

创伤性失血性休克大鼠血浆 血栓调节蛋白的动态测定及价值*

李大鹏¹, 李震², 王刚³, 张永军¹, 王凤娇¹, 郑文哲¹ (1. 解放军88医院, 山东泰安 271000;

2. 泰安市中心医院, 山东泰安 271000; 3. 泰安军分区干休四所, 山东泰安 271000)

摘要:目的 探讨创伤性失血性休克(tramatic hemorrhagic shock, THS)中血浆血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)动态变化及其临床价值。方法 选择无特定病原体成年大鼠17只,通过急性失血方式建立收缩压下降曲线,形成THS动物模型,测定收缩压基础值(T1),记录收缩压降至基础值3/4(T2)、基础值1/2(T3)、基础值2/5(T4)、基础值1/5(T5),10 mmHg(T6)失血量,采用酶联免疫吸附分析检测各个时间点血浆TM水平。结果 各时间组间存在显著性差异,T2~T3时间段内TM水平随时间延长而升高,T4~T5时间段内TM水平随时间延长而降低,T5~T6时间段内TM水平随时间延长而升高。结论 选择收缩压下降曲线建立THS模型评估失血量变化,结合TM水平动态监测,可对血管内皮细胞损伤程度与THS相关过程进行有效评估。

关键词:创伤性;失血性休克;动物模型;血管内皮细胞;损伤;血栓调节蛋白

中图分类号:R-332 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)01-116-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.033

Dynamic Observation and Value of Plasma Level of Thrombomodulin in Rats with Traumatic Hemorrhagic Shock

LI Da-peng¹, LI Zhen², WANG Gang³, ZHANG Yong-jun¹, WANG Feng-jiao¹, ZHENG Wen-zhe¹

(1. the 88th Hospital of PLA, Shandong Taian 271000, China; 2. Taian Center Hospital, Shandong Taian 271000, China; 3. Taian Military Subarea Accept the Four, Shandong Taian 271000, China)

Abstract: **Objective** To explore the dynamic changes in the plasma levels of thrombomodulin(TM) with traumatic hemorrhagic shock (THS). **Methods** The model of the THS with gradient decrease in the systolic blood pressure was established in 17 rats without specific pathogen. The arterial blood during the different phase of shock, i. e. when the systolic pressures were three forth, one second, two fifth of the basis systolic blood pressure, one fifth of the basic systolic blood pressure and 10mmHg, was collected and TM levels in the plasma were determined by the double antibody sandwich method of enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA) and analyzed. **Results** There were significant differences in plasma levels of TM between groups, with TM levels in T2~T3 period of time increased with the extension of time, and TM levels in T4~T5 period of time decreased with the extension of time, and TM levels in T5~T6 period of time increased with the extension of time. **Conclusion** The animal model of THS was related to the systolic pressure during the shock, may be helpful to assessment changes in blood loss. The dynamic observation of the plasma levels of TM which is a good index of the damage to the vascular endothelial cells, may be helpful to assessment of the THS is related to the degree of damage to the vascular endothelial cells.

Keywords: traumatic; hemorrhagic shock; animal model; vascular endothelial cells; damage; thrombomodulin

创伤性失血性休克(tramatic hemorrhagic shock, THS)是院前急救中常见的急危重症,发生于快速、大量失血且未得到及时补充后。微循环障碍是失血性休克所有监测指标中的核心评判标准,为探讨THS发生过程中有效循环血量变化与血管内皮细胞损伤相关性,以建立收缩压下降曲线方式形成THS模型,以血管内皮细胞损伤标志物血栓调节蛋白(thrombomodulin TM)为动态检测指标^[1~3],探讨血管内皮细胞损伤与THS发生过程相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物选择 选择0.3~0.4 kg健康雄性Wistar大鼠($n=17$),无特定病原体动物(specific pathogen free animal, SPF),购于山东省鲁抗医药股份有限公司(实验动物生产许可证:SCXK(鲁)2013-0001)。十万级亚屏障环境中恒温、恒湿条件下适应性饲养4天以上。实验前禁食12 h,自由饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 动物实验及模型:大鼠称重及10 ml/dl水合氯醛麻醉,稳定后固定在解剖台上,消毒后仔细解剖出其股动脉,分离完毕后对血管进行PE套管

* 基金项目:军队“十二五”后勤科研计划项目(课题编号:CWS115297)。

作者简介:李大鹏(1964-),男,汉族,本科,副主任技师,研究方向:医学实验, Tel:0518-8839734, E-mail: lidapeng1964@126.com。

插管,并与生理记录仪(美国 Biopac 公司)相连,连接完毕打开三通监测大鼠收缩压、心率等变化。选择以上消毒方式,解剖出大鼠颈动脉,经颈动脉插入 PE 套管并与消毒的定量收集管相连,放血及留取检测血标本。实验前插管进行肝素化抗凝。

实验操作前稳定大鼠 30 min,检测及记录相关生理功能指标基础值(T1)。选择颈动脉放血管路放血,大鼠收缩压随其放血量增加而快速下降,形成下降曲线,达到相应曲线位置可封闭放血管路,维持并观察 THS 情况。选择带刻度 EP 收集管,标明 A,B,C,D 和 E,分别收集曲线降至基础值 3/4(T2)和由 3/4 至 1/2(T3),1/2 至 2/5(T4),2/5 至 1/5(T5),1/5 至 10 mmHg(T6)共 5 个位置放出血液,留取检测血样并常规分离后,-80℃ 超低温冰箱保存待检。

1.2.2 TM 检测:选择 ELX800UV 全自动酶标仪、ELX50/6 全自动洗板机(美国 Biotek 公司)以及 5415R 台式冷冻小型离心机,5810R 台式冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司)等仪器设备。大鼠 TM 酶联免疫(ELISA)分析试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,使用双抗体夹心法。

严格按试剂盒操作说明书要求进行标准品处理和实验操作,450nm 波长测各孔吸光度 A。检测范围为 0.05~20 ng/ml。

1.3 检测数据分组 在实验大鼠 T2~T6 共 5 个位置,使用 A,B,C,D 和 E 管分别留取血样,检测 TM 水平数据按②~⑥分组进行分析。

1.4 统计学分析 选择 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理分析。计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Friedman 检验进行组间相关性分析。

2 结果 大鼠体重为 0.367 ± 0.032 kg,收缩压基础值 T1 为 101.765 ± 9.176 mmHg,②~⑥各组 TM 水平(\times ng/ml)分别为 1.442 ± 0.335 , 1.454 ± 0.330 , 1.486 ± 0.335 , 1.356 ± 0.320 , 1.658 ± 0.373 。对各组进行 Shapiro-Wilk 检验,结果②,③,④,⑤组统计量依次为 0.933,0.905,0.943,0.910, P 为 0.249,0.083,0.355,0.100, TM 值均服从正态分布($P > 0.05$);在置信度 $\alpha = 0.05$ 的水平下,⑥组统计量为 0.762, TM 值服从正态分布($P < 0.001$)。②,③,④,⑤四组数据之间存在时间顺序关系,数据之间具有相关关系,对各组数据进行 Friedman 检验($\alpha = 0.05$), TM 情况随时间变化有显著性差异($\chi^2 = 14.541$, $P = 0.006$)。②~⑥平均秩次为 2.647,2.823,3.235,2.176,4.118,由此可知,在 $\alpha = 0.05$ 的置信水平下,各时间组间存在显著性差异, T2~T3 时间段

内 TM 水平随时间延长而升高, T4~T5 时间段内 TM 水平随时间延长而降低, T5~T6 时间段内 TM 水平随时间延长而升高。

3 讨论 本文选择大鼠颈动脉插入 PE 套管手段致动脉损伤,使用大量放血致快速失血引起休克方式建立 THS 模型,造模及实验方式简单、可靠、易行,易于观察。

失血性低血容量休克主要病理生理改变是有效循环血容量急剧减少,导致组织低灌注、再灌注损伤等^[4]。由于血管收缩反应、总血容量、凝血机制等因素影响, THS 发生过程中失血量变化并不相同,收缩压与失血量间存在相关性^[5]。建立收缩压曲线,动态测定曲线不同位置 TM 水平,可体现 THS 中有效循环血量变化与血管内皮细胞损伤相关性。

血栓调节蛋白(TM)是内皮细胞损伤的特异性分子标志物之一,是反映血管内皮细胞损伤最敏感的指标之一,其是血管内皮细胞合成并存在于其表面的跨膜糖蛋白,存在于动脉、静脉、毛细血管、淋巴管的内皮细胞表面,在血管壁表面作为凝血调节发挥作用,正常状态下主动调节微循环血流和炎症反应,其与凝血酶具有较高的亲和力,与凝血酶结合可防止形成血栓,并可使游离凝血酶增多以促凝血,是检测凝血功能及血栓性疾病发生的重要手段。TM 可少量脱落并以可溶性形式存在于血浆中,内皮细胞受损时则以可溶性方式快速大量释放入血,程度与内皮细胞损伤呈正比,内皮功能损伤在全身性炎症反应综合征-多脏器功能障碍综合征-多脏器功能衰竭过程中具有重要作用^[3,6~7]。

本文实验表明:各时间组间存在显著性差异, T2~T3 时间段内 TM 水平随时间延长而升高,提示 THS 过程中随失血增加致血管受损最早和最敏感部位的微循环障碍,已发生血管内皮细胞损伤,致 T2~T3 间 TM 以可溶性方式释放入血; T4~T5 时间段内 TM 水平随时间延长而降低,提示 THS 随继续大量失血致 TM 单位体积内含量水平下降; T5~T6 时间段内 TM 水平随时间延长而升高,提示随微循环障碍持续存在致血管内皮细胞损伤进一步加重, TM 快速大量释放入血致 TM 水平快速升高,表明 THS 发展过程中收缩压降至基础值 3/4 前,应尽快开展液体复苏治疗,并在基础值 1/5 以上时进行及完成,否则可能随血管内皮细胞严重损伤,使 TM 水平迅速上升导致高凝血酶活性,激活纤维蛋白原形成纤维蛋白,作用于血小板受体使血小板聚集,使游离凝血酶增多,可能发生血栓形成及弥散性血管内凝血(DIC)或深静脉血栓等,促进全身性炎症反应综合 (下转 120 页)

- in a neonatal intensive care unit[J]. Am J Infect Control, 2012, 40(7): 637-642.
- [4] 谢在海, 朱元祺, 李莉, 等. 黏质沙雷菌 β -内酰胺类耐药基因研究[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(3): 431-434.
- Xie ZH, Zhu YQ, Li L, et al. Study of *Serratia marcescens* to β -lactam resistance gene[J]. Chinese Journal Laboratory Diagnosis, 2014, 18(3): 431-434.
- [5] 杨海飞, 程君, 胡立芬, 等. 黏质沙雷氏菌中 AmpC 酶的检测及药敏率分析[J]. 安徽医学, 2012, 33(2): 129-132.
- Yang HF, Cheng J, Hu LF, et al. Antimicrobial resistance of AmpC producing in *Serratia marcescens* in Anhui[J]. Anhui Medical Journal, 2012, 33(2): 129-132.
- [6] 邵海枫, 蒯守刚, 王卫萍, 等. 黏质沙雷菌对碳青霉烯酶类抗菌药物的耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12): 1196-1198.
- Shao HF, Kuai SG, Wang WP, et al. The mechanism of *Serratia marcescens* resistant to carbapenems[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2010, 33(12): 1196-1198.

收稿日期: 2014-04-05

修回日期: 2014-12-23

(上接 117 页) 征-多脏器功能障碍综合征-多脏器功能衰竭的发展。

TM 水平检测及在临床医学中应用是当前重要研究课题^[3,6~7]。THS 发展过程中动态检测 TM 对其治疗和预后具有重要意义。本文以收缩压曲线结合常规经典 ELISA 方法, 进行 THS 不同位置外周血标志物 TM 水平动态监测, 对血管内皮细胞损伤程度进行评价, 有效评估微循环障碍程度及发展状况, 为指导 THS 液体复苏治疗及判断预后等提供新思路及实验依据^[8~10]。

今后仍有待于进一步增加样本量, 以及开展 THS 相关病理生理机制研究, 并在临床诊疗应用中扩大研究范围。

参考文献:

- [1] 李维礁, 陈媛, 朱玮亚, 等. 家兔急性失血性休克及分组治疗的血压、微循环同步观测[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(5): 20-23.
- Li WJ, Chen Y, Zhu WY, et al. Simultaneous observation of blood pressure and microcirculation of rabbits with acute hemorrhagic shock after treatment[J]. Journal of Kunming Medical University, 2011, 32(5): 20-23.
- [2] 刘卫华, 黄群英, 庞振瑶. 高血压患者肾微循环功能障碍与冠状动脉病变相关研究[J]. 陕西医学杂志, 2010, 39(12): 1611-1613.
- Liu WH, Huang QY, Pang ZY. The relationship of renal microcirculation dysfunction and severity of coronary artery stenosis in essential hypertension patients[J]. Shaanxi Medical Journal, 2010, 39(12): 1611-1613.
- [3] 江彩玉, 杨敬茂, 崔桦. 肝脏疾病病人血浆血栓调节蛋白变化及其临床意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2010, 25(6): 509-510, 513.
- Jiang CY, Yang JM, Cui H. The changes of plasma thrombomodulin and their clinical significance in patients with liver diseases[J]. Med J Qilu, 2010, 25(6): 509-510, 513.
- [4] 吴健锋, 管向东, 陈娟, 等. 早期乳酸清除率评估与失血性低血容量休克预后的研究[J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2010, 4(4): 28-30.
- Wu JF, Guan XD, Chen J, et al. Clinical significance of

early lactate clearance on prognosis in patients with hemorrhagic hypovolemic shock[J]. Chin Arch Gen Surg(Electronic Version), 2010, 4(4): 28-30.

- [5] 李大鹏, 李震, 王刚, 等. 创伤性失血性休克发生过程中收缩压与失血量的相关性研究[J]. 医学信息, 2013, 26(11): 150-151.
- Li DP, Li Z, Wang G, et al. Study on the correlative for systolic blood pressure and blood loss volume in traumatic hemorrhagic shock[J]. Medical Information, 2013, 26(11): 150-151.
- [6] 李萍. 原发性肝癌患者血浆血栓调节蛋白测定的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 494.
- Li P. Patients with primary liver cancer clinical significance for the determination of plasma thrombus regulatory proteins[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2009, 30(5): 494.
- [7] 江雁, 穆红, 唐志琴. 血栓调节蛋白及细胞间粘附因子检测在急性冠脉综合征中的临床应用[J]. 哈尔滨医药, 2009, 29(2): 1, 3.
- Jiang Y, Mu H, Tang ZQ. The clinical application of sTM and sICAM-1 in the patients with acute coronary syndromes[J]. Harbin Medical Journal, 2009, 29(2): 1, 3.
- [8] 于天瑜. 102 例限制性液体复苏治疗创伤失血性休克的临床研究[J]. 吉林医学, 2013, 34(21): 4252.
- Yu TY. 102 cases of limited fluid resuscitation clinical research for the treatment of traumatic uncontrolled hemorrhagic shock[J]. Jilin Medical, 2013, 34(21): 4252.
- [9] 侯丹, 谭雯. 创伤性肝破裂合并失血性休克不同早期液体复苏方法疗效比较[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(21): 4819-4820.
- Hou D, Tan W. Traumatic hepatic rupture complicating uncontrolled hemorrhagic shock different early fluid resuscitation method curative effect comparison[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32(21): 4819-4820.
- [10] 程卫东, 孙明寅. 限制性液体复苏在创伤失血性休克急救中的应用[J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 662-663.
- Cheng WD, Sun MY. Restrictive liquid recovery application in uncontrolled hemorrhagic shock trauma first aid[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2013, 17(4): 662-663.

收稿日期: 2014-11-12

修回日期: 2014-01-04