

蜜蜂蜂毒涂膜剂经皮给药对实验性脑血栓大鼠的改善作用^Δ

何苗^{1,2,3,4*}, 张枝雪^{1,2,4}, 赵海荣^{1,2,3,4}, 巫秀美^{1,2,3,4}, 赵昱^{1,2,3,4}, 张成桂^{1,2,3,4#}(1.大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南大理 671000; 2.大理大学昆虫生物医药研究院, 云南大理 671000; 3.大理大学中国西南药用昆虫及蛛形类资源开发利用2011协同创新中心, 云南大理 671000; 4.大理大学药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心, 云南大理 671000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0182-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.08

摘要 目的:研究蜜蜂蜂毒(BV)涂膜剂经皮给药对实验性脑血栓大鼠的改善作用。方法:取SD大鼠96只,随机分为假手术组(生理盐水)、模型组(涂膜剂空白基质)、尼莫地平组(阳性药物,4.00 mg/kg)和BV涂膜剂低、中、高剂量组(1.67、3.33、6.67 mg/kg),每组16只,假手术组和尼莫地平组大鼠灌胃给药,模型组和BV涂膜剂各剂量组大鼠经皮涂抹给药。连续给药5 d后,采用结扎右颈外动脉和翼静脉,同时颈内动脉注射复合血栓诱导剂的方法建立实验性脑血栓模型。分别测定大鼠右脑/左脑的湿质量比以考察梗死侧脑组织水肿程度;采用紫外分光光度法测定大鼠左右半脑中伊文思蓝(EB)含量以考察脑血管通透性;检测大鼠血液流变学和凝血功能指标;采用苏木精-伊红染色法观察大鼠脑组织病理学变化,并计数存活神经细胞数。结果:经与假手术组各指标比较显示,大鼠脑血栓模型成功建立。与模型组比较,BV涂膜剂各剂量组大鼠右侧(梗死侧)脑组织蓝染面积明显缩小,右脑/左脑湿质量比和右脑组织中EB含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);BV涂膜剂各剂量组大鼠全血黏度和卡松黏度,以及BV涂膜剂中、高剂量组大鼠血浆黏度均显著降低($P<0.01$);BV涂膜剂中剂量组大鼠凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间显著延长($P<0.01$);BV涂膜剂各剂量组大鼠脑组织病理学变化明显减轻,神经细胞排列较为整齐,结构清晰,核仁清晰,胞膜完整,存活神经细胞数显著增加($P<0.01$)。结论:BV涂膜剂能减轻脑血栓模型大鼠的脑水肿程度,抑制其脑血管通透性,改善脑血栓形成后大鼠血液流变学和凝血功能指标,减轻其缺血后神经细胞损伤。

关键词 蜜蜂蜂毒;涂膜剂;脑血栓;脑水肿;通透性;血液流变学;凝血功能

Improvement Effects of Bee Venom Plastics on Experimental Cerebral Thrombosis in Rats

HE Miao^{1,2,3,4}, ZHANG Zhixue^{1,2,4}, ZHAO Hairong^{1,2,3,4}, WU Xiumei^{1,2,3,4}, ZHAO Yu^{1,2,3,4}, ZHANG Chenggui^{1,2,3,4}
(1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali University, Yunan Dali 671000, China; 2. Institute of Insect Biology and Medicine, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 3. Southwest 2011 Collaborative Innovation Center for Development and Utilization of Medicinal Entomocutics and Arachnoidea Resource, Dali University, Yunan Dali 671000, China; 4. National-local Joint Engineering Research Center of Medicinal Specialty Entomocutics, Dali University, Yunnan Dali 671000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of Bee venom(BV) plastics on experimental cerebral thrombosis in rats. METHODS: Totally 96 SD rats were randomly divided into sham operation group (normal saline), model group (plastics blank matrix), Nimodipine group (positive drug, 4.00 mg/kg) and BV plastics low-dose, medium-dose, high-dose groups (1.67,

苦度评价的比较[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(20):118-122.

[14] 李学林,吴子丹,刘瑞新,等.口尝法评价中药汤剂苦味的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):11-13.

[15] 刘瑞新,李慧玲,李学林,等.基于电子舌的穿心莲水煎液的掩味效果评价研究[J].中草药,2013,44(16):2240-2245.

[16] 李学林,王盼盼,刘瑞新,等.3种掩味剂单独或联合应用对黄柏的掩味作用探究及掩味前后化学成分的比较[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):7-11.

[17] 王优杰,徐德生,冯怡.中药及其制剂苦味评价方法的建立[J].中国中药杂志,2007,32(15):1511-1514.

[18] LIU R, ZHANG X, ZHANG L, et al. Bitterness intensity prediction of berberine hydrochloride using an electronic tongue and a GA-BP neural network[J]. *Exp Ther Med*, 2014,7(6):1696-1702.

[19] 周中汉,王汉江,李梅,等.利用DPS剔除测量数据中的异常值[J].计量技术,2007(10):61-63.

[20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:210.
(收稿日期:2018-05-02 修回日期:2018-10-29)
(编辑:张元媛)

3.33, 6.67 mg/kg), with 16 rats in each group. Rats in sham operation group and Nimodipine group were given medicine intragastrically, while rats in model group and BV plastics groups were given medicine by transdermal smearing. After 5 days of continuous administration, the experimental cerebral thrombosis model was established by ligating the right external carotid artery and pterygomandibular artery, and injecting compound thrombus inducer into the internal carotid artery. The wet mass ratio of right brain to left brain was measured to investigate the degree of brain edema on the infarcted side. The content of Evans blue (EB) in the left and right hemispheres of rats was determined by ultraviolet spectrophotometry to investigate the cerebral vascular permeability. Blood rheology and coagulation function indicators of rats were measured. The pathological changes of brain tissue in rats were observed by HE staining, and the number of survival neuron cells was counted. RESULTS: Compared with the indexes of sham operation group, the cerebral thrombosis model was established successfully. Compared with model group, the area of blue staining in the right brain (infarcted side) of rats in BV plastics groups was significantly reduced, and the right brain/left brain wet mass ratio and the content of EB in the right brain tissue were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The whole blood viscosity and Casson viscosity of rats in BV plastics groups, and the plasma viscosity of rats in BV plastics medium-dose and high-dose groups decreased significantly ($P < 0.01$). PT and APTT of rats were prolonged significantly in BV plastics medium-dose group ($P < 0.01$). The pathological changes of brain tissue in rats in BV plastics groups were significantly alleviated. The arrangement of neuron cells was more orderly, the shape and structure of cells were clear, the nucleolus was clear, the membrane was intact, and the number of survival neuron cells was significantly increased ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: BV plastics can alleviate brain edema, inhibit cerebral vascular permeability, improve hemorheology and coagulation function indicators of rats after the formation of cerebral thrombosis, and alleviate nerve cell injury after ischemia.

KEYWORDS Bee venom; Plastics; Cerebral thrombosis; Cerebral edema; Permeability; Hemorheology; Coagulation function

血栓性疾病是由血管内形成血栓和血栓栓塞引起血液流动异常所导致的疾病,其发病率居各种疾病之首,严重危害着人类健康^[1]。血栓性疾病常伴有血液黏度增高、血小板聚集活性增高、凝血时间缩短等现象^[2]。蜂毒(Bee venom, BV)是由蜜蜂(*Apis mellifera*)尾部蛰针排出的一种透明的天然毒素,有多项研究表明, BV具有抗炎^[3]、抗凝血^[4]、抗血栓^[5]的作用,还可用于治疗中枢神经系统相关疾病^[6]。蜜蜂BV已上市的剂型主要为注射液,但其过敏和溶血现象严重^[7]。基于此,本课题组前期研制出BV涂膜剂,并通过经皮给药研究发现,该涂膜剂无过敏反应,且具有一定的抗血栓作用^[8-9]。因此,本研究通过颈内动脉注入诱导剂建立大鼠脑血栓模型,用以评估BV涂膜剂对大鼠脑组织损伤的保护作用以及对大鼠血液流变学和凝血功能的改善作用,旨在为将该涂膜剂开发为脑卒中治疗药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

TC-30K型电子天平(江苏常熟电子仪器厂); AE240型精密电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; TL-16R型台式高速冷冻离心机(上海市离心机械研究所有限公司); T96型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); SA-7000型全自动血液流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司); CA-620型全自动凝血分析仪(上海希森美康医用电子有限公司); AE21型MOTIC倒置显微镜(日本Speed Fair公司); VOR72-X-5型涡旋机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); KL-UP-UV-20KNSY1059型艾柯超纯水机(成都康宁实验专用纯水设备厂)。

1.2 药品与试剂

BV涂膜剂[实验室自制(原料药由大理大学张成桂

副教授提供,涂膜剂空白基质以卡波姆为主要原料^[10]),批号:20160517,载药量:5%];盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司,批号:10140701,规格:1 mL:1 mg);尼莫地平片(拜耳医药保健有限公司,批号:BJ29770,规格:30 mg);5'-二磷酸腺苷(5'-ADP,批号:1001918049)、凝血酶(批号:1001799554)、伊文思蓝(EB,批号:E2129)均购自美国Sigma公司;水合氯醛(深圳市丽晶生化科技有限公司,批号:20150325);丙酮(汕头市达濠精细化学品有限公司,批号:20080617);实验用水为自制超纯水。

1.3 动物

健康雄性SD大鼠,SPF级,体质量为250~300 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(湘)2016-0002。大鼠在室温25℃、湿度40%~70%、光照12 h明暗交替的条件下喂养,自由取食饮水(专用标准饲料、纯净水)。本实验全过程对动物的处置方法符合相关动物伦理学要求。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

取大鼠96只,随机分为假手术组(生理盐水)、模型组(涂膜剂空白基质)、尼莫地平组(阳性药物,4.00 mg/kg)和BV涂膜剂低、中、高剂量组(1.67、3.33、6.67 mg/kg)^[11],每组16只。给药剂量根据前期预实验结果确定。尼莫地平组大鼠灌胃尼莫地平溶液(生理盐水配制),假手术组大鼠灌胃等体积生理盐水,给药体积均为0.1 mL/kg;模型组和BV涂膜剂各剂量组大鼠参照文献[12]方法,在动物太阳穴处(即大鼠目外眦与耳之间连线近1/3处^[13])涂抹给药。

各组大鼠均连续5 d预防用药,每天1次。于末次给药后1 h,参考文献[14-15]方法,分离大鼠右侧颈总动脉

(CCA),沿CCA向前分离右颈外动脉(ECA),结扎ECA和CCA向心端,然后向颅底方向分离颈内动脉(ICA),在颅底小心分离出翼腭动脉(PPA)并结扎其根部,仅保留ICA入颅底主干部分;然后在距远心端离结扎处约1 cm处暂时夹闭ICA,在右CCA结扎处和夹闭处之间剪一小口,插入导管,让少量血液流入导管并放置10 min,使之形成小的栓子;除假手术组大鼠注射等体积生理盐水外,其余组大鼠均将此栓子和复合诱导剂(1.25 mmol/L ADP溶液、1.25万单位/L凝血酶溶液、1 g/L肾上腺素溶液以体积比100:200:5混合^[16])按0.1 mL/100 g(体质量)缓慢注入ICA,注射时打开微动脉夹使血管再通,注射完毕后再夹闭,以复制实验性脑血栓模型。

2.2 大鼠脑组织水肿程度及脑血管通透性考察

各组取8只大鼠,参考文献[17]方法,在注射生理盐水或复合血栓诱导剂10 min后,再从CCA的插入导管按0.5 mL/100 g(体质量)缓慢注入0.2% EB溶液。10 min后迅速断头取脑,用生理盐水洗去脑组织残血并以滤纸吸干,将大脑分成左右两半分别称定湿质量,并计算右脑/左脑的湿质量比,以考察梗死侧脑组织水肿程度。

将左右半脑组织分别置于匀浆器中,按5 mL/g加入0.5% Na₂SO₄溶液-丙酮混合液(体积比3:7),制成匀浆液。将样本匀浆液置于加盖试管中,密封,于4 ℃静置1 h;然后以4 000 r/min离心10 min,取上清液,以空白匀浆液调零,在620 nm波长下测定吸光度(A)。另取EB适量,以0.5% Na₂SO₄溶液-丙酮混合液(体积比3:7)制成0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0、4.8、5.6、6.4、7.8、8.0 μg/mL的系列溶液,分别在620 nm波长处测定A;以EB质量浓度(c, μg/mL)为横坐标、A为纵坐标进行线性回归分析,得线性标准曲线 $A=0.1053c-0.0054$ ($r=0.9996$)。将大鼠脑组织样本匀浆上清液所测A值代入该标准曲线,计算大鼠左右半脑EB含量,以考察大鼠脑血管通透性。

2.3 大鼠血液流变学和凝血功能指标检测

各组剩余8只大鼠在注射生理盐水或复合血栓诱导剂后缝合,单笼饲养。24 h后,按0.35 mg/kg(体质量)腹腔注射10%水合氯醛溶液麻醉大鼠。使用一次性负压肝素钠抗凝管在大鼠腹主动脉快速取血4 mL,采用全自动血液流变测试仪测定全血低切黏度(10 s⁻¹)、全血中切黏度(60 s⁻¹)、全血高切黏度(200 s⁻¹)、血浆黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度;另使用一次性负压枸橼酸钠抗凝管于大鼠腹主动脉快速取血2 mL,采用全自动凝血分析仪测定凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)及纤维蛋白原(FIB)含量。

2.4 大鼠脑组织病理学观察

取“2.3”项下麻醉取血后大鼠,开胸暴露心脏,在左心室心尖部位剪一小口,从该处插灌流管至升主动脉根

部,用夹子将灌流管固定;在右心耳剪一小口用于灌流液流出,先用100 mL生理盐水快速灌流,然后使用4%中性多聚甲醛200 mL缓慢灌注。灌流完毕后迅速断头取脑,去除嗅球及小脑,置于10%中性缓冲福尔马林液中继续固定24 h。然后在冠状位视交叉前后切取厚度约为2 mm的脑组织块,常规脱水,石蜡包埋,连续冠状切片(厚度为4~5 μm)。将脑组织切片置于37 ℃温箱内过夜烤干,再进行苏木精-伊红(HE)染色。在光镜下选取右脑组织(梗死侧)3个视野观察皮质的病理学变化,并在40×10倍镜下计数单位面积(cm²)中细胞膜和核膜均完整的存活神经细胞数。

2.5 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用最小显著差检验(LSD检验);不符合正态性或方差不齐的数据,采用Mann-Whitney检验比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BV涂膜剂对大鼠脑组织水肿程度和脑血管通透性的影响

肉眼观察可见,假手术组大鼠脑组织无明显蓝染;模型组大鼠右侧脑组织有明显蓝染,染色部分涉及到整个脑半球,包括皮层大部分区域和尾壳核区,表明该侧脑组织发生梗死;尼莫地平组和BV涂膜剂各剂量组大鼠右侧脑组织部分蓝染,但面积明显缩小。各组大鼠注射EB后脑组织染色图见图1,大鼠脑组织冠状切片各部位解剖示意图见图2(注:图1中箭头处为蓝色;图2中CX-1为额顶骨皮层运动区,CX-2为上侧部分额顶骨躯体感觉区,CX-3为下侧部分额顶骨躯体感觉区,CP-m为中部尾壳核区,CP-1为侧边尾壳核区)。

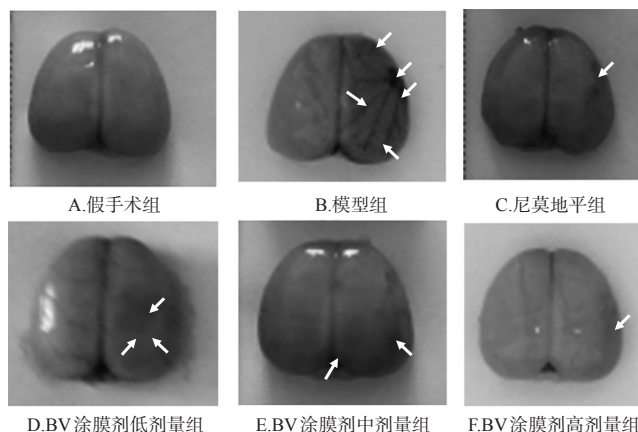


图1 各组大鼠注射EB后脑组织染色图

Fig 1 Brain tissue staining pictures of rats in each group after injecting EB

梗死侧脑组织水肿程度及脑组织中EB含量测定结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠右脑/左脑湿质量比和右侧脑组织EB含量均显著升高,差异均有统计学

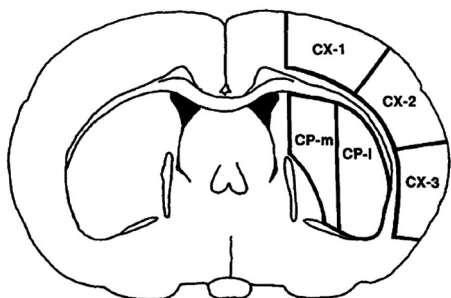


图2 大鼠脑组织冠状切片各部位解剖示意图

Fig 2 Anatomical diagram of various parts of coronal section of rat brain tissue

意义($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平组和BV涂膜剂各剂量组大鼠右脑/左脑湿质量比和右侧脑组织中EB含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各组大鼠左侧脑组织中EB含量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠右脑/左脑湿质量比及左右半脑中EB含量检测结果见表1(注:表中各组大鼠因造模时分血管失败或后续死亡等情况导致有不等数量的减少,故 n 值有时低于8,以下各表同)。

表1 各组大鼠右脑/左脑湿质量比及左右半脑中EB含量检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of right brain/left brain wet mass ratio and the content of EB in the left and right brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, mg/kg	右脑/左脑湿质量比	脑组织中EB含量, $\mu\text{g/g}$	
				左脑	右脑
假手术组	6		1.00 ± 0.04	4.21 ± 0.92	4.90 ± 0.88
模型组	6		1.12 ± 0.05**	4.01 ± 0.92	17.57 ± 5.69**
尼莫地平组	8	4.00	1.05 ± 0.04*	3.73 ± 0.80	7.76 ± 3.58**
BV涂膜剂低剂量组	8	1.67	1.04 ± 0.09*	5.32 ± 1.08	6.31 ± 1.87**
BV涂膜剂中剂量组	8	3.33	1.04 ± 0.06**	3.49 ± 0.91	10.35 ± 6.79**
BV涂膜剂高剂量组	8	6.67	1.02 ± 0.08**	4.72 ± 1.17	9.93 ± 4.58**

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 BV涂膜剂对大鼠血液流变学和凝血功能指标的影响

3.2.1 全血黏度 与假手术组比较,模型组大鼠的全血低切、中切、高切黏度均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平组与BV涂膜剂各剂量组大鼠全血低切、中切、高切黏度均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。各组大鼠全血黏度检测结果见表2。

3.2.2 血浆黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度 与假手术组比较,模型组大鼠血浆黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组大鼠血浆黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);BV涂膜剂各剂量组大鼠卡松黏

表2 各组大鼠全血黏度检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of whole blood viscosity of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, mg/kg	全血黏度, mPa·s		
			低切(10 s^{-1})	中切(60 s^{-1})	高切(200 s^{-1})
假手术组	8		10.58 ± 1.17	6.07 ± 0.72	5.12 ± 0.64
模型组	6		15.37 ± 1.07**	8.26 ± 0.50**	6.81 ± 0.39**
尼莫地平组	8	4.00	11.72 ± 1.64**	6.47 ± 0.79**	5.39 ± 0.62**
BV涂膜剂低剂量组	8	1.67	13.07 ± 1.51**	7.01 ± 0.69**	5.77 ± 0.54**
BV涂膜剂中剂量组	8	3.33	12.67 ± 0.85**	6.84 ± 0.35**	5.65 ± 0.26**
BV涂膜剂高剂量组	6	6.67	12.65 ± 1.06**	6.91 ± 0.55**	5.85 ± 0.37**

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.01$

度均显著降低,BV涂膜剂中、高剂量组大鼠血浆黏度均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),但红细胞聚集指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血浆黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度检测结果见表3。

表3 各组大鼠血浆黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Results of plasmatic viscosity, erythrocyte aggregation index and Casson viscosity of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, mg/kg	血浆黏度, mPa·s	红细胞聚集指数	卡松黏度, mPa·s
假手术组	8		1.46 ± 0.09	7.73 ± 0.85	3.55 ± 0.41
模型组	6		1.60 ± 0.11**	9.22 ± 0.28**	4.64 ± 0.23**
尼莫地平组	8	4.00	1.49 ± 0.09*	8.52 ± 0.61*	3.75 ± 0.38**
BV涂膜剂低剂量组	8	1.67	1.53 ± 0.11	9.28 ± 0.82	3.92 ± 0.35**
BV涂膜剂中剂量组	8	3.33	1.46 ± 0.05**	9.12 ± 0.62	3.86 ± 0.16**
BV涂膜剂高剂量组	6	6.67	1.47 ± 0.08**	8.84 ± 0.50	3.95 ± 0.32**

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2.3 凝血功能 与假手术组比较,模型组大鼠PT显著缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$);APTT缩短,FIB含量有升高趋势,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,BV涂膜剂中剂量组大鼠PT和APTT显著延长,差异均有统计学意义($P < 0.01$);BV涂膜剂各剂量组大鼠FIB含量有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠TT均无明显变化($P > 0.05$)。各组大鼠凝血功能指标检测结果见表4。

表4 各组大鼠凝血功能指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Results of coagulation function indicators of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量, mg/kg	PT, s	APTT, s	TT, s	FIB, g/L
假手术组	8		20.99 ± 7.40	70.45 ± 15.50	29.45 ± 5.80	2.93 ± 0.54
模型组	6		15.34 ± 1.75*	54.99 ± 3.13	30.30 ± 1.98	3.59 ± 0.33
尼莫地平组	8	4.00	16.93 ± 4.74	58.10 ± 6.58	30.68 ± 1.80	3.45 ± 0.64
BV涂膜剂低剂量组	8	1.67	17.03 ± 4.41	64.49 ± 14.23	30.63 ± 2.96	3.27 ± 0.70
BV涂膜剂中剂量组	8	3.33	21.20 ± 2.19**	72.50 ± 7.74**	32.63 ± 2.06	3.37 ± 0.44
BV涂膜剂高剂量组	6	6.67	18.74 ± 5.98	59.95 ± 14.35	30.13 ± 3.01	3.34 ± 0.52

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.01$

3.3 BV涂膜剂对大鼠脑组织病理学变化和神经细胞存活数的影响

镜下观察可见,假手术组大鼠脑细胞排列整齐,核仁清晰、核圆形,胞膜完整;模型组大鼠脑组织神经细胞及间质细胞水肿明显,细胞胞体皱缩、变形,细胞及血管周围间隙增大,胞核浓缩着色较深,有神经细胞自溶及坏死现象;尼莫地平组大鼠脑组织细胞核清晰,未见明显坏死现象;BV涂膜剂各剂量组大鼠脑组织细胞核仁清晰,胞膜完整,神经细胞及间质细胞仅有轻微水肿。存活神经细胞计数结果显示,与假手术比较,模型组大鼠脑组织存活神经细胞数显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,尼莫地平组和BV涂膜剂各剂量组大鼠脑组织神经细胞数均显著增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。各组大鼠缺血侧脑组织病理学显微图见图3,存活神经细胞数检测结果见表5。

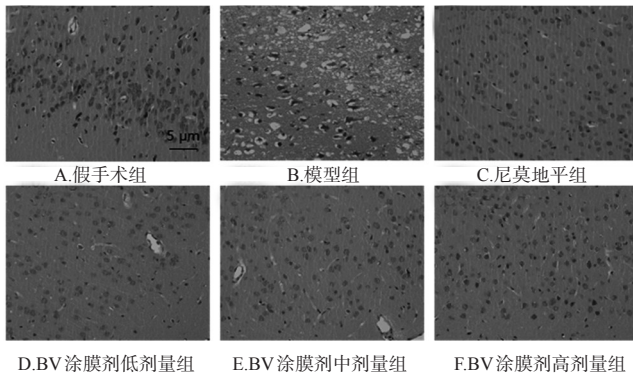


图3 各组大鼠缺血侧脑组织病理学显微图(HE染色, 40×10)

Fig 3 Histopathological micrographs of brain tissue in ischemic side of rats in each group(HE staining, 40×10)

表5 各组大鼠缺血侧脑组织存活神经细胞数检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Results of the number of alive neuron cells of brain tissue in ischemic side of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量,mg/kg	存活神经细胞数,个/mm ²
假手术组	8		214.00±24.64
模型组	6		83.75±15.80**
尼莫地平组	8	4.00	130.75±10.02 ^{##}
BV涂膜剂低剂量组	8	1.67	121.25±14.40 ^{##}
BV涂膜剂中剂量组	8	3.33	122.63±4.34 ^{##}
BV涂膜剂高剂量组	6	6.67	123.25±15.42 ^{##}

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

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, ^{##} $P<0.01$

4 讨论

血栓性疾病严重危害着人类健康和生命,而对于血栓性疾病的研究,有效的动物模型是必不可少的。例如Kudo M等^[18]采用颈内动脉注入自体血栓凝块诱导动物

形成脑栓塞;Zhang Z等^[19]从大鼠ECA逆行插管至ICA,在大脑中动脉起始部注入凝血酶诱导血栓形成。目前所报道的各种脑血栓动物模型均有其各自的优缺点,其中血栓栓塞法制作局灶性脑梗死动物模型更接近人类缺血性卒中病理过程,且不需开颅、创伤小、制作简单、缺血效果可靠^[20]。脑血栓不是通过单一途径形成的,而是由血管内皮损伤与血管收缩、血小板聚集与释放、纤维蛋白凝固等多种途径共同诱发形成^[21]。研究证实,ADP可诱导血小板聚集,使小血管及毛细血管通透性升高,破坏血脑屏障^[22];凝血酶易使血液中的纤维蛋白原转变成纤维蛋白,促使血液凝固^[23];肾上腺素能促使血管收缩,增强ADP和凝血酶激活血小板的作用,有助于血栓形成^[24]。因此,本课题组综合上述文献方法,采用ADP、凝血酶和肾上腺素作为复合诱导剂,通过结扎ECA和PPA、从ICA注射该诱导剂和小血栓子从而诱导血栓形成,该造模方法操作简单、缺血效果可靠,能更好地模拟人体脑血栓发病的病理生理过程。

尼莫地平作为一种双氢吡啶类钙离子拮抗剂^[25],可选择性地作用于脑血管平滑肌,易通过血脑屏障(BBB),与中枢神经的特异性受体结合,从而扩张脑血管,增加脑血流量,减轻脑水肿,降低血液流变学各项指标^[26-27]。因此本研究选择尼莫地平作为阳性药物进行灌胃给药,用以验证模型是否成功建立。

BBB是一种高度选择性渗透屏障,脑缺血性损伤过程中BBB表现为通透性破坏^[28]。EB作为一种荧光染料,在BBB被破坏后易进入脑组织。同时,缺血后脑组织缺血缺氧,可使BBB的通透性升高,进而引起脑水肿。因此,通过测定脑组织中EB含量可反映脑血管的通透性,测定右脑/左脑湿质量比可反映脑组织水肿程度。本研究结果显示,建立大鼠脑血栓模型后,模型组大鼠的右脑/左脑湿质量比显著高于假手术组,表明模型组大鼠右侧脑组织发生明显水肿;注射EB后,模型组大鼠右侧脑组织染成蓝色,颅底颜色较深,而左侧脑组织未见蓝染,且模型组大鼠右脑中EB含量明显高于左脑并高于假手术组同侧组织。这表明在本研究条件下,大鼠右侧脑梗死模型成功建立。而给予不同剂量的BV涂膜剂进行干预后,大鼠右脑/左脑湿质量比和右脑组织中的EB含量都较模型组显著降低,且肉眼观察可见其右侧脑组织蓝染面积明显缩小。这提示BV涂膜剂能抑制复合诱导剂诱导的大鼠脑血栓形成,减轻脑水肿并抑制脑血管通透性的增加。

血栓形成后会阻碍血液循环,使全身或局部的血流速度减慢,在局部形成涡流,并使血液凝血功能异常、血液流变学各项指标异常^[29]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠的全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度和FIB含量均显著升高,PT明显缩短,表明脑血栓模型大鼠的血液呈现高黏稠状态。而

低、中、高剂量BV涂膜剂干预能使大鼠全血黏度和卡松黏度均显著降低;中、高剂量BV涂膜剂干预能使大鼠血浆黏度显著降低;此外,BV涂膜剂还能延长大鼠PT和APTT,以中剂量BV涂膜剂的效果较为显著,推测可能与BV的治疗窗较窄有关;但BV涂膜剂对FIB和TT的作用效果不明显。这提示BV涂膜剂能改善模型大鼠血液流变学,在一定程度上能抑制脑血栓的形成和发展。

经HE染色后观察发现,模型组大鼠脑组织梗死灶中心区域可见神经细胞排列不规则、稀疏甚至消失等明显病理变化,存活神经细胞计数显著减少;而给予BV涂膜剂干预后,大鼠脑组织上述病理学变化明显减轻,神经细胞排列较为整齐,结构清晰,核仁清晰,胞膜完整,存活神经细胞数显著增加,表明BV涂膜剂可改善大鼠脑梗死侧神经病理学损伤。

综上所述,BV涂膜剂能减轻脑血栓模型大鼠的脑水肿程度,抑制其脑血管的通透性,改善脑血栓形成后大鼠的血液流变学和凝血功能指标,减轻缺血后神经细胞损伤。

(致谢:感谢大理大学药用特种昆虫国家地方联合工程研究中心研究平台!感谢国家自然科学基金委、云南省应用基础研究重点项目的支持!感谢所有参与、指导此实验的老师和同学!)

参考文献

[1] 孙秀波,付春毅,张亚同,等.新型抗血小板聚集药物:替格瑞洛的研究进展[J].中国药房,2015,26(14):2010-2013.

[2] 王辉,刘刚,罗顺德.莲心碱对血小板聚集、凝血功能和血栓形成的影响[J].中国药理学通报,2010,26(6):768-772.

[3] KIM WH, AN HJ, KIM JY, et al. Beneficial effects of melittin on ovalbumin-induced atopic dermatitis in mouse[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):1-12.

[4] ZOLFAGHARIAN H, MOHAJERI M, BABAIE M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time[J]. *J Pharmacopunc*, 2015, 18(4):7-11.

[5] 刘自元,孟令瑜,吴围屏,等.蜂毒有效成分分离及其抗血栓作用的研究[J].中国生化药物杂志,1998,19(6):381-383.

[6] KIM JI, YANG EJ, LEE MS, et al. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease[J]. *Int J Neurosci*, 2011, 121(4):209-217.

[7] 刘红云,童富淡.蜂毒的研究进展及其临床应用[J].中药材,2003,26(6):456-458.

[8] 朱凤.ZF-3涂膜剂的抗血栓作用研究及其初步安全性评价[D].大理:大理大学,2017.

[9] 黄茜,胡园,张成桂,等.蜜蜂蜂毒涂膜剂对SD大鼠动静脉旁路血栓形成的影响[J].中国民族民间医药,2017,26(20):45-49.

[10] 金玲,王锦玉,仝燕,等.涂膜剂研究概述[J].中国实验方

剂学杂志,2012,18(8):277-280.

[11] 张枝雪,黄茜,李玥,等.膜翅目昆虫提取物Ento-II涂膜剂的镇痛及活血化瘀作用研究[J].中草药,2018,49(9):2108-2113.

[12] 金凡茂,张枝雪,王音,等.Ento-I涂膜剂对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].国际药学研究杂志,2016,43(3):504-508,528.

[13] 白妍.电针太阳、印堂穴对大鼠睡眠功能的神经-免疫调节及脑电活动影响的实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2004.

[14] 张兆岩,郭述,苏曹霞,等.大鼠大脑中动脉血栓形成模型的建立[J].解放军医学杂志,2001,16(6):423-425.

[15] 齐刚,张莉,李长龄,等.绞股蓝总皂苷对血小板聚集和血栓形成的影响[J].中草药,1997,28(3):163-165.

[16] 李萍,杜洪霞,侯进,等.白藜芦醇对大鼠实验性脑血栓形成的影响[J].时珍国医国药,2010,21(9):2391-2392.

[17] 苏梅,陈群英,段晓波,等.脑脉利颗粒对实验性脑血栓模型保护作用研究[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(1):1-5.

[18] KUDO M, AOYAMA A, ICHIMORI S, et al. An animal model of cerebral infarction: homologous blood clot emboli in rats[J]. *Stroke*, 1982, 13(4):505-508.

[19] ZHANG Z, ZHANG RL, JIANG Q, et al. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(2):123-135.

[20] 包玉龙,杜佳林,张宏,等.大鼠脑血栓动物模型研究进展[J].实验动物科学,2009,26(6):50-52.

[21] 甄丽芳.七十味珍珠丸对缺血性脑卒中动物模型药效学及机制的研究[D].广州:南方医科大学,2014.

[22] 章靓,陈旺,庞文生,等.血栓形成机制及血小板膜糖蛋白IIb/IIIa受体拮抗剂的研究进展[J].国际药学研究杂志,2009,36(4):268-271.

[23] 郭莹莹.天麻酚性成分抗血栓形成作用及机制研究[D].昆明:云南中医学院,2014.

[24] 陈杰.抑肽酶对血小板PAR1活化保护机理的研究[D].重庆:第三军医大学,2003.

[25] 吴俊华.凝血酶抑制剂研究进展[J].生命科学仪器,2006,4(5):3-10.

[26] WURPEL JN, IYER SN. Calcium channel blockers verapamil and nimodipine inhibit kindling in adult and immature rats[J]. *Epilepsia*, 1994, 35(2):443-449.

[27] 李孟,张晓华.尼莫地平的药理作用及临床应用[J].中国实用医药,2013,8(19):201-202.

[28] 冯金花,魏子孝,李涛.健脑补肾丸联合尼莫地平对血管性痴呆患者血液流变学和认知功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(5):182-184.

[29] 刘信桥,钱冠清,金惠铭.血液流变性障碍在血栓形成中的作用[J].微循环技术,1993(2):104-108.

(收稿日期:2018-05-12 修回日期:2018-11-29)

(编辑:段思怡)