

实验研究

温心胶囊对缺血性冠心病心阳虚证大鼠
血小板功能及形态变化的影响张明雪¹ 曹洪欣² 姜楠² 韩波² 沈雁²

摘要 目的:研究缺血性冠心病心阳虚证动物模型与血小板功能及形态变化。方法:采用高脂饮食、脑垂体后叶素(pit)皮下注射及寒冷刺激的造模方法,建立冠心病心阳虚证大鼠模型,观察血小板功能及形态变化。结果:模型组血小板膜糖蛋白(GPⅡb/Ⅲa)分子数和血小板α颗粒膜蛋白(GMP-140)含量、血小板聚集率等增高。结论:血小板功能及形态变化可以作为缺血性冠心病心阳虚证的客观指标。

主题词 冠状动脉疾病/中医药疗法 冠状动脉疾病/血液 @ 温心胶囊

将宏观物理表征和思辨性诊断的传统医学模式上升到将现代科学技术引入中医证候微观化领域和数理逻辑计量诊断相结合的现代医学模式是实现中医证候客观化、规范化的重要途径和方法。鉴于此,我们通过建立缺血性冠心病心阳虚证大鼠模型和把血小板指标引入中医辨证微观化领域研究,旨在从基础实验角度,探讨缺血性冠心病心阳虚证的物质基础,从而说明中医辨证客观化存在可能性及可操作性,并为中医辨证从定位、定性诊断上升到定量诊断提供科学的理论和实验依据,为中医证候规范化、客观化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物:健康 Wistar 雄性大鼠 40 只,体重 200~250g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 动物分组:40 只大鼠随机分为正常组、模型组、温心胶囊低剂量组、温心胶囊高剂量组,每组 10 只,单笼饲养。

1.3 造模方法:正常组每天饲喂基础饲料加生理盐水 10ml/kg 体重,其余各组饲喂高脂饲料,模型组每日生理盐水灌胃 10ml/kg 体重,低剂量组灌胃温心胶囊悬液 10g/kg(含生药),高剂量组灌胃温心胶囊悬液 20g/kg(含生药量),连续灌服 6 周。除正常组大鼠外,各组

大鼠每日 2h 冷藏于-2~-4℃冰柜中,持续 6 周。在第 35 天,除正常组以外的 3 组动物皮下多点注射 pit(10u/kg),正常组给予等容量的生理盐水。于第 43 天早晨各组大鼠经乌拉坦麻醉后,称体重,颈主 A 采血检测心肌酶、血脂及血小板各项指标。采血之后分别处死大鼠,摘取心、肝、肺脏,迅速用冷生理盐水冲洗,吸纸吸干,天平称重后,固定于 4%多聚甲醛溶液中。

1.4 生化检查:心肌酶、血脂试剂盒采用北京中生生物工程高技术公司产品,用 Lisa300 法国产全自动生化仪进行检测。α颗粒膜蛋白 GMP-140、血栓素 B₂(TXB₂)、6-酮-前列环素(6-Keto-PGF_{1α})、血小板膜糖蛋白(GPⅡb/Ⅲa)、VWF 血管性假血友病因子(VWF)试剂盒由苏州大学血栓与止血研究室提供,用 Packard 公司生产 5302 型 γ 自动记数仪检测,用上海通用机电技术研究所生产 TYXN-91 血液凝聚仪检测血小板聚集率。

1.5 血小板透射电镜标本制备:取 PRP 0.5ml,加入与室温相同的 4%缓冲戊二醛(pH7.4)作轻微表面固定。静置 10 分钟,以 1000r/min 离心 15 分钟,缓冲戊二醛 4℃下固定 2 小时,漂洗 2 次,1%四氧化锇(pH7.4)固定 1 小时,再漂洗,梯度乙醇脱水,Epon-812 环氧树脂包埋,60℃下聚合 24 小时,80℃下聚合 48 小时。LKK-NOVA 型超薄切片机切片,醋酸铀、枸橼酸铅双重染色,日本 JEM-1200EX 型电子显微镜,100KV 下观察。

1.6 药物组成与制备:温心胶囊由人参 10g、仙茅 10g、半夏 10g、瓜蒌 15g、薤白 15g、厚朴 10g、赤芍 20g、柴胡 15g 等组成。按处方比例称取中药材,并按胶囊制备工艺以 75%乙醇提取回收两次,调整浓度为 1:2,相当于每毫升悬液含生药 2g。

1.7 统计学处理:结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 缺血性冠心病心阳虚证模型组大鼠临床特征:模型组大鼠心肌损伤和心功能减退程度严重高于正常

基金项目:黑龙江省“95”攻关项目(G96C13-3-1)

1 辽宁中医学院中医内科教研室,辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 72 号(110032)

2 黑龙江中医药大学

收稿日期:2001-11-20;修回日期:2002-03-30

表1 各组大鼠血小板聚集率、平均血小板体积(MPV)、血小板分布密度(PDW)值检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血小板聚集率(%)			MPV(FL)	PDW(%)
		1min	5min	最大聚集		
正常组	10	12.18±8.41	12.66±8.63	17.76±8.61	4.99±0.30	15.52±0.45
模型组	10	32.89±16.62 $\Delta\Delta$	45.14±21.04 $\Delta\Delta$	48.14±19.93 $\Delta\Delta$	5.76±0.37 $\Delta\Delta$	17.38±0.43 $\Delta\Delta$
低剂量组	10	22.60±14.19*	22.13±20.81**	29.78±19.09*	5.49±0.30*	16.43±0.55**
高剂量组	10	17.78±12.87**	13.87±18.27**	25.08±18.67**	5.10±0.22**	16.01±0.37**

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 下表同

表2 各组大鼠血浆 GMP-140、TXB₂、6-Keto-PGF_{1 α} 、GP II b/III a 分子数、血浆 VWF 浓度变化结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GMP-140 (ng/ml)	TXB ₂ (pg/ml)	6-Keto-PGF _{1α} (pg/ml)	II b(分子数)	III a(分子数)	VWF(%)
正常组	10	5.88±2.18	715.5±77.1	88.8±22.0	93889.9±52857.7	90547.44±76664.03	8.51±1.27
模型组	10	12.3±4.3 $\Delta\Delta$	1153.4±126.1 $\Delta\Delta$	41.6±9.9 $\Delta\Delta$	220844.9±167808.4 Δ	215775.95±158362.36 Δ	44.18±41.78 Δ
低剂量组	10	9.22±2.83**	1000.1±114.2**	61.2±17.3**	134320.7±92693.4*	123149.70±83187.07**	9.21±2.92**
高剂量组	10	6.06±2.55**	778±95.7**	72.9±20.8**	103300.0±73081.2**	91614.99±68264.98**	10.13±1.09**

组,其中血脂、心肌酶升高,左心舒张功能下降,心电图心肌缺血,心肝肺出现组织形态学变化、背温下降等特异性改变,基本符合缺血性冠心病心阳虚证临床特点。

2.2 血小板各项指标比较:表1示,缺血性冠心病心阳虚证大鼠模型与正常组比较,血小板聚集率、平均血小板体积(MPV)和血小板分布密度(PDW)值增高极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),证明冠心病心肌缺血时血小板功能活跃,活性增强,为缺血性冠心病心阳虚证大鼠模型提供了形态学改变的客观指标,并提示温心胶囊能明显抑制血小板聚集率、MPV 和 PDW 值的升高,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且具有一定的剂量差别。

表2示,模型组大鼠血浆 GMP-140、TXB₂ 含量,GP II b/III a 分子数、血浆 VWF 浓度升高,6-Keto-PGF_{1 α} 含量下降,与正常组比较差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。高、低剂量组均能降低 GMP-140、TXB₂ 含量,GP II b/III a 分子数,VWF 浓度,升高 6-Keto-PGF_{1 α} 的含量,与模型组比较,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且有明显的量效关系。

2.3 电镜下各组大鼠血小板形态观察:正常组血小板多数呈盘状,大小均匀一致。模型组血小板糖萼增厚,颗粒界膜融合消失,使血小板颗粒内容物溶于胞浆,细胞之间不易区分界限,形成较大的实体团块;血小板易于变形,周边部向外伸出伪足。温心胶囊组血小板近似圆形者居多,血小板表面尚光滑,血小板细胞之间界限清楚(图略)。

3 讨论

模型组 GMP-140 表达增高是血小板 α 颗粒释放的直接证据^[1],而 TXB₂ 显著增高、6-Keto-PGF_{1 α}

显著降低说明 TXA₂ 具有强烈诱导血小板聚集和促血管收缩作用。VWF 含量^[3]及、血小板 GP II b/III a 分子数均显著增高(该指标反映血小板膜结合 Fg 能力的增强,是血小板聚集活性增强的主要标志^[4]),MPV 和 PDW 也明显增高(该指标说明大体积血小板数量增多和血小板体积分布弥散度增大,揭示血小板聚集率增强^[5]),上述指标均较正常组差异显著($P < 0.01$),原因是造模后形成的高脂血症、冠状动脉痉挛和心肌缺血可损伤内皮细胞,使血小板活性增强。血小板活化时释放的许多活性物质可以促进血小板聚集,致血小板功能亢进。

由此可见,缺血性冠心病心阳虚证大鼠模型的血小板功能处于高活化状态,其微观化表现是血小板聚集率增高,功能亢进。因此,我们认为,将血小板功能及形态变化作为缺血性冠心病心阳虚证的客观指标,有其物质基础及理论依据,可以反映缺血性冠心病心阳虚证的本质特征,并可为临床辨证客观化提供科学准确的量化指标。

参考文献

- 1 韦继明,王贵生,王慧芳.高血压、脑梗塞、冠心病患者血小板表面 GMP-140 及血浆 TXB₂、6-Keto-PGF_{1 α} 的 RIA. 放射免疫学杂志,1996,9(2):92-93.
- 2 景在平.遗传性假血友病因子在动脉硬化中的作用.中华实验外科杂志,1995,12(1):15-16.
- 3 方桂远,王左生,杨振华.脑梗塞时血浆血小板 α 颗粒膜蛋白及 VWF 的变化.实用儿科临床杂志,1999,14(4):205-206.
- 4 武艺,左连富,曹雪笠,等.冠心病患者血小板膜结合纤维蛋白原的免疫荧光定量研究.中华心血管病杂志,1996,24(3):200-202.
- 5 王建生,王英华.血小板分布宽度在冠心病检测中的临床意义.宁夏医学杂志,1996,18(3):129-130.