

活血定眩胶囊对 CSA 模型大鼠椎动脉血流量及血浆 PAI、t-PA 水平的影响*

李清林¹, 宋敏^{1△}, 孙定平¹, 孙彬霄², 刘涛¹, 巩彦龙¹, 柴居堂³, 刘晓¹

1. 甘肃中医药大学 中医临床学院(兰州 730000); 2. 中国中医科学院(北京 100700);

3. 甘肃中医药大学附属医院 骨科(兰州 730000)

【摘要】 目的 探究活血定眩胶囊对椎动脉型颈椎病(cervical spondylosis of vertebral artery type, CSA)模型大鼠椎动脉血流量以及血浆中组织型纤溶酶原激活物(tissue type plasminogen activator, t-PA)和纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen activator inhibitor, PAI)的影响。**方法** 将 90 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组及治疗组 3 组, 每组 30 只。对照组不做处理, 模型组及治疗组采用复合造模法制造 CSA 模型大鼠。治疗组在造模 4 周后按照人鼠折算系数开始给予活血定眩胶囊药物干预 6 周。每组分别在造模前、干预前及干预后 3 个不同时间点检测椎动脉血流量及血浆 PAI、t-PA 含量。**结果** 干预前, 模型组与治疗组的椎动脉血流量均低于对照组($P<0.05$); 干预后, 治疗组高于对照组($P<0.05$)。与本组造模前分别比较, 模型组及治疗组干预前血清 PAI、t-PA 含量均升高($P<0.01$)。与对照组同期比较, 模型组及治疗组干预前 PAI、t-PA 含量升高($P<0.01$)。与本组干预前进行比较, 模型组造模后血清 PAI、t-PA 含量升高($P<0.01$), 治疗组干预后血清 PAI、t-PA 含量降低($P<0.01$)。与模型组同期比较, 治疗组干预后血清 PAI、t-PA 含量降低($P<0.01$)。**结论** 活血定眩胶囊可提高椎动脉血流量, 降低血清 PAI、t-PA 含量。

【关键词】 活血定眩胶囊 椎动脉型颈椎病 PAI t-PA

Effects of Huoxue Dingxuan Capsule Glare on Vertebral Artery Blood Flow, Plasma PAI and t-PA in CSA Rat Models

LI Qing-lin¹, SONG Min^{1△}, SUN Ding-ping¹, SUN Bin-xiao², LIU Tao¹, GONG Yan-long¹, CHAI Ju-tang³, LIU Xiao¹. 1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

△ Corresponding author, E-mail: sm@gszy.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the effects of Huoxue Dingxuan Capsule on vertebral artery blood flow, plasma plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI) in rats with cervical spondylosis of vertebral artery type (CSA). **Methods** Ninety healthy male Wistar rats were equally and randomly divided into control, model and treatment groups. The rats in the model and treatment groups were subject to composite modeling manufacturing CSA. The treatment group was given six-week interventions with Huoxue Dingxuan capsule 4 weeks after the modeling. Vertebral artery blood flow, plasma PAI, and t-PA contents were detected before modeling, prior to the interventions, and post interventions. **Results** Before the interventions, the rats in the model and treatment groups had significantly lower blood flow of vertebral artery than the controls ($P<0.05$). The model rats also had increased serum PAI and t-PA contents ($P<0.01$). After the interventions, significantly higher vertebral blood flow was found in the treatment group compared with the controls ($P<0.05$). After the interventions, increased serum PAI and t-PA contents were observed in the rats in the model group ($P<0.01$); whereas, decreased serum PAI and t-PA contents were observed in the rats in the treatment group ($P<0.01$). The treatment group had lower levels of serum PAI and t-PA contents than the model group ($P<0.01$). **Conclusion** Huoxue Dingxuan Capsule glare can improve the blood flow of vertebral artery and reduce serum PAI and t-PA contents.

【Key words】 Huoxue Dingxuan Capsule Cervical spondylosis of vertebral artery type PAI t-PA

椎动脉型颈椎病(CSA)是由于颈椎局部退行

性变引起钩小关节位移、椎关节骨质增生、颈部肌肉痉挛等刺激压迫椎动脉, 引发椎动脉狭窄、痉挛或屈曲等改变, 导致椎基底动脉供血不足而引起眩晕、眼花、耳鸣、颈项僵痛甚则昏厥等临床表现的颈椎病, 临床发病率仅次于神经根型颈椎病, 约占所有颈椎病的 20%, 近年来, 该病呈不断增加和年轻化趋

* 国家自然科学基金(No. 81360554)、甘肃省中药现代制药工程研究院开发项目(No. 230583306)、甘肃省重点中医药科研立项课题(No. GZK-2010-Z14)和甘肃省高等学校研究生导师科研项目(No. 1206-01)资助

△ 通信作者, E-mail: sm@gszy.edu.cn

势^[1-2]。活血定眩胶囊是甘肃中医药大学附属医院内制剂,经过十几年临床应用与实验研究,对CSA疗效确切,但其机理尚未明了。本研究采用复合造模方法建立CSA模型大鼠,观察活血定眩胶囊对CSA大鼠椎动脉血流量变化及血浆内源性纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)的影响,为明确CSA的血液学调控机制及活血定眩胶囊的临床推广提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

10月龄SPF级健康Wistar雄性大鼠90只,体重(300±20)g,生产许可证号为SCXK(甘)2011-0001,由甘肃中医药大学实验动物中心提供。动物购进后安静状态下适应性饲养1周,饮水饲料充足,12h明暗交替照明,室内温度(23±2)℃,相对湿度(50±10)%。

1.2 药物

活血定眩胶囊(成分:炙黄芪、丹参、粉葛、白芷等)0.5g/粒,48粒/瓶,甘肃中医药大学附属医院配置生产,批准文号:甘药制字Z20130010,批号:140816。

1.3 试剂及仪器

SR-6R多功能大鼠立体定位仪(北京)、MoorVMS激光多普勒血流监测仪(英国),大鼠PAI、t-PA酶联免疫分析试剂盒(购自上海亚培生物科技有限公司)等。

1.4 实验方法

1.4.1 模型制备及分组

按随机数字表法分为模型组、对照组及治疗组,每组各30只。适应性喂养1周后,参照文献^[3]报道的植骨压迫与离断肌肉的复合造模法,将治疗组和模型组两组大鼠麻醉后进行复合造模,术后3d内,各组均进行肌肉注射青霉素预防感染(上海公谊药业有限公司,批号:130604)16万IU/(kg·d),造模4周后进行影像学测评,证实造模成功后对治疗组大鼠进行药物干预,连续给药6周,每组分别在造模前、干预前及干预后3个时间点各取10只大鼠检测椎动脉血流量及血浆PAI、t-PA含量。

1.4.2 干预方法 参考《中药药理研究方法学》^[4]根据人大鼠的计量折算系数得出大鼠的给药剂量约为157.50mg/(kg·d);将活血定眩胶囊按50粒/250mL生理盐水溶解制备成溶剂。治疗组大鼠根

据体质量,按照人鼠折算系数给予活血定眩胶囊溶剂每天2次灌胃,模型组及对照组用等量生理盐水灌胃,每天2次。每隔7d测量体质量1次,根据变化调整用药剂量。连续干预6周。

1.4.3 检测指标及方法

1.4.3.1 椎动脉血流量检测 腹腔注射麻醉后,将大鼠俯卧固定于多功能定位仪上,备皮后,沿左侧外耳道和后眼角连线中点分离皮肤和肌肉,暴露颞弓和颞骨。用多功能定位仪标准夹持器夹持MoorVMS激光多普勒仪探头,将探头消毒后伸进切口,在颞骨表面轻度移动,观察多普勒仪上的回光度,寻找回光度超过50%的点,截取血流量,待回光度和血流量稳定后标记该点,在数据稳定后取1~2min内的数据。

1.4.3.2 血清PAI、t-PA测定 禁食12h,麻醉后,取各组大鼠股动脉血3~4mL,离心后,取血清4℃冰箱保存,一周内检测。采用酶联免疫法测定大鼠血清中PAI、t-PA含量,用酶标仪在450nm波长下测量光密度(OD)值。

1.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,均数的比较采用 t 检验,多个样本均数的两两比较采用SNK检验;计数资料采用 χ^2 检验;等级资料的相关性分析采用Spearman秩相关。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 三组大鼠干预期间一般状态比较

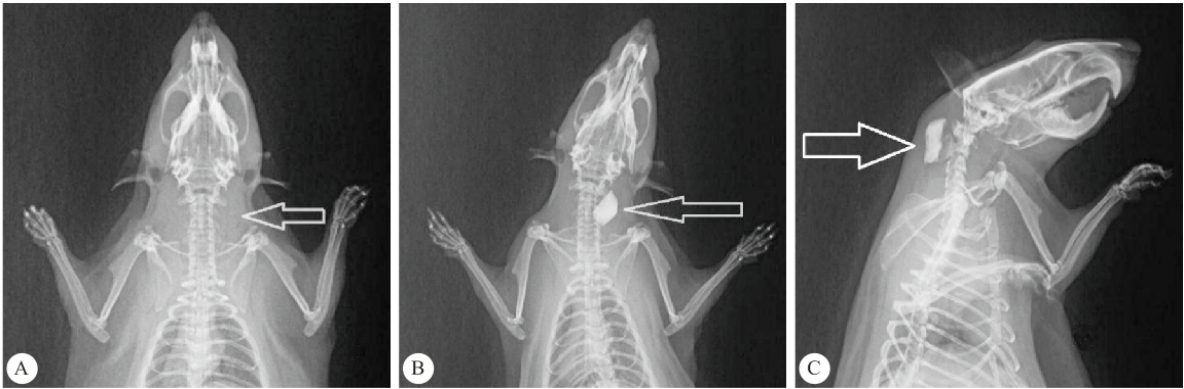
治疗组造模期间死亡2只,造模后死亡1只;模型组造模期间死亡2只;对照组无死亡。死亡大鼠后期进行补充并检测。实验动物死亡原因为麻醉过量、切口感染和肺部感染。

2.2 三组大鼠造模后颈椎影像学

见附图。造模4周时,对照组大鼠X线下颈椎显示正常。治疗组及模型组X线影像提示颈椎局部侧弯,大鼠颈部活动异常。

2.3 三组大鼠椎动脉血流量实验结果比较

见表1。3组大鼠在造模前椎动脉血流量差异无统计学意义($P>0.05$);干预前,模型组与治疗组对比,差异无统计学意义($P>0.05$),但模型组与治疗组分别与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);干预后,治疗组与对照组和模型组对比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。



附图 三组大鼠干预期间 X 线下颈椎影像学

Fig X-ray image of cervical spine in the three groups of rats during the intervention period

A: Control group; B: Model group; C: Treatment group

表 1 三组大鼠椎动脉血流量实验结果/PU, $\bar{x} \pm s$

Table 1 Experimental results of vertebral artery blood flow in the three groups of rats/PU, $\bar{x} \pm s$

Group	n	Vertebral artery blood flow		
		Pre-modeling	Pre-intervention	Post-intervention
Control	10	407.5±74.3	413.2±85.3	403.5±69.7
Model	10	406.6±62.4	346.1±77.3*·△	293.4±74.3□
Treatment	10	414.1±59.2	355.3±58.7*·△	398.1±82.2□·#

* $P<0.05$, vs. pre-modeling in the same group; △ $P<0.05$, vs. control group at the same period; □ $P<0.05$, vs. pre-intervention group; # $P<0.05$, vs. model group at the same period

2.4 三组大鼠血清 PAI、t-PA 含量比较

见表 2。各组大鼠造模前血清 PAI、t-PA 含量差异无统计学意义($P>0.05$)。与本组造模前分别比较,模型组及治疗组干预前血清 PAI、t-PA 含量均升高($P<0.01$)。分别与对照组同期比较,模型组及治

疗组干预前 PAI、t-PA 含量升高($P<0.01$)。与本组干预前进行比较,模型组干预后血清 PAI、t-PA 含量升高($P<0.01$),治疗组干预后血清 PAI、t-PA 含量降低($P<0.01$)。与模型组同期比较,治疗组干预后血清 PAI、t-PA 含量降低($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间点血清 PAI、t-PA 含量比较/(ng/mL), $\bar{x} \pm s$

Table 2 Serum PAI and t-PA levels at different time points in rats/(ng/mL), $\bar{x} \pm s$

Group	n	PAI			t-PA		
		Pre-modeling	Pre-intervention	Post-intervention	Pre-modeling	Pre-intervention	Post-intervention
Control	10	0.0317±0.0104	0.0344±0.0113	0.0326±0.0089	0.0454±0.0172	0.0447±0.0198	0.0485±0.0134
Model	10	0.0291±0.0124	0.0552±0.0121*·△	0.0647±0.0081□	0.0411±0.0118	0.0723±0.0151*·△	0.0975±0.0122□
Treatment	10	0.0306±0.0076	0.0581±0.0116*	0.0362±0.0151□·#	0.0469±0.0097	0.0684±0.0158*	0.0338±0.0173□·#

* $P<0.05$, vs. pre-modeling in the same group; △ $P<0.05$, vs. control group at the same period; □ $P<0.05$, vs. pre-intervention in the same group; # $P<0.05$, compared with the model group at the same period

3 讨论

CSA 是由于颈椎退行性改变导致椎-基底动脉供血不足而产生以眩晕为主的疾病,由 BACRE 和 LIEOU 于 1926 年率先提出。血流动力学改变是导致 CSA 椎动脉血流量减少的主要原因之一。BOON 等^[5]对 CSA 患者椎-基底动脉血流速度的研究发现,当一侧椎动脉出现狭窄时,其平均流速就会下降 17%~30%,这与本实验研究结果一致。而对侧椎动脉代偿减低时,可出现椎-基底动脉供血范围内器官的缺血,从而引发其功能障碍并产生眩晕

发作症状。在体内,血液的正常流动依赖于血管凝血-纤溶系统的动态平衡,纤溶系统包括纤溶酶、纤溶酶原、纤溶酶原的激活物以及纤溶酶原激活物抑制物,在血液中主要负责溶解已形成的纤维蛋白并防止血栓形成。纤溶酶原激活物主要以 t-PA 为主。纤溶抑制物主要包括 PAI 及纤溶酶抑制物。大量研究证实,PAI 活性增高,t-PA 活性下降会明显影响血流速度,降低血流量^[6-8]。其中 PAI 及 t-PA 对于维持血液纤溶与凝血系统的平衡稳定非常重要,这其中 PAI 起着关键作用。PAI 水平升高具有凝血酶激酶原的作用,主要来抑制 t-PA,降低血

液内源性及外源性纤溶活性。正常血管内皮细胞能分泌抗凝和纤溶蛋白,内皮功能出现障碍时,内皮细胞抗凝作用就会削弱,进而纤溶与凝血系统失衡,PAI 分泌增多,tPA 分泌减少,导致血液流速减慢,甚至引发血栓形成。

现代药理学研究证实,中药成分中的活血化瘀作用能有效阻滞血小板的聚集,降低血液粘稠度,抑制内皮素介导,改善微循环及血液流变性,增加血流量,有效的促纤溶和抗凝血^[9-10]。通过调控血液流变学,是中医药治疗椎动脉型颈椎病的方法之一^[11]。活血定眩胶囊作为甘肃中医药大学附属医院院内制剂,由宋敏教授根据多年临床经验研制,已在临床应用多年,其主要成分包括炙黄芪、菊花、天麻、桑寄生、钩藤、丹参、葛根、鸡血藤、甘草等,具有活血、定眩、通络、补益等功效。在不同药物剂量组的 CSA 大鼠研究中发现,该药能有效改善 CSA 大鼠的血液流变学指标^[12]。其中君药为黄芪,具有补气、祛瘀散结之效,可有效抑制血小板聚集,改善血液流变学、扩张血管等功效^[13]。鸡血藤、丹参、葛根为臣药,具有活血、化瘀、通络之功效,能有效改善微循环,扩张血管,抗动脉粥样硬化,抗脑缺血,保护心肌,抗血栓,抗氧化等功能^[14-16]。佐以钩藤、天麻、菊花、桑寄生定眩明目,熄风止痉,补肝益肾。其中天麻的主要有效成分天麻素可改善血管的扩张功能,提高脑组织 5-羟色胺(5-HT)水平^[17]。钩藤中含有多种吲哚类生物碱,具有镇静、降压、抗惊厥、钙拮抗剂的作用,并可以抗血栓,调节多巴胺、NE、等神经元系统功能^[18]。甘草作为使药,起调和诸药之功能。诸药合用,共奏活血化瘀、定眩止痛、通络补益之功。

本实验采用植骨压迫与离断肌肉的复合造模法建立 CSA 大鼠模型,造模 4 周后椎动脉血流量显示,模型组和治疗组血流量均低于对照组,提示 CSA 模型符合造模标准。活血定眩胶囊干预 6 周后,治疗组和模型组椎动脉血流量差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明应用活血定眩胶囊干预可增加 CSA 大鼠椎动脉血流量。比较模型组不同时期的血清 PAI、t-PA 变化,随疾病进程逐渐升高;治疗组应用活血定眩胶囊 6 周后,与同时期模型组比较,血清 PAI、t-PA 明显降低,结合椎动脉血流量结果,提示活血定眩胶囊可能通过下调血清 PAI、t-PA 来增加椎动脉血流量以达到治疗椎动脉型颈椎病的目的。

本研究仍存有不足之处,比如样本量较小,观察指标较为单一,如椎动脉中纤维生长因子 2(FGF-2)、血小板源生长因子 β 链蛋白(PDGF- β)、核因子 κ B(NF- κ B)等因子都可纳入进一步的观察检测指标。我们将在后续的实验中进一步拓宽探究思路,

深入挖掘活血定眩胶囊对 CSA 的干预机制。

参 考 文 献

- [1] 宋 敏,柴居堂,董万涛,等. 中医药防治椎动脉型颈椎病研究思路探讨. 辽宁中医杂志,2014,41(12):2579-2581.
- [2] SULTAN MJ, HARTSHORNC T, NAYLOR AR. Extracranial and transcranial ultrasound assessment in patients with suspected positional 'vertebrobasilar ischaemia'. Eur J Vasc Surg,2009,38(1):10-13.
- [3] 柴居堂,宋 敏,董万涛,等. 椎动脉型颈椎病动物模型国内研究进展及评价. 中国中医骨伤科杂志,2015,23(1):26-30.
- [4] 陈 奇. 中药药理学研究方法学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:31-33.
- [5] BONN M, SCHMITT A, LESCH KP, *et al.* Serotonergic innervation and serotonin receptor expression of NYP-producing neurons in the lateral and basolateral amygdaloid nuclei. Brain Struct Funct,2013,218(2):421-435.
- [6] RAZIEL A, KOMBERG Y, FRIEDLER S, *et al.* Hypercoagulable brombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol,2001,45(2):65-71.
- [7] CRANDALL DL, ELOKDAH H, DI L, *et al.* Characterization and comparative evaluation of a structurally unique PAI-1 inhibitor exhibiting oral *in vivo* efficacy. J Thromb Haemost,2004,2(8):1422-1428.
- [8] SHEN ZQ, DONG ZJ, PENG H, *et al.* Modulation of PAI-1 and t-PA activity and thrombolytic effects of corilagin. Planta Medica,2003,69(12):1109-1112.
- [9] VISANJJI JM, SEARGENT J, TAHRI D, *et al.* Influence of the -675 4G/5G dimorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 promoter on thrombotic risk in patients with factor V Leiden. Br J Haematol,2000,110(1):135-138.
- [10] LANIR N, AHARON A, BRENNER B. Procoagulant and anticoagulant mechanisms in human placenta. Semin Thromb Hemost,2003,29(2):175-184.
- [11] 姚立芳,曹建书,许 伟,等. 彩色多普勒超声诊断椎动脉走行变异与螺旋 CT 血管造影对比分析. 中国超声医学杂志,2008,24(6):90-92.
- [12] 宋 敏,温孝明,郭成龙,等. 活血定眩丸对治疗椎动脉型颈椎病血液流变学的影响. 时珍国医国药,2013,24(9):2167-2168.
- [13] 贺一新,石海莲,刘宏师,等. 黄芪甲苷调控 STAT1/I κ B/NF- κ B 信号通路抑制 γ -干扰素诱导 BV-2 细胞激活. 中国中药杂志,2015(1):124-128.
- [14] 富 琦,罗晓琴,唐 勇,等. 鸡血藤提取物体内抗肿瘤效应及对造血功能的影响. 中国中医药信息杂志,2008,15(12):29-31.
- [15] 赵仁霞. 丹参的现代药理研究及临床应用. 中国医药指南,2011,12(9):291-292.
- [16] 韩江全,于奎营,何 敏,等. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注侧皮质区细胞凋亡及 p-Akt(Ser473)表达的影响. 中国中西医结合杂志,2012,32(8):1069-1072.
- [17] 姜 丽,余兰彬,徐国良,等. 天麻素和葛根素在大鼠体内联合应用的药动学研究. 中国中药杂志,2015(6):1179-1184.
- [18] 戴国华,孙敬昌,齐冬梅,等. 钩藤生物碱对自发性高血压大鼠胸主动脉成纤维细胞凋亡/增殖及 FN、LN 的影响. 中国中西医结合杂志,2012,32(9):1233-1237.

(2016-01-02 收稿,2016-06-13 修回)

编辑 汤 洁