

血府逐瘀液对血小板与内皮细胞功能的影响

李艳梅¹ 汪 钟² 翁 进² 陈志勇² 陈可冀³ 田 菲¹

内容提要 目的:研究血府逐瘀液对血小板与内皮细胞功能的影响。方法:将不同浓度血府逐瘀液与血小板和体外培养人脐带内皮细胞共同作用,用放射免疫方法测定血小板膜表面 GP II b/III a 复合物和人脐静脉内皮细胞表面血栓调节蛋白(TM)分子数。结果:血府逐瘀液(40mg/ml, 80mg/ml)明显抑制二磷酸腺苷诱导的 GP II b/III a 复合物分子表达,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),而血府逐瘀液对 TM 无明显影响。结论:血府逐瘀液通过阻断 GP II b/III a 复合物的暴露,可抑制 ADP 对血小板的激活。

关键词 血府逐瘀液 血小板膜表面 GP II b/III a 复合物 内皮细胞

Effect of Xuefu Zhuyu Decoction on Function of Platelet and Endothelial Cell Li Yanmei, Wang Zhong, Weng Jin, et al *The First Affiliated Hospital, Tianjin TCM College, Tianjin (300193)*

Objective: To explore the effect of Xuefu Zhuyu Decoction (XFZYD) on function of platelet and endothelial cell. **Methods:** Through incubation of XFZYD, in different concentration, with platelet and human umbilical vein endothelial cell, the platelet membrane glycoprotein II b/III a complex and thrombomodulin (TM) of human umbilical vein endothelial cell were determined by radioimmunoassay. **Results:** XFZYD in 40 mg/ml or 80 mg/ml could obviously inhibit the adenosine diphosphate induced glycoprotein II b/III a molecular expression, as compared with the control group, the difference was significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but it did not influence the TM level significantly. **Conclusion:** XFZYD could inhibit the adenosine diphosphate induced activation of platelet through blocking the exposure of glycoprotein II b/III a complex.

Key words Xuefu Zhuyu Decoction, surface glycoprotein II b/III a complex of platelet, endothelial cell

血小板是一种多功能细胞,具有粘附、聚集、释放等特性,在动脉粥样硬化中起重要作用⁽¹⁾。血小板膜糖蛋白是血小板膜蛋白的主要成分。近年来,随着生化、免疫、细胞生物学特别是分子生物学的发展,采用抗血小板各种单克隆抗体及分子生物学技术,发现各种血小板膜糖蛋白常以异二聚体形式起着不同的膜受体作用,其中血小板膜表面的糖蛋白 II b/III a 复合物在粘附聚集等功能中起关键作用⁽²⁾。完整的血管内皮具有抗血栓形成特性,既充当血小板和内皮下结构之间的机械屏障,又能合成血栓调节蛋白(TM),抑制血小板聚集。内皮细胞在血栓形成过程中占极重要的地位⁽³⁾。临床研究结果表明,血府逐瘀汤浓缩丸剂具有较好的抗动脉粥样硬化形成的作用,为了进一步探讨该方抑制血小板激活和抗栓机理,本研究采用健康成人血分离血小板,并用人脐静脉培养的内皮细胞(HUVEC)探讨血府逐瘀液对血小板激活中起重要作用的 GP II b/III a 复合物和 TM 的影响。

资料与方法

1 健康成人血 10 份,男女各 5 份,北京协和医院血库提供。

2 人脐带 北京协和医院和北京积水潭医院产房提供。

3 主要药品 牛血清白蛋白,胎牛血清,谷氨酰胺,丙酮酸钠,二磷酸腺苷(ADP),胶原酶,均为 Sigma 公司出品。M199:GIBCO 实验室出品,胰蛋白酶:ICN 公司出品。¹²⁵I - GP II b/III a 复合物药盒、¹²⁵I - TM 药盒、生长因子、纤维连接蛋白:中国协和医科大学基础医学研究所药理室制备。青霉素、链霉素:华北制药厂生产。肝素:上海生物化学制药厂生产。血府逐瘀液:当归、赤芍、川芎、枳壳、桃仁、牛膝、生地、红花、桃仁、甘草、桔梗水煎后,浓缩,制成含生药 3.39g/ml,实验前分别用 0.1mol/L Tris-HCl 和完全培养液稀释成浓度 80mg/ml、40mg/ml、20mg/ml 的工作液。

4 主要仪器 γ 计数仪:西安二六二厂生产。超净台:北京半导体设备一厂生产。CO₂ 孵育箱:SHELKON 公司产品。倒置显微镜:Olympus 公司产

1. 天津中医学院第一附属医院(天津 300193); 2. 中国协和医科大学基础医学研究所; 3. 中国中医研究院西苑医院

品。无菌培养皿、瓶及 96 孔塑料培养板: NUNCO 公司出品。

5 实验方法

5.1 血府逐瘀液对血小板膜表面 GP II b/III a 复合物含量影响测定 健康成人血, 取血前两周未服用阿斯匹林等影响血小板功能的药物。进行血小板悬液制备与血小板计数, 将每管血小板含量调至 2.5×10^3 加入不同浓度的血府逐瘀液 (0、20、40、80mg/ml), 室温作用 30min, 然后各管均加入 $2\mu\text{g/ml}$ 的 ADP。作用 5min 后, 用 0.1% 戊二醛固定 30min, 然后每管加入 1ml 常规台氏液, 离心 (1400r/min, 15min), 去上清, 再加入 0.5ml 常规台氏液与 $0.1\text{ml}^{125}\text{I}$ -GP II b/III a 复合物, 充分混匀, 4°C 过夜。24h 后再用 1ml 常规台氏液洗涤两次, 去上清沉淀用 γ 计数器进行计数, 结果根据放射计数 (CMP) 换算成每个血小板表面的分子数。

5.2 血府逐瘀液对 HUVEC 表面 TM 分子数影响的测定 将第三代内皮细胞传至 96 孔板, 每孔细胞数为 3×10^4 个, 置 37°C , 0.5% CO_2 孵育箱孵育 24h 后, 加不同浓度的血府逐瘀液 (0、20、40、80mg/ml), 续孵育 24h 后, 用 PBS 洗 3 次, 在空白孔加入 $5\mu\text{g}$ 未标记抗原, 所有各孔均加入 ^{125}I -TM, 终体积为 $100\mu\text{l}$, 37°C 孵育 2h, PBS 洗数次, 再用胰酶于 37°C 消化 2h, 然后将细胞从 96 孔板中逐一对号吸入试管中, γ 计数器计数。换算出每个内皮细胞膜表面 TM 分子数。

结 果

1 血府逐瘀液对血小板膜表面 GP II b/III a 复合物分子数表达的影响 见表 1。

用 20mg/ml, 40mg/ml 和 80mg/ml 的血府逐瘀液分别与血小板反应, 加入 $2\mu\text{g/ml}$ 的 ADP 刺激后, 血小板膜表面 GP II b/III a 复合物分子数与 ADP 对照组比较, 各组分别为 $P > 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$, 提示该方体外浓度为 40mg/ml 和 80mg/ml 时对血小板 GP II b/III a 的表达有明显抑制作用。

表 1 血府逐瘀液对血小板 GP II b/III a 复合物的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血府逐瘀液 (g/L)	ADP (mg/L)	GP II b/III a (分子数/血小板)
空白	—	—	51360 ± 6600
ADP	—	2	$60455 \pm 4660^*$
中药小剂量	20	2	54355 ± 7505
中药中剂量	40	2	$52900 \pm 8445^\Delta$
中药大剂量	80	2	$52095 \pm 6345^{\Delta\Delta}$

注: $n = 10$; 与空白组比较, $^* P < 0.01$; 与 ADP 组比较, $^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

2 血府逐瘀液对内皮细胞表面 TM 的影响 人脐静脉内皮细胞上每个细胞含有 (68470 ± 10286) 个 TM 分子数, 不同浓度的血府逐瘀液 (20mg/ml、40mg/ml、80mg/ml) 与内皮细胞反应后, 内皮细胞表面的 TM 分子数分别为 65270 ± 10107 、 66210 ± 9621 和 67500 ± 8786 , 与对照组比较均无明显差异 ($P > 0.05$), 提示该方在体外上述浓度时对内皮细胞表面 TM 无明显影响。

讨 论

1 血府逐瘀液对血小板膜糖蛋白 II b/III a 复合物影响的研究 血小板在动脉粥样硬化形成中的作用已被许多研究证实, 近年来, 随着细胞生物学及分子生物学的发展, 对血小板的结构及功能认识更加深化, 发现各种血小板膜糖蛋白常以二聚体的形式起着不同膜受体的作用, 其中血小板膜表面的糖蛋白 II b/III a 复合物在血小板粘附聚集功能中起着关键作用, 文献报道每个正常血小板表面 GP II b/III a 约为 5 万个, 当血小板被激活后, 处于隐蔽状态的 GP II b/III a 复合物即在膜表面暴露 (GP II b/III a 表化), 并产生受体活性⁽⁴⁻⁵⁾, 目前认为 GP II b/III a 复合物受体的暴露, 是各种刺激剂激活血小板的最终共同通路, 在血小板聚集中起关键作用。如果阻断血小板 GP II b/III a 复合物受体, 则可有效地抑制各种诱导剂所致的血小板激活⁽⁶⁻⁷⁾。许多研究表明, 血瘀证实质与循环系统血液粘度增高, 凝血活性增强, 血小板异常, 纤溶亢进等有关。动脉粥样硬化形成与血脂升高, 血小板粘附聚集增强, 血栓形成密切相关。因此, 中医学认为动脉粥样硬化属血瘀证范畴。血府逐瘀液是活血化瘀名方血府逐瘀汤浓缩液, 具有活血化瘀功效。现代研究表明, 该方具有抗动脉粥样硬化形成, 降低血粘度, 改善微循环, 抑制血小板聚集的作用。笔者在以往临床研究发现该方能够减少动脉粥样硬化患者血浆中血小板活化颗粒 GMP-140 的释放, 具有抗动脉粥样硬化的作用^(8,9)。为了探讨其作用机制, 本研究用体外不同浓度的血府逐瘀液作用于血小板, 然后用 ADP 诱导血小板活化, 结果浓度为 40mg/ml、80mg/ml 的血府逐瘀液均可抑制 GP II b/III a 复合物的表达, 与对照组比较有明显差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示该方通过阻断 GP II b/III a 复合物的暴露, 可抑制所有刺激剂对血小板的激活。

2 血府逐瘀液对内皮细胞表面 TM 的影响 TM 是血管内皮细胞合成并表达在内皮细胞表面的糖蛋白, 为凝血酶的受体, 它参与凝血酶—TM—蛋白 C

系统的功能活动,内皮细胞表面 TM 与凝血酶结合后,不仅使凝血酶活性下降,而且使凝血酶激活蛋白 C 的速率提高大约 20 000 倍,激活的蛋白 C 在辅因子蛋白 S 的参与下,能迅速灭活凝血因子 V_a 和 VⅢ_a,因此具有很强的抗凝作用^(10,11),文献报道,静止的内皮细胞有较高的 TM 活性,每个细胞上大约有 50 000 个 TM 分子⁽¹²⁾,本实验结果发现在每个脐静脉内皮细胞上有 60 000 多个 TM 分子,基本与文献相符,但未观察到血府逐瘀液有增加内皮细胞表面 TM 分子数的作用。以上结果提示,该方的抗动脉粥样硬化作用不是通过增加内皮细胞合成 TM 发生的。该方是否对内皮细胞合成的前列环素,抗凝血酶Ⅲ等有影响,值得进一步研究。

参 考 文 献

1. Weiss HJ. Platelets, pathophysiology and antiplatelet drug therapy. New York: Alan R Liss, 1982:1—44.
2. Philippe DR, Charo IF, Parise LV, et al. The platelet membrane glycoprotein II b/III a complex. Blood 1988;71:831.
3. Esmon CT, Owen WG. Identification on endothelial cell factor for thrombin-catalyst activation of protein c. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:2249—2252.

4. 赖福生. 血小板膜糖蛋白 II b/III a 复合体研究进展. 国外医学输血及血液学分册 1991;4:196—198.
5. 李建勇. 粘附分子在血小板中的功能. 国外医学输血及血液学分册 1991;4:194—195.
6. Gold HK, Gimple LW, Yasuda T, et al. Pharmacodynamic study of F(ab')₂ fragments of murine monoclonal antibody TE₃ directed against human platelet glycoprotein II b/III a in patients with unstable angina pectoris. J Clin Invest 1990;86:651—659.
7. Simoons ML, Boer MJ, Brand MTBM, et al. Randomized trial of a GP II b/III a platelet receptor blocker in refractory unstable angina. Circulation 1994;89(2):596—603.
8. 李艳梅, 陈可冀, 张学文, 等. 血府逐瘀丸对患者颈动脉粥样硬化的影响. 中国中西医结合杂志 1997;17(3):152—154.
9. 李艳梅, 陈可冀, 史载祥, 等. 血府逐瘀丸对动脉粥样硬化血瘀征象及危险因素影响的研究. 中国中西医结合杂志 1998;18(2):71—73.
10. Grines CL. Thrombolytic, antiplatelet and antithrombotic agents. Am J Cardiol 1992;70:18—26.
11. Salam HH. The natural anticoagulants. Clinics in Hematology 1986;15(2):371—391.
12. Maruyama I. Expression and distribution of thrombomodulin on altered endothelium. Thromb Haemost 1989;62:467.

(收稿:1998-10-14 修回:1999-01-16)

· 病例报告 ·

中西医结合治愈重症变应性皮肤血管炎 1 例

朱东晨 杨裕树

病历简介 患者,男,28岁,病历号 981378。于 1998 年 5 月右下肢小腿内侧出现红色斑疹,自服扑尔敏 4mg,每日 3 次,1 周无效。斑疹扩大溃烂伴剧痛,经空军某医院诊断为变应性皮肤血管炎,予静脉滴注地塞米松 10mg,每日 1 次,赛庚啶 4mg,维生素 C 0.1g,每日 1 次口服,外用 0.1% 利凡诺溶液湿敷,疼痛减轻,但局部溃烂加重合并胃出血,因此停药转入我院。入院检查,右小腿内侧皮肤溃疡面积 8cm×8cm。中间深达骨髓,有淡黄色渗液。化验血常规正常。

治疗经过 给予青霉素 400 万 u,每日 2 次静脉滴注,强力解毒敏 4ml 每日 1 次肌肉注射,0.1% 利凡诺溶液局部湿敷,治疗 1 周后无效,停上述治疗。改用中药结合局部生理盐水湿敷。查患者面色晄白,神疲乏力,脉平缓,舌苔黄腻;证属湿热

下注,脾肾阳虚。治则:清热利湿,益气升阳。方剂:黄柏 20g 苍术 25g 皂角刺 10g 泽泻 10g 乌药 10g 山药 10g 牛膝 10g 党参 10g 白术 10g 茯苓 10g 牡蛎 10g,水煎取汁 500ml,每日分 2 次口服。同时停用其他中西药物。服用 3 剂后疼痛消失,局部渗出减少,疮面周围有新生表皮生长。18 剂后疮面缩小至 4cm×4cm,基底部与周围皮肤持平,呈红色肉芽。原方去黄柏加附子 5g、黄芪 10g,服用 20 剂后痊愈。

讨 论 目前此病原因不明,一般认为可能与某种物质引起的变态反应所致免疫复合物沉积有关。本病经抗感染及抗过敏治疗效果不佳。经中医辨证,清热利湿,益气升阳治疗病情好转,最后以补中益气,托里生肌收功。笔者临床体会,皂角刺对多种变态反应疾病有效,值得进一步研究。

(收稿:1998-10-20 修回:1999-01-18)