

## • 论著 •

## 葛根素对失血性休克大鼠内皮细胞和抗凝血功能的影响

丁红香<sup>1</sup>,倪孔海<sup>2</sup>,邵美娟<sup>1</sup>,刘长宝<sup>3</sup>,杜兵<sup>1</sup>,胡云良<sup>1</sup>,陈新宇<sup>1</sup>,秦基取<sup>1</sup>

(温州医学院附属二院,育英儿童医院①检验科,②急诊外科,③中医肛肠外科,浙江温州 325027)

**【摘要】** 目的:探讨葛根素对失血性休克大鼠内皮细胞和抗凝血功能的影响及意义。方法:将 40 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组、休克组、乳酸林格液复苏组(林格组)和乳酸林格液加葛根素注射液治疗组(葛根素组)4 组,每组 10 只。假手术组仅行颈动脉插管,不流血;失血性休克模型制备方法按 Lamson 法快速放血使动物处于休克状态。林格组和葛根素组于休克后 1 h 分别回输失血量 3 倍的乳酸林格液或 30 mg/kg 葛根素注射液加乳酸林格液。休克 3 h 时取血观察血浆凝血酶调节蛋白(TM)、组织因子(TF)、抗凝血酶活性(AT:A)和蛋白 C 活性(PC:A)的变化。结果:与假手术组比较,休克组和林格组 TM 和 TF 含量均显著增高,AT:A 和 PC:A 均显著降低( $P$  均 $<0.01$ );葛根素组 TM 含量略有升高,TF、AT:A 和 PC:A 略有下降,均接近假手术组水平;与林格组比较,葛根素组 TM 和 TF 含量均明显下降,AT:A 和 PC:A 均明显升高( $P$  均 $<0.01$ )。结论:失血性休克可导致大鼠内皮细胞损伤,抗凝血酶和蛋白 C 呈消耗性下降;葛根素可有效调整失血性休克后大鼠凝血和抗凝血系统失衡的发生。

**【关键词】** 葛根素注射液;休克,失血性;血管内皮;凝血/抗凝血系统;大鼠

中图分类号:R285.5;R278 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)01-0032-03

## Effect of puerarin (葛根素) on endothelial cell and anticoagulant function of rats with hemorrhagic shock

DING Hong-xiang<sup>1</sup>, NI Kong-hai<sup>2</sup>, SHAO Mei-juan<sup>1</sup>, LIU Chang-bao<sup>3</sup>, DU Bing<sup>1</sup>, HU Yun-liang<sup>1</sup>, CHEN Xin-yu<sup>1</sup>, QIN Ji-qu<sup>1</sup>. 1. Department of Laboratory, 2. Department of Surgical Emergency, 3. Traditional Chinese Medicine Department of Anus and Rectum, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Yuying Children's Hospital, Wenzhou 325027, Zhejiang, China

**【Abstract】** **Objective:** To investigate the effect of puerarin (葛根素) on endothelial cell and anticoagulant function of Sprague Dawley (SD) rats with hemorrhagic shock. **Methods:** Forty SD rats were randomly divided into four groups: sham operation, shock, lactate Ringer's solution and puerarin groups, and each group consisted of 10 SD rats. Intubation without bloodletting was performed in sham operation group. By way of Lamson bloodletting, the rats with hemorrhagic shock were obtained. One hour after shock, three times of the volume of the lost blood of lactate Ringer's solution was infused into the lactate Ringer's solution group, while the same above volume of a mixture of 30 mg/kg puerarin injection and lactate Ringer's solution was infused into the puerarin group. Blood specimens were collected 3 hours after shock. Changes of plasma thrombomodulin (TM), tissue factor (TF), protein C activity (PC:A) and antithrombin activity (AT:A) of the four groups were detected. **Results:** The levels of plasma TM and TF in shock group and Ringer's solution group were obviously higher than those of sham operation group (all  $P < 0.01$ ), and the levels of plasma AT:A and PC:A in shock group and Ringer's solution group were clearly lower than those of sham operation group (all  $P < 0.01$ ). The level of plasma TM in puerarin group was slightly increased, and the levels of plasma TF, AT:A and PC:A were lowered; all above items were similar to those of sham operation group. The levels of plasma TM and TF in puerarin group were obviously lower than those of Ringer's solution group, and the levels of plasma AT:A and PC:A in puerarin group were obviously higher than those of Ringer's solution group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The rats with hemorrhagic shock have trauma of endothelial cells and decrease of protein C and antithrombin due to consumption. Puerarin could effectively regulate the imbalance between the coagulant and anticoagulant functions of rats with hemorrhagic shock.

**【Key words】** puerarin injection; hemorrhagic shock; vascular endothelium; coagulant/anticoagulant system; rat

失血性休克是急诊较为常见的休克类型,常导

基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助项目(2006C098)

作者简介:丁红香(1963-),女(汉族),浙江省人,副主任技师

(Email:dhx@wzhealth.com)。

致多器官功能衰竭而致患者死亡。由于失血或血浆渗出致患者循环血量减少,临床上通常给予输液复苏可获得一定疗效。但文献报道,输注不同液体的复

苏效果是不同的<sup>[1-3]</sup>;在 2003 年美、加创伤学会联合制定的复苏方案会议上,对选用何种液体复苏也持不同态度,且对合理的液体选择方式规定了证据的类型<sup>[4]</sup>。本实验中对比观察失血性休克大鼠采用乳酸林格液和中药葛根素注射液加乳酸林格液复苏时机体血管内皮损伤和抗凝血功能的变化,以期阐明葛根素对失血性休克凝血和抗凝血功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组:**40 只健康成年 SD 大鼠,体重 250~300 g,雌雄不限,由温州医学院动物中心提供。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、休克组、乳酸林格液复苏组(林格组)和乳酸林格液加葛根素注射液治疗组(葛根素组),每组 10 只。大鼠实验前禁食过夜,自由饮水。

**1.2 失血性休克模型制备:**用质量分数为 20% 的乌拉坦 4 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后,分离左侧颈总动脉和右侧颈外静脉,用 22-18 G 动脉穿刺针行动脉插管,整个管道系统预充质量分数为 0.9% 的生理盐水,经三通管及压力传感器与多功能监护仪相连。右侧颈外静脉穿刺、插管,用于采血和输液或回输自体血。假手术组仅行颈动静脉插管,未予以放血,观察 3 h 后取血标本;其余 3 组均按 Lamson 法快速放血,使平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)时记为休克开始,并密切观察 MAP 的变化,通过回输自体血或输液使 MAP 维持在 40 mm Hg 直到预定的时间。休克组:不给予任何处理,3 h 后取血标本;林格组:休克稳定 1 h 后通过输入失血量 3 倍的乳酸林格液,复苏 2 h 后取血标本;葛根素组:休克稳定 1 h 后将 30 mg/kg 葛根素注射液与乳酸林格液混合成 3 倍失血量输入,复苏 2 h 后取血标本。每组在预定时间采集静脉血 1.8 ml,加入含 0.2 ml (109 mmol/L)枸橼酸钠抗凝塑料试管中,颠倒混匀后以 3 000 r/min (离心半径 10 cm)离心 10 min,分离血浆,立刻置于-40℃冰箱保存待检。

**1.3 观察指标与检测方法:**血浆凝血酶调节蛋白(TM)、组织因子(TF)含量均采用酶联免疫吸附法,试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,按照说明书要求操作,在自动酶标仪上用比色法测定。在法国 STAGO-STA 自动血凝仪上采用发色底物法测定抗凝血酶活性(AT:A)和蛋白 C 活性(PC:A),所用试剂均由 STAGO 公司提供,严格按说明书操作。

**1.4 统计学方法:**数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS11.0 统计软件包处理,多组间均数比

较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

表 1 结果显示:与假手术组比较,休克组和林格组 TM 和 TF 含量均显著增高,AT:A 和 PC:A 均显著降低( $P$  均 $< 0.01$ );休克组与林格组各指标比较差异均无显著性( $P$  均 $> 0.05$ );与林格组比较,葛根素组 TM 和 TF 含量均明显下降,AT:A 和 PC:A 明显升高( $P$  均 $< 0.01$ )。

表 1 各组大鼠血浆 TM、TF、AT:A 及 PC:A 比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the levels of plasma TM, TF, AT:A and PC:A in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	TM( $\mu\text{g/L}$ )	TF( $\mu\text{g/L}$ )	AT:A(%)	PC:A(%)
假手术组	10	70.2±11.4	0.74±0.10	112.7±8.7	96.2±11.3
休克组	10	87.3±12.5*	1.06±0.20*	90.3±8.2*	80.9±9.0*
林格组	10	85.3±10.8*	1.03±0.26*	93.2±7.6*	82.9±8.6*
葛根素组	10	73.5±11.9**☆	0.72±0.10**☆	104.4±8.0**☆	95.1±11.5**☆
F 值		5.309	10.513	16.057	6.149
P 值		0.004	0.0001	0.000	0.002

注:与假手术组比较:\* $P < 0.01$ ;与休克组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与林格组比较:☆ $P < 0.01$

## 3 讨论

失血性休克为临床常见的危重症,是重要生命器官得不到足够的血液灌注或组织细胞对氧及营养物质利用障碍的一种复杂的全身性病理过程。TM 是血管内皮细胞表面的一类跨膜糖蛋白,与凝血酶结合后通过激活蛋白 C 而起抗凝作用。当血管内皮受损时其血浆浓度明显升高,因而可作为血管内皮细胞损伤的敏感标志物<sup>[5]</sup>。TF 存在于血管内皮细胞、单核细胞、巨噬细胞及各种组织上,血栓性疾病、弥散性血管内凝血、恶性肿瘤等均可使其表达增高并释放至血浆<sup>[6]</sup>,是机体凝血功能的主要启动因子。本实验结果显示:与假手术组比较,休克组大鼠血浆 TM、TF 含量均明显升高,表明失血性休克后,由于机体缺血、缺氧及氧自由基的产生,致使血管内皮细胞损伤及组织因子大量释放,启动外源性凝血途径,生成大量凝血酶,导致机体处于高凝状态。与此同时,机体的主要生理性抗凝物质如抗凝血酶和蛋白 C 系统也相继被启动。抗凝血酶为了灭活凝血酶与其形成无活性的凝血酶-抗凝血酶复合物。蛋白 C 是蛋白 C 系统中的中心物质,为无活性的丝氨酸蛋白酶原,在凝血酶与 TM 以 1:1 形成复合物后,可使结合在内皮细胞受体上的蛋白 C 变为具有丝氨酸蛋白酶活性的活化蛋白 C,其主要作用是在磷脂和  $\text{Ca}^{2+}$  的参与下灭活因子 Va 和因子 VIIa,具有抗凝作用。这些生理性抗凝物质在发挥抗凝作用的过程

中,自己出现消耗性下降,如同本实验结果所示。

失血性休克救治的首要问题是尽早恢复有效血容量,维持基本组织灌注,临床上及时予以容量复苏,常用乳酸林格液等晶体液复苏。本实验中对失血性休克大鼠给予输注失血量 3 倍的乳酸林格液,尽管血容量得到了补充,但分析血管内皮受损的指标和抗凝血功能的变化发现 TM 和 TF 含量较假手术组显著增高,AT:A 和 PC:A 则显著降低,说明休克期血管内皮细胞和抗凝血功能没有得到很好的改善,仍处在高凝状态。这是由于失血性休克再灌注时,氧自由基等物质可损伤血管内皮细胞;同时大量的晶体液复苏后,血浆胶体成分如白蛋白等被稀释,胶体渗透压下降,血管内水向组织间渗透,导致组织水肿,更加剧了组织细胞的进一步损伤<sup>[7]</sup>。而血液稀释本身就可诱导凝血酶形成,凝血酶增多既可促进蛋白 C 的活化,又可与抗凝血酶形成复合物,最后导致蛋白 C 和抗凝血酶消耗<sup>[8]</sup>。因此,单纯晶体液复苏,不能改善休克所致的血液高凝状态,反而造成凝血与抗凝血之间的平衡紊乱,易引起血栓形成的危险,甚至诱发弥散性血管内凝血。

葛根素是从豆科植物野葛干燥根中提取的异黄酮化合物。李永红等<sup>[9]</sup>研究表明,葛根素能抑制血管内皮损伤后血小板的活化及血管平滑肌细胞的移行。罗助荣等<sup>[10]</sup>临床研究表明,葛根素注射液治疗不稳定型心绞痛患者 20 d 后,血中抗凝血酶 III、血浆组织型纤溶酶原激活剂活性显著升高;纤溶酶活性和纤溶酶原激活剂抑制剂活性显著下降;内皮素和一氧化氮均有所改善,说明葛根素可以改善凝血纤溶系统活性,调节内皮舒缩功能。有研究表明,葛根素具有扩张血管、改善微循环、抗自由基损伤的作用<sup>[11]</sup>;对许多脏器的缺血、缺氧有保护作用及具有抗缺血/再灌注损伤的作用等<sup>[12]</sup>。本实验中对失血性休克大鼠给予输注含中药葛根素的乳酸林格液进行复苏,结果表明,葛根素组 TM 和 TF 均较林格素明显降低,AT:A 和 PC:A 明显升高,提示休克期的

高凝状态得到改善,其作用机制可能是葛根素通过抗氧自由基等作用,保护血管内皮细胞功能,从而改善失血和缺血/再灌注损伤所致的高凝状态。

综上所述,大鼠失血性休克过程中,由于缺血、缺氧及氧自由基的释放致使血管内皮细胞损伤,使机体处于高凝状态。单纯用乳酸林格液复苏很难改善机体凝血与抗凝血的平衡,而加用中药葛根素注射液能使凝血与抗凝血的平衡得到改善。因此,在失血性休克救治过程中要选择适合的复苏方式,同时严密监测凝血与抗凝血参数变化,防止致命性弥散性血管内凝血的发生。

#### 参考文献:

- [1]梅冰,康舟军,霍正禄. 创伤性休克后血浆黏附分子的变化及不同复苏液的影响[J]. 中华实验外科杂志,2004,21(12):1544-1546.
- [2]陈晓雄,叶恭水,帅学军,等. 重症胸部创伤合并创伤失血性休克限制性液体复苏的疗效评价[J]. 中国急救医学,2004,24(3):178-180.
- [3]冯丽洁,杜捷夫. 危重病患者液体复苏的选择争议[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(5):319-320.
- [4]林洪远. 复苏理念的更新值得关注[J]. 中国危重病急救医学,2006,18(9):513-515.
- [5]陆志熊,江观玉,张茂,等. 40 例多发伤患者血浆血栓调节蛋白的检测与意义[J]. 中华创伤杂志,2001,17(7):427-428.
- [6]Morrissey J H. Tissue factor; a key molecule in hemostatic and nonhemostatic systems [J]. Int J Hematol, 2004, 79(2): 103-108.
- [7]马晓鹏,邵义明,邓烈华,等. 乳酸林格液对血浆凝血因子 I 和抗凝血酶-III 的影响[J]. 医药导报,2005,24(7):599-600.
- [8]马朋林,苏瑾文. 失血性休克复苏及监测指标研究进展[J]. 解放军医学杂志,2005,30(7):568-570.
- [9]李永红,李志强,李震海,等. 葛根素对血管内皮损伤后血小板活化状态及内膜厚度的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2003,10(2):87-89.
- [10]罗助荣,盖晓波,郑卫星,等. 葛根素治疗不稳定型心绞痛及对凝血纤溶活性和内皮功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2000,7(2):105-106.
- [11]胡静,徐德生. 葛根素药理和临床研究进展[J]. 世界临床药物,2006,27(4):215-220.
- [12]夏华玲. 葛根素的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(3):434-435.

(收稿日期:2006-10-27 修回日期:2006-11-19)

(本文编辑:李银平)

#### · 消息 ·

#### 全国急救医学学术研讨会征文通知

“中华全科医学编辑部”和“河北省急救医学会”定于 2007 年 6 月在湖北省襄樊市召开“全国急救医学学术研讨会”。交流论文经审阅后将刊入国家级医刊《全科医学杂志》。欢迎内、外、妇、儿、中西医等科医护人员参会(会务费 500 元)或赐稿(版面费 350 元)。打印稿件挂号寄:河北省石家庄市新华区华西路 53 号,河北省急救医学会刘苏平秘书长收,邮编:050051;电话:0311-86751855,手机:13785189697;Email:hbsjyx@sina.com。收稿截止时间:2007 年 4 月 15 日。稿件上请写明联系电话。(河北省急救医学会)