

机(徕卡-2015,德国);TSJ-Q 型全自动封闭式组织脱水机;BMJ-Ⅲ型包埋机;PHY-Ⅲ型病理组织漂烘仪(常州市中威医疗仪器有限公司);显微镜 Motic BA400;图像分析软件 Motic Images Advanced。

2 方法与结果

2.1 感毒清颗粒对大鼠颅骨肥大细胞脱颗粒的影响

抗血清制备:取 90~100 g 雄性 SD 大鼠 10 只,于每只大鼠两腿肌肉注射 1% 卵白蛋白溶液 0.5 mL,同时腹腔注射百白破疫苗 0.5 mL,隔日致敏 1 次,共 3 次。于末次致敏 13 d 后大鼠腹主动脉取血,离心(3 500 r/min,10 min)分离血清并合并,−20 ℃ 保存备用。另取大鼠 60 只,体质量为 180~220 g,按体质量分层随机分为 6 组,即空白对照组、模型对照组、马来酸氯苯那敏片(扑尔敏,5 mg/kg)、感毒清颗粒高、中、低剂量组,每组 10 只,ig 给药或等体积生理盐水,10 mL/kg,1 次/d,连续 6 d。给药第 4 天,各组大鼠头部皮下注射抗血清 0.1 mL/只致敏,注射 48 h 后,各组大鼠尾静脉注射用 0.5%伊文思蓝溶液配成 2 mg/mL 的卵白蛋白溶液攻击,注射量 0.01 mL/g。30 min 后断头处死大鼠;常规方法制备颅骨膜骨切片,切片脱蜡复水后入甲苯胺蓝溶液染液 30 s,蒸馏水洗 2 次,每次 3~5 min,30%酒精分色,在镜下控制分色时间,以肥大细胞异染颗粒呈紫色为宜。每只大鼠切片选取 3 个 400 倍视野,计数肥大细胞总数和脱颗粒数目(包膜出现明显破裂或有颗粒外逸为脱颗粒),将相应数值平均即为该点 400 倍镜下局部肥大总数和脱颗粒数目。按下式计算肥大细胞脱颗粒率:

脱颗粒率=肥大细胞脱颗粒数目 / 肥大细胞数 × 100%。

结果见图 1 和表 1。在光镜下观察,背景为淡蓝色或无色,肥大细胞胞浆呈蓝色,胞核为无色,胞质中含有粗大的蓝紫色或紫红色颗粒。肥大细胞周围有紫色颗粒,或胞浆破裂或呈现爆炸样,又称鬼影细胞均视为脱颗粒的肥大细胞。肥大细胞多在硬脑膜血管周围分布。图 1 所示,模型对照组肥大细胞脱染色较深,分布面广,脱颗粒的肥大细胞较空白对照组显著增多,感毒清颗粒各剂量组肥大细胞染色较模型组浅,分布面积较小,脱颗粒的肥大细胞数目较模型对照组显著减少。

由表 1 可知,与模型组比较,感毒清颗粒高、中、低剂量组大鼠颅骨肥大细胞脱颗粒率显著低于模型对照组,有显著的统计学意义(P<0.05)。

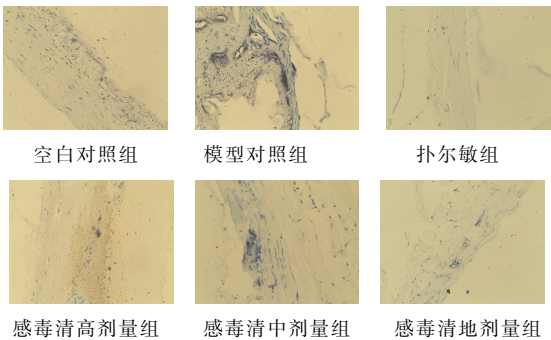


图 1 各组肥大细胞脱颗粒情况(×400)

表 1 感毒清颗粒对大鼠颅骨肥大细胞脱颗粒的作用(̄x±s)

组别	n	脱颗粒率/%
空白对照组	10	7.09±7.06**
模型对照组	10	51.70±3.31
扑尔敏对照组(5 mg/kg)	10	33.33±3.90**
感毒清颗粒高剂量组(6.3 g/kg)	10	37.41±7.40**
感毒清颗粒中剂量组(3.15 g/kg)	10	42.77±6.80**
感毒清颗粒低剂量组(1.575 g/kg)	10	44.47±7.16*

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.2 感毒清颗粒对大鼠同种被动皮肤过敏的影响

抗血清制备同“2.1”,抗血清用生理盐水 1:1 和 1:2 稀释备用。另取大鼠 60 只,分组与给药同“2.1”,ig 给药,1 次/d,连续 6 d。给药第 4 天,每鼠背部左右两侧脱毛 3 cm×3 cm,次日于脱毛处皮内注射抗血清 0.1 mL 致敏(空白组不致敏),左右两侧分别为 1:1 和 1:2 抗血清。大鼠注射抗血清 48 h 后,各组大鼠尾静脉注射用 0.5%伊文思蓝溶液配成 2 mg/mL 的卵白蛋白溶液 1 mL/100 g 攻击。30 min 后断头处死大鼠,翻转背部皮肤,用 1.2 cm 打孔器取下 1:1,1:2 的蓝斑皮肤,剪碎,分别装入加有 5 mL 丙酮:生理盐水(7:3)混合液中浸泡,37 ℃ 培养箱过夜,离心(3 500 r/min,10 min),取上清液,590 nm 处测定吸光度值。按下式计算抑制率,结果见表 2。

抑制率=(模型组吸光度值-给药组吸光度值) / 模型组吸光度值 × 100%。

由表 2 可知,1:1 抗原血清注射点,与模型组比较,感毒清高、中、低剂量对 OD 值无明显影响(P>0.05);1:2 抗原血清注射点,与模型组比较,感毒清高、中、低剂量组 OD 较模型对照组显著降低,有极显著的统计学意义(P<0.01),抑制率分别为 45.83%、54.17%和 54.17%。

3 讨论

从现代临床来看,反复上呼吸道感染与过敏关系密切,其原因就在于过敏可以导致呼吸道黏膜的

分泌,分泌物在上呼吸道的堆积为病毒等病原微生物附着和感染提供了机会和条件,反复感染又破坏

上呼吸道的抗感染能力,引起恶性循环。

表2 感毒清对大鼠同种被动皮肤过敏反应的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吸光度值		抑制率/%	
		1 : 1	1 : 2	1 : 1	1 : 2
空白对照组	10	0.11±0.05	0.18±0.06 **		
模型对照组	10	0.16±0.07	0.24±0.05		
扑尔敏对照组(5 mg/kg)	10	0.10±0.04 *	0.11±0.04 **	37.50	54.17
感毒清颗粒高剂量组(6.3 g/kg)	10	0.16±0.08	0.13±0.03 **	0	45.83
感毒清颗粒中剂量组(3.15 g/kg)	10	0.15±0.05	0.11±0.05 **	6.25	54.17
感毒清颗粒低剂量组(1.575 g/kg)	10	0.17±0.06()	0.11±0.04 **	-6.25	54.17

注:与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

肥大细胞是过敏反应的一个很重要的效应细胞,肥大细胞活化后可分泌血管活性物质如组胺^[2],这些化学介质在过敏反应中具有重要地位,不仅能增加血管的通透性,引起血浆外漏,而且能促进平滑肌收缩、腺体分泌,导致喷嚏、流涕等过敏症状。因此,抑制肥大细胞活化对于抗过敏反应至关重要。被动皮肤过敏是由 IgE 类抗体所介导 I 型超敏反应^[3]。当抗原致敏机体后,产生的 IgE 可与肥大细胞表面的 FcεR I 结合使细胞致敏,当再次接触抗原时,可与 IgE 结合活化 FcεRI,从而诱导肥大细胞脱颗粒并释放多种炎性介质^[4]。本研究采用大鼠颅骨肥大细胞脱颗粒和大鼠同种被动皮肤过敏反应探讨感毒清颗粒的抗过敏作用,研究结果表明,感毒清颗粒能够抑制大鼠颅骨肥大细胞脱颗粒,能够拮抗大鼠同种被动皮肤过敏反应,提示感毒清颗粒具有良好的抗过敏作用,为其临床应用提供了药理学依据。

参考文献:

[1] 熊敏,张荫杰,徐世军,等.感毒清颗粒抗炎镇痛作用研究[J].中药药理与临床,2012, 28(3):89-92.
Xiong M, Zhang YJ, Xu SJ, et al.Research on Ganduqing granule anti-inflammatory and analgesia effects[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2012, 28(3): 89-92.

[2] Choi YH,Yan GH.Silibinin attenuates mast cell-mediated anaphylaxis-like reactions[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(5): 868-875.

[3] 钟正贤,陈学芬,周桂芬,等.水半夏提取物的抗炎抗过敏作用研究[J].中药药理与临床,2003, 19(2):25-27.
Zhong ZX, Chen XF, Zhou GF, et al.Research on pinellia water extract anti-inflammatory and anti-allergy effects[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2003, 19(2): 25-27.

[4] KovarovaM, R ivera J. Amolecular understanding of mast cell activation and the promise of antiallergic the rapeutics[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(15):2083-2091. (编辑:董宇)

(上接 232 页)

[5] Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, et al. Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(11): 2434-2441.

[6] Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis[J]. Virchows Arch, 2004, 444(3): 247-256.

[7] 邓英辉,林琼真,于洁,等.黄芪注射液改善肾间质纤维化的作用机制研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2008, 9(5):393-396,474.
Deng YH, Lin QZ, Yu J, et al.The study in the mechanism of *Radix Astragali* injection to improve the renal interstitial fibrosis[J]. Chin J Integr Tradit Western Med Kidney Dis, 2008, 9(5): 393-396,474.

[8] Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, et al. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor [J]. Am J Kidney Dis, 2005, 46(5): 938-948.

[9] Huang YJ, Wang ZH, Zhang JB, et al. Smad7 instead of Smad6 blocks epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta in human renal proximal tubule epithelial cells[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2008, 24(11): 1074-1078.

[10] Li JH, Zhu HJ, Huang XR, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(6): 1464-1472.

[11] 窦献蕊,余学清.TGF-β1 及其信号蛋白在大鼠腹膜纤维化模型腹膜组织中的表达及可能作用[J].中华医学杂志,2005, 85(37):2613-2618.
Dou XR, Yu XQ.The expression and possible role of TGF-β1 and its signal protein in rat peritoneal tissues in peritoneal fibrosis model[J]. Chin Med J, 2005, 85(37): 2613-2618.

[12] Zavadil J, Bttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mes-enchymal transitions[J]. Oncogene, 2005, 24(37): 5764-5774.

[13] Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7[J]. J Clin Invest, 2001, 108: 807-816. (编辑:董宇)

寒凝血瘀证大鼠模型的优化筛选研究

谢波, 邓海山, 喻斌, 方泰惠*

(南京中医药大学江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 探讨不同冷冻时间对寒凝血瘀证动物模型建立的影响, 从而为中医学寒凝血瘀证的研究提供实验模型。方法 将大鼠随机分 5 组, 即空白组、5 d 组、10 d 组、15 d 组、20 d 组。除空白组外, 其余大鼠置于 0℃ 冰水中 15 min, 每日 1 次, 各组分别冷冻相应天数, 造成寒凝血瘀模型。观察血常规、卵巢和子宫指数和血液流变指标。结果 与空白组比较, 造模 5 d 和 10 d 组大鼠红细胞可见显著降低和 APTT 的显著延长 ($P < 0.01$); 另外造模 5 天还可见血浆黏度、低转速全血黏度和红细胞聚集指数的显著降低, 红细胞变形能力的显著增加, 血红蛋白显著降低, 子宫指数可见显著减少 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。造模 10 d 组还可见中性粒细胞百分比的显著增加, TT 的显著缩短 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。造模 10 d 和 15 d 虽然均可见红细胞压积的显著减少, 但是造模 10 d 组却可见红细胞变形指数的降低, 而造模 15 d 却见其变形指数的显著增加 (与空白组比较, $P < 0.01$), TT 的显著缩短 ($P < 0.05$), 血浆黏度的显著增加 ($P < 0.01$), 另外 APTT 也有缩短的趋势。而当造模时间延长到 20 d, 反而可见 PT 和 APTT 的显著延长 ($P < 0.01$)。但是各组大鼠肛温在整个造模过程中未见显著改变 (与空白组比较, $P > 0.05$)。结论 造模 10 d 和 15 d 可见大鼠出现凝血功能增强, 并且 15 d 组血液流变学异常最明显。该造模方法为中医寒凝血瘀证的研究提供新的思路。

关键词: 寒凝血瘀; 动物模型; 证

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2013)03-0262-04

Study on optimal screening of rat model with blood stasis due to cold syndrome

XIE Bo, DENG Hai-shan, YU Bin, FANG Tai-hui*

(Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the effects of freezing time on setting up a rat model of blood stasis due to cold and to provide an experimental model for the study of blood stasis due to cold syndrome with Chinese medicine. **METHODS** The rats were divided randomly into 5 groups, namely control group, 5-day group, 10-day group, 15-day group and 20-day group. Except those in control group, the rest rats in other groups were induced blood stasis due to cold syndrome by kept in 0℃ ice water lasting for 15 mins one time a day. The complete blood count indexes, ovary index, uterus index and blood rheology were carefully observed. **RESULTS** Compared with control group, the erythrocytes of rats in 5-day and 10-day group were dramatically reduced, the APTT dramatically extended ($P < 0.01$). In 5-day group, plasma viscosity, blood viscosity and erythrocyte aggregation index (EAI) reduced dramatically, erythrocyte deformability improved significantly, hemoglobin decreased remarkably, and uterus index declined significantly ($P < 0.05 \sim 0.01$). The 10-day group also showed that the percentage of neutrophils increased significantly and TT shortened remarkably ($P < 0.05 \sim 0.01$). In 10-day and 15-day group, both of their HCT reduced obviously. HBX of 10-day group declined, while that of 15-day group increased significantly (compared with the control group, $P < 0.01$). Besides, TT obviously shortened ($P < 0.05$), plasma viscosity increased significantly ($P < 0.01$), and APTT also tended to be short in 15-day group. When frozen time lasted for 20days, PT and APTT were prolonged significantly ($P < 0.01$). But rectal temperature of rats in each group had no significant change during the whole modeling process (compared with control group, $P > 0.05$). **CONCLUSION** Making model on the 10th and 15th day of modeling, coagulative function improved, and abnormal hemorheology was the most obvious in 15-day group compared with other groups. The modeling approach may provide new ideas for the research of blood stasis due to cold syndrome.

KEY WORDS: blood stasis due to cold syndrome; animal model; syndrome

收稿日期: 2013-03-24; 修稿日期: 2013-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(81102898); 江苏省自然科学基金(BK2010561)

作者简介: 谢波(1981-), 男, 江苏沭阳人, 南京中医药大学讲师。* 通信作者: 025-86798155

寒凝血瘀是中医学证候中常见的病证,多由寒邪侵袭机体而引起体内血行不畅、血脉不通、血液瘀滞等中医病理变化,尤其是妇科月经病之常见病。目前寒凝血瘀动物模型的研制有多种形式^[1],其法各有千秋,其中最符合中医月经病发病机理^[2]特点的是冰水浸泡法,该法模拟女性接触低温和冷水后月经病高发的特点,成秀梅^[3]等对冰水浸泡致寒凝血瘀模型已做初步探索,但并没有对该法进行优化。考虑到冰水浸泡时间对大鼠寒凝血瘀证的形成有着重要影响,笔者在本次试验中拟针对不同浸泡时间对寒凝血瘀证模型进行优化筛选研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

凝血酶原试剂(思塔高诊断产品贸易有限公司,批号:108739)、活化部分凝血酶原试剂(思塔高诊断产品贸易有限公司,批号:108850;纤维蛋白原试剂(思塔高诊断产品贸易有限公司,批号:108771);凝血酶试剂(思塔高诊断产品贸易有限公司,批号:108854);其余均采用分析纯试剂。

1.2 仪器

STA-R Evolution 型全自动血凝仪(法国 STA-GO 公司);ZS9200 型全自动血液流变仪(北京众驰伟业科技发展有限公司);ABX PENTRA60 型全自动血细胞分析仪(法国 ABX 公司);欧姆龙(OMRON)体温计 MC-347。

1.3 动物及分组

选用清洁级健康 SD 雌性大鼠 50 只,体质量(400±50) g,由南京江宁青龙山动物养殖场提供,动物许可证号:SYXK(苏)2007-0030。大鼠随机分为 5 组:空白组、造模 5 d 组、造模 10 d 组、造模 15 d

组、造模 20 d 组,每组 10 只。

2 方法

2.1 造模方法

空白组大鼠正常饲养,其余大鼠置于冰水环境中,持续冰水刺激 15~20 min。当大鼠出现反应迟钝、呼吸微弱、腿部僵直欲沉时取出。每日刺激 1 次,持续刺激时间分别为 5、10、15、20 d。

2.2 指标检测方法

各组大鼠造模过程中每 5 d 检测肛温。大鼠按照上述方式刺激结束后,颈动脉取血 0.5 mL 于肝素化离心管中,用于血常规检测。其余血液用 3.8%枸橼酸钠抗凝,用于凝血功能、血液和全血黏度、红细胞压积、红细胞聚集和红细胞变形指数等指标的检测。最后取子宫和卵巢用于计算子宫指数和卵巢指数。

2.3 统计学方法

数据采用 SPSS11.0,数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料分析采用 *t* 检验及方差分析。

3 结果

3.1 冷冻不同时间对实验性大鼠血常规的影响

结果见表 1。

结果表明,与空白组比较,造模 5 d 和 10 d 组大鼠红细胞可见显著降低($P<0.01$);造模 5 d 组可见血红蛋白显著降低($P<0.05$);造模 10 d 组还可见中性粒细胞百分比的显著增加($P<0.05$)。

3.2 冷冻不同时间对实验性大鼠卵巢和子宫指数的影响

结果见表 2。

结果表明,与空白组比较,造模 5 d 组大鼠子宫指数可见显著减少($P<0.05$)。

表 1 冷冻不同时间对实验性大鼠血常规的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血小板数 (10 ⁹ /L)	红细胞计数 (10 ¹² /L)	白细胞计数 (10 ⁹ /L)	中性粒细胞 百分比/%	血红蛋白/ (g·L ⁻¹)
空白组	9	492.67±130.17	6.15±0.63	5.50±2.93	15.66±7.99	115.33±10.64
造模 5 d 组	9	384.67±91.38	5.29±0.53 * *	6.87±4.06	17.10±8.82	97.89±12.65 *
造模 10 d 组	8	568.50±171.91	5.11±0.70 * *	3.19±1.72	42.67±26.17 *	93.13±13.09
造模 15 d 组	8	532.29±96.25	5.72±0.72	5.33±2.23	22.60±11.49	105.85±10.83
造模 20 d 组	8	596.43±151.27	6.19±0.79	4.73±2.33	17.26±11.19	118.29±15.16

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.3 冷冻不同时间对实验性大鼠凝血功能的影响

结果见表 3。

结果表明,与空白组比较,造模 5 d 和 10 d 组可见 APTT 的显著延长($P<0.01$),但第 10 天已出现

TT 的显著缩短($P<0.01$)。造模第 15 天则可见 APTT 已有缩短的趋势,此时 TT 仍可见显著缩短($P<0.05$)。而当造模时间延长到 20 d,反而可见 PT 和 APTT 的显著延长($P<0.01$)。