

老年气滞血瘀、气虚血瘀患者与 CD62p、CD63 及 TSP 关系的临床观察^{*}

孔令钧 李鲁扬 唐占府

内容提要 目的 观察气滞血瘀、气虚血瘀与血小板活化的关系。方法 采用流式细胞仪和特异性抗活化血小板单克隆抗体对气滞血瘀、气虚血瘀患者 118 例的血小板活化分子 α -颗粒膜蛋白(CD62p)、溶酶体完整膜蛋白(CD63)、凝血酶敏感蛋白(TSP)的表达量进行定量研究,同时测定血小板聚集功能。结果:气滞血瘀、气虚血瘀患者的 CD62p、CD63、TSP 的表达量皆显著高于正常对照组(30 名,均 $P < 0.01$);气滞血瘀组 CD62p、CD63、TSP 的表达量皆显著高于气虚血瘀组(均 $P < 0.01$);CD62p 与 CD63、TSP 均呈正相关($r = 0.740, P < 0.01$; $r = 0.744, P < 0.01$),TSP 与 CD63 呈正相关($r = 0.635, P < 0.01$)。CD62p 与 ADP 诱导的血小板聚集亦呈正相关($r = 0.715, P < 0.01$)。结论:血小板活化参与了血瘀证的发生与发展;血小板活化尤其与气滞血瘀关系密切。

关键词 血瘀证 中医分型 血小板活化分子

Clinical Study on Relationship of CD62p, CD63 and TSP to the Qi-Stagnation Induced Blood-Stasis Syndrome and Qi-Deficiency Induced Blood-Stasis Syndrome in Aged Patients KONG Ling-jun, LI Lu-yang, TANG Zhan-fu *Qilu Hospital of Shandong University, Jinan (250012)*

Objective: To observe the relationship of platelet activation to the Qi-stagnation induced blood-stasis (QSBS) or Qi-deficiency induced blood-stasis (QDBS) syndrome. **Methods:** Expressions of platelet activating molecules, including α -granule membrane glycoprotein (CD62p), lysosomal integral membrane protein (CD63) and thrombospondin (TSP), in patients with QSBS and QDBS were determined quantitatively with flow-cytometry and specific monoclonal antibody against activated platelet. And platelet aggregation was tested simultaneously. **Results:** CD62p, CD63 and TSP expressions in Blood-Stasis patients, both QSBS and QDBS, were higher than those in the normal control significantly (all $P < 0.01$); all the three expressions were higher in QSBS group than those in QDBS group (all $P < 0.01$). Positive correlation was shown between CD62p and CD63 ($r = 0.740, P < 0.01$), CD62p and TSP ($r = 0.744, P < 0.01$), TSP and CD63 ($r = 0.635, P < 0.01$), and between CD62p and ADP induced platelet aggregation ($r = 0.715, P < 0.01$). **Conclusion:** Platelet activation was involved in the pathogenesis and development of Blood-Stasis Syndrome, especially closely related with the QSBS Syndrome.

Key words Blood-Stasis Syndrome, TCM typing, platelet activating factor

近几年研究表明,血小板活化及其产物在血液粘度增高、血栓形成以及动脉粥样硬化的发生发展过程中起着重要作用^(1~3)。已有研究证明血小板活化与血瘀证有关⁽⁴⁾,但气滞血瘀、气虚血瘀对血小板活化的影响尚未见报道。本研究采用流式细胞仪对标志血小板活化的几种血小板膜糖蛋白进行测定,同时测定血小板聚集功能,旨在探讨气滞血瘀、气虚血瘀与血小板活化的关系,为血瘀证的虚实辨证提供客观依据,以便更

好地指导血瘀证的临床治疗。

资料和方法

1 临床资料 118 例心、脑血管病患者,均系我院门诊及住院患者,主要病种为冠心病、高血压病、高脂血症、急性脑梗塞、一过性缺血发作、脑梗塞后遗症,均符合内科疾病诊断标准⁽⁵⁾。以上受检者分为两组,参照中国中西医结合研究会血瘀证、虚证等专业委员会所修订的有关诊断标准进行辨证⁽⁶⁾。分为气滞血瘀、气虚血瘀 2 型。气滞血瘀组 58 例,男 30 例,女 28 例,年龄 50~71 岁,平均(58.09 ± 10.68)岁;病程 10

^{*} 山东省科委资助课题 (No. 991205708)

山东大学齐鲁医院 济南 250012

个月~25年,平均7.54年;心血管病33例,脑血管病25例。气虚血瘀组60例,男34例,女26例,年龄51~72岁;平均(60.33±10.17)岁;病程12个月~21年,平均6.83年;心血管病32例,脑血管病28例。另选30名本院职工健康查体者作为正常对照组,男21名,女9名;平均年龄(59.2±3.44)岁;排除内科器质性疾病,亦无血瘀证表现(不包括糖尿病、肾脏疾病、肿瘤患者)。

2 方法

2.1 血小板活化功能测定 (1)血液样本的处理:晨起采集空腹静脉血2ml,1% Na₂EDTA抗凝,800r/min离心5min,取上层富含血小板的血浆(PRP)。3500r/min离心15min,弃上清,加入PBS 2ml,3000r/min离心10min,洗涤两次,1%多聚甲醛1.5ml室温固定30min。(2)血小板膜受体的标记:将固定后的血小板悬液2500r/min离心10min,弃上清,加入相应荧光标记抗体[免疫荧光抗体CD62p-FITC, CD63-PE, TSP-PE,均为法国国际免疫有限公司(IMMUNOTECH)产品],置室温30min,加入PBS 2ml,2500r/min离心10min,弃上清,加入1ml PBS将血小板悬浮,上机(FACSVantage流式细胞仪:由美国Becton-Dickinson公司提供)检测。活化血小板数量占全部被测比例即活化血小板百分率。每份样本均设阴性对照,以消除本底荧光的影响。

2.2 血小板聚集率测定 采用比浊法^[7],血小板聚集仪NKK HEMA TRACERI, Model, PAT-4A。用3种聚集诱导剂:ADP4.68μmol/L, EPN11.28μmol/L, Col(自制)。血小板聚集功能以加诱导剂后5min血小板聚集率表示。

3 统计学方法 采用 t 检验,指标间关系确定采用直线相关分析。

结 果

1 3组患者 α -颗粒膜蛋白(CD62p)、溶酶体完整膜蛋白(CD63)及凝血酶敏感蛋白(TSP)表达量的比较 见表1。气滞血瘀组患者CD62p、CD63、TSP的表达量均明显高于正常对照组及气虚血瘀组(均 $P<0.01$);气虚血瘀组患者亦均高于正常对照组(均 $P<0.05$)。表明两种疾病CD62p、CD63、TSP的表达量均较正常组升高。

2 同种疾病气滞血瘀、气虚血瘀的CD62p、CD63及TSP表达量比较 见表1。气滞血瘀患者的CD62p、CD63及TSP的表达量均明显高于同病种气虚血瘀患者(均 $P<0.01$),说明同种疾病中气滞血瘀

表1 两组血瘀证患者血小板CD62p、CD63及TSP表达量比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD62p	CD63	TSP
气滞血瘀	58	4.05±2.16**△	4.26±3.19**△	7.45±5.44**△
心血管病	33	4.13±2.84▲	4.66±3.10▲	6.90±5.15▲
脑血管病	25	4.03±2.84▲	3.94±3.14▲	7.30±4.57▲
气虚血瘀	60	1.98±1.31*	1.65±1.19*	3.46±2.77*
心血管病	32	1.89±1.68	1.91±1.37	3.54±1.80
脑血管病	28	1.67±0.71	1.35±0.76	3.25±3.59
正常对照	30	1.44±0.48	1.15±0.63	1.47±0.71

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与气虚血瘀组比较,△ $P<0.01$;与气虚血瘀组同种疾病比较,▲ $P<0.01$

患者的CD62p、CD63及TSP的表达量均明显高于气虚血瘀证患者,反映气滞血瘀对CD62p、CD63及TSP的表达量均有显著影响。

3 气滞血瘀与气虚血瘀患者CD62p与CD63、TSP血小板聚集的相关性 气滞血瘀与气虚血瘀患者CD62p与CD63、TSP均呈正相关($r=0.740$, $P<0.01$, $r=0.744$, $P<0.01$);TSP与CD63亦呈正相关($r=0.635$, $P<0.01$);CD62p与ADP诱导的血小板聚集亦呈正相关($r=0.715$, $P<0.01$)。

讨 论

中医学认为血和则经脉流行,反之,血凝而不流,血泣则不通。因气与血的关系密切,“气为血之帅,血随之而运行……”,故气病常常导致血病,血病又可影响气的通畅。血瘀证中常兼有气病,以气滞血瘀和气虚血瘀最为常见。“气滞”是全身或局部功能障碍的统称。“气虚”为推动血液运行之气亏虚,帅血无力。气滞所致的血瘀属实证,气虚所致的血瘀属虚证^[8]。结果显示气滞血瘀患者血小板CD62p、CD63、TSP表达量均显著增高,提示血小板活化与气滞血瘀的发生及发展密切相关。

CD62p、CD63、TSP是目前所知最能反映血小板活化的特异指标。静息状态血小板胞浆内颗粒膜上的糖蛋白CD62p、凝血酶敏感蛋白(TSP)及溶酶体膜上的CD63在血小板激活“脱颗粒”的过程中发生移位,与血小板外膜融合,表达于血小板的表面膜上,成为识别活化血小板的分子标记物^[9]。检测表达活化标志物的血小板数量,可以特异地评价血小板活化程度。血小板活化的最主要表现是粘附和聚集,在这个过程中,血小板膜表面的粘附分子起着关键作用。血小板活化时,GPⅡb/Ⅲa含量升高,与 α -颗粒分泌的CD62p、TSP一起,加速血小板与内皮下基质的粘附,同时血小板活化时所表达的CD62p与白细胞E选择素糖蛋白配体结合,促进白细胞与血小板的粘附及在血栓部位的聚

集⁽¹⁰⁾。已有研究证明,活化血小板参与了动脉粥样硬化的发生、血栓的形成、血管的痉挛和缺血后脑组织的迟发性损伤的各个环节⁽¹¹⁾。本文检测的 118 例患者,患有血管病变或伴有血栓形成的疾病,在中医辨证中亦有瘀血倾向的心、脑血管疾病,测得血小板 CD62p、CD63、TSP 的表达量皆高于正常对照组,表明这些疾病中确实存在血小板活化现象。

本文主要探讨气滞血瘀、气虚血瘀与血小板 CD62p、CD63、TSP 之间的关系,研究结果显示,气滞血瘀和气虚血瘀患者的血小板活化均增多,但以气滞血瘀最为明显。说明血瘀证本身虽都存在着血小板活化现象,但以气滞血瘀对血小板 CD62p、CD63、TSP 的关系最为密切。通过上述研究,可为不同类型血瘀证的临床用药提供客观指标。由此可以设想,如果通过中医行气活血的方法能达到抑制血小板功能,而不引起出血的抗血小板聚集的作用,将为心、脑血管疾病的防治起到重要作用。

参 考 文 献

1. Metzlaar MJ, Clever HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelet. *Thromb Haemostas* 1992 ;68:378—382.
2. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of

stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990 ;75 : 550—554.

3. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemostas* 1991 ;65 : 467—473.
4. 石志芸,施赛珠,陈剑秋,等.血瘀证患者血小板 α -颗粒蛋白、内皮素测定. *中医杂志* 1996 ;37(4):239—240.
5. 戴瑞鸿.内科疾病诊断标准.上海:上海科技教育出版社, 1991:179—183,196,96—97,400,397—398.
6. 陈贵廷,薛赛琴.最新国内外疾病诊疗标准.第 2 版.北京:学苑出版社,1992:747,778.
7. 周瑞海,朱媛媛,高海青,等.二硝酸异山梨醇酯对冠心病患者血小板聚集功能的影响. *临床心血管病学杂志* 1995 ;11: 97—99.
8. 陈可冀,张之南,梁子钧,等.血瘀证与活血化瘀研究.上海:上海科学技术出版社,1990:416,417.
9. Corash L. Measurement of platelet activation by fluorescence activated flow-cytometry. *Blood Cell* 1990 ;16:97.
10. 李家增,贺石林,王鸿利.血栓病学.北京:科学出版社,1998 :107—125.
11. 冯周琴.实用血栓病学.郑州:河南科学技术出版社,1995: 169—172.

(收稿 2000-07-10 修回 2001-01-10)