血栓形成中的作用与其质膜、贮存颗粒和骨架蛋白的生化组成密切相关。缺血性脑卒中患者血小板处于高度活化状态，表面的糖蛋白发生数量和构型的改变并与血浆中的受体蛋白结合，发生血小板聚集和血小板成分的释放^[15]。探讨该方对急性脑缺血损伤的保护作用机制与血小板膜糖蛋白表达的关系，具有重要的临床指导意义。血小板上有致密颗粒、α 颗粒和溶酶体等 3 种贮存颗粒，其质膜上的糖蛋白是血小板活化的主要介导者^[16]。其中 CD62P 存在于 α 颗粒膜上，而 CD63 存在于致密颗粒和溶酶体颗粒膜上。CD62P (P 选择素) 是血小板 α 颗粒膜的糖蛋白，在静止期血小板上不表达或少量表达。血小板活化时 α 颗粒膜蛋白迅速与血小板膜蛋白融合，使 CD62P 持久表达在活化的血小板膜表面，介导活化的内皮细胞与单核细胞、中性粒细胞等的黏附功能，促进纤维蛋白沉积，参与炎症反应和血栓形成^[17]。CD62P 只在活化的血小板表面表达，不被血浆蛋白所掩盖，且不随时间的推移而在活化血小板表面消失^[15,18]。CD63 是溶酶体颗粒糖蛋白，主要位于静止的血小板致密颗粒和溶酶体腔内，只有在血小板活化时，溶酶体膜溶解，CD63 与血小板浆膜融合后才表达于血小板膜上^[19]。在急性缺血性脑卒中时血小板活化使 PAF 释放增加，致密颗粒、α 颗粒和溶酶体等颗粒脱落导致 CD62P 和 CD63 在血小板表面表达增加，并刺激炎症因子的大量释放，释放出的炎性因子和糖蛋白会反过来刺激 PAF 的合成，促进 CD62P 和 CD63 表达的进一步升高的恶性循环。同时，CD62P、CD63 和 PAF 也协同参与白细胞和内皮细胞的黏附过程，从而促进血小板的聚集和微血栓的形成，这可能会阻碍侧支循环的建立，加重缺血半阴带中脑细胞和神经损害^[20-21]。因此，CD62P 和 CD63 在脑血管疾病的发生和发展中发挥着重要的作用，成为活化血小板灵敏特异的标志物^[22]。课题组前期采用双侧颈总动脉阻断诱导大鼠急性脑缺血再灌注模型，针对该方预防脑缺血的机制做了探讨，发现该方预防应用 14 d 后，能明显降低模型大鼠 CD62P 和 CD63 含量^[21]。而本实验采用 MCAO 局灶性脑缺血模型，对急性脑卒中后给予补阳还五汤治疗，发现用药后各组均能显著降低脑缺血模型大鼠血清 CD63 和 CD62P 的含量，从而可导致血小板活化水平下降，且含量下降呈剂量相关性，尤以高剂量组较为明显，这与前期研究预防使用结果相似，说明该方无论在治

疗阶段还是预防阶段, 均能防治脑缺血损伤, 值得临床推广使用。

总之, 本研究证实补阳还五汤在缺血性脑卒中治疗使用时, 具有促进缺血受损神经运动功能的恢复和减少脑组织梗死面积等作用, 其作用机制可能与减少血小板贮存颗粒的释放, 降低 CD63 和 CD62P 分子与血小板浆膜融合, 下调血小板表面的血清中游离的 CD63 和 CD62P 的表达, 进而减少血管内皮细胞的炎性免疫反应, 减轻梗塞灶脑细胞的缺血性损害有关, 且量效关系明显, 这可能是补阳还五汤在治疗急性脑卒中时产生脑保护的作用的机制之一。

参考文献:

- [1] 晁利芹, 谭子虎, 王晓东, 等. 急性脑梗死与血清可溶性 P 选择素及 L 选择素的相关研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2046-2047.
- [2] 胡瑛, 高乐, 于增国. 急性脑梗塞患者 CD18、CD54 与 CD62P、CD63 表达变化的临床研究[J]. 医学与哲学, 2011, 32(5): 59-77.
- [3] 周赛男, 蔺晓源, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 251-254.
- [4] 郭晓利, 肖伟. 线栓法大鼠中动脉闭塞脑缺血动物模型的影响因素探析[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(3): 239-241.
- [5] 孙少曾, 孙松峰. 急性脑梗死缺血瀑布的形成及其处理[J]. 中原医刊, 2001, 28(1): 54-56.
- [6] 田兆华, 刘柏炎. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(3): 193-198.
- [7] Mu Q, Liu P, Hu X, *et al.* Neuroprotective effects of Buyang Huanwu decoction on cerebral ischemia-induced neuronal damage[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(17): 1621-1627.
- [8] 李书霖, 李岩, 刘慧. 李延教授运用补阳还五汤治验举隅[J]. 中医药学报, 2012, 40(1): 106-107.
- [9] 郭乐, 周赛男, 蔺晓源, 等. 补阳还五汤对脑缺血后大鼠 NF- κ B/p50 表达的影响[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 98-101.
- [10] 蔡俊, 张继平, 姚晖, 等. 补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 122-126.
- [11] 姚晖, 吴勇杰, 张继平, 等. 补阳还五汤体外对家兔血小板 PAF 受体活性影响的拆方研究[J]. 新中医, 2005, 37(12): 82-84.
- [12] 张继平, 张玉萍, 文凤妮, 等. 补阳还五汤对家兔血液中血小板活化因子含量的影响[J]. 中国中医急症, 1998, 7(5): 229-230.
- [13] Miwa M, Miyake T, Yamanaka T, *et al.* Characterization of serum platelet activating factor (PAF) acetylhydrolase: correlation between deficiency of serum PAF acetylhydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children[J]. *J Clin Invest*, 2007, 82(6): 1983-1991.
- [14] 张继平, 宫丽, 姚晖, 等. 补阳还五汤大鼠含药血清对家兔血小板 PAF 受体活性的影响[J]. 临床医学工程, 2009, 16(9): 14-16.
- [15] 沈薇薇, 王宁, 李刚, 等. 血小板活化标志物的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(3): 137-138.
- [16] 陆锋, 张梅, 郭力, 等. 血小板活化因子及血小板膜糖蛋白与缺血性脑血管疾病[J]. 中国临床康复, 2006, 10(28): 126-128.
- [17] 齐茗, 王晨霞. 血小板活化标志物 CD62P、PAC-1 与心血管病关系研究的进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2014, 23(1): 98-100.
- [18] 吴涛, 姜瑞民, 苏颖, 等. 血小板膜糖蛋白研究进展[J]. 北京医学, 2011, 33(8): 701-703.
- [19] 罗德欣, 段伟, 李通, 等. 脑梗死与血小板溶酶体膜糖蛋白 CD63 [J]. 中国民康医学, 2012, 24(24): 3051-3052.
- [20] Luo Y, Yin W, Chen J, *et al.* Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(2): 435-48.
- [21] 王日生, 蔡俊, 张继平. 补阳还五汤对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5): 725-727.
- [22] 徐培敬, 张枫林, 陈颖, 等. 血小板活化因子 CD62P 和 CD63 的表达在急性脑梗死中的临床意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(9): 744-745.