

• 方药研究 •

痰瘀同治法对动脉粥样硬化家兔 凝血/纤溶活性平衡的影响

张卫萍¹ 任建勋² 袁祖贻¹ 刘建勋²

(1. 西安交通大学第一医院内科, 陕西省西安市雁塔区雁塔路 277 号, 710061; 2. 中国中医科学院西苑医院)

[摘要] **目的** 观察痰瘀同治法对动脉粥样硬化(AS)家兔血脂、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)与纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)、血小板聚集性及血液流变学的影响。**方法** 将 50 只家兔随机分为 5 组, 每组 10 只。分别为空白对照组、模型组、地奥心血康组(0.02g/kg)、痰瘀同治方大、小剂量组(7.5g/kg, 15g/kg)。除空白对照组外其余各组给予高脂饲料喂养后 4 周开始灌胃给药, 每日 1 次, 连续 4 周后处死动物, 测定血脂、t-PA 与 PAI、血小板黏附与聚集性及血液流变学相关指标。**结果** 痰瘀同治方大、小剂量组能显著改善 AS 家兔血脂变化, 升高 t-PA 并降低 PAI, 抑制血小板第 1 分钟聚集率及最大聚集率, 降低全血高切变率及低切变率黏度、全血还原黏度、血小板黏附率与血沉。**结论** 痰瘀同治法可通过改善血脂异常, 提高纤溶活性, 抑制血小板聚集, 改善微循环等方面来防治 AS。

[关键词] 痰瘀同治; 动脉粥样硬化; 凝血; 纤溶活性; 血小板聚集性; 血液流变学

Effect of Simultaneous Treatment of Phlegm and Stasis on the Balance of Blood Coagulant and Fibrinolytic Activity in Atherosclerotic Rabbits

ZHANG Wei-ping¹, REN Jian-xun², YUAN Zu-yi¹, et al.

(1. The First Affiliated Hospital of XI'AN Jiaotong University, XI'AN 710061; 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT **Objective** To study the effects of simultaneous treatment of phlegm and stasis on the changes of blood fat, tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI), platelet agglutinate rate and hemorheology in atherosclerotic rabbits. **Methods** The 50 white rabbits were divided randomly into five groups with 10 in each: blank control group, model group, Di'ao Xinxuekang (0.02g/kg) group, phlegm and stasis simultaneous treatment small and large dose (7.5g/kg, 15g/kg) groups. After four weeks' high-fat feedstuff feed, the rabbits were given medicine gavage per day for 4 weeks and then killed. The blood fat, t-PA and PAI, platelet agglutinate rate and hemorheology were measured. **Results** The phlegm and stasis simultaneous treatment in the treated group could significantly improve the level of blood fat, increase t-PA and decrease PAI, significantly inhibit the platelet one minute agglutinate rate and maximum agglutinate rate, significantly decrease the whole blood high cut rate and low cut rate viscosity, whole blood revert viscosity, platelet adhesion, and erythrocyte sedimentation rate (ESR) in atherosclerosis (AS) rabbit. **Conclusion** Simultaneous treatment of phlegm and stasis can prevent AS through improving abnormal blood fat, increasing fibrinolytic activity, inhibiting platelet aggregation, and improving microcirculation.

Key Words Simultaneous treatment of phlegm and stasis; Atherosclerosis; Blood coagulation; Fibrinolytic activity; Platelet aggregation; Hemorheology

动脉粥样硬化(AS)是缺血性心血管疾病最主要的病理改变,是以脂质沉积、纤维结缔组织增殖等为特点在大动脉的积聚并伴随局部炎症反应的慢性过程^[1]。研究表明^[2],由脂质代谢紊乱与炎症反应引起的血液凝血/纤溶活性平衡失调,局部血液凝固性增高,纤维蛋白原沉积和血小板黏附、聚集所释放的一些活性因子都可以促进AS的形成和发展。同时,AS所引起

的血管壁组织学和生化改变必然会影响到循环系统的功能,使血液凝固性、血液流变学发生一系列的异常改变,又可进一步加重AS,因此可以认为,血液流变学改变、血栓形成、凝血及纤溶失衡的复杂机制伴随斑块形成的始终。中医药对AS凝血/纤溶活性平衡的调节具有一定的影响。本研究旨在通过运用痰瘀同治法对AS动物模型血液中纤溶酶原激活物(t-PA)与纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)含量变化及血流动力学的影响,以探讨其对AS形成的影响。

1 材料

1.1 动物

日本大耳白兔 50 只, 体重 2kg 左右, 兔龄 3~4 个月, 雄性。由西安交通大学医学院实验动物中心提供(动物合格证号: 陕医动字 08-018 号)。

1.2 药物

地奥心血康胶囊(成都地奥集团生产, 批号: 990457, 每粒含甾体总皂苷 100mg); 胆固醇(上海政翔化学试剂研究所生产, 批号: 980105); 枸橼酸钠(西安化学试剂厂生产, 批号: 980602); 痰瘀同治方(以瓜蒌薤白半夏汤为基础方, 组成: 人参 20g, 瓜蒌 15g, 薤白 12g, 半夏 15g, 川芎 15g, 红花 15g, 桃仁 12g, 丹参 20g, 山楂 12g) 均购自陕西中医学院附属医院中药房, 先按照临床用药煎煮方法煎制成常规药液, 再分别低温减压浓缩成含生药 1.5g/ml 与 3.0g/ml 的高浓度药液。

1.3 试剂

t-PA 与 PAI 活性测定试剂盒(上海太阳亚都生物技术公司生产, 批号: 990901); 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定试剂盒(上海科华—东蔓诊断用品有限公司); 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(北京中生生物技术公司); 二磷酸腺苷(ADP)中国科学院上海生物化学研究所生产, 批号: 041011。

1.4 仪器

LG-III 型转筒式血液黏度测定仪(中国科学院传感技术公司生产, 切变率分别为 200S^{-1} 和 40S^{-1}); 3F-3 型高速微量离心机(华兴机轮公司生产); 9103-B 血小板黏附仪(中国科学院传感技术公司生产); TYXN-91 智能血液凝集仪(上海通用机电技术研究所生产); DG-II 型酶标仪(国营华东电子管厂生产)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及处理

将日本大耳白兔 50 只随机分为 5 组。(1) 空白对照组: 正常饮食, 每天生理盐水灌胃 5ml/kg。(2) 模型组: 按文献指导方法^[3], 实验前 4 周以 79.5% 基础饲料加 15% 蛋黄粉、0.5% 胆固醇和 5% 猪油喂食, 后 4 周将胆固醇去掉, 给予 80% 基础饲料加 15% 蛋黄粉和 5% 猪油喂食。每天生理盐水灌胃 5ml/kg。(3) 地奥心血康组: 除按模型组给予高脂饮食外, 给予地奥心血康药液灌胃 0.02g/kg。(4) 痰瘀同治方小剂量组: 除按模型组给予高脂饮食外, 给予痰瘀同治方(浓度: 1.5g/ml), 剂量为 7.5g/kg。(5) 痰瘀同治方大剂量组: 除按模型组给予高脂饮食外, 给予痰瘀同治方(浓度: 3.0g/ml), 剂量为 15g/kg。各组用药体积均为 5ml/kg。动物造模后第 28 天开始给药, 每日 1 次, 连续 28 日, 于末次给药后第 2

日晨空腹颈总动脉取血, 冻存。

2.2 检测指标与方法

2.2.1 血脂测定 TC、TG 采用氧化酶法, HDL-C 采用直接测定法, 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)采用 Field 公式法: $\text{LDL-C} = (\text{TC} - \text{HDL-C} - \text{TG}) / 2.06$ 。

2.2.2 纤溶系统活性测定 t-PA 与 PAI 采用发色底物显色法, 具体操作方法按试剂盒说明进行。t-PA 活性参照 WHO 的标准品(861670), 以国际单位 IU 表示。PAI 活性单位定义为在 25°C , 20 分钟内抑制 1.0 国际单位 t-PA 的 PAI 酶量, 即为 1.0(Arb·unit)。

2.2.3 血小板黏附与聚集率测定 采用比浊法, 使用 TYXN-91 智能血液凝集仪, 以 ADP 作诱导剂, 观察结果用第 1 分钟血小板聚集率(A_1)和最大聚集率(A_m)表示。另取 1ml 枸橼酸钠抗凝血加入 5ml 长颈圆球玻璃瓶中, 置于血小板黏附仪转盘上, 以 5rpm 的转速旋转 15 分钟, 分别吸取 20μl 旋转前后血液, 对其进行血小板计数, 血小板黏附率按下式计算。血小板黏附率(PT)(%) = (旋转前血小板数 - 旋转后血小板数) / 旋转前血小板数 $\times 100\%$

2.2.4 血液流变学测定 取 1ml 肝素抗凝血注入黏度计转筒内, 转换高切变率、低切变率(高切: 200S^{-1} , 低切: 40S^{-1}), 求得全血高切变率($\eta \cdot h$)及低切变率($\eta \cdot l$)黏度值; 采用温氏法测定血沉(ESR); 取 1ml 血浆, 按全血高切黏度的方法测定血浆黏度($\eta \cdot p$); 全血还原黏度(RV)由计算机根据全血高切变黏度值和红细胞压积算出。

2.2.5 主动脉内膜形态学观察 所有动物处置后取样, 打开兔心腔, 小心分离主动脉, 肉眼观察比较各组动脉粥样形态学差异。

2.3 统计学方法

实验结果均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件处理。资料的统计学分析用单因素方差分析, 方差齐性用 Student-Newman-Keuls 检验, 方差不齐用 Tamhane's T² 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组家兔血脂变化比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 其他各组家兔血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药各组血清 TC、TG、LDL-C 均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 痰瘀同治方大剂量组血清 HDL-C 明显升高($P < 0.01$), 而地奥心血康组与痰瘀同治方小剂量组血清 HDL-C 变化不显著($P > 0.05$)。

表 1 各组家兔血脂变化比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量	TG	TC	HDL-C	LDL-C
空白对照组	10	—	0.93±0.19	1.79±0.29	0.62±0.11	0.72±0.23
模型组	10	—	2.26±0.35▲	25.99±4.09▲▲	2.06±0.22▲	22.74±3.76▲
地奥心血康组	10	0.02g/kg	1.90±0.27*	21.16±2.84**	2.17±0.26	17.48±1.92**
痰瘀同治方小剂量组	10	7.5g/kg	1.82±0.32*	17.42±4.33**	2.22±0.29	15.31±3.08**
痰瘀同治方大剂量组	10	15g/kg	1.63±0.17**	13.64±3.02**	2.41±0.15**	10.30±2.81**

与空白对照组比较, ▲ $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.2 各组家兔凝血/纤溶系统变化比较

表 2 示, 模型组与空白对照组相比 t-PA 活性明显降低, 而 PAI 活性明显升高, 二者差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。地奥心血康组、痰瘀同治方大剂量组与模型组比较, t-PA 活性明显升高, PAI 活性明显下降, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。而痰瘀同治方小剂量组与模型组比较 t-PA 活性升高 ($P<0.05$), PAI 略有下降, 差异无统计学意义。

表 2 各组家兔纤溶系统变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量	t-PA (IU/ml)	PAI (AU/ml)
空白对照组	10	—	0.48±0.10	0.67±0.13
模型组	10	—	0.25±0.06▲	0.89±0.07▲
地奥心血康组	10	0.02g/kg	0.45±0.11**	0.69±0.11**
痰瘀同治方小剂量组	10	7.5g/kg	0.32±0.06*	0.78±0.06
痰瘀同治方大剂量组	10	15g/kg	0.78±0.10**	0.31±0.12**

与空白对照组比较, ▲ $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.3 各组家兔对血小板聚集性变化比较

表 3 各组家兔血小板聚集性变化比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量	A ₁ (%)	A _m
空白对照组	10	—	28.2±7.8	51.5±10.1
模型组	10	—	62.9±8.7▲	73.4±7.8▲
地奥心血康组	10	0.02g/kg	34.0±8.3**	42.6±9.3**
痰瘀同治方小剂量组	10	7.5g/kg	51.3±10.0*	59.0±19.0*
痰瘀同治方大剂量组	10	15g/kg	14.4±6.1*	21.1±9.8**

与空白对照组比较, ▲ $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 3 示, 地奥心血康组和痰瘀同治方大、小剂量组与模型组比较均可降低 A₁、A_m ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型组与空白对照组比较 A₁、A_m 升高非常显著 ($P<$

0.01)。

3.4 各组家兔血液流变学指标变化比较

表 4 示, 模型组与空白对照组比较, $\eta \cdot h$ 、 $\eta \cdot l$ 、 $\eta \cdot p$ 、ESR、RV、PT 均有显著性升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。治疗组(包括地奥心血康组、痰瘀同治方大、小剂量组)与模型组比较 $\eta \cdot h$ 、 $\eta \cdot l$ 、 $\eta \cdot p$ 、RV、PT 均有显著性降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.5 各组家兔主动脉内膜形态学观察

空白对照组主动脉内膜光滑呈灰色, 未见异常; 模型组主动脉绝大部分血管内膜有不同程度的淡黄色斑块, 以主动脉弓处及腹主动脉处明显, 呈灶状、条索状及不规则的小片状分布, 略突出于内膜表面; 地奥心血康组血管内膜病较模型组轻, 以主动脉弓处病变显著; 痰瘀同治方大剂量组病变最轻, 集中于主动脉弓处, 为散在点状分布。

4 讨论

AS 在一定程度上被认为是血管壁组织、细胞成分对许多损伤刺激因素的反应所引起的慢性炎症和免疫反应过程^[4], 涉及到血脂异常、细胞外基质、血液成分(特别是单核细胞、淋巴细胞、血小板及低密度脂蛋白等)、局部血液动力学、环境及遗传等诸多因素之间的复杂作用。研究表明, 血液流变学异常对动脉血管内皮细胞损伤、动脉内膜增厚、内膜平滑肌细胞增生和内膜结缔组织结合, 以及对单核细胞黏附、血小板聚集和巨噬细胞吞噬等都起着重要影响^[5]。同时, 对内源性凝血系统中凝血/纤溶平衡紊乱也有一定的促进作用。而 t-PA、PAI-1 活性及水平的变化将直接影响血浆促凝和抗凝功能的状态。研究证实, 血液 t-PA 浓度与 PAI

表 4 各组家兔血液流变学变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量	$\eta \cdot h$ (mPa · s)	$\eta \cdot l$ (mPa · s)	$\eta \cdot p$ (mPa · s)	RV (mPa · s)	PT (%)	ESR (mm/h)
空白对照组	10	—	2.35±0.16	4.26±0.31	1.86±0.13	4.22±0.57	23.26±3.40	2.40±0.95
模型组	10	—	2.70±0.18▲▲	6.64±0.86▲*	2.20±0.25▲▲	5.90±1.08▲▲	32.04±2.41▲▲	5.10±1.74▲▲
地奥心血康组	10	0.02g/kg	2.25±0.20**	4.76±0.25**	1.83±0.15**	4.40±0.60**	22.28±3.00**	3.30±0.96*
痰瘀同治方小剂量组	10	7.5g/kg	2.23±0.27**	4.93±0.97**	1.85±0.19**	3.89±0.75**	20.45±2.81**	3.00±1.37*
痰瘀同治方大剂量组	10	15g/kg	1.93±0.19*	4.44±1.12	1.73±0.22*	3.43±1.74*	20.46±3.48*	2.80±1.44*

与空白对照组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

-1 浓度高度相关^[6]。临床上也证实 AS 患者存在不同程度的血栓前状态及纤溶受抑状态^[7]。

中医学理论对 AS 的病机变化认识多从血瘀入手,治疗多以活血化瘀为法。但血瘀只是 AS 病机的一个方面,单纯应用活血化瘀中药对降低血液高凝状态,改善血液流变性,减弱 AS 病变的程度并不是十分理想。因此近年来对 AS 病机变化的认识与治疗更注重于痰与瘀之间的关系^[8]。痰、瘀是密不可分的,津血同源必然导致痰瘀相关。痰浊阻于血脉,影响气血运行,导致血瘀,最终痰瘀同病。正如《明医杂著》曰:“若血浊气滞则凝聚为痰,气虚死血痰饮为言。”明确提出了痰瘀相关。现代医学目前研究认为,高血脂是痰浊的病理产物之一,由高血脂所化生的痰浊可损伤血管内皮细胞,破坏 t-PA/PAI 之间平衡,从而使血液流动性降低,表现出“黏、浓、凝、聚”的血液流变学改变,最终导致血栓及 AS 的形成,同时血浆中甘油三酯水平升高也可使纤溶系统功能紊乱,PAI 活性上升、t-PA 活性下降^[9,10]。在本实验中,模型动物血清 TC、TG、LDL-C 在高脂饮食 8 周时出现了明显升高,而同时血液流变学也出现了明显的改变,主动脉内膜出现不同程度的呈灶状、条索状及不规则的小片状淡黄色斑块,体现了 AS 过程中痰浊和血瘀两种证候的生物学变化。同时,研究也证实了在通过高脂饲料喂养而形成 AS 的病理生理过程中,血小板黏附与聚集性以及 t-PA/PAI 的平衡均出现明显改变。提示 t-PA/PAI 的失衡是影响血小板黏附与聚集性、血液流变学异常的一个重要因素。而以益气活血、祛瘀化痰为组方原则,由人参、瓜蒌、薤白、半夏、川芎、桃仁、红花、山楂等配伍的中药复方可明显改善血脂水平,恢复 t-PA/PAI 平衡,同时降低血液黏滞度,改善血流动力学状态,主要表现在降低

血清中 TC、TG、LDL-C 含量,减少血小板聚集与黏附率,降低红细胞聚集性(低切全血黏度降低),提高红细胞变形性(高切全血黏度降低)以及降低血沉。以上表明,通过痰瘀同治法可以明显调节 t-PA/PAI 平衡,降低血小板聚集与黏附与改善血液流变学状态,抑制食饵性家兔动脉粥样硬化的形成,为痰瘀同治法进一步用于冠心病的临床治疗提供了实验依据。

参考文献

[1]Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature, 2000, 407(6801): 233~241.
[2]吴锦. 冠心病血瘀证患者血小板膜系统的超微结构和功能. 中国循环杂志, 1989, 4(4): 317~320.
[3]施新猷. 现代医学实验动物学. 北京:人民军医出版社, 2000:470.
[4]Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002, 420(6917): 868~874.
[5]Kleinstreuer C, Hyun S, Buchanan JR Jr, et al. Hemodynamic parameters and early intimal thickening in branching blood vessels. Crit Rev Biomed Eng, 2001, 29(1): 1~64.
[6]韩纪举,魏然,陈彬,等. 血液 t-PA 和 PAI-1 水平及活性与血液流变学指标的相关性分析. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(2): 160~165.
[7]魏文宁,宋善俊,刘仲萍,等. 凝血酶-抗凝血酶Ⅲ复合物测定及其临床意义. 同济医科大学学报, 1998, 27(1): 39~41.
[8]张卫萍,任建勋,胡锐. 冠心病从痰论治的探讨. 陕西中医学院学报, 2002, 25(5): 7~9.
[9]沈涛,白怀,刘秉文,等. 实验性高甘油三酯血症大鼠凝血和纤溶的变化. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(3): 199~202.
[10]黄秋霞,姜德谦. 冠心病患者血清甘油三酯与纤溶激活系统的关系. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(4): 313~315.
(收稿日期:2007-12-21;修回日期:2008-01-25)
[编辑:叶 晨]

(上接第 333 页)

参考文献

[1]中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则. 3 辑. 北京:中国医药科技出版社, 1997:151.
[2]王淑玉. 实用妇产科诊疗规范. 南京:江苏科学技术出版社, 2002:120.
[3]马宝璋. 中医妇产科学. 上海:上海科学技术出版社, 2001:104.
[4]丰有吉. 妇产科学. 北京:人民卫生出版社, 2002:343.
[5]张启兵. 耳针作用的形态学机理研究. 上海针灸杂志, 2003, 22(1): 46~48.
[6]邢锦绣,刘春霞. 关于耳穴的理论研究. 吉林中医药, 1996, (6): 39~40.
[7]刘冬娥. 女性围绝经期的生理和病理变化. 中国实用妇科与

产科杂志. 2004, 20(8): 473~474.
[8]王俊霞,杨晓娜. 围绝经期综合征中西医发病机理研究进展. 江苏中医药, 2004, 24(2): 58~59.
[9]王跃清,李俊霞,刘文枝. β 内啡肽对更年期妇女潮热的影响. 实用妇产科杂志, 1999, 15(6): 321.
[10]单秋华,孙冬梅,吴富东. 耳穴贴压对女性更年期综合征患者血清内分泌素及 β 内啡肽的影响. 2003, 23(11): 676~678.
[11]王志宏,白文佩. 围绝经期睡眠障碍的研究. 中华妇产科杂志, 2004, 39(4): 276~277.
[12]胡卫东,陈更业,鞠光亚. 耳穴贴压治疗失眠患者睡眠结构的分析与疗效观察. 宁夏医学杂志, 2003, 25(11): 650~652.
(收稿日期:2007-02-25;修回日期:2007-07-04)
[编辑:李春梅]