

中图分类号: R932; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)06-0039-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.010



金卷升板胶囊对模型大鼠血小板减少的改善作用*

韩艳丛, 杨琳, 郑玉玲, 于静, 周春华, 刘清池, 王玲娇[△]

(河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050031)

摘要:目的 探讨金卷升板胶囊对模型大鼠血小板减少的改善作用。方法 将36只雄性SD大鼠随机分为空白对照组(A组, 等体积生理盐水), 模型组(B组, 等体积生理盐水), 咖啡酸组(C组, 9 mg/kg), 以及金卷升板胶囊高、中、低剂量组(D₁组、D₂组、D₃组, 1.00, 0.50, 0.25 g/kg), 各6只。腹腔注射环磷酰胺溶液(100 mg/kg), 每日1次, 连续3 d, 以复制血小板减少大鼠模型, 同时A组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。在建模开始后第5天, 各组大鼠予相应药物或生理盐水灌胃, 每日1次, 连续14 d。检测血小板计数(PLT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fib); 采用酶联免疫吸附法检测白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平; 称定脾脏质量并计算脾脏系数; 采用苏木素-伊红染色, 并在显微镜下观察脾脏组织病理形态。**结果** 与A组比较, B组大鼠PLT显著减少, PT, APTT, TT均显著延长, Fib和TNF- α 水平均显著升高, IL-10水平显著降低, 脾脏系数显著降低($P < 0.01$)。与B组比较, C组、D₁组、D₂组大鼠PLT显著增加, PT, APTT, TT均显著缩短, Fib及TNF- α 水平均显著降低; C组、D₁组、D₂组、D₃组大鼠IL-10水平均显著升高, 脾脏系数显著升高($P < 0.01$); D₁组、D₂组、D₃组大鼠脾脏组织的B淋巴细胞数量均增加, 细胞核内的嗜碱性物质着色明显, 细胞核完整度较好。**结论** 金卷升板胶囊可改善模型大鼠的血小板减少情况, 其机制可能与升高IL-10水平及降低TNF- α 水平和改善大鼠的免疫有关。

关键词: 金卷升板胶囊; 环磷酰胺; 血小板减少; 大鼠; 脾脏; 白细胞介素

Effect of Jinjuan Shengban Capsules on the Improvement of Thrombocytopenia in Model Rats

HAN Yancong, YANG Lin, ZHENG Yuling, YU Jing, ZHOU Chunhua, LIU Qingchi, WANG Lingjiao
(The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050031)

Abstract: Objective To investigate the effect of Jinjuan Shengban Capsules on the improvement of thrombocytopenia in model rats. **Methods** Thirty-six male SD rats were randomly divided into the blank control group (group A, equal volume of normal saline), model group (group B, equal volume of normal saline), caffeic acid group (group C, 9 mg/kg) and high-, medium- and low-dose groups of Jinjuan Shengban Capsules (group D₁, group D₂, group D₃; 1.00, 0.50, 0.25 g/kg), six rats in each group. The rats in groups B, C, D₁, D₂, and D₃ were intraperitoneally injected with cyclophosphamide solution (100 mg/kg) once a day for 3 d to replicate the rat model with thrombocytopenia, while the rats in group A were given same volume of normal saline by intraperitoneal injection. On the 5th day after the start of modeling, rats in each group were given corresponding drugs or physiological saline by gavage once a day for 14 d. The platelet count (PLT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and fibrinogen (Fib) were measured. The levels of interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rats were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The spleen mass was measured and the spleen coefficient was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for observing the histopathological morphology of spleen under the microscope. **Results** Compared with those in group A, the PLT was significantly lower, the PT, APTT and TT were significantly longer, the levels of Fib and TNF- α were significantly higher, the level of IL-10 was significantly lower, while the spleen coefficient was significantly lower in group B ($P < 0.01$). Compared with those in group B, the PLT was significantly higher, the PT, APTT and TT were significantly shorter, the levels of Fib and TNF- α were significantly lower in groups C, D₁ and D₂; the level of IL-10 was significantly higher, while the spleen coefficient was significantly higher in groups C, D₁, D₂ and D₃ ($P < 0.01$); the number of B lymphocytes in the spleen tissue of rats increased, the basophils in the nucleus were obviously stained, and the nuclear integrity was good in groups D₁, D₂ and D₃. **Conclusion** Jinjuan Shengban Capsules can improve the thrombocytopenia of model rats, and its mechanism may be related to the increase of IL-10 level, the decrease of TNF- α level, and the improvement of immunity in rats.

Key words: Jinjuan Shengban Capsules; cyclophosphamide; thrombocytopenia; rats; spleen; interleukin

*基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目[2021128]。

第一作者: 韩艳丛, 女, 大学本科, 主管护师, 研究方向为中药学, (电话)0311-87156675(电子信箱)hnhyc0521@163.com。

[△]通信作者: 王玲娇, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为临床药学, (电话)0311-87156670(电子信箱)327239256@qq.com。

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是以人体血小板计数(PLT)降低(低于 $100 \times 10^9 / L$)为主要特征的血液疾病。ITP症状多为瘀点、紫癜、黏膜出血(如鼻衄)等,甚至涉及颅内出血^[1]。ITP死亡率超90%(有效治疗前),治疗后仍达10%,至少30%的患者在首次发作后复发。目前临床共识推荐的常见治疗方案为输注血小板及促血小板生长因子^[2],但效果欠佳,费用昂贵,且药品不良反应明显^[3-4]。金卷升板胶囊由金银花、黄芩、茜草等10味药材组方,具有清热凉血、止血通络功效,主治各种血小板减少症^[5-7],且价格便宜、原料易得,近年来在我院临床使用疗效确切,但作用机制尚不明晰。本研究中探讨了该药对血小板减少模型大鼠凝血能力及脾脏系数的影响,以及对血小板减少的改善作用。现报道如下。

1 材料与方

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: MEX-7222 K型全自动血细胞分析仪(日本 Nihon Kohden 公司); CX23型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

试剂: 注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号为18100825); 金卷升板胶囊生粉(河北医科大学第一医院,批号分别为170813, 170826, 170901, 170914); 咖啡酸片(德州德药制药有限公司,批号为181606013); 大鼠白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(美国 ABclonal 公司,批号分别为9680002050519, 9680002040119); 苏木素(H)、伊红(E)染液(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为719032, 719012)。

动物: 清洁级SD大鼠36只, 雄性, 10周龄, 体质量350 g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号SCXK(冀)2018-004, 实验动物使用许可证号SYXK(冀)2020-002。饲养于河北医科大学实验动物房, 通风, 自由进食、饮水。本动物实验经河北医科大学第一医院实验动物伦理委员会批准(批件号20220712)。

1.2 方法

1.2.1 建模、分组及给药

将36只大鼠随机分为空白对照组(A组, 等体积生理盐水), 模型组(B组, 等体积生理盐水), 咖啡酸组(C组, 9 mg/kg), 以及金卷升板胶囊高、中、低剂量组(D₁组、D₂组、D₃组, 1.00, 0.50, 0.25 g/kg), 各6只。腹腔注射环磷酰胺溶液(100 mg/kg), 每日1次, 连续3 d, 以复制血小板减少大鼠模型, 同时A组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。以PLT减至建模前的20%~30%为建模成功^[8]。建模开始后第5天, 各组大鼠予相应药物或生理盐水灌胃, 每日1次, 连续14 d^[9]。

1.2.2 观察指标

PLT: 分别于建模前和给药14 d后取大鼠尾静脉血检测^[9], $< 100 \times 10^9 / L$ 为PLT减少。

凝血四项: 末次给药后, 称定大鼠体质量, 腹腔注射水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血适量, 分别置惰性分离胶促凝管和枸橼酸钠凝血实验管中, 取后者检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)及纤维蛋白原(Fib)水平。

IL-10及TNF- α : 取前述惰性分离胶促凝管中的血液样本, 采用ELISA法检测。

脾脏组织病理形态: 处死大鼠, 取出脾脏, 称定质量并计算脾脏系数(脾脏系数=脾脏质量/体质量)。将脾脏组织浸泡于福尔马林溶液中固定, 石蜡切片, HE染色, 置显微镜下观察^[9-11]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 组间比较行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLT

与A组比较, B组大鼠给药14 d后PLT显著减少($P < 0.01$); 与B组比较, C组、D₁组、D₂组大鼠给药14 d后PLT均显著增加($P < 0.01$)。详见表1。

表1 各组大鼠PLT比较($\bar{X} \pm s, \times 10^9 / L, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	建模前	给药14 d后
A组		1 015.83 ± 108.77	1 112.50 ± 188.28
B组		1 143.83 ± 110.24	311.33 ± 32.10**
C组	0.009	1 125.67 ± 95.52	688.00 ± 75.23##
D ₁ 组	1.00	1 086.17 ± 102.12	888.83 ± 83.16##
D ₂ 组	0.50	1 169.50 ± 75.39	614.50 ± 66.10##
D ₃ 组	0.25	1 131.00 ± 107.03	344.17 ± 17.87

注: 与A组比较, ** $P < 0.01$; 与B组比较, ## $P < 0.01$ 。表2、表3同。

Note: Compared with those in group A, ** $P < 0.01$; Compared with those in group B, ## $P < 0.01$ (for Tab. 1-3).

2.2 凝血四项

与A组比较, B组大鼠的PT, APTT, TT均显著延长, Fib水平显著升高($P < 0.01$); 与B组比较, C组、D₁组、D₂组大鼠的PT, APTT, TT均显著缩短, Fib水平显著降低($P < 0.01$)。详见表2。

2.3 IL-10及TNF- α

与A组比较, B组大鼠TNF- α 水平显著升高, IL-10水平显著降低($P < 0.01$); 与B组比较, C组、D₁组、D₂组大鼠TNF- α 水平均显著降低, C组、D₁组、D₂组、D₃组

表2 各组大鼠凝血四项指标比较($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Comparison of four blood coagulation indexes of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	Fib(g/L)
A组		56.52 ± 0.56	65.57 ± 1.14	61.01 ± 1.59	22.49 ± 1.91
B组		96.74 ± 1.05**	75.64 ± 1.06**	92.48 ± 1.14**	30.32 ± 0.89**
C组	0.009	61.95 ± 1.47**	66.12 ± 1.74**	62.03 ± 2.93**	24.16 ± 1.50**
D ₁ 组	1.00	59.19 ± 2.43**	66.63 ± 2.06**	62.07 ± 1.97**	23.28 ± 1.39**
D ₂ 组	0.50	59.99 ± 1.51**	64.71 ± 2.34**	61.10 ± 1.74**	23.72 ± 0.87**
D ₃ 组	0.25	94.01 ± 1.51	72.42 ± 1.60	90.43 ± 0.91	28.65 ± 0.86

大鼠IL-10水平均显著升高($P < 0.01$)。详见表3。

2.4 脾脏系数

与A组比较,B组大鼠脾脏系数显著降低($P < 0.01$);与B组比较,C组、D₁组、D₂组、D₃组大鼠脾脏系数均显著升高($P < 0.01$)。详见表3。

2.5 脾脏组织病理形态

A组大鼠脾脏组织的被膜、红髓、白髓清晰;B淋巴细胞较大,细胞膜完整,边缘清晰,细胞核着色深且清

表3 各组大鼠IL-10、TNF-α水平及脾脏系数比较($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 3 Comparison of IL-10, TNF-α levels and spleen coefficient of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/kg)	TNF-α(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	脾脏系数(%)
A组		737.83 ± 45.73	425.50 ± 17.26	0.44 ± 0.08
B组		894.50 ± 22.77**	255.50 ± 22.47**	0.29 ± 0.06**
C组	0.009	823.33 ± 15.89**	359.67 ± 17.68**	0.43 ± 0.07**
D ₁ 组	1.00	761.83 ± 23.67**	392.83 ± 15.85**	0.41 ± 0.09**
D ₂ 组	0.50	842.83 ± 20.81**	341.33 ± 19.92**	0.38 ± 0.07**
D ₃ 组	0.25	882.67 ± 25.75	326.17 ± 28.10**	0.35 ± 0.06**

晰不黏连。B组大鼠脾脏组织的红髓可见缩小,白髓有增大迹象,T淋巴细胞显著增多,红髓的髓索、髓窦中出现大量的巨核细胞;T淋巴细胞数量减少,呈膨大破裂,着色变浅,细胞内嗜酸性物质减少。与B组比较,C组大鼠脾脏组织的被膜、红髓、白髓较清晰,B淋巴细胞增多,细胞结构较完整;D₁组、D₂组、D₃组大鼠脾脏组织的B淋巴细胞数量均有所增加,细胞核内的嗜碱性物质着

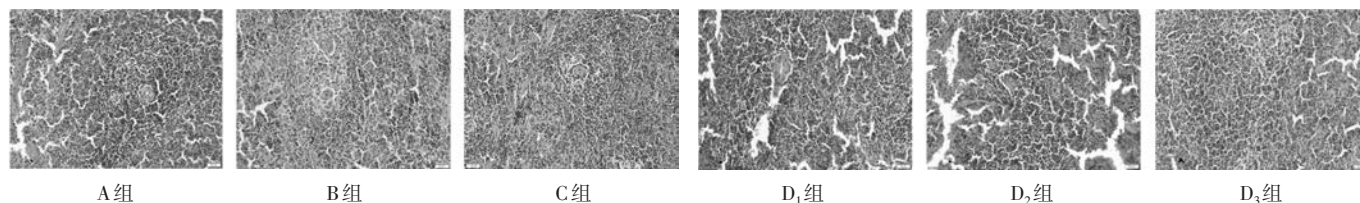


图1 大鼠脾脏组织病理形态(HE, × 200)

Fig. 1 Histopathological morphology of rat spleen (HE, × 200)

色明显,细胞核完整度较好。详见图1。

3 讨论

ITP的血小板缺乏可能是由血小板产生减少,免疫介导破坏或脾液封存增加等原因引起^[1]。80%的ITP病例属原发性,常被视为自身免疫性疾病;20%的ITP病例为继发性^[12]。ITP的主要症状为出血,程度可从无症状到顽固性出血,发病可为急性(持续时间少于3个月或持续3~12个月),也可为慢性(持续12个月以上)。

常见血小板减少症模型为免疫性血小板减少和药物所致血小板减少^[10]。前者建模时间长、费用高、操作复杂,且成功率低。而环磷酰胺的临床常见不良反应是PLT明显减少,即中医的血虚证^[13-14]。研究表明,以环磷酰胺建模,可发生血小板减少,出血时间延长、凝血困难等,其模型比免疫性血小板减少造模法更经济,易操作,效果确切^[14-15]。

PLT是评价血小板减少症最直观的指标^[13-14]。研究认为血小板减少模型大鼠可出现凝血时间延长的现象,故凝血四项变化可作为衡量血小板减少程度的评判标准之一^[15]。IL-10可抑制B淋巴细胞生成血小板抗体,还可促进T淋巴细胞的增殖、分化,从而缓解血

小板的免疫性破坏^[16]。ITP患者PLT减少可能受到TNF-α表达水平的影响^[17]。脾脏系数是评价大鼠血小板减少模型的经典指标^[16]。本研究中,与A组比较,B组大鼠PLT显著减少,IL-10水平、脾脏系数均显著降低,TNF-α水平显著升高,PT,APTT,TT均显著延长,Fib水平显著升高,表明环磷酰胺致血小板减少大鼠模型复制成功。与B组比较,C组、D₁组、D₂组、D₃组的指标均有改善,表明金卷升板胶囊均可减轻模型大鼠血小板减少程度。

综上所述,金卷升板胶囊可改善模型大鼠的血小板减少,其机制可能与升高IL-10及降低TNF-α水平,改善大鼠免疫指标有关。该研究为进一步探讨该制剂具体活性成分和基于信号通路的作用机制提供了参考。

参考文献

- [1] MARGOT S, WILLIAM F, DAVID L. Treatments for Primary Immune Thrombocytopenia: A Review[J]. Cureus, 2019, 11(10): e5849.
- [2] 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会. 中国肿瘤化疗相关性血小板减少症专家诊疗共识(2019版)[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(18):