

参附注射液对失血性休克大鼠肾脏血栓调节蛋白及内皮细胞蛋白 C 受体基因表达的影响

周小洁 潘景业 陈洁 吴双华 张近波 王卫 沈晔

摘要 **目的** 探讨参附注射液对失血性休克大鼠肾脏血栓调节蛋白(TM)及内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)基因表达的影响及可能的机制。**方法** 成年健康 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组:正常对照组、实验对照组、失血性休克组、林格液复苏组、参附复苏组,每组 10 只。建立失血性休克大鼠模型。林格液组用 3 倍失血量的林格液复苏;参附组用含参附注射液(10ml/kg)和林格液组成的 3 倍失血量的液体复苏。休克后 4h 及复苏后 3h 处死大鼠,留取肾组织,用 RT-PCR 法检测 TM 及 EPCR 的基因表达。**结果** 与正常对照组比较,实验对照组肾组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达升高($P < 0.05$),休克后明显升高($P < 0.01$);林格液组和参附组复苏后肾组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达较休克组均下降,差异有统计学意义,林格液组下降更明显($P < 0.01$);林格液组与参附组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 失血性休克时大鼠肾脏组织 TM 和 EPCR 表达增加,这与休克时存在内皮细胞功能损伤有关,参附注射液可以从基因水平影响大鼠肾组织 TM 和 EPCR 的 mRNA 表达,保护内皮细胞功能。

关键词 失血性休克 血栓调节蛋白 内皮细胞蛋白 C 受体 参附注射液

Study on Effects of Shenfu Injection on Thrombomodulin and Endothelial Protein C Receptor on Kindney in Hemorrhagic Shock Rats.

Zhou Xiaojie, Pan Jingye, Chen Jie, Wu Shuanghua, Zhang Jinbo, Wang Wei, Shen Ye. The First Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of Shenfu injection on thrombomodulin (Tm) and endothelial protein C receptor (EPCR) on kindney and to clarify its possible mechanism in hemorrhagic shock rats. **Methods** In this study, fifty Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into the following five groups: controls; sham shock; hemorrhagic shock (HS group); resuscitation with Ringer's solution (RS group); resuscitation with Shenfu injection (SF group) with ten rats per group. The rats in RS group and SF group were subjected to hemorrhagic shock and resuscitation was performed with three times of the volume of shed blood of Ringer's solution, or three times of the volume of shed blood of fluid containing Shenfu injection (10ml/kg) plus Ringer's solution. After four hours of shock or three hours of resuscitation, the rats in various groups were executed and the kindneys were taken out. TM and EPCR messenger ribonucleic acid (mRNA) on kindney were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared to the control group, the level of TM and EPCR mRNA on kindney in the sham shock group increased ($P < 0.05$), and they increased obviously in the shock group ($P < 0.01$). Kindney TM and EPCR mRNA in the RS group and SF group were lower than those in the shock group, and they changed significantly in the RS group ($P < 0.01$). The levels of TM and EPCR mRNA on kindney were lower in the RS group than those in the SF group ($P < 0.05$). **Conclusion** The TM and EPCR on kindney increased in hemorrhagic shock rats. It prompted that the endothelial cell was damaged in these rats. The Shenfu injection could effect TM and EPCR mRNA expression on kindney and protect the endothelial cell.

Key words Hemorrhagic shock; Thrombomodulin; Endothelial protein C receptor; Shenfu injection

失血性休克是血液大量丢失后所造成的血容量骤降、静脉回流不足和心每搏输出量减少,超过机体的代偿能力而导致的有效循环血量不足、组织缺氧和低灌注状态的一种综合征。失血性休克得不到纠正最后将会导致弥散性血管内凝血(disseminated intra-

vascular coagulation, DIC),多器官功能障碍综合征(multiorgan dysfunction syndrome, MODS)的发生,甚至死亡。多年来国内外的抗休克研究主要针对于炎症因子和抗炎治疗方面,近年来有关专家提出对休克的治疗还应包括改善凝血系统的变化方面^[1]。目前已将抗凝和抗炎并列为重症休克的新治疗靶点。血管内皮系统参与机体凝血与炎症过程。内皮细胞不仅是创伤后炎症反应的参与者,还是首先受损的靶细胞,内皮细胞受损后,调节凝血、抗凝和纤溶的功能下降,进

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20060062)

作者单位:325000 浙江省温州医学院附属第一医院 ICU

通讯作者:潘景业,电子信箱:panjingye@hosp1.ac.cn

而导致出血或微血栓形成,微循环障碍,发生 DIC。

血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)及内皮细胞蛋白 C 受体(endothelial protein C receptor, EPCR)是近年来发现的位于血管内皮细胞的 2 个新型蛋白受体,是体内蛋白 C 系统重要的组成成分之一^[2,3]。血管内皮细胞受损,内皮细胞释放大量的 TM 和 EPCR,致血浆 TM 和 EPCR 升高,目前已被用来反映内皮细胞受损的重要标志物^[2,3],但从组织学角度研究重要脏器创伤失血性休克后 TM 和 EPCR 表达变化的报道不多。肾脏是一个高血流的器官,血管内皮细胞丰富,在创伤失血性休克时易出现功能损伤。为此,本实验通过失血性休克大鼠模型,以肾组织 TM、EPCRmRNA 的表达水平为研究指标,观察休克治疗前后的改变,初步探讨失血性休克早期重要脏器内皮损伤的变化机制及参附注射液的干预作用。

材料与方法

1. 动物分组:温州医学院实验动物中心提供健康、清洁级 sprague dawley (SD)大鼠 50 只,雌雄不限,体重 250 ~ 300g。随机分为 5 组:正常对照组、实验对照组、失血性休克组、林格液复苏组、参附复苏组,每组 10 只。实验前禁食过夜,但可自由饮水。

2. 失血性休克模型的建立及标本的采集处理:参考文献[4]的方法,改良后复制动物模型,操作前称重,在暖灯照射下进行操作。按 0.7ml/kg 腹腔注射 5% 水合氯醛,麻醉后将其仰卧固定于鼠板上。①正常对照组:不予其他操作,4h 后取肾组织作为正常对照组。其余 4 组均进行颈动静脉插管。行颈正中切口,分离左侧颈总动脉和右侧颈外静脉,使用 PE-50 导管行动静脉插管。动脉插管经三通及压力传感器连接多功能监护仪监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)。经颈总动脉测压,经颈外静脉放血,液体复苏。整个管道系统预充 0.9% 生理盐水液;②实验对照组:动静脉插管后不予其他操作,于 4h 后取肾组织;③失血性休克组:失血性休克组大鼠插管成功后,15min 内放血使平均动脉压降至 5.33kPa (40mmHg),使其波动在 (40 ± 5) mmHg,稳定 60min,即为休克模型复制成功;于 3h 后取肾组织标本;④林格液复苏组:复制模型如③组,模型复制成功后 30min 内输注 3 倍失血量的林格液复苏;于复苏开始后 3h 后取肾组织标本;⑤参附复苏组:补液方案为参附注射液 10ml/kg,再输入林格液补充至失血量 3 倍,所有液体在 30min 内输完;于复苏开始后 3h 取肾组织标本。肾脏组织用于 RT-PCR 或放入冻存管,然后放入液氮罐中冻存待用。

3. 实验方法:反转录多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测肾组织 TM 和 EPCR 信使 RNA(messenger ribonucleic acid, mRNA)的表达。参考基因库设计合成(上海生工生物工程技术有限公司):TM 引物系列为:上游引物:5'-TCATCCTGGACGAGGCTTC-3';

下游引物:5'-GTCGATTGCTTGATGGGT-3(产物片段长度为 217 bp)。EPCR 引物系列为:上游引物:5'-TCTACCTGTC-CCAGTTC-3';下游引物:5'-CATACCGAGTCCGATTGT-3(产物片段长度为 276 bp)。β-actin 引物系列为:上游引物:5'-AAAGAAAGGCTGTAAACGCA-3';下游引物:5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3(产物片段长度为 488 bp)。用 Invitrogen 公司提供的 Trizol 试剂盒,按说明书介绍的方法提取总 RNA。按 Takara 公司说明书的操作步骤反转录合成 cDNA。反应在 Gene Amp PCR System 2400 型(PE 公司)上进行。PCR 循环条件为:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 30s,不同退火温度(β-actin 58℃, EPCR 53.3℃, TM 58℃)退火 30s,72℃ 延伸 1min,共 30 ~ 32 个循环;循环结束后继续于 72℃ 延伸 5min, -20℃ 保存备用。取 5μl PCR 扩增产物与 1μl 6 × Loadingbuffer 液混合均匀后,用 1.5% 琼脂糖凝胶(Sigma 公司)(含 10mg/ml 溴乙锭),5V/cm 进行电泳,经 Image master VDS 成像系统摄影存盘后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。

4. 统计学处理:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS12.0 统计软件包处理,多组比较用单因素方差分析,用 Levene 法检验方差齐性,方差齐时多组间均数比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane's 检验;P < 0.05 为差异有统计学意义, P < 0.01 为差异有显著统计学意义。

结 果

表 1 是各实验组肾组织 TM 及 EPCR mRNA 表达的变化。与正常对照组比较,实验对照组肾组织 TM 及 EPCR mRNA 的表达升高有统计学意义(P < 0.05);失血性休克组较正常对照组、实验对照组比较均明显升高,有显著统计学意义(P < 0.01);林格液复苏后表达明显下降,有显著统计学意义(P < 0.01);参附组较休克组肾组织 TM 及 EPCR mRNA 表达亦下降,有统计学意义(P < 0.05);林格液复苏组肾组织 TM 及 EPCR mRNA 的表达较参附组下降明显,两者比较有统计学意义(P < 0.05)。图 1 和图 2 是各实验组肾组织 TM 及 EPCR mRNA 的表达变化。

表 1 各实验组肾组织 TM 及 EPCR mRNA 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	TMmRNA	EPCRmRNA
正常对照组	0.726 ± 0.528	0.740 ± 0.395
实验对照组	1.502 ± 0.695 [△]	1.412 ± 0.681 [△]
失血性休克组	3.050 ± 1.099 ^{△▲}	2.771 ± 0.972 ^{△▲}
林格液复苏组	1.528 ± 0.757 ^{△☆}	1.418 ± 0.548 ^{△☆}
参附组	2.316 ± 0.858 ^{△▲☆☆}	2.086 ± 0.931 ^{△▲☆☆}
F	11.979	10.896
P	0.000	0.000

△与正常对照组比较, P < 0.05; ▲与实验对照组比较, P < 0.05; ☆与失血性休克组比较, P < 0.05; ★与林格液复苏组比较, P < 0.05

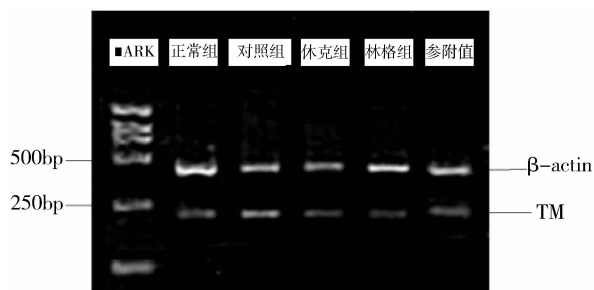


图1 各实验组肾组织 TM mRNA 的变化

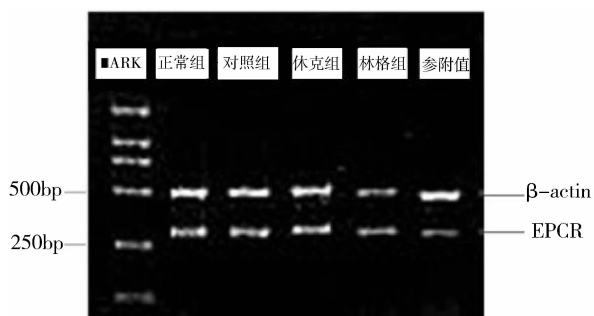


图2 各实验组肾组织 EPCR mRNA 的变化

讨 论

休克是各种强烈致病因子作用于机体引起的急性循环功能衰竭。休克时内皮细胞不可避免会损伤,其功能也会发生变化。Lu Q 等^[5]用 Tunnel 实验及通过光镜及电镜观察均发现创伤失血性休克触发内皮细胞的凋亡。Savoye G 等^[6]发现失血性休克复苏通过自由基产生的机制损伤动脉内皮细胞。TM 及 EPCR 目前已被用来反映内皮细胞受损的重要标志物^[2,3]。

TM 是一个含有 557 个氨基酸残基和 5 个主要基团的完整膜糖蛋白,可以出现在动脉、静脉、毛细血管和淋巴管的内皮细胞表面,以微循环表达密度相对更高,肾小球微循环 TM 表达甚高,1981 年首次由 Esmon 和 Owen 确认,并于次年从兔肺中分离和命名^[7]。TM 在凝血过程中具有抗凝和抗纤溶双相作用, TM 与凝血酶具有高度亲和力,两者以化学剂量 1:1 的比例形成可逆性复合物,凝血酶的促凝活性转化为抗凝活性,可使凝血酶激活 PC 的效率提高 1000 倍,同时, TM 可加速血浆中凝血酶激活纤溶抑制物 (TAFI) 的活性而抑制纤溶活性。TM 的表达受多种因素的影响,肿瘤坏死因子 - α (TNF - α)、内毒素等可下调内皮细胞 TM mRNA 的表达,而凝血酶则上调 TM mRNA 转录。

EPCR 是一种 I 型跨膜蛋白,分子结构与 CD1/主要组织相容性复合物 I 型分子超家族相似。1994 年 Fukudome 和 Esmon 等^[8]利用内皮细胞基因文库,采用克隆表达技术得到了能够编码 PC 结合位点的蛋白,并命名为 EPCR。EPCR 本身不具备直接的抗凝功能,但通过与 PC 结合并被呈递给凝血酶 - TM 复合物,可使 PC 活化效率提高 5 ~ 20 倍^[9]。EPCR 有两种存在形式:结合型 EPCR 主要表达在大血管内皮细胞表面,在动脉、静脉、毛细血管中表达递减。游离型 EPCR (sEPCR) 存在于血浆中。EPCR 的表达受多种因素的影响, TNF - α 可显著降低内皮细胞 EPCRmRNA 表达^[10],呈时间 - 剂量依赖性。内毒素和凝血酶可上调 EPCRmRNA 转录,与凝血酶内皮细胞接触后,可通过 sEPCR 结合蛋白酶 - 3 介导 EPCR 从细胞表面脱落成为 sEPCR 入血。

参附注射液源自《校注妇人良方》卷之参附汤,由人参一两、附子五钱组成。中医认为其具有“益气温阳固脱”之功,主治厥脱及阳虚诸证。现代临床用于心力衰竭、休克等证属肾阳虚,阳气欲脱,脉细欲绝,病势危急而见上证者。以其剂改制为注射剂后其效更速。参附注射液可以减少血管间黏附分子 - 1 (ICAM - 1)、TNF - α 等炎症因子的表达^[11],使内皮细胞损伤减轻;直接抑制黄嘌呤氧化酶,抗氧自由基^[12],抑制失血性休克缺血再灌注时内皮细胞过氧化;能抑制 Caspase - 3 表达,同时上调 Bcl - 2,抑制细胞凋亡^[13],对内皮细胞有保护作用。

本实验结果发现实验对照组与正常对照组相比,肾脏组织的 TM 及 EPCRmRNA 表达升高有统计学意义,提示创伤能诱导肾脏组织 TM 及 EPCR 的表达升高,可能与创伤所致内皮细胞损伤有关。休克组与实验对照组或正常对照组相比明显升高,提示除了创伤因素致内皮细胞损伤外,可能还有休克因素参与诱导肾脏组织 TM 及 EPCR 的基因表达。总之,创伤与失血性休克都会导致 TM 及 EPCR 升高,原因可能与体内多种细胞因子的总体效应有关。经液体复苏后,林格液组及参附组肾脏组织 TM 及 EPCRmRNA 的表达均下降,提示失血性休克早期经过充分的液体复苏,血液被稀释,不管是林格液复苏组还是参附组都可能改善机体微循环。林格液复苏组的 TM 及 EPCR 指标更低,提示其抗凝活性较弱,导致较容易凝血,而参附组相对能保持较高水平的抗凝能力,这可能与输入林格液致缺血再灌注损伤作用有关。补充林格液时,虽对血管内皮细胞能起到一定的保护作用,但血

管内皮细胞同时也存在损伤。缺血再灌注后,机体可产生大量的氧自由基及钙超载等,对各种组织细胞都有损伤作用。失血性休克后采用参附复苏既能保持一定的抗凝能力,防止血栓形成,又不会引起出血,在改善微循环,保护内皮细胞,减少缺血再灌注损伤方面优于林格液。

综上所述,创伤失血性休克后大鼠肾脏血管内皮细胞损伤,参附注射液可以从基因水平影响肾脏组织 TM 及 EPCRmRNA 的表达,保护内皮细胞,改善微循环。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 Martini WZ, Chinkes DL, Sondeen J, *et al.* Effects of hemorrhagic and lactated ringer's resuscitation on coagulation and fibrinogen metabolism in swine. *Shock*. 2006, 26(4):396-401
- 2 Esmon CT, Xn J, Gu JM, *et al.* Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost*, 1999, 82:251
- 3 Waugh JM, Yuksel E, Li J. Local overexpression of thrombomodulin for in vivo prevention of arterial thrombosis in a rabbit model. *Circ Res*, 1999, 84:84
- 4 Sharma P, Walsh KT, Kerr - Knott KA, *et al.* Pyruvate modulates hepatic mitochondrial functions and reduces apoptosis indicators during hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology*. 2005, 103(1):65-73
- 5 Lu Q, Xu DZ, Davidson MT, *et al.* Hemorrhagic shock induces endo-

thelial cell apoptosis, which is mediated by factors contained in mesenteric lymph. *Crit Care Med*. 2004, 32 (12):2464-2470

- 6 Savoye G, Tamion F, Richard V, *et al.* Hemorrhagic shock resuscitation affects early and selective mesenteric artery endothelial function through a free radical - dependent mechanism. *Shock*. 2005, 23(5):411-416
- 7 Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombincatalyzed activation of protein C. *Proc Natl AcadSci USA*, 1981, 78 (4):2249-2252
- 8 Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/ activated protein C receptor. *J Biol Chem*, 1994, 269:26486-26491
- 9 Esmon CT. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit Care Med*, 2004, 32:S298-S301
- 10 Nan B, Lin P, Lumsden A B, *et al.* Effects of TNF - α and curcumin on the expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. *Thromb Res*, 2005, 115 (5):417-426
- 11 杨进国, 刘先义, 杜大平. 参附注射液对败血性休克大鼠心肌损伤的影响. *武汉大学学报(医学版)*, 2005, 26(2):169-171
- 12 夏中元, 王龙, 陈雪君. 参附注射液对休克复苏时肠黏膜保护作用机制的实验研究. *中国急救医学*, 2001, 21(8):447-448
- 13 孟庆涛, 夏中元, 贾一帆, 等. 参附注射液对大鼠肠缺血再灌注时肠上皮细胞 Caspase-3, Bcl-2 基因表达的影响. *武汉大学学报(医学版)*, 2004, 25(3):275-278

(收稿:2009-08-24)

胰岛素对糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 Ang-2 表达的影响

马萍萍 王玉萍 吴 炎 李 斌 林少芬 唐仕波

摘 要 **目的** 观察胰岛素治疗对糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)表达的影响,探讨胰岛素在糖尿病视网膜病变发生发展中的作用。**方法** 链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠动物模型,成模后经胰岛素治疗控制血糖,随机分为糖尿病血糖严格控制组、糖尿病血糖非严格控制组、糖尿病组和正常对照组。应用免疫荧光组织化学染色法检测大鼠视网膜组织 VEGF、Ang-2 的表达,用计算机-图像分析软件对 VEGF、Ang-2 免疫荧光强度进行半定量分析。**结果** 与正常对照组比较,糖尿病组大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 平均荧光强度分别增加了 2.38 倍和 2.41 倍($P < 0.05$)。与糖尿病组比较,血糖严格控制组大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 的表达分别下降了 1.47 倍和 1.51 倍($P < 0.05$),而血糖非严格控制组 VEGF、Ang-2 的表达无明显下降($P > 0.05$)。**结论** 胰岛素治疗严格控制血糖可降低糖尿病大鼠视网膜 VEGF、Ang-2 的表达,对糖尿病视网膜病变的发生发展有保护作用。

基金项目:深圳市科技计划项目(200404048)

作者单位:523018 广东省东莞市人民医院眼科(马萍萍);518020 广东省深圳市人民医院内分泌科(王玉萍、吴炎);510060 广州,中山大学中山眼科中心(李斌、林少芬、唐仕波)

通讯作者:唐仕波,电子信箱:shibotang@yahoo.com