

血必净注射液对急性肺血栓栓塞症 干预作用的实验研究

李兰 陈立 吕波 黄瑞峰

(贵州省中医院, 贵阳中医学院第一附属医院重症医学科, 贵州 贵阳 550001)

【摘要】 **目的** 探讨血必净注射液对急性肺血栓栓塞症(APTE)的治疗作用及可能机制。**方法** 选择纯种新西兰大耳白兔 32 只,按随机数字表法分为正常对照组、模型组、低分子肝素组、血必净组,每组 8 只。采用自体血栓回输法建立肺血栓栓塞模型;正常对照组不予任何处理。血必净组制模成功后给予血必净注射液静脉推注(静推)1 mL/kg;低分子肝素组给予低分子肝素钠 100 U/kg 皮下注射;模型组和正常对照组静注等量生理盐水;均每日 2 次,共 7 d。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定制模后 8 h 和 1、3、5、7 d 的血浆 D-二聚体及内皮素-1(ET-1)含量变化;7 d 后处死动物取肺组织,透射电镜下观察超微结构变化。**结果** 模型组 D-二聚体随制模时间的延长逐渐升高,制模后 7 d 明显高于正常对照组、低分子肝素组和血必净组($g/L: 3.98 \pm 1.14$ 比 0.43 ± 0.12 、 1.05 ± 0.13 、 1.04 ± 0.15 , 均 $P < 0.05$);ET-1 于制模后 5 d 达峰值,制模后 7 d 有所降低,但仍明显高于正常对照组、低分子肝素组和血必净组($g/L: 63.8 \pm 20.9$ 比 20.0 ± 1.4 、 36.5 ± 8.3 、 34.2 ± 6.3 , 均 $P < 0.05$)。低分子肝素组和血必净组各时间点 D-二聚体、ET-1 水平均明显高于正常对照组,但均明显低于模型组(均 $P < 0.05$),两治疗组各时间点比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。电镜下观察肺组织超微结构显示:模型组肺组织基底膜断裂,血管内皮细胞, I、II 型肺泡上皮细胞器结构不清晰,细胞膜表面微绒毛消失,细胞质浓缩,细胞核染色质固缩,可见大量核裂解碎片,脱落后形成凋亡小体,线粒体结构破坏;低分子肝素组毛细血管内皮细胞肿胀,可见大量坏死血细胞渗出,堵塞管腔, II 型肺泡上皮细胞胞质疏松,明显水肿,多数板层小体空泡化;血必净组毛细血管内皮细胞肿胀,管腔内可见坏死血细胞渗出,堵塞管腔,链接基本正常, II 型肺泡上皮细胞水肿,板层小体排空减轻。**结论** 血必净能够显著降低 APTE 兔血浆 D-二聚体、ET-1 水平,调整凝血和纤溶平衡,同时使肺血管通透性显著降低,具有一定的内皮功能保护作用,减少肺损伤,减轻了肺栓塞后肺组织的病理损害。

【关键词】 血必净注射液; 低分子肝素; D-二聚体; 内皮素-1; 肺血栓栓塞症; 超微结构; 兔; 中西医结合疗法

An experimental study on intervention of Xuebijing injection for acute pulmonary thromboembolism
Li Lan, Chen Li, Lyu Bo, Huang Ruifeng. Department of Critical Care Medicine, Guizhou Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital Affiliated to Traditional Chinese Medicine College of Guiyang, Guiyang 550001, Guizhou, China

Corresponding author: Chen Li, Email: yishengchenli@163.com

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic effect and possible mechanisms of Xuebijing injection for treatment of rabbits with acute pulmonary thromboembolism (APTE). **Methods** Thirty-two New Zealand rabbits were randomly divided into normal control group, model group, low molecular weight heparin (LMWH) group and Xuebijing group by random number table, 8 rabbits in each group. APTE model was reproduced by re-infusing autologous blood clots, and nothing was done for the normal control group. After the model was established, intravenous injection of Xuebijing 1 mL/kg from ear marginal vein was given to the rabbits in Xuebijing group, the LMWH 100 U/kg was subcutaneously injected in LMWH group, the same amount of normal saline was given intravenously to model group and normal control group, twice daily for 7 days in all the groups. The changes of plasma D-dimer and endothelin-1 (ET-1) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after modeling for 8 hours and 1, 3, 5, 7 days; after 7 days the animals were sacrificed and their lung tissues were removed for the examination of ultrastructural changes under an electron microscope. **Results** With the prolongation of time, the D-dimer level in the model group was gradually increased, and on the 7th day after modeling, the level was significantly higher than that of the normal control, LMWH and Xuebijing groups ($g/L: 3.98 \pm 1.14$ vs. 0.43 ± 0.12 , 1.05 ± 0.13 , 1.04 ± 0.15 , all $P < 0.05$). After modeling for 5 days, the ET-1 level reached its peak in the model group, and it was lowered on the 7th day after modeling, but still significantly higher than that in the normal control, LMWH and Xuebijing groups ($g/L: 63.8 \pm 20.9$ vs. 20.0 ± 1.4 , 36.5 ± 8.3 , 34.2 ± 6.3 , all $P < 0.05$). The D-dimer and ET-1 levels in the LMWH and Xuebijing groups were significantly higher than those of the normal control group at each time point, but still obviously lower than those

of the model group (all $P < 0.05$), and the differences between the two treatment groups were not statistically significant at each time point (all $P > 0.05$). Electron microscopic examination of lung tissue ultra-structure showed: in the model group, there were the lung tissue basement membrane rupture, the organelle structure in vascular endothelial cells and alveolar epithelial cells type I and II not clear, disappearance of microvilli on cell surface, cytoplasm concentration, nuclear chromatin condensation, a lot of debris due to nuclear lysis, formation of apoptotic bodies after shedding, and mitochondrial structural damage. In LMWH group, the capillary endothelial cell swelling, a lot of necrotized blood cells oozing, blockage of lumen, the cytoplasm of type II alveolar epithelial cell loose, edematous and multiple lamellar bodies vacuolized were seen. In Xuebijing group, capillary endothelial cell swelling, necrotized blood cells blocking the lumen and seeping, the link basically normal, the type II alveolar epithelial cell edematous, mitigation of lamellar bodies emptying were found. **Conclusions** Xuebijing can significantly reduce the plasma D-dimer and ET-1 levels, adjust the balance of coagulation and fibrinolysis, simultaneously decrease the pulmonary vascular permeability obviously in rabbits with APTE, thus it possesses certain protective effect for endothelial function leading to amelioration of lung injury and reduction of lung pathological damage in rabbits with pulmonary embolism.

【Key words】 Xuebijing injection; Low molecular weight heparin; D-dimer; Endothelin-1; Pulmonary thromboembolism; Ultrastructure; Rabbit; Integrated traditional Chinese and western medicine therapy

急性肺血栓栓塞症(APTE)的主要病理学基础为血栓阻塞肺动脉,临床表现为特征性肺循环和呼吸功能障碍,主要与深静脉血栓形成的高发病率有关,目前抗凝、溶栓仍为首要治疗方法,目前中西医结合治疗报道屡见不鲜。血必净具有清热解毒、凉血活血、止痛等作用,在临床上广泛用于危重患者的抢救,收到了确切的临床效果^[1-2]。本研究旨在探讨血必净对 APTE 的治疗作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料: D-二聚体、内皮素-1(ET-1)检测试剂盒(批号:E04D0123、E04E0040)由上海蓝基生物科技有限公司提供;H-7650型透射电子显微镜由日本HITACH公司生产;低分子肝素钠由意大利阿尔法韦士曼制药公司生产(药品注册证号:H20090246);血必净由天津红日药业股份有限公司生产(国药准字:Z2004033,10 mL/支)。

1.2 动物分组、模型制备及给药方法: 32只大耳白兔由贵阳医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(黔)2012-001。按随机数字表法分为正常对照组、模型组、低分子肝素组及血必净组,每组各8只。采用自体血栓回输方法^[3]制备肺血栓栓塞模型;正常对照组动物不予任何处理;制模成功后血必净组予血必净注射液静脉推注(静推)1 mL/kg,每日2次;低分子肝素组皮下注射低分子肝素钠,100 U/kg,每日2次;模型组与正常对照组给予等量生理盐水。实验周期为7 d。

本实验中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 D-二聚体、ET-1水平测定: 分别于制模后8 h和1、3、5、7 d采集静脉血2~4 mL,离心10 min,取血浆-70℃冻存,使用时复融,采用酶联免疫吸附

试验(ELISA)测定D-二聚体和ET-1水平。

1.3.2 肺组织超微结构观察: 7 d后处死家兔,开胸选取肉眼观察病变最为严重的肺组织1 mm×1 mm×1 mm,2.5%戊二醛溶液-5℃低温冰箱中保存24 h,1%锇酸溶液固定,丙酮脱水,浸透,环氧树脂包埋,切片厚度60 nm,先后经醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色,透射电镜下观察肺组织超微结构改变。

1.4 统计学处理: 使用SPSS 16.0软件进行数据统计。连续变量的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血浆D-二聚体水平变化比较(表1): 与正常对照组比较,制模后8 h各组D-二聚体水平即明显升高,以模型组升高最明显(均 $P < 0.05$);模型组持续上升至制模后7 d仍无下降趋势;与模型组比较,低分子肝素组、血必净组D-二聚体水平均降低,以血必净组降低更显著,但两治疗组间各时间点比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.2 各组血浆ET-1水平变化比较(表2): 与正常对照组比较,制模后8 h各组ET-1水平均明显升高,以模型组升高更明显(均 $P < 0.05$);模型组持续升高至制模后7 d开始下降,但仍明显高于低分子肝素组和血必净组(均 $P < 0.05$);与模型组比较,低分子肝素组、血必净组ET-1水平均降低,但两治疗组间各时间点比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 肺组织超微结构观察: 正常对照组毛细血管内皮细胞结构、基膜完整,管腔内可见红细胞结构完整无畸形;肺组织气血屏障清晰,线粒体结构完整,I、II型肺泡上皮细胞无水肿,肺泡上皮清晰(图1a)。模型组肺组织基底膜断裂,血管内皮细胞,I、II型

肺泡上皮细胞器结构不清晰,细胞膜表面微绒毛消失,细胞质浓缩,细胞核染色质固缩,可见大量核裂解碎片,脱落后形成凋亡小体,线粒体结构破坏(图 1b)。低分子肝素组毛细血管内皮细胞肿胀,可见大量坏死血细胞渗出,堵塞管腔,Ⅱ型肺泡上皮细胞胞质疏松,明显水肿,多数板层小体空泡化(图 1c)。血必净组毛细血管内皮细胞肿胀,管腔内可见坏死血细胞渗出,堵塞管腔,链接基本正常,Ⅱ型肺泡上皮细胞水肿,板层小体排空减轻(图 1d)。

3 讨论

APTE 的发生发展存在复杂的神经内分泌调节机制,其中 D-二聚体是交联纤维蛋白经纤溶酶作用后的终末产物,主要反映纤维蛋白的溶解作用,可作为血栓形成的良好指标,是血管内血栓形成的标志之一^[4]。随着研究的不断深入,D-二聚体对于 APTE 的诊断也日趋成熟,其含量变化除可以作为体内高凝状态及纤溶亢进的标志外,还可以用于诊断 APTE^[5];其机制是机体内凝血和纤溶系统的动态平衡被破坏,使凝血系统活跃,而纤溶系统相对受到抑制,大量纤维蛋白聚集,纤维蛋白降解产物增加,最终使 D-二聚体水平升高^[6]。研究显示,D-二聚体浓度的升高与大面积 APTE 后血栓广泛溶解有关^[7]。ET-1 是一种由内皮细胞分泌的活性多肽,其主要来源于血管内皮细胞,同时也广泛分布于肺血管、呼吸道上皮、黏膜腺体和交感神经节^[7],具有调节气道、血管平滑肌细胞张力和肺血管通透性及腺体分泌的作用,可引起平滑肌细胞收缩及增殖^[8-9]。有研究显示,APTE 造成的缺氧刺激可使 ET-1 的合成与释放增加,在发病过程中起重要作用;栓子嵌塞在肺动脉或随血液循环运行于血管中,使血管内皮细胞损伤,严重缺血、缺氧^[10];急性缺氧又会促进 ET-1

表 1 各组血浆 D-二聚体水平比较($\bar{x} \pm s$)

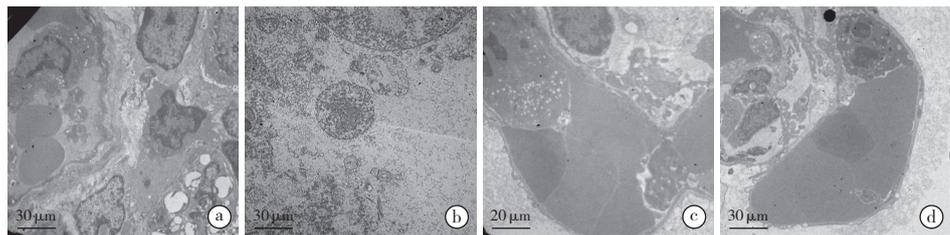
组别	动物数 (只)	D-二聚体(g/L)				
		制模后 8 h	制模后 1 d	制模后 3 d	制模后 5 d	制模后 7 d
正常对照组	8	0.45±0.10	0.51±0.12	0.49±0.09	0.53±0.13	0.43±0.12
模型组	8	1.27±0.25 ^a	1.80±0.69	2.32±0.44 ^a	3.01±0.70 ^a	3.98±1.14 ^a
低分子肝素组	8	1.00±0.13 ^{ab}	1.11±0.16	1.29±0.13 ^{ab}	1.11±0.16 ^{ab}	1.05±0.13 ^{ab}
血必净组	8	0.94±0.16 ^{ab}	1.05±0.17	1.18±0.21 ^{ab}	1.04±0.19 ^{ab}	1.04±0.15 ^{ab}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

表 2 各组血浆 ET-1 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	ET-1(g/L)				
		制模后 8 h	制模后 1 d	制模后 3 d	制模后 5 d	制模后 7 d
正常对照组	8	19.6±2.7	20.7±3.0	20.7±1.6	21.3±2.6	20.0±1.4
模型组	8	42.8±12.9 ^a	61.4±12.1 ^a	72.8±9.4 ^a	75.3±13.5 ^a	63.8±20.9 ^a
低分子肝素组	8	32.4±10.2 ^{ab}	45.2±9.4 ^{ab}	57.7±11.0 ^{ab}	47.8±7.4 ^{ab}	36.5±8.3 ^{ab}
血必净组	8	32.0±8.5 ^{ab}	46.8±7.0 ^{ab}	53.2±9.5 ^{ab}	37.2±7.1 ^{ab}	34.2±6.3 ^{ab}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$



①:正常对照组;②:模型组;③:低分子肝素组;④:血必净组

图 1 电镜下观察肺组织超微结构改变(醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色)

的合成与释放进一步增加,从而引起肺血管广泛收缩^[11]。本研究结果显示,制模后模型组动物 D-二聚体、ET-1 水平升高,可能为栓子嵌塞时肺动脉通过机械性刺激及机体的多种神经体液因素,可引起缺血、缺氧,凝血纤溶系统活化加强,血管收缩,血管内皮细胞受损,引发并加重肺部的病理改变。模型组 ET-1 上升 5 d 后逐渐下降,但仍明显高于其他各组,考虑与机体的自身调节使内皮功能逐渐恢复有关;而 D-二聚体水平持续增高,这可能与体内凝血和纤溶系统失衡,凝血系统活跃,大量纤维蛋白聚集,纤维蛋白降解增加有关。这说明 D-二聚体、ET-1 参与了 APTE 早期的病理生理过程。

血必净注射液前身为“神农 33 号”^[12],由丹参、川芎、赤芍、红花、当归等多味活血化瘀中药组成。现代药理学研究证实,血必净具有抑菌抗炎^[13-14]、抗内毒素^[15]等作用,体现中药成分多途径,多靶点,多环节和“菌、毒、炎”并治的特色优势。另外,研究证实,单味中药丹参、川芎、赤芍、当归及红花可改善微循环^[16],清除氧自由基,抗氧化,对缺氧和氧自由

基损伤有保护效应^[17-19],还可抑制中性粒细胞黏附聚积、活化^[20],减轻肺损伤^[21]。血必净能够抑制血小板聚集,促进纤溶,对血管内皮细胞有一定的保护作用^[22];同时能增强内皮细胞的吞噬功能,促进组织吸收^[23]。在肺栓塞治疗过程中,抗凝一直被公认为有效地治疗手段之一,研究证实低分子肝素应用于肺栓塞的防治有重要的意义,具有增强脂肪酶活性、抗凝、改善微循环的作用^[24-26]。本研究结果也显示,血必净治疗可抑制 D-二聚体、ET-1 的升高,其作用时间和改善程度与低分子肝素组相当,说明两组在治疗上存在等效关系,同时还没有肝素可引起的出血并发症的不良反应。

肺组织超微结构观察显示,血必净能明显减轻血管内皮细胞损伤,保护 I、II 型肺泡上皮细胞,保护细胞器,稳定生物膜,减轻气血屏障损害和肺组织损伤,减少梗死面积。其可能作用机制为血必净的组分为多种活血成分,通过扩张微循环、减少炎性渗出、拮抗血小板的黏附和聚集,促进纤维组织重吸收和胶原纤维的降解,使凝血和纤溶达到有效平衡,降低肺毛细血管通透性,保护肺血管内皮细胞,恢复肺组织灌注,降低微循环阻力,防止肺高压,改善并在一定程度上逆转右心功能不全,减轻肺损伤^[27-28]。因此我们认为,对 APTE 的治疗策略是:在抗凝的基础上辅以血必净,不仅可以明显改善临床症状,而且减轻了栓塞后肺组织的病理损害,是临床治疗 APTE 的有效手段。

参考文献

- [1] 李兰,张谦,郭军,等.血必净联合抗凝治疗急性肺血栓栓塞症临床分析[J].临床荟萃,2009,24(13):1175-1176.
- [2] 刘伟恒,关雪梅,牛洞峰.血必净注射液在 ICU 患者中的临床应用价值探析[J].中国实用医药,2014,9(4):162-163.
- [3] 陈立,吕波,韩悦,等.急性肺血栓栓塞兔模型的一种新制作方法[J].贵阳中医学院学报,2013,35(6):2-4.
- [4] 梁仲惠,张新华,吕成伟,等.肝硬化、肝癌患者临床分期与血浆中 D-二聚体检测及临床意义[J].中国现代医学杂志,2001,11(5):86,88.
- [5] Kruip MJ, Slob MJ, Schijen JH, et al. Use of a clinical decision rule in combination with D-dimer concentration in diagnostic workup of patients with suspected pulmonary embolism: a prospective management study[J]. Arch Intern Med, 2002, 162(14):1631-1635.
- [6] 胡伟强.血清 D-二聚体浓度对急性肺栓塞患者近期预后的评估价值研究[J].实用心脑血管病杂志,2013,21(5):78-79.
- [7] 黎莉.内皮素与呼吸系统疾病[J].临床医学,1996,17(5):53-54.
- [8] Schwartz I, Ittoop O, Hazum E. Direct evidence for multiple endothelin receptors [J]. Biochemistry, 1991, 30(21):5325-5327.
- [9] Masaki T1, Kimura S, Yanagisawa M, et al. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function [J]. Circulation, 1991, 84(4):1457-1468.
- [10] Galié N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2):227-237.
- [11] 张凌,白明,夏蕾,等.川芎嗪对急性肺血栓栓塞大鼠 ET-1、COX-2、CD54 表达的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2008,37(1):31-34.
- [12] 张晔,曹书华,崔克亮,等.血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):21-23.
- [13] 雪琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究——血必净的药理学观察[J].中国危重病急救医学,1997,9(12):720-722.
- [14] 明自强,俞林明,吕银祥,等.血必净注射液治疗脓毒症患者抗炎作用观察[J].现代中西医结合杂志,2007,16(6):731-732.
- [15] 吴允孚,陈刚,席与斌.血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(3):181-182.
- [16] 金玉青,洪远林,李建蕊,等.川芎的化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2013,4(3):44-48.
- [17] 官金艳.丹参注射液对肺血栓大鼠内皮素及 P 选择素表达水平的影响[J].血栓与止血学,2013,19(1):14-16.
- [18] 周长福,李志军,刘红栓.血必净联合前列腺素 E1 对肺纤维化大鼠转化生长因子-β1 的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(3):186.
- [19] 李志军,刘红栓,王今达.血必净联合前列腺素 E1 防治急性肺纤维化的实验研究[J].中华急诊医学杂志,2007,16(3):255-259.
- [20] 宋伟.丹参的药理作用的研究进展[J].北方药学,2013,10(5):52-53.
- [21] Wang X, Morris-Natschke SL, Lee KH. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen [J]. Med Res Rev, 2007, 27(1):133-148.
- [22] 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.
- [23] 王筠默.中药药理学[M].上海:上海科学技术出版社,1985:73-75.
- [24] 顾玉程,李龙云,赵凤芹,等.术中急性肺脂肪栓塞致心搏骤停 1 例的诊疗分析[J].中华危重病急救医学,2014,26(10):759-760.
- [25] 夏锡仪,谭玉林,孙亚伟,等.低分子肝素预防外科术后患者的肺栓塞[J].中国危重病急救医学,2011,23(11):661-664.
- [26] 杨照宇,赵玉镯.肺栓塞 2 例分析[J].中华危重病急救医学,2014,26(8):597-598.
- [27] 杨立山,马晓,李文峰,等.血必净注射液对危重患者凝血功能障碍的研究[J].宁夏医学杂志,2012,34(6):485-487.
- [28] 康国强,程祖建,林志鸿,等.血必净注射液对心肺复苏患者凝血功能的影响[J].中华全科医学,2010,8(11):1347-1348.

(收稿日期:2014-10-10)

(本文编辑:李银平)