

血必净注射液对脓毒症大鼠活化蛋白 C 及凝血功能的影响

李银平¹, 郑贵军², 武子霞¹, 姚咏明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活化蛋白 C(APC)及其凝血功能的影响。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型。清洁级雄性 Wistar 大鼠 104 只被随机分为正常对照组、假手术组、脓毒症模型组和血必净治疗组, 各组按处死时间分为术后 12、24、48、72 h 4 个亚组, 每组 8 只。除正常对照组外, 其余各组分别于术后 2 h 给予生理盐水或血必净注射液(4 ml/kg)1 次。各组在相应时间点处死 8 只动物, 经腹主动脉取血, 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆 APC、血管性假血友病因子(vWF)和血管性假血友病裂解酶(ADAMTS-13)的含量; 肝素抗凝测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FBG)含量、血小板计数(PLT)等凝血功能指标。结果 与正常对照组比较, 脓毒症组血浆 APC 含量均有不同程度的下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 用血必净注射液治疗后, APC 水平随时间延长逐渐升高。CLP 后大鼠血浆 vWF 含量升高; 用血必净注射液治疗后均有不同程度的降低, 以 12、24、48 h 最为明显。CLP 后大鼠 ADAMTS-13 含量在 12 h 略有升高($P < 0.01$), 但随时间延长明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 用血必净注射液后能明显升高 ADAMTS-13 含量(P 均 < 0.01)。CLP 后, PT、APTT 均有不同程度缩短, FBG 含量降低, PLT 减少; 用血必净注射液后, 凝血功能得到明显改善。结论 血必净注射液能提高脓毒症大鼠血浆 APC、ADAMTS-13 水平, 降低 vWF 含量, 明显改善脓毒症大鼠的凝血功能。

【关键词】 血必净注射液; 脓毒症; 活化蛋白 C; 凝血功能; 大鼠

中图分类号: R285.5; R365 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)06-0361-04

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on activated protein C and coagulation parameters in septic rats
LI Yin-ping¹, ZHENG Gui-jun², WU Zi-xia¹, YAO Yong-ming³. 1. Tianjin Union Hospital, Tianjin 300050, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 3. Burns Institute, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of traditional Chinese medicine Xuebijing injection (血必净注射液) on activated protein C (APC) expression and blood coagulation parameters in septic rats. **Methods** Wistar rats were subjected to sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). One hundred and four clean healthy Wistar rats were randomly divided into four groups: normal group, sham operation group, septic model group, and Xuebijing-treated group. According to the time of sacrifice, the latter three groups were subdivided into four subgroups: 12, 24, 48, and 72 hours subgroups (each $n=8$). Except normal group, normal saline (NS) or Xuebijing injection (4 ml/kg) was injected into the other three groups within 2 hours after operation. The blood samples of each group were collected at various time points from abdominal aorta. The levels of plasma APC, von willebrand factor (vWF), von willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) were measured by enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA); the indexes of blood coagulation function, such as levels of plasma prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and fibrinogen (FBG) were examined with heparin anti-coagulative blood, and the number of platelets (PLT) was counted. **Results** Compared with the normal group, APC levels in plasma were decreased in various degrees in the septic group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); after treatment with Xuebijing injection, APC concentration was gradually increased with the prolongation of time. Compared with the normal group, the plasma vWF remained markedly elevated up from 12 to 72 hours after CLP, and it was dramatically inhibited by Xuebijing injection during 12-72 hours, especially significant at 12, 24 and 48 hours time points. After CLP-operation, ADAMTS-13 level in plasma was slightly increased at 12 hours ($P < 0.01$), but from 24 to 72 hours, its level in plasma was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and it was markedly improved or elevated in Xuebijing-treated group (all $P < 0.01$). In septic group, the times of plasma PT and APTT were shortened in various degrees, and the FBG level was decreased, and the number of PLT also decreased; after the use of Xuebijing injection, the coagulative function was improved obviously.

Conclusion These data suggest that Xuebijing injection increase plasma APC and ADAMTS-13 level, and depress plasma vWF content in rats with sepsis, it may significantly improve the blood coagulative function in rats with sepsis.

【Key words】 Xuebijing injection; sepsis; activated protein C; blood coagulation function; rat

脓毒症(sepsis)指由感染引起的全身炎症反应,是创伤、烧伤、休克、感染等临床急危重患者的严重并发症之一,也是诱发脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)的重要原因。脓毒症的发病机制极为复杂,近年来的研究证实,凝血系统异常和炎症“瀑布”反应在脓毒症发生发展过程中具有重要作用,是脓毒症、MODS 发生的重要机制之一。目前尽管采用了综合的急救措施和最先进的药物,但其在重症加强治疗病房(ICU)的病死亡率仍居高不下^[1]。血必净注射液是治疗脓毒症的中药静脉制剂,本课题组在前期的实验研究中发现,血必净注射液在改善脓毒症大鼠凝血功能异常方面有显著疗效^[2];并且发现其机制表现在对肝脏组织蛋白 C(PC)、内皮蛋白 C 受体(EPCR)和血栓调节蛋白(TM)的 mRNA 表达的调节方面^[3-4]。脓毒症时,由于炎症反应和内皮功能障碍,PC 系统被破坏,使 PC 转化成活化蛋白 C(APC)的能力大大降低,而用 APC 的替代品重组人 APC 治疗严重脓毒症时,能改善患者的病死情况。故本实验中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 APC 的生成及其凝血功能的影响。

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。适应性饲养 1 周后,按照 Chaudry 等^[5]报告的方法行 CLP,复制严重腹腔感染致脓毒症模型。术前禁食 12 h,自由饮水。以盐酸氯胺酮注射液与速眠新 I 注射液按体积比 8:3 混合,0.4 ml/kg 肌肉注射麻醉大鼠,腹正中线切口,暴露盲肠并结扎根部(避免结扎回肠及盲肠系膜血管),用 16 号穿刺针贯通穿刺盲肠 3 次形成肠瘘,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,自由饮水。假手术组仅开腹翻动盲肠后关腹。

1.2 动物分组及给药:将 104 只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 4 组,后 3 组再分为术后 12、24、48 和 72 h 组,每组 8 只。血必净各组于 CLP 后 2 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惠赠,批号:Z20040033)4 ml/kg 1 次;模型组给予等量生理盐水。

1.3 血标本及组织标本的采集与处理:按相应时间点将动物麻醉后,经腹主动脉无菌采血,留取 3 ml 入含有抗凝剂的真空采血管内,2 h 内进行凝血功能测定;留取 2 ml 全血做血常规测定;再留取 3 ml 血于含有 3.8%枸橼酸钠的试管内,血液与 3.8%枸橼酸钠比例为 9:1,立即离心 15 min,分离血浆于 -80 ℃ 保存待用。

1.4 检测指标及方法:血浆 APC 含量用大鼠 APC 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国 USCN 公司)检测,严格按说明书步骤进行,将样品吸光度(A)值代入标准曲线,计算出样品 APC 的浓度。血浆血管性假血友病因子(vWF)、血管性假血友病裂解酶(ADAMTS-13)含量分别用 ELISA 试剂盒(美国 USCNLIFE 公司)测定;凝血功能采用 ILACLTOP 凝血四项分析仪进行分析;采用 SysmexXT-1800i 血常规分析仪进行血小板计数。

1.5 统计学方法:用 SPSS 13.0 统计软件包,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析和 t 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血必净注射液对脓毒症大鼠血浆 APC 的影响(表 1):假手术组各时间点 APC 含量与正常对照组比较差异无统计学意义(P 均>0.05);CLP 后 12 h 血浆 APC 含量开始下降,随着时间的延长,APC 含量呈逐渐下降的趋势,至 72 h 与正常对照组比较差异仍有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01);用血必净注射液治疗 12 h 后,血浆 APC 含量显著升高(P<0.05 或 P<0.01),在 48 h 和 72 h 时升高显著。

2.2 血必净注射液对脓毒症大鼠血浆 vWF、ADAMTS-13 含量的影响(表 1):假手术组与正常

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602),天津市卫生局中西医结合科研项目(2005088),天津市现代中药大品种群系统开发基金资助项目(2006)

作者简介:李根平(1961-),女(汉族),湖北省人,研究员,硕士生导师,享受国务院津贴专家,现任中国病理生理学会危重病医学分会全国委员,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.

对照组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05);脓毒症组血浆 vWF 从 12 h 开始升高,在 48 h 和 72 h 最为明显(P 均 <0.01);经血必净注射液治疗后血浆 vWF 在各个时间点均有所降低,在 12、24 和 48 h 最明显(P 均 <0.01)。正常对照组血浆 ADAMTS-13 含量与假手术组比较差异无统计学意义;脓毒症组在 12 h 时略有升高($P<0.01$),24 h 后 ADAMTS-13 水平逐渐下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),至 72 h 最为明显;经血必净注射液治疗 24、48、72 h 均显著升高(P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠血浆 APC、vWF 和 ADAMTS-13 的变化比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	时间(h)	APC($\mu\text{g/L}$)	vWF(g/L)	ADAMTS-13(mg/L)
假手术组	12	3.36 \pm 0.15	16.08 \pm 0.70	181.27 \pm 2.27
	24	3.23 \pm 0.16	16.30 \pm 1.30	182.83 \pm 7.28
	48	3.20 \pm 0.19	14.18 \pm 1.93	186.63 \pm 3.88
	72	2.76 \pm 0.35	18.47 \pm 1.93	169.31 \pm 10.97
脓毒症组	12	3.06 \pm 0.35 ^{ac}	16.47 \pm 0.48	185.65 \pm 2.39 ^{bd}
	24	3.01 \pm 0.16 ^{bc}	17.11 \pm 0.61	171.96 \pm 10.54 ^{ac}
	48	2.72 \pm 0.58 ^{bc}	19.36 \pm 3.46 ^{bc}	171.95 \pm 3.64 ^{bd}
	72	2.13 \pm 0.56 ^{bd}	22.18 \pm 2.07 ^{bd}	158.25 \pm 7.73 ^{bc}
血必净组	12	3.38 \pm 0.26 ^e	15.32 \pm 0.73 ^f	183.69 \pm 2.33
	24	3.27 \pm 0.27 ^e	13.99 \pm 2.50 ^f	185.03 \pm 6.18 ^f
	48	3.34 \pm 0.27 ^{ef}	13.97 \pm 2.01 ^{ef}	191.90 \pm 3.64 ^{ef}
	72	3.39 \pm 0.51 ^f	20.98 \pm 2.34 ^f	183.56 \pm 8.80 ^{ef}

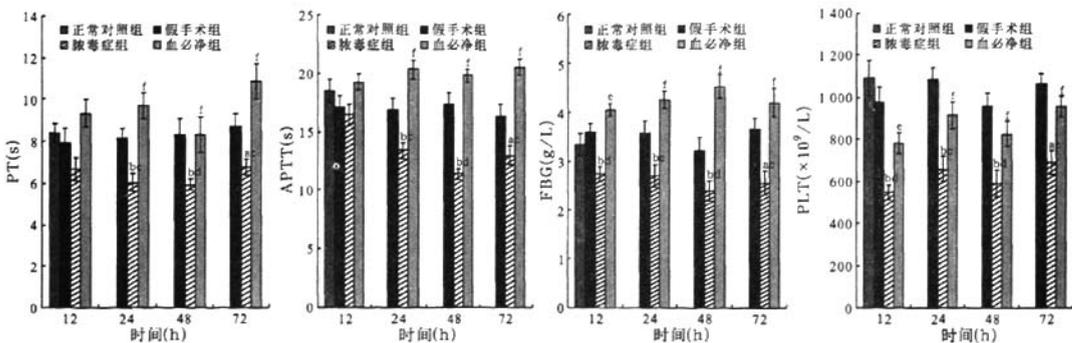
注:正常对照组 APC 为(3.41 \pm 0.12) $\mu\text{g/L}$,vWF 为(15.89 \pm 1.92)g/L,ADAMTS-13 为(182.41 \pm 4.84)mg/L;与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与假手术组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与脓毒症组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$

2.3 血必净注射液对脓毒症大鼠凝血功能的影响(图 1):假手术组凝血功能指标与正常对照组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。脓毒症组凝血酶

原时间(PT)在 CLP 后 12 h 与正常对照组、假手术组比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05);24、48、72 h 明显缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中以 24 h、48 h 最为显著;血必净组 24、48、72 h PT 较脓毒症组显著延长(P 均 <0.01),且与正常对照组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。活化部分凝血活酶时间(APTT)在脓毒症组术后 24、48、72 h 较正常对照组、假手术组均明显缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$);给予血必净注射液后 24、48、72 h APTT 较脓毒症组均显著延长(P 均 <0.01),且与正常对照组、假手术组比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。纤维蛋白原(FBG)在脓毒症组于术后 12 h 起较正常对照组、假手术组均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),在 48 h 达最低点;给予血必净注射液后各时间点均较脓毒症组明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。血小板计数(PLT)在 CLP 后 12 h 起均较正常对照组、假手术组明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且在 12 h 达最低点;给予血必净注射液后各时间点 PLT 含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),以 24 h 最明显。

3 讨论

业已明确,脓毒症时由于炎性细胞过度激活,产生和释放大量的细胞因子,这些释放到血液中的细胞因子通过各种途径激活了凝血系统,机体随即产生抗凝物质和启动纤溶系统。同时纤溶系统及生理性的抗凝系统受到不同程度的抑制,血液处于高凝状态,微血管内微血栓广泛形成,导致微循环障碍^[6]。以前的观点认为,凝血功能障碍或弥散性血管内凝血(DIC)是脓毒症晚期的并发症,而近年来的动物实验和临床研究证实凝血功能紊乱贯穿于脓毒症的整个病理过程,凝血级联反应是脓毒症发生发



注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与假手术组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与脓毒症组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$

图 1 各组大鼠不同时间点凝血指标变化比较

展和预后的决定因素之一^[7-8]。在脓毒症的病理过程中,病原体及其毒素、以及来源于宿主本身的细胞因子均可激活内皮细胞,使内皮细胞在结构和功能上都发生了改变。暴露出来的内皮细胞亚结构使各种蛋白水解酶释放,从而启动内源性凝血系统。在内毒素和炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)等的刺激下,内皮细胞释放组织因子(TF),启动外源性凝血途径并加速凝血酶的产生^[9]。PC 系统是人体内重要的天然抗凝系统,它由 PC、PS、TM 和 EPCR 组成。凝血酶与 TM 结合后,凝血酶-TM 复合物将 PC 提呈给 EPCR,使 PC 转化成 APC,APC 具有抗血栓形成、促进纤维蛋白溶解及抗炎特性,在严重脓毒症的发病机制中起重要作用。内皮细胞被激活后,由于内皮细胞丧失 TM 和 EPCR,导致 PC 转化为 APC 的正常途径被破坏,使 APC 生成的速率大大降低。加上 APC 被大量消耗,致使循环血液中的 APC 浓度远低于正常水平,无法阻止高凝状态引起的微血栓堵塞,导致多器官功能衰竭和死亡^[10]。

vWF 是一种多聚体高分子蛋白质,由血管内皮细胞或单核/巨噬细胞合成,存在于血管内皮的 Weibel-palade 小体、血浆和血小板的 α 颗粒内。当血管内皮受损时,可致 vWF 等内皮细胞内容物释放入血增多,vWF 可通过膜糖蛋白结合位点形成血小板膜糖蛋白(Ib)-vWF-内皮下纤维,参与血小板与血管壁的黏附,vWF 也可通过与糖蛋白 I b/II a 膜结合位点与血小板结合,有利于血小板的聚集;vWF 也可以与胶原结合,从而引起血小板的黏附与聚集。ADAMTS-13 主要在肝脏内合成,可将大分子质量的 vWF 多聚体水解成生理状态的小分子肽段。ADAMTS-13 活性的改变或 vWF 对该酶敏感度的改变均可影响 vWF 的降解,从而改变 vWF 与血小板和内皮下胶原的结合能力。脓毒症时,内皮细胞受损,vWF 释放增多,而 ADAMTS-13 水平下降^[11]。近年来研究发现,vWF 抗原水平的升高和 ADAMTS-13 水平的下降与脓毒症患者的预后密切相关^[12]。

血必净注射液主要由红花、赤芍、川芎、丹参、当归等活血化瘀中药提炼而成。有研究表明,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,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^[13]。本实验中用血必净注射液干预脓毒症大鼠,结果发现,给药后血浆 APC 浓度虽然未达到正常水平,但较脓毒症组显著提高;血

浆 vWF 水平明显降低。脓毒症组血浆 ADAMTS-13 水平在 12 h 时比血必净组略微升高。可能与 12 h 时肝脏受到内源性毒素的刺激而释放增加有关。但是随着时间的推移,血必净组 ADAMTS-13 水平明显高于脓毒症组,PT 和 APTT 明显延长,FBG 有不同程度的升高,PLT 有所增加,从而有效缓解了脓毒症大鼠的高凝状态,防止脓毒症病程的进一步发展。

参考文献

- [1] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study[J]. Crit Care Med 2006,34(2):344-353.
- [2] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠肿瘤坏死因子-a 及凝血功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007,14(2):104-107.
- [3] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠蛋白 C 及肿瘤坏死因子基因表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007,19(8):488-491.
- [4] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠血栓调节蛋白及内皮蛋白 C 受体基因表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007,19(6):365-368.
- [5] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels[J]. Surgery, 1979, 85(2): 205-211.
- [6] Bauer I, Bauer M, Raddatz A, et al. Influence of gender on stimulated cytokine response in patients with severe sepsis [J]. Anaesthetist, 2006,55(5):515-527.
- [7] Hack CE. Tissue factor pathway of coagulation in sepsis[J]. Crit Care Med, 2000,28(9 Suppl):S25-30.
- [8] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2008:468-470.
- [9] Esmon CT. The impact of the inflammatory response on conglutation[J]. Thromb Res, 2004,114(5-6):321-327.
- [10] Hodgson A, Ryan T, Moriarty J, et al. Plasma exchange as a source of protein C for acute onset protein C pathway failure [J]. Br J Haematol, 2002,116(4):905-908.
- [11] Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow[J]. Blood, 2004,104(1):100-106.
- [12] Martin K, Borgel D, Lerolle N, et al. Decreased ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure[J]. Crit Care Med, 2007,35(10):2375-2382.
- [13] 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.

(收稿日期: 2008-08-10)
(本文编辑: 保健媛)

• 广告目次 •

- ①天津生化制药有限公司: 注射用氢化可的松琥珀酸钠 (封二)
- ②天津红日药业: 血必净注射液 (封底)