

## 参附注射液对创伤失血性休克大鼠的肾保护作用研究

马继红<sup>1</sup>, 刘 婷<sup>2</sup>, 潘景业<sup>1</sup>, 陈 洁<sup>1</sup>, 张近波<sup>1</sup>

(1. 温州医学院附属第一医院 ICU, 浙江 温州 325000; 2. 中国医科大学北京顺义医院 ICU, 北京 101300)

**【摘要】** 目的 探讨失血性休克大鼠肾组织内皮细胞组织因子(TF)、血栓调节蛋白(TM)的 mRNA 表达及参附注射液的干预作用。方法 将 40 只 SD 大鼠随机分成对照组、休克组、林格液组、参附液组, 每组 10 只。采用放血法制备失血性休克大鼠模型。林格液组和参附液组于制模后分别用林格液或参附注射液(10 ml/kg)加林格液复苏。制模各组于复苏后 2 h、对照组于置管后 3 h 取肾组织, 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TF、TM 的 mRNA 表达。结果 休克组 TF、TM 的 mRNA 表达较其他组均显著升高( $P$  均 $<0.01$ ); 而对照组则较其他组均显著降低( $P$  均 $<0.01$ ), 参附液组 TF mRNA 表达较休克组和林格液组均显著下降( $P$  $<0.01$  和  $P$  $<0.05$ ), 而 TM mRNA 表达则显著高于林格液组( $P$  $<0.05$ )。结论 失血性休克后存在肾组织及内皮细胞损伤; 参附注射液从促凝与抗凝两个方面保护肾组织, 从而对机体凝血功能产生影响。

**【关键词】** 失血性休克; 组织因子; 血栓调节蛋白; 参附注射液

中图分类号: R285.5; R605.971 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.05.014

A study on expressions of tissue factor mRNA and thrombomodulin mRNA in kidney of rats with hemorrhagic shock and interference effects of Shenfu injection (参附注射液) for resuscitation MA Ji-hong\*, LIU Ting, PAN Jing-ye, CHEN Jie, ZHANG Jin-bo. \* Intensive Care Unit, the First Hospital Affiliated to the Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: PAN Jing-ye, Email: panjingye@hospl.ac.cn

**【Abstract】** Objective To investigate the changes of the expressions of tissue factor (TF) mRNA and thrombomodulin (TM) mRNA in endothelial cells of kidney tissues in rats with hemorrhagic shock (HS) and the interference effects of Shenfu injection (SFI, 参附注射液). Methods Forty adult healthy Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to the following four groups (each  $n=10$ ): wound control (WC group), HS group, resuscitation with Ringer's solution (RS group) and resuscitation with SFI group (SFI group). The rat model of HS was established by blood letting. In the WC group, the rat was subjected to insertion of catheter respectively into the right carotid artery and left femoral vein only without any other management; after the model establishment, Ringer's solution was used in RS group and RS plus SFI (10 ml/kg) mixture was applied in the SFI group for resuscitation. At 2 hours after resuscitation and 3 hours after catheterization in WC group, the kidney tissue was collected. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expressions of TF mRNA and TM mRNA. Results The expressions of TF mRNA and TM mRNA in HS group were significantly higher than those in other groups (all  $P$  $<0.01$ ); while the expressions in WC group were obviously lower than those in other groups (all  $P$  $<0.01$ ). The expression of TF mRNA in SFI group was markedly lower than that in HS group and RS group ( $P$  $<0.01$  and  $P$  $<0.05$ ), while the expression of TM mRNA in SFI group was significantly higher than that in RS group ( $P$  $<0.05$ ). Conclusion After the occurrence of HS in rats, there is kidney tissue and endothelial cell injury. SFI can protect renal tissues from both pro- and anti-coagulant aspects; its affect on the production and release of TF and TM in kidney may have an impact on the coagulation of an organism.

**【Key words】** hemorrhagic shock; tissue factor; thrombomodulin; Shenfu injection

创伤是当今人类死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。创伤死亡的首要原因是失血性休克<sup>[2]</sup>, 失血性休克如得不到纠正, 最后将会导致弥散性血管内凝血(DIC),

甚至死亡。2007 年欧洲重症监护医学等专家联合指出在创伤失血性休克早期纠正凝血功能的紊乱, 对失血性休克的治疗及预后具有重要意义<sup>[3]</sup>。参附注射液是中药红参、附子的提取物。研究证实, 参附制剂具有提高机体对缺氧的耐受性、减轻组织和细胞的损伤等多种药理作用, 对缺血/再灌注损伤具有良

基金项目: 浙江省温州市科技计划项目(Y20060062)

通信作者: 潘景业, Email: panjingye@hospl.ac.cn

作者简介: 马继红(1977-), 男(汉族), 安徽省人, 医学硕士, 医师。

好的保护作用<sup>[4-5]</sup>。而参附注射液对凝血系统方面影响的研究甚少,为此,本研究中探讨失血性休克大鼠肾组织内皮细胞组织因子(TF)及血栓调节蛋白(TM)的 mRNA 表达及参附注射液的干预作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物分组及失血性休克模型制备:SD 大鼠 40 只(温州医学院实验动物中心提供),按随机数字表法分为 4 组,每组 10 只。腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠,参照文献<sup>[6]</sup>方法建立失血性休克模型。①对照组:大鼠麻醉后经右颈动脉和左股静脉置管后不予其他操作,于 3 h 后取肾组织;②休克组:大鼠插管成功后 15 min 内放血使平均动脉压降至(40±5)mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),稳定 60 min,即为失血性休克模型;③林格液组:制模后 30 min 内输注 3 倍失血量的林格液复苏;④参附液组:制模后 30 min 内先补充参附注射液 10 ml/kg,再输入林格液至 3 倍失血量。除对照组外,各组均于 2 h 后取肾组织标本,实验结束后处死动物。

1.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肾组织 TF、TM 的 mRNA 表达:采用 Primer 5.0 设计 PCR 所用引物,TF、TM、β-肌动蛋白(β-actin)引物序列均由上海生工生物工程技术有限公司合成。按 TRIzol 试剂盒一步法分离提取总 RNA。PCR:将提取的总 RNA 立即进行反转录,参考 PCR 反应试剂盒说明书并按比例调整反应体系体积。按以下程序扩增:94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 5 min,-20℃保存备用。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像系统照相,应用计算机图像分析软件(Gel 3.0)行灰度扫描分析。以目的基因与 β-actin 的 PCR 产物条带灰度之比作为反映目的基因 mRNA 水平的相对指标。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 11.5 统计软件处理,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane's 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

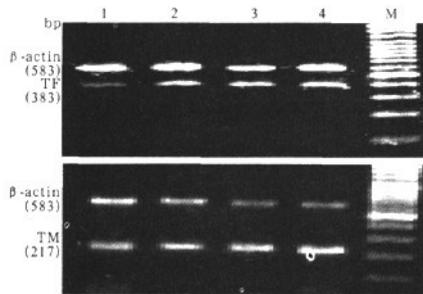
表 1 和图 1 结果显示,休克组肾组织 TF、TM 的 mRNA 表达均较对照组明显升高( $P$  均  $< 0.01$ )。林格液组肾组织 TF mRNA 表达较休克组有所下降( $P > 0.05$ ),但仍显著高于对照组( $P < 0.01$ );TM mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义,但较休克组降低( $P < 0.01$ )。参附液组 TF mRNA

表达较休克组与林格液组均明显降低( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ),但仍高于对照组( $P < 0.01$ );TM mRNA 表达较对照组及林格液组均明显升高( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ),但较休克组显著降低( $P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠肾组织 TF、TM 的 mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	TF mRNA	TM mRNA
对照组	10	0.773±0.151	1.243±0.325
休克组	10	1.862±0.281 <sup>a</sup>	3.160±0.598 <sup>a</sup>
林格液组	10	1.580±0.036 <sup>a</sup>	1.460±0.425 <sup>b</sup>
参附液组	10	1.220±0.144 <sup>abc</sup>	2.121±0.605 <sup>abc</sup>
F 值		21.487	17.618
P 值		0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与休克组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与林格液组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$



1~4 依次为对照组、休克组、林格液组、参附液组;M:Marker  
图 1 RT-PCR 检测各组大鼠肾组织 TF、TM 的 mRNA 表达

3 讨论

正常情况下,机体促凝/抗凝处于动态平衡,但各种病理过程可打乱该平衡,引起凝血系统的激活。我们前期的实验表明,凝血系统失衡在休克的发生发展过程中具有重要作用<sup>[7]</sup>;观察不同复苏液对失血性休克大鼠凝血功能的影响发现,失血性休克大鼠血浆中 TF、TM 含量升高,表明失血性休克可使血小板和凝血系统激活<sup>[8]</sup>。本实验中主要通过观察失血性休克后大鼠肾组织 TF、TM 的 mRNA 表达及参附注射液对其的干预作用,探寻参附注射液对休克的防治作用。

3.1 休克组肾组织 TF、TM 的 mRNA 表达:TF 是外源性凝血的主要启动因子,是止血、凝血和血栓形成的主要调节因子,多种病理情况下均可使其表达增高并释放至血中,启动凝血途径,引起血管内血栓形成<sup>[9]</sup>。本实验中发现,与对照组比较,休克组肾组织 TF mRNA 表达明显升高。提示失血性休克后肾组织产生大量 TF 并释放入血,进而激活凝血途径参与止血。TM 是血管内皮细胞表面的一类跨膜

糖蛋白,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>[11]</sup>。TM升高是机体的一种保护机制,防止由于TF激活后的凝血功能过强而导致血栓栓塞,对防止失代偿性DIC的发生有重要意义。本实验中发现,休克组肾组织TM mRNA表达亦较对照组显著增强。提示失血性休克后,肾组织血管内皮细胞损伤,TM大量生成,可能存在凝血功能紊乱。

**3.2 林格液组肾组织TF、TM的mRNA表达:**本实验中单用林格液复苏后,肾组织TF mRNA水平明显高于对照组,而较休克组下降,但差异无统计学意义,提示林格液干预后凝血功能未见明显改善;肾组织TM mRNA表达较休克组明显降低,提示林格液组抗凝活性更弱。结合TF mRNA的变化趋势可以看出,林格液组的凝血功能较休克组加强,而抗凝功能减弱,可能更容易导致凝血。

**3.3 参附液组肾组织TF、TM的mRNA表达:**研究证明,参附可保护缺血/再灌注的组织及细胞,何宇红等<sup>[11]</sup>证实,参附注射液可通过诱导血红素氧合酶-1表达,抑制诱生型一氧化氮合酶表达,明显减轻大鼠肠缺血/再灌注损伤所导致的肾组织损伤。本研究结果发现,参附液组肾组织TF mRNA表达虽然较对照组增高,但较休克组、林格液组显著降低,提示参附注射液对凝血途径的启动有抑制作用。参附液组TM mRNA表达较对照组、林格液组增高,提示其抗凝功能增强;相对于林格液,参附注射液在凝血能力上趋于正常,抗凝能力相对增强,不易引起血栓。

综上所述,失血性休克大鼠肾组织及内皮细胞损伤持续存在;参附注射液治疗后抗凝功能增强,凝

血功能受到部分抑制,避免血栓的形成。本实验结果具有一定的临床意义,为祖国传统中药参附注射液在治疗休克的临床应用提供理论依据,值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Peden M, McGee K, Sharma G. The injury chart book; a graphical overview of the global burden of injuries [M]. Geneva: World Health Organization, 2002; 1-18.
- [2] Alam HB, Rhee P. New developments in fluid resuscitation [J]. Surg Clin North Am, 2007, 87(1): 55-72.
- [3] Spahn DR, Cerny V, Coats TJ, et al. Management of bleeding following major trauma; a European guideline [J]. Crit Care, 2007, 11(1): R17.
- [4] 郑瑞云, 徐建国, 李明. 参附注射液对大鼠心肌缺血再灌注细胞凋亡的影响 [J]. 南京大学学报(自然科学版), 2004, 40(2): 192-198.
- [5] 程梦琳, 吴基良, 罗德生. 参附注射液对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织NO含量和NOS活性的影响 [J]. 中国中医急症, 2004, 13(4): 234-235.
- [6] 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.
- [7] 张艳杰, 潘景业, 王明山. 失血性休克大鼠凝血因子的变化研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(1): 110-113.
- [8] 王晓蓉, 潘景业, 朱柳凡, 等. 大鼠失血性休克继发性凝血活化的实验治疗 [J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(2): 396-398.
- [9] 刘小雨, 霍婷婷, 王为忠, 等. 参附注射液对大鼠移植脑缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(S1): 111-115.
- [10] 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.
- [11] 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.

(收稿日期: 2009-01-12 修回日期: 2009-03-30)

(本文编辑: 李银平)

#### • 科研新闻速递 •

#### 影响颈部脊髓外伤患者病死率的危险因素

最近巴西学者通过研究,对影响颈段脊髓外伤(TSCI)病死率的因素提出了新的观点。研究人员对2001—2005年住院治疗的84例TSCI患者进行回顾性研究,收集每位患者的神经系统损伤及复合伤、生理学数据、并发症、治疗方案和死亡情况,用BM logistic回归分析来查找能影响患者病死率的因素。结果显示院内死亡22例患者(26.2%)中,死于神经系统损伤8例(占36.4%),呼吸衰竭4例(占18.2%),脓毒症4例(占18.2%),静脉血栓栓塞2例(占9.0%),不明原因4例(占18.2%)。格拉斯哥昏迷评分(GCS) < 9分[相对危险度(RR) = 47.4, 95%可信区间(95%CI)为5.4~413.2]、入院时休克(RR = 2.5, 95%CI为0.8~7.9)、应用升压药物(RR = 25.8, 95%CI为6.1~109.6)、机械通气(RR = 31.9, 95%CI为6.6~154.0)、急性肾功能不全(RR = 10.0, 95%CI为0.98~102.1)等对患者病死率均有显著的影响。无复合伤的TSCI患者病死率最低。研究人员认为,GCS < 9分、应用升压药和机械通气是影响TSCI患者病死率的独立危险因素。消除这些因素后,可以发现患者病死率降低。

侯经元, 编译自《J Trauma》, 2009, 67(1): 67-70; 胡森, 审校