

消瘀止血片对出血性血小板病患者膜糖蛋白表达的影响

沈霖* 沈迪* 高兰* 刘仲萍* 杨艳萍* 谢晶* 周丕琪*

摘要 目的:观察消瘀止血片对出血性血小板病患者血小板膜糖蛋白表达的影响,探讨其治疗该病的可能机制。方法:148例出血性血小板病患者随机分为两组,中药组98例用消瘀止血片治疗;西药组50例用安络血及维生素C、K、P治疗,两组均治疗6个月。观察比较两组治疗后止血疗效及血小板聚集恢复率,并采用流式细胞术检测两组治疗前后及34例健康人(正常组)的血小板膜糖蛋白GPⅠb/Ⅲa、GPⅡb/Ⅲa、GPⅠb、GPⅡb、GPⅢa和p-选择素的表达。结果:中药组止血总有效率为89.8%,西药组为54.0%($P<0.01$);中药组血小板聚集功能恢复率为72.4%,西药组仅为4.0%($P<0.01$)。两组患者治疗前GPⅠb/Ⅲa、GPⅡb/Ⅲa、GPⅠb、GPⅡb及p-选择素表达荧光强度均低于正常组($P<0.05$);经中药治疗后,患者的血小板膜糖蛋白表达显著增加,与正常组比较差异无显著性($P>0.05$),且明显优于西药组($P<0.05$)。结论:消瘀止血片在受体蛋白水平上调节血小板膜糖蛋白GPⅠb/Ⅲa、GPⅡb/Ⅲa、GPⅠb、GPⅡb及p-选择素的表达可能是其治疗出血性血小板病的疗效机理之一。

主题词 血小板疾病/中医药疗法 膜糖蛋白类/药物作用 @消瘀止血片

Effect of Xiaoyu Zhixue Tablets on Expression of Membrane Glucoprotein in the Patient of Hemorrhagic Thrombopathy

Shen Lin, Shen Di, Gao Lan, et al.

(Union Medical Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022)

Objective: To observe effect of Xiaoyu Zhixue Tablets on expression of platelet membrane glucoprotein in the patient of hemorrhagic thrombopathy and probe into the mechanism of the therapy. **Methods:** 148 cases of hemorrhagic thrombopathy were randomly divided into a Chinese drug group ($n=98$) treated by Xiaoyu Zhixue Tablets, and a Western medicine group ($n=50$) treated by adrenosem, vitamine C, K, P. They were treated for 6 months. After treatment the therapeutic effect of hemostasis and the recovery rate of platelet aggregation in the two group were observed and analyzed. Before and after treatment expressions of platelet membrane glucoproteins GPⅠb/Ⅲa, GPⅡb/Ⅲa, GPⅠb, GPⅡb, GPⅢa and p-selectin expression were detected with flow cytometry in the two groups and in 34 healthy persons (normal group). **Results:** The total effective rate of hemostasis was 89.8% in the Chinese drug group and 54.0% in the Western medicine group, and the recovery rate of platelet aggregation was 72.4% in the Chinese drug group and 4.0% in the Western medicine group, with significant differences (both $P<0.01$). Before treatment, GPⅠb/Ⅲa, GPⅡb/Ⅲa, GPⅠb, GPⅢa and p-selectin expression's fluorescent intensities in the patients of the two groups were lower than those in the healthy persons ($P<0.05$), and after treatment with Chinese drug, the platelet membrane glucoprotein expression significantly increased and was higher than that in the Western medicine group ($P<0.05$), but with no significant difference as compared with the normal group ($P>0.05$). **Conclusion:** Xiaoyu Zhixue Tablets can up-regulate platelet membrane glucoproteins GPⅠb/Ⅲa, GPⅡb/Ⅲa, GPⅠb, GPⅢa and p-selectin expression, which is possibly one of the mechanisms for treatment of hemorrhagic thrombopathy.

Key Words Thrombopathy/TCM therapy; Membrane glucoproteins/drug action; @Xiaoyu Zhixue Tablets

出血性血小板病是一组反复发作性出血性疾病。患者常有不同程度的肢体瘀斑,月经过多,鼻衄,牙龈出血或眼底、球结膜等出血倾向,血小板计数、血小板形态、出凝血时间及凝血象等均属正常,但血小板聚集功能存在缺陷^[1,2]。前期我们采用益气活血方加消瘀止血片治疗本病,疗效显著^[3]。本研究在此基础上,重点观察消瘀止血片对出血性血小板病患者血小板膜糖蛋白表达的影响,并探讨其疗效机理,现报告如下。

1 临床资料

1.1 病例纳入及排除:本组病例的选择按1996年标准进行^[4]。148例出血性血小板病患者均为2001年1月~2003年3月间我院中医科和血液科门诊及住院患者。全部病例均有多部位出血临床表现,检测血小板计数、出血时间、凝血象(包括活化的部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间)等未发现明显异常改变。按常规操作检测患者血小板聚集率,其中最大聚集率在21%~40%者为反应不良,低于20%者为反应缺如。本组纳入的病例均对一项或多项诱聚剂诱导的聚集反应不良或缺如。经内科、耳鼻喉科、妇科、口腔科和眼科等科室诊视,未在出血部位发现特异诊断性病灶,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171194)

* 华中科技大学同济医学院附属协和医院中医科,湖北省武汉市解放大道1277号(430022)

收稿日期:2004-05-31;修回日期:2004-10-11

且均由瑞斯托霉素检测血小板排除血小板无力症。

1.2 一般资料:148 例患者采用随机数字表法分为两组。中药组 98 例中,男 34 例,女 64 例;年龄 11~63 岁,平均 (34.42 ± 13.86) 岁;病程 2~14 年。98 例患者共计 207 个出血部位,其中肢体皮肤瘀斑或瘀点 79 例,鼻出血 42 例,月经过多(每次月经量估计在 150ml 以上)39 例,齿龈出血 36 例,眼底出血 7 例,球结膜出血 4 例。患者血压、心率正常,舌淡或带瘀点,苔薄,脉弦或涩。以二磷酸腺苷(ADP,美国 Sigma 公司)、花生四烯酸(AA,美国 Sigma 公司)、血小板活化因子(PAF,美国 Sigma 公司)、刺参黏多糖(SJAMP,美国进口分装,由中国医学科学院血液学研究所提供)作为诱聚剂,用 Chronolog430 型血小板聚集仪检测患者血小板最大聚集率。98 例患者中,单独一种诱聚剂诱导缺陷为 ADP6 例、AA11 例、PAF9 例、SJAMP23 例,两种诱聚剂同时出现聚集缺陷为 ADP/AA6 例、ADP/PAF5 例、AA/PAF14 例、ADP/SJAMP7 例,三种诱聚剂 ADP/AA/PAF 或 ADP/AA/SJAMP 聚集缺陷者 5 例,四种诱聚剂 ADP/AA/PAF/SJAMP 同时缺陷者 12 例。西药组 50 例中,男 14 例,女 36 例;年龄 9~61 岁,平均 (32.89 ± 12.54) 岁;病程 1~12 年。50 例患者共计 114 个出血部位,其中肢体皮肤瘀斑或瘀点 42 例,鼻出血 28 例,月经过多 21 例,齿龈出血 21 例,眼底出血和球结膜出血各 2 例。聚集缺陷为 ADP2 例、AA4 例、PAF3 例、SJAMP9 例,ADP/AA3 例、ADP/PAF5 例、AA/PAF8 例、ADP/SJAMP6 例,ADP/AA/PAF 和 ADP/AA/SJAMP 各 1 例,四种诱聚剂 ADP/AA/PAF/SJAMP 同时缺陷者 8 例。两组患者的年龄、病程、出血症状及实验室资料等差异均无显著性($P > 0.05$)。另选健康献血员 34 例作为正常对照组,其中男 15 例,女 19 例,年龄 (30.12 ± 7.14) 岁,检测血小板聚集功能未发现异常。

2 治疗及观察方法

2.1 治疗方法:中药组口服消瘀止血片^[3],本方由黄芪、党参、白芍、当归、桃仁、甘草按 1:1:1:0.5:0.5:0.2 比例组成。方中药材均购自湖北省中药材公司,由本院中药制剂室加工成中药片剂,每片含生药量约 1.2g。依据病情每次口服 5~8 片,每日 2 次,出血量较多(鼻出血,月经过多)者可酌情增至每日 3 次。治疗期间停用其他中、西药物。西药组每次口服维生素 C(湖北华中药业有限公司,国药准字 H42020614)100mg、维生素 K₄(上海天平制药厂,国药准字 H20020821)2mg、芦丁片(山西临汾云鹏药业有限公司,国药准字 H14020783)20mg、安络血(武汉制药厂,

国药准字 H42021950)2.5~5mg,每日 2 次。两组疗程均为 6 个月。治疗期间每月检测 1 次血小板计数、凝血象、血小板聚集率,并注意观察出血症状。

2.2 血小板膜糖蛋白检测^[5]:患者于治疗前后分别取肘静脉血 3.6ml,以 2%EDTA-NA₂1:9 抗凝处理,正常对照组以相同方法收集标本。按常规分离富含血小板血浆,收集血浆层,加 PBS2ml,3000 转/分离心 10 分钟,去上清,再加 PBS 15ml 混匀,加入 4%多聚甲醛 0.5ml 摇匀,室温固定 15 分钟,PBS 洗涤 2 次,调整血小板浓度为 $3 \times 10^7/L$ 。取调整好的血小板溶液 100 μ l,分别加入异硫氰酸荧光黄(FITC)标记的 CD42b(抗 GP I b)、CD41(抗 GP II b)、CD61(抗 GP III a)、CD42b/CD42a(抗 GP I b/II b)、CD41/CD61(抗 GP II b/III a)、p-选择素(CD62p)(均为美国 BD Pharmingen 产品)克隆抗体 200 μ l,混匀后室温避光孵育 30 分钟,PBS 补至终体积 1ml,于 FACS420 型流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)上进行测定,每个样本分析 10000 个血小板,结果以荧光阳性百分标记率(%Tot)表示^[5]。

2.3 统计学方法:采用 Excel 统计软件处理,治疗前后比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用方差分析;止血有效率采用 *Ridit* 检验,血小板聚集恢复率采用 χ^2 检验。

3 治疗结果

3.1 疗效判定标准:按本课题协作组制定的止血疗效和血小板聚集率恢复疗效标准^[3]进行判定。(1)止血疗效标准:显效:治疗后出血症状消失,月经量如常($< 80ml$);有效:临床出血症状消失,停止治疗 2 个月后偶有肢体瘀斑或齿龈出血;无效:治疗 6 个月而出血症状仍反复出现,或出血并无好转,甚至加重。(2)血小板聚集率疗效标准:以血小板聚集率恢复正常为有效。

3.2 两组止血疗效比较:中药组 98 例观察 6 个月,显效 72 例(73.5%),有效 16 例(16.3%),无效 10 例(10.2%),总有效率为 89.8%;西药组 50 例中,显效 8 例(16.0%),有效 19 例(38.0%),无效 23 例(46.0%),总有效率为 54.0%。经 *Ridit* 检验,两组止血疗效差异有显著性($P < 0.01$)。

3.3 两组血小板聚集率恢复情况比较:中药组 98 例中,有 71 例(72.4%)血小板聚集功能恢复正常,而西药组仅 2 例(4.0%),两组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

3.4 血小板膜糖蛋白测定结果:附表示,两组患者治疗前 GP I b/II b、GP II b/III a、GP I b、GP III a 及 CD62p 的荧光标记率均明显低于正常组($P < 0.05$);中药组治疗 6 个月后,上述指标均上升,与正常组比较差异无

附表 各组血小板膜糖蛋白表达荧光标记率比较(%Tot, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	GP I b/Ⅱ	GP Ⅱ b/Ⅲa	GP I b	GP I b	GP Ⅲa	CD62p
中药组	治疗前	98	43.62±14.58*	46.68±16.03*	70.53±32.28*	53.24±23.56	39.77±16.23*	12.58±4.27*
	治疗后	98	62.44±17.61 [△]	54.28±20.81 [△]	84.62±29.24 [△]	52.32±27.27	52.09±14.59 [△]	14.66±3.64 [△]
西药组	治疗前	50	44.58±13.07*	44.61±15.22*	71.81±28.55*	51.29±23.42	41.26±12.98*	11.64±5.84*
	治疗后	50	47.12±18.28	45.74±16.52	72.57±32.54	50.64±24.28	44.31±16.22	11.89±6.57
正常组		34	66.21±13.23	52.33±10.54	90.54±23.67	51.66±17.30	57.62±10.84	15.63±7.07

与正常组比较, * $P<0.05$; 与西药组治疗后比较, $\Delta P<0.05$

显著性($P>0.05$), 与西药组治疗后比较差异有显著性($P<0.05$)。

4 讨论

血小板表面独特的膜糖蛋白在血小板黏附、聚集和释放反应中起重要作用。GP Ⅱ b/Ⅲa 复合物是血小板膜上含量最多的糖蛋白, 不仅是纤维蛋白原的受体, 还能与其他大分子黏附蛋白如血管性假血友病因子(vWF)、玻璃连结蛋白(VN)等相结合, 调节血小板变形及聚集功能。有研究证实, 各种不同的诱导剂引起的血小板聚集途径并不相同, 但两个 GP Ⅱ b/Ⅲa 与一个纤维蛋白原分子结合是血小板聚集反应的最后通路^[6]。GP I b/Ⅱ复合物具有 vWF 和凝血酶受体功能, GP I b 与 vWF 的初始结合是血小板聚集反应中重要的生理过程之一^[7]。CD62p 目前被认为是反映体内血小板活化的较好标志物之一。当血小板黏附于血管破损处或受到凝血酶和 ADP 等血小板活化剂作用后, α 颗粒膜与胞浆膜融合, CD62p 暴露于胞浆膜表面, 同时一部分 CD62p 脱落至血浆中, 这样血小板表面及血浆中 CD62p 就随血小板的活化而增多^[7]。

我们既往的研究已证实^[8], 出血性血小板病患者 GP I b、GP I b/Ⅱ、GP Ⅲa 水平下降。本研究在此基础上, 发现该病患者 GP Ⅱ b/Ⅲa 及 CD62p 也低于正常水平。由此可见, 本组病例血小板膜 GP I 降低, 从而引起 GP I b/Ⅱ降低, 使 vWF 及凝血酶不能与之有效结合; 同时, GP Ⅲa 降低又引起 GP Ⅱ b/Ⅲa 降低, 在不可逆的血小板聚集过程中, 使之与纤维蛋白原识别和结合的位点减少, 从而导致临床出血症状及血小板聚集不良或异常。CD62p 水平下降, 说明患者在出血期间, 血小板活化状况低于正常状态。但该病患者血小板膜 GP 降低, 是由于 GP 表达异常, 还是结构或功能异常, 尚有待进一步探讨。

中药消瘀止血片是我们经多年体外筛选及临床摸索而自拟的益气活血方。方中黄芪、党参益气, 当归和血补血, 白芍、桃仁活血化瘀, 甘草和中, 诸药共奏行气止血消瘀之功。经 10 余年临床验证, 该方在控制本病临床出血症状, 纠正血小板聚集缺陷及降低停药 1 年

后复发率等方面均明显优于常规西药安络血、维生素 C、P、K₁ 等^[3]。本研究结果显示, 用该药治疗半年后, 能提高患者的 GP I b、GP I b/Ⅱ、GP Ⅲa 及 CD62p 表达水平, 从而改善血小板活化状态, 控制出血症状, 恢复血小板聚集功能。这表明在受体蛋白水平上调节部分血小板膜糖蛋白的表达, 是消瘀止血片治疗出血性血小板病的疗效机理之一。至于本方改善血小板膜糖蛋白作用的详细机理, 尚有待于进一步研究。

参考文献

- 1 沈迪, 凌柱三主编. 临床出血病学. 北京: 科学技术文献出版社, 1996: 43~45.
- 2 沈迪, 朱闽, 王爱莲, 等. 出血性血小板病患者血小板超微结构的研究. 中华医学杂志, 1997, 21(2): 75~76.
- 3 沈迪, 沈霖, 王爱莲, 等. 消瘀止血片治疗未明原因多部位出血伴血小板聚集缺陷 104 例临床观察. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(5): 280~282.
- 4 沈迪, 朱闽, 王爱莲, 等. 未明原因多部位出血者血小板聚集功能的研究. 血栓与止血杂志, 1996, 3(4): 145~147.
- 5 杨林花, 沈迪, 王爱莲, 等. 应用流式细胞仪检测原因未明血小板病患者血小板膜糖蛋白的改变. 中华物理医学杂志, 1997, 19(9): 165~167.
- 6 Vorchheimer DA, Badimon JJ, Fuster V. Platelet glycoprotein Ⅱ b/Ⅲa receptor antagonists in cardiovascular disease. JAMA, 1999, 281(15): 1407~1414.
- 7 Nurden A, Cazes E, Bihour C, et al. Confirmation that GP I b/Ⅱ complexes have a reduced surface distribution on platelets activated by thrombin and TRAP-14-mer peptide. Br J Haematol, 1995, 90(3): 645~654.

欢迎邮购《动物本草》

由风湿病专家杨仓良等主编, 全国 50 多位医药专家参与撰写的我国第一部动物药本草专著——《动物本草》已由中医古籍出版社出版。该书 200 余万字, 收录动物药 1700 余种, 单验方 2 万多首, 重点突出临床应用。该书被称为收录品种最全、体例新, 有很高学术价值和一定实用性的一本好书。历代医家常将动物药称为“血肉有情之品”, 并认为有“愈顽疾起沉疴”之神奇功效。《动物本草》是杨仓良先生的又一力作, 是《毒药本草》的姊妹篇, 同《毒剧中药古今用》及《矿物本草》构成系列本草专著。前两书已连印 3 次, 并多次获奖, 欢迎邮购。《毒药本草》(书价: 78 元)、《现代中医临床疗效评价与进展》(书价: 38 元)、《动物本草》(书价: 120 元), 免收邮挂费, 量大优惠。地址: 宁夏银川市宁夏秦杨风湿病医院, 邮编: 750002, 联系人: 杨仓良。