

寒凝血瘀模型大鼠红细胞膜生物学研究

牛雯颖, 张禹, 卞敬琦, 武爽, 冯月男, 张瑶, 肖洪彬*

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**从血液流变学和红细胞膜生物学变化探讨寒凝血瘀证在红细胞膜上的生物学差异。**方法:**20 只 Wistar 大鼠,随机分为空白组及寒凝血瘀组,每组 10 只。寒凝血瘀组大鼠置于 0~1℃冰水中 8~10 min,待大鼠全身僵直后取出,连续造模 14 d,第 15 天大鼠皮下注射盐酸肾上腺素 0.8 mL·kg⁻¹(0.8 mg·kg⁻¹),共 2 次,间隔 4 h,2 次之间将大鼠置于冰水中浸泡 5 min,末次造模后禁食不禁水 12 h。次日以乌拉坦 1 g·kg⁻¹麻醉,固定,取血测定血液流变学指标以及红细胞膜组分相关指标。**结果:**与空白组比较,寒凝血瘀组大鼠体重显著降低($P < 0.05$);全血黏度显著增高($P < 0.05$);血浆黏度及血脂无显著变化;红细胞变形指数在 600,800,1 000 s⁻¹切变率下均显著降低($P < 0.05$);血沉 K 值显著升高($P < 0.05$);APTT(活化部分凝血活酶时间)降低极显著($P < 0.01$);FIB(纤维蛋白原)含量显著升高($P < 0.05$);TT(凝血酶时间)、PT(凝血酶原时间)无显著影响,但有降低趋势;Na⁺-K⁺-ATP 酶活力、唾液酸含量及 SOD(超氧化物歧化酶)活力均显著降低($P < 0.05$);MDA(丙二醛)含量及膜胆固醇含量有升高趋势但无显著差异;巯基含量有降低趋势,但无显著差异。**结论:**寒凝血瘀模型可能由于红细胞膜上 Na⁺-K⁺-ATP 酶、唾液酸及 SOD 的减少导致全血黏度及红细胞变形性发生改变。

[关键词] 寒凝血瘀;血液流变学;红细胞膜;生物学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0204-04

[doi] 10.11653/syfy2013120204

Biological Study on the Activity of Erythrocyte Membrane in Rats with Cold Stagnation and Blood Stasis

NIU Wen-ying, ZHANG Yu, BIAN Jing-qi, WU Shuang, FENG Yue-nan, ZHANG Yao, XIAO Hong-bin*
(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate biological difference in hemorheology and erythrocyte membrane in rats with blood stasis caused by cold stagnation. **Method:** Twenty Wistar rats were randomly assigned to blank control group and cold stagnation and blood stasis group, 10 rats in each group. These rats were put into ice water (0-1℃) for 8-10 minutes until the rats were tunic everyday, and the duration of modeling was 14 days. On the day of 15, 0.8 mL·kg⁻¹ adrenalin hydrochloride was subcutaneously injected, the interval duration was 4 hours. Hemorheology indexes and activity of erythrocyte membrane were determined after 15 days. **Result:** Compared with blank control group, weight of rats in model group was decreased significantly. The whole blood viscosity was increased significantly ($P < 0.05$). There were no significant change in plasma viscosity and blood-fat. The red cell deformability index was decreased significantly ($P < 0.05$). Blood sedimentation K value and the content of fibrinogen (FIB) of rats in model group was increased significantly. Activated partial thromboplastin time (APTT) was decreased significantly while thrombin time (TT) and prothrombin time (PT) showed no significant change. Super oxide dismutase (SOD) and Na⁺-K⁺-ATP enzyme activity of erythrocyte membrane were decreasing and the content of sialic acid was decreased ($P < 0.05$). There was no significant change in the content of malondialdehyde

[收稿日期] 20130103(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173186);黑龙江省博士后项目;黑龙江中医药大学优秀创新人才项目支持

[第一作者] 牛雯颖,助理研究员,黑龙江中医药大学博士后科研流动站在站工作人员,E-mail:nwy012603001@126.com

[通讯作者] *肖洪彬,Tel:0451-82193409,E-mail:hrbxiaohongbin@126.com

(MDA) and plasma cholesterol. The content of hydrosulphonyl was no change. **Conclusion:** In cold stagnation and blood stasis model the decreased content of sialic acid, SOD and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme activity of erythrocyte can be found membrane which maybe one of the mechanism of increasing deformability of erythrocyte and improving the blood viscosity.

[**Key words**] cold stagnation and blood stasis; hemorheology; erythrocyte membrane; biology

血瘀证是许多复杂性重大疾病过程中的常见证候,也是中西医结合研究最为活跃的领域之一。从20世纪60年代开始,中医药工作者就开始了血瘀证及活血化癥治法的研究,随着科学技术的不断进步,人们对疾病的认识更加深入,有关血瘀证及活血化癥治法的研究也不断深入,相关研究更加活跃。该文章从寒凝血瘀这种公认的血瘀证动物模型入手,借助已建立的红细胞膜生物学特征研究平台,探求寒凝血瘀证在红细胞膜上的生物学差异。今后将为方药活血化癥机制的研究提供参考价值。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 老龄大鼠 20 只(15~17 周龄),雌雄各半,体重(262±19.2)g。由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(黑)2008004。

1.2 受试药物 盐酸肾上腺素(由西南药业股份有限公司生产,生产批号为 111001)。

1.3 仪器 Anthos2010 酶标仪(郑州博赛生物工程有限责任公司),BECKMAN 低温超速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司),LBY-N6B 型血液黏度仪(北京普利生仪器有限公司),LBY-BX 型红细胞变形仪(北京普利生仪器有限公司),TGL-16G 型高速台式离心机(上海医用分析仪器厂),Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),蒸发光散射检测器 ELSD 2000(美国 Alltech 公司),LBY-XC 全自动动态血沉测试仪(北京普利生仪器有限公司)。

1.4 试剂 甲醇(色谱纯,美国迪马技术有限公司),甲醇(分析纯,西陇化工股份有限公司),氯仿(分析纯,天津市化学试剂六厂分厂),胆固醇对照品(美国, Sigma 公司),胆固醇试剂盒(CHO,中生北控生物科技股份有限公司,批号 11304100),甘油三酯,(TG,中生北控生物科技股份有限公司,批号 11503100),纤维蛋白原(FIB,批号 1320351),凝血酶原时间(PT,批号 105178),凝血酶时间(TT,批号 121076),活化部分凝血活酶时间(APTT,批号 111035),均为上海太阳生物技术有限公司。

2 方法

2.1 分组及模型的复制 大鼠 20 只,雌雄各半,按

体重随机分为 2 组,即寒凝血瘀组和空白组,寒凝血瘀组每天按照下述造模方法造模,连续 14 d。空白组灌胃蒸馏水。每天上午 9 点将 10 只大鼠浸入直径 40 cm 水深 15~20 cm 内壁光滑的 2 个塑料圆筒中,冰水温度 0~1℃,待大鼠全身僵直后取出。每天冰水浴后再给食物正常饲养,每天每只大鼠按照 120 g·kg⁻¹ 喂食,连续造模 14 d,第 15 天大鼠皮下注射盐酸肾上腺素 0.8 mL·kg⁻¹(0.8 mg·kg⁻¹),共 2 次,间隔 4 h,2 次之间将大鼠置于冰水中浸泡 5 min,末次造模后禁食不禁水 12 h。次日以乌拉坦 1 g·kg⁻¹ 麻醉,固定,取血进行指标的测定。

2.2 红细胞膜的制备 取新鲜肝素抗凝血 2 mL 以及枸橼酸钠抗凝血 6 mL。其中枸橼酸钠抗凝血以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,除去中间的白细胞和血小板层,再以 1:3 比例加入等渗 pH 7.4 PBS,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,反复洗涤 3 次,最终得到干净的红细胞。按照 1:80 比例向红细胞中加入预冷的 5 mmol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 溶液^[1],同时加入 0.1 mmol·L⁻¹ 蛋白酶抑制剂 PMSF(对甲苯磺酰氟),超声 15 min(80 Hz,20℃),放入 4℃ 冰箱过夜使其充分溶血。红细胞溶血液以 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清液,加入 5 mmol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 溶液以 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,反复洗涤 3 次,最后得到乳白色膜,将其 1:1 悬浮在 PBS 溶液中,膜蛋白定量后置于低温冰箱备用。

2.3 血液流变学指标检测

2.3.1 全血黏度的测定 取肝素抗凝血 1 mL,用 LBY-N6B 型血液黏度仪测定全血黏度。

2.3.2 血浆黏度的测定 取肝素抗凝血 1 mL 离心 3 000 r·min⁻¹,10 min,取血浆用于血浆黏度测定。

2.3.3 血沉 K 值的测定 取肝素抗凝血 0.5 mL 加入血沉管,用血沉测试仪进行测定。

2.3.4 红细胞变形性的测定 取肝素抗凝血 20 μL,加入 15% PVP 悬浮液 1 mL 中混匀,吸取 500 μL 采用 LBY-BX 型红细胞变形仪进行测定,剪切参数分别为 600 s⁻¹,800 s⁻¹,1 000 s⁻¹。

2.3.5 血脂含量的测定 取枸橼酸钠抗凝血离心

(3 000 r·min⁻¹, 10 min)取血浆,全自动生化分析仪对 CHO(胆固醇)、TG(甘油三酯)进行测定。

2.3.6 凝血 4 项的测定 取枸橼酸钠抗凝血的血浆按照试剂盒说明书测定 FIB,PT,TT 和 APTT。

2.4 红细胞膜组分变化

2.4.1 红细胞膜胆固醇含量测定 取制备好的红细胞膜液 0.5 mL,加入 2.5 mL 提取液(氯仿:甲醇 2:1),向膜液中每加入 0.5 mL 涡旋振荡器剧烈振荡一会,直至全部加完后,避光室温静置 2 h,取下层有机层 2 mL,作为供试品溶液。

2.4.2 红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性测定 采用比色法测定红细胞膜上 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。

2.4.3 红细胞膜唾液酸及巯基含量测定 根据试剂盒说明书检测红细胞膜上唾液酸及巯基含量。

2.4.4 红细胞膜 SOD 及 MDA 水平检测 根据试剂盒说明书检测红细胞膜上 SOD 和 MDA 水平。

2.5 统计学处理 统计学方法采用 SPSS 16.0 软件处理所得数据,选用 One-way ANOVA 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 造模前后大鼠动物表征观察及体重变化

3.1.1 造模前后大鼠动物表征观察^[2] 造模前两组大鼠均活动正常,反应灵敏,毛色浓密有光泽,鼠尾温度正常。造模 2 周后寒凝血瘀组大鼠体重有下降趋

势,蜷缩、少动、爱聚集抱团、毛色暗淡,毛发稀疏易脱落、耳部和爪尖出现不同程度的瘀血、尾部出现瘀斑,尾尖紫黑或外皮脱落,尾温降低、便溏。

3.1.2 造模前后大鼠体重变化情况 各组大鼠于造模前、造模 1 周末、2 周末观察模型复制方法对大鼠体重影响。与空白组比较,造模前大鼠体重无明显差异;造模 1 周后,寒凝血瘀组大鼠体重有下降趋势,但无显著差异;造模 2 周后,模型组大鼠体重明显下降($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 寒凝血瘀模型大鼠造模前后体重变化($\bar{x} \pm s, n = 10$) g

组别	造模前	造模 1 周	造模 2 周
寒凝血瘀	262.9 ± 27.7	252.3 ± 31.31	252.2 ± 39.5 ²⁾
空白	264.8 ± 29.6	284.3 ± 45.3	320.9 ± 55.8

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.2 血液流变学指标

3.2.1 全血黏度及血浆黏度 与空白组比较,对全血黏度在 3 s⁻¹, 30 s⁻¹, 200 s⁻¹切变率下寒凝血瘀组均显著增高($P < 0.05$);血浆黏度无明显变化。见表 2。

3.2.2 红细胞变形性和血沉 K 值 与空白组比较,对红细胞变形指数在 600 s⁻¹, 800 s⁻¹, 1 000 s⁻¹切变率下寒冷刺激组均显著降低($P < 0.05$);与空白组比较,血沉 K 值寒凝血瘀组显著升高($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 寒凝血瘀模型大鼠全血黏度及血浆黏度的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	全血黏度/mPa·s				血浆黏度 /mPa·s
	3 s ⁻¹	30 s ⁻¹	60 s ⁻¹	200 s ⁻¹	
寒凝血瘀	21.66 ± 4.44 ¹⁾	7.52 ± 2.50 ¹⁾	5.64 ± 1.28	4.49 ± 0.63 ¹⁾	1.328 ± 0.476
空白	15.26 ± 4.14	5.71 ± 0.40	4.92 ± 0.78	3.74 ± 0.18	1.229 ± 0.299

表 3 寒凝血瘀模型大鼠红细胞变形性及血沉 K 值的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	红细胞变形指数			血沉 K 值
	600 s ⁻¹	800 s ⁻¹	1 000 s ⁻¹	
寒凝血瘀	41.10 ± 4.18 ¹⁾	44.21 ± 3.84 ¹⁾	46.30 ± 3.66 ¹⁾	0.008 9 ± 0.007 6 ¹⁾
空白	45.11 ± 5.06	48.13 ± 4.47	50.20 ± 4.13	0.003 4 ± 0.001 4

3.2.3 血脂含量及凝血 4 项的测定 与空白组比较,对血浆 CHO 和 TG 均无明显的影响;对 APTT 寒凝血瘀组降低极显著 $P < 0.01$;对 FIB 含量寒凝血瘀组显著升高($P < 0.05$);对 TT,PT 无显著影响,但有降低趋势。见表 4。

3.3 红细胞膜组分变化 与空白组比较,寒凝血瘀组 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力、唾液酸含量及 SOD 活力均

显著降低($P < 0.05$);MDA 含量及膜胆固醇含量有升高趋势,巯基含量有降低趋势,但都无显著差异。见表 5。

4 讨论

血瘀是指血液运行迟缓,甚或不通畅的病理状态,造成这种病理状态有很多原因。《内经》中有载“天寒日阴,则人血凝泣而卫气沉”,这与现代医学

表4 寒凝血瘀模型大鼠血脂含量及凝血4项的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	CHO/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	APTT/s	TT/s	PT/s	FIB/s
寒凝血瘀	0.82 ± 0.29	0.40 ± 0.22	3.63 ± 9.16 ²⁾	21.32 ± 7.95	12.45 ± 2.11	1.63 ± 0.63 ¹⁾
空白	0.93 ± 0.23	0.47 ± 0.19	14.83 ± 4.84	24.26 ± 8.70	12.84 ± 1.26	0.97 ± 0.38

表5 寒凝血瘀大鼠红细胞膜各成分的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶 / $\mu\text{molPi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	唾液酸 / $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	巯基 / $\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA / $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	胆固醇 / $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$
寒凝血瘀	0.237 ± 0.131 ¹⁾	0.35 ± 0.09 ²⁾	0.119 ± 0.038	1.258 ± 0.591 ¹⁾	3.374 ± 0.90	0.35 ± 0.08
空白	0.390 ± 0.074	0.60 ± 0.20	0.152 ± 0.073	2.516 ± 1.246	2.726 ± 0.479	0.32 ± 0.12

所认为的外界气温降低,血液黏稠,运行迟滞相类似。但当某种原因所致血行迟缓出现病理表现时,如寒冷刺激引发心脑血管意外可认为是病理的“血行迟缓”,即血瘀^[3-7]。本实验将大鼠置于冰水中,施以全身寒冷刺激,随着造模时间的延长,动物出现蜷缩,少动,尾温下降等类似阳气受损的表现,耳尖、爪尖不同程度的出现瘀斑,在造模结束时,多数大鼠出现尾尖瘀斑甚至紫黑,从表征上分析,大鼠出现明显血瘀表现。

本实验借助已经建立的红细胞膜成分研究的平台,从红细胞膜分子角度探讨寒凝血瘀证的生物学差异。红细胞膜成分方面检测了膜上唾液酸含量、Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、巯基、SOD 活性、MDA 含量等。唾液酸是红细胞膜表面负电荷的主要来源,负电荷之间的相互排斥可以防止细胞间相互聚集,若唾液酸含量减少,则细胞间聚集性增加,而促进凝血^[8]。本实验中寒凝血瘀模型红细胞膜表面唾液酸含量显著降低,表明血液流变学异常与细胞膜唾液酸减少进而使红细胞表面负电荷减少有关。维持红细胞正常形态功能的另一个重要因素是红细胞膜表面的 Na⁺-K⁺-ATP 酶,在能量转换、信息传递方面及维持细胞结构功能方面具有重要作用。本实验中寒凝血瘀模型红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性均较空白组明显降低,会使红细胞内失 K⁺ 增多,水分将随 Na⁺ 进入胞内,而使红细胞体积增大,甚则如球形而水肿破裂。本实验中寒凝血瘀模型红细胞膜 SOD 活性明显下降,说明模型清除自由基能力减弱。另外一个影响血液黏度的重要的血细胞因素是红细胞的聚集性,通过血沉 K 值测定红细胞的聚集程度。寒凝血瘀组血沉 K 值增加明显,可能与该组大鼠血浆纤维蛋白原含量增加有关。凝血四项中 APTT 时

间寒凝组明显缩短,提示其处于高凝状态,这与前面相关讨论结果相一致。APTT 降低在临床上提示内源性凝血系统异常。

综合上述实验结果与分析,本实验中寒凝血瘀组大鼠表现为全血黏度增加,红细胞变形性下降,聚集性增强,提示内源性凝血系统存在异常,可能与红细胞唾液酸含量减少,Na⁺-K⁺-ATP 酶及 SOD 活性减弱有关。

[参考文献]

- [1] Crepaldi Domingues C, Ciana A, Buttafava A, et al. Resistance of human erythrocyte membranes to Triton X-100 and C12E8[J]. J Membr Biol, 2009,227(1):39.
- [2] 王琨. 血瘀证动物模型体表特征及生物学基础研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.
- [3] 谷万里,张俏,史载祥. 寒凝血瘀证动物模型的研究述评[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(6):89.
- [4] 王学江,丰平. 寒凝血瘀证动物模型的实验研究[J]. 北京中医,2000,19(5):52
- [5] 成秀梅,杜惠兰,李丹,等. 桃红四物汤对寒凝血瘀模型大鼠卵巢血管舒缩因子的影响[J]. 中药药理与临床,2011,27(1):5.
- [6] 谷万里,史载祥,贾海忠,等. 可视光血氧饱和度评价寒凝血瘀心肌缺血大鼠微循环的实验研究[J]. 微循环学杂志,2010,20(2):80.
- [7] 吴卓霖,林一帆,王承利,等. 寒凝血瘀型胃溃疡大鼠模型的建立及冬胃颗粒保护作用的观察[J]. 中国中西医结合消化杂志,2011,19(3):141.
- [8] 张爱林,徐秋萍,孙建宁,等. 不同厂家的银杏制剂对冷水负重游泳模型小鼠保护作用的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(1):31.

[责任编辑 聂淑琴]