

蝮蛇抗栓酶对骨骼肌缺血再灌注损伤保护的实验研究

范里¹ 刘世清¹ 杜飞²

(1. 武汉大学人民医院骨科, 湖北 武汉 430060; 2. 湖北省新华医院)

【摘要】目的 探讨骨骼肌缺血再灌注损伤前后微循环变化及蝮蛇抗栓酶(Svate)的保护作用。
方法 24只新西兰大白兔随机分成实验组和对照组,以气囊止血带造成兔左下肢缺血再灌注损伤模型。实验组分别在缺血前及再灌注前给予 Svate 静注,对照组给予等量生理盐水。用活体微循环显微镜观察兔缺血前及再灌注后骨骼肌微循环的变化并作血液流变学检测。
结果 骨骼肌缺血再灌注后对照组:全血粘度增高、血流缓慢、红细胞严重聚集、纤维蛋白原增加,大量白细胞附壁和白色微栓形成,无复流现象严重,微血管有渗出、渗血,骨骼肌组织损伤较重。随再灌注时间的推移,微循环障碍逐渐加重;实验组经 Svate 保护,血液流变学状况、微循环障碍明显好转,骨骼肌组织损伤较轻。
结论 ①骨骼肌缺血再灌注后造成严重的微循环障碍和肌组织损伤;②Svate 通过疏通微循环对骨骼肌缺血再灌注损伤起保护作用。

【关键词】 缺血再灌注损伤; 血液流变学; 微循环; 蝮蛇抗栓酶

Experimental research on the protective effect of agkistrodon halys antithrombin on ischemical reperfusion injury of skeletal muscles FAN Li, LIU Shiqing, DU Fei. Department of Orthopaedics, the People's Hospital of Wuhan University(Hubei Wuhan, 430060, China)

【Abstract】 Objective To explore the changes of microcirculation and hemorrheology on ischemia reperfusion injury of skeletal muscles and evaluate the protective effects of Agkistrodon halys anti-thrombin(Svate)
Methods 24 New Zealand rabbits were divided randomly into experimental group and the control. The model of ischemia reperfusion injury of skeletal muscles was built by tourniquet. The anti-thrombin Svate was applicated in experimental group instead of saline in control group before ischemia and reperfusion. The changes of microcirculation were observed.
Results After 4hrs ischemia and 2hrs reperfusion of skeletal muscles in control group:the whole blood viscosity, severe erythrocyte aggregation index and fibrinogen were significantly increased,blood flow slowed down. Serious no-reflow phenomenon, erythrocyte aggregation, large amounts of neutrophil-endothelial adhesion and white micro-thrombosis were observed in microcirculation of the control group, There was exudation and oozing of blood from capillaries, and the more severe damages of skeleton muscles. The disturbance of micro-circulation would be gradually aggravated along with the increase time of reperfusion. In experimental group: the condition of heamo-dynamics and microcirculatory disturbances were improved and the damages of the skeletal muscles was lighter.
Conclusion ① Seriously microcirculatory disturbance cause by ischemia reperfusion injury of skeletal muscles. ② Anti-thrombin Svate could play the impotant roles in prevention from ischemia reperfusion injury of skeletal muscles by dredging microcirculation.

【Key words】 Ischemia-reperfusion injury; Hemorrheology; Microcirculation; Agkistrodon halys antithrombin

在骨科临床工作中,常可遇到骨骼肌缺血再灌注(I/R)损伤的问题,如处理不当,轻则使骨骼肌功能受损,重者致远端肢体坏死。本实验通过微循环显微镜直接观测骨骼肌 I/R 前后微循环状况的变化及运用蝮蛇抗栓酶(Svate)保护后骨骼肌微循环的变

化,探讨骨骼肌 I/R 损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 新西兰大耳白兔 24 只,体重 1.8~2.4 kg,随机分两组, A 组为对照组, B 组为实验组。实验组于上止血带前 10 min 和松止血带前

10 min 分别静注 Svate 0.0125 U/kg(沈阳第一制药厂,批号 970413),对照组注射等容量生理盐水。

1.2 实验方法 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)耳缘静脉注射麻醉,无菌条件下解剖出左趾长伸肌腱肌肉,肌腱移行部至斜韧带之间的部分,保证腱系膜完整,用微循环显微镜(WX-753B型,徐州光学仪器厂生产)观察肌腱系膜微循环状况并录像,以微循环微机图像测量系统(XTW型,北京光电技术公司生产)进行微循环测定分析。观察 10 min 后,在兔左大腿中上段上气囊止血带,驱血后充气至 4.0 KPa,缺血 4 h 后松开止血带并再次观察肌腱表面微循环状况 2 h。

1.3 检测项目

1.3.1 血液流变学指标(北京普利生 LBY-N6A 自清洗旋转式粘度计, LBY 红细胞变形仪) 全血粘度(η_b)、血浆粘度(η_p)、红细胞聚集指数(RAI)、红细胞

电泳时间(EPT)、红细胞变形指数(RDI)、纤维蛋白原(Fib)、红细胞压积(HCT)。

1.3.2 微循环指标 ①三级微血管血流速度测定:根据微循环显微镜下微血管分布特点:1级为细动脉,2级为后微动脉,3级为真毛细血管;②白细胞附壁;③白色微栓;④红细胞聚集;⑤无复流现象(No-reflow phenomenon):按田牛等^[1,2]将微循环各指标分为正常、轻、中、重四度。

1.3.3 组织病理学检查 电镜。

1.4 统计学处理 各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用 SPSS 统计软件进行检验(*t* 检验和 *q* 检验)。

2 结果

骨骼肌缺血 4 h 再灌注 2 h 后,血液流变学发生以下变化(表1):A组,全血粘度低切变率下增高,高

表 1 兔左后肢 I/R 后血液流变学变化($n=24, \bar{x} \pm s$)

检测项目	A 组		B 组	
	I 前 10 min	R 后 120 min	I 前 10 min	R 后 120 min
$\eta_b 10s^{-1}(mPa \cdot s)$	7.113 ± 0.763	8.159 ± 0.765 ^{▲▲}	7.253 ± 1.059	6.363 ± 0.841 [▲]
$\eta_b 120s^{-1}(mPa \cdot s)$	2.838 ± 0.217	2.893 ± 0.186	2.855 ± 0.133	2.508 ± 0.325 ^{▲▲}
$\eta_p(mPa \cdot s)$	1.427 ± 0.079	1.353 ± 0.084 [▲]	1.416 ± 0.075	1.262 ± 0.100 [▲]
Fib(G/L)	2.568 ± 0.374	3.145 ± 0.288 ^{▲▲}	2.743 ± 0.269	2.483 ± 0.322 [▲]
RAI	2.367 ± 0.326	2.811 ± 0.419 ^{▲▲}	2.467 ± 0.343	2.427 ± 0.295
EPT(S)	7.540 ± 0.647	8.666 ± 1.409 [▲]	7.477 ± 1.040	7.593 ± 0.455
RDI	2.374 ± 0.298	2.408 ± 0.183	2.332 ± 0.108	2.523 ± 0.123 ^{▲▲}
HCT(%)	31.417 ± 3.232	30.917 ± 2.466	31.333 ± 3.284	30.083 ± 2.678

注:I/R 前后对照 ▲*P*<0.05, ▲▲*P*<0.01

切变率下无变化,红细胞聚集指数升高,纤维蛋白原增多,红细胞电泳时间延长,红细胞压积不变,红细胞变形指数不变,血浆粘度下降;B组,全血粘度在高、低切变率下均下降,红细胞聚集指数不变,纤维蛋白原减少,红细胞电泳时间不变,红细胞压积不变,红细胞变形指数增高,血浆粘度与 A 组相比明显下降。

微循环变化:缺血前(T_0):两组微血管血流快,血细胞聚集不明显,偶见白色微栓和少量白细胞附壁,极少有无复流(no-reflow)现象,未见渗出及渗血。缺血 4 h,再灌注后 10 min(T_1):A组,微血管血流减慢,红细胞中度聚集,有较多白细胞附壁及少量白色微栓,部分微血管出现无复流,轻度渗出,但无渗血;B组,红细胞聚集不明显,仅真毛细血管血流减缓,但仍明显快于 A 组(表 2),白细胞附壁、白色微栓及无复流现象较少,无明显渗出和渗血。缺血 4 h 再灌注 2 h(T_2):A组,红细胞重度聚集,血流进一步减慢,有中度白细胞附壁和较多的白色微栓,无复流现象加

重,少数细静脉、毛细血管渗血;B组,血流亦减慢,但各级血管流速明显快于 A 组,红细胞轻度聚集,白细胞附壁及白色微栓量少于 A 组,无复流现象较轻,有轻度渗出,无渗血。电镜:A组,线粒体极度肿胀,结构不清,甚至崩解,嵴减少甚至消失,多处肌丝溶解,严重时形成散在片状溶解,糖原消失,少量肌细胞核浓缩边集;B组,线粒体肿胀,嵴减少,无坏死灶及肌丝溶解,糖原减少,少量肌丝断裂,肌细胞核无异常。

3 讨论

蝮蛇抗栓酶(Svate)中含有类凝血酶,它可切除血浆 Fib 中所含的纤维蛋白肽 A 片段,但不激活凝血因子Ⅻ,所以其水解产生的纤维蛋白凝块的侧链不能交链,易被纤维蛋白酶降解,导致体内 Fib 浓度降低而表现出抗凝效应^[3]。Svate 通过降低 Fib,增强红细胞间的静电斥力,降低其聚集力,使红细胞解聚、血液粘度下降,从而改善血液流动性,加快血液流动。

表 2 兔左后肢 I/R 后各级微血管血流速度变化 (mm/s, n = 24, $\bar{x} \pm s$)

分级	A 组			B 组		
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₀	T ₁	T ₂
1 级	0.515 ± 0.023	0.370 ± 0.023 [▲]	0.311 ± 0.014 ^{▲▲}	0.505 ± 0.025	0.526 ± 0.030	0.509 ± 0.038 [△]
2 级 A	0.404 ± 0.020	0.291 ± 0.021 [▲]	0.250 ± 0.027 ^{▲▲}	0.393 ± 0.023	0.398 ± 0.044	0.321 ± 0.033 ^{△▲▲}
V	0.270 ± 0.017	0.221 ± 0.017 [▲]	0.201 ± 0.015 ^{▲▲}	0.268 ± 0.020	0.255 ± 0.021	0.239 ± 0.017 [△]
3 级	0.279 ± 0.022	0.212 ± 0.020 [▲]	0.139 ± 0.020 ^{▲▲}	0.297 ± 0.021	0.257 ± 0.019 [▲]	0.230 ± 0.028 ^{△▲▲}

注: I/R 前后对照 ▲与 T₀ 相比 P < 0.01, ▲▲与 T₁ 相比 P < 0.01; 组间对照 △BT₂ 与 AT₂ 相比 P < 0.01, AT₀ 与 BT₀ 相比 P > 0.05

Svate 中含有 A 型磷脂酶 A₂ (A-PLA₂), 是血小板聚集抑制剂^[4], 可使血浆中 PGI₂ 含量增加, TxA₂ 浓度降低, 从而预防白色微栓的形成。红细胞变形是微循环保持有效灌注的必要条件, Svate 可增加红细胞的变形能力, 使红细胞与组织间物质与气体的交换面积增大, 从而增加组织供氧。

白细胞附壁与再灌注损伤关系密切, 本实验观察到 Svate 可使再灌注后白细胞附壁量明显下降, Svate 抑制白细胞附壁的机制可能与增加血液流速、减轻红细胞聚集、降低血液粘度及血管内皮损伤有关。

本实验中 I/R 损伤所致的红细胞聚集、白细胞附壁、白色微栓的形成均可使血液粘度增高、血液流速减慢, 而血粘度增高、流速减慢又可进一步促进红细胞聚集、白色微栓形成, 这种恶性循环可解释再灌注后随时间的推移, 微循环障碍逐渐加重。另外, 聚

集的红细胞携氧能力下降, 加之血流缓慢、无复流现象加重, 使骨骼肌仍处于一种缺血缺氧状态。而 Svate 通过降低血液粘度、加快血液流速、防止红细胞聚集、增强红细胞变形能力、抑制白细胞附壁抑制血小板聚集、预防白色微栓形成、减少 No-reflow 发生, 从而改善骨骼肌微循环状况, 对骨骼肌缺血再灌注损伤起到保护作用。

参考文献

- 田牛, 李向红. 临床微循环检查手册. 北京: 中国医药科技出版社, 1992. 165.
- 范里, 刘世清. 骨骼肌缺血再灌注损伤后血液流变性及微循环变化. 微循环学杂志, 1999, 9(1): 13-15.
- Ewart MR, Hatton MW, Basford JM, et al. The proteolytic action of Arvin on human fibrinogen. Biochem J, 1970, 118: 603-609.
- 潘华, 刘小龙, 杨冠珍, 等. 江浙蝮蛇磷脂酶 A₂ 基因的多样性研究. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(1): 91-95.

(收稿: 2002-08-14 修回: 2002-12-20 编辑: 李为农)

北京市京华行科贸有限责任公司

生产研制产品报价单

京药管械经营许 20000737 号 国医械广审(文)020129

一、牵引康复设备 (D)代表全电脑控制

1. JKF 系列多功能脊柱牵引康复床: 电脑程控, 腰椎、颈椎、全身静止、间歇牵引, 侧扳, 腰部热疗按摩。

Ⅲ型 19800 元/台 ⅢA 型: 26500 元/台 ⅢA(D)型: 38000 元/台
 IB 型: 8800 元/台 IB(D)型: 19800 元/台 IC 型: 13000 元/台 IC(D)型: 23900 元/台

2. FYC 系列卧式多功能腰椎治疗床: 屈膝俯卧位牵引、捶击、热疗一体化, 颈牵、下肢摇摆。

Ⅲ型: 9850 元/台 ⅢA 电动型: 13900 元/台 ⅢA(D)型: 29000 元/台

3. JQY 系列多功能颈椎牵引治疗仪: 颈牵、电针、热疗一体化。

I 型: 5800 元/台 I(B)型: 12600 元/台 I(A)型: 8800 元/台 IC 家用型: 520 元/台

二、RLY-A 系列 BH 型中频热场针灸按摩仪

该系列产品均为电脑程控, I 型产品具有人工针灸的各种针法及按摩手法, 手法逼真、柔和、深沉, 力度等同人工。中频波渗透性强, 可调至较深层次的穴位及病灶处。Ⅲ型和Ⅵ型增设远红外线热疗、药物离子导入, 配有与人体各部位相吻合的药物模具。主治: 风湿病、腰椎间盘突出症、颈椎病、骨质增生、关节炎、急慢性扭拉伤、偏瘫肢体恢复等。

I 型: 6000 元/台 Ⅲ型: 9000 元/台(双功能型) Ⅵ型: 12000 元/台(双功能智能型)

三、其它设备

1. XN 心脑检查治疗仪 ⅢA 型 2960 元/台 2. GZ 骨质增生药物电泳治疗仪 ⅢA 型 3260 元/台

3. FD 风湿治疗仪 ⅢA 型 2880 元/台 4. DJS 胆结石治疗仪 ⅢA 型 3380 元/台

邮购办法: (1) 邮局, 银行汇款均可, 款到后立即发货。(2) 厂家销售, 所售产品保修 1 年, 长期维修。运费保险费由我方负责。(3) 面向全国常年办理邮购, 欢迎来函来电索取资料。公司地址: 北京广外安门大街 305 号八区荣丰嘉园 8 号楼 2722 号 邮编: 100055 联系人: 徐照 电话: 010-63275185, 63275186 值班电话: 010-66031777 手机: 13901040602, 13910097637 银行汇款户名: 北京市京华行科贸有限责任公司 开户行: 北京建行玉泉路分理处 帐号: 2630017010