

冠心病血瘀证患者血浆和单核细胞水平 凝血/纤溶活性研究

吕 中¹ 施赛珠²

内容提要 **目的:**研究并比较冠心病血瘀证患者血浆和单核细胞水平凝血/纤溶活性的改变及其意义。**方法:**80 例冠心病患者分为血瘀证组 30 例和非血瘀证组 50 例(包括痰浊型 27 例,气滞型 23 例),另设健康对照组 20 名;采用发色底物法分别检测血浆和外周血单核细胞(PBMC)组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制物(PAI-1)活性,并检测 PBMC 促凝活性(PCA)。**结果:**冠心病血瘀证患者血浆 PAI-1 活性和 PBMC PCA 显著高于非血瘀证组和健康对照组($P < 0.01$);血瘀证和非血瘀证患者 PBMC PAI-1 活性无显著性差异($P > 0.05$),但均高于健康对照组($P < 0.01$);血瘀证患者血浆 t-PA 活性与非血瘀证患者无显著性差异($P > 0.05$),PBMC t-PA 活性血瘀证组显著低于非血瘀证组及健康对照组($P < 0.01$)。**结论:**冠心病血瘀证患者单核细胞促凝活性增高,并在血浆和单核细胞两水平上纤溶活性降低,上述凝血/纤溶活性改变可能是血瘀证形成的重要病理因素,提示冠心病血瘀证患者处于血栓前状态。

关键词 冠心病血瘀证 血浆 单核细胞 凝血/纤溶活性

Study on Blood Coagulant/Fibrinolytic Activity at Plasma and Monocytic Levels in Coronary Heart Disease Patients with Blood-Stasis Syndrome of Traditional Chinese Medicine LU Zhong, SHI Saizhu *The Second Affiliated Hospital of Zhejiang College of TCM, Hangzhou (310007)*

Objective: To explore and compare the changes of coagulant/fibrinolytic activity in coronary heart disease (CHD) patients with Blood Stasis Syndrome of TCM and evaluate the roles of these changes. **Methods:** Eighty patients of CHD were divided into two groups by Syndrome Differentiation of TCM, the Blood-Stasis (BS) group (30 cases) and the non-Blood-Stasis (NBS) group (50 cases, including 27 cases of Phlegm-Dampness Syndrome and 23 cases of Qi-Stagnation Syndrome); and 20 healthy persons were enrolled as normal control group. Tissue type plasminogen activator (t-PA) and its inhibitor (PAI-1) in plasma and in human peripheral blood monocyte cell (PBMC), as well as the procoagulant activity (PCA) in PBMC were measured by chromogenic substrate method. **Results:** The plasma PAI-1 activity and PCA of PBMC in the BS group were significantly higher than those in the NBS group and the normal control group ($P < 0.01$). PAI-1 activity of PBMC in the two groups of CHD patients was higher than those in the normal control group significantly ($P < 0.01$), but no significant difference was found between the BS group and the NBS group ($P > 0.05$). The difference of plasma t-PA activity between the two groups of CHD was insignificant. The PBMC t-PA activity in the BS group was lower than that in the NBS and normal control groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** In the CHD patients with BS, the PBMC PCA was increased and the fibrinolytic activity at both plasma and monocyte levels lowered significantly, these changes in coagulant/fibrinolytic activity may be the important pathologic factors in forming BS which suggests that CHD patients with BS were in the prothrombotic state.

Key words coronary heart disease with Blood-Stasis Syndrome, plasma, monocyte, blood coagulation/fibrinolytic activity

冠心病血瘀证是中医活血化瘀临床应用研究中十分活跃的领域⁽¹⁾,近年来,应用检测分子标志物的方法,发现其存在着血管内皮细胞损伤、抗凝蛋白含量下

降等多种改变^(2,3),值得进一步深入研究。人外周血单核细胞(PBMC)可产生和(或)结合组织因子(TF)等凝血因子,通过内(外)源性凝血途径启动凝血系统表达其促凝活性(PCA);PBMC 也可合成和(或)结合纤溶酶原激活物(PA)及其抑制物(PAI)等纤溶组分,参与

1. 浙江中医学院附属第二医院(杭州 310007);2. 上海医科大学附属华山医院

调节机体的纤溶状态⁽⁴⁾。PBMC 可能在高凝状态的形成及在动脉粥样硬化(AS)基础上的血栓形成中发挥着作用⁽⁵⁾。本研究采用发色底物法检测并比较冠心病血瘀证患者血浆和单核细胞组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制物(PAI-1)活性,并检测单核细胞PCA表达,进一步从血浆和细胞水平探讨冠心病血瘀证患者凝血/纤溶活性的改变及在发病中的意义。

材料与方法

1 临床资料 冠心病组 80 例均为本院住院患者,分为血瘀证和非血瘀证两组。其中血瘀证组 30 例,男 17 例,女 13 例,年龄 43~82 岁,平均 (64.90 ± 10.31) 岁,病程 (10.25 ± 6.24) 年;非血瘀证组包括:痰浊型 27 例,男 14 例,女 13 例,年龄 42~79 岁,平均 (61.22 ± 8.64) 岁,病程 (6.78 ± 4.96) 年;气滞型 23 例,男 13 例,女 10 例,年龄 41~76 岁,平均 (63.09 ± 9.52) 岁,病程 (7.93 ± 4.18) 年。另选健康体检者 20 名,其中男、女各 10 名,年龄 45~69 岁,平均 (59.15 ± 8.52) 岁。冠心病病例选择无肝脏及感染疾病史、并排除急性心肌梗死和不稳定型心绞痛患者,收集标本前 3 天内未服影响血栓和止血的中西药物。冠心病诊断根据 WHO 临床命名及诊断标准⁽⁶⁾,血瘀证诊断根据 1986 年第二届全国活血化瘀研究学术会议修订标准⁽⁷⁾,冠心病中医分型根据 1990 年中国中医药学会心血管学会修订标准⁽⁸⁾。

2 标本采集及处理 均在上午 7:00~9:00,空腹静脉采血。5ml 静脉血应用 0.11mmol/L 的枸橼酸钠抗凝,抗凝剂与血液之比(v/v)为 1:9,轻轻混匀后立即置冰水浴中,2h 内 3000r/min,15min,分离上清血浆,分装,置于 -70°C 保存,临测时置于 37°C 水浴箱中冻融。PBMC 分离按 Freundlich 等⁽⁹⁾的方法,并对 PBMC 分离时所有试剂均进行内毒素检测,其含量均 $<16\text{pg}$,超过此范围时重新配制。

3 观察项目及检测方法

3.1 PCA 测定 于酶标板每孔加入 50 μl 的细胞悬液或不等活性单位的组织凝血活酶,然后加入 100 μl FVI-X 溶液及 100 μl S2222,于 25°C 下孵育 50min,再以 50%冰醋酸终止反应;应用酶标仪于波长 405nm 下测定吸光度,查标准曲线,将吸光度转化为 TF 单位,以 TU/ 10^5 cells 表示。PCA 活性单位设置以国产已标化的组织凝血活酶稀释 10^6 倍为 1TU。试剂盒 S2222 由上海申海生化科技公司提供,组织凝血活酶由上海通用医疗器械公司生产(上海医科大学华山医院监制),国际敏感指数(ISI)为 1.78。

3.2 t-PA、PAI-1 测定 采用发色底物法,具体操作方法按说明书进行,试剂盒均由上海医科大学分子遗传室提供。t-PA 活性参照 WHO 的标准品(86/670),以国际单位(IU)表示。PAI-1 活性单位定义为:在 25°C 20min 内抑制 1.0 IU t-PA 的 PAI-1 酶量,即为 1.0AU(Arb. Unit)。PBMC t-PA、PAI-1 活性均以 IU/ 10^6 cells 或 AU/ 10^6 cells 表示。

4 统计学处理 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 F 检验及 q 检验。

结 果

1 各组血浆 t-PA、PAI-1 含量比较 见表 1。与健康对照组比较,血瘀证组和非血瘀证组(痰浊型)血浆 t-PA 活性均显著降低,有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$);PAI-1 活性显著升高,亦有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),而且血瘀证组与非血瘀证组间亦有显著性差异($P < 0.01$)。

表 1 各组血浆 t-PA、PAI-1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	t-PA(IU/ml)	PAI-1(AU/ml)
健康对照	20	0.59 ± 0.16	5.51 ± 2.54
血瘀证	30	$0.45 \pm 0.12^{**}$	$9.34 \pm 3.27^{**}$
非血瘀证	50		
痰浊	27	$0.48 \pm 0.18^{*}$	$7.05 \pm 2.59^{* \Delta \Delta}$
气滞	23	0.52 ± 0.21	$7.16 \pm 2.37^{* \Delta \Delta}$

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与血瘀证组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$

2 各组 PBMC t-PA、PAI-1 和 PCA 含量比较 见表 2。与健康对照组比较,血瘀证组 PBMC PCA、PAI-1 均显著升高,而 t-PA 显著下降($P < 0.01$);血瘀证与非血瘀证组之间 PBMC t-PA、PCA 有显著性差异($P < 0.01$),而 PAI-1 无显著性差异($P > 0.05$);非血瘀证组之间各项指标未见明显差异($P > 0.05$)。

表 2 各组 PBMC t-PA、PAI-1 和 PCA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCA (TU/ 10^5 cells)	t-PA (IU/ 10^6 cells)	PAI-1 (AU/ 10^6 cells)
健康对照	20	9.52 ± 5.14	9.41 ± 3.67	3.14 ± 1.17
血瘀证	30	$63.39 \pm 19.97^{*}$	$3.71 \pm 1.71^{*}$	$5.30 \pm 2.10^{*}$
非血瘀证	50			
痰浊	27	$47.06 \pm 15.72^{* \Delta}$	$5.79 \pm 2.45^{* \Delta}$	$4.83 \pm 1.98^{*}$
气滞	23	$38.56 \pm 14.52^{* \Delta}$	$6.17 \pm 2.77^{* \Delta}$	$4.46 \pm 1.69^{*}$

注:与健康对照组比较,* $P < 0.01$;与血瘀证组比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

冠心病的病理基础为冠状动脉粥样硬化,在急性冠脉综合征的患者,血栓形成是主要病因。凝血活性增高,纤溶活性下降是血栓形成的重要危险因素,表明机体处于血栓前状态。

单核细胞可通过多种机制参与动脉粥样硬化的形

成⁽¹⁰⁾,进而在冠心病的发生发展中发挥作用⁽¹¹⁾。PCA 活性表达是单核细胞及巨噬细胞的生物学特性,其中起主要作用的是 TF。Wilcox 等⁽¹²⁾应用原位杂交和免疫方法显示人动脉粥样硬化灶以泡沫细胞存在的巨噬细胞及临近胆固醇裂隙的单核细胞含有 TF 及 TFm-RNA;Annex 等⁽¹³⁾发现不稳定型心绞痛患者冠状动脉的损害部位有 TF 表达,且明显高于稳定型心绞痛患者。冠心病尤其是心肌梗死患者 PBMC TF 含量增多的比例增高⁽¹⁴⁾。提示 PBMC PCA 表达增高可能反映了动脉粥样硬化及因此导致冠脉内血栓形成这一连续过程的不同发展阶段。在本研究中,血瘀证患者 PBMC PCA 表达显著高于非血瘀证组及健康对照组,表明冠心病血瘀证患者在细胞水平上处于高凝状态;PBMC PCA 增高在血瘀证的形成中起着一定的作用,并可能加速冠脉内血栓形成。

纤溶酶原激活系统(PAs)是体内防止血栓形成的重要保护机制。PBMC 可合成和表达 t-PA 及 PAI-1 等纤溶组分,并从 PA 和纤溶酶两水平来调节机体纤溶活性⁽¹⁵⁾。Schneiderman 等⁽¹⁶⁾发现与正常或轻度硬化的血管相比,严重硬化的血管 PAI-1mRNA 表达增加。冠状动脉主要在粥样硬化灶内伴有抗纤溶能力的表达,PAI-1 表达增高能提高巨噬细胞和平滑肌细胞的迁移,加速动脉硬化,削弱硬化斑块的稳定性,使其易于破裂和形成血栓⁽¹⁷⁾。本研究发现,冠心病血瘀证患者血浆纤溶活性显著降低,并以 PAI-1 升高为特征,提示可能存在着较为严重的冠脉硬化,血液处于血栓前状态。血瘀证患者 PBMC t-PA 活性显著低于非血瘀证,而 PAI-1 活性与非血瘀证均高于健康对照组,表明血瘀证患者在细胞水平上纤溶活性也明显降低,其改变趋势与血浆相同。PBMC 凝血纤溶活性的改变说明冠心病血瘀证的形成除与微循环障碍等有关外,亦与血液成分机能的改变有关。

Virchow⁽¹⁸⁾在 100 多年前提出了闭塞性血管病变的三大主要原因,即血管壁损伤、血液成分的改变和血液流变性异常,综合本研究和既往的研究结果,可发现冠心病血瘀证已具备上述三大病理改变,因而值得临床重视。

参 考 文 献

1. 翁维良. 冠心病血瘀证的研究进展. 中医杂志 1987;28(6): 64—67.
2. 陈建鸿, 杜建. 冠心病中医辨证与内皮素及降钙素基因相关肽关系的临床研究. 中医杂志 1998;39(2):108—109.

3. 梁铁军, 高顺宗, 张发丽, 等. 冠心病患者抗凝系统改变与中医证型关系. 中国中西医结合杂志 1995;15(10):599—600.
4. Seljelid R, Eskeland T. The biology of macrophages: I general principles and properties. Eur J Haematol 1993;51:267—275.
5. Lybery T. Clinical significance of increased thromboplastin activity on the monocyte surface-A brief review. Haemostasis 1984;14:430—439.
6. 国际心脏病学会和协会及世界卫生组织命名标准化联合专题组. 缺血性心脏病的命名及诊断标准. 中华内科杂志 1981;20(4):254.
7. 第二届全国活血化瘀研究学术会议. 血瘀证诊断标准. 中西医结合杂志 1987;7(3):129.
8. 中国中西医结合学会心血管专业委员会. 冠心病中医辨证标准. 中西医结合杂志 1991;11(5):257.
9. Freundlich B, Avdalovic N. Use of gelatin/Plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. J Immunol Meth 1983;62:31—37.
10. 蔡海江. 动脉粥样硬化基础与临床. 南京:江苏科学技术出版社,1996:120—125.
11. Robert Olivares, Pierre Ducimetiere, Jean Roger Claude. Monocyte Count: A risk factor for coronary heart disease? Am J Epidemiol 1993;137(1):49—53.
12. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2839—2843.
13. Annex BH, Denning SM, Channon KM, et al. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. Circulation 1995;91:619—622.
14. Leatham EW, Bath PMW, Tooze JA, et al. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. Br Heart J 1995;73:10—13.
15. 魏影非, 林果为. 人外周血单核细胞纤溶活性调节作用的研究及其意义. 国外医学输血及血液学分册 1995;18(2): 84—86.
16. Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, et al. Increased type I plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:6998—7002.
17. Raghunath PN, Tomaszewske JE, Brady ST, et al. Plasminogen activator system in human coronary atherosclerosis. Arterioscler Thrombo Vasc Biol 1995;15(9):1432—1443.
18. Nordoy A. Haemostatic factors in coronary heart disease. J Intern Med 1993;233:377—383.

(收稿:1999-09-12 修回:2000-02-20)