

蝮蛇毒抑制心肌缺血再灌注损伤中血小板活化机制的探讨

高恬媛¹, 张根葆^{1,2}, 靳文¹, 季娜¹

(皖南医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 蛇毒研究所 安徽省重点实验室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨蝮蛇毒血小板抑制因子(AHV-PI) 减弱大鼠心肌缺血/再灌注(I/R) 损伤作用及其可能作用机制。**方法:** 雄性 SD 大鼠随机分为 6 组($n = 6$): 正常对照组、I/R 模型组、阳性对照组(银杏内酯 BN52021, 4 mg/kg)、AHV-PI 低、中、高剂量组(0.05、0.1、0.2 mg/kg)。行大鼠心脏冠状动脉左前降支结扎 30 min, 再灌注 120 min 制备 I/R 模型, 颈动脉取血并分离血小板, 比浊法测定血小板聚集率; TTC 染色检测心肌梗死程度; ELISA 法测定血小板中血小板活化因子(PAF) 含量。**结果:** 与正常对照组相比, I/R 组血小板聚集率上升($P < 0.05$), PAF 含量增加($P < 0.05$), TTC 染色梗死面积增加($P < 0.01$); AHV-PI 中、高剂量组血小板聚集率降低, PAF 释放减少, 心肌缺血面积减少($P < 0.05$)。**结论:** AHV-PI 可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤, 其机制可能是通过抑制 PAF 的释放, 进而抑制血小板聚集等实现的。

【关键词】蛇毒; 血小板活化因子; 心肌缺血/再灌注

【中图分类号】R 285.5; R 542.2 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.01.002

Investigation of the inhibiting effects of *Agkistrodon halys* venom on platelet activation in rats with myocardial ischemia reperfusion injury

GAO Tianyuan, ZHANG Genbao, JIN Wen, JI Na

Department of Pathophysiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the inhibiting effects of platelet inhibitor from *Agkistrodon halys* venom(AHV-PI) on the platelet activation in rats with myocardial ischemia reperfusion(I/R) injury and the potential inhibiting mechanisms. **Methods:** Male SD rats were randomized into 6 groups ($n = 6$ for each group), namely: normal control group, I/R group, positive control group (treated with inhibitor of platelet activating factor BN52021, 4 mg/kg), AHV-PI group(treated with low dose: 0.05 mg/kg; medium dose: 0.1 mg/kg; and high dose: 0.2 mg/kg, respectively). Rat models of myocardial I/R injury were developed by ligating the left anterior descending artery for 30 min, followed by 120 min reperfusion. Blood samples were obtained via carotid artery, and platelet was isolated. Turbidimetry was performed to measure the platelet aggregation rate, and TTC staining was used to detect the myocardial infarction size. ELISA was performed to determine the platelet activating factor. **Results:** Significantly increased platelet aggregation rate and PAF content as well as enlarged myocardial infarction size were seen in rats in I/R group compared to normal control group($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Marked decrease of platelet aggregation rate, reduced release of PAF and significantly improved infarction were observed in rats from AHV-PI group treated with medium and high dose of the snake venom($P < 0.05$). **Conclusion:** AHV-PI can effectively improve the myocardial I/R injury in model rats. The potential mechanisms may be associated with inhibited release of PAF release and platelet aggregation.

【Key words】 snake venom; platelet activating factor; myocardial I/R injury

心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 广泛见于临床, 是造成临床溶栓治疗、冠脉搭桥术和心脏移植失败的重要原因。血小板活化因子(platelet activating factor, PAF) 是一种磷脂递质, 血小板、中性粒细胞、肥大细胞、内皮细

胞等均可分泌, 是目前发现的作用最强的脂质递质, 也是最有效的血小板聚集诱导剂。研究表明, MIRI 可促进 PAF 释放, 激活血小板, 促进血栓形成^[1-2]。本实验室前期已经成功从皖南蝮蛇粗毒中分离纯化出蝮蛇毒血小板抑制因子(platelet inhibitor from

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2011A266); 活性生物大分子研究安徽省重点实验室项目(科基[2012]126号)

收稿日期: 2017-06-01

作者简介: 高恬媛(1992-), 女, 2015 级硕士研究生, (电话) 18255354394, (电子信箱) 920952547@qq.com;

张根葆, 男, 教授, (电子信箱) zgb858@163.com, 通信作者。

Agkistrodon halys venom, AHV-PI), 其分子质量约 31 ku。家兔在体实验发现其有抗血小板聚集的作用, 与保护血小板超微结构, 减少其颗粒内容物释放有关, 但具体作用机制尚不明确^[3]。本实验通过复制大鼠在体心肌缺血/再灌注损伤模型, 旨在观察 AHV-PI 对其作用及其可能机制, 为 AHV-PI 的临床应用提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 雄性 SD 大鼠 36 只, 体质量 (250 ± 25) g, 清洁级, 由苏州市工业园区爱尔麦特科技有限公司提供, 许可证编号: SCXK(苏)20130002。大鼠随机分为 6 组 ($n = 6$): 正常对照组、I/R 模型组、阳性对照组 (PAF 抑制剂银杏内酯 BN52021, 4 mg/kg)、AHV-PI 低、中、高剂量组 (0.05、0.1、0.2 mg/kg)。模型组经腹腔注射 1 mL 的生理盐水, 阳性对照组注射同体积的 4 mg/kg 银杏内酯 B 稀释液, AHV-PI 低、中、高剂量组注射同体积的 (0.05、0.1、0.2 mg/kg) AHV-PI。正常对照组不复制 I/R 模型, 仅腹腔注射同体积的生理盐水。

1.2 药品与试剂 AHV-PI 由皖南医学院蛇毒研究所提供; 银杏内酯 (BN52021) 购于 Sigma 公司; 血小板活化因子 (PAF) ELISA 试剂盒购于武汉华美生物工程公司; ADP 购于 Sigma 公司; TTC 试剂购于 Amresco 公司。

1.3 仪器 HX-300S 动物呼吸机 (成都泰盟科技有限公司); RM6240 生物信号采集系统 (成都仪器厂); Model-680 酶标仪美国 (Bio-Rad 公司); 血小板聚集仪 (Helena Laboratories 公司)。

1.4 I/R 模型制备 大鼠腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠 (0.3 mL/100g), 麻醉后背部固定于鼠台, 常规颈部手术, 行气管插管, 连接呼吸机, RM6240 生物信号采集处理系统监测 II 导联心电图变化。分离胸肌, 断开左侧第 2~4 肋骨, 暴露心脏, 撕开心包膜, 于肺动脉圆锥与左心耳间, 以冠状静脉为标志, 找到冠状动脉左前降支, 并于冠状动脉左前降支起始部下 2 mm 处用 6-0 手术线结扎, 手术线两端各套一个细小乳胶管圈, 拉紧结扎线使细小乳胶管压迫左冠状动脉前降支而致闭塞。以结扎后心前区发绀伴随 T 波高耸或 ST 段抬高 (>0.2 mV) 作为结扎成功的标志。结扎后立即腹腔注射给药, 结扎 30 min 后剪断结扎线, 再灌注 120 min 后采集标本。

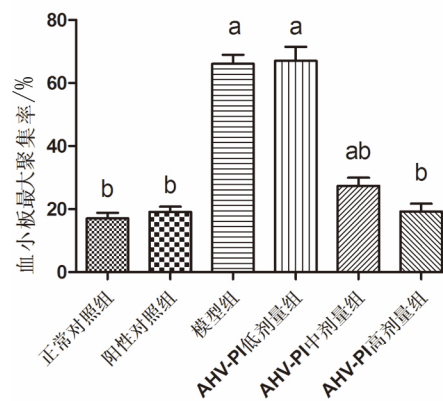
1.5 标本采集与指标检测 颈总动脉取血, 用 3.8% 枸橼酸钠 (1:9) 抗凝, 常温静置 30 min, 离心 10 min (3000 r/min) 收集血浆, 冰冻保存, 采用酶联

免疫吸附双抗体夹心法 (ELISA) 定量测定 PAF 含量; 将血样离心 (1000 r/min, 10 min) 后取富含血小板血浆 (RPR), 剩余再离心 (3000 r/min, 10 min) 取贫血小板血浆 (PPP), 采用 ADP (25 μL, 50 μmol/L) 诱导比浊法测定血小板聚集率 (取血后 2 h 内完成); 剪取心肌组织做好标记后, 立即用冰生理盐水冲净血迹, 吸水后 -70℃ 冰冻 10 min, 从心底至心尖切成 5 片, 每片厚度 2 mm, 0.2% TTC 37℃ 水浴箱中避光孵育 20 min, 观察心肌切片颜色变化 (由于缺血梗死部位乳酸脱氢酶会失活, TTC 与乳酸脱氢酶结合, 梗死部位染成白色, 非梗死部位为红色), 拍照后采用 Image J 软件计算梗死面积。梗死面积百分比 (%) = 梗死面积/横切片总面积 × 100%^[4]。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件处理, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 两两比较用 SNK- q 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AHV-PI 对缺血再灌注大鼠血小板聚集率的影响 图 1 可见, 与正常对照组相比, 模型组血小板最大聚集率上升; 与模型组相比, AHV-PI 中、高剂量组血小板最大聚集率均降低 ($F = 73.64, P < 0.05$)。



a $P < 0.05$ vs. 正常组, b $P < 0.05$ vs. 模型组。

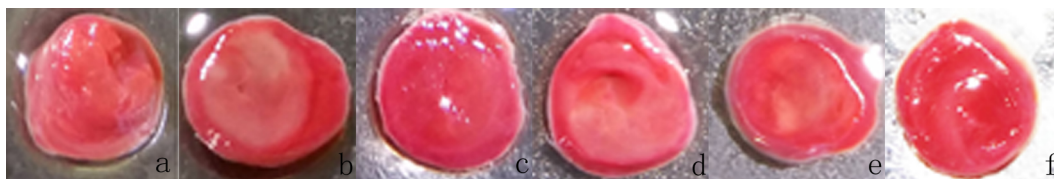
图 1 各组血小板最大聚集率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2 AHV-PI 对缺血再灌注大鼠血小板活化因子 (PAF) 含量的影响 表 1 中可见, 与正常对照组相比, 模型组中 PAF 含量增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, AHV-PI 中、高剂量组均降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

2.3 TTC 染色 由图 2 可见, AHV-PI 低剂量组与模型组的缺血梗死发白非常明显, AHV-PI 高剂量组 TTC 染色后没有明显的心肌缺血梗死发白的变化。由图 3 可见, 与模型组 [(48.04 ± 13.93)%] 相比,

阳性对照组 [(10.93 ± 1.95) %]、AHV-PI 中剂量组 [(14.76 ± 5.79) %]、高剂量组 [(3.94 ± 1.03) %]

心肌梗死面积百分比均降低 ($F = 25.46, P < 0.01$)。



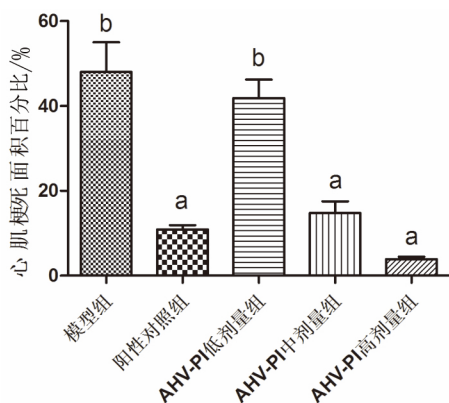
a: 正常对照组; b: 模型组; c: 阳性对照组; d: AHV-PI 低剂量组(0.05 mg/kg); e: AHV-PI 中剂量组(0.1 mg/kg); f: AHV-PI 高剂量组(0.2 mg/kg)。

图2 TTC染色后各组心肌染色结果

表1 各组大鼠血浆中 PAF 的含量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	PAF 含量/(ng/mL)
正常对照组	0.13 ± 0.07 ^b
阳性对照组	0.17 ± 0.10 ^b
模型组	5.98 ± 1.32 ^a
AHV-PI 低剂量组	5.16 ± 2.85 ^a
AHV-PI 中剂量组	2.37 ± 0.08 ^{ab}
AHV-PI 高剂量组	0.23 ± 0.06 ^b
F	27.42
P	0.00

a $P < 0.05$ vs. 正常组, b $P < 0.05$ vs. 模型组。



a $P < 0.01$ vs. 模型组, b $P < 0.01$ vs. 对照组。

图3 TTC染色后各组心肌梗死面积

3 讨论

研究发现,再灌注损伤会引起血小板的活化聚集^[5],再灌注损伤主要与血小板激活引起冠状动脉无复流现象有关。目前临床上治疗 ST 段抬高的急性心肌梗死最有效的疗法^[6]是经皮冠状动脉介入手术,但相当一部分病人手术后出现心外膜冠状动脉无复流,这是导致左心室收缩舒张功能障碍的危险因素。无复流现象形成机制包括:肿胀的心肌细胞压迫微血管;肿胀的毛细血管内皮细胞突出到毛

细血管腔;心肌细胞挛缩压迫毛细血管;中性粒细胞堵塞微脉管系统;血小板聚集、微血栓、血小板脂质碎片等栓塞毛细血管;微血管床的破坏;毛细血管痉挛和功能障碍,再灌注损伤^[6]。其中血小板在再灌注损伤引起无复流现象中扮演重要角色。血小板激活会产生微血栓导致微循环障碍,也会产生炎症介质、血管活性物质导致冠状动脉无复流,且当去除血小板后会显著减少无复流区域^[7]。

本实验室前期研究发现 AHV-PI 可以降低血浆中纤维蛋白原含量,可能具有纤溶酶活性^[3]。研究发现,PAF 与受体结合才能产生活性,结合后可使纤维蛋白原的结合位点暴露,血小板与血小板之间相互反应^[8]。BN52021 是 PAF 拮抗剂,是一种银杏叶提取物,通过降低 PAF 水平及与潜在的 PAF 受体结合产生效应^[9]。PAF 与其受体结合的复合物主要通过 5 种途径来产生活性:与 G 蛋白偶联,调控磷脂酶,调控 Ca^{2+} 浓度,调控蛋白激酶,调控基因表达^[1]。本实验利用 BN52021 进行阳性对照,旨在探讨 AHV-PI 对再灌注中产生的 PAF 的影响程度。本研究还发现模型组血小板聚集率上升,PAF 水平升高,TTC 染色显示模型制造成功,AHV-PI 中、高剂量组血小板聚集率降低,PAF 水平降低,TTC 染色梗死面积减少,这说明 AHV-PI 对大鼠心肌缺血再灌注损伤有修复作用,可以降低血小板的活化聚集。缺血再灌注中,PAF 可以通过第二信使 IP₃、DAG 等直接参与,或者通过炎性细胞活化,如血小板,多形核中性粒细胞加重缺血后心肌细胞损伤^[10-11];PAF 还可致内皮与基底的组织相连蛋白破坏,促进血小板黏附,形成小血栓,大量的炎性细胞聚集并侵入,最后在内皮细胞损伤处出现纤维蛋白沉积^[12]。

综上所述,大鼠心肌缺血再灌注损伤时血小板分泌的血小板活化因子增加,AHV-PI 可以降低血小板中 PAF 释放,减少血小板活化,降低血小板聚集率,减少心肌梗死面积,减轻再灌注损伤。

(下转第 18 页)

有研究^[9]提示高血压、吸烟、TG、HDL-C 水平在不同年龄组间无显著差异,但中青年冠心病患者较老年患者有更高的 LDL-C、TC 水平,虽然与本研究结果不完全一致,但原因可能与地域不同,生活方式、饮食习惯的差异,样本量的多少等因素有关。同时冠心病为多因素造成的疾病,本研究中的几个传统危险因素并不能涵盖所有因素,混杂的其他危险因素也有可能对研究结果造成影响。

因冠心病在不同性别中发病及表现存在差异^[10-11],故本研究按性别分组后再进一步进行对比研究发现,男、女老年冠心病患者均分别较男、女中青年组有更高的高血压病史比例,这与不区分性别时的比较结果是一致的。男性老年冠心病组较男性中青年组吸烟史比例更高,而女性老年组与女性中青年组无此差异,这与现实生活中绝大多数吸烟者为男性是相符的。男性中青年冠心病组的 BMI 超过男性老年组患者,并且有更高的 TG 水平和更低 HDL-C 水平;而女性中青年组与女性老年组无 BMI 差别,但女性中青年组有更高的 LDL-C,而 TG、HDL-C 在 2 组间差异并无统计学意义。由此我们推断在皖南地区,老年冠心病患者无论男女可能具有更高的高血压比例,老年男性吸烟比例相对于男性中青年也较高;中青年冠心病患者可能较老年有更高的 BMI 和血脂异常水平,而较高的 BMI 主要体现在男性中青年患者中。因此,我们认为,皖南地区的冠心病患者在危险因素的控制过程中,对于老年人更应关注吸烟及高血压控制情况,而对于中青年更应关注 BMI、血脂的控制。

综上所述,冠心病是多因素导致的疾病,在治疗中需兼顾各种危险因素的控制,但不同年龄段危险因素特点存在一定差别,因此需要有针对性地控制危险因素,本研究为皖南地区冠心病患者的治疗提供了一定的理论支持,但毕竟为单中心、小样本研究,其结论还需要进一步的研究证实。

【参考文献】

[1] 耿家峰,包宗明. 冠心病的危险因素及研究进展 [J]. 医学综述,2011,17(15) : 2310 - 2312.
 [2] MACK M, GOPAL A. EPIDEMIOLOGY. Traditiongal and novel risk factors in coronary artery disease [J]. Heart Fail Clin,2016,12(1) : 1 - 10.
 [3] TANG SS, CHENG J, CAI MY, *et al.* Association of lincRNA-p21 haplotype with coronary artery disease in a chinese han population [J]. Disease Markers,2016,2016: 1 - 7.
 [4] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 《中国心血管病报告 2014》概要 [J]. 中国循环杂志,2015,30(7) : 617 - 622.
 [5] ROBERT WOLK, PETER BERGER, RYAN J, *et al.* Body mass index: a risk factor for unstable angina and myocardial infarction in patients with angiographically confirmed coronary artery disease [J]. Circulation,2003,108(18) : 2206 - 2211.
 [6] 陈翔,刘达钧. 早发冠心病危险因素研究进展 [J]. 中国现代药物应用,2016,10(9) : 280 - 282.
 [7] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南 [J]. 中华心血管病杂志,2007,35(5) : 390 - 418.
 [8] 赵水平. 高甘油三酯与冠心病风险的相关性 [J]. 中华心血管病杂志,2011,39(9) : 789 - 790.
 [9] 曾敏,吴智勇,李伟,等. 老年与中青年冠心病危险因素及冠心病病变严重程度比较 [J]. 广东医学,2013,34(18) : 2798 - 2800.
 [10] 马芷琴,汪启斌. 女性冠心病研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2015,13(12) : 1395 - 1397.
 [11] 李菁,郑金刚. 女性冠心病危险因素分析 [J]. 心血管病学进展,2012,33(1) : 31 - 35.

(上接第 6 页)

【参考文献】

[1] 袁奇,张小华,乔延江. 血小板活化因子及其受体拮抗剂的研究进展 [J]. 中华中医药杂志,2011,26(7) : 1568 - 1571.
 [2] CLAUDIA PENNA, ELEONORA BASSINO, GIUSEPPE ALLOTTI. Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart [J]. Experimental Biology & Medicine,2011,236(236) : 390 - 401.
 [3] 黄璐,张根葆,闵志雪,等. 蝮蛇毒血小板抑制因子对动脉血栓形成的影响及机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学,2012,17(12) : 1355 - 1360.
 [4] YUAN Z, CAI T, TIAN J, *et al.* Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex [J]. Mol Biol Cell,2005,16(9) : 4034 - 45.
 [5] PAUL A, GURBELVICTOR L, SEREBRUANY STEVEN F, *et al.* Regional and systemic platelet function is altered by myocardial ischemia-reperfusion [J]. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 1995,1(2) : 187 - 194.
 [6] ZHOU H, HE XY, ZHUANG SW, *et al.* Clinical and procedural

predictors of no-reflow in patients with acute myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention [J]. World Journal of Emergency Medicine,2014,5(2) : 96 - 102.
 [7] MEINRAD GAWAZ. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium [J]. Cardiovascular Research, 2004,61(3) : 498 - 511.
 [8] 傅洁民. 血小板活化因子对血小板的作用 [J]. 生理科学进展, 1989,20(1) : 40 - 44.
 [9] XIA SH, XIANG XH, CHEN K, *et al.* Roles of BN52021 in platelet-activating factor pathway in inflammatory MS1 cells [J]. World J Gastroenterol,2013,19(25) : 3969 - 3979.
 [10] BITENCOURT CS, BESSI VL, HUYNH DN, *et al.* Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischemia-reperfusion-mediated tissue injury [J]. J Cell Mol Med,2013,17(12) : 1554 - 65.
 [11] 金鸣,臧宝霞,吴伟,等. 芦丁拮抗血小板活化因子与受体结合的作用 [J]. 中草药,2005,36(3) : 390 - 392.
 [12] 王志彬,张继平. 血小板活化因子研究进展 [J]. 公共卫生与预防医学,2008,19(6) : 46 - 49.