

• 论著 •

血必净注射液对脓毒症大鼠组织肿瘤坏死因子- α 及凝血功能的影响

李银平¹, 乔佑杰¹, 武子霞², 姚咏明³, 于燕³, 吴瑶³

(1. 天津市天和医院, 天津 300050; 2. 天津中医药大学, 天津 300193;

3. 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, 北京 100037)

【摘要】 目的:探讨血必净注射液对脓毒症大鼠凝血功能及组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。方法:采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症动物模型。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,后两组分别于CLP后0.5、12、24、36、48和60h经大鼠阴茎背静脉注射生理盐水或血必净注射液4ml/kg,分别于CLP后2、8、24、48和72h 5个时间点各处死8只动物。各组大鼠取腹主动脉血检测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)及纤维蛋白原(Fbg)含量;取肝、肺组织测定TNF- α 蛋白水平。结果:CLP后2h模型组动物肝、肺组织TNF- α 蛋白水平迅速升高(P 均 <0.01),8h达到高峰,分别为正常对照组的2.57倍($P<0.01$)和4.77倍($P<0.01$)。血必净注射液治疗后可显著降低肝、肺组织TNF- α 蛋白水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),于CLP后24h均恢复至伤前正常范围。模型组CLP后2~72h,PT、APTT有不同程度的缩短,血浆Fbg水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血必净治疗组CLP后2~24hPT、APTT均较模型组明显延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血浆Fbg含量回升。结论:血必净注射液可显著降低脓毒症大鼠组织TNF- α 蛋白水平,防止凝血功能异常,从而有效防止脓毒症的发生发展。

【关键词】 脓毒症;血必净注射液;肿瘤坏死因子- α ;凝血功能

中图分类号:R285.5;R259 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)02-0104-04

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on tissue tumor necrosis factor - α and blood coagulation parameters in septic rats LI Ying-ping¹, QIAO You-jie¹, WU Zi-xia², YAO Yong-ming³, YU Yan³, WU Yao³. 1. Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 3. First Hospital Affiliated to General Hospital of PLA (formerly 304 th Hospital), Beijing 100037, China

Corresponding author: LI Yin-ping (Email: ccm.23042150@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects of traditional Chinese medicine Xuebijing injection (血必净注射液) on tissue tumor necrosis factor - α (TNF - α) expression and blood coagulation parameters in septic rats. **Methods:** Wistar rats were subjected to sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). Ninety - six healthy rats were randomly divided into four groups: normal group, sham operation group, CLP model group, and Xuebijing - treated group. The two latter groups were given respectively intravenous injection of normal saline or Xuebijing injection with the dose of 4 ml/kg at 0.5, 12, 24, 36, 48 and 60 hours after the establishment of CLP model. Eight rats were sacrificed at 2, 8, 24, 48 and 72 hours post - CLP in the two latter groups. Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and fibrinogen (Fbg) levels were determined. Tissue TNF - α protein levels in liver and lung tissues were also measured at various intervals. **Results:** TNF - α protein levels in liver and lung tissues were significantly increased at 2 hours after establishment of CLP model compared with those of the normal group (both $P<0.01$), and they were 2.57 - fold ($P<0.01$) and 4.77 - fold ($P<0.01$) of baseline values at 8 hours post - CLP, respectively. However, treatment with Xuebijing injection markedly reduced TNF - α protein levels both in liver and lung tissues ($P<0.05$ or $P<0.01$), recovering to normal baseline values at 24 hours post - CLP. In CLP model group, PT and APTT were significantly shortened, and plasma Fbg levels were significantly decreased at 2 - 72 hours ($P<0.05$ or $P<0.01$), and they were markedly improved in the Xuebijing - treated group at 2 - 24 hours ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Xuebijing injection can inhibit tissue TNF - α protein synthesis and release in vital organs in rats with sepsis, thereby it may prevent the development of blood coagulation dysfunction and severe sepsis.

【Key words】 sepsis; Xuebijing injection; tumor necrosis factor - α ; blood coagulation

严重脓毒症(severe sepsis)患者凝血系统障碍及炎症反应失控十分常见,且与疾病的严重程度及预后密切相关。研究发现,脓毒症早期炎症介质刺激凝血系统活化,同时,凝血系统活化可促进炎症的进一步发展,形成正反馈循环,从而加剧脓毒症的恶化^[1]。应用炎症介质拮抗剂或凝血抑制剂治疗脓毒症在动物实验中取得一定效果,但临床试验疗效不佳^[2]。因此,运用中医药防治脓毒症及多器官功能障碍综合征(MODS)可能是今后的一个重要发展方向^[2-5]。本实验采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型,观察血必净注射液对脓毒症大鼠重要炎症介质及凝血功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物模型制备: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。大鼠适应性饲养 1 周后,按照 Chaudry 等^[6]报道的方法复制 CLP 严重腹腔感染致脓毒症模型。术前大鼠禁食 12 h、自由饮水。以盐酸氯胺酮注射液与速眠新 II 注射液按体积比 8:3 混合后 0.4 ml/kg 肌肉注射麻醉大鼠。沿大鼠腹正中中线作一长约 1.5 cm 的切口,结扎盲肠根部,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。假手术组只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($n=40$),模型组和血必净治疗组按照观察时间点再分为 CLP 后 2、8、24、48 和 72 h 5 组,每组 8 只动物。血必净治疗组分别于 CLP 后 0.5、12、24、36、48 和 60 h 经阴茎背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^[7];模型组依同时间点注射等量生理盐水。

1.3 标本采集与处理:于相应时间点将动物麻醉后,经腹主动脉无菌采血,留取 3 ml 加入质量分数为 3.8%的枸橼酸钠抗凝试管,血液与 3.8%枸橼酸钠比例为 1:9,4℃下 2 000 r/min 离心(离心半径

20 cm)7 min。严格无菌留取肝、肺组织,组织标本放置深低温冻存管,于液氮中保存待测。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白含量:取液氮冻存的肝、肺组织各约 100 mg 置于匀浆器中,并加入 3 倍体积冰生理盐水冰浴匀浆,4℃下 2 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 20 min,取上清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定组织上清液中的 TNF- α 浓度,ELISA 检测试剂盒为美国 Biosource 公司产品,检测步骤严格按说明书要求进行;采用美国 Pierce 公司蛋白分析试剂盒测定组织匀浆上清液蛋白定量。将样品的积分光密度值代入标准曲线并乘以相应的稀释倍数,按公式计算组织 TNF- α 蛋白含量[组织 TNF- α 蛋白含量(pg/mg, μ g/kg)=组织匀浆上清液 TNF- α 浓度(pg/L)/组织匀浆上清液蛋白定量(mg/L)]。

1.4.2 凝血指标检测:凝血酶原时间(PT)及活化部分凝血酶原时间(APTT)、纤维蛋白原(Fbg)水平采用凝血四项分析仪进行分析。

1.5 统计学方法:应用 SPSS12.0 统计软件包,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行 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 组织 TNF- α 蛋白含量改变(表 1):正常对照组大鼠肝、肺组织 TNF- α 蛋白含量均较低,于 CLP 后 2 h 迅速升高,其中模型组 8 h 升高幅度最明显,分别为正常对照组的 2.57 倍($P<0.01$)和 4.77 倍($P<0.01$);24 h 肝、肺组织 TNF- α 蛋白水平逐渐回落,但模型组明显高于正常对照组(P 均 <0.01),48 h 恢复至正常范围(P 均 >0.05)。血必净注射液能显著抑制肝、肺组织 TNF- α 蛋白水平升高,CLP 后 2、8 和 24 h 组织 TNF- α 蛋白水平与模型组比较均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且 CLP 24 h 逐渐恢复至伤前基础水平。

2.2 血必净注射液对脓毒症大鼠凝血指标的影响(表 1):与正常对照组相比,模型组 PT 及 APTT 于 CLP 后 2~72 h 表现为不同程度的缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,血必净治疗组 PT 和 APTT 于 2、8 和 24 h 均明显延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),48 h 和 72 h APTT 显著延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。CLP 后 2~72 h 大鼠血浆 Fbg 含量有不同程度下降,模型组与正常对照组比较差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血必净治疗组血浆 Fbg 水平均明显高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

基金项目:天津市卫生局中西医结合科研资助项目(2005088)

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:cccm.23042150@yahoo.com.cn)。

表 1 血必净注射液对脓毒症大鼠肝、肺组织 TNF- α 蛋白水平及凝血指标的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Effect of Xuebijing injection on TNF- α protein levels in liver, lung tissues and coagulation parameters in septic rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

时间	组别	TNF- α ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		凝血指标		
		肝组织	肺组织	PT(s)	APTT(s)	Fbg(g/L)
	正常对照组	102.570 \pm 14.496	5.603 \pm 1.939	22.217 \pm 2.289	21.383 \pm 1.019	2.755 \pm 0.281
	假手术组	120.756 \pm 12.397	7.760 \pm 0.486	19.883 \pm 1.109	20.283 \pm 1.551	2.705 \pm 0.263
CLP 2 h	模型组	210.462 \pm 28.311**	24.080 \pm 3.858**	18.250 \pm 0.701**	16.440 \pm 1.573**	0.975 \pm 0.090**
	血必净治疗组	156.463 \pm 21.828**#	14.346 \pm 3.149**#	22.483 \pm 2.007**#	19.760 \pm 1.959**#	1.990 \pm 0.466**#
CLP 8 h	模型组	263.255 \pm 15.950**	26.753 \pm 2.760**	19.340 \pm 0.551*	15.720 \pm 1.161**	1.642 \pm 0.203**
	血必净治疗组	150.919 \pm 15.761**#	14.607 \pm 3.452**#	21.067 \pm 0.709**#	20.180 \pm 1.254**#	2.323 \pm 0.448**#
CLP 24 h	模型组	147.493 \pm 12.842**	16.634 \pm 0.798**	19.400 \pm 1.939*	19.233 \pm 2.051*	2.202 \pm 0.282**
	血必净治疗组	101.234 \pm 14.808**#	6.304 \pm 1.402**#	21.583 \pm 1.258**#	21.450 \pm 0.880**#	2.595 \pm 0.176**#
CLP 48 h	模型组	104.820 \pm 18.750	9.392 \pm 2.111	15.817 \pm 1.113**	18.433 \pm 1.502**	2.327 \pm 0.124*
	血必净治疗组	93.374 \pm 8.844	6.262 \pm 1.973	16.650 \pm 0.977**	20.257 \pm 1.258**#	3.038 \pm 0.161**#
CLP 72 h	模型组	113.537 \pm 13.742	8.865 \pm 2.320	15.183 \pm 1.113**	17.960 \pm 1.345**	2.120 \pm 0.491**
	血必净治疗组	95.531 \pm 7.301	5.738 \pm 0.288	18.117 \pm 5.272	21.300 \pm 1.619**#	2.692 \pm 0.165**#

注:与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相应时间点比较:# $P<0.05$,## $P<0.01$

3 讨论

目前认为,脓毒症的病理生理基础是全身炎症反应、微血管凝血及血管内皮细胞损伤等因素间的相互促进、相互影响^[8,9]。脓毒症时,内毒素可刺激多种细胞合成,释放大量炎症介质、黏附分子,损伤血管内皮细胞,同时内毒素可刺激单核细胞、内皮细胞表达组织因子(TF),激活凝血系统。在 Ca^{2+} 存在的条件下,内皮细胞损伤后暴露的带负电荷胶原蛋白与TF-FVIIa复合物分别经内、外源途径启动凝血过程^[10]。已明确,凝血酶具有较强的促炎作用,可激活中性粒细胞,直接诱导内皮细胞和巨噬细胞释放致炎因子、黏附因子,介导白细胞-内皮细胞反应;另外,凝血过程的终产物纤维蛋白也具有明显的促炎效应,体外实验证实,纤维蛋白可上调TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)的表达^[11]。凝血系统活化可刺激炎症介质的释放,加重炎症反应;反过来炎症介质又进一步促进凝血过程,二者相互作用,形成恶性循环,诱发弥散性血管内凝血(DIC)、脓毒症,甚至MODS^[12]。已证实,TNF- α 具有强烈的促炎活性,在全身炎症反应及脓毒症的发生发展中发挥关键作用。TNF- α 是炎症早期重要的促炎细胞因子,在炎症反应中可激活细胞因子级联反应,诱发IL-1 β 、IL-6、IL-8以及次级炎症介质合成,如血小板活化因子、前列腺素、一氧化氮和白细胞三烯等,从而导致炎症反应失控^[13]。另外,TNF- α 还可诱导内皮细胞表达TF,激活凝血过程,触发凝血级联反应^[10]。本实验结果显示,CLP后2h实验动物肝、肺组织TNF- α 蛋白水平迅速升高,尤其是在CLP后8h达高峰;同时,反映临床凝血功能障碍指标如

PT、APTT出现不同程度的缩短,血浆Fbg水平明显降低。表明多种微生物致腹腔严重感染可迅速促使肝、肺组织合成并释放大量的TNF- α ,促使机体处于高凝状态。

血必净注射液的有效成分红花黄色素A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药苷、原儿茶醛主要从红花、赤芍、川芎、丹参、当归等中草药中提炼而来。相关研究报道,血必净注射液能有效拮抗内毒素,下调促炎介质水平,调节免疫反应^[5,14],并通过保护受损内皮、改善微循环,避免内毒素攻击所致的组织损伤^[5,7]。本实验中,血必净注射液治疗可明显抑制肝、肺组织TNF- α 蛋白水平上升幅度,并且快速恢复至正常范围。同时,血必净治疗组凝血功能指标PT、APTT及血浆Fbg水平均较模型组明显改善。上述结果表明,脓毒症发展过程中早期使用血必净注射液不仅能抑制肝、肺组织过量表达TNF- α ,减轻多器官炎症反应,同时又能有效缓解严重感染动物产生高凝状态,预防凝血功能紊乱的发生,从而阻断炎症级联与凝血级联的恶性循环,防止脓毒症的进一步发生发展。根据中药具有多层次、多环节、多靶点的作用特点及我们初步观察(数据未显示),推测血必净注射液可能通过影响蛋白C(PC)通路某一成分或某一作用环节发挥上述效应。PC通路具有多重生物学活性,在抑制凝血反应、炎症反应及限制细胞凋亡过程中起重要作用。关于血必净注射液对PC通路的详细作用机制仍有待于深入探讨。

参考文献:

- [1]程蔚新,林洪远,盛志勇.凝血系统紊乱在多器官功能不全综合征发病中的作用[J].中国危重病急救医学,2000,12(10):632-635.

- [2]姚咏明, 盛志勇. MODS 抗炎治疗研究的反思[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 456-458.
- [3]王今达. 开展中西医结合治疗急性危重病的思路和方法[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(6): 323-325.
- [4]盛志勇. 努力提高脓毒症的认识水平[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 131.
- [5]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.
- [6]Chaudry I H, Wichterman K A, Baue A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels[J]. Surgery, 1979, 85(2): 205-211.
- [7]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.
- [8]Bone R C, Grodzin C J, Balk R A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process[J]. Chest, 1997, 112(1): 235-243.
- [9]Iba T, Kidokoro A, Yagi Y. The role of the endothelium in changes in procoagulant activity in sepsis[J]. J Am Coll Surg, 1998, 187(3): 321-329.
- [10]Napoleone E, Di Santo A, Bastone A, et al. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(5): 782-787.
- [11]Herbert J M, Dupuy E, Laplace M C, et al. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway[J]. Biochem J, 1994, 303(Pt 1): 227-231.
- [12]周慧君, 程尉新, 林洪远, 等. 弥散性血管内凝血临床治疗进展[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 635-636.
- [13]姚咏明, 黎洁良. 脓毒性休克与细胞因子[J]. 中国实用外科杂志, 2000, 20(7): 433-435.
- [14]雪琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究——血必净的药效学观察[J]. 中国危重病急救医学, 1997, 9(12): 720-722.

(收稿日期: 2007-01-08)

(本文编辑: 保健媛)

• 经验交流 •

生大黄浸液治疗轻症急性胰腺炎的疗效观察

蔡长泉

(河南省方城县中医院急诊科, 河南 方城 473200)

【关键词】 生大黄; 浸液; 胰腺炎, 急性; 疗效

中图分类号: R285.6; R259 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2007)02-0107-01

2004 年 1 月—2006 年 10 月, 采用综合治疗加服生大黄浸液治疗轻症急性胰腺炎(AP)患者, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 32 例轻症 AP 患者按照随机原则分为两组。试验组 16 例, 男 8 例, 女 8 例; 年龄 18~59 岁, 平均 41 岁。对照组 16 例, 男 7 例, 女 9 例; 年龄 17~58 岁, 平均 43 岁。两组患者临床症状、实验室检查、胰腺 CT 等都支持水肿型胰腺炎改变, 具有诊断意义^[1]。两组患者基础资料比较差异均无显著性(P 均 > 0.05), 有可比性。

1.2 治疗方法: 两组患者均予禁食、输液、静脉给予抑酸剂西咪替丁或奥美拉唑; 防治感染(喹诺酮类、头孢他啶、甲硝唑等), 止痛(阿托品或度冷丁), 维持水和电解质及酸碱平衡, 营养支持等治疗。对照组部分患者插胃管减压; 试验组均不插管, 在综合治疗基础上口服生大黄浸液(生大黄 10 g, 用开水 70 ml 浸泡),

12 h 1 次, 腹痛减轻不明显或无明显腹泻者改为 8 h 1 次。2 d 后腹痛缓解和腹泻严重者减为 24 h 1 次, 4 d 后停用。

1.3 出院标准: ①腹痛、发热、恶心、呕吐等症状消失; ②白细胞计数、分类及淀粉酶连续 2 d 检查正常; ③能进正常膳食 1 d 不再发作。

1.4 统计学处理: 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 治疗效果: 试验组腹痛、恶心、呕吐症状消失天数平均(2.5±1.1)d, 对照组平均(5.0±2.0)d。试验组退热天数平均(3.0±1.4)d, 对照组平均(4.5±2.3)d。试验组血象及淀粉酶恢复正常天数平均(3.5±1.5)d, 对照组平均(5.5±2.8)d。试验组住院天数平均(5.5±1.6)d, 对照组平均(8.0±2.9)d。经统计学处理, 两组差异均有显著性(P 均 < 0.05)。

2 讨论

AP 发病机制极其复杂, 大黄治疗胰腺炎也已被临床证实肯定有效。中医将大黄对 AP 的治疗功用归之为通里攻

下、清热利胆、活血化瘀。研究发现, 大黄对胰腺的保护机制可能与降低胰酶、减少炎症介质、保护胰腺细胞、保护胃肠道以及减少或治疗并发其他器官功能障碍等有关^[2]。

本组结果表明, 加用生大黄浸液治疗可使轻症 AP 患者临床症状消失, 血象及淀粉酶恢复正常, 住院天数均少于对照组。治疗中两组各有 1 例患者出现头晕、乏力症状, 经检查与低血压、低血钾有关, 给予补钾、加大输液量后缓解, 其余患者均无不良反应发生。

值得注意的是, AP 患者由于大量体液渗出, 加上呕吐、禁食和导泻, 血容量减少, 需要积极补充血容量, 维持水、电解质和酸碱平衡以及能量供给。

参考文献:

- [1]叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 466-470.
- [2]王婧, 阴赅宏, 张淑文, 等. 大黄类药物治疗重症急性胰腺炎的进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(5): 318-320.

(收稿日期: 2006-11-18)

(本文编辑: 李银平)

作者简介: 蔡长泉(1965-), 男(汉族), 河南省人, 主治医师。