

血康口服液对小鼠血小板减少性紫癜模型的作用机理探讨

葛卫红^{1*}, 郭建友², 石森林¹, 陈立兵¹, 赵晓英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 100101)

[摘要] 目的: 探讨血康口服液治疗特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)的疗效机理。方法: 采用12 d每2日1次腹腔注射4倍稀释豚鼠抗鼠血小板抗血清5 mL/kg, 共7次, 建立小鼠ITP模型, 自造模第一天开始灌胃血康口服液高、低两个剂量组共15 d。结果: 血康口服液能显著提升ITP小鼠外周血小板数, 促进巨核细胞向成熟方向分化效应, 改善脾脏组织病理学变化。结论: 血康口服液对ITP治疗安全、有效。

[关键词] 血康口服液; 血小板减少性紫癜; 实验研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0047-04

Experimental Study of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura with Xuekang Koufuye

GE Wei-hong^{1*}, GUO Jian-you², SHI Sen-lin¹, CHEN Li-bing¹, ZHAO Xiao-ying¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Hangzhou 310053, China;

2. Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Xuekang Koufuye on mice models of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods:** Guinea pig anti-mice platelet serum (GP-APS) was diluted with saline (1:4), and intravitreal injected (5 mL/kg) into mice once in 2 days for 15 days. Two dosage of Xuekang Koufuye was given orally to mice in 15 days since mice models of ITP were established. **Results:** Xuekang Koufuye can enhance the amount of platelets, promote the mature of megakaryocyte of mice significantly and improve the histological pathology of spleen. **Conclusions:** Xuekang Koufuye is an effective and safety medicine in treating ITP, and can be used widely in clinic.

[Key words] Xuekang Koufuye; Idiopathic thrombocytopenic purpura; Experimental study

免疫性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, 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、多脏器自发性出血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^[1,2]。临床治疗以皮质激素、脾切除和免疫抑制剂为主, 从远期疗效看, 多数病人还

不能获得完全缓解。近年来已能用多种方法检测出各种血小板抗体和其识别的血小板膜抗原。但血小板抗体产生的原因及所作用的抗原的本质仍不太清楚。血康口服液是我国自行研制治疗 ITP 较为理想的一种纯中药制剂, 其主要成分为天然植物草珊瑚, 具有升血小板、调节免疫、活血化瘀、消肿散结、凉血止血的作用。本实验旨在研究血康口服液治疗 ITP 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 实验材料

1.1 动物 BALB/C 小鼠 80 只, 体重 18~22 g, 雌性

[收稿日期] 2006-07-04

[通讯作者] * 葛卫红, Tel: (0571) 86613603

50 只, 雄性 30 只, 中国科学院上海实验动物中心提供(沪动合格证字: 103 号); 豚鼠 10 只, 全为雌性, 中国科学院上海实验动物中心提供(沪动合格证: 105 号)。

1.2 药品和试剂 血康口服液 10 mL/支, 江西天狮中药集团提供, 批号: 20020922, 临床用量为每人每天 30 mL; 强的松, 浙江仙居制药有限公司生产, 批号: 020708。完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂均为美国 Sigma 公司产品, 批号分别为 42k8939 和 43k3253。

1.3 仪器 M-2100 型全自动血细胞计数分析仪, 中国兰桥医学仪器有限公司; 5415R 型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; QM5001I 型倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 豚鼠抗血小板抗血清的制备^[3,4] 取雌性 BALB/C 小鼠 20 只, 乙醚麻醉后, 以 EDTA-Na₂ 抗凝从心脏取出全血, 分离血小板并洗涤, 用生理盐水稀释成 1×10^5 /mL。与等量完全福氏佐剂充分混合, 注射于豚鼠足掌、背及皮下至少 4 点各 0.02 mL; 分别首次注射后第 1, 2, 4 周重复以上取血操作, 生理盐水稀释后与等量的不完全福氏佐剂充分混合, 注射豚鼠足掌、背及皮下至少 4 点。末次注射后第 6 d, 取豚鼠心脏不抗凝全血, 1 500 r/min 离心 10 min 后取上清, 即为豚鼠抗血小板抗血清(GP-APS), 储存于 -20℃冰箱待用。

2.2 动物分组、造模及给药 60 只雌雄各半的 BALB/C 小鼠, 随机分为 5 组, 每组 12 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。取出 -20℃保存 APS, 置于 56℃水浴中 30 min, 以等量的 BALB/C 小鼠红细胞至少吸附两次, 用生理盐水 1:4 稀释。于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 d 按照 0.1 mL 20 g 小鼠腹腔注入稀释的抗血清, 每 2 d 重复注射 1 次, 以维持血小板的持续降低^[5,6]。从

第 1 次注射 APS 后, 以血康口服液临床等效剂量的 2 倍为高剂量组(20 mL/kg), 由于临床疗效显著, 因此以临床等效剂量的 1/10 为低剂量组(1 mL/kg)灌胃给药; 每日 1 次, 连续给药 15 d。强的松组, 以 10 mg/kg 剂量灌胃。ITP 模型组及正常对照组给予 20 mL/kg 生理盐水。

2.3 实验观察指标^[7,8] 观察实验中小鼠的精神活动状况、皮毛光泽、饮食饮水量、大小便、体重变化及死亡情况。外周血象: 实验结束后眼球取血, 置于 EDTA-Na₂ 管中, 取部分血液, 检测血小板、白细胞、红细胞、血红蛋白。处死动物, 取胸骨制作骨髓片, 风干后作瑞氏染色, 显微镜下计数全片骨髓巨核细胞数。取各组小鼠脾脏、胸腺、肾上腺称重并计算脏器系数。病理观察: 制作脾脏病理切片, HE 染色光镜下计数巨噬细胞数及凋亡小体。巨噬细胞数: 5 个高倍镜下的巨噬细胞数的平均值; 凋亡小体: 高倍镜下数 5 个生发中心凋亡小体的平均值。

2.4 统计方法 实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 显著性比较采用 Student *t* 检验进行统计分析。

3 实验结果

3.1 一般行为学改变 自第 3 次注射 APS 后, ITP 模型组小鼠出现明显皮下紫癜, 以注射部位、四肢、尾部为重, 同时小鼠出现精神萎靡、毛发色泽变暗, 进食进水量减少、便溏、体重下降等脾虚症状。经血康口服液及强的松药物干预后, 上述脾虚证候明显改善。各组小鼠均无死亡。

3.2 对血常规的影响 ITP 模型组外周血小板数明显降低, 与正常对照组比较有非常显著统计学差异 ($P < 0.01$), 说明小鼠动物模型建立。白细胞数、红细胞数及血红蛋白与正常组比较无明显变化。强的松组、血康口服液高、低剂量组可明显升高血小板数, 与模型组比较有统计学差异(表 1)。

表 1 血康口服液给药 15 d 后对 ITP 模型小鼠治疗后各组血常规变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (/kg)	PLT ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	HGB ($\times g/L$)
正常对照组	-	792.39 ± 34.12 ²⁾	8.02 ± 0.81	7.13 ± 0.71	143.1 ± 13.5
模型组	-	554.71 ± 40.04	8.82 ± 0.84	7.34 ± 0.95	144.5 ± 11.2
强的松组	10 mg	771.88 ± 52.92 ²⁾	8.21 ± 0.94	7.86 ± 1.12	138.9 ± 12.5
血康高剂量组	20 mL	712.57 ± 28.36 ²⁾	8.22 ± 0.86	7.71 ± 1.05	142.6 ± 13.3
血康低剂量组	1.0 mL	625.35 ± 54.16 ¹⁾	8.31 ± 0.81	7.44 ± 0.88	147.4 ± 11.8

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

3.3 对骨髓巨核细胞的影响 ITP 模型组骨髓巨核细胞明显增多,与正常组比较有非常显著的统计学差异($P < 0.01$);强的松和血康口服液高剂量干预治疗后,骨髓巨核细胞数显著降低,与模型组比较有非常显著统计学差异($P < 0.01$),与正常对照组比较已无统计学差异。血康口服液低剂量组给药后,骨髓巨核细胞亦有恢复,与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$),但未恢复至正常水平,与正常组比较仍有显著差异($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 血康口服液给药 15 d 后对 ITP 模型小鼠骨髓巨核细胞影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(/kg)	骨髓巨核细胞数 (个/每片)
正常对照组	-	89.42 ± 16.32 ²⁾
模型组	-	190.17 ± 29.63
强的松组	10 mg	93.58 ± 33.12 ²⁾
血康高剂量组	20 mL	97.75 ± 26.38 ²⁾
血康低剂量组	1.0 mL	152.92 ± 37.14 ¹⁾

3.4 对各组脏器指数影响 模型组脾脏系数显著增加,与正常对照组比较有非常显著统计学差异($P < 0.01$),胸腺、肾上腺脏器系数与正常组比较无明显变化。强的松及血康口服液高剂量组治疗后,脾脏系数降低(表 3)。

表 3 血康口服液给药 15 d 后对 ITP 模型小鼠各组脏器系数变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (/kg)	脾脏 (mg/10 g)	胸腺 (mg/10 g)	肾上腺 (mg/10 g)
正常对照组	-	68.04 ± 8.54 ²⁾	66.08 ± 10.52	5.09 ± 1.02
模型组	-	96.42 ± 7.98	65.25 ± 8.38	5.55 ± 0.67
强的松组	10 mg	75.41 ± 11.23 ²⁾	63.02 ± 8.21	4.82 ± 0.68
血康高剂量组	20 mL	81.81 ± 11.38 ¹⁾	67.51 ± 7.02	5.81 ± 1.20
血康低剂量组	1.0 mL	91.12 ± 11.04	64.34 ± 7.46	5.23 ± 0.80

3.5 对脾脏病理学影响 正常组脾脏偶见巨噬细胞,生发中心内也偶见凋亡小体。ITP 模型组脾脏内巨噬细胞和网状内皮细胞增生明显,生发中心内凋亡小体及核碎片增多。强的松组和血康口服液高剂量组巨噬细胞和生发中心的凋亡小体数明显减少,与模型组比较有非常显著统计学差异($P < 0.01$)。结果见表 4。

表 4 血康口服液给药 15 d 后对 ITP 模型小鼠脾脏病理变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(/kg)	巨嗜细胞(个)	凋亡小体(个)
正常对照组	-	6.5 ± 1.5 ²⁾	8.8 ± 1.6 ²⁾
模型组	-	18.3 ± 2.2	19.8 ± 3.0
强的松组	10 mg	9.1 ± 2.0 ²⁾	12.1 ± 2.9 ²⁾
血康高剂量组	20 mL	10.7 ± 2.0 ²⁾	11.6 ± 2.8 ²⁾
血康低剂量组	1.0 mL	16.3 ± 2.3	16.4 ± 3.4

4 讨论

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,使循环中血小板破坏增加^[9]。ITP 患者骨髓巨核细胞总数增高,并有成熟障碍^[10]。本实验通过免疫法建立 ITP 动物模型观察发现:模型组小鼠自第 2 次注射 APS 后逐渐出现明显皮下紫癜、以注射部位、四肢、尾部为重,同时小鼠出现精神萎靡、毛发色泽变暗,进食进水量减少、便溏、体重下降等脾虚症状,其与人类 ITP 临床表现相仿;模型组小鼠外周血小板明显减少,骨髓巨核细胞显著升高,脾脏脏器系数显著升高,且出现组织病理学变化。通过以上结果表明,用免疫造模法能够成功的复制 ITP 动物模型,其特征与人类 ITP 发病基本相似。这也说明免疫造模法可能成为研究 ITP 发病机制与药理学研究的有用工具。

中医药治疗 ITP 有疗效稳定持久,副作用小等特点。中医学从宏观角度将出血归并为“血证”门类,并明确提出了发病因素与治疗法则。特别是近代,中医学基础与临床研究发展给 ITP 治疗带来了新契机。血康口服液临床上用于治疗 ITP,具有健脾益气养血功效,能够针对 ITP 中医病机治疗。本次实验研究表明,经血康口服液治疗后,ITP 小鼠血小板较治疗前明显升高,脾虚症状也得到了明显改善,为血康口服液临床治疗 ITP 提供药理实验依据。

[参考文献]

- [1] 杨宇飞,周霭祥,麻柔. 免疫性血小板减少性紫癜动物模型的建立[J]. 中华血液学杂志, 1994, 15(3): 160-161.
- [2] 杨宇飞,周霭祥,麻柔. 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): 699-701.
- [3] 徐卫国. 血康口服液的临床应用[J]. 中国药业, 2005, 14(4): 79-80.

- [4] 赵诗云, 彭旦明, 周名智, 等. 肿节风对小鼠白细胞和血小板的影响[J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(3): 154-156.
- [5] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 22.
- [6] 胡红, 周艳华, 张智, 等. 养血糖浆的药效学研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(9): 22-26.
- [7] 徐国良, 肖兵华, 陈奇, 等. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 33-36.
- [8] 黄振翘. 中医药治疗原发性血小板减少性紫癜的现代药效学设计与方法的研究[J]. 中医药通报, 2002, 1(4): 34-38.
- [9] 范颖, 马骥, 陶淑春, 等. 紫癜颗粒对 ITP 模型小鼠外周血小板的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 158-161.
- [10] 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(11): 45-49.