

· 论著 ·

僵蚕抗凝成分对内毒素休克伴弥散性血管内凝血大鼠的保护作用研究

彭延古, 曾序求, 雷田香, 付灿云

(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的: 探讨僵蚕抗凝成分(ACBB)对大鼠内毒素休克伴弥散性血管内凝血(DIC)的保护作用。方法: 60 只雄性 SD 大鼠被随机分为空白对照组、模型组及 ACBB 高、中、低剂量组, 每组 12 只。采用静脉注射脂多糖(LPS)的方法复制大鼠内毒素休克伴 DIC 模型。ACBB 高、中、低剂量组于注射 LPS 即刻分别由静脉注射 ACBB 36、18 和 9 mg/kg; 空白对照组给予等量生理盐水。注射 LPS 前及 LPS 后 1、3 和 6 h 记录大鼠平均动脉压(MAP); 并于 LPS 后 6 h 经颈总动脉取血, 测定血浆副凝实验(3P 实验)阳性率、D-二聚体含量、血小板计数(PLT)、纤维蛋白原(Fbg)含量及抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)活性。结果: 与空白对照组比较, 随时间延长, 模型组 MAP 显著下降, 6 h PLT、Fbg、AT-Ⅲ均显著降低, D-二聚体、3P 实验阳性率均明显升高, 各指标比较差异均有显著性(P 均 < 0.01)。与模型组比较, ACBB 各剂量组可明显抑制 LPS 引起的 MAP 降低, 抑制 3P 实验阳性率, 增加 D-二聚体含量, 防止休克后 PLT、Fbg、AT-Ⅲ活性降低, 两组比较差异均有显著性(P 均 < 0.01), 且 ACBB 高剂量组各指标几乎接近于空白对照组。结论: ACBB 对内毒素休克伴 DIC 大鼠具有保护作用。

【关键词】 僵蚕抗凝成分; 内毒素休克; 保护作用; 大鼠

中图分类号: R285.5; R259 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)02-0080-03

Protective effect of anticoagulant components of bombyx batryticatus (僵蚕) on endotoxic shock complicated with diffuse intravascular coagulation in rats PENG Yan-gu, ZENG Xu-qiu, LEI Tian-xiang, FU Can-yun. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the protective effect of the anticoagulant components of bombyx batryticatus (僵蚕, ACBB) on endotoxic shock complicated with diffuse intravascular coagulation (DIC) in rats. **Methods:** Sixty SD rats were randomly divided into blank control group, model group, high, middle and low doses of ACBB group (each group $n=12$). The animal model with endotoxic shock was reproduced by lipopolysaccharide (LPS) intravenous injection. Then, high, middle and low doses of ACBB (36, 18 and 9 mg/kg) were intravenously injected to observe its protective effects on the pathological changes due to LPS injection. The same amount of normal saline was given to blank control group. Mean arterial pressure (MAP) was recorded before and 1, 3 and 6 hours after LPS injection. Positive rate of plasma protamine paracoagulation test (3P test), D-dimer, platelet count (PLT), plasma fibrinogen (Fbg) content and antithrombin Ⅲ (AT-Ⅲ) activity were detected in blood collected from the common carotid artery 6 hours after LPS injection. **Results:** Compared with blank control group, MAP levels were significantly decreased in model group at different time points, PLT, Fbg and AT-Ⅲ were lowered, while D-dimer and positive rate of 3P test were elevated in model group 6 hours after LPS injection, and the differences were significant (all $P < 0.01$). Compared with the model group, ACBB significantly inhibited the decrease of MAP induced by LPS. ACBB also remarkably attenuated the positive rate of 3P test, increased D-dimer content, and prevented the decrease of the PLT, Fbg, and activity of AT-Ⅲ after shock (all $P < 0.01$). The indexes mentioned above in the high-dose ACBB group were nearly close to those of blank control group. **Conclusion:** These facts demonstrate that ACBB can protect rats from endotoxic shock complicated with DIC.

【Key words】 anticoagulant components of bombyx batryticatus; endotoxic shock; protective effect; rats

休克是临床常见急危重症之一, 产生的原因很

多^{〔1〕}。在革兰阴性(G^-)菌严重感染时, 大量内毒素进入血液, 引起弥散性血管内凝血(DIC)或加速组织损伤, 并引起继发性纤溶为特征的获得性出血综合征。休克本身不是一种独立性疾病, 而是作为重要

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30171159)

作者简介: 彭延古(1952-), 女(土家族), 湖南省人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事血栓与止血的中西医结合基础研究。

的中间病理环节,存在于许多疾病中。由于广泛凝血与继发纤溶造成血小板和凝血因子大量消耗,因而出现凝血功能障碍。肝素作为抗凝药,人们曾给予了极大的关注。新近实验提出肝素对 DIC 预后无益,因此,迫使人们从天然抗凝蛋白和具有活血化瘀作用的中药中寻找抗 DIC 的有效药物。20 世纪 90 年代以来,针对细胞因子的单克隆抗体和可溶性受体以及炎症介质拮抗剂的研究无一通过 III 期临床试验。但在我国用中医药治疗内毒素休克的结果却令人鼓舞^[2]。僵蚕为传统中药,本实验运用生化实验手段,从僵蚕中提取出有抗凝血作用的有效成分。本研究药理学实验表明僵蚕抗凝成分(ACBB)除具有拮抗凝血酶外,还具有抗因子 Xa 的作用^[3]。本研究旨在探讨 ACBB 在内毒素休克中的作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:僵蚕经水煮醇沉凝胶过滤以及交换层析后分离纯化出 ACBB,制成注射剂备用。革兰阴性(G⁻)菌(E. coli O111:B4)脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司,用生理盐水配成 2 g/L 溶液;D-二聚体、抗凝血酶 III(AT-III)均由上海太阳生物技术公司提供。

1.2 模型制备及分组:60 只雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,由湖南省卫生防疫站动物中心提供。按随机数字表法将动物分为空白对照组、模型组及 ACBB 高、中、低剂量组,每组 12 只。腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉大鼠,颈部正中切口,常规气管插管,术后 15 min 由静脉给予 LPS 5 mg/kg 或等量生理盐水;ACBB 高、中、低剂量组由静脉注入的 ACBB 量为 36、18 和 9 mg/kg。各组动物左颈动脉插管连接血导生理记录仪持续监测平均动脉压(MAP),记录 LPS 前,LPS 后 1、3 和 6 h 的 MAP。LPS 后 6 h 颈总动脉取血,用质量分数为 3.8%的枸橼酸钠抗凝(1:9),分离血浆于-30℃保存备用。

1.3 指标及测定方法:①D-二聚体测定用酶联免疫吸附法(ELISA);②AT-III 活性测定用发色底物

法;③血小板计数(PLT)用直接计数法;④纤维蛋白原(Fbg)定量用双缩脲法;⑤血浆副凝实验(3P 实验)用鱼精蛋白法。

1.4 统计学分析:计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据处理用 SPSS10.0 统计软件,两组间比较 *t* 检验,多组数据做单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ACBB 对内毒素休克大鼠 MAP 的影响(表 1):空白对照组各时间点 MAP 无明显变化;模型组大鼠在注入 LPS 后随时间延长,MAP 明显降低(P 均 <0.05),且与空白对照组相比差异有显著性(P 均 <0.01),表明内毒素休克模型复制成功。ACBB 各剂量组在注入 LPS 后,MAP 下降不明显,但均明显高于模型组(P 均 <0.01),其中高剂量组与空白对照组水平相当。

2.2 ACBB 对内毒素休克大鼠凝血功能的影响(表 1):模型组 6 h PLT、Fbg 和 AT-III 活性均显著下降(P 均 <0.01),说明发生了 DIC。与模型组比较,ACBB 各剂量组各项指标改变程度均较轻(P 均 <0.01),其中高剂量组改变最轻;与空白对照组比较差异无显著性(P 均 >0.05)。

2.3 ACBB 对内毒素休克大鼠 D-二聚体、3P 实验的影响(表 1):注入 LPS 后动物均诱发不同程度的内毒素休克。模型组 D-二聚体含量和 3P 实验阳性率均明显高于空白对照组(P 均 <0.01)。ACBB 各剂量组 D-二聚体含量和 3P 实验阳性率均明显低于模型组(P 均 <0.01),其中以高剂量组为甚。

3 讨 论

体内注射 LPS 会产生类似感染性休克的病理改变,并且内毒素休克通常并发 DIC^[4]。新近研究表明,炎症与凝血之间存在网络关系,因此,使用抗凝物质来防治内毒素休克似乎是合理的^[5]。但新近也有研究者提出,以往作为抗凝药的肝素对 DIC 预后无益,可能是由于以下两个原因:①与成纤维细胞生

表 1 ACBB 对内毒素休克大鼠 MAP 动态变化及凝血功能的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of ACBB on dynamic change of MAP and coagulation function of rats with endotoxic shock($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	MAP(mm Hg)				PLT ($\times 10^9/L$)	Fbg (g/L)	AT-III (%)	D-二聚体 (mg/L)	3P 实验 阳性率
		LPS 前	LPS 后 1 h	LPS 后 3 h	LPS 后 6 h					
空白对照组	12	107.0±6.1	99.4±4.9	98.9±5.3	99.3±3.9	365±80	2.69±0.56	97.40±12.80	0.26±0.06	0.65±0.19
模型组	12	101.0±4.7	81.3±7.5 ^Δ	67.4±6.9 ^Δ	51.7±7.3 ^Δ	195±33 ^Δ	1.56±0.41 ^Δ	68.70±12.10 ^Δ	0.98±0.10 ^Δ	1.85±0.17 ^Δ
ACBB 低剂量组	12	102.5±4.4	90.3±6.2 [#]	79.3±9.3 [#]	87.3±11.8 [#]	341±83 [#]	2.09±0.30 [#]	84.30±18.40 [#]	0.43±0.05 [#]	0.93±0.18 [#]
ACBB 中剂量组	12	104.2±7.6	92.5±5.9 [#]	83.3±4.3 [#]	94.9±8.1 [#]	332±65 [#]	2.21±0.28 [#]	88.10±15.60 [#]	0.40±0.08 [#]	0.85±0.15 [#]
ACBB 高剂量组	12	106.5±5.1	95.2±8.3 [#]	89.5±6.5 [#]	101.5±8.6 [#]	355±45 [#]	2.45±0.32 [#]	99.60±14.30 [#]	0.35±0.04 [#]	0.79±0.20 [#]

注:与空白对照组比较:^Δ $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.01$;1 mm Hg=0.133 kPa

长因子结合,加速细胞与凝血效应有关的信号转导;②肝素使血管内皮细胞表面组织因子途径抑制物(TFPI)释放,导致内皮受损。在内毒素休克的发病早期,主动脉、肺动脉血管张力调节机制均有明显紊乱,表现为 MAP 进行性降低^[6]。目前认为内毒素休克低血压的发生机制,除了内毒素对血管的直接作用外,还与激活巨噬细胞和中性粒细胞,使诱生型一氧化氮合酶表达,产生大量一氧化氮(NO)引起血管扩张、血管反应性降低、心肌收缩力降低有关^[7]。我们在以往的实验中发现,僵蚕对红细胞膜具有保护作用,而且对内毒素所致的溶血具有抑制作用^[8]。本实验显示 ACBB 能抑制内毒素引起的低血压,但共同作用机制是否与抑制 NO 产生有关尚不清楚。

AT-Ⅲ 是人体内最为重要的生理性抗凝物质,主要作用是灭活凝血过程启动后形成的凝血酶,同时还有抑制因子 Xa 的作用。肝素通过与 AT-Ⅲ 中的赖氨酸结合,增强其抗凝作用,故 AT-Ⅲ 变化是衡量 DIC 严重性的重要指标。有报道,血中 AT-Ⅲ 活性与 DIC 有密切关系^[9];也有实验证明 AT-Ⅲ 对 DIC 的诊断性敏感率可达 91.9%,当 AT-Ⅲ 有消耗性降低时,肝素治疗又可加剧 AT-Ⅲ 活性下降,不仅有助于 DIC 的发展,而且降低了肝素的治疗效果^[10];观察内毒素血症大鼠凝血指标变化时发现,AT-Ⅲ 治疗 DIC 时各凝血指标的变化有一致性,使用外源性 AT-Ⅲ 可改善 DIC 时的凝血功能紊乱^[11]。而 ACBB 具有与肝素不同的特点,无论 AT-Ⅲ 是否存在于血浆,均可抑制凝血酶水解 Fbg 转变为纤维蛋白,表明其抗凝血酶活性不依赖于 AT-Ⅲ 的性质。本研究结果表明 ACBB 诱发 AT-Ⅲ 活性下降,能明显减轻内毒素休克的程度,因此它对 DIC 的治疗具有重要意义。

PLT 在生理性止血过程中发挥重要作用,其减少所致出血是血液系统疾病最常见的临床表现之一,主要原因有 PLT 生成减少与 PLT 消耗、破坏过多。PLT 下降说明被激活的环氧化酶途径代谢活跃以及 α 颗粒内物释放增加,其下降程度与炎症的发展有关,提示 PLT 的活化可引起其消耗,在 DIC 的发生发展过程中有重要作用。DIC 引起的 PLT 活化可能与微血管血栓形成的出血倾向有关。ACBB 可对抗内毒素休克的 PLT 降低,这可能与抑制 PLT 活化、抑制血栓形成有关。

DIC 的病理过程中除凝血功能改变外,尚有纤溶功能改变。D-二聚体是纤维蛋白在纤溶酶的作用下分解的一种特异性代谢产物,血浆 D-二聚体是

诊断 DIC 早期特异的指标^[12]。鱼精蛋白可使纤维蛋白单体(FM)与纤维蛋白降解产物所形成的可溶性复合物中的 FM 游离出来,随后自行聚合成肉眼可见的不溶性纤维蛋白,它是反映 Fbg 碎片 X 存在的指标之一。3P 实验阳性通常见于各类有高凝状态或 DIC 的疾病,D-二聚体与 3P 实验均为反映体内存在继发性纤维蛋白溶解的指标,血浆 Fbg 减少是急性 DIC 改变的重要指标之一。本研究结果显示,发生内毒素休克时血浆 Fbg 消耗性减少。而 ACBB 抑制 3P 实验阳性率与 D-二聚体含量增高,可防止血浆 Fbg 含量降低。说明 ACBB 能明显抑制凝血过程,但对纤溶系统是否有抑制作用有待进一步研究。

内毒素休克合并 DIC 时,由于广泛微血栓形成,引起 PLT 和 AT-Ⅲ 被消耗,凝血系统和纤溶功能改变,而 ACBB 可对抗内毒素休克后 PLT 下降,防止血浆 AT-Ⅲ 活性降低,抑制纤溶系统的亢进。说明僵蚕对内毒素休克时微血栓形成和凝血以及纤溶系统的亢进具有抑制作用,但僵蚕对 DIC 的具体作用环节有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] 罗正曜. 休克学[M]. 天津:天津科学技术出版社,2001:1-3.
- [2] 王本芙. 中医药抗内毒素损伤的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(2):121-124.
- [3] 李安国,彭延古,邓常青,等. 僵蚕提取液抗凝活性的初步研究[J]. 湖南中医学院学报,1992,12(3):37-38.
- [4] 马宏博,姜良铎,朱陵群. 扶正排毒液治疗内毒素休克实验研究[J]. 中国中医急症,2006,15(3):283-284.
- [5] 王鸿利. 炎症-凝血网络与血栓形成的关系[J]. 外科理论与实践,2006,11(1):61-63.
- [6] 段国辰,凌亦凌,谷振勇,等. 八肽胆囊收缩素对家兔内毒素休克时主动脉及肺动脉反应性改变的影响[J]. 中国急救医学,2002,22(12):693-697.
- [7] Landry D W, Oliver J A. The pathogenesis of vasodilatory shock[J]. N Engl J Med,2001,345(8):588-595.
- [8] 彭延古,曾序求,徐爱良,等. 僵蚕抗内毒素所致红细胞膜损伤作用的研究[J]. 湖南中医学院学报,2004,24(3):1-2.
- [9] Minnema M C, Chang A C, Jansen P M, et al. Recombinant human antithrombin Ⅲ improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with escherichia coli[J]. Blood,2000,95(4):1117-1123.
- [10] 龚波,尹定加,杜景云,等. 弥散性血管内凝血快速实验室诊断指标的价值[J]. 中华现代临床医学杂志,2005,3(17):1744-1745.
- [11] 乔佑杰,祝君梅,由希雷,等. 抗凝血酶 Ⅲ 对内毒素血症大鼠凝血功能异常的治疗作用[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(3):165-167.
- [12] 姚斌,徐大庆. 血浆 D-二聚体对弥散性血管内凝血患者的检测及意义[J]. 辽宁医学杂志,2006,20(1):11-12.

(收稿日期:2006-10-25 修回日期:2007-03-10)

(本文编辑:李银平)