

· 论 著 ·

## 血必净对窒息大鼠心肺复苏后免疫因子及补体变化的实验研究\*

周厚荣, 张 谦<sup>△</sup>, 杨秀林, 周 霞  
(贵州省人民医院急诊科, 贵阳 550002)

**摘 要:**目的 探讨血必净对大鼠心肺复苏后免疫因子及补体水平变化的影响。方法 建立心肺复苏大鼠模型, 将 42 只 SD 大鼠随机分为 4 组。A 组: 假手术组(仅进行麻醉和气管切开插管、血管穿刺, 不进行窒息及心肺复苏); B 组: 常规复苏组(常规复苏 + 生理盐水 4 mL/kg); C 组: 血必净低剂量治疗组(血必净 2 mL/kg + 生理盐水 2 mL/kg); D 组: 血必净高剂量治疗组(血必净 4 mL/kg); 动态观察血清补体 C<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>)、补体 C<sub>4</sub>(C<sub>4</sub>)、白介素-12(IL-12)、白介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平的变化。结果 与 A 组比较: B、C、D 组 IL-12、TNF-α 水平复苏后均高于 A 组( $P < 0.01$ ); B 组复苏后 6 h 与 0 h 比较, C<sub>3</sub> 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), C、D 组均差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 各组间 C<sub>4</sub> 均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与同组 0 h 比较: B、C、D 组复苏后 6 h IL-12、TNF-α 水平均升高( $P < 0.01$ ); C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> B 组复苏后 6 h 分别下降 45.24%, 49.97%, 且差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), C、D 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 B 组比较: C、D 组复苏后 IL-12、TNF-α 水平低于 B 组( $P < 0.01$ ), C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在整个实验过程均未能检测到 IL-4 的浓度。结论 心肺复苏后存在补体水平的消耗, 炎症因子 TNF-α、IL-12 过度表达, 血必净可减轻复苏后补体水平的消耗及 TNF-α、IL-12 过度表达。

关键词: 心肺复苏; 免疫因子; 补体; 血必净

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.004

中图分类号: R364.4; R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)17-2248-03

## Study of leverl of complement receptor and immune factor after anoxia-induced cardiac arrest - cardiopulmonary resuscitation treatment by Xuebijing in rats\*

ZHOU Hou-rong, ZHANG Qian<sup>△</sup>, YANG Xiu-lin, et al.

(Department of Emergency, People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550002, China)

**Abstract:** Objective To study the lever of complement receptor and immune factor after anoxia-induced cardiac arrest - cardiopulmonary resuscitation (CA-CPR) by Xuebijing injection. **Methods** To establish the CA-CPR model with 42 SD rats, randomly divided into 4 groups. Group A: sham operation group (only anesthesia and tracheotomy intubation, vascular puncture, without suffocate and cardio-pulmonary resuscitation); group B: conventional resuscitation group (conventional recovery + physiological saline 4 ml/kg); group C: Xuebijing low-dose treatment group (Xuebijing 2ml/kg); group D: Xuebijing high-dose treatment group (Xuebijing 4 mL/kg). To observe the changes of complement receptor C<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>), C<sub>4</sub>, IL-12, IL-4, tumor necrosis factor-α(TNF-α) at any time. **Results** Compared with group A, the level of IL-12, TNF-α in group B, C, D was higher after CPR ( $P < 0.01$ ), the level of C<sub>3</sub> on 6 h in group B had the statistic differnece, but there was no statistical difference between the group C and D; C<sub>4</sub> had no statistic significance among these groups ( $P > 0.05$ ). Compaired with 0 h in the same groups, the level of IL-12, TNF-α was increased after 6 h in the group B, C, D ( $P < 0.01$ ); but the lever of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> on 6 h in group B was decreased by 45.24% and 49.97%, with the statistic significance ( $P < 0.01$ ), there was no statistic difference between the group C and D. Compared with group C, the level of IL-12, TNF-α after CPR in group C, D was decreased ( $P < 0.01$ ), but C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> had no statistic significance. Concentration of the factor of IL-4 was not detected during all the experiments. **Conclusion** There exsits the consumption of complement receptor and the over-expression of inflammation factors including IL-12, TNF-α, and Xuebijing can rectify them.

Key words: cardiopulmonary resuscitation; complement; immune factor; Xiebijing

猝死一直是威胁人类健康及生命的主要疾病, 在美国每年约有 350 000 人发生猝死(1 000 人/天)<sup>[1]</sup>。心肺复苏后细胞因子的变化, 最终可引起自身的免疫失控, 导致全身炎症反应综合征(SIRS)的发生, 在这种状态下, 自身免疫失控所导致的损伤远远大于心肺复苏的损伤作用, 是继发多器官衰竭(MODS)的重要原因。心肺复苏后免疫功能变化目前报道甚少, 本研究通过制备大鼠心肺复苏模型, 探讨心肺复苏后免疫功能变化。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物** 动物分组 选用健康成年 SD 大鼠[第三军医大学大坪医院野战外科研究所医学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK(渝)2007-0005]42 只, 雌雄不限, 体质量 310~450 g 动物随机分为 4 组。A 组: 假手术组(仅进行麻醉和气管切开插管、血管穿刺, 不进行窒息及心肺复苏); B 组: 常规复苏组(安慰剂静脉注射生理盐水 4 mL/kg); C 组: 血必净低剂量治疗组(血必净 2 mL/kg + 生理盐水 2 mL/kg, 血必净, 由天津红日药业有限公司生产, 规格 10mL/支, 批号: 08121001); D 组: 血必净高剂量治疗组(血必净 4 mL/kg); B、C、D 组均为心肺

\* 基金项目: 贵州省科技攻关项目黔科合 S 字[2007]1055, 贵州省科技厅资助; 贵州省省长基金资助课题 黔省专合字(2007)66 号。 △ 通讯作者, 电话: 13608558119; E-mail: zhangqian800@126.com。

复苏组,每组按时间又分为复苏后即刻0 h、6 h亚组,每亚组6只。其他常规复苏同模型组,实验动物术前晚上禁食,允许自由饮水。维持体温在正常范围,以避免其对实验结果的影响。

**1.2 动物模型制备** 根据 Hendrickx 等<sup>[2]</sup>创建的窒息法心肺复苏模型,并参照复苏实验研究 Utstein 模式制作该模型,简述如下:将动物仰卧固定于手术台上,乌拉坦(首剂量为2 g/kg)腹腔注射麻醉,行左颈动脉置管,接ASB-240U生物信号采集分析系统(成都傲生科技公司生产),测量平均动脉压(MAP)、心率(HR),记录Ⅱ导心电图(ECG);气管切开置管,接ALC-V9动物呼吸机(上海奥尔特生物科技有限公司生产)。大鼠术后室温下稳定10 min,于呼气末夹闭气管插管致窒息心跳骤停(CA)。CA持续(176±70)s[窒息(423±26)s]后,立即实施心肺复苏。胸外按压频率为160次/分,按压深度为大鼠胸廓前后径的1/3,并快速推注肾上腺素0.01 mg/kg,呼吸机辅助通气(100%纯氧),通气频率80次/分,潮气量6 mL/kg,连续监测并记录心电图、颈动脉血压。15 min无效者放弃复苏。记录窒息导致CA的时间、心肺复苏时间、自主循环恢复(ROSC)时间;ROSC 3 h后逐步撤离呼吸机。实验结束取血6 mL送检并处死实验动物。CA标准:(1)心电图示心电静止、室颤、心电机械分离;(2)心尖区心脏搏动消失;(3)动物皮肤黏膜明显发绀。ROSC判断指标:(1)心电图出现正常的QRS波群(夹闭气管前的心电图表现);(2)可触摸到明显的心尖搏动,收缩压大于或等于60 mm Hg;(3)动物皮肤黏膜发绀明显减轻。

**1.3 血清补体C<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>)、补体C<sub>4</sub>(C<sub>4</sub>)、白介素-12(IL-12)、白介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)检测** C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、IL-12检测采用双抗体夹心ABC-ELISA法。仪器为美国宝莱公司生产Elx800全自动酶标仪。试剂由上海西唐生物科技有限公司提供。IL-4、TNF-α检测采用FACS Aria流式细胞仪(美国BD公司)测定,由贵州省人民医院检验科专人按试剂盒内操作方

法进行双份检测,取均值。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 11.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐,采用成组设计资料的 $t$ 检验,如方差不齐,采用随机区组设计的秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 复苏组间体质量、窒息时间、心肺复苏(CPR)时间、ROSC时间比较** 各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表1。

表 1 复苏组间体质量、窒息时间、CPR 时间等比较( $\bar{x} \pm s$ )					
组别	<i>n</i>	体质量 (kg)	窒息时间 (s)	CPR 时间 (s)	ROSC 时间 (s)
B 组	6	380±21	423±26	192±110	612±116
C 组	6	376±43	413±25	163±42	576±57
D 组	6	380±19	402±22	173±46	575±47

**2.2 各组间复苏后即刻(0 h)、6 h C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、IL-12、TNF-α水平比较** 从观察起点到终点,检测4个实验组中各时间点的血清IL-4浓度值均低于0.05 ng/L。与A组比较:B、C、D组IL-12、TNF-α水平复苏后均高于A组( $P < 0.01$ );B组复苏后6 h与0 h比较,C<sub>3</sub>差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),C、D组均差异无统计学意义( $P > 0.05$ );各组间C<sub>4</sub>均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与同组0 h比较:B、C、D组复苏后6 h IL-12、TNF-α水平均升高( $P < 0.01$ );B组复苏后6 h C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>分别下降45.24%,49.97%,且差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),C、D组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与B组比较:C、D组复苏后IL-12、TNF-α水平低于B组( $P < 0.01$ ),C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表2。

表 2 各组间复苏后即刻、6h C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、IL-12、TNF-α 水平( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

项目指标	时间	A 组	B 组	C 组	D 组
TNF-α(pg/L)	0 h	30.70±11.50	47.00±18.70	51.80±19.60	37.60±14.20
	6 h	30.70±11.50	242.30±61.60 <sup>bc</sup>	144.70±51.40 <sup>bcd</sup>	94.40±25.20 <sup>bcd</sup>
IL-12(ng/L)	0 h	133.90±41.00	140.20±23.50	138.00±27.10	144.60±42.50
	6 h	133.90±41.00	672.70±83.09 <sup>bc</sup>	265.40±43.40 <sup>bcd</sup>	260.00±50.50 <sup>bcd</sup>
C <sub>3</sub> (g/L)	0 h	13.19±5.57	15.28±5.11	16.49±4.97	16.93±5.06
	6 h	13.19±5.57	6.91±2.34 <sup>ac</sup>	11.59±3.30	11.75±3.79
C <sub>4</sub> (g/L)	0 h	1.86±0.65	2.66±0.83	1.99±0.69	1.80±0.53
	6 h	1.86±0.65	1.33±0.36 <sup>c</sup>	1.92±0.53	1.83±0.62

与A组同时点比较,<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: $P < 0.01$ ;与同组0 h比较,<sup>c</sup>: $P < 0.01$ ;与B同时点比较,<sup>d</sup>: $P < 0.01$ 。

3 讨 论

心肺复苏本质上就是缺血再灌注的过程,心肺复苏术后氧供与氧耗失衡导致全身组织低灌注,引发心源性休克、SIRS、MODS,最终导致死亡。SIRS、休克、MODS、充血性心力衰竭等危重患者临床上均有补体过度活化作用的表现,由此推测,心肺复苏后可能存在补体的过度活化。补体系统的三条途径,即经典途径、替代途径、凝集素途径在再灌注损伤中都存在,国外研究显示应用人可溶性补体受体1可阻断急性心肌梗死患者经心肺转流术后的补体激活<sup>[3]</sup>。马虹等<sup>[4]</sup>报道急性心肌梗

死患者补体系统被激活,补体激活的程度与心肌缺血损伤范围相关。提示补体系统在缺血再灌注损伤发展过程中有重要地位。

血必净注射液是王今达教授以血府逐瘀汤为基础,反复精炼筛选出的静脉制剂,主要成分为赤芍、川芎、丹参、红花、当归等活血药物。现代药理证明,血必净具有活血化瘀、清热解毒、菌毒并治等功效,通过拮抗TNF-α、内毒素及IL-6的释放,增强单核细胞人类白细胞Ⅱ抗原(HLA-DR)表达,促进免疫功能恢复,对免疫功能具有双向调节能力<sup>[5]</sup>。心肺复苏后6 h,B组

C<sub>3</sub> 水平低于复苏前( $P<0.05$ ),与同组复苏后即刻比较,B 组复苏后 6 h C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 水平分别下降 45.24%,49.97%,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),C、D 组 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 水平与复苏前比较差异无统计学意义,提示随着复苏后缺血再灌注发展补体被激活而大量消耗,与张慧等<sup>[6]</sup>报道心脏体外循环手术患者 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 在转流中 30 min 和转流停止直至术后 4 h 出现大量消耗相吻合。C、D 组 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 水平降低较小,可能与血必净能减少缺血再灌注损伤,拮抗内毒素诱导单核/巨噬产生的内源性炎性介质失控性释放的作用有关,而与血必净的剂量无关。

近年有研究认为,心肺复苏术后患者 SIRS 发生率高达 90.6%,是影响心肺复苏最终死亡的主要危险因素<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  是触发缺血再灌注损伤时炎症瀑布效应的关键因子,其表达高度依赖于 IL-12 或 IL-23,如果其表达被抑制,则再灌注时 TNF- $\alpha$  合成及缺血再灌注损伤程度均明显减轻<sup>[8-9]</sup>。Th1/Th2 细胞平衡受诸多因素的调节,Th1 主要分泌 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$ ,主要介导细胞免疫反应。Th2 主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13,主要介导体液免疫反应。IL-4 在 Th 细胞分化过程中起到基本调节作用,可使 Th0 B 细胞向 Th2 细胞分化,IL-12 使 CD4<sup>+</sup> 和 Th2 细胞向 Th1 细胞分化<sup>[10]</sup>;作者研究发现,与 A 组及复苏后即刻比较,B、C、D 组 IL-12、TNF- $\alpha$  水平复苏后均高于 A 组和复苏后即刻( $P<0.01$ ),与 B 组比较,C、D 组复苏后 IL-12、TNF- $\alpha$  水平低于 B 组( $P<0.01$ ),提示 TNF- $\alpha$ 、IL-12 参与了心肺复苏后再灌注损伤的发生、发展过程,本实验中未检测到血清 IL-4 浓度,可能与 Th1/Th2 细胞失衡及细胞因子之间交互抑制有关,由此推测心肺复苏后机体存在免疫失衡,主要以 Th1 细胞因子表达异常为主。血必净可抑制血清 IL-12、TNF- $\alpha$  水平,调节过高或过低的免疫反应,保护和修复应激状态下受损的脏器。

通过本实验可推测,心肺复苏后存在补体水平的消耗,炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-12 过度表达及 Th1/Th2 细胞失衡,主要以 Th1 细胞因子表达异常为主。血必净可抑制补体水平的过度活化,抑制血清 IL-12、TNF- $\alpha$  水平,保护和修复应激状态下受损的脏器。

(上接第 2247 页)

一步探索研究。

#### 参考文献:

- [1] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(25): 14863.
- [2] Seal S, Komarina S, Aluru S. An optimal hierarchical clustering algorithm for gene expression data[J]. Inform Proc Lett, 2005, 93(3): 143.
- [3] 孟范静, 刘毅慧, 王洪国, 等. 遗传优化算法在基因数据分类中的应用[J]. 生物信息学, 2008, 6(20): 119.
- [4] Chen XF, He ZJ, Xiang JW, et al. A dynamic multi-scale lifting computation method using Daubechies wavelet[J]. J Comput Appl Math, 2006, 188(2): 228.

#### 参考文献:

- [1] Eisenberg MS, Mengert TJ. Cardiac Resuscitation[J]. N Engl J Med, 2001, 344(17): 1304.
- [2] Hendrickx HH, Rao GR, Safar P, et al. Asphyxia cardiac arrest and resuscitation in rats: I Short term recovery[J]. Resuscitation, 1984, 12(2): 97.
- [3] Lazar HL, Bokesch PM, van Lenta F, et al. Soluble human complement receptor 1 limits ischemic damage in cardiac surgery patients at high risk requiring cardiopulmonary bypass[J]. Circulation, 2004, 110(11 Suppl 1): II 274.
- [4] 马虹, 吴素华, 董吁钢, 等. 急性心肌梗死患者补体激活与心肌缺血损伤的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2002, 2(6): 372.
- [5] 刚丽, 孙晓义, 蒋志宏, 等. 血必净注射液治疗急性呼吸窘迫综合征的疗效观察[J]. 疑难病杂志, 2007, 6(6): 359.
- [6] 张慧, 苗庄, 刘刚, 等. 心脏体外循环手术患者检测 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、CRP 结果分析[J]. 吉林医学, 2007, 28(9): 1132.
- [7] 朱英, 黄淮, 颜景华, 等. 心肺复苏后多器官功能障碍综合征危险因素和预后分析[J]. 中国医师杂志, 2006, 8(8): 1048.
- [8] Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, et al. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Hepatology, 1999, 30(6): 1448.
- [9] Husted TL, Blanchard J, Schuster R, et al. Potential role for IL-23 in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Inflamm Res, 2006, 55: 177.
- [10] 王兵, 张畔. 多器官功能障碍综合征中急性虚证发病与辅助 T 淋巴细胞 1/2 平衡之间的关系及治疗对策[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(1): 58.

(收稿日期: 2010-03-05 修回日期: 2010-04-10)

- [5] 罗万春, 陈军, 伍亚舟, 等. 基于小波多尺度的人类胚胎期大脑皮层基因表达分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(12): 1462.
- [6] 胡昌华, 张军波, 夏军, 等. 基于 MATLAB 的系统分析与设计——小波分析[M]. 西安电子科技大学出版社, 1999.
- [7] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer class discovery and class prediction by gene expression monitoring[J]. Science, 1999, 286: 531.
- [8] 闫晓光, 游顶云, 李康. 基因表达数据与小波变换分析的思想与方法[C]//2007 年中国卫生统计学大会. 2007 年中国卫生统计学学术大会论文集, 西安, 2007.

(收稿日期: 2009-11-27 修回日期: 2010-02-07)