

血府逐瘀浓缩丸抗血小板活化的临床疗效与体外血清药理作用的相关性研究*

雷 燕 陈可冀 李中文 许勇钢 刘剑刚

内容提要 目的 探讨血小板活在不稳定性心绞痛(unstable angina pectoris, UA)和急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)中的意义以及血府逐瘀浓缩丸抗血小板活化的临床疗效与其体外血清药理作用的相关性。方法 采用流式细胞技术和特异性标记抗体 检测口服血府逐瘀浓缩丸前后 UA 患者全血血小板膜糖蛋白 CD62P 和 CD41/45 的表达,并以 UA 患者的含药血清与 AMI 模型大鼠的外周血体外共温育后 检测大鼠 CD62P 水平。结果 :UA 患者 CD62P 及 CD41/45 表达量增高,分别为(24.36 ± 7.91)%和(29.51 ± 12.21)% 经有效治疗后降至(19.57 ± 7.22)%(与治疗前比较, $P < 0.05$)和(20.87 ± 8.73)% ;同时血小板粘附和聚集率增高。AMI 大鼠 CD62P 为(39.73 ± 12.36)% ,与有效病例的含药血清作用后降至(30.41 ± 10.36)%(与温育前比较, $P < 0.05$) ,而疗效不佳患者的药后血清干预作用则较差($P > 0.05$)。结论 :UA 患者和 AMI 大鼠的血小板活化增强。血府逐瘀浓缩丸含药血清药理与临床整体药效在抑制血小板活化作用上的一致性,反映出中药血清药理作用与临床整体药效的良好相关性。

关键词 中药血清药理学 血府逐瘀浓缩丸 血小板活化

Study on Relationship of Clinical Effect of Xuefu Zhuyu Concentrated Pill and Serum Pharmacological Anti-Platelet Activating Effect in Vitro LEI Yan , CHEN Ke-ji , LI Zhong-wen , et al *Department of Cardiology , Xiyuan Hospital , Beijing (100091)*

Objective : To assess the significance of platelet activation in unstable angina pectoris(UA) and acute myocardial infarction(AMI) , and to explore the relationship of clinical effect of Xuefu Zhuyu concentrated pill (XCP) in vivo and the serum pharmacological anti-platelet activating effect of XCP in vitro. **Methods :** By flow cytometry and special labelled antibody to detect the whole blood platelet membranous glycoprotein CD62P and CD41/45 expressions in UA patients before and after XCP treatment , as well as those in peripheral blood of AMI rats before and after co-cultured with XCP containing serum from patients at 37°C for 30 min. **Results :** CD62P and CD41/45 expressions increased significantly in UA patients to 24.36 ± 7.91 % and 29.51 ± 12.21 % respectively. After effective treatment , they decreased to 19.57 ± 7.22 % and 20.87 ± 8.73 % respectively accompanied with increase of platelet adhesion and aggregation rate. The difference of CD62P before and after treatment was significant ($P < 0.05$). CD62P in blood of AMI rats was 39.73 ± 12.36 % ,after being co-cultured with XCP containing serum from patients treated effectively , it reduced to 30.41 ± 10.36 % ($P < 0.05$) , but after co-cultured with the serum from patients treated ineffectively , it showed less intervention effect ($P > 0.05$). **Conclusion :** Platelet was highly activated in UA patients and AMI rats. The consistency between clinical holistic effect of XCP and serum pharmacological effect of XCP in platelet activation inhibition reflects a good correlation between serum pharmacological effect of Chinese herbal medicine and its clinical holistic effect.

Key words serum pharmacology of Chinese herbal medicine , Xuefu Zhuyu concentrated pill , platelet activation

中药复方的血清药理学研究是目前中药研究备受关注的领域之一,其研究内容主要涉及到含药血清的

方法学探索和中药血清的药效评价两方面。但目前多是应用动物特别是正常动物的含药血清进行体外实验研究,而与复方的临床疗效联系起来开展研究的工作尚未见报道。本实验在临床研究证明口服中药复方血府逐瘀浓缩丸具有抑制不稳定性心绞痛(unstable

* 国家自然科学基金重点项目(No. 39630360)
中国中医研究院西苑医院心内科(北京 100091)

angina pectoris, UA) 患者的血小板活化状态及抗血小板粘附、聚集等功能的基础上, 继以 UA 患者的含药血清作为药物载体, 在体外与急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI) 大鼠的外周血共温育, 应用荧光标记单抗和全血法流式细胞技术等, 观察了不同临床疗效 UA 患者的含药血清在体外对 AMI 大鼠血小板活化, 以及粘附、聚集率的影响, 旨在探讨血府逐瘀浓缩丸的临床疗效与其体外血清药理作用的相关性。

临床研究

1 临床资料 选择 2000 年 9~12 月在我科住院治疗的 UA 患者 15 例, 其中男性 5 例, 女性 10 例; 年龄 54~77 岁, 平均 64 岁; 符合 UA 诊断标准^[1], 其中初发劳力型心绞痛 4 例, 恶化劳力型心绞痛 6 例, 梗死后心绞痛 2 例, 变异型心绞痛 3 例, 平均病程(5.0 ± 3.5) 年。近 1 周内未服用任何影响血小板功能的药物。

2 给药方法 给予血府逐瘀浓缩丸(即血府逐瘀汤的水丸制剂, 含桃仁、红花、当归、生地黄、川芎、赤芍、牛膝、桔梗、柴胡、枳壳、甘草等, 每袋 6g, 每克药量相当生药量 3g, 由厦门中药厂研制, 批号: 970902) 口服, 每次 6g, 每日 3 次, 同时给予鲁南欣康(单硝酸异山梨酯片, 每粒 20mg, 鲁南制药股份有限公司生产) 20mg, 每天 2 次, 和(或)合心爽(盐酸地尔硫片, 每粒 30mg, 天津田边制药有限公司生产) 15mg, 每天 2 次, 疗程 2 周。

3 结果 参照 1979 年中西医结合治疗冠心病心绞痛及心律失常研究座谈会修订的“冠心病及心电图疗效评定标准”^[2], 服药前后根据临床症状评分、心电图改变和硝酸甘油停减率, 判断有效者(胸痛基本消失, 或发作次数、程度及持续时间明显减轻, 休息时心电图恢复至正常, 或未达正常, 但 S-T 段下降在治疗后回升 0.05mV 以上, 主要导联倒置 T 波变浅达 50% 以上, 或 T 波由平坦变为直立; 基本不用硝酸甘油或减用 50% 以上) 10 例, 无效者(症状及静息心电图与治疗前基本相同甚至加重, 或虽有改善但未达到“有效”项规定者, 硝酸甘油用量无改变或有增加) 5 例。

实验研究

1 实验动物 选用雄性 Wistar 大鼠 25 只, 动物体重(266.40 ± 15.02)g, 由中国科学院遗传研究所实验动物中心提供。

2 仪器与试剂 采用仪器为美国 Coulter 公司生产的 Elite 型流式细胞仪(FCM)。兔抗大鼠血小板粘

附分子 CD62P(一抗)和 FITC 标记的山羊抗兔抗体(二抗), 以及小鼠抗人 CD62P-FITC、抗 CD41-FITC、抗 CD41-PE 及 IgG1-FITC、IgG1-PE 均购自美国 BD 公司。血小板聚集率测定采用 LBY-NG II 型血小板聚集仪, 诱导剂 ADP 试剂盒为美国 DATA 公司产品; 血小板粘附率检测采用体外血栓形成、血小板粘附两用仪。

3 实验方法

3.1 UA 患者血清制备 服药前均于疼痛发作后 8h 内空腹抽静脉血 4ml, 其中 2ml 血 2000r/min 离心 15min, 分离血清(治疗前), -20℃ 保存备用; 余 2ml 血以 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 立即取 100μl 全血, 加入新鲜配制的 1% 多聚甲醛(pH7.2) 1ml 中止反应, 12h 内上机检测人 CD62P 和 CD41/45, 余血查血小板粘附和聚集功能。疗程结束时均于末次给药后 1.5h 空腹抽静脉血, 分离血清为治疗后含药血清, 其他检测指标及方法同治疗前。

3.2 AMI 大鼠模型复制 Wistar 大鼠用 20% 乌拉坦麻醉(1.2g/kg), 背位固定, 连接呼吸机和心电图机, 开胸结扎冠脉左前分支造成 AMI 模型, 选取出现异常 Q 波和 ST-T 段抬高即造模成功的大鼠 15 只, 于心肌缺血 40min 后, 腹主动脉取血 4ml, 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 分装于两个塑料试管内, 每管 2ml。

3.3 标本处理 取大鼠血 3~5min 内分别加入有效和(或)无效 UA 患者服药前后的血清(浓度为 20%), 37℃ 共同温育 30min 后, 从每管各取 100μl 全血, 加入新鲜配制的 1% 多聚甲醛 1ml(pH7.2) 固定, 12h 内上机测定大鼠 CD62P, 余血 1500r/min 离心 10min, 用于检测血小板粘附和聚集率。为减少个体差异, 每只大鼠的两份血标本分别与同一患者治疗前后的血清共温育。

3.4 观察指标及方法 (1) 人血小板活化因子 CD62P 和 CD41/45 应用双色免疫荧光直接标记全血法流式细胞技术, 大鼠 CD62P 采用间接荧光抗体标记, FCM 检测按常规操作方法进行。(2) 血小板聚集采用比浊法。(3) 血小板粘附采用旋转玻璃球法。

4 统计学方法 应用 STATA4.0 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 治疗前后比较采用配对 *t* 检验, 两组比较采用成组数据 *t* 检验。

结果

1 不同疗效 UA 患者治疗前后血小板活化因子 CD62P、CD41/45 及血小板粘附、聚集率的变化比较见表 1。UA 患者中存在较高的血小板活化状态。口

服血府逐瘀浓缩丸有效组的患者,血小板膜糖蛋白 CD62P、CD41/45 的表达量和血小板的粘附、聚集率均有所降低,与治疗前比较,差异均有显著性($P < 0.05$)。而服药后无效患者的血小板粘附、聚集率虽有下降趋势,但无统计学意义,特别是 CD62P 表达量治疗后尚有升高趋势,与有效组同期比较差异有显著性($P < 0.05$)提示血小板活化状态可预测病变的严重程度和预后。

2 不同疗效的血府逐瘀浓缩丸含药血清对 AMI 大鼠血小板活化因子及血小板粘附、聚集率的影响见表 2。AMI 大鼠中存在较高的血小板活化状态。口服血府逐瘀浓缩丸有效患者的含药血清体外对 AMI 大鼠血小板活化、粘附与聚集等功能表现出明显的抑制作用,治疗前后比较差异有显著性($P < 0.05$),而疗效不佳的患者其用药后的血清则作用较差($P > 0.05$)。提示血府逐瘀浓缩丸抗血小板活化的临床疗效与其体外血清药理作用有一定的相关性。未见因动物种属差异而造成的免疫反应。

表 1 不同疗效 UA 患者治疗前后血小板活化因子及血小板粘附、聚集率的变化比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	血小板活化因子		血小板聚集率	血小板粘附率
	CD62P	CD41/45		
有效 (10)	24.36 ± 7.91	29.51 ± 12.21	54.91 ± 15.39	26.49 ± 3.87
治后	19.57 ± 7.22*	20.87 ± 8.73*	42.02 ± 19.27*	23.55 ± 2.77*
无效 (5)	26.48 ± 7.21	28.06 ± 6.70	55.10 ± 19.69	27.90 ± 3.04
治后	29.14 ± 7.13 [△]	25.38 ± 10.90	41.02 ± 20.46	24.37 ± 3.88

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$;与有效组治疗后比较,[△] $P < 0.05$ ()内数据为例数

表 2 不同疗效的血府逐瘀浓缩丸含药血清对 AMI 大鼠血小板活化因子及血小板粘附、聚集的影响 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	CD62P	血小板聚集率	血小板粘附率
有效 (10)	39.73 ± 12.36	44.42 ± 22.17	29.77 ± 2.38
温育后	30.41 ± 10.36**	26.79 ± 7.36*	26.54 ± 2.76*
无效 (5)	38.28 ± 11.61	34.46 ± 14.30	28.83 ± 1.39
温育后	34.78 ± 12.84	36.02 ± 10.63	32.30 ± 2.29 [△]

注:与本组温育前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与有效组温育后比较,[△] $P < 0.02$ ()内数据为例数

讨 论

有研究显示血小板激活在冠心病的血栓形成和 UA 的发病中起了重要的作用⁽³⁾,而抗血小板治疗可明显降低冠心病不良事件的发生⁽⁴⁾。本研究采用特异性抗活化血小板单克隆抗体测定 UA 患者外周血中血小板膜糖蛋白 CD62P、CD41/CD45 的表达,以探讨血小板激活在冠心病中的意义。

CD62P 也称 P 选择素或血小板 α 颗粒膜蛋白(GMP-140)具有介导活化血小板与中性粒细胞和单

核细胞粘附的功能,在炎症、血栓形成中起重要作用。它主要存在于血小板的 α -颗粒膜上,在静止血小板表面无或仅有极少的表达。当血小板被激活时, α 颗粒迅速与血小板质膜融合而在血小板的膜表面大量表达,成为活化血小板的分子标志物⁽⁵⁾。

CD41 是糖蛋白 II b/III a(GP II b/III a)受体的亚基。GP II b/III a 是纤维蛋白原受体,存在于血小板膜表面,活化时此复合物可因构型改变而与纤维蛋白原结合,同时还与血浆或组织中的 vWf、FN 等粘附蛋白结合,从而介导血小板聚集,故 CD41 可作为血小板的特异膜抗原来鉴别血小板群。CD45 又称白细胞共同抗原,为鉴定白细胞的分子标志,应用 CD41-FITC 和 CD45-PE 双标进行血小板与白细胞的粘附检测,可以观察活化血小板与白细胞的结合情况。

本研究结果表明,UA 患者和 AMI 大鼠体内的血小板激活增强,其体内的血流变因素、化学因素、体液因素等都可造成内皮细胞的损伤,胶原暴露,使前列环素(PGI_2)和 α_2 巨球蛋白的合成减少,利于血小板活化、粘附和聚集。故血小板活化可能在血粘度增高、内皮细胞损伤、微循环障碍等方面参与了 UA 和 AMI 的发生与发展。

越来越多的证据表明,活化的血小板除可发生 GP II b/III a 介导的血小板-血小板间聚集外,还可与白细胞结合并激活后者,活化的白细胞反过来又可刺激血小板的进一步活化,因此,血小板与白细胞结合即粘附是止血与血栓形成过程中的重要步骤。我们观察到在 UA,不仅表现出 CD62P 的明显上升,而且血小板与白细胞结合物也有增多趋势。提示在 UA 时,不仅激活血小板,而且激活白细胞,激活的白细胞通过粘附分子介导与血小板的粘附⁽⁶⁾。Skinner 等报道⁽⁷⁾,凝血酶激活的血小板与白细胞的粘附是由 GMP-140 介导的。本实验室及其他实验室也都证实 UA 和 AMI 可引起 CD41/CD45 和 CD62P 表达的显著增加⁽⁸⁾。表明病变严重的 UA 患者中存在较高的血小板活化状态,且活化血小板与白细胞的粘附增多⁽⁹⁾。因此推测两者的表达在 UA 中发挥着重要作用,而中药复方血府逐瘀浓缩丸对全血血小板膜粘附分子 CD41 和 CD62P 的影响可能是本方抗血小板活化的分子机制。

本研究应用流式细胞技术快速、灵敏、特异而直接地检测全血中的活化血小板,由于标本处理的简化避免了血小板体外医源性激活,并且循环中的红细胞、白细胞对血小板的活化也有影响,因此全血法流式细胞技术能在最接近受检者体内环境的条件下测定活化血小板膜蛋白⁽¹⁰⁾,为评价体内血小板活化的首选技术。

我们的研究结果显示,血府逐瘀浓缩丸在体内、外均有抑制血小板激活的作用,临床有效病例的含药血清,可以部分改善心肌缺血大鼠体外的血小板活化状态,从而有利于减轻心肌损伤,改善预后,而疗效不佳患者的血清则干预作用较差,提示以血府逐瘀浓缩丸含药血清进行的体外实验在一定程度上能够反映整体给药的效果,在抑制血小板活化方面,血清药理作用与临床整体药效具有良好的相关性。初步证明,本方确实含有抗血小板活化的有效成分,而且此成分能经胃肠吸收入血,其体外血清药理作用可以部分代表体内药理效应。但本组观察例数较少,还有待进一步扩大临床观察范围,同时由于以有效和无效作为分组的标准,服药时间相对较长,因而所谓的含药血清,有可能是药物代谢血清或药物作用后机体的状态血清^[11],如能配合中药复方的药代动力学开展同步研究,将更有助于说明问题。

参 考 文 献

1. 中华医学会心血管病分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定性心绞痛诊断和治疗建议. 中华心血管病杂志 2000, 28(6):409—412.
2. 陈可冀,廖家桢,肖镇祥. 心脑血管疾病研究. 上海:上海科学技术出版社,1988:318—319.

3. Fitzgerald DJ, Louis R, Catella F, et al. Platelet activated in unstable coronary disease. N Engl J Med 1986; 315:983—998.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. Nature 1993; 362:801—809.
5. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. Blood 1990; 75:128—138.
6. 林勇,汪钟. 急性心肌梗塞大鼠血小板与白细胞的相互作用. 基础医学与临床 1997; 17(5):56—59.
7. Skinner MP, Lucas ML, Burns GF, et al. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. J Biol Chem 1991; 266(9):5371—5374.
8. 孙学刚,贾钰华,陈育堯. 定心方及丹参酮对血小板膜粘附分子表达的影响. 山东中医药大学学报. 2001; 25(1):61—63.
9. Murakami T, Komiyama Y, Masuda M, et al. Flow cytometric analysis of platelet activation markers CD62P and CD63 in patients with coronary artery disease. Eur J Clin Invest 1996; 26(11):996—1003.
10. 李珉珉. 流式细胞术检测血小板功能及其临床应用. 中华医学检验杂志 1999; 22(3):182—184.
11. 蒙一纯,丁霞,袁长恩. 中药血清药理学应用研究展望. 北京中医药大学学报 1999; 22(4):42—43.

(收稿 2001-06-08 修回 2001-12-20)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编	季钟朴										
总编辑	陈可冀										
副总编辑	沈自尹	肖培根	陈维养(常务)								
顾问	吴咸中	辛育龄	关幼波	邓铁涛	尚天裕	王永炎	侯 灿				
编辑委员	马必生	王一涛	王书臣	王今达	王宁生	王 阶	王学美	王 佩	王宝恩		
	王硕仁	王雪苔	尹光耀	史大卓	史载祥	刘干中	刘建勋	刘耕陶	刘猷枋		
	危北海	匡调元	朱 兵	吕爱平	吕维柏	齐清会	孙 燕	李 恩	李乃卿		
	李大金	李玉光	李连达	李廷谦	李国贤	李国栋	李鸣真	李顺成	李恩宽		
	杨任民	杨秀伟	时毓民	陈士奎	陈小野	陈冬燕	陈香美	吴伟康	陆付耳		
	张大钊	张之南	张永祥	张伯礼	张国玺	张亭栋	张荣华	张家庆	张梓荆		
	林求诚	林志彬	林瑞超	郁仁存	周文泉	周 俊	周霭祥	金益强	赵伟康		
	唐由之	顾振纶	郭赛珊	徐治鸿	梁晓春	黄晓愚	曹小定	葛秦生	谢宗万		
	谢竹藩	董福慧	曾晓春	雷 燕	蔡定芳	裴正学	黎磊石	廖家桢	廖福龙		
	戴瑞鸿										