

## · 论著 ·

## 眼镜蛇毒因子抑制补体激活对创伤失血性休克大鼠血浆内毒素含量的影响

魏永军 王瑞兰 李国平

**【摘要】** 目的 观察眼镜蛇毒因子(CVF)抑制补体激活对创伤失血性休克大鼠血浆内毒素含量的影响。方法 80 只雄性 SD 大鼠随机分成对照组和 CVF 组。建立创伤失血性休克模型,于休克前及复苏后 1、6 和 24 h 取血,检测血浆内毒素(LPS)、血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量及血清二胺氧化酶(DAO)和总补体活性(CH50)。结果 对照组大鼠复苏后 1 h 血 CH50 水平迅速下降,血 LPS、TNF- $\alpha$  水平均明显升高,随后均快速恢复至休克前水平;DAO 活性在复苏后 1 h 和 6 h 明显升高,然后快速下降。CVF 组大鼠除 CH50 水平始终 $<5\%$ ,其余各指标复苏后 1 h 仅略升高,复苏后各时间点均较对照组相应时间点明显降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论 在创伤失血性休克中使用补体抑制剂 CVF 可明显减轻补体激活导致的肠道损伤及肠屏障破坏,减少 LPS 移位的发生,明显降低血浆 LPS 含量。

**【关键词】** 创伤; 休克,失血性; 补体; 内毒素; 眼镜蛇毒因子; 内毒素移位

**Influence on the concentration of plasma endotoxin by inhibition of complement activation in traumatic hemorrhagic shock rats** WEI Yong-jun, WANG Rui-lan, LI Guo-ping. Emergency Department, The Second Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, Jiangxi, China  
Corresponding author: WANG Rui-lan (Email: wangyusun@hotmail.com)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the influence on the concentration of plasma endotoxin by inhibition of complement activation in traumatic hemorrhagic shock rats. **Methods** Eighty male SD rats were randomly divided into two groups: control and cobra venom factor (CVF) treatment groups. The hemorrhagic shock induced by trauma was replicated in both groups. The animals were killed preshock and at 1, 6, and 24 hours postresuscitation. Twenty-four hours before hemorrhage, rats were given a mainline dose of either 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  CVF or an equal volume of saline solution. The plasma and serum samples were collected at each time point to determine the concentration of endotoxin, the activity of CH50 and diamine oxidase (DAO), and the level of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) at various time points in two groups. **Results** Compared with preshock in control group, serum CH50 levels were decreased promptly at 1 hour postresuscitation. Markedly elevation of the levels of endotoxin and TNF- $\alpha$  in blood were found at early time after resuscitation, and they were come rapidly back to the basic level at 6 and 24 hours phase. The activity of DAO in blood was increased significantly at 1 and 6 hours after resuscitation and declined promptly at 24 hours. Compared with the control group, significantly decline of the levels of endotoxin, TNF- $\alpha$  and DAO at the various time points after resuscitation were also found in the CVF group. The levels of CH50 in CVF group were always less than 5% during the experiment. **Conclusion** In traumatic hemorrhagic shock rats CVF pretreatment could decline plasma endotoxin levels by preventing the injury of intestine and gut barrier function, decrease endotoxin translocation and reduce plasma endotoxin levels.

**【Key words】** trauma; hemorrhagic shock; complement; endotoxin; cobra venom factor; endotoxin translocation

严重创伤、烧伤、休克、缺血/再灌注损伤等应激状态下发生的脓毒症(sepsis)及随后的多器官功能障碍综合征(MODS)与肠道细菌和内毒素(LPS)移位所致肠源性感染密切相关<sup>[1]</sup>。补体激活可能是创伤或大量失血复苏后并发症发生的关键环节之一。

Fruchterman 等<sup>[2]</sup>研究发现,使用补体抑制剂可溶性补体受体 1 型(sCR1),可以减轻大鼠失血/复苏时对肠道的损伤,减少并发症的发生。补体抑制剂眼镜蛇毒因子(CVF)是来源于眼镜蛇毒、性质稳定的补体蛋白,作为旁路补体激活物,能够使 C3 和 C5 不断激活直至耗竭。因此,CVF 常被作为探索补体在疾病发生、发展中作用的工具药。本实验中使用 CVF 预先清除大鼠体内补体,进一步观察抑制补体激活对创伤所致失血性休克大鼠血浆 LPS 含量的影响。

基金项目:江西省自然科学基金资助项目(0440083)

作者单位:330006 南昌,南昌大学第二附属医院急诊科

通讯作者:王瑞兰,硕士研究生导师,博士研究生,副教授,副主任医师(Email:wangyusun@hotmail.com)

作者简介:魏永军(1976-),男(汉族),山东滕州人,医学硕士,医师。

1 材料与方法

1.1 动物分组:健康雄性 SD 大鼠 80 只,购于江西医学院,体重 250~300 g。完全随机法分为对照组(40 只)和 CVF 组(40 只)。根据观察时间的不同各组再分为休克前(插管后、创伤及放血前),复苏后 1、6 和 24 h 4 个亚组,每个亚组 10 只。两组均复制创伤所致失血性休克动物模型, CVF 组于创伤前 24 h 从大鼠阴茎背静脉注射 CVF 50 μg/kg, 对照组给予等量生理盐水。

1.2 创伤失血性休克动物模型制备:大鼠用质量分数为 20% 的乌拉坦 1.0 g/kg 腹腔注射麻醉,股动脉插管用于监测血压及放血,颈外静脉插管用于回输血液和补液。用钳夹方法致对侧股骨中下 1/3 段闭合性骨折,骨折后 5 min 立即经股动脉快速放血约 10 min,使平均动脉压(MAP)降至 30~35 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa),维持 60 min,然后回输全部失血及等量乳酸林格液复苏 30 min,撤除插管,关闭切口。在实验中,动物被肝素化(100 U/kg,插管后由动脉注入)。于相应时间点麻醉及无菌条件下分别留取门静脉、下腔静脉血标本。将门静脉血分离血浆,封入无热原安瓿中;下腔静脉血分离血清;均贮存于-70 °C 冰箱中待测。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 血浆 LPS 含量:采用改良过氯酸预处理血浆、基质显色法鲎实验定量测定法<sup>[3]</sup>,单位用每升中内毒素单位(EU)表示;试剂为瑞典 Chromogenix 公司及日本生化工业株式会社产品。

1.3.2 血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量:采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定,试剂盒由晶美生物工程公司提供,按说明书操作。

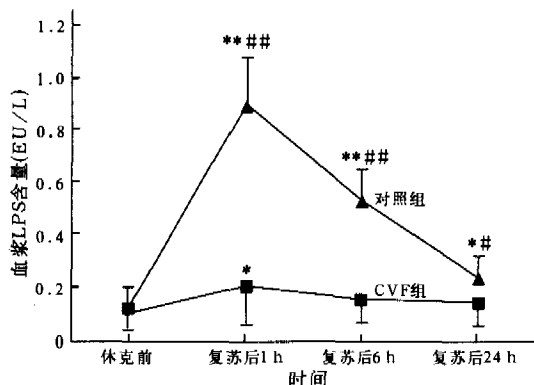
1.3.3 血清二胺氧化酶(DAO)活性和总补体活性(CH50):分别采用 CH50 法和分光光度法测定。

1.4 统计学方法:数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用两独立样本 *t* 检验以及相关分析方法, *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 LPS 含量的变化(图 1):对照组休克复苏后各时间点血浆 LPS 水平均明显高于休克前,复苏后 1 h 达峰值,并逐渐下降(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。创伤失血性休克前给予 CVF 预处理后,血浆 LPS 水平较对照组同时时间点均显著下降(*P*<0.05 或 *P*<0.01),除复苏后 1 h 血浆 LPS 水平较休克前明显增高(*P*<0.05)外,其余各时间点与休克前比较

差异均无显著性。

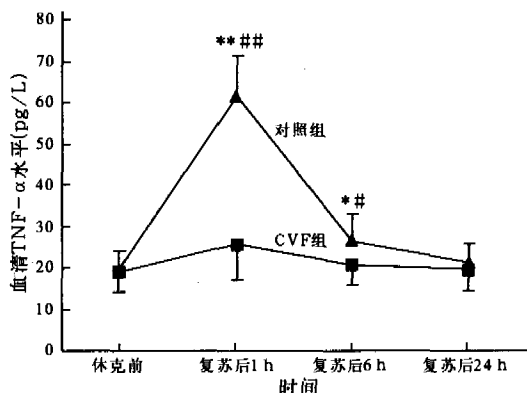


注:与本组休克前比较: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; 与 CVF 组比较: #*P*<0.05, ##*P*<0.01

图 1 两组血浆 LPS 含量的比较

Figure 1 Comparison of endotoxin level between two groups

2.2 TNF-α 水平变化(图 2):对照组血清 TNF-α 水平于复苏后明显升高,以复苏后 1 h 最为明显,约为休克前的 3.1 倍(*P*<0.01)。予 CVF 后血清 TNF-α 峰值明显下降,但仍明显高于休克前值(*P*=0.053)。复苏 1 h 后两组血清 TNF-α 浓度均快速下降至基础水平,但对照组复苏 6 h TNF-α 水平与休克前比较,差异仍具有显著性(*P*<0.05)。



注:与本组休克前比较: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; 与 CVF 组比较: #*P*<0.05, ##*P*<0.01

图 2 两组血清 TNF-α 水平的比较

Figure 2 Comparison of serum TNF-α level between two groups

2.3 血清 CH50 变化(表 1):休克复苏后 1 h 对照组血清 CH50 较休克前明显下降(*P*<0.01),复苏后 6 h 虽有回升,但仍较休克前下降(*P*<0.01),至复苏后 24 h 接近休克前水平。而 CVF 组在实验各时间点血清 CH50 均显著降低,达到 5% 以下。

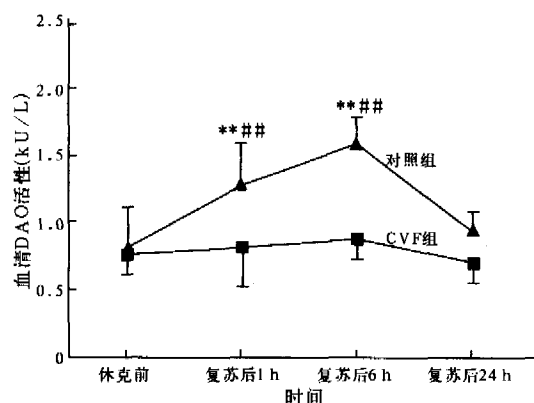
2.4 血清 DAO 活性变化(图 3):对照组大鼠血清 DAO 活性在休克复苏后 1 h 明显升高(*P*<0.01),6 h 达高峰,随后快速降至伤前水平。CVF 组复苏后虽也有升高,但其升高趋势不如对照组明显,两组复

表 1 两组 CH50 比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 1 Comparison of CH50 between two groups( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	休克前	复苏后 1 h	复苏后 6 h	复苏后 24 h
对照组	(100.00±0.00)% <sup>##</sup>	(61.76±11.84)% <sup>****</sup>	(84.38±8.64)% <sup>****</sup>	(95.14±7.02)% <sup>****</sup>
CVF 组	(3.76±1.21)%	(4.08±1.58)%	(3.27±1.43)%	(4.59±1.79)%

注:与本组休克前比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 CVF 组比较: ## $P < 0.01$

苏 1 h 和 6 h 比较,差异均有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。



注:与本组休克前比较: \* $P < 0.01$ ;与 CVF 组比较: ## $P < 0.01$

图 3 两组血清 DAO 活性的比较

Figure 3 Comparison of serum DAO activity between two groups

2.5 相关性分析显示:对照组大鼠血浆 LPS 与血清 DAO 活性和血清 TNF- $\alpha$  水平均呈明显正相关( $r_1=0.602, r_2=0.804; P$  均  $< 0.01$ ),与血清 CH50 呈明显负相关( $r=-0.580, P < 0.01$ );CVF 组血浆 LPS 与血清 DAO 活性呈明显正相关( $r=0.321, P < 0.05$ ),与血清 TNF- $\alpha$  水平呈明显正相关( $r=0.440, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

补体系统是由 20 多种蛋白组成的复杂的、完整的网络体系,是机体早期防御系统的一个关键成分。创伤后补体激活有助于协调创伤早期炎症反应;补体激活程度、持续时间与创伤严重程度、随后的多器官功能衰竭(MOF)形成及可能的致命性结果密切相关<sup>[4]</sup>。研究认为,创伤休克患者发生“渗漏”的肠道可能是脓毒症和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)发生的重要作用因素<sup>[5]</sup>。研究发现,使用 sCR1 抑制过敏毒素的产生,可减轻大鼠失血/复苏对肠道的损伤,减少随后严重并发症的发生<sup>[2]</sup>。Younger 等<sup>[6]</sup>也发现,在失血性休克中用 CVF 预先耗竭补体,可改善由于补体激活所致的破坏性作用。本实验中采用 DAO 作为反映肠黏膜上皮细胞损伤及肠屏障结构破坏的监测指标,研究结果显示,与对照组比较, CVF 组大鼠在创伤失血性休克后,伴随着肠道损伤的明显减轻(DAO 活性无明显升高),血浆 LPS 浓度也显著减

少;相关分析发现 CH50 与血浆 LPS 呈明显负相关,血清 DAO 活性与血浆 LPS 浓度呈明显正相关,提示在创伤失血性休克中,补体激活可能通过损伤肠道使内毒素移位而导致血浆 LPS 水平升高。这与 Radke 和 Khorrarn-Sefat 等<sup>[7,8]</sup>的研究结果一致。

TNF- $\alpha$  在创伤后 MODS 的发病机制中可能具有重要作用。本研究结果显示,复苏后对照组血清 TNF- $\alpha$  明显升高,尤其在复苏后 1 h 升高更为明显,且血浆 LPS 与血清 TNF- $\alpha$  呈协同性上升,这与 LPS 被认为是 TNF 产生的一个潜在刺激因子的观点<sup>[9]</sup>一致。研究显示, C5a 可诱导和加强 TNF- $\alpha$  从巨噬细胞和单核细胞中释放<sup>[10]</sup>。Wada 等<sup>[11]</sup>发现,给予大鼠抗 C5 单克隆抗体(18A)治疗,可明显减少缺血/再灌注后肠组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达。本实验中 CVF 组血清 TNF- $\alpha$  峰值较对照组明显降低, CH50 与血清 TNF- $\alpha$  呈明显负相关,表明在创伤失血性休克中补体激活与 TNF- $\alpha$  升高可能存在直接的诱生关系。

脓毒症是创伤失血性休克后的严重并发症,也是引起患者死亡的主要原因之一<sup>[9]</sup>。其中, LPS 是革兰阴性菌细胞壁的脂多糖成分,与严重创伤后一系列感染并发症密切相关,是脓毒症时机体主要的致病因子。在鼠盲肠结扎穿孔模型中发现,使用 C5a 抑制剂可减轻肠道损伤,减少细菌和内毒素移位,避免了脓毒症和内毒素血症的致命作用<sup>[12]</sup>。Mizuno 等<sup>[13]</sup>也发现,用 CVF 或 C5a 受体拮抗剂预处理过的大鼠,可避免随后静脉注射 LPS 预激而引起的致命性休克,表明 C5a 在脓毒症和内毒素血症的早期具有关键作用,也提示 C5a 对 LPS 的毒性作用可能通过某种机制具有放大效应。Liu 等<sup>[14]</sup>在 LPS 诱导的致命性大鼠内毒素血症中使用补体抑制剂 C1-Inh 也证实了这种保护作用,认为这可能与减少 C5a 的生成和阻止 LPS 与巨噬细胞结合,下调 TNF- $\alpha$  mRNA 表达有关。提示本实验中补体抑制剂对创伤失血性休克大鼠预后的改善作用可能一方面与其抑制补体激活、减少促炎介质的产生有关;另一方面,还与其阻止 LPS 与巨噬细胞结合,进而阻止巨噬细胞表达 TNF- $\alpha$  mRNA 有关。如何有效控

制创伤失血性休克应激状态下引起的严重并发症对创伤的救治,具有重要的临床意义,补体抑制剂所取得的明显有益作用为临床救治危重创伤提供了一个新的思路与方法。

#### 参考文献:

- 姚咏明,于燕,盛志勇,等.创伤后内毒素血症与脏器损害关系及其防治新方法的系列研究[J].中国危重病急救医学,1998,10:134-139.
- Fruchterman T M, Spin D A, Wilson M A, et al. Complement inhibition prevents gut ischemia and endothelial cell dysfunction after hemorrhage/resuscitation [J]. Surgery, 1998, 124: 782-792.
- 姚咏明,田惠民,王亚平,等.过氧酸新法预处理血浆定量检测微量内毒素的萤光实验方法及其应用[J].上海医学检验杂志,1993,8:31-33.
- Roumen R M H, Redl H, Schlag G, et al. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma[J]. Crit Care Med, 1995, 23: 474-480.
- Pastores S M, Katz D P, Kretan V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome[J]. Am J Gastroenterol, 1996, 91: 1697-1710.
- Younger J G, Sasaki N, Waite M D, et al. Detrimental effects of complement activation in hemorrhagic shock[J]. J Appl Physiol, 2001, 90: 441-446.
- Radke A, Mottaghy K, Goldmann C H, et al. C1-inhibitor prevents capillary leakage after thermal trauma [J]. Crit Care Med, 2000, 28: 3224-3232.
- Khorram-Sefat R, Goldmann C, Radke A, et al. The therapeutic effect of C1-inhibitor on gut-derived bacterial translocation after thermal injury [J]. Shock, 1998, 9: 101-108.
- 姚咏明,于燕,方文慧,等.创伤后内毒素增敏效应在多器官损害中的作用[J].中国危重病急救医学,1998,10:712-718.
- Arumugan T V, Shiels I A, Woodruff T M, et al. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestinal [J]. J Surg Res, 2002, 103: 260-267.
- Wada K, Montalto M C, Stahl G L. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat [J]. Gastroenterology, 2001, 120: 126-133.
- Czermak B, Sarma V, Pierson C, et al. Protective effects of C5a blockade in sepsis [J]. Nat Med, 1999, 5: 788-792.
- Mizuno M, Nishikawa K, Okada N, et al. Inhibition of a membrane complement regulatory protein by a monoclonal antibody induces acute lethal shock in rats primed with lipopolysaccharide [J]. J Immunol, 1999, 162: 5477-5482.
- Liu D, Cai S, Gu X, et al. C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide [J]. J Immunol, 2003, 171: 2594-2601.

(收稿日期:2005-07-10 修回日期:2006-01-15)

(本文编辑:李银平)

#### • 病例报告 •

## 肌肉注射盐酸山莨菪碱致过敏性休克 1 例

肖柏成 刁兴彬

【关键词】 山莨菪碱; 休克; 过敏性; 不良反应

盐酸山莨菪碱系抗胆碱药,能阻断 M 受体,使介质乙酰胆碱不能与受体结合,松弛气管和胃肠道平滑肌,并能改善机体循环。该药毒性较低,临床应用广泛,过敏反应报道较少。现将我院收治的因肌肉注射(肌注)盐酸山莨菪碱致过敏性休克 1 例患者的抢救经验报告如下。

### 1 病历简介

患者男性,32 岁,于 2005 年 8 月 28 日 11:00 出现上腹部持续性疼痛,伴恶心、呕吐(胃内容物)、腹泻(呈水样便,带少许黏液)及低热、乏力。直至 20:00 症状仍未见缓解,遂来我院就诊。入院

时查体:体温 38℃,脉搏 80 次/min,呼吸频率 20 次/min,血压 80/30 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)。急性面容,神清语明,查体合作,自动体位,心、肺无异常。上腹部压痛阳性,无反跳痛及肌紧张,墨菲征阴性,肝、脾未触及,肠鸣音亢进。实验室检查:血白细胞  $12 \times 10^9/L$ ;粪常规未见异常;腹部立位 X 线片未见异常;心电图检查大致正常;肝、胆、脾、胰腺彩色超声检查未见异常。血、尿淀粉酶(Somogyi 法)分别为 1 000 U/L 和 1 800 U/L。门诊拟诊为急性胃肠炎。立即肌注盐酸山莨菪碱 10 mg。约 5 min 后患者出现胸闷、心悸、气短,即而意识模糊、颜面苍白、四肢湿冷、口唇发绀、呼吸急促、脉搏细数;血压测不到,心率 140 次/min、律齐。立即予吸氧,肌注肾上腺素 1 mg,静脉推注地塞米松 10 mg,肌注异丙嗪 25 mg,多巴胺 100 mg 和间

羟胺 50 mg 加入质量分数为 5% 的葡萄糖 500 ml 中静脉滴注,约 30 min 后,患者四肢温暖,口唇转红,呼吸正常,血压 90/60 mm Hg,心率 90 次/min;2 h 后症状及体征趋于正常,随后观察 1 d 无其他异常症状出院。患者既往无药物过敏史,无家族史,期间未用其他任何药物,故认为是盐酸山莨菪碱致过敏性休克。

山莨菪碱为抗 M 受体胆碱药,广泛应用于胃肠道痉挛所致的绞痛、急性微循环障碍及有机磷农药中毒,常见不良反应为口干、面色潮红、轻度扩瞳、视物模糊,偶有心率加快及排尿困难等,但过敏反应的相关报道较少见。要注意用药前一定询问患者有无药物过敏史。医院应备有常规急救药品,便于抢救使用。

(收稿日期:2005-09-13)

修回日期:2006-02-20)

(本文编辑:李银平)

作者单位:153000 黑龙江省伊春林业中心医院内科(肖柏成);黑龙江省西林钢铁公司大西林铁矿职工医院(刁兴彬)

作者简介:肖柏成(1973-),男(汉族),黑龙江人,主治医师。