

血康口服液对家兔血小板减少性紫癜模型的作用机理研究

葛卫红¹, 郭建友², 楼云雁³, 石森林¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 中国科学院心理研究所, 北京 100000; 3. 杭州市第四医院, 浙江 杭州 310000)

摘要:目的:研究血康口服液对ITP模型家兔免疫学作用机理。方法:采用免疫法腹腔注射外源性抗血清(APS)建立家兔血小板减少性紫癜模型,分别运用血康口服液、泼尼松治疗,观察各组家兔外周血象、T淋巴细胞亚群、脏器均重、免疫器官病理变化。结果:与模型组比较,血康口服液高、低剂量组和强的松治疗组均能明显提升血小板,使骨髓巨核细胞数恢复正常。T淋巴细胞亚群功能改善。结论:血康口服液对家兔紫癜动物模型有明显治疗作用,其机理主要是通过对细胞免疫功能的调节而发挥作用。

关键词:血康口服液;血小板减少性紫癜;机理

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-7717(2007)01-0151-03

免疫性血小板减少性紫癜(ITP)是一种以血液中血小板计数减少,骨髓中巨核细胞正常或增多,出现多部位、多脏器自发性血溶的临床常见出血性疾病,其发病机理是由于同种抗体或自身抗体与血小板膜抗原结合,引起血小板破坏增多,致使外周血液循环中血小板数量减少而发病。目前临床上药物治疗效果不理想,缺乏有效的治疗药物。本实验旨在研究血康口服液对家兔紫癜动物模型的免疫学作用机理,为血康口服液治疗ITP提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 动物 豚鼠体重180~220g,3周龄,全雌,共40只。家兔52只,体重1.8~2.2kg,雌雄各半。以上动物均购自中国医学科学院上海动物所。

1.1.2 药品 血康口服液:江西天狮中药集团(批号:20020922),瑞氏染色液:杭州天和微生物试剂有限公司(批号:20010925),磷酸氢二钠:湖州化学试剂厂(批号:020601),磷酸二氢钠:湖州化学试剂厂(批号:020901),ACD:上海血液中心(批号:020403),泼尼松(020708),5mg片溶于0.9%生理盐水中制备成1mg/mL浓度的药液待用。

1.1.3 试剂 Goat anti mouse antigen (anti-CD3-fite; anti-CD4-fite; anti-CD8-fite)购自美国 phamingen 公司

1.1.4 仪器 FACS Cablier 流式细胞仪(美国 BD 公司)、全自动血细胞计数分析仪、倒置生物显微镜(OLUMPUS)等。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠抗家兔血清的制备 取家兔4只,采集全血于ACD液中(6:1,pH4.5),每只家兔最少为50mL,共400mL。离心分离血小板,然后用0.01M pH7.4的PBS液洗涤3次,并混悬血小板,得血清大致在160mL,向每只豚鼠腹腔注射血小板 10^9 致敏(约1.5mL)。隔1个月如前法进行第2次注射,在第2次注射后第6天,经腹主动脉穿刺采血,每只豚鼠取全血7mL,分离血清,并用洗涤和包裹过的兔红细胞

(1:1)及洗涤过的兔淋巴细胞各吸附1次,分离此血清,分装后贮存在冰箱备用。

1.2.2 模型的制备 用硫喷妥钠麻醉家兔,血康口服液高剂量组、低剂量组、模型组和阳性对照组家兔于耳缘静脉推注抗血清2.5mL,共需约80mL血清;对照组家兔推注等量的生理盐水。

1.2.3 动物分组及给药 家兔随随机分为5组,每组8只,分别为血康口服液高剂量组、低剂量组、模型组、空白对照组和阳性对照组。血康高剂量组以20mL/kg、低剂量组以1mL/kg灌胃,造模后每日给药1次,连续给药7天。①正常对照组:给同等体积生理盐水。②ITP模型生理盐水对照组:给同等体积生理盐水。③强的松阳性对照组:临用配成1mg/mL浓度,以0.5mg/kg剂量灌胃。

1.3 实验指标

1.3.1 日常行为及血常规 首先每日观察家兔的饮食和饮水状况,第7天后家兔心脏取血于EDTA- Na_2 管,进行血常规检查。

1.3.2 血小板黏附率测定 另取家兔血置于12mL球形瓶中,将球形瓶固定于转盘上,以3r/min旋转15min,使血液与瓶壁充分接触。取以上从EDTA- Na_2 管中取血1mL和球形瓶接触的血各1mL于两个大试管中,然后各试管加入0.109M枸橼酸钠溶液19mL,混合均匀,室温下静置2h,取上清液直接加入计数盘作血小板计数,然后计算血小板黏附率。血小板黏附率=接触前后血小板差值/接触前血小板 $\times 100\%$ 。

1.3.3 骨髓巨核细胞检查 处死家兔,取胸骨制作骨髓片,以瑞氏液染色后油镜下计数1.5cm \times 1cm范围内检查骨髓巨核细胞总数

1.3.4 血小板超微结构观察 电镜观察。

1.3.5 测定 家兔心脏取1mL血于EDTA- Na_2 管中,进行T淋巴细胞亚群NK α 、IL-2及PAIgG、PAIgM、PAIgA、CD $_3$ 、CD $_4$ 、CD $_8$ 、CD $_4$ /CD $_8$ 测定,以流式细胞仪测定。

2 实验结果

2.1 行为学及出血情况

家兔造模后可见饮食饮水减少,活动减少,安静少动,

收稿日期:2006-08-22

作者简介:葛卫红(1969-),男,浙江临海人,副研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药新药与药理研究。

对刺激不敏感等特征,模型治疗组和模型对照组均未死亡,外观无出血症状。第7天解剖后,模型组可见有6只家兔背臀部皮下呈片状出血灶,双肺也可隐约见到出血灶,血康低剂量治疗组有2只家兔肋间散在出血灶,高剂量组和强的松阳性组,空白组未见出血灶。血常规结果可见与空白组比较,白细胞数下降($P < 0.05$),红细胞、血红蛋白及血小板数则升高($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。血康高剂量组给药治疗后白细胞数显著下降($P < 0.01$),红细胞、血红蛋白及血小板数则降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。强的松阳性组趋势相同,但与模型组比较没有统计学意义。见表1。

表1 血康口服液对紫癜模型家兔治疗后各组血常规变化($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	WBC (千/ μ L)	RBC (百万/ μ L)	HB (g/dL)	PLT (千/ μ L)
正常对照组	10.70 \pm 2.9 Δ	6.4 \pm 2.0 Δ	13.2 \pm 3.0 Δ	543.4 \pm 149.0 $\Delta\Delta$
模型组	15.50 \pm 4.1	5.0 \pm 1.1	10.3 \pm 1.7	352.7 \pm 73.2
血康高剂量组	10.90 \pm 1.8 $\Delta\Delta$	6.3 \pm 0.7 Δ	12.6 \pm 0.9 Δ	499.3 \pm 108.4 $\Delta\Delta$
血康低剂量组	11.55 \pm 1.8 Δ	5.4 \pm 0.8 $\Delta\Delta$	11.1 \pm 1.4 $\Delta\Delta$	444.5 \pm 88.9 Δ
强的松组	12.20 \pm 5.4	5.2 \pm 0.5	11.0 \pm 1.8	480.3 \pm 179.4

注:与模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2 对骨髓巨核细胞的影响

模型组与正常对照组相比,骨髓巨核细胞明显增多($P < 0.01$);血康口服液高剂量给药和强的松治疗后,骨髓巨核细胞数恢复正常;血康口服液低剂量组治疗后,骨髓巨核细胞亦有恢复,虽未至正常,但较模型组已有显著差异($P < 0.01$)。见表2、图1、图2。

表2 血康口服液对ITP模型家兔骨髓巨核细胞影响($n = 16, \bar{x} \pm s$)

组别	骨髓巨核细胞数(个/每片)
正常对照组	27.94 \pm 12.80 $\Delta\Delta$
模型组	63.75 \pm 14.21
血康高剂量组	33.06 \pm 9.01 $**\Delta\Delta$
血康低剂量组	44.38 \pm 10.02 $\Delta\Delta$
强的松组	32.19 \pm 8.02 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与正常对照组比: $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

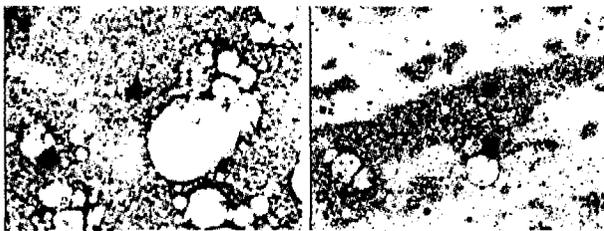


图1 ITP模型胸骨骨髓染色 图2 血康给药后骨髓染色

2.3 血小板黏附率实验结果

血小板在机体凝血过程中,发挥着黏附、聚集,释放凝血因子的作用,不仅需要充足的数量,还需要正常的功能。血小板聚集率普遍低于正常,显示本病除血小板数量减。正常对照组与模型组比较血小板黏附率明显下降($P < 0.01$);经过血康口服液药物治疗后,血小板黏附率明显提高,与正常组没有显著差异($P > 0.05$);阳性对照组也显

著提高血小板黏附率,与正常组没有差异($P > 0.05$)。见表3。

表3 血康口服液对ITP模型家兔血小板黏附率影响($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	血小板黏附率(%)
正常对照组	44.35 \pm 7.23 $\Delta\Delta$
模型组	31.33 \pm 4.22
血康高剂量组	42.46 \pm 5.58 $\Delta\Delta$
血康低剂量组	39.59 \pm 4.27 $\Delta\Delta$
强的松组	41.23 \pm 5.41 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.4 PAIgG PAIgM PAIgA测定结果

模型组PAIgG、PAIgM、PAIgA均较正常组有明显上升($P < 0.01$),以血康治疗后则有明显下降,但与正常组仍有明显差异($P < 0.01$)。阳性对照组也相同。见表4。

表4 血康口服液对紫癜模型家兔治疗后PAIgG变化($ng/mL, n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	PAIgG	PAIgM	PAIgA
正常对照组	1.40 \pm 0.15 $\Delta\Delta$	0.63 \pm 0.17 $\Delta\Delta$	0.14 \pm 0.04 $\Delta\Delta$
模型组	11.40 \pm 4.20	2.57 \pm 0.58	0.47 \pm 0.11
血康高剂量组	4.70 \pm 1.90 $\Delta\Delta$	1.73 \pm 0.29 $\Delta\Delta$	0.23 \pm 0.11 $\Delta\Delta$
血康低剂量组	6.90 \pm 2.00 $\Delta\Delta$	1.00 \pm 0.43 $\Delta\Delta$	0.30 \pm 0.09 $\Delta\Delta$
强的松组	3.10 \pm 1.50 $\Delta\Delta$	1.13 \pm 0.26 $\Delta\Delta$	0.21 \pm 0.06 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与正常对照组比: $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

2.5 NK α IL-2测定结果

模型组NK α 、IL-2均较正常组有明显上升($P < 0.01$),以血康高、低剂量治疗后则有明显下降,但与正常组仍有明显差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);阳性组治疗后,与正常组比较已没有统计学差异($P > 0.01$)。见表5。

表5 血康口服液对紫癜模型家兔治疗后NK α IL-2变化($ng/mL, n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	NK α (ng/mL)	IL-2 (u/mL)
正常对照组	21.0 \pm 2.8 $\Delta\Delta$	45.4 \pm 5.7 $\Delta\Delta$
模型组	11.7 \pm 3.1	34.8 \pm 9.5
血康高剂量组	18.1 \pm 3.2 $\Delta\Delta$	40.6 \pm 5.8 $\Delta\Delta$
血康低剂量组	16.3 \pm 3.6 $\Delta\Delta$	41.9 \pm 6.7 $\Delta\Delta$
强的松组	18.4 \pm 2.5 $\Delta\Delta$	43.8 \pm 8.1 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与正常对照组比: $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

2.6 CD $_3$ CD $_4$ CD $_8$ 及CD $_4$ /CD $_8$ 值比较

模型组CD $_3$ 、CD $_8$ 、CD $_4$ /CD $_8$ 的比值与正常组比较,显著降低($P < 0.01$),而CD $_4$ 值则下降。血康治疗后CD $_3$ 、CD $_8$ 值显著下降,与正常组比较已无统计学差异;CD $_4$ 上升恢复,但与正常比较仍有差异。强的松治疗后CD $_3$ 、CD $_8$ 值显著下降,与正常组比较没有显著差异,CD $_4$ 值出现比模型组还低的想象。各治疗组显著提高CD $_4$ /CD $_8$,但与空白组比较仍有显著差异($P < 0.01$)。见表6。

2.7 血小板超微结构观察

经扫描电镜观察,可见模型组血小板形态不规则,胞浆颗粒减少,伪足形成,相邻血小板界线模糊。经血康口服液治疗后则胞浆颗粒增多,接近正常。强的松治疗后相同。

当归 红芪超滤膜提取物对急性心肌缺血大鼠 NO 和 CK-MB 影响的实验研究

万生芳

(甘肃中医学院中医诊断教研室,甘肃 兰州 730000)

摘要:目的:观察当归、红芪及当归红芪合剂(当归:红芪=1:5)超滤膜提取物对急性心肌缺血大鼠血清一氧化氮(nitric oxide, NO, 下同)、肌酸激酶同功酶(creatine kinase-MB, CK-MB, 下同)的影响,探讨当归、红芪及其合剂对缺血心肌的保护作用及其机制。方法:以冠状动脉前降支结扎法制造急性心肌缺血模型;造模成功后,32只大鼠随机分为1、3、7、14天组,每组8只;采用拉丁方设计实验方法并对动物进行用药;用酶还原法测定血清NO含量;用全自动生化仪测定血清CK-MB含量。结果:血清NO含量与血清CK-MB含量在不同时间组大鼠之间和不同药物组大鼠之间均有显著差异($P < 0.01$)。结论:当归、红芪及其合剂超滤膜提取物具有降低心肌缺血大鼠血清NO含量和降低血清CK-MB活性的作用,且与用药时间有关。中药对缺血心肌的保护作用可能与用药时间有关。

关键词:当归;红芪;超滤膜;急性心肌缺血;NO;CK-MB

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-7717(2007)01-0153-03

Experimental Research on Effects of Ultra-filtration Extract from *Angelica Sinensis* and *Hedysarum Polybotrys* and Their Mixture on NO and CK-MB on Rat with Myocardial Ischemia

WAN Sheng-fang

(Diagnosis Staff Room of TCM, Gansu College of TCM, LANZHOU 730000, Gansu, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of ultra-filtration extract from *Angelica sinensis* (AS), *Hedysarum polybotrys* (HP)

表6 血康口服液对紫癜模型家兔治疗后各组淋巴细胞亚群变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	CD ₃ (%)	CD ₄ (%)	CD ₈ (%)	CD ₄ /CD ₈
正常对照组	68.3±4.6 ^{△△}	57.9±4.4 ^{△△}	19.3±1.7 ^{△△}	2.9±0.3 ^{△△}
模型组	76.2±3.7	44.9±3.2	25.8±6.7	1.8±0.1
血康高剂量组	70.6±6.2 [△]	47.4±6.2 ^{**}	18.4±4.3 ^{△△}	2.4±0.3 ^{△△**}
血康低剂量组	71.7±6.2 [△]	50.4±7.8 ^{△△}	21.3±2.3 ^{△*}	2.3±0.2 ^{△△**}
强的松组	70.0±5.2 ^{△△}	41.7±9.6 ^{**}	19.4±2.2 ^{△△}	2.3±0.3 ^{△△**}

注:与模型组比较:△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$;与正常对照组比:* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

原发性血小板减少性紫癜(ITP)是一种自身免疫性血小板减少症。血小板减少的机制是由于自身免疫功能异常导致血液中产生血小板相关抗体(PAIgG),使循环中血小板破坏增加。ITP患者骨髓巨核细胞总数增高,并有成熟障碍,在细胞免疫中,由于NK_a存在缺陷,产生IL-2等淋巴因子减少,使T细胞的增殖减低,尤其是CD8的抑制功能减退,从而导致B细胞分泌自身抗体,引起血小板破坏增加。本实验通过对家兔的血小板减少性紫癜模型的研究,

表明血康口服液能调节细胞免疫功能,通过增加免疫调节细胞如NK活性,分泌IL-2等淋巴因子,调整T细胞的比值平衡,增加CD8功能,以致B细胞产生抗体,使血小板破坏减少,并能促进巨核细胞成熟,为临床治疗免疫性血小板减少性紫癜提供了实验依据。

参考文献

- [1] 杨宇飞,麻柔. 免疫性血小板减少性紫癜实验动物模型研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志,1995,1(3):43-45
- [2] 杨宇飞,周嵩祥. 特发性血小板减少性紫癜中医研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(11):699-702
- [3] 傅汝林,刘为民. 归脾冲剂对免疫性血小板减少性紫癜动物模型实验研究[J]. 中医药学刊,2001,19:312-313
- [4] 朱华峰,张红. PAIg 诊断骨髓巨核细胞不增多ITP的价值[J]. 中国免疫学杂志,2001,17(6):335-336
- [5] 刘宏潇,傅汝林. 中医药治疗特发性血小板减少性紫癜研究进展[J]. 贵阳中医学院学报,2001,23(1):45-49
- [6] 纪树奎,陈惠仁. 脾照射治疗老年特发性血小板减少性紫癜的临床和实验研究[J]. 中国老年学杂志,2000,7(20):282-285
- [7] 史苍柏,秦克力. 中药止血散治疗特发性血小板减少性紫癜的临床和实验研究[J]. 中医药信息,1999,1:44-45
- [8] 黄振魁,周永明. 生血灵治疗原发性血小板减少性紫癜的临床与实验研究[J]. 实用中西医结合杂志,1997,10(20):1951-1954
- [9] 谢伟. 原发性血小板减少性紫癜中医药治疗现状浅析[J]. 河北中医,1996,18(3):48

收稿日期:2006-08-31

作者简介:万生芳(1971-),女,甘肃兰州人,讲师,硕士,主要从事心脑血管疾病的防治和研究工作。