

血必净注射液对脓毒症大鼠血栓调节蛋白及内皮蛋白 C 受体基因表达的影响

李银平 乔佑杰 武子霞 钱芳芳 姚咏明 于燕 吴瑶

【摘要】目的 探讨血必净注射液对脓毒症大鼠血栓调节蛋白(TM)及内皮蛋白 C 受体(EPCR)基因表达的影响。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型。将 96 只健康 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组和血必净治疗组,后两组又按处死时间分为术后 2、8、24、48 和 72 h 亚组,每组 8 只。留取肝、肺组织,分别检查各组动物组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达。**结果** 正常对照组和假手术组肝、肺组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 有一定表达。CLP 后 2 h 肝、肺组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达无明显变化(P 均 >0.05),8~48 h 肝、肺组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达均有不同程度的增强(P 均 <0.01),至术后 72 h 基本恢复到术前水平(P 均 >0.05);与模型组比较,血必净治疗组 CLP 后 8 h 和 24 h 组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达均有不同程度下降,48 h 和 72 h 的基因表达有不同程度提高。**结论** 血必净注射液可以从基因水平影响脓毒症动物组织 TM 及 EPCR 的基因表达。

【关键词】 脓毒症; 血必净注射液; 血栓调节蛋白; 内皮蛋白 C 受体

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on thrombomodulin and endothelial cell protein C receptor in septic rats LI Yin-ping*, QIAO You-jie, WU Zi-xia, QIAN Fang-fang, YAO Yong-ming, YU Yan, WU Yao. * Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

【Abstract】Objective To investigate effects of the integrated traditional Chinese medicine Xuebijing injection (血必净注射液) on thrombomodulin (TM) and endothelial cell protein C receptor (EPCR) in septic rats. **Methods** Ninety-six healthy Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, sham operation group, cecal ligation and puncture (CLP) model group, and Xuebijing-treated group. Sepsis was reproduced by CLP. The two latter groups were divided into five subgroups of 2, 8, 24, 48 and 72-hour with 8 rats in each subgroup. Tissue samples from liver and lung were collected to determine tissue TM and EPCR mRNA expression. **Results** TM and EPCR mRNA expressions were observed in liver and lung in control group and sham operation group, while with no significant differences at 2 hours post-CLP (both $P > 0.05$). TM and EPCR gene expression levels in tissues were significantly increased to certain extent at 8-48 hours (all $P < 0.01$), and were dramatically decreased following Xuebijing injection at 72 hours post-CLP (both $P > 0.05$). Also, treatment with Xuebijing injection markedly decreased TM and EPCR mRNA levels to certain extents at 8 and 24 hours, and markedly increased at 48 and 72 hours compared with those of model group. **Conclusion** These data suggest that Xuebijing injection could raise TM and EPCR mRNA expression, thereby it might be effective in prevention of development of severe sepsis.

【Key words】 sepsis; Xuebijing injection; thrombomodulin; endothelial cell protein C receptor

脓毒症(sepsis)是由感染因素介导的全身炎症反应综合征(SIRS)。在严重创(烧)伤、感染及大手手术等应激情况下,外源性的细菌入侵或肠源性的细菌/内毒素移位,均可诱发和(或)加重脓毒症^[1]。脓

毒症以及继发的多器官功能障碍综合征(MODS)已成为导致危重患者死亡的主要原因。近年来大量动物及临床研究证实,蛋白 C(PC)系统的抗血栓形成、纤溶及抗炎特性,以及抗凋亡、保护内皮细胞、改善微循环、减缓器官功能障碍的作用,在严重脓毒症的发病机制中起着重要作用^[2]。PC 系统主要由 PC、蛋白 S(PS)、血栓调节蛋白(TM)、内皮蛋白 C 受体(EPCR)等组成,其中 TM、EPCR 对 PC 活化及生物活性的发挥具有重要的辅助作用,是 PC 系统的重要组成部分。因此本实验以 TM 和 EPCR 为研究指标,通过血必净注射液的干预作用,旨在了解和掌握腹腔感染脓毒症时 TM、EPCR 基因表达的变化

基金项目:天津市卫生局中西医结合科研资助项目(2005088)

作者单位:300050 天津市天和医院(李银平,乔佑杰);300193 天津中医药大学 2004 级硕士研究生(武子霞);518067 深圳蛇口人民医院(钱芳芳);100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所(姚咏明,于燕,吴瑶)

作者简介:李银平(1961-),女(汉族),湖北省人,研究员,硕士生导师,中国病理生理学会危重病医学分会委员,中国中西医结合学会急救医学专业委员会委员,天津市中西医结合学会急救专业委员会委员、青年委员会委员(Email:cccmm.23042150@yahoo.com.cn)。

特点及规律,以及运用血必净注射液干预后对其产生的影响,探讨血必净注射液在脓毒症防治方面的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及模型制备:清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 220~250 g,购自中国医学科学院实验动物中心。适应性饲养 1 周后按照 Chaudry 等^[3]报道的方法行大鼠盲肠结扎穿孔术(CLP),复制严重腹腔感染致脓毒症模型。动物术前称重、编号,并禁食 12 h,自由饮水。以盐酸氯胺酮注射液与速眠新 II 号注射液按体积比 8:3 混合,0.4 ml/kg 肌肉注射麻醉大鼠后固定,常规消毒,铺无菌巾。沿腹正中线作一长约 1.5 cm 的切口,暴露盲肠并于根部结扎,避免结扎回肠以及盲肠系膜血管,用 16 号穿刺针贯通穿刺盲肠 3 次形成肠痿,并留置一条宽 2.0 mm 的橡皮片以防针孔闭合。将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口,术毕立即皮下注射 10 ml 生理盐水抗休克,术后自由饮水。假手术组开腹翻动盲肠后关腹。

1.2 动物分组及给药:将 96 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组($n=8$)、假手术组($n=8$)、模型组($n=40$)和血必净治疗组($n=40$)4 组。血必净治疗组分别于 CLP 后 0.5、12、24、36、48 和 60 h 经静脉注射血必净注射液(天津红日药业股份有限公司生产),每次剂量 4 ml/kg,按照观察时间点再分为 CLP 后 2、8、24、48 和 72 h 组,每组 8 只动物;模型组依同法分组并平行注射等量生理盐水。

1.3 组织标本的采集与处理:所用器具均预先进行去 RNA 酶处理,手术台置酒精灯,整个过程在严格无菌条件下进行。动物复合麻醉后仰卧位固定,用体积分数为 2.5% 的碘酒消毒,铺无菌巾,沿腹正中线依次切开皮肤、腹壁,腹主动脉放血处死动物。依次摘除肝、肺组织,剪成小块后置于无菌、无酶、深低温冻存管中,于液氮中快速冰冻保存备用。

1.4 组织基因表达检测方法:取肝、肺组织各约 100 mg,以异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对转录产物进行扩增,扩增产物经质量分数为 2% 的

琼脂糖凝胶电泳后照相。电泳结果采用计算机图像分析系统(Gel-pro)进行扫描,以灰度值表示电泳带的强度。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照,大鼠 GAPDH 序列(扩增片段 309 bp)^[4] 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'(正义链),5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'(反义链);大鼠 TM 序列(扩增片段 317 bp)5'-TCC CTG TTC TGG AGG ACT CAG-3'(正义链),5'-GCC ACC TTG GTC TCT GGA GTA-3'(反义链);大鼠 EPCR 序列(扩增片段 341 bp)5'-CGA CGT GGT CTT TCC TCT GAC-3'(正义链),5'-TCA GGA TAC CCA GGA CCA GTG-3'(反义链)。

1.5 统计学方法:应用 SPSS12.0 统计软件包,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 t 检验和方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血必净注射液对脓毒症大鼠肝、肺组织 TM mRNA 表达的影响(表 1):正常对照组和假手术组大鼠肝、肺组织有一定的 TM mRNA 表达。CLP 后 2 h 肝、肺组织 TM mRNA 表达无明显变化(P 均 >0.05);伤后 8 h 肝、肺组织 TM mRNA 表达显著上调,24 h 达高峰,且持续至伤后 48 h(P 均 <0.01),至伤后 72 h 基本恢复到术前水平。与正常对照组比较,血必净治疗组肝组织 TM mRNA 表达于 CLP 后 8 h 显著增强,肝、肺组织 TM mRNA 表达于术后 24 h 进一步增高,48 h 达高峰(P 均 <0.01);其中肝组织 TM mRNA 表达于伤后 8 h 略低于模型组,但差异无显著性($P>0.05$),伤后 24 h 明显低于模型组($P<0.05$);而肺组织 TM mRNA 表达于术后 8 h 和 24 h 显著低于模型组,至 CLP 后 48 h 和 72 h 明显高于模型组($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。

2.2 血必净注射液对脓毒症大鼠肝、肺组织 EPCR mRNA 表达的影响(表 2):正常对照组和假手术组大鼠肝、肺组织有一定量的 EPCR mRNA 表达。CLP 后 2 h 肝、肺组织 EPCR mRNA 表达开始增高,但与伤前比较差异无显著性(P 均 >0.05);CLP

表 1 血必净注射液对脓毒症大鼠肝、肺组织 TM mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Xuebijing injection on TM mRNA in liver and lung tissues of septic rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

标本来源	组别	2 h	8 h	24 h	48 h	72 h
肝组织 TM mRNA(灰度值)	模型组	0.478±0.058	0.619±0.112**	0.690±0.092**	0.597±0.063**	0.475±0.066
	血必净治疗组	0.483±0.072	0.561±0.054**	0.584±0.101**#	0.660±0.078**	0.495±0.085
肺组织 TM mRNA(灰度值)	模型组	0.214±0.072	0.342±0.059**	0.477±0.082**	0.362±0.070**	0.237±0.053
	血必净治疗组	0.213±0.047	0.229±0.036**	0.338±0.045***	0.438±0.073***	0.351±0.064***

注:正常对照组肝组织 TM mRNA 为 0.436±0.087,肺组织 TM mRNA 为 0.232±0.048;假手术组肝组织 TM mRNA 为 0.480±0.078,肺组织 TM mRNA 为 0.225±0.065;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:# $P<0.05$,*** $P<0.01$

表 2 血必净注射液对脓毒症大鼠肝、肺组织 EPCR mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Effect of Xuebijing injection on EPCR mRNA expression in liver and lung tissues of septic rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

标本来源	组别	2 h	8 h	24 h	48 h	72 h
肝组织 EPCR mRNA(灰度值)	模型组	0.296±0.056	0.487±0.076**	0.595±0.067**	0.356±0.075**	0.236±0.072
	血必净治疗组	0.248±0.075	0.294±0.070##	0.483±0.087**##	0.437±0.076**##	0.253±0.084
肺组织 EPCR mRNA(灰度值)	模型组	0.239±0.058	0.351±0.061**	0.461±0.096**	0.318±0.075**	0.228±0.028
	血必净治疗组	0.238±0.046	0.251±0.059##	0.338±0.044**##	0.342±0.060**	0.214±0.072

注:正常对照组肝组织 EPCR mRNA 为 0.243±0.058,肺组织 EPCR mRNA 为 0.205±0.046,假手术组肝组织 EPCR mRNA 为 0.267±0.035,肺组织 EPCR mRNA 为 0.226±0.056;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:## $P<0.05$,### $P<0.01$

后 8 h 肝、肺组织 EPCR mRNA 表达显著上调,24 h 达高峰,伤后 48 h 有所下降,但仍显著高于正常对照组(P 均 <0.01)。血必净注射液治疗可延缓伤后 EPCR mRNA 表达上调时间,CLP 后 2 h 和 8 h 肝、肺组织 EPCR mRNA 表达与正常对照组比较差异无显著性(P 均 >0.05),伤后 24 h 和 48 h 肝、肺组织 EPCR mRNA 表达明显增加(P 均 <0.01);术后 8 h 和 24 h 肝、肺组织 EPCR mRNA 表达明显低于模型组(P 均 <0.01),而 48 h 肝组织 EPCR mRNA 表达显著高于模型组($P<0.05$),伤后 72 h 各组均恢复至术前水平(P 均 >0.05)。

3 讨论

近年来,随着对脓毒症发病机制研究的不断深入,人们认识到炎症、凝血与纤溶失衡以及内皮细胞损伤共同构成的内环境紊乱是脓毒症病情恶化和造成脓毒性休克、MODS 的根本原因^[5]。新近研究发现,PC 系统具有抗炎、抗凝、促纤溶及调节内皮细胞凋亡等多种生物学活性,是连接脓毒症失控性炎症反应与凝血紊乱的桥梁,在脓毒症发病机制中起重要作用。TM 及 EPCR 是 PC 系统的主要组成部分。

已证实 TM 是位于内皮细胞上的跨膜糖蛋白,对凝血酶激活 PC 起重要辅助作用。研究发现,TM 在凝血过程中具有抗凝和抗纤溶的双相作用,是连接凝血与抗凝途径联系的桥梁^[6]。TM 与凝血酶有高度亲和力,当形成 T-TM 后具有使凝血酶的促凝作用从促纤维蛋白形成和血小板活化转变为促 PC 活化,使 PC 激活率超过正常的 1 000 倍并抑制凝血酶激活血小板及内皮细胞的能力。细胞表面 TM 的表达受多种因素的影响,如炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、内毒素等可下调内皮细胞 TM mRNA 的表达,而凝血酶则可上调 TM mRNA 转录。内皮细胞受损或某些炎症介质能促使 TM 从血管内皮细胞脱落入血,成为可溶性 TM(sTM)片断,丧失其对 PC 的活化能力。

EPCR 是 PC 系统的新成员,可激活 PC 并介导其发挥多种生物学效应。EPCR 属 I 型跨膜蛋白,与

CD1/I 类主要组织相容性复合物(MHC I)有高度同源性,参与抗原呈递、激活 PC 等过程。已证实,EPCR 可以结合型 EPCR 和游离型 EPCR(sEPCR)两种形式存在,两种类型 EPCR 对 PC/活化蛋白 C(APC)都具有相同的亲和力,但介导 PC/APC 发挥的生物学效应却不同,sEPCR 可显著抑制 PC 活化及 APC 的抗凝活性^[7],而结合型 EPCR 可增强 PC/APC 的生物活性。结合型 EPCR 可将 PC 呈递给 T-TM 复合物,与 TM 协同作用以提高 PC 的活化效率。在体内,经 EPCR 调节后,PC 系统抗凝活性可提高近 10 倍^[8]。据报道,给 EPCR 转基因型鼠腹腔注射内毒素后,其血浆 APC 水平明显升高^[9]。结合型 EPCR 与 APC 结合后,在 APC 的抗炎及抗凋亡过程中发挥作用。EPCR 表达受多种因素的影响,体外观察证明,TNF- α 可显著降低内皮细胞 EPCR mRNA 表达^[10],并呈时间、剂量依赖性。内毒素和凝血酶可上调 EPCR mRNA 转录,但凝血酶与内皮细胞接触后,可通过 sEPCR 结合蛋白酶-3 介导 EPCR 从细胞表面脱落进入血循环成为 sEPCR。

现已明确,血必净注射液能有效拮抗内毒素,抑制内毒素诱导单核/巨噬细胞产生炎症介质,下调促炎介质水平,保护内皮细胞^[11]。血必净注射液单独使用或与抗生素联合应用可不同程度地降低内毒素血症小鼠的死亡率^[12]。本试验运用血必净注射液早期干预后发现,在肝、肺两个重要生命器官中,TM、EPCR 的 mRNA 表达规律基本相似。TM、EPCR 的 mRNA 在正常大鼠组织均有一定量表达,其中肝组织表达比肺组织要强,但基本变化趋势相似;CLP 后组织 TM、EPCR 的 mRNA 增加与代偿细胞表面 TM、EPCR 的损伤有关。血必净治疗组肝、肺组织 TM、EPCR 的 mRNA 表达上调延迟,伤后 24 h 低于模型组,至伤后 48 h 明显高于模型组。该结果显示,血必净注射液可降低脓毒症早期肝、肺组织 TM、EPCR 的 mRNA 表达增幅,上调脓毒症后期(术后 48 h)TM、EPCR 的 mRNA 表达,我们推测

这可能是由于血必净注射液通过对内皮细胞的保护作用^[11],降低膜结合型 TM、EPCR 的损伤,从而抑制脓毒症早期组织 TM、EPCR 的 mRNA 表达反应性上调;而后期该药物可促进 TM、EPCR 的 mRNA 表达增强,有利于脓毒症预后及机体康复。

综上所述,血必净注射液可以从基因水平影响脓毒症动物组织 TM 及 EPCR 的 mRNA 表达,可能是血必净注射液防治脓毒症的作用机制之一,但其具体机制有待进一步阐明。

参考文献:

- 1 Tados T, Traber D L, Heggers J P, et al. Effects of interleukin-1 α administration on intestinal ischemia and reperfusion injury, mucosal permeability, and bacterial translocation in burn and sepsis[J]. Ann Surg, 2003, 237(1):101-109.
- 2 武子霞, 李银平, 姚咏明. 活化蛋白 C 的生物学活性及其作用机制研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(3):182-185.
- 3 Chaudry I H, Wichterman K A, Baue A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. Surgery, 1979, 85(2):205-211.
- 4 Liu S, Adcock I M, Old R W, et al. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196(3):1208-1213.
- 5 Summer W R. Severe sepsis: new concepts in pathogenesis and management[J]. Am J Med Sci, 2004, 328(4):193-195.
- 6 Xu J, Esmon N L, Esmon C T. Reconstitution of the human endothelial cell protein C receptor with thrombomodulin in phosphatidylcholine vesicles enhances protein C activation [J]. J Biol Chem, 1999, 274(10):6704-6710.
- 7 Taylor F B Jr, Stearns-Kurosawa D J, Kurosawa S, et al. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against Escherichia coli sepsis[J]. Blood, 2000, 95(5):1680-1686.
- 8 Stearns-Kurosawa D J, Kurosawa S, Mollica J S, et al. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19):10212-10216.
- 9 Li W, Zheng X, Gu J, et al. Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(7):1351-1359.
- 10 Nan B, Lin P, Lumsden A B, et al. Effects of TNF- α and curcumin on the expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells [J]. Thromb Res, 2005, 115(5):417-426.
- 11 曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8):489-491.
- 12 王今达, 雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治——治疗重症脓毒症的新对策[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(6):323-325.

(收稿日期:2007-05-07)

(本文编辑:保健媛)

• 经验交流 •

236 例早期复极综合征患者的诊断分析

李娟 陆虹

【关键词】 早期复极综合征; 心电图; 运动试验; 动态心电图

早期复极综合征(ERS)的特征与某些器质性心脏病引起的心电图改变类似,临床上易误诊。分析 236 例 ERS 患者的心电图资料,报告如下。

1 临床资料

1.1 病例与方法:男 167 例,女 69 例;年龄 16~55 岁,平均 35.5 岁;心脏无阳性体征发现;X 线胸片未见心脏阴影扩大,无明显心脏器质性病变。全部患者进行常规心电图检查、运动试验和动态心电图(DCG)检查,符合 ERS 特征^[1]。

1.2 心电图检查结果:①236 例胸导联均有 ST 段抬高,其中以 V₃~V₅ 导联抬高最显著;肢体导联 ST 段抬高 169 例。②全部病例均出现 J 波,以 V₃~V₅ 导联最为常见而明显,J 点抬高改变程度与

ST 段抬高呈正相关。③胸导联 T 波振幅增高,且两支不对称,上升支缓慢,下降支较陡直。

1.3 分级活动平板运动试验结果:有 148 例进行试验,148 例显示 ST 段下降,休息后又恢复;15 例原有高大 T 波者在运动后振幅减低。

1.4 DCG 检查结果:167 例行 DCG 检查,结果:室性期前收缩(早搏)49 例,房性早搏 51 例,阵发性房性心动过速(房速)25 例,阵发性心房颤动(房颤)7 例,窦性停搏 3 例,短阵室性心动过速(室速)2 例,1 度房室传导阻滞 5 例。睡眠和休息时 J 点和 ST 段抬高明显,运动时恢复或消失。

2 讨论

ERS 心电图主要表现为以 J 点未回到基线的 ST 段抬高,故易与病理性 ST 段抬高相混淆,抬高的 ST 段在运动后回到等电位线对诊断 ERS 有利;一般认

为 ERS 心电图在运动试验后 10 min 内 ST 段可恢复到原始抬高状态。ERS 的存在并不影响运动所诱发的心肌缺血性 ST 段压低,故当 ERS 合并冠心病时,原来抬高的 ST 段会降低,可与单纯 ERS 鉴别,但应观察心电图动态变化,并结合病史、症状和体征全面分析,必要时参考血生化、心肌坏死标记物检查进行鉴别。

对 ERS 患者也不能一概而论为良性,需要结合临床表现及心电图的动态变化予以具体分析。若遇有下列情况,ERS 患者可能有较大的危险,应积极防治。①患者有不同原因的晕厥;②家族人员中有猝死史;③有频率依赖性的异常显著 J 波,ST 段抬高呈凸面向上、下斜形或鞍型,或随后 T 波倒置;④有多形性室性早搏或短阵室速;⑤钙通道阻滞剂可诱发 J 波增大和心律失常。

(收稿日期:2007-03-15)

(本文编辑:李银平)

作者单位:300192 天津市第一中心医院

作者简介:李娟(1960-),女(汉族),天津市人,主管技师。