

大鼠原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛模型的建立与评价

聂甜¹, 蒋文明¹, 彭素娟², 张旻昱³, 杨琳⁴, 李仕能¹, 胡妮¹

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005;
3. 湖南省人民医院, 长沙 410005; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的 建立同时符合中医“热盛证”和原发性免疫性血小板减少性紫癜外周血血小板减少的大鼠模型。方法 采用SD大鼠背部多点注射20%干酵母菌悬液和腹腔注射1:4稀释的兔抗SD大鼠血小板血清(APS)建立原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛大鼠模型。并观察受试大鼠的中医证候特点、血象、骨髓象及丘脑体温调节中枢5-羟色胺(5-HT)的水平。结果 模型组大鼠注射后2~6 h体温和日饮水量显著上升,造模第4天出现足趾紫癜和造模第30天出现肠道黏膜出血($P < 0.05$);外周血象中血小板数显著降低,骨髓象巨核细胞数显著减少($P < 0.05$);大脑体温调节中枢5-HT的水平显著增高($P < 0.05$)。结论 原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛大鼠病证结合模型基本体现了“热盛”所致原发性免疫性血小板减少性紫癜大鼠发生紫癜的病理特点。

【关键词】 原发性免疫性血小板减少性紫癜;热盛证;大鼠模型

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0013-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.004

Establishment and evaluation of heat sheng model of rat primary immune thrombocytopenic purpura

NIE Tian¹, JIANG Wen-ming¹, PENG Su-juan², ZHANG Min-yu³, YANG Lin⁴, LI Shi-neng¹, HU Ni¹

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China;
2. The Second Affiliated Hospital, Hunan University of TCM, Changsha 410005, China;
3. Hunan People's Hospital, Changsha 410005, China; 4. The First Affiliated Hospital, Hunan University of TCM, Changsha 410007, China)

【Abstract】 Objective To establish a rat model at the same time in accordance with the “hot sheng syndrome” of traditional Chinese medicine and primary immune thrombocytopenic purpura of peripheral blood platelet reduction. **Methods** Using back multi-point injection of 20% dry yeast suspension on SD rats and 1:4 dilution of rabbit anti SD rats platelet serum (APS) by intraperitoneal injection to establish a primary immune thrombocytopenic purpura “heat sheng” rat model. And observing rats of TCM syndrome characteristics, hemogram, myelogram and serotonin (5-HT) level of the temperature regulating center in thalamus. **Results** After injection of 2 h ~ 6 h temperature and daily water of the model group rats increased significantly, toe purper showed in fourth day of modeling and intestinal mucosal bleeding in thirty day of modeling ($P < 0.05$); Platelet count in peripheral blood decreased significantly, bone marrow megakaryocyte number

[基金项目] 湖南省研究生科研创新项目(CX2013B331)。

[作者简介] 聂甜(1983-),男,博士生,专业:中西医结合血液病学。Email:568098977@qq.com。

[通讯作者] 蒋文明(1962-),男,教授,研究方向:难治性血液病的中医药防治。Email:2839040380@qq.com。

reduced significantly ($P < 0.05$); 5-HT level of the temperature regulating center of brain increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** The study of the primary immune thrombocytopenic purpura heat sheng rat model of combination of disease and syndrome reflected basically the pathological characteristics of purpura caused by "heat sheng" in primary immune thrombocytopenic purpura rat mode.

【Key words】 Primary immune thrombocytopenic purpura; Heat sheng; Heat syndrome; Rat model

原发性免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种血小板免疫性破坏的常见出血性疾病^[1]。第七届全国中西医结合血液病学术会议将 ITP 的中医病名定为“紫癜病”。热盛证是 ITP 患者常见的中医证型, 热灼脉络、迫血妄行是 ITP 热盛证的基本病机^[2-3]。对糖皮质激素耐药、难以耐受免疫抑制剂毒副作用、病程长的 ITP 患者采用具有清热作用的复方治疗, 其结果显示了较好的临床疗效^[4]。但是, 目前对这类复方干预 ITP 的效应机制研究仍缺乏符合中医“病证”特点的 ITP 动物模型, 这可能进一步限制 ITP 中药新药开发和中药复方的药效学研究。为此, 本实验在前期研究和文献调查的基础上^[5], 采用 20% 干酵母菌悬液联合抗血小板血清 (APS) 注射 SD 大鼠法建立原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛大鼠模型, 并评价该模型的基本病理特点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 体重 160 ~ 200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2013-0004】。清洁级新西兰雄性白兔 5 只, 体重 1.7 ~ 2 kg, 购自长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2009-0012】。实验在湖南中医药大学实验动物中心进行, 使用许可证号【SYXK(湘)2013-0005】。

1.1.2 仪器 TDZ4-WS 低速台式离心机, 长沙湘仪医疗设备厂。XT-4000i 全自动血细胞计数仪, 日本希森美康公司。Leica dm 2500 普通显微镜, 德国徕卡公司。电子体温计, 温州友尚医疗科技有限公司。

1.1.3 试剂 弗氏完全佐剂, 购自武汉博士德生物公司(生产批号: bstzje10bwq)。不完全弗氏佐剂, 购自武汉博士德生物公司(生产批号: bstbzje10bwq)。5-羟色胺免疫检测试剂盒, 购自北京中山生物技术有限公司(生产批号: H9523)。0.01 mol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液(PBS), 购自武汉博士德生物公司(生产批号: 09D16B30)。干酵母

菌; 安琪高活性干酵母, 购自安琪酵母股份有限公司(生产批号: 1124686937)。瑞氏-姬姆萨染液, 购自珠海贝索生物技术有限公司(生产批号: 413123)。多聚甲醛, 购自湖北奥生新材料科技有效公司(生产批号: XK13-201-00399)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔抗 SD 大鼠血小板血清 (APS) 的制备 腹主动脉取血获取 SD 大鼠外周血 2 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 1500 r/min 离心 15 min 获取富血小板血浆。3200 r/min, 4℃离心 10 min, 去上清, 获得血小板。用 0.01 mol/L pH7.3 的 PBS 洗涤、离心 3 次并混悬血小板至 $10^9/L$ 。取血小板悬液与 10 mL 弗氏完全佐剂等量混匀形成乳白色黏稠乳剂, 备用。向每只新西兰兔两后肢足垫及背部多点注射致敏。首次注射后第 1、2、3、4 周, 按上述方法再次获得血小板悬液, 取血小板悬液与 10 mL 不完全弗氏佐剂等量混合。向每只新西兰兔两后肢足垫及背部多点注射加强免疫。末次加强免疫后第 3 天心脏采集白兔外周血, 3000 r/min 离心 10 min, 获取富含兔抗 SD 大鼠血小板血清, 贮存在 -80℃ 冰箱中备用(临用时取出, 56℃水浴 30 min 灭活补体)。

1.2.2 20% 干酵母菌悬液的配制 称取 10 g 干酵母菌, 将其溶于 40 mL 蒸馏水, 玻璃棒混匀(临用临配)。

1.2.3 分组与处理 将 40 只 SD 大鼠随机分成模型组、干酵母菌组、APS 组和正常大鼠组, 每组各 10 只。模型组采用干酵母菌联合 APS 注射法造模: 每天均背部多点注射 20% 干酵母菌悬液 (2 mL/200g) 1 次, 连续 30 d。第 1 天、第 2 天、第 3 天腹腔注射 1:4 稀释的兔抗 SD 大鼠血小板血清 (0.7 mL/200g) 1 次, 后每隔一天注射一次兔抗 SD 大鼠血小板血清。干酵母菌组: 每天均背部多点注射 20% 干酵母菌悬液 (2 mL/200g) 1 次, 连续 30 d。APS 组: 第 1 天、第 2 天、第 3 天腹腔注射 1:4 稀释的兔抗 SD 大鼠血小板血清 (0.7 mL/200g) 1 次, 后每隔一天注射一次兔抗 SD 大鼠血小板血清。正常大鼠组: 每天均背部多点注射生理盐水 (2 mL/200g) 1 次, 连续 30 d。第 1 天、第 2 天、第 3 天腹腔注射生理盐水 (0.7 mL/

200g) 1 次, 后每隔一天注射一次生理盐水。

1.2.4 标本采集与制备 各组大鼠采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(1 mL/100g), 腹主动脉采血 2 mL, EDTA 抗凝。组织剪分离股骨, 剪其一端, 挑出骨髓置于载玻片上, 涂片后待干, 做瑞士-姬姆萨染色。断颈法获取大脑, 置于 4% 多聚甲醛固定液中。

1.2.5 指标检测

1.2.5.1 外周血血小板数的检测: XT-4000i 全自动血细胞计数仪检测血小板数。

1.2.5.2 骨髓巨核细胞数的检测: 显微镜低倍镜下(10×10)计数巨核细胞数。

1.2.5.3 大脑体温调节中枢 5-羟色胺的检测: 组织切片脱蜡至水, 3% H₂O₂ 室温灭活 10 min, PBS 洗 3 次。抗原修复, PBS 洗 3 次。滴加正常山羊血清封闭, 室温 20 min, 甩去多余液体。滴加 I 抗, 室温 1 h。PBS 洗 3 次, 滴加二抗室温 1 h。PBS 洗 4 次, 5 min, DAB 显色。蒸馏水洗 10 min, 苏木素复染 2 min, 盐酸酒精分化。脱水、透明、封片、镜检。随机挑选 5 个高倍视野, 计数阳性细胞。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料用“ $\pm s$ ”表示, 所有资料进行正态性和方差齐性检验; 不符合正态性和方差齐性者用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较用 Nemenyi 法检验。计数资料采用 X² 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著意义。

2 结果

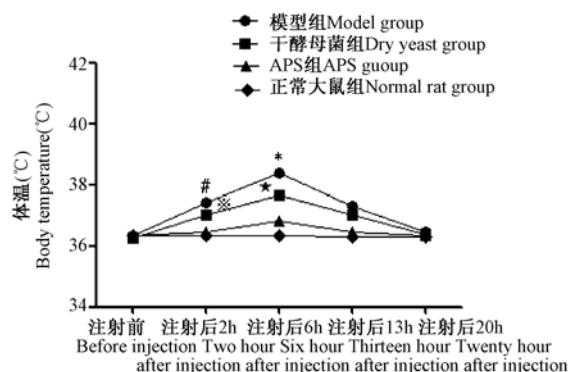
2.1 各组大鼠中医证候出现情况的比较

2.1.1 发热与体温变化情况

采用电子体温计, 检测各组大鼠体温(直肠温度)变化。处理期间模型组和干酵母菌组的大鼠出现发热症状, 在注射 20% 干酵母菌悬液后 2 h 体温开始上升, 注射后 6 h 体温达高峰(图 2)。而 APS 组和正常大鼠组的大鼠在此时间点体温无显著变化, 注射 20 h 后各组大鼠体温恢复正常(图 1)。与 APS 组和正常大鼠组相比较, 模型组和干酵母菌组大鼠体温升高明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。

2.1.2 口渴与饮水量的变化情况

处理期间模型组和干酵母菌组大鼠出现了口渴症状, APS 组和正常大鼠组大鼠未出现口渴症状。与 APS 组和正常大鼠组大鼠相比, 饮水量增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。



注: 模型组与 APS 组相比, $\# P < 0.05$; 与正常大鼠组相比, $* P < 0.05$ 。干酵母菌组与 APS 组相比, $** P < 0.05$; 与正常大鼠组相比, $* P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠体温(直肠温度)变化

Note: Compared with model group and APS group, $\# P < 0.05$; Compared with normal rat group,

$* P < 0.05$. Compared with dry yeast group and APS group,

$** P < 0.05$; Compared with normal rat group, $* P < 0.05$.

Fig. 1 Changes in body temperature (rectal temperature) of rat

2.1.3 便干症状的比较

处理期间模型组和干酵母菌组大鼠出现大便硬结^[6](粪便表面干燥, 质地坚硬), 而 APS 组和正常大鼠组大鼠大便相对湿润(粪便表面水分多, 湿润, 质地松软)。模型组、干酵母菌组与 APS 组、正常大鼠组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 4)。

2.1.4 紫癜出现及消退情况

在注射 APS 的第 4 天, 模型组和 APS 组的大鼠足趾出现了紫癜, 而干酵母菌组和正常大鼠组的大鼠未见紫癜。与干酵母菌组和正常大鼠组相比, 模型组和 APS 组的大鼠紫癜症状显著($P < 0.05$, 彩插 6 图 5)。处理第 14 天模型组和 APS 组各有 5 只大鼠紫癜开始消退。处理第 19 天 APS 组大鼠紫癜消失, 模型组仍有 6 只大鼠存在紫癜, 但颜色较前变浅; 模型组与 APS 组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 6)。

2.1.5 肠道出血情况

造模 30 d 后处死各组大鼠, 模型组有 4 只大鼠发生肠道出血, 其余各组未见肠道出血。模型组与其它三组比较, 差异有统计学意义($P > 0.05$, 彩插 6 图 7)。

2.1.6 耳廓深红与舌色症状的变化比较

处理期间四组大鼠的耳廓和舌质未见深红表

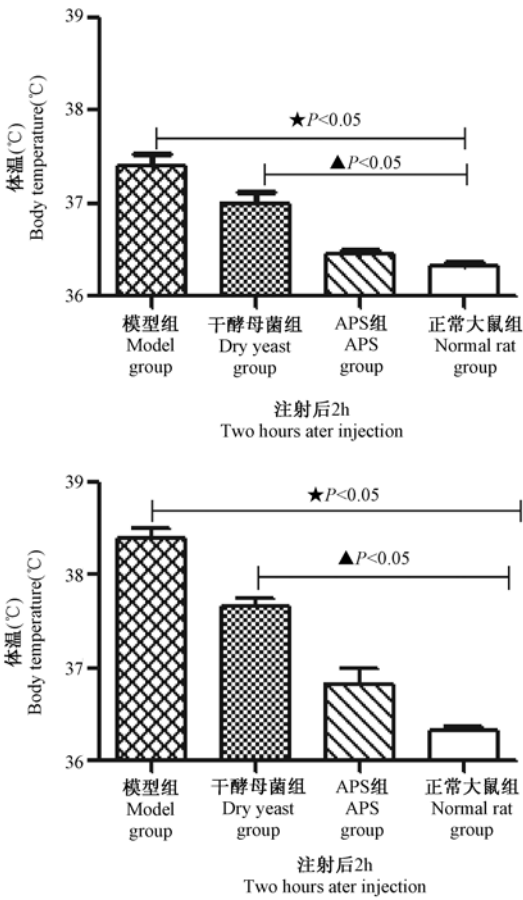


图2 注射后 2 h 和 6 h 各组大鼠体温(直肠温度)情况
 Fig.2 Temperature(rectal temperature) conditions of rat in 2 h and 6 h after injection

现,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 8)。

2.2 各组大鼠外周血小板数的比较

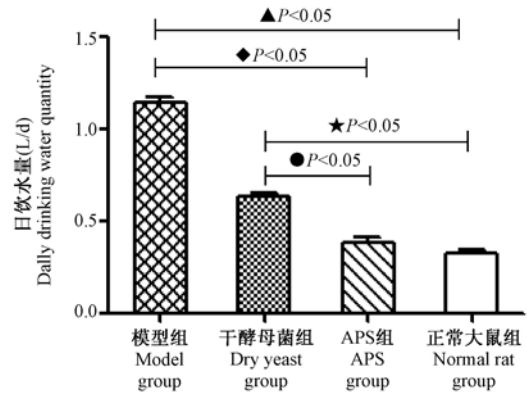
与正常大鼠组相比,模型组大鼠和 APS 组大鼠造模后外周血小板显著下降($P < 0.05$)。但干酵母菌组大鼠没有出现血小板数下降,与正常大鼠组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,图 9)。

2.3 各组大鼠骨髓巨核细胞数的比较

取各组大鼠股骨骨髓液涂片,做瑞士-姬姆萨染色,显微镜低倍镜下计数全片巨核细胞数量。模型组、干酵母菌组、APS 组、正常大鼠组巨核细胞数分别为: 202.40 ± 97.29 、 625.70 ± 180.74 、 234.80 ± 114.54 、 1235.60 ± 177.16 。结果提示:模型组和 APS 组大鼠骨髓组织中巨核细胞数显著低于干酵母菌组和正常大鼠组,差异有统计学意义($P < 0.05$,彩插 7 图 10)。

2.4 各组大鼠大脑体温调节中枢 5-羟色胺水平的比较

5-羟色胺(5-HT)是体温调节中枢重要的发



注:模型组与 APS 组相比,◆ $P < 0.05$;与正常大鼠组相比,▲ $P < 0.05$ 。干酵母菌组与 APS 组相比,● $P < 0.05$;与正常大鼠组相比,★ $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠日饮水量情况

Note: Compared with model group and APS group, ◆ $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ▲ $P < 0.05$. Compared with dry yeast group and APS group, ● $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ★ $P < 0.05$.

Fig.3 Daily drinking water quantity of rats

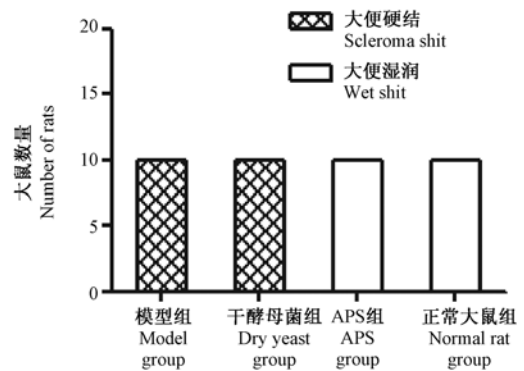


图4 各组大鼠大便情况

Fig.4 Shit situation of rat

热介质。免疫组化结果显示,模型组和干酵母菌组大鼠丘脑组织中 5-羟色胺含量显著高于 APS 组和正常大鼠组,差异有统计学意义($P < 0.05$,彩插 7 图 11)。模型组大鼠脑组织 5-HT 的光密度值为 0.72 ± 0.19 ,干酵母菌组为 0.70 ± 0.29 ,APS 组为 0.58 ± 0.14 ,正常大鼠组为 0.58 ± 0.14 。模型组和干酵母菌组 5-HT 免疫反应阳性产物平均光密度值高于 APS 组和正常大鼠组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 12)。

3 讨论

建立一种比较理想的大鼠原发免疫性血小板减少性紫癜热盛模型(病证结合模型),对于进一步

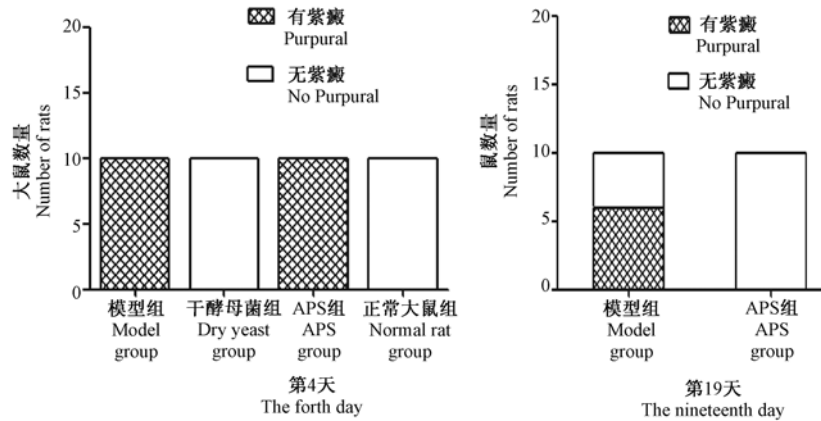


图 6 各组大鼠紫癜变化情况

Fig. 6 Changes of rat purpura

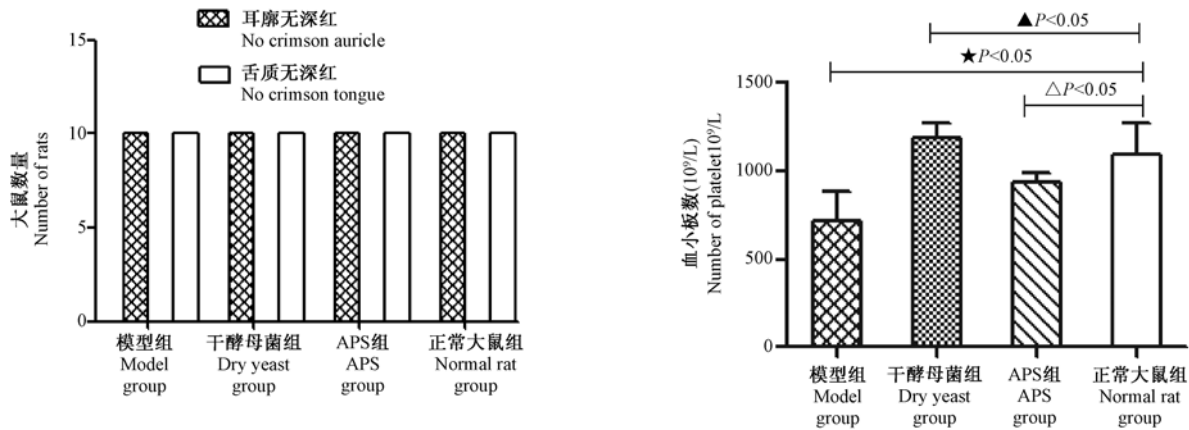
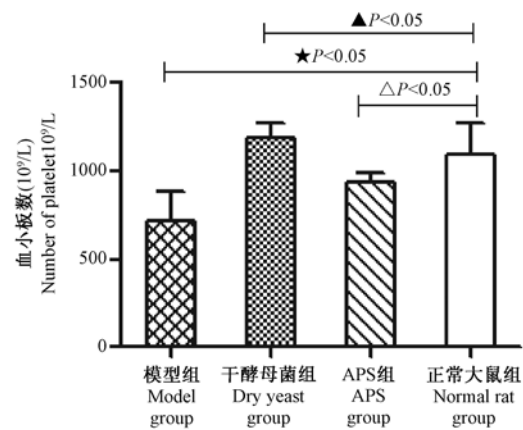


图 8 各组大鼠耳廓及舌质深红情况

Fig. 8 Auricle and tongue crimson condition of rat

探索 ITP 中医证型的病理本质, 阐述中药复方干预 ITP 的作用机制, 揭示祖国中医学辨证施治的科学性等方面具有重要意义。目前, 病证结合模型研究仍是中医学科研的瓶颈。其原因为某些病证结合模型很难同时兼顾疾病的病理特点与中医证候特征。因此, 大鼠 ITP 热盛模型(病证结合模型)能否建立主要取决于造模方法能否同时兼顾上述两点, 主要表现为以下两方面: (1) 选用的造模方法能否复制 ITP 的病理特点; (2) 该方法能否同时使 ITP 大鼠表现典型的中医热盛证候, 如发热、口渴、紫癜等; 而这一点显得尤为重要, 因为上述证候是中医学判定证型的辨证要素。

被动免疫法造模是 ITP 动物造模的主要方法。1951 年, William J. Harrington^[7] 输注了 500 mL ITP 患者血液, 诱发了严重的小血小板减少症, 3 d 后出现皮肤出血。此后, 研究者常在被动免疫状态下, 将抗血小板血清(APS)或鼠抗 GPIIb/IIIa 单克隆抗体输入动物体内造成血小板破坏, 形成紫癜。



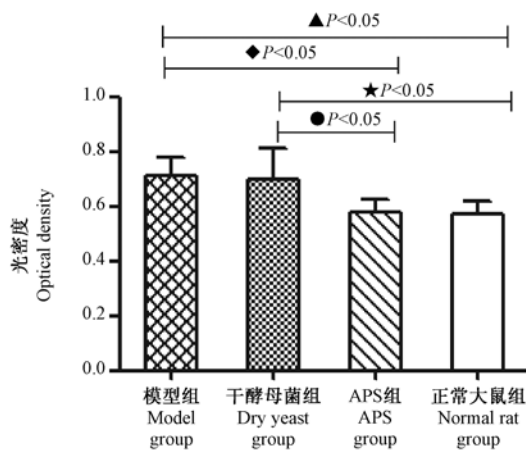
注: 模型组与正常大鼠组相比, ★ $P < 0.05$;
干酵母菌组与与正常大鼠组相比, ▲ $P > 0.05$;
APS 组与正常大鼠组相比, △ $P < 0.05$ 。

图 9 各处理因素对 SD 大鼠外周血血小板数的影响

Note: Compared with model group and normal rat group, ★ $P < 0.05$; Compared with dry yeast group and normal rat group, ▲ $P > 0.05$; Compared with APS group and normal rat group, △ $P < 0.05$.

Fig. 9 Effects of various factors on peripheral blood platelet count of SD rat

Domínguez V 等^[8]用兔抗 BALB/C 小鼠血小板血清免疫 BALB/C 小鼠, 小鼠皮肤出现紫癜, 成功获得 ITP 小鼠模型。Song S 等^[9]通过向未经过 IVIG 预处理 SCID 小鼠腹腔注射抗 GPIIb 单克隆抗体 (MWR30) 和抗 GPIIIa 单克隆抗体 (2C9. G2) 诱导产生了 ITP 小鼠模型, 而经 IVIG 预处理的小鼠未出现 ITP 相关症状, 说明 IVIG 可保护 SCID 小鼠血小板免受抗血小板单克隆抗体的破坏。被动免疫法造模优点在于反复输入抗血小板抗体, 容易造成体内血小板迅速破坏, 诱发出血; 且不易造成其它血细胞发生破坏和组织损伤。两者优点区别在于:



注:模型组与 APS 组相比,◆ $P < 0.05$;
与正常大鼠组相比,▲ $P < 0.05$;
干酵母菌组与 APS 组相比,● $P < 0.05$;
与正常大鼠组相比,★ $P < 0.05$ 。

图 12 各组大鼠脑组织 5-HT 光密度值比较

Note: Compared with model group and APS group, ◆ $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ▲ $P < 0.05$; Compared with dry yeast group and APS group, ● $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ★ $P < 0.05$.

Fig. 12 5-HT optical density value comparison in brain tissue of rat

APS 法造模有明显的血小板抗体,造模后出血症状明显,而单克隆抗体造模法主要用于 IVIG 等药物抗 ITP 机制研究。中医证候是判断证型的关键因素,紫癜(出血)对于判定 ITP 大鼠模型是否呈现热盛迫血具有重要意义。因此,基于 APS 造模法易出现紫癜的优点,本课题组未采用特定的单克隆抗体,而是沿用 APS 法造模,希望出血症状明显。

热邪是中医临床出血常见的病因之一。《诸病源候论·热病衄候》曰:“邪热与血气并,故衄也”。《景岳全书·血症》曰:“出血者多由于火,火盛则破血妄行”。因此,良好的致热源是 ITP 大鼠呈现热盛证的关键。左泽平等^[10]建立了不同浓度的大鼠干酵母、2,4-二硝基酚、脂多糖、细菌内毒素模型,研究发现 20% 干酵母菌悬液大鼠模型升温持续时间长,发热稳定。故本课题组采用 20% 干酵母菌悬液联合 APS 法造模建立大鼠 ITP 热盛病证结合模型。实验发现 SD 大鼠经皮下注射 20% 干酵母菌悬液和腹腔注射 1:4 稀释的 APS 后,模型组大鼠出现了发热、口渴、便干、足趾紫癜证候,表现为热盛迫血妄行。同时,模型组大鼠外周血血小板数和骨髓巨核细胞数降低,表现为急性 ITP 血象和骨髓象。其潜

在的机制为酵母致大鼠丘脑体温调节中枢发热介质 5-HT 含量上升,引起 SD 大鼠体温上升(图 11 和图 12);被动免疫状态下,APS 能导致 SD 大鼠外周血血小板数降低,引起出血。这提示该方法可以诱导 ITP 大鼠出现热盛证。仅皮下注射干酵母菌悬液或腹腔注射 APS 均未表现出热盛相关证候。郜新莲等^[11]采用腹腔注射细菌内毒素联合皮下注射酵母菌制作了大鼠血热出血模型,机制主要是由于剧烈炎症引起的发热兼出血。但是,该血热出血模型并没有引起大鼠外周血血小板的减低。

身热烦渴,便干,吐血,衄血是热迫血行的特征证候^[12]。在注射 APS 的第 4 天,模型组和 APS 组的大鼠足趾均出现了紫癜,而另外两组未出现紫癜(图 5)。研究表明^[13],兔抗大鼠血小板血清(APS)与大鼠血小板结合后被大鼠体内的巨噬细胞吞噬破坏,从而引起大鼠外周血血小板数降低,诱发紫癜。模型组和干酵母菌组大鼠注射 20% 干酵母菌悬液后出现发热症状,同时有口渴和便干症状。这是因为干酵母菌是种常用的外源性致热源,其皮下注射后能引起丘脑体温调节中枢发热介质 5-HT 含量上升,诱发体温上升^[14](图 11)。Chander V 等^[15]研究显示酵母致大鼠发热与体温调节中枢发热介质 5-HT 含量变化有关,且下丘脑组织中 5-HT 含量随体温的改变而改变。四组大鼠均未见舌红。而舌质的改变受血供的多少(舌血供丰富,含舌下动脉和舌深动脉多条分支)、微血管的收缩与扩张影响。本实验发现注射后 6 h 模型组大鼠呈现中度发热,干酵母菌组大鼠呈现轻度发热。这种发热的程度可能未引起舌动脉的明显扩张和血供增加,因此,各组大鼠未见舌质改变。

被动免疫状态下,抗血小板抗体引起实验动物外周血血小板数降低是制作急性 ITP 动物模型的常用方法。本研究发现 APS 注射后 SD 大鼠血小板数和骨髓巨核细胞数降低。原因为血小板和骨髓成熟产血小板型巨核细胞表面均表达 GPIIb/IIIa,抗血小板抗体与其结合后,可诱导血小板被大鼠体内巨噬细胞损害和巨核细胞分化障碍^[16]。虽然本实验采用皮下注射 20% 干酵母菌悬液和腹腔注射 APS 法制作了 ITP 血分热盛证模型,初步阐述了该方法的制作机制。但仍需进一步探讨该模型“热性病机”的免疫病理实质。

参考文献:

[1] Heitink - Pollé KM, Haverman L, Annink KV, et al. Health-

- related quality of life in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia [J]. *Haematologica*, 2014, 99 (9): 1525 - 1531.
- [2] 张权, 王纓. 中医药治疗特发性血小板减少性紫癜概况及展望[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(4): 247 - 249.
- [3] 全日城, 麻柔. 麻柔辨证施治慢性免疫性血小板减少性紫癜经验[J]. *北京中医药*, 2010, 29(4): 260 - 261.
- [4] 朱影. 清热滋阴凉血止血法治疗慢性特发性血小板减少性紫癜[J]. *江西中医药*, 2008, 39(304): 32 - 33.
- [5] 蒋文明, 邓常青, 陈大舜, 等. 大鼠免疫性血小板减少模型的研究[J]. *中国实验动物学报*, 1996, 4(2): 104 - 107.
- [6] 朱文锋. *中医诊断学*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.
- [7] Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, *et al.* Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura [J]. *J Lab Clin Med*, 1951, 38: 1 - 10.
- [8] Domínguez V, Govezensky T, Gevorkian G, *et al.* Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice [J]. *Haematologica*, 2003, 88 (6): 679 - 687.
- [9] Song S, Crow AR, Freedman J, *et al.* Monoclonal IgG can ameliorate immune thrombocytopenia in a murine model of ITP: an alternative to IVIG [J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3708 - 3713.
- [10] 左泽平, 王志斌, 郭玉东, 等. 常用大鼠发热模型研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(2): 52 - 57.
- [11] 鄯新莲, 段红福, 崔瑛, 等. 血热出血模型大鼠血清中鲜地黄高效液相色谱分析[J]. *中医学报*, 2011, 9(26): 1067 - 1069.
- [12] 付澄洲. 寒热治则浅议[C]. *中华中医药学会中医内科学术论坛*, 2013, 517 - 520.
- [13] Cines DB, Bussell JB, Liebman HA, *et al.* The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity [J]. *Blood*, 2009, 113(26): 6511 - 6521.
- [14] 唐晓峰, 薛漫清, 王晖. 大鼠发热模型及发热机制的研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(3): 327 - 329.
- [15] Chander V, Tirkey N, Chopra K. Adrenergic receptor subtypes inositol phosphates and sources of cell [J]. *Toxicology*, 2005, 210(1): 55 - 64.
- [16] Chong BH. ITP: Tregs come to the rescue [J]. *Blood*, 2010, 116 (22): 4388 - 4390.

[修回日期]2015-03-31

(下接第 28 页)

- [17] Yang Z, Asico LD, Yu P, *et al.* D5 dopamine receptor regulation of reactive oxygen species production, NADPH oxidase, and blood pressure [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290(1): R96 - R104.
- [18] 张艳荣, 全雄志, 杨志伟, 等. 多巴胺 D5 受体转基因小鼠的建立[J]. *中国比较医学杂志*. 2008; 18(5): 54 - 58.
- [19] 胡永艳, 董伟, 杨志伟, 等. 多巴胺 D5 受体突变基因 F173L 在心脏过表达引起转基因小鼠扩张型心肌病[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 5(19): 454 - 458.
- [20] Nirmal PARAJULI, Vaibhav B. PATEL, Wang WANG, Ratnadeep BASU and Gavin Y. OUDIT. Loss of NOX2 (gp91phox) prevents oxidative stress and progression to advanced heart failure [J]. *Clinical Science*, 2014, 127, 331 - 340.
- [21] Turunen, M. Olsson, J. Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys [J]. Acta*, 2004; 1660: 171 - 199.
- [22] Packer M, Bristow MR, Cohn JN, *et al.* The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure: US Carvedilol Heart Failure Study Group [J]. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349 - 1355.
- [23] Yue TL, Cheng HY, Lysko PG. *et al.* Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 92 - 98.
- [24] Dandona, P. Karne, R. Ghanim, *et al.* Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation* 2000; 101: 122 - 124.
- [25] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest* 2005; 115: 500 - 508.
- [26] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86: 494 - 501.
- [27] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271: C1424 - C1437.
- [28] Ghosh MC, Wang X, Li S, *et al.* Regulation of calcineurin by oxidative stress [J]. *Methods Enzymol*. 2003, 366: 289 - 304.
- [29] G YB, Su B, Sah VP, *et al.* Cardiac Hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun HN2 - terminal kinase in ventricular cells [J]. *J Biol Chem*. 1998, 273(10): 5423.
- [30] Ghosh MC, Wang X, Li S, *et al.* Regulation of calcineurin by oxidative stress [J]. *Methods Enzymol*. 2003, 366: 289 - 304.
- [31] W, Zou Y, Shiojima L, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardio myocyte hypertrophy [J]. *J Biol Chem*. 2000, 275.
- [32] Rdano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 500 - 508.

[修回日期]2015-04-08