

益气通阳汤对血小板减少性紫癜小鼠模型的作用

杨晓红, 苏根元, 许勇钢, 唐旭东, 王洪志, 胡晓梅, 麻柔*

(中国中医科学院西苑医院血液科, 北京 100091)

[摘要] **目的:**观察益气通阳汤对特发性血小板减少性紫癜(ITP)模型小鼠外周血血小板(PLT)数、骨髓巨核细胞数和巨核细胞数分类、外周血 T、B 淋巴细胞亚群变化的影响。**方法:**设计用豚鼠抗小鼠血小板血清(APS)连续注射小鼠,造成 ITP 小鼠模型,分别给益气通阳汤(150, 75, 37.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,正常对照组、模型对照组给予生理盐水,连续给药 14 d。应用血细胞分析仪测定 PLT、显微镜观察巨核细胞形态分类、塑料包埋法计数小鼠股骨巨核细胞数、流式细胞仪检测 T、B 淋巴细胞亚群。**结果:**模型小鼠外周血 PLT 数持续明显减低、骨髓巨核细胞数增多、其中原幼巨核细胞比例明显增高,产板巨核细胞比例明显减低,外周血 CD3⁺CD4⁺T 细胞减低,CD3⁺CD8⁺T 细胞明显增高,CD4⁺/CD8⁺明显降低。给予益气通阳汤治疗小鼠的 PLT 明显增高、巨核细胞数减少、产板巨核细胞比例明显增高,CD3⁺CD4⁺T 细胞增高,CD3⁺CD8⁺T 细胞比例降低,CD4⁺/CD8⁺升高。**结论:**益气通阳汤能提升 ITP 模型小鼠 PLT 数,提高产板巨核细胞比例,改善 T 淋巴细胞的失衡,达到治疗 ITP 的作用。

[关键词] 益气通阳汤;特发性血小板减少性紫癜;动物模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0148-04

Function of Yiqi Tongyang Decoction on Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Animal Model

YANG Xiao-hong, SU Gen-yuan, XU Yong-gang, TANG Xu-dong, WANG Hong-zhi, HU Xiao-mei, MA Rou*

(Department of Hematology, Xiyuan Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impact of patients in disease of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) of platelet count, marrow megakaryocyte count and class, T lymphocyte subset in peripheral blood on treatment with Yiqi Tongyang decoction. **Method:** It is designed to use guinea pig anti-mouse serum (APS) to inject to the mouse in order to induce the ITP mouse model. Then Yiqi Tongyang decoctions treatment group with 3 levels of greater, media and small is given. Separately to the treatment, the normal control group and model control group are also set, and all 3 group are maintained its treatment for continual 14 days. The blood cell counter is used to detect platelet count, to observe megakaryocyte configuration by microscope, to count the megakaryocyte in mouse thighbone by plastic embedding and to detect T lymphocyte subset by cytometer. **Result:** In model mouse group, platelet, CD3⁺CD4⁺T cell are reduced significantly, and CD3⁺CD8⁺T cells are significantly increased. In Yiqi Tongyang mouse groups, platelet count increased significant, producing platelet megakaryocyte and CD4⁺/CD8⁺ were obviously increased. Megakaryocyte count reduced, CD3⁺CD4⁺T cell increased, and CD3⁺CD8⁺T lymphocyte are significantly decreased, and CD4⁺/CD8⁺ value is increased. **Conclusion:** Yiqi Tongyang decoction

[收稿日期] 20110129(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072928)

[第一作者] 杨晓红, 学士, 副主任医师, 从事中西医结合血液病临床及实验研究, E-mail: yxh0604@yahoo.com.cn, Tel: 010-62835627, 13671335784

[通讯作者] *麻柔, 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合血液病临床及实验研究, E-mail: xyxsys@yahoo.com.cn, Tel: 010-62835627

improves platelet count in ITP model mouse group, increase platelet producing megakaryocyte ratio, meliorate unbalance of T lymphocyte, that means the Yiqi Tongyang decoction is approved to be effective of treating ITP patients clearly in this study.

[**Key words**] Yiqi Tongyang decoction; idiopathic thrombocytopenic purpura; animal model

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是一种以血小板减少和出血为主要临床表现的自身免疫性疾病。发病机制为机体内产生了抗血小板和巨核细胞膜表面糖蛋白的自身抗体,使血小板破坏过多或生成减少^[1]。祖国医学将其统归于“血证”,在中医古典文献中有许多类似于ITP病状的描述。虚、瘀既是出血最常见病因,又是出血病发生与转化的关键^[2]。ITP的重要特征之一是骨髓巨核细胞正常或增高,伴有成熟障碍(产板巨核细胞减少)^[3],以骨髓巨核细胞总数与分类评价临床疗效较为灵敏。

益气通阳汤为麻柔教授临床治疗ITP及血小板减少性紫癜(RITP)经验之所得^[2],由太子参、桂枝、白芍、制甘草、川草薢、锁阳、鸡血藤等9味药物组成,对临床病人治疗效果明显。

免疫造模法建立的ITP动物模型具有与人类ITP发病相似的临床特征,可用于开展中药治疗作用机制研究^[4-5]。本研究设计在复制ITP动物模型基础上,观察益气通阳汤对造模小鼠外周血小板计数、骨髓巨核细胞数及其形态分类以及与免疫机制有关T淋巴细胞亚群的影响^[6],希望为益气通阳汤临床推广应用与新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康BALB/C小鼠,体重18~22g,雌性,由中国医学科学院实验动物研究所提供,动物合格证号SCXK(京)2005-0003。

1.2 药物 益气通阳汤由太子参、桂枝、白芍、制甘草、川草薢、锁阳、鸡血藤等组成,实验用药为浓缩液,每毫升汤剂含生药2.5g,由本实验室研制并提供。

1.3 试剂 豚鼠抗小鼠血小板血清(下称APS,动物造模用),由本实验室制备。直标单克隆荧光抗体:Rat anti mouse(CD3-FITC, CD4-PE, CD8-Pc5, Rat IgG1-FITC, Rat IgG1-PE购自美国Beckman-Coulter公司)。

1.4 仪器 Epics Elite型流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司)、CYTOSPIN 2型细胞离心机(英国Shandon公司)、DMRBE型万能显微镜(德国

Leica公司)。MEK-6318型血细胞计数仪(日本光电)、SLEE型病理切片机(德国)。

2 方法

2.1 分组及给药剂量 将BALB/C小鼠60只,随机分为5组,正常对照组,ITP模型组,益气通阳汤高、中、低剂量组,每组12只。每日按 $25\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重ig,1次/d。其中正常对照组、模型组ig蒸馏水、益气通阳汤高、中、低剂量组分别按 $150,75,37.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig。

2.2 造模方法^[1] 于0,1,3,5,7,9,11d分别注射1:4豚鼠抗血小板血清(APS)0.1mL(正常对照组注射0.1mL蒸馏水),从第1次注射后开始灌胃,至造模后第14天,将各组动物全部处死,取全血检测血象和淋巴细胞亚群;取小鼠胸骨做骨髓涂片,取右侧股骨用10%甲醛固定待病理检查。

2.3 检测指标

2.3.1 外周血小板(PLT)动态观察 隔日取各组动物尾血10 μL ,将血细胞计数仪检测小鼠血像状态计数PLT。

2.3.2 骨髓巨核细胞分类 取小鼠胸骨做骨髓涂片,瑞氏染色后,显微镜下计数100个巨核细胞并进行巨核细胞分类(按原始幼稚核颗粒巨核,产板巨核,颗粒巨核分类)。

2.3.3 小鼠骨髓病理检查 取小鼠右侧股骨用10%甲醛固定,塑料包埋,SLEE切片机制作3 μm 切片,H-G-E染色,显微镜下观察计数。骨髓:观察增生程度,细胞成分,计数40倍镜下50个视野内 10×10 网型目尺巨核细胞数。

2.3.4 淋巴细胞亚群检测 应用流式细胞仪三色技术检测各组小鼠外周血淋巴细胞亚群($\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-$, $\text{CD3}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^+$, $\text{CD3}^-\text{CD19}^+$ 并计算 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+/\text{CD3}^+\text{CD8}^+$)。

2.4 统计学方法 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS13.0软件进行单因素方差分析,等级资料进行等级秩和检验, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 对外周血PLT的影响 由表1和图1所示,正

常对照组在用药前后无明显差异,与正常对照组相比,模型组有明显降低 ($P = 0.001$),与模型组相比,益气通阳汤高、中、低剂量组在治疗后血小板均有不同程度的提高 ($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$)。益气通阳汤高、中、低剂量组无明显差异 ($P = 0.826, P = 0.731, P = 0.353$),说明益气通阳汤高、中、低各组对于 PLT 恢复都起到了正向作用。

表 1 益气通阳汤治疗前后 PLT 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	PLT/×10 ⁹ /L	
		治疗前	治疗后
正常	-	560.71 ± 106.99	543.14 ± 122.72
模型	-	1.00 ± 2.45	376.75 ± 74.81 ²⁾
益气通阳汤	150	8.33 ± 6.86	559.38 ± 92.40 ¹⁾
	75	8.50 ± 10.43	588.88 ± 107.41 ³⁾
	37.5	9.50 ± 9.31	625.38 ± 121.34 ⁴⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 益气通阳汤对巨核细胞的影响分类比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	骨髓巨核细胞/个			
		裸核巨	原、幼稚巨	颗粒巨	产板巨
正常	-	11.11 ± 3.17	17.11 ± 4.37	46.89 ± 4.26	26.00 ± 6.78
模型	-	10.00 ± 2.00	13.20 ± 3.03	55.60 ± 6.23 ²⁾	13.80 ± 3.19 ^{2,6)}
益气通阳汤	150	8.40 ± 2.97	15.60 ± 4.34	52.60 ± 1.95 ¹⁾	24.80 ± 3.03 ^{4,5)}
	75	10.40 ± 1.67	16.00 ± 0.20	51.40 ± 8.32 ¹⁾	32.00 ± 4.00 ⁴⁾
	37.5	9.20 ± 1.79 ⁴⁾	21.60 ± 1.67	54.20 ± 4.44 ¹⁾	22.80 ± 1.79 ^{4,6)}

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与中剂量组相比⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ 。

数明显均有不同程度的增多 ($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$),其中以益气通阳汤中剂量组疗效更为明显。说明益气通阳汤是通过促进 ITP 小鼠骨髓巨核细胞分化,增加产板巨核细胞形成而提升外周血 PLT 数。

从表 3 可以看出,与正常组相比,模型组骨髓巨核细胞数明显升高 ($P < 0.01$),与模型组相比,益气通阳高、中、低剂量组骨髓巨核细胞计数明显减低 (均 $P < 0.01$),与正常组比无明显差异。

表 3 益气通阳汤对外周血 PLT 数和骨髓巨核细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	PLT /×10 ⁹ /L	骨髓巨核细胞数 /个/mm ²
正常	-	543.14 ± 122.72	10.42 ± 2.35
模型	-	376.75 ± 74.81 ²⁾	50.08 ± 22.79 ²⁾
益气通阳汤	150	559.38 ± 92.40 ¹⁾	10.33 ± 2.98 ⁴⁾
	75	588.88 ± 107.41 ³⁾	9.28 ± 2.68 ⁴⁾
	37.5	625.38 ± 121.34 ⁴⁾	9.51 ± 2.75 ⁴⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

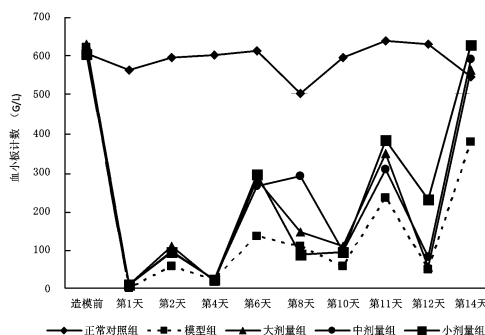


图 1 益气通阳汤对 ITP 模型动物外周血的 PLT 动态变化

3.2 对 ITP 模型动物骨髓巨核细胞的影响 从表 2 可以看出,与正常组比较,模型组小鼠骨髓颗粒巨核细胞明显增多,产板巨核细胞数明显减少 ($P < 0.01, P < 0.01$);益气通阳汤大、中、小剂量组的骨髓颗粒巨核细胞数也显著增多 ($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.05$)。与模型组相比,用药各组产板巨核细胞

3.3 对淋巴细胞亚群的影响 如表 4 所示,与模型组相比,正常组和益气通阳各剂量组 CD3⁺T 细胞明显升高 ($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.05, P < 0.05$), CD3⁺CD4⁺T 细胞明显上升 ($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$), CD3⁺CD8⁺T 细胞明显下降 ($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.01, P < 0.01$), CD4⁺/CD8⁺明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01, P < 0.01$), CD3⁻CD19⁺B 细胞无明显变化 ($P < 0.05$)。说明益气通阳汤对 ITP 造模小鼠有较强的调节免疫功能的作用,主要为调节 T 细胞功能,促使紊乱的免疫功能恢复正常。

4 讨论

按照本实验室建立的小鼠 ITP 模型方法^[4],通过连续给小鼠腹腔注射 APS,造成小鼠体内血小板持续处于低水平,模型小鼠血小板持续低于正常 ($P < 0.01$),说明本研究的模型设计是成功的。

表4 益气通阳汤对淋巴细胞亚群的影响

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	CD3 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ CD19 ⁺ /%
正常	-	65.99 ± 5.09 ¹⁾	40.79 ± 6.93 ¹⁾	10.36 ± 1.50 ²⁾	3.93 ± 3.02 ¹⁾	12.40 ± 3.93
模型	-	55.33 ± 6.27	32.04 ± 10.74	16.04 ± 3.39	2.59 ± 2.34	14.41 ± 4.39
益气通阳汤	150	64.91 ± 5.26 ²⁾	36.59 ± 11.02 ¹⁾	10.61 ± 2.71 ²⁾	6.86 ± 5.34 ²⁾	12.64 ± 5.42
	75	61.74 ± 22.81 ¹⁾	49.39 ± 5.69 ²⁾	8.95 ± 2.91 ²⁾	5.60 ± 1.99 ²⁾	13.93 ± 3.64
	37.5	65.89 ± 5.94 ²⁾	38.03 ± 10.14 ¹⁾	8.26 ± 2.37 ²⁾	5.13 ± 2.86 ²⁾	14.54 ± 3.88

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

经过灌胃益气通阳汤膏,PLT均有不同程度升高,随着用药时间延长,PLT有逐渐上升趋势,说明该药有提升PLT的作用,疗效满意。

筛选了最能够反应ITP临床特征的小鼠外周血PLT数、骨髓巨核细胞总数以及分类、免疫学指标等实验室检测和观察指标作为益气通阳汤对ITP小鼠治疗效应的判断标准。应用ITP模型试验的结果表明,益气通阳汤各剂量组均可使ITP小鼠骨髓巨核细胞总数得到不同程度恢复,使产板巨核细胞数增加,提示益气通阳汤具有促进ITP小鼠骨髓巨核细胞向成熟方向分化效应。

国内外相关报道都表明ITP患者的细胞免疫功能异常。患者体内存在着多种T淋巴细胞表型和功能异常,这些免疫异常在ITP发病中起着重要作用。其中较多研究认为,ITP患者CD3⁺细胞正常或减低,CD3⁺CD4⁺细胞降低,CD3⁺CD8⁺细胞增高,CD4⁺/CD8⁺比值降低或倒置;CD4⁺Tr细胞显著减少,以及活化T细胞增加等异常改变,这些T淋巴细胞的异常导致T淋巴细胞免疫紊乱、失衡,最终导致ITP的发生^[6],与本研究结果一致,提示益气通阳汤有通过调节免疫功能发挥治疗ITP作用的。

实验结果证明益气通阳汤能够明显提高ITP小鼠外周血PLT数,而有效地控制出血,说明益气通阳

汤对ITP小鼠具有良好治疗作用。

进一步需要证明的是,益气通阳汤治疗的机制可能与该药促进抗体清除,减少血小板被吞噬破坏有关,同时通过调节ITP动物模型小鼠T细胞免疫功能,使得骨髓巨核细胞有不同程度的恢复,从而发挥其治疗作用。

[参考文献]

- [1] 全日城,麻柔.麻柔辨证施治慢性免疫性血小板减少性紫癜经验[J].北京中医药,2010,29(4):260.
- [2] 唐旭东,麻柔.特发性血小板减少性紫癜的中医病机和治疗[J].内科急危重症杂志,2006,12(6):262.
- [3] Cines D B, Blanchette V S, Chir B. Immune thrombocytopenic purpura [J]. N Engl J Med,2002,346(13):995.
- [4] 杨宇飞,周霭祥,麻柔,等.免疫性血小板减少性紫癜动物模型建立[J].中华血液学杂志,1994,15(4):160.
- [5] 许勇钢,杨晓红,王洪志,等.ITP模型小鼠巨核细胞形态学相关研究[J].中国实验血液学杂志,2001,9(Suppl):201.
- [6] 许勇钢,杨晓红,王洪志,等.金薯叶止血合剂对ITP模型动物的治疗作用[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(9):674.

[责任编辑 邹晓翠]