

• 研究报告 •

血必净注射液对肺血栓栓塞大鼠肺血管内皮细胞 P-选择素的影响

沈华 徐英 秦海东 刘敏星 鲍磊 张铮

【摘要】 目的 观察大鼠肺血栓栓塞后肺血管内皮细胞 P-选择素、动脉血氧分压 (PaO_2) 的变化,探讨血必净注射液的治疗机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 105 只,按随机数字表法分为对照组、栓塞组和血必净组,每组 35 只。采用自体血栓回输法制备肺血栓栓塞症 (PTE) 模型,对照组注射 2 mL 生理盐水;血必净组于制模后每日腹腔注射血必净注射液 8 mL/kg,对照组和栓塞组给予等量生理盐水。各组分别于术后 1 h、3 h 及 1、3、7 d 取 7 只大鼠,留取股动脉血和肺组织。用血气分析仪测定 PaO_2 ;行苏木素-伊红 (HE) 染色后光镜下观察支气管-肺组织病理学改变;采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达。并对 PaO_2 与 P-选择素进行相关性分析。**结果** 对照组肺组织无明显改变, PaO_2 基本正常,肺血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达较低。栓塞组光镜下可见肺动脉血栓栓塞,炎症反应明显;血必净组病变程度有所减轻。栓塞组和血必净组术后 1 h 时 PaO_2 (mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa) 即较对照组明显下降 (62.7 ± 8.1 、 71.6 ± 6.5 比 82.2 ± 7.9 , $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),随后逐渐下降,至术后 1 d 达谷值 (46.8 ± 6.5 、 56.4 ± 6.8),之后逐渐升高,至术后 7 d 时仍明显低于对照组 (64.5 ± 5.0 、 73.4 ± 6.3 比 89.3 ± 4.9 , 均 $P < 0.01$);而血必净组 PaO_2 均较栓塞组明显升高 (均 $P < 0.05$)。栓塞组和血必净组术后 1 h 时 P-选择素蛋白表达 (灰度值) 即较对照组明显升高 (1.280 ± 0.013 、 1.120 ± 0.010 比 0.760 ± 0.011 , 均 $P < 0.01$),之后逐渐升高,至术后 1 d 达峰值 (1.870 ± 0.025 、 1.340 ± 0.017),随后逐渐降低,至术后 7 d 时仍明显高于对照组 (1.210 ± 0.012 、 0.990 ± 0.013 比 0.690 ± 0.014 , 均 $P < 0.01$);而血必净组 P-选择素蛋白表达均较栓塞组明显降低 (均 $P < 0.01$)。肺血栓栓塞后 1 h、3 h 时, PaO_2 与 P-选择素蛋白表达无相关性;1、3、7 d 时, PaO_2 与 P-选择素蛋白表达呈显著负相关 (1 d: $r = -0.942$, $P = 0.002$; 3 d: $r = -0.944$, $P = 0.001$; 7 d: $r = -0.958$, $P = 0.001$)。**结论** 在 PTE 早期,血必净注射液可能通过抑制肺血管内皮细胞 P-选择素表达,从而改善组织器官氧供,起到保护肺组织的作用。

【关键词】 血必净注射液; 肺血栓栓塞症; 内皮细胞; P-选择素; 动脉血氧分压; 大鼠

肺血栓栓塞症 (PTE) 的血栓一般来自静脉系统或右心,阻塞肺动脉及其分支,缺氧是其主要病理生理特征,临床表现为突发呼吸衰竭 (呼衰),动脉血氧分压 (PaO_2) 急剧下降,造成全身缺氧、器官功能衰竭,这不仅与栓子堵塞肺动脉对心脏、肺循环、肺实质及胸膜的直接作用有关,近年来发现广泛凝血-纤溶系统激活和炎症反应及其相互关系也是导致低氧的主要因素^[1-2]。P-选择素及其细胞黏附与血栓性疾病关系十分密切,在 PTE 发生发展过程中起主要作用。

血必净注射液主要由赤芍、川芎、丹参、红花、当归等活血化瘀药组成。大量研究表明,血必净具有抑制过度的炎症反应、减少组织细胞损害、改善循环组织灌注及凝血功能等功效^[3-4],在临床救治脓毒性休克^[5]、多器官功能障碍综合征 (MODS)^[6]、重症急性胰腺炎^[7]等危急重症患者中起重要作用,但应用于 PTE 的报道尚不多见。本研究通过观察血必净注射液对 PTE 模型大鼠 PaO_2 和肺血管内皮细胞 P-选择素表达的影响,探讨其保护作用的可能机制。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.017

基金项目:江苏省南京市医学科技发展项目 (YKK10104)

作者单位:210006 江苏,南京医科大学附属南京医院 (南京市第一医院) 急诊 ICU

通信作者:张铮, Email: zz18351891108@126.com

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组:健康清洁级雄性 SD 大鼠 105 只,鼠龄 57~78 d,体质量 280~320 g,由南京医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:0021771。按随机数字表法将大鼠分为对照组、栓塞组和血必净组 3 组。

1.2 PTE 动物模型制备及处理方法:取大鼠股静脉血制成 5~8 mm、直径 0.8 mm 的栓子备用。腹腔注射 5% 水合氯醛麻醉大鼠,行颈部正中切口,分离右颈总静脉留置静脉针,缓慢推注混有 12 个血栓的生理盐水 2 mL。注入血栓后可见大鼠明显发绀、呼吸加快,注射完毕拔出留置针,压迫止血后逐层缝合。麻醉意外和中途死亡大鼠剔除本实验。对照组仅行颈部切口,由右颈总静脉注入 2 mL 生理盐水。血必净组于制模成功后每日腹腔注射血必净注射液 8 mL/kg,对照组和栓塞组给予等量生理盐水。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 标本采集:各组分别于术后 1 h、3 h 和 1、3、7 d 取 7 只大鼠,右股动脉取血进行血气分析;开胸取右肺,置于 10% 甲醛中固定,用于病理学观察;左肺中下叶置于液氮中冷却, -70℃ 冰箱保存待测肺血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达。

1.3.2 支气管-肺组织病理学观察:将固定好的右肺组织经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,包埋、切片,37℃温箱中干燥,二甲苯脱蜡,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察支气管-肺组织病理学变化。

1.3.3 PaO₂测定:应用血气分析仪测定 PaO₂。

1.3.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达:取冻存的左肺下叶组织进行匀浆、离心,取等量上清缓冲液于试管中冷却。经电泳、转膜、封闭后加入适量一抗、二抗孵育,洗膜、室温放置、胶片曝光、显影、洗像后,用 Quantity One 软件进行分析,以对照组条带灰度定为基础值,各组条带灰度值与其比值作为 P-选择素相对表达量。

1.4 统计学处理:实验数据采用 Stata 9.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析检验各组间方差齐性,方差齐者组间两两比较采用 *t* 检验;相关性分析采用 Pearson 等级相关法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支气管-肺组织病理学改变(图1):对照组肉眼和光镜下观察肺组织未见异常。栓塞组各时间点肉眼可见双肺充血肿胀,表面散在点片状出血点;光镜下可见多处肺动脉血栓栓塞,有大量渗出及红细胞浸润。血必净组病变程度较栓塞组有所减轻。

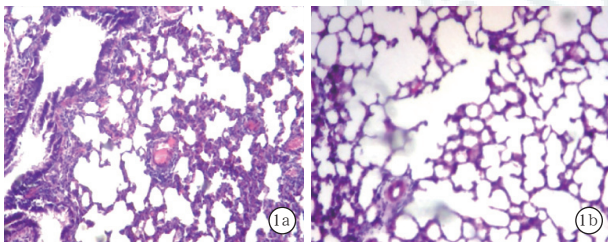


图1 光镜下观察各组大鼠术后3 d时支气管-肺组织病理学改变 自体血栓回输制备肺栓塞模型组(a)多处肺动脉血栓栓塞,血栓表面粗糙、着色不均,肺泡萎陷、有大量渗出及红细胞浸润,肺泡壁及间质内大量炎性细胞浸润(以中性粒细胞、单核细胞为主);血必净组(b)病变程度有所减轻 HE 低倍放大

2.2 PaO₂(表1):对照组各时间点 PaO₂ 基本正常。栓塞组和血必净组术后1 h PaO₂ 即较对照组明显下降,1 d时达谷值后逐渐升高,7 d时仍显著低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);但血必净组各时间点 PaO₂ 明显高于栓塞组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表2 3组大鼠术后各时间点血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	P-选择素蛋白表达(灰度值)				
		术后1 h	术后3 h	术后1 d	术后3 d	术后7 d
对照组	7	0.760 ± 0.011	0.740 ± 0.013	0.770 ± 0.021	0.750 ± 0.011	0.690 ± 0.014
栓塞组	7	1.280 ± 0.013 ^a	1.420 ± 0.007 ^a	1.870 ± 0.025 ^a	1.530 ± 0.017 ^a	1.210 ± 0.012 ^a
血必净组	7	1.120 ± 0.010 ^{ab}	1.210 ± 0.018 ^{ab}	1.340 ± 0.017 ^{ab}	1.190 ± 0.010 ^{ab}	0.990 ± 0.013 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与栓塞组比较,^b $P < 0.01$

表1 3组大鼠术后各时间点 PaO₂ 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	PaO ₂ (mmHg)				
		术后1 h	术后3 h	术后1 d	术后3 d	术后7 d
对照组	7	82.2 ± 7.9	87.6 ± 6.7	88.2 ± 8.3	86.4 ± 5.6	89.3 ± 4.9
栓塞组	7	62.7 ± 8.1 ^a	51.3 ± 9.2 ^a	46.8 ± 6.5 ^a	59.6 ± 5.7 ^a	64.5 ± 5.0 ^a
血必净组	7	71.6 ± 6.5 ^{bc}	67.3 ± 7.1 ^{ad}	56.4 ± 6.8 ^{ac}	65.7 ± 4.7 ^{ac}	73.4 ± 6.3 ^{ac}

注:PaO₂为动脉血氧分压;1 mmHg = 0.133 kPa;与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与栓塞组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

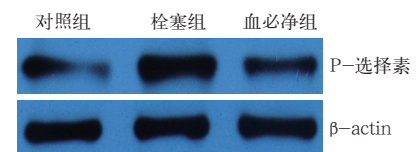
2.3 肺血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达(表2;图2):对照组各时间点 P-选择素蛋白表达均较低。栓塞组和血必净组术后1 h P-选择素蛋白表达即明显高于对照组,随后逐渐增高,至1 d达峰值后逐渐下降,7 d时仍显著高于对照组(均 $P < 0.01$);但血必净组各时间点 P-选择素蛋白表达明显低于栓塞组(均 $P < 0.01$)。

2.4 PaO₂与 P-选择素蛋白表达的相关性:肺栓塞后1 h、3 h时,PaO₂与 P-选择素蛋白表达无相关性($r = -0.534$, $P = 0.410$; $r = -0.613$, $P = 0.380$);1、3、7 d时,PaO₂与 P-选择素蛋白表达水平呈显著负相关($r = -0.942$, $P = 0.002$; $r = -0.944$, $P = 0.001$; $r = -0.958$, $P = 0.001$)。

3 讨论

本实验通过大鼠自体血栓回输法制备肺栓塞模型,且病理证明大鼠 PTE 模型制备成功。有实验证实,自体血栓回输法制备的 PTE 动物模型肺动脉压明显升高,而体动脉压在制模后明显下降,肺灌注/通气扫描(ECT)显像可见两肺明显放射性缺损和稀疏,表明以自体血栓作为栓子能很好地模拟 PTE 的自然发病过程^[8]。既往制作的 PTE 动物模型栓子有血凝块、明胶海绵、玻璃体球状物、 α_2 凝血酶、胶原蛋白等多种,但由于自体血栓和临床肺栓塞血栓的形成有一定相似性,目前普遍认为较为理想的栓子仍然是自体血栓。

基础及临床研究表明,PTE 中血栓形成是血管内皮细胞受损、血小板激活、抗凝和纤溶系统相关因子发生变化等多种因素综合作用的结果^[9]。作为选择素家族的重要成员之一,P-选择素在创伤性休克、MODS 早期即显著升高^[10-11],并与急性脑梗死的发生显著相关^[12-13],提示 P-选择素可能在危重病时介导了血栓形成。活化的血小板和内皮细胞中 P-选择素高表达,介导了细胞之间的相互黏附。在血栓性疾病和炎症等情况下,血小板 α 颗粒和内皮细胞的棒状小体与细胞膜迅速融合,使 P-选择素在细胞膜表面大量并持久表达^[14-15]。Chirinos 等^[16]发现,P-选择素与 P-选择素糖蛋白配体1(PSGL-1)的黏附导致了血小板、内皮细胞与白



注: β -actin 为 β -肌动蛋白

图2 蛋白质免疫印迹试验检测各组大鼠术后3 d时肺血管内皮细胞 P-选择素蛋白表达

细胞的相互作用,从而促进血栓和炎症网络的形成。Chu^[17]的研究也发现,活化的血小板高表达 P- 选择素,与白细胞相互作用后可促使其表达组织因子(TF),TF 与 F VII a 结合形成 F VII a/TF 复合物,经过级联反应最终活化凝血酶原为凝血酶,促使纤维蛋白原相互聚合,启动血栓形成。有研究表明,经 PSGL-1 或 P- 选择素基因剔除处理后的小鼠,其血栓形成明显减少^[18-19];经过 P- 选择素单克隆抗体阻断 P- 选择素形成,可加速链激酶的溶栓速度^[20],并且静脉血栓形成显著减少^[21]。国内学者发现,细胞间黏附分子-1 与 P- 选择素参与了 PTE 的发病过程^[22];大鼠发生 PTE 时,肺动脉血管内皮细胞 P- 选择素在基因和蛋白表达水平均较对照组增高^[23];临床试验也证实,PTE 患者 P- 选择素和 TF 水平均显著升高,二者共同参与了肺栓塞的炎症反应和血栓形成的过程^[24]。本实验也发现,PTE 发生后大鼠肺血管内皮细胞 P- 选择素蛋白表达均较对照组明显升高,术后 7 d 仍持续高表达;同时发现 P- 选择素蛋白表达在术后 1、3、7 d 时与 PaO₂ 呈显著负相关,提示 P- 选择素蛋白水平的下降有助于改善氧合,在组织器官缺氧保护中具有一定作用。因此,有效抑制 P- 选择素蛋白的高表达,从而达到改善组织器官氧供的目的,是临床治疗 PTE 的有效途径。

血必净注射液作为一种活血化瘀的中药复合制剂,具有抗黏附、抗血小板、清除氧自由基、抗炎以及免疫调节作用,在临床救治凝血功能障碍患者中起重要作用^[5,25-26]。陈立等^[27]研究发现,血必净注射液能够显著降低肺栓塞兔肺组织炎性细胞浸润程度,减小梗死面积。陈旭峰等^[28]通过建立家兔 PTE 模型发现,血必净组 PaO₂ 较对照组明显好转,病理损伤程度减轻。本实验结果也发现,血必净组各时间点大鼠 P- 选择素蛋白表达水平均明显低于栓塞组,PaO₂ 较栓塞组升高,肺组织病理损伤减轻。

综上所述,血必净注射液在肺血栓栓塞早期可能通过抑制 P- 选择素的高表达,阻断活化血小板、内皮细胞与白细胞的相互黏附聚集,切断血栓和炎症网络的形成,减轻凝血纤溶失衡和过度炎症反应对肺组织的损害,提高器官组织氧供,从而达到保护肺组织的目的。

参考文献

- [1] Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis [J]. *Maturitas*, 2008, 61 (1-2): 122-131.
- [2] Simoncini S, Njock MS, Robert S, et al. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation [J]. *Circ Res*, 2009, 104 (8): 943-951.
- [3] 邱俏檬,葛赞,孙未,等. 血必净注射液对硫化氢急性中毒大鼠肺组织氧化应激的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (3): 144-148.
- [4] 李鑫,马晓春. 血必净注射液对肾脏微血管内皮细胞发挥保护作用的机制探讨[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (2): 94-97.
- [5] 茅尧生,吕铁,孙雪东,等. 血必净注射液对脓毒性休克患者血流动力学和氧代谢的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19 (10): 627-628.
- [6] 邢静,王娜,张或. 血必净注射液对脓毒性多器官功能障碍综合征患者心功能及预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18 (6): 359-362.
- [7] 王晓,杨国红,张照兰,等. 血必净注射液治疗重症急性胰腺炎 25 例临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18 (6): 350-352.
- [8] 叶瑞海,陈少贤,王良兴,等. 急性自体血栓肺栓塞大鼠动物模型制备[J]. 温州医学院学报, 2006, 36 (4): 323-325.
- [9] Adams JE 3rd, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? [J]. *Circulation*, 1993, 88 (2): 750-763.
- [10] 林洪武,彭咏梅,叶祥燕,等. 创伤性休克患者血清 P- 选择素和一氧化氮酶的变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (9): 562.
- [11] 邢迎红,曹书华,崔克亮,等. 可溶性 P- 选择素及血栓调节蛋白在多器官功能障碍综合征早期诊断中的意义[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14 (8): 478-480.
- [12] 王宁群,李宗信,黄小波,等. 动脉粥样斑块稳定性与脑梗死急性期中证候及血清选择素和细胞间黏附分子的关系研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (2): 75-78.
- [13] 王蕾,田桂玲,李芳. 急性脑梗死患者血小板膜糖蛋白与血小板参数的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14 (3): 173-175.
- [14] Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86 (1): 214-221.
- [15] Geng JG. Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24 (12): 1297-1300.
- [16] Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45 (9): 1467-1471.
- [17] Chu AJ. Tissue factor upregulation drives a thrombosis-inflammation circuit in relation to cardiovascular complications [J]. *Cell Biochem Funct*, 2006, 24 (2): 173-192.
- [18] Sullivan VV, Hawley AE, Farris DM, et al. Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice [J]. *J Surg Res*, 2003, 109 (1): 1-7.
- [19] Myers D Jr, Farris D, Hawley A, et al. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis [J]. *J Surg Res*, 2002, 108 (2): 212-221.
- [20] Toombs CF, DeGraaf GL, Martin JP, et al. Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombolysis in a primate model of arterial thrombosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 275 (2): 941-949.
- [21] Downing LJ, Wakefield TW, Strieter RM, et al. Anti-P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis [J]. *J Vasc Surg*, 1997, 25 (5): 816-827.
- [22] 张建初,杨卫兵,夏蕾,等. 溶栓前后肺血栓栓塞症大鼠肺血管内皮细胞 ICAM-1 及 Ps 的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15 (4): 462-467.
- [23] 高岩,夏蕾,白明. 实验性大鼠肺血栓栓塞症中 ICAM-1, P- 选择素的变化及当归注射液的影响[J]. 中国微循环, 2007, 11 (3): 176-179.
- [24] 张鹏,艾力曼·马合木提,霍亚风,等. 肺血栓栓塞症患者 P 选择素和组织因子的表达及相关性[J]. 心血管康复医学杂志, 2011, 20 (1): 15-18.
- [25] 唐丽群,彭娜,潘志国,等. 血必净注射液对严重脓毒症患者凝血指标及预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (3): 132-136.
- [26] 邵敏,刘宝,王锦权,等. 脓毒症患者辅助性 T 细胞 17 和 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞表达及血必净注射液的干预作用[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (7): 430-434.
- [27] 陈立,李兰,吕波,等. 血必净注射液对急性肺栓塞兔 B 型脑钠肽水平的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (6): 345-348.
- [28] 陈旭峰,黄培培,吴昊,等. 血必净对急性肺动脉栓塞有保护作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29 (5): 695-701.

(收稿日期: 2014-05-10) (本文编辑:李银平)