·论 著·

三七对脑出血合并VTE大鼠血小板活化因子的影响

邝晶 张志荣 祝晨 蔡丹莉 王灵聪

[摘要] **目的** 探索三七对脑出血合并VTE大鼠的血小板活化因子的影响。**方法** 将50只大鼠按随机数字表法分为空白对照组、假手术组、脑出血合并VTE模型组、阳性对照组、三七组(浓度为2.5 g/kg),每组10只,分别采取相应处理及造模;在脑出血建模成功后24 h对大鼠行头颅MRI,VTE造模后48 h结扎血管组织进行苏木精-伊红(HE)染色,并采用流式检测分析血小板活化因子CD61及CD62P表达。**结果** 大鼠头颅MRI示三七组大鼠出血量、血肿程度和梗死面积明显比模型组少或减轻;大鼠结扎血管组织HE染色镜下示模型组血管栓塞严重,而三七组血管栓塞明显好转。各组大鼠脑组织中CD61的表达量无明显差异(F=2.76,P>0.05),与空白对照组比较,模型组、阳性对照组和三七组大鼠脑组织中CD62P的表达量明显上调(t分别=-2.79、-2.06、-3.38,P均<0.05);与模型组比较,三七组大鼠脑组织中CD62P的表达量明显上调(t=-0.59,P<0.05)。各组大鼠结扎血管段组织中CD61的表达量无明显差异(F=1.76,P>0.05),与空白对照组比较,模型组、阳性对照组和三七组大鼠结扎血管段组织中CD62P的表达量明显上调(t分别=-7.69、-5.73、-4.37,P均<0.05);与模型组比较,三七组大鼠结扎血管段组织中CD62P的表达量明显下调(t=3.32,P<0.05)。**结论** 三七能一定程度上双向调节血小板活化因子CD61和CD62P的表达,对脑出血合并VTE大鼠有一定改善作用。

[关键词] 三七; 脑出血; 静脉血栓栓塞症; CD61; CD62P;

Effect of pseudo-ginseng on platelet activating factor in rats with cerebral hemorrhage complicated with venous thromboembolism KUANG Jing, ZHANG Zhirong, ZHU Chen, et al. The First Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

[Abstract] Objective To explore the effect of pseudo-ginseng on platelet activating factor in rats with cerebral hemorrhage complicated with VTE. **Methods** Totally 50 rats were randomly divided into blank control group (blank), cerebral hemorrhage combined with VTE sham operation group (sham), cerebral hemorrhage combined with VTE model group (model), positive control group (fraxiparine), and the pseudo-ginseng group (with the concentration of 2.5 g/kg) with 10 cases in each. 24 hours after brain hemorrhage model established, all rats from five groups accepted head MRI. And 48 hours after VTE model established, the HE staining was taken to the ligature vascular tissue. The flow cytometry were used to detected the expression quantity of platelet activating factor CD61 and CD62P. **Results** The head MRI showed that the intracerebral hemorrhage volume, the distribution of haematomas and the sizes of the infarct of the pseudo-ginseng group were less or smaller than the model group. And the HE staining of the ligature blood vessels tissues showed that the model group had serious vascular embolism, while the pseudo-ginseng group was obviously improved. There was no significant difference in the expression of CD61 in the brain tissue of rats among each group (F=2.76, P>0.05). Compared with the blank control group, the expressions of CD62P in the brain tissues of the rats in model group, the positive control group and the pseudo-ginseng group were obviously increased (t=-2.79, -2.06, -3.38, P<0.05). The expression of CD62P of the pseudo-ginseng group was significantly higher than that of the model group (t=-0.59, P<0.05). There was no significant difference in the expression of CD61 in the

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.04.004

基金项目:浙江省自然科学基金(LY17H29006),浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目资助(2014-108)

作者单位:310053 浙江杭州,浙江中医药大学第一临床医学院(邝晶);浙江中医药大学附属第一医院ICU(张志荣、祝晨、蔡丹莉、王灵聪)

通讯作者:王灵聪,Email:wlc501@139.com

ligature tissue of rats among each group (F=1.76, P>0.05). Compared with the blank control group, the expressions of CD62P in the ligated vascular segments of the model group, the positive control group and the pseudo-ginseng group were significantly increased (t=-7.69, -5.73, -4.37, P<0.05). Compared with the model group, the expression of CD62P of pseudo-ginseng group was significantly decreased (t=3.32, P<0.05). **Conclusion** Pseudo-ginseng can bidirectionally regulate the expression of platelet activating factor CD62P to some extent, thus to improve outcome of the cerebral hemorrhage complicated with VTE rats.

[Key words] pseudo-ginseng; cerebral hemorrhage; venous thromboembolism; CD61; CD62P

脑出血又称脑溢血[1],是指脑内血管病变出血及脑实质内血肿形成[2];而静脉血栓栓塞症(venous thromboembolism, VTE)包括深静脉栓塞(deep vein thrombosis, DVT)及肺栓塞,是老年卧床患者较常见的并发症[3]。临床上对血栓性疾病的常规治疗方法是施行内科抗凝溶栓治疗[1],但对于急性脑出血合并VTE患者,抗凝会加重脑出血风险[4-6],其早期只能采取机械预防,待脑出血稳定后方可行抗凝治疗[7]。近年来,血小板活化功能亢进是血栓形成的主要病理机制已成为公认[8],而三七又具有活血止血[9,10]双重功效,能有效影响血小板活化,从而抑制血小板的聚集,促进止血过程[11~13]。血小板膜糖蛋白CD61(cluster differentiation 61, CD61)、CD62P(cluster differentiation 62P, CD62P)能较好反应血小板活化状态[14~18]。本次研究旨在探索三七对脑出血合并VTE大鼠血小板活化因子的影响,为临床上用药提供思路。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取湖北省实验动物研究中心提供的雄性SD大鼠63只,体重200~250 g。饲养环境:22 ℃恒温,空气湿度为50%,用标准的奶头喂养。所有的程序都遵守了机构动物保健和使用委员会的指导原则。实验时间2016年7月至2017年1月。

1.2 方法

1.2.1 分组 将50只SD大鼠按随机数字表法分为空白对照组、假手术组、脑出血合并VTE模型组(模型组)、阳性对照组、三七组,共5组,每组10只。

1.2.2 模型建立 根据预实验发现脑出血造模后24 h为脑损伤高峰期,因此选择外伤后24 h为观察点T_1;VTE造模后48 h,静脉血栓达高峰,因此选择栓塞后48 h为观察点T_2。采用自由落体方法制作大鼠外伤性脑出血模型[19];采用Reyers等[20]的方法复制VTE模型;脑出血1 h后复制VTE模型以制作脑出血合并VTE模型。具体造模方法如下:①颅骨损伤手术:采用在大鼠腹腔注射10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,剃毛消毒处理后沿头部正中稍偏右切开头皮约2 cm,钝性分离软组织及骨外膜后暴露颅骨,在人字缝前方2 mm,颅骨中线旁2 mm,开直径为4 mm的圆形骨窗,保持硬脑膜完好无损。②采用自由落体方法制作脑出血模型。具体为:用一个40 g的金属重物自25 cm高处垂直坠落,撞击置在硬脑膜上的圆柱体,致伤冲击力为1000 g·cm,造成右顶叶脑挫裂伤,致伤面积为4 mm×4 mm,然后用骨蜡封闭骨窗,3-0缝线缝合头皮,将大鼠置于加热垫维持肛温在(37.0±0.5)℃。③VTE造模方式为:沿腹白线切开腹腔,钝性分离下腔静脉,用 5.0缝线在肾静脉下方2 mm处结扎下腔静脉和其主要分支,再用 5.0及3.0缝线缝合内层及外层,将大鼠置于加热垫维持肛温在(37.0±0.5)℃。假手术组只作右顶叶相应部位颅骨开窗,不致伤,和腹部开口不结扎下腔静脉和其主要分支。待大鼠苏醒后自由饮水,正常饲养。

1.2.3 处理方法 ①空白对照组:使用0.9%氯化钠注射液进行灌胃处理,但不进行任何手术处理;②假手术组:使用0.9%氯化钠注射液进行灌胃处理,进行颅骨损伤手术和DVT假手术处理;③脑出血合并VTE模型组:使用0.9%氯化钠注射液进行灌胃处理,每日两次,连续多天,并进行颅骨损伤脑出血造模,脑出血后1 h行DVT造模处理。④阳性对照组:进行颅骨损伤脑出血造模脑出血后1 h行DVT造模处理,皮下注射低分子肝素钙注射液0.01 ml/kg,一天两次;⑤三七组使用浓度为2.5 g/kg的三七进行灌胃处理,每日两次,连续多天,于灌胃第4天进行颅骨损伤脑出血造模脑出血后1 h行DVT造模处理,造模后继续灌胃,每日两次。造模后24 h,每组随机抽5只用于脑出血相关指标检测。造模后48 h,每组剩余5只用于静脉血栓相关指标检测。

1.3 观察指标

1.3.1 MRI检测 造模处理24 h时，对每组随机选取的5只大鼠头部行MRI扫描检查，采用型号为Bio-spec 70/20USR 7.0T（由Bruker公司生产）MRI机。大鼠MRI检查前12 h禁食不禁水，并用10%水合氯醛（350 mg/kg）腹腔注射麻醉，以夹趾无反应为麻醉标准。将大鼠放进MRI机检查台中，固定好后进行扫描。横轴位序列：TR 3 000 ms，TE 36 ms，层厚0.8 mm，间隔0.8 mm，视野（FOV）3 cm，矩阵256×256。完成后处死取脑组织，行流式检测。

1.3.2 苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色 造模处理48 h 后，处死剩余全部老鼠，取结扎血管段组织行甲醛固定、洗涤与脱水、浸蜡、包埋、切片、烤片和脱蜡、水化等一系列步骤后，行HE染色并制作成玻片，通过显微镜拍照，采集分析样本相关部位，并行流式检测。

1.3.3 流式检测 准备2支2 ml EP管，并做好编号标记。分别取10 μlGPIIIa-FITC和CD62p-APC用磷酸盐缓冲溶液按1:50稀释至500 μl。在对照管中加入FITC-小鼠IgG1，kappa同型对照、APC-兔IgG同型对照各20 μl。在试验管中加入GPIIIa-FITC和CD62 p-APC各20 μl。在对照管和试验管中各加入脑组织或结扎血管组织5 μl和60 μl磷酸盐缓冲溶液。轻轻混匀，室温避光孵育15～20 min。试验管中加入1 ml 4 ℃预冷的1%多聚甲醛，充分混匀，4 ℃避光放置0.5～1 h。24 h内上机检测分析CD61以及CD62P表达量。

1.4 统计学方法 利用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。计量资料均采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）来表示，计数资料采用例数（%）来表示；计量资料多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用*LSD-t*法检验。以$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRI检查结果见封二图1

由封二图1可见，空白对照组的大鼠无出血、血肿和梗死；假手术组大鼠无明显出血、血肿和梗死；模型组及阳性对照组大鼠蛛网膜下腔和脑挫裂伤周围皮下有出血现象，其中模型组右脑的面积明显大于左脑，右脑挫裂伤附近有严重的脑血肿，同时还出现大面积灰白色梗死灶；三七组大鼠蛛网膜下腔和脑挫裂伤周围皮下有轻微出血现象，右脑有明显的血肿和梗死灶出现，与模型组相比，出血量、血肿程度明显减轻，梗死面积明显减少。

2.2 HE染色结果见封三图2

从封三图2可见，空白对照组和假手术组血管组织形态正常，模型组血管栓塞严重。与模型组比较，三七组和阳性对照组的血管栓塞明显好转。

2.3 脑组织中CD61和CD62P变化见表1

表1 各组大鼠脑组织中CD61和CD62P的表达量变化

组别	n	CD61表达量	CD62P表达量
三七组	5	98.80 ± 0.00	4.65 ± 0.92*#
阳性对照组	5	97.90 ± 0.57	3.30 ± 0.29*
模型组	5	98.40 ± 0.00	2.90 ± 0.14*
假手术组	5	98.75 ± 0.07	2.10 ± 0.28
空白对照组	5	96.50 ± 0.42	1.45 ± 0.64

注：*：与空白对照组比较，$P<0.05$；#：与模型组比较，$P<0.05$。

由表1可见，各组大鼠脑组织中CD61比较，差异无统计学意义（F=2.76，$P>0.05$），而CD62P表达量比较，差异有统计学意义（F=9.30，$P<0.05$）。与空白对照组比较，模型组、阳性对照组和三七组大鼠脑组织中CD62P的表达量明显上调（t分别=−2.79、−2.06、−3.38，P均<0.05）；与模型组比较，三七组大鼠脑组织中CD62P的表达量明显上调（t=−0.59，$P<0.05$）。

2.4 结扎血管段组织中CD61和CD62P变化见表2

表2 各组大鼠结扎血管段组织中CD61和CD62的表达量

组别	n	CD61表达量	CD62P表达量
三七组	5	98.63 ± 0.49	3.00 ± 0.36*#
阳性对照组	5	98.57 ± 0.32	3.30 ± 0.17*
模型组	5	97.93 ± 0.15	3.73 ± 0.12*
假手术组	5	97.40 ± 1.31	2.27 ± 0.38
空白对照组	5	97.07 ± 1.71	2.03 ± 0.35

注：*：与空白对照组比较，$P<0.05$；#：与模型组比较，$P<0.05$。

由表2可见，各组间大鼠结扎血管段组织CD61表达量无明显差异（F=1.76，$P>0.05$），而CD62P表达量比较，差异有统计学意义（F=16.21，$P<0.05$）。与空白对照组相比，模型组、阳性对照组和三七组大鼠结扎血管段组织中CD62P的表达量明显上调（t分别=−7.69、−5.73、−4.37，P均<0.05）；三七组大鼠结扎血管段组织中CD62P的表达量较模型组明显下调（t=3.32，$P<0.05$）。

3 讨论

血小板在正常生理血液中是静息的[14]。血栓形成过程受多重因素的影响，血小板被激活，血小板

和纤维蛋白原聚集成团，最终导致血栓形成及血管的闭塞[14,16,17,21]。CD61是血小板活化时在血小板膜表面表达的糖蛋白，CD61与CD41共同形成GPⅡb-Ⅲa复合物，是血小板聚集、血栓形成的最终通道，可直接反映血小板的活化状态。血小板活化时，GPⅡb-Ⅲa复合物因构象改变而暴露出与纤维蛋白原的受体结合部位，一个纤维蛋白原可以同时和至少2个GPⅡb-Ⅲa复合物结合，血小板通过各自的GPⅡb-Ⅲa复合物相互结合而聚集起来，最终形成血栓[22,23]。CD62P也是血小板膜上反映血小板活化的一种糖蛋白[24]，亦称GMP- 140、P选择素或PADGEM蛋白（血小板活化依赖性α颗粒性膜蛋白）。它定位于静止血小板α颗粒和活化血小板的质膜上[14,16~18]，属于黏附分子选择性家族中的一种，具有介导活化血小板或内皮细胞与不同类型细胞相互黏附的功能[18,25]。

血栓形成的重要标志是血小板黏附和聚集功能增强或亢进[23]，流式细胞术作为一种先进的技术，可以快速并且高效地对活化血小板膜表面糖蛋白分子的变化进行多参数分析，从而更精确地判断血小板的活化程度和功能状态[26,27]。

本次研究结果提示三七组大鼠24 h头部MRI显示出血量、血肿程度和梗死面积明显比模型组少或减轻，表明三七可以缓解大鼠脑损伤出血情况，没有增加出血风险。结合脑组织流式细胞术检测结果显示三七组大鼠脑组织中CD62P表达量上调（$P<0.05$），表明三七在不加重大鼠脑损伤程度的同时对于脑损伤大鼠具有治疗作用。结扎血管组织HE染色表明三七和低分子肝素治疗大鼠的血管栓塞明显好转，并且结扎血管组织流式细胞术检测提示三七组大鼠结扎血管段组织中CD62P的表达量明显下调（$P<0.05$）。可见三七对于大鼠结扎血管组织处的CD62P的表达有一定抑制作用，同时可以对结扎血管组织处血栓起到治疗作用。综合上述结果来看，三七一定程度上能双向调节血小板活化因子CD62P的表达。

三七又名田七，是一味传统中药。除三七外，临床上活血化瘀药还有川芎、丹参、当归、红花等，但是有研究表明，这些活血化瘀药出血风险大[28]，而三七具有“止血不留瘀，化瘀不伤新”特点，即有止血和活血化瘀双向调节功能。三七中有效成分三七总皂苷能降低血小板表面活性，抑制血小板黏附和聚集，抗血栓形成，改善微循环[29]。三七中三七素具有止血作用，通过诱导血小板释放凝血物质而产生止血作用[30]。临床上也有运用三七来止血及抗血栓[31,32]。更有研究表明，三七治疗颅脑外伤术后DVT，效果良好，无出血副作用[33]，但该研究未探究不同剂量的三七的活血止血效果及安全性。因三七具有一定止血功效，所以对于合并有出血或出血倾向而不能使用低分子肝素的VTE患者，使用三七可以起到抗凝作用，同时不会加重出血或出血风险。

影响栓塞的有血小板、血管舒缩、凝血系统等多方面[34]，下一步将研究血管收缩及凝血系统等部分的影响，以及三七治疗对临床上急性脑出血合并VTE患者的效果。

参考文献

1 常芳．探讨脑出血保守治疗的临床疗效观察[J]. 中国现代药物应用，2017，11(3)：101-102.

2 张杰．一例脑出血合并下肢深静脉血栓，肺栓塞患者的护理[J]. 天津护理，2009，17(6)：357-358.

3 Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis[J]. Seminars in Hematology，2007，44(2)：62-69.

4 苏丽娜，王月华，卫翻娜．脑出血伴急性大面积肺栓塞的护理策略[J]. 临床合理用药杂志，2014(35)：157-158.

5 朱春海，邝晶，王灵聪．姜黄素干预急性肺栓塞不规则趋化因子后对B型钠尿肽、心肌肌钙蛋白I、D-二聚体水平的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志，2017(1)：78-81.

6 Dudley RR，Aziz I，Bonnici A，et al. Early venous thromboembolic event prophylaxis in traumatic brain injury with low-molecular-weight heparin：risks and benefits[J]. J Neurotrauma，2010，27(12)：2165-2172.

7 石莹，张志荣，蔡丹莉，等．Caprini模型对ICU患者发生静脉血栓栓塞症的预防效果[J]. 中国中西医结合急救杂志，2016，23(6)：605-608.

8 唐放鸣，耿德勤，王然，等．脑缺血病人血小板肌球蛋白轻链激酶和Ca^{2+}、Mg^{2+}-ATP酶活性及其与[Ca^{2+}]关系的研究[J]. 中风与神经疾病，1999，16(6)：361-363.

9 许智超，温燕华，李美娟，等．景天三七对阿司匹林大鼠的止血活血功效及作用机制研究[J]. 时珍国医国药，2016(1)：84-85.

10 梁璐．三七对血液系统药理活性的探讨[J]. 中国处方药，2016，14(7)：22-23.

11 陈鹏，胡晓立，雷伟亚，等．三七叶甙对兔血小板聚集功能的影响[J]. 云南大学学报自然科学版，2005，27(1)：82-85.

12 黄有荣，蒋攀峰．三七总皂甙预防兔创伤性肢体深静脉血栓形成的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志，2009，17

(3):15-17.
13 蒋贤高,林晓,黄一统,等. 三七总皂甙注射液对脓毒症凝血功能的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2010,09(4):419-421.
14 陈加俊,孙景春,韩雪梅. 短暂脑缺血发作患者血小板膜糖蛋白CD61、CD62P表达及阿斯匹林干预的临床研究[J]. 中国实验诊断学,2004,8(2):166-168.
15 傅晓岚,陈兆珍,成晓玲,等. 流式细胞仪双色术检测机采血小板活化方法[J]. 第三军医大学学报,2003,25(18):1672-1673.
16 Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation[J]. Trends Mol Med, 2004, 10(4):171-178.
17 Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion[J]. Thromb Haemost, 2001, 86(1):214-221.
18 Yang J, Zhou X, Fan X, et al. mTORC1 promotes aging-related venous thrombosis in mice via elevation of platelet volume and activation[J]. Blood, 2016, 128(5):615-624.
19 Wang JW, Wang HD, Cong ZX, et al. Puerarin ameliorates oxidative stress in a rodent model of traumatic brain injury[J].J Surg Res, 2014, 186(1):328-337.
20 Reyers I , Mussoni L , Donat I , et al . Failure of aspirin at different doses tomodify experimentalthrombosisinrats[J] . Thromb Res, 1980, 18(5):669.
21 蒋玲,任英,罗翠花. 肺栓塞与血小板活化标志物[J]. 临床肺科杂志,2007,12(7):691-692.
22 Madan M, Berkowitz SD, Tcheng JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade[J]. Circulation, 1999, 98(23):2629-2635.
23 Tarnow I, Kristensen AT, Krogh AK, et al. Effects of physiologic agonists on canine whole blood flow cytometry assays of leukocyte-platelet aggregation and platelet activation[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 123(3-4):345-352.
24 李玉峰,王士雯,周荣斌,等. 缺血性心力衰竭患者血小板功能状态的研究[J]. 中国急救医学,2001,21(6):326-327.
25 Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis[J]. Clin Res Cardiol Suppl, 2004, 93(11):855-863.
26 Michelson AD. Flow cytometirc analysis of platelets[J]. Vox SANG, 2000, 78(Suppl 2):137-142.
27 Michelson AD, Barmard M R, Krueger L A, et al. Evaluation of platelet function by flow cytometry[J]. Methods, 2000, 21(3):259-270.
28 杨大猷. 三七的临床应用[A].//全国民族医药专科专病学术研讨会论文选编[C].2001:2.
29 王阶,许军,衷敬柏,等. 三七总苷对高黏血症患者血小板活化分子表达和血小板聚集的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(4):312-316.
30 周家明,马妮,詹泽丰,等. 三七粉和三七素的止血效果对比[J].人参研究,2016,28(3):5-7.
31 徐建兵,陈其原,文竹,等. 单味三七的临床应用研究进展[J].临床合理用药杂志,2013,6(12):157-159.
32 季树仙. 三七的临床应用功效及药理分析[J]. 医学信息,2016,29(28):284.
33 李伟生,周明.三七总皂甙对颅脑外伤术后深静脉血栓形成的防治作用[J].中国医药指南,2015,13(1):28-29.
34 王灵聪,黄立权,孙晨,等.姜黄素对肺血栓栓塞症大鼠肺组织不规则趋化因子的影响[J].中华危重症医学杂志电子版,2011,4(6):4-8.

(收稿日期 2017-09-20)
(本文编辑 蔡华波)