

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2021.06.007

• 实验研究 •

益气活血方及其拆方对出血性血小板病患者 静脉血 iRhom2 及 GP V 表达的影响*

马 陈[#] 廖 奕[#] 沈 霖[△] 卢芙蓉 帅 波

华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科, 武汉 430022

摘要 目的 观察益气活血方及其拆方对出血性血小板病患者静脉血非活性的菱形蛋白(inactive rhomboid-like protein, iRhom)2 及血小板膜糖蛋白(platelet membrane glycoprotein, GP) V 表达的影响。**方法** 选取 33 例出血性血小板病患者及 30 例血小板聚集检测无异常发现的健康献血员的静脉血, 体外加益气活血方及其拆方进行中药孵育后, 采用 Real-time PCR 法检测 iRhom2 mRNA 的相对表达水平, 采用 ELISA 法检测 GP V 蛋白表达水平。**结果** 阴性对照组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显高于正常对照组, GP V 蛋白表达水平明显低于正常对照组($P < 0.05$)。全方组、益气活血组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组, GP V 蛋白表达水平明显高于阴性对照组($P < 0.05$)。**结论** 益气活血方全方及其部分拆方治疗出血性血小板病的机制可能与下调 iRhom2 mRNA 表达及上调 GP V 蛋白表达有关。

关键词 出血性血小板病; 益气活血方; 非活性的菱形蛋白 2; 血小板膜糖蛋白 V

中图分类号 R558 **文献标志码** A

Effect of Yiqi Huoxue Decoction and Its Disassembled Formulas on Expression of iRhom2 and GP V in Venous Blood of Patients with Hemorrhagic Thrombopathy

MA Chen[#], LIAO Yi[#], SHEN Lin[△], LU Furong, SHUAI Bo

Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital,

Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract Objective To observe the effects of Yiqi Huoxue decoction and its disassembled formulas on the expression of inactive rhombic like protein(iRhom)2 and platelet membrane glycoprotein(GP)V protein in venous blood of patients with hemorrhagic thrombocytopenia. **Methods** The venous blood of 33 patients with hemorrhagic thrombocytopenia and 30 healthy blood donors who were detected without abnormalities in platelet aggregation test were selected. The venous blood samples were supplemented and incubated with Yiqi Huoxue decoction and its disassembled formulas in vitro. The relative expression levels of iRhom2 mRNA were determined by the Real-time PCR assay, and the expression levels of GP V protein were detected by ELISA. **Results** The relative expression levels of iRhom2 mRNA in the negative control group were significantly higher than those in the normal control group, and the expression levels of GP V protein were significantly lower than those in the normal control group ($P < 0.05$). The relative expression levels of iRhom2 mRNA in the whole formula group, the Yiqi Huoxue group were significantly lower than those in the negative control group, and the expression levels of GP V protein were significantly higher than those in the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of Yiqi Huox-

* 国家自然科学基金资助项目(No. 81673761; No. 82004201); 第六批全国老中医药专家学术经验继承工作资助项目(No. 国中医药人教发[2017]29 号)

[#] 共同第一作者

[△] 通信作者, Corresponding author, E-mail: shenlinhb@sina.cn

ue decoction and its disassembled formulas in the treatment of hemorrhagic thrombocytopenic might be related to the downregulation of iRhom2 mRNA expression and upregulation of GP V protein expression.

Key words hemorrhagic thrombopathy; Yiqi Huoxue formula; inactive rhomboid-like protein 2; platelet membrane glycoprotein V

益气活血方是沈霖教授治疗出血性血小板病的经验方,经 20 余年临床验证,该方在控制临床出血症状、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肾上腺素片^[1]。近期临床药物试验^[2-3]提示,调控非活性的菱形蛋白 2 (inactive rhomboid-like protein 2, iRhom2) 及血小板膜糖蛋白 V (platelet membrane glycoprotein V, GP V) 的表达可能是益气活血方治疗出血性血小板病作用靶点之一。为了进一步研究益气活血方组方药物的具体作用靶点以及作用机制,本研究通过人血标本体外加药的方法,观察了全方、配伍组和单味药组对出血性血小板病患者静脉血中 iRhom2 及 GP V 表达的影响,旨在探讨益气活血方治疗出血性血小板病的作用机制及益气活血中药配伍的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 10 月—2021 年 3 月就诊于本院中西医结合科门诊的 33 例出血性血小板病患者作为研究组,其中男 9 例,女 24 例;年龄(34.51±14.27)岁,年龄范围为 20~57 岁;病程(7.18±5.26)年,病程范围为 2~13 年。另选 30 例血小板聚集检测无异常发现的健康献血员作为正常对照组,其中男 10 例,女 20 例;年龄(33.27±8.26)岁,年龄范围为 21~55 岁。2 组患者性别、年龄比较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。

1.2 诊断标准

研究组患者符合文献^[4]中出血性血小板病相关的诊断标准:患者有多部位出血临床表现;按常规操作检测患者血小板聚集最大聚集率,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,患者对 1 项或多项诱聚剂诱导的聚集反应不良或缺如。

1.3 纳入及排除标准

纳入标准:符合上述诊断标准;在本研究前 2 周内,未服用阿司匹林、潘生丁、肝素以及活血化瘀类中药等可能影响血小板功能的药物;同意参与本研究并签署知情同意书。

排除标准:经内科、血管外科、耳鼻喉科、妇科、口

腔科和眼科等科室诊视,发现诊断性出血病灶;合并其他脏器重大疾病且预后不佳者;精神类疾病或智力、语言障碍者;不愿意签署知情同意书者。

1.4 体外干预方法

1.4.1 血液标本的制备 采用真空采血管(美国 BD 公司)采集所有受试对象清晨空腹肘静脉血,以 3.8% 枸橼酸钠进行抗凝处理,血液与抗凝剂的比例为 9:1。出血性血小板病患者静脉血经抗凝处理后分为 12 等份,每份 0.75 mL 血液标本;健康献血员静脉血经抗凝处理后取 1 份 0.75 mL 血液标本。

1.4.2 中药拆方及分组 ①全方组:黄芪 10 g、党参 10 g、当归 10 g、白芍 5 g、桃仁 5 g、甘草 2 g;②益气活血组(全方去甘草):黄芪 10 g、党参 10 g、当归 10 g、白芍 5 g、桃仁 5 g;③黄芪当归组:黄芪 10 g、当归 10 g;④益气组:黄芪 10 g、党参 10 g;⑤活血组:当归 10 g、白芍 5 g、桃仁 5 g;⑥黄芪组:黄芪 10 g;⑦党参组:党参 10 g;⑧当归组:当归 10 g;⑨白芍组:白芍 5 g;⑩桃仁组:桃仁 5 g;⑪甘草组:甘草 2 g。中药饮片均由本院中药房提供。

1.4.3 药物的制备 参照文献^[5],中药用 200 mL 清水浸泡 12 h,武火煮沸,文火煮 0.5 h;取出药液后,再加入 200 mL 清水,武火煮沸,文火煮 0.5 h,取药液;将 2 次药液合并,浓缩至较高浓度。按体积比 2:3 加入无水乙醇,4 ℃静置 24 h,用无菌滤纸滤去残渣;再用旋转蒸发仪蒸发至无醇味,并进一步将各组药液浓缩至 10 mL,调整 pH 值为 6.8~8.5,均匀倒入培养皿置于-20 ℃预冻;然后冷冻真空干燥,得到粉末状物质,放入干燥器中备用。根据既往体外实验^[6-7]结果,全方组终浓度为 4.2 mg/mL 时对血小板聚集功能及 GP Ib α 影响最为显著,所以各实验组中药冻干粉临用前均稀释为 4.2 mg/mL 浓度,经过 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后,与血液标本共孵育。

1.4.4 中药干预静脉血标本 益气活血方全方及拆方组是在出血性血小板病患者血液标本中分别加入 10 μL 相对应的中药提取物;阴性对照组是在出血性血小板病患者血液标本中加入 10 μL 的 0.9% NaCl 注射液;正常对照组是在健康献血员血液标本中加入 10 μL 的 0.9% NaCl 注射液。将给药后血液标本在 37 ℃下孵育 30 min。

1.5 观察指标

Real-time PCR 法检测 iRhom2 mRNA 表达:按照 YBR Green PCR (KAPA Biosystems, 货号 KM4101)试剂盒说明书,通过 QIAzol Lysis Reagent 和氯仿提取总 RNA,测定 RNA 浓度。使用逆转录试剂盒(TAKARA,货号 639505)进行逆转录合成 cDNA。引物名称及序列如下, iRhom2-F CAAGATGC-CCAAGATT, iRhom2-R GGAGTAGCCAGAACGG, 在 Real-Time System 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad)上进行扩增,共 40 个循环,每个样品重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组静脉血 iRhom2 mRNA 的相对表达水平。

ELISA 法检测 GP V 蛋白表达:根据试剂盒说明书,使用人 GP V ELISA 试剂盒(Bioswamp, 货号 HM10699)定量检测各组静脉血 GP V 蛋白水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,计量资

料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

阴性对照组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显高于正常对照组,GP V 蛋白表达水平明显低于正常对照组 ($P<0.05$)。全方组、益气活血组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组,GP V 蛋白表达水平明显高于阴性对照组 ($P<0.05$);全方组、益气活血组 iRhom2 mRNA 及 GP V 表达水平与正常对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。黄芪当归组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组 ($P<0.05$);GP V 蛋白表达水平与正常对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。活血组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组 iRhom2 mRNA 及 GP V 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	iRhom2 mRNA	GP V (pg/mL)
正常对照组	30	1.000±1.065	99.243±13.986
阴性对照组	33	3.416±1.711*	85.846±14.629*
全方组	33	0.993±1.054 [△]	95.449±16.533 [△]
益气活血组	33	1.155±1.276 [△]	93.565±15.087 [△]
黄芪当归组	33	2.204±1.499* ^{△▲}	92.608±13.806
益气组	33	3.124±2.417* [▲]	88.780±9.157* [▲]
活血组	33	2.522±1.557* ^{△▲}	85.049±14.557* [▲]
黄芪组	33	3.389±1.798* [▲]	85.983±12.629* [▲]
党参组	33	3.598±1.884* [▲]	87.995±12.862* [▲]
当归组	33	3.545±1.962* [▲]	86.848±12.376* [▲]
白芍组	33	4.346±1.792* ^{△▲}	85.706±14.412* [▲]
桃仁组	33	3.278±1.679* [▲]	87.800±11.903* [▲]
甘草组	33	3.569±1.748* [▲]	85.206±18.818* [▲]

与正常对照组比较* $P<0.05$;与阴性对照组比较[△] $P<0.05$;与全方组比较[▲] $P<0.05$ 。

3 讨论

研究^[2-3]表明,出血性血小板病患者发病过程中, iRhom2 可通过与 ADAM17 前体蛋白结合,激活 iRhom2/ADAM17 信号通路,从而促进血小板膜表面的 GP V 胞外功能区过度水解,引起血小板凝血酶受体复合物活性下降,导致血小板聚集缺陷,引起皮肤、黏膜出血。根据本病临床表现,可归属于中医学“血症”范畴,益气活血方治疗本病疗效显著^[1]。本次研究通过体外实验,观察了益气活血方及其拆方对出血性血小板病患者全血 iRhom2 及 GP V 表达的影响,以进一步探讨该方及其组方药物的作用机制。

本研究结果显示,全方组、益气活血组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组,GP V 蛋白表达水平明显高于阴性对照组;全方组及益气活血组 iRhom2 mRNA 及 GP V 表达水平与正常对照组比较,差异无统计学意义。表明出血性血小板病患者血液标本中的 iRhom2 mRNA 及 GP V 表达在益气活血全方和益气活血中药的干预下,可恢复到健康人的水平。

黄芪当归组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组;GP V 蛋白表达水平与正常对照组比较,差异无统计学意义。表明黄芪-当归药对可起到一定治疗作用。《内外伤辨惑论》卷中记载的当归补

血汤,就是由当归与黄芪按一定比例配伍而成,具有补血益气的功效,用于治疗气血两虚发热证,被称为“气血双补”代表方之一。多项研究^[8]表明,黄芪-当归药对具有同类相须、相辅相成、相互促进的功效,对造血系统疾病诱发的出血、感染、贫血及血小板聚集障碍均有明显疗效。

活血组 iRhom2 mRNA 相对表达水平明显低于阴性对照组,表明活血药物可降低出血性血小板病患者血液标本中的 iRhom2 mRNA 相对表达水平,佐证中医“活血止血,祛瘀生新”治疗理论是信而有征的。活血组药物由当归、白芍、桃仁 3 味中药组成,含有 2 个中药药对配伍。其一为当归芍药散,最早源自东汉张仲景所著《金匮要略》,该方血水同调、治血为主,临床上可用于治疗血虚夹瘀之血小板过敏性紫癜、原发性痛经、月经过多等疾病^[9];体外实验^[10]提示当归芍药散含药血清对血小板聚集有显著调节作用。其二为当归-桃仁药对,《证治准绳·类方》载桃仁当归汤具有祛血滞之功效,有学者^[11]基于数据挖掘桃仁方剂配伍规律,发现桃仁的核心配伍组合之首为当归;体外实验^[12]表明当归-桃仁药对不同配比对血小板聚集的调节作用均大于同等生药剂量的当归和桃仁单味药材。

复方中药是近年来研究的热点,其成分复杂、靶点众多。目前应用的干预方法主要有 3 种,包括中药提取物/纯化物直接添加、中药血清药理学及中药血浆药理学。3 种添加方法各有利弊,是否选择了合适的干预方法直接影响研究结果的可信度。本文的研究对象是出血性血小板病患者静脉血标本,用实验动物制作中药血清、中药血浆无可行性,故采用中药粗提取物直接添加。

尽管本研究严格按照文献^[5]中记载的方法去除杂质、调整酸碱度、制成冻干粉,临近实验时再溶解、离心、过滤等,希冀进一步减少中药杂质的理化干扰因素。但是由于中药复方或单味中药理化性质复杂,中药提取物直接添加至血液或细胞体系中影响因素仍较多。按中药学理论,白芍具有“通顺血脉,缓中,散恶血,逐贼血”功效,而本实验结果显示白芍组 iRhom2 mRNA 表达却明显高于阴性对照组,提示该药不适用于治疗出血性血小板病。但是在含有白芍配伍的全方组、益气活血组及活血组中,能够明显降

低 iRhom2 mRNA 表达。究竟是单味白芍可以导致患者全血 iRhom2 mRNA 高表达,还是含有杂质的影响因素,或是中药复方配伍后,改变了白芍的药效,目前很难解释。尚有待更合理的中药体外研究方法建立,方能解决这类中药拆方研究中的疑点及难点。

综上所述,益气活血方全方及其部分拆方治疗出血性血小板病的机制可能与下调 iRhom2 mRNA 表达及上调 GP V 蛋白表达有关。

参 考 文 献

- [1] 沈霖,张红星,杨胜兰,等. 益气活血方治疗出血性血小板病临床疗效观察[J]. 中西医结合研究, 2014, 6(2): 65-67.
- [2] 马陈,卢芙蓉,沈霖,等. 益气活血方对脾虚型出血性血小板病患者 microRNA-126 表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2020, 28(9): 672-675.
- [3] 卢芙蓉,秦铀,沈霖,等. 基于 iRhom2/ADAM17 信号通路探讨益气活血方治疗出血性血小板病患者的作用机制[J]. 中西医结合研究, 2020, 12(4): 217-221.
- [4] 沈霖,张红星,赵光. 益气活血法治疗出血性疾病[M]. 武汉:湖北科学技术出版社 2015:36-40.
- [5] 王领弟,孙孟瑶,张芳,等. 体外细胞实验中中药干预方法研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1448-1451.
- [6] 石威,沈霖,秦铀,等. 从益气活血方拆方对健康人血小板聚集功能的影响探讨方剂组成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21): 2294-2297.
- [7] 沈霖,陈瑞,朱闽,等. 益气活血方及其拆方对出血性血小板病患者 GP I b/IX/V 复合物及 GP Iba 表达的影响[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1): 13-16.
- [8] 方欢乐,张慧,陶炎炎,等. 黄芪-当归药对研究进展[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(8): 633-636, 640.
- [9] 赵立昌,计忠宁,夏晶晶. 当归芍药散临床应用及实验研究[J]. 河南中医, 2021, 41(5): 653-655.
- [10] 刘卫红,贾丽超,张蕾,等. 当归芍药散含药血清对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子及信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(11): 1853-1858.
- [11] 刘景亮,裴丽,王文凯,等. 基于数据挖掘的桃仁方剂配伍规律研究[J]. 江苏中医药, 2019, 51(4): 65-68.
- [12] 刘立,段金殿,唐于平,等. 当归-桃仁药对配伍特点及其效应物质基础研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2415-2420.

(收稿日期:2021-06-05)