

• 论著 •

参附注射液对失血性休克大鼠小肠组织血栓调节蛋白及蛋白 C 受体表达的影响

李智强, 潘景业, 张近波, 陈 洁, 王晓蓉, 姚震亚

(温州医学院附属第一医院 ICU, 浙江 温州 325000)

【摘要】目的 探讨参附注射液对失血性休克大鼠小肠组织血栓调节蛋白(TM)及内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)表达的影响。**方法** 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、假休克组、失血性休克组、林格液组、参附液组, 每组 10 只。用放血法制备大鼠失血性休克模型。林格液组制模后 30 min 内输注 3 倍失血量的林格液; 参附液组先输注参附注射液 10 ml/kg, 再补充林格液至 3 倍失血量; 假休克组仅插管、不流血。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测各组大鼠小肠组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 与假休克组比较, 休克组和林格液组 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达均明显增高(TM mRNA, 1.074 ± 0.051 、 1.037 ± 0.042 比 0.627 ± 0.055 , EPCR mRNA; 1.262 ± 0.069 、 1.209 ± 0.110 比 0.869 ± 0.065), TM 和 EPCR 的蛋白水平均明显下降(P 均 < 0.05); 与林格液组比较, 参附液组 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达显著下降(0.627 ± 0.047 、 0.886 ± 0.057), TM 和 EPCR 的蛋白含量显著升高(P 均 < 0.05)。**结论** 参附注射液可能通过基因、蛋白水平影响失血性休克大鼠小肠组织 TM 及 EPCR 的表达, 从而阻止失血性休克的发展。

【关键词】 失血性休克; 参附注射液; 血栓调节蛋白; 内皮细胞蛋白 C 受体

中图分类号: R285.5; R541.64 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.013

Effects of Shenfu injection (参附注射液) on intestina parva tissue thrombomodulin and endothelial cell protein C receptor in rats with hemorrhagic shock LI Zhi-qiang, PAN Jing-ye, ZHANG Jin-bo, CHEN Jie, WANG Xiao-rong, YAO Zhen-ya. *Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China*

Corresponding author: PAN Jing-ye

【Abstract】Objective To investigate the effects of Shenfu injection (参附注射液) on the expressions of intestina parva tissue thrombomodulin (TM) and endothelial cell protein C receptor (EPCR) in rats with hemorrhagic shock. **Methods** Fifty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups (each $n=10$); normal control, sham shock, hemorrhagic shock, Ringer's solution-treated and Shenfu-treated groups. The hemorrhagic shock model was made by blood depletion method. Ringer's solution three times the blood loss in volume was infused into the rats 30 minutes after the model was established. In Shenfu-treated group 10 ml/kg Shenfu injection was infused first in the model, and then Ringer's solution was infused to complete the volume of three times the blood loss. In sham shock group, only was catheterization performed without blood depletion. TM and EPCR mRNA and protein expressions in intestina parva tissue of the rats in various groups were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. **Results** The mean levels of the expression of TM and EPCR mRNA were significantly higher in hemorrhagic shock and Ringer's-treated groups than those in sham shock group (TM mRNA, 1.074 ± 0.051 , 1.037 ± 0.042 vs. 0.627 ± 0.055 ; EPCR mRNA; 1.262 ± 0.069 , 1.209 ± 0.110 vs. 0.869 ± 0.065), while the mean levels of TM and EPCR protein of the former two groups were lower than those in the latter group (all $P < 0.05$). Compared with Ringer's-treated group, the mean levels of the expression of TM and EPCR mRNA were obviously lower (0.627 ± 0.047 , 0.886 ± 0.057), while the levels of their protein were significantly higher than those in Shenfu-treated group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that Shenfu injection effect TM and EPCR mRNA and protein expressions of intestina parva tissue, thereby it may effectively prevent the development of hemorrhagic shock.

【Key words】 hemorrhagic shock; Shenfu injection; thrombomodulin; endothelial cell protein C receptor

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y207635)

通信作者: 潘景业

作者简介: 李智强(1983-), 男(汉族), 湖北省人, 硕士研究生, Email: lizhiqiang000@yahoo.cn.

失血性休克是急诊较为常见的休克类型,常导致多器官功能衰竭而致患者死亡。肠黏膜作为肠道乃至整个机体代谢最活跃的部位,在创伤、休克及严重感染时最易受缺血/再灌注(I/R)等病理因素影响,导致肠黏膜屏障功能受损,细菌移位和内毒素血症激发细胞因子及炎症介质的连锁反应,导致持续性炎症细胞因子释放和全身炎症反应综合征(SIRS)的发生,甚至出现多器官功能障碍综合征(MODS)^[1]。Lillehei 等^[2]提出小肠是休克向不可逆发展的关键器官。因此,保护肠黏膜屏障是阻止休克向不可逆方向发展的关键环节^[3]。

蛋白 C(PC)系统是人体内重要的天然抗凝系统,它由 PC、蛋白 S(PS)、血栓调节蛋白(TM)和内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)组成。本研究中以 TM 和 EPCR 为研究指标,通过参附注射液的干预作用,旨在了解和掌握失血性休克对小肠组织 TM、EPCR 的基因、蛋白表达变化特点及规律,探讨参附注射液对失血性休克的治疗作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:健康 SD 大鼠 50 只(温州医学院实验动物中心提供),雌雄不拘,雌鼠不孕,体重 250~300 g。按随机数字表法分为 5 组,每组 10 只。左侧颈总动脉插管,接血压监测仪,监测并记录动脉血压,同时作为放血降压通道。①正常对照组:直接采集大鼠小肠标本。②假休克组:大鼠行左颈总动脉及右颈外静脉插管后,不予其他操作,于 4 h 15 min 采集小肠标本。③失血性休克组:参考文献^[4]方法改良后复制失血性休克动物模型。④林格液组:模型复制成功后 30 min 内输注 3 倍失血量的林格液复苏。⑤参附液组:先输注参附注射液 10 ml/kg,再用林格液补充至失血量的 3 倍,其余操作同林格液组。③~⑤组于休克模型复制成功后 3 h 采集小肠标本,于 -80 ℃冻存待测。

1.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测小肠组织 TM mRNA 和 EPCR mRNA 表达:参考基因库设计(由上海生工生物工程技术有限公司提供)。TM 引物、EPCR 引物按照美国 Invitrogen 公司提供的 TRIzol 试剂盒说明书方法提取总 RNA,按 Takara[宝生物工程(大连)有限公司]说明书的操作步骤进行反转录合成 cDNA。反应在 2400 型 Gene Amp PCR 系统(美国 PE 公司)上进行。PCR 循环条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,不同温度[β-肌动蛋白(β-actin)58.0 ℃,TM 58.0 ℃,EPCR 53.3 ℃]退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 40 个

循环;循环结束后继续于 72 ℃延伸 5 min,-20 ℃保存备用。PCR 产物 5 μl 加入 1 μl 上样缓冲液(buffer)后,用质量分数为 1.5%琼脂糖凝胶(含 5 mg/L 溴化乙锭,美国 Sigma 公司)电泳,以 β-actin 为内参照,用图像分析系统进行灰度扫描分析。以目的基因与 β-actin 的 PCR 产物条带灰度比值作为反映目的基因 mRNA 水平的相对指标。

1.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测小肠组织 TM、EPCR 的蛋白含量:从冻存管中取出小肠组织,用 Western 细胞裂解液(碧云天生物技术研究所)抽提小肠组织的全细胞蛋白样品,经浓度测定、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、封闭、加稀释的一抗(购自美国 Santa Cruz 公司)、洗膜、加稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(购自美国 Santa Cruz 公司)、孵育、洗脱后,进行化学发光法显色、曝光显影(BeyoECL Plus 试剂购自碧云天生物技术研究所)。用美国 BIO-RAD 公司 Quantity One 分析软件对显影条带进行灰度分析,将目的蛋白与 β-actin 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学处理:数据用 SPSS 12.0 统计软件处理。实验数据以均数±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

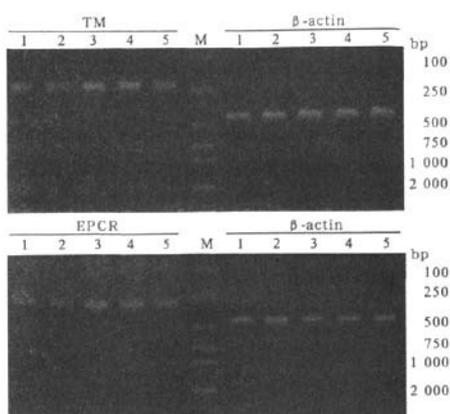
2.1 TM、EPCR 基因表达(表 1;图 1):休克组和林格液组 TM mRNA 和 EPCR mRNA 表达均较假休克组显著增高(P 均 < 0.05),与林格液组比较,参附液组小肠组织 TM mRNA 和 EPCR mRNA 表达均显著下降(P 均 < 0.05)。

表 1 参附注射液对大鼠小肠组织 TM mRNA 和 EPCR mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TM mRNA	EPCR mRNA
正常对照组	10	0.603±0.048	0.848±0.099
假休克组	10	0.627±0.055	0.869±0.065
休克组	10	1.074±0.051 ^{ab}	1.262±0.069 ^{ab}
林格液组	10	1.037±0.042 ^{ab}	1.209±0.110 ^{ab}
参附液组	10	0.627±0.047 ^c	0.886±0.057 ^c

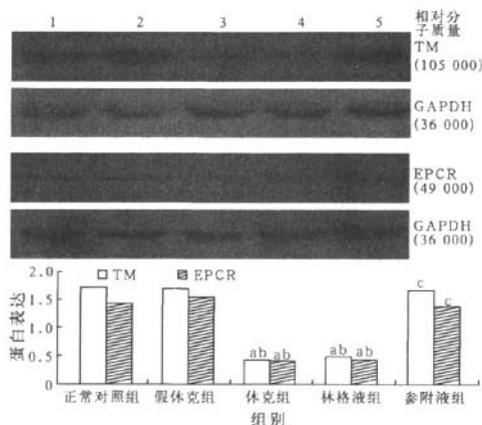
注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与假休克组比较,^b $P < 0.05$;与林格液组比较,^c $P < 0.05$

2.2 TM、EPCR 蛋白表达(图 2);Western blotting 结果显示,与假休克组比较,休克组和林格液组 TM 和 EPCR 的蛋白含量均显著下降(P 均 < 0.05);与林格液组比较,参附液组 TM 和 EPCR 的蛋白含量均显著升高(P 均 < 0.05)。



1~5 依次为正常对照组、假休克组、休克组、林格液组、参附液组; M: Marker

图 1 各组大鼠小肠组织 TM、EPCR 的 mRNA 表达



1~5 依次为正常对照组、假休克组、休克组、林格液组、参附液组; 与正常对照组比较, *P<0.05; 与假休克组比较, bP<0.05; 与林格液组比较, cP<0.05

图 2 各组大鼠小肠组织 TM、EPCR 的蛋白表达

3 讨论

近年来,人们已认识到炎症、凝血与纤溶失衡及内皮细胞损伤共同构成的内环境紊乱是失血性休克病情恶化的根本原因^[5]。危重病患者的肠道不是处于传统所认为的休眠状态,而是处于活跃的应激反应状态,发生肠 I/R 损伤,肠道屏障被破坏^[6]。新近研究发现,PC 系统是连接失血性休克失控性炎症反应与凝血紊乱的桥梁,而 PC 系统中的 TM 及 EPCR 在失血性休克发病机制中起重要作用。在 PC 抗凝系统中,凝血酶与 TM 结合后,凝血酶-TM 复合物将 PC 呈递给 EPCR,使 PC 转化成活化蛋白 C (APC),APC 具有抗血栓形成、促进纤维蛋白溶解及抗炎特性^[7]。研究证实,APC 不仅调控机体的凝血及纤溶平衡,而且通过抗炎、抗凋亡机制保护内皮

细胞、改善微循环、减缓器官功能障碍,参与多种疾病的病理生理过程^[8]。

已证实 TM 是位于内皮细胞上的跨膜糖蛋白,对凝血酶激活 PC 起重要辅助作用。TM 在内皮细胞发生炎症等病理过程或损伤后被释放入血,并表现为可溶性 TM 抗原,可作为内皮细胞受损的重要标志之一^[9],故可成为预测疾病严重性的指标。

EPCR 是近年来发现的 PC 途径的新成员,为多功能的 I 型跨膜糖蛋白,具有抗凝、抗炎、抗凋亡和神经保护作用。在大鼠脓毒症模型中,其肝、肺 EPCR mRNA 水平在 2~24 h 呈时间依赖性增加,而应用血必净注射液后,EPCR 表达明显下降^[10]。

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,临床上常用林格液等晶体液复苏。本实验中对失血性休克大鼠输注失血量 3 倍的林格液复苏后,发现小肠组织 TM、EPCR 的蛋白含量减少,而其 mRNA 水平代偿性升高。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 PC 的活化,又可与抗凝血酶形成复合物,最后导致 PC 和抗凝血酶消耗。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^[11],因而不能阻止组织细胞上 TM、EPCR 的蛋白减少。

参附注射液由红参、黑附片提取物组成,其主要有效成分为人参皂苷及乌头碱,常用于四肢厥冷、大汗、虚脱等阳气脱证,这些症状类似现代医学的休克、心力衰竭等表现^[12],药理研究及动物实验都表明参附注射液能够改善休克时的微循环。本实验中采用参附注射液早期干预后,小肠组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达较林格液组降低,TM 和 EPCR 的蛋白含量增加,说明参附注射液具有保护内皮细胞、抗炎、抗内毒素和提高对缺氧耐受性的作用^[13],降低膜结合型 TM、EPCR 损伤、脱落,但不减少内皮细胞 TM 和 EPCR 的蛋白含量,从而减少了 TM、EPCR 的 mRNA 代偿性升高,有利于失血性休克的预后及机体康复。

参考文献

- [1] 何宇红,陈畅,夏中元. 参附注射液对大鼠肠缺血/再灌注期间肾保护作用机制的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(2): 67-70.
- [2] Lillehei RC, Longerbeam JK, Bloch JH, et al. The nature of irreversible shock: experimental and clinical observations[J]. Ann Surg, 1964, 160: 682-710.
- [3] 董燕,郑江,王仙园,等. 氧疗对高原失血性休克家兔肠黏膜屏障的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 32-35.

- [4] Sharma P, Walsh KT, Kerr-Knott KA, et al. Pyruvate modulates hepatic mitochondrial functions and reduces apoptosis indicators during hemorrhagic shock in rats[J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(1): 65-73.
- [5] Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, et al. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5447-5452.
- [6] 徐杰. 危重病患者肠黏膜屏障的变化与肠内营养[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6): 385-387.
- [7] 李银平, 郑亚军, 武子霞, 等. 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[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(6): 361-364.
- [8] 武子霞, 李银平, 姚咏明. 活化蛋白 C 的生物学活性及其作用机制研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(3): 182-185.
- [9] 刘旭盛, 杨宗城. 血栓调节蛋白与炎症反应[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(6): 375-377.
- [10] 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.
- [11] 丁香香, 倪孔海, 邵美娟, 等. 葛根素对失血性休克大鼠内皮细胞和抗凝血功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(1): 32-34.
- [12] 殷文朋, 李春盛. 参附注射液对心源性休克犬血流动力学及氧代谢的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1): 20-23.
- [13] 廖文生, 李卫青, 陈世伟, 等. 参附注射液对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者炎症细胞因子和肺功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(3): 149-151.

(收稿日期: 2009-03-06)

(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

血液透析联合血液灌流救治重度四氯化碳中毒 1 例

吴燕平, 李月红, 周 旻

(天津中西医结合南开医院肾内科, 天津 300100)

【关键词】 中毒, 四氯化碳; 血液透析; 血液灌流

中图分类号: R595.1 文献标识码: B DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.014

1 临床资料

患者男性, 49 岁, 入院前 3 d 误服有机溶剂 400 ml, 出现腹痛、腹泻、恶心、呕吐, 被家人送至当地医院, 以急性胃肠炎给予对症处理, 症状未缓解。次日患者出现头晕、意识恍惚、站立不稳、语言不清等症状, 再次就诊, 24 h 尿量减少至 50 ml。查体: 患者意识不清, 烦躁, 查体不合作, 双侧瞳孔等大等圆, 对光反射存在; 血压 120/70 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 呼吸频率 33 次/min, 心率 100 次/min, 律齐, 未闻及血管杂音, 双肺呼吸音粗, 无干湿啰音, 腹胀、全腹轻微压痛, 无反跳痛及肌紧张, 肝脾未触及。心电图示窦性心动过速, 心肌供血不足。血中测出四氯化碳; 血尿素氮(BUN) 29.45 μmol/L, 肌酐(Cr) 753 μmol/L, 碱性磷酸酶(ALP) 150 U/L, 肌酸激酶 987 U/L, 肌酸激酶同工酶(CK-MB) 71 U/L, 肌红蛋白(Mb) > 1 000 μg/L, 血氨 98 μmol/L; 尿蛋白(+++), 血尿(+++). 初步诊断: 急性四氯化碳中毒;

作者简介: 吴燕平(1971-), 女(汉族), 天津市人, 主治医师。

中毒性肾病, 急性肾功能衰竭; 中毒性心脏损害; 中毒性肝脏损害。24 h 内进行血液透析(HD)联合血液灌流(HP)治疗, 血管通路为股静脉临时单针双腔管, 血液透析机和透析器为日本进口和廊坊爱尔 ZX-260 树脂吸附一次性血液灌流器, 碳酸氢盐透析液, 低分子肝素抗凝。首次治疗 2 h, 血流量控制在 250 ml/min, 治疗中病情控制稳定。患者入院后连续 3 d 每日进行 HD 联合 HP 治疗 1 次后, 血毒物测定转为微量, 继续规律 HD 隔日 1 次, 配合内科保护心肌、肝脏及神经系统治疗后, 肝功能好转, 血氨降至正常范围, 心肌损害明显减轻, 尿常规检测指标转阴, 尿量增加, 临床症状缓解。患者于入院后 20 d 好转出院。

2 讨论

四氯化碳又名四氯甲烷, 属含卤素的有机化合物, 遇热可分解为二氧化碳、氯化氢、光气和氯气等有害气体。主要经呼吸道吸收, 蒸汽和液体也可经皮肤和消化道吸收。本品高毒, 是典型的肝脏毒物, 但接触浓度与频率可影响其作用部位与毒性。高浓度时首先是中枢神经

统受累, 随后累及肝、肾; 而低浓度长期接触则主要表现为肝、肾受累, 其机制可能是由于产生大量的氧自由基造成生物膜脂质过氧化损伤, 或由于其代谢产物与细胞成分的共价结合使细胞的正常生物学功能丧失, 或由于细胞内钙代谢紊乱, 钙流失失控最终导致细胞死亡。

HD 是通过溶质弥散和对流作用, 清除水溶性小分子且不与蛋白或血浆其他成分结合的物质, 对中大分子物质无效。HP 可通过灌流器的非特异性吸附作用清除血液中有毒物质及脂溶性、易与血浆蛋白结合的毒物或毒物, 同时也能清除中分子毒素。

该患者由于未能及时明确诊断延误最佳洗胃时机, 同时服用剂量大、出现严重的脏器功能损害。但经过及时有效的多次 HD 联合 HP 治疗, 同时兼顾肾脏保护和内环境稳定的维持, 阻止了多器官功能衰竭的发生发展, 为内科治疗争取了宝贵的时间。

(收稿日期: 2008-10-09)

(本文编辑: 李银平)