

·基础研究·

电针对家兔急性钝器伤后高凝状态分子标志物D-二聚体和凝血酶-抗凝血酶复合物的影响*

赵玄骥^{1,2} 王云亭^{2,3} 王荣国¹ 刘守尧^{1,2} 于占歌^{1,2}

摘要

目的:探讨电针对家兔急性钝器伤后D-二聚体(D-Dimer)和凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)的影响作用。

方法:将18只新西兰大白兔随机分为3大组,即空白组、模型组、电针组;每组6只动物。电针组在常规治疗的基础上,于伤后24h开始电针治疗。在造模前、造模后第1天、第4天、第7天分别对各组动物进行耳中动脉采血,测定D-Dimer和TAT的含量。

结果:造模后第1天,模型组和电针组的D-Dimer、TAT的含量高于空白组($P < 0.05$);造模后第4天,模型组的D-Dimer、TAT含量高于电针组($P < 0.05$),而电针组又高于空白组($P < 0.05$);造模后第7天,模型组和电针组的D-Dimer、TAT的含量呈下降趋势,但仍高于空白组($P < 0.05$)。

结论:电针弱刺激可以有效减少家兔急性钝器伤后D-Dimer和TAT的升高,防止高凝状态的形成。

关键词 电针;高凝状态;D-二聚体;凝血酶-抗凝血酶复合物

中图分类号:R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-12-1208-04

Effects of electroacupuncture on D-Dimer and thrombin-antithrombin complex of molecular markers of hypercoagulable state in rabbits after acute blunt trauma/ZHAO Xuanji, WANG Yunting, WANG Rongguo, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(12): 1208—1211

Abstract

Objective: To investigate the influence of electroacupuncture for rabbits with acute blunt injury of D-Dimer and thrombin-antithrombin complex (TAT).

Method: The 18 New Zealand white rabbits were randomly divided into three major groups, namely the blank group, model group and electroacupuncture group; and each group of 6 rabbits. In electroacupuncture group on the basis of conventional therapy, 24h after injury electroacupuncture treatment began. Before modeling and after modeling 1d, 4d, 7d respectively, in each group arterial blood were adopted from rabbits ears to measure the contents of D-Dimer and TAT.

Result: On the 1st day after modeling, in model group and electroacupuncture group the contents of D-Dimer and TAT were higher than that of blank group ($P < 0.05$). On the 4th day after modeling, the contents of D-Dimer and TAT in model group were higher than those in electroacupuncture group ($P < 0.05$), and in acupuncture group those were higher than that in blank group ($P < 0.05$). On the 7th in model group and electroacupuncture group the contents of D-Dimer and TAT decreased, but still higher than that in blank group ($P < 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture of weak stimulation can effectively reduce the increase of D-Dimer and TAT

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.12.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173343)

1 北京中医药大学,北京,100029; 2 中日友好医院; 3 通讯作者

作者简介:赵玄骥,男,硕士研究生; 收稿日期:2014-12-28

in rabbits after acute blunt injury, and prevent the formation of hypercoagulable state.

Author's address Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029

Key word electroacupuncture; hypercoagulable state; D-Dimer; thrombin-antithrombin complex

高凝状态亦称为血栓倾向或血栓形成前状态,是由于血液抗凝系统和(或)纤溶系统活性减低,止血与抗血栓平衡状态失调,血液凝固性和(或)血液流变学增高所导致的一种病理状态或症状,是一种不正常的状态,会增加血栓形成的危险^[1],目前运用中草药预防和治疗高凝状态的文献较多,但使用电针干预高凝状态的报道非常稀少。本研究旨在运用电针对家兔急性钝器伤后进行刺激,观察电针对高凝状态的分子标志物D-二聚体(D-Dimer)和凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性新西兰大白兔,(2.0±0.2)kg,北京市昌扬西山养殖场[SCXK(京)2011-0010]提供,于中国中医科学院基础理论研究所动物室普通环境饲养[SYXK(京)2010-0032]。

1.2 主要试剂

D-Dimer试剂盒(CUSABIO产品,批号:D3100103122)、TAT试剂盒(CUSABIO产品,批号:T2468793540)。

1.3 实验仪器

韩氏穴位神经刺激仪(HANS200E,南京济生医疗科技有限公司产品)、一次性针灸针(苏州针灸用品有限公司产品,0.25×25mm)、真空采血管(山东省成武县永康医用制品有限公司产品)、5号半采血针(上海康依医疗用品有限公司产品)、骨骼肌急性钝器伤打击装置(中国中医科学院望京医院)、高速离心机(德国Eppendorf公司产品)。

1.4 腓肠肌钝器伤模型制作

所有动物在实验前1天双侧小腿剃毛、称重、禁食;3%戊巴比妥钠30mg/kg体重耳缘静脉麻醉,将动物右侧在上侧卧位固定于造模台,右后肢置于伸膝、踝背屈约90°位固定,便于腓肠肌显示。在腓肠肌距跟骨后缘9cm处标记打击位置,用砸伤器造成一次性钝器伤,打击面积为1cm²,能量为9.75J。打

击处皮肤完整,胫腓骨无骨折。放回笼中,家兔麻醉苏醒后自由活动。所有动物在麻醉、术前、术后的喂养、室温及其他管理条件完全一致。

1.5 实验分组

将18只新西兰大白兔按照随机数字表法分为3大组,即空白组、模型组、电针组;每组6只动物。

1.6 干预方法

模型组创面外用安尔碘处理,1次/d,干燥暴露避免感染。电针组在常规治疗的基础上,于伤后24h开始电针治疗。用兔固定盒固定动物,取“足三里(ST36)”穴,参照《中国兽医针灸学》,阿是穴分别取在距每处创口头尾端1cm处。常规消毒,针刺后接电针仪(正极针刺入穴位区,负极针在旁开0.5cm处刺入皮下即可),频率2Hz,断续波,强度为可耐受(动物不挣扎),时间15min,1次/d,所有电极同步接电、断电。模型组、空白组同步模拟固定,但无任何干预措施。

1.7 取材及标本处理

在造模前、造模后第1天、第4天、第7天分别对各组动物进行耳中动脉采血,对血样进行相关检测。所有检测方法严格遵守相关实验室的操作规定。

1.8 指标的测定

用含有EDTA的真空采血管采血2ml,颠倒混匀,低温(4℃)离心(3500r/min,15min),取血浆,-20℃保存备用。按常规酶联免疫吸附法测定血浆D-Dimer和TAT含量,严格按照试剂盒说明书中的操作步骤完成。

1.9 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计处理,符合正态分布且方差齐性检验通过的,组间比较采用单因素方差分析,两两均数间比较采用LSD-*t*法,不符合正态分布或方差齐性检验未通过的采用非参数检验;数据以均数±标准差表示。

2 结果

造模前三组家兔的D-Dimer的含量无显著性差异($P>0.05$),造模后第1天模型组和电针组的D-Di-

mer 含量与空白组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 造模后第4天模型组和电针组的 D-Dimer 含量与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 且电针组和模型组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 造模后第7天, 模型组和电针组的 D-Dimer 含量较造模后第4天有所下降, 但仍与空白组有显著差异 ($P < 0.05$)。见表1。

造模前三组家兔的 TAT 的含量无显著性差异 ($P > 0.05$), 造模后第1天模型组和电针组的 TAT 含量与空白组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 造模后第4天模型组和电针组的 TAT 含量与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 且电针组和模型组相比有显著差异 ($P < 0.05$); 造模后第7天, 模型组和电针组的 TAT 含量较造模后第4天有所下降, 但仍与空白组有显著差异 ($P < 0.05$), 且电针组和模型组之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表2。

表1 不同时间点各组家兔 D-Dimer 的含量 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$)

组别	例数	造模前	造模后第1天	造模后第4天	造模后第7天
空白组	6	30.80±2.25	35.95±3.96	29.16±2.95	31.46±2.05
模型组	6	32.39±2.76	45.40±2.72 ^①	50.63±3.39 ^①	41.52±2.53 ^①
电针组	6	30.31±2.60	45.07±2.76 ^①	43.96±2.76 ^{①②}	39.32±3.30 ^①

①与空白组比较 $P < 0.05$; ②与模型组比较 $P < 0.05$

表2 不同时间点各组家兔 TAT 的含量 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$)

组别	例数	造模前	造模后第1天	造模后第4天	造模后第7天
空白组	6	33.23±6.62	41.03±6.89	39.41±3.10	40.23±5.30
模型组	6	32.72±6.24	57.28±4.08 ^①	57.79±4.20 ^①	55.55±4.67 ^①
电针组	6	34.88±4.64	57.49±3.21 ^①	46.98±5.37 ^{①②}	45.34±6.58 ^{①②}

①与空白组比较 $P < 0.05$; ②与模型组比较 $P < 0.05$

3 讨论

血浆 D-Dimer 是交联纤维蛋白溶酶原下激活的稳定和具体的降解产物^[2]。它的水平与纤溶系统的活性及血栓的溶解有密切关系, 是反映体内纤溶酶活性的理想指标, 也是评价凝血加速的一个有用指标^[3], 同时, 也是高凝状态的标志物^[4-5]。Matyas Benyo^[6]认为 D-Dimer 是一种很好的表明高凝状态和纤溶亢进的测试。Koenig W^[7]亦认为 D-Dimer 水平的增加提示高凝状态。区锦燕等^[8]对股骨闭合性骨折患者进行 D-Dimer 与血栓弹力图 (thrombelastograph, TEG) 的相关性研究, 发现患者创伤后 D-Dimer 有不同程度升高, 其增高与 TEG 的 α 角有相关性。赵超等^[9]认为 D-Dimer 能特异性反映体内高凝

状态和继发性纤溶亢进, 检测血浆中 D-Dimer 水平有助于血栓性疾病的早期诊断和指导溶栓药物治疗。高建刚等^[10]对 145 例骨折患者进行凝血功能与 D-Dimer 的检测, 21.3% 的患者 D-Dimer $> 500 \mu\text{g/L}$, 与 70.3% 的血浆纤维蛋白原 (plasma fibrinogen, FIB) 升高患者比较有显著性差异。Owings 等^[11]指出在严重创伤早期血浆中 D-Dimer 升高, 与血栓形成很难区别, 一般创伤后 48h 开始下降, 72h 基本消失, 如创伤后 72h D-Dimer 仍为阳性, 则应高度怀疑下肢深静脉血栓 (deep vein thrombosis, DVT) 的发生。吕鹏飞等^[12]研究结果显示, 创伤性骨折后 2h—3d, 大鼠的 D-Dimer 升高较明显, 峰值持续 3—7d, 然后呈逐渐下降趋势, 并认为创伤性骨折后凝血系统占优势, 3d 内血液处于高凝状态。区锦燕等^[8]研究显示股骨多段闭合骨折患者创伤后的第2天与正常人比较, D-Dimer 增大, 提示患者创伤后凝血功能于 24h 内即开始增强, 创伤后第6天与正常人比较, TEG 指标中 R 时间缩短, α 角、D-Dimer 增大, 提示患者的凝血功能增强呈高凝状态。本研究表明造模后第1天, 模型组和电针组 D-Dimer 水平明显增高, 与空白组有显著差异; 造模后第4天, 模型组 D-Dimer 水平明显增高, 电针组较模型组明显减低, 且有明显差异; 造模后第7天, 模型组和电针组的 D-Dimer 水平都明显下降; 但与空白组相比仍有显著差异。不难看出, D-Dimer 在造模后第4天含量最高, 提示家兔处于高凝状态, 造模后第4天, 电针组的 D-Dimer 水平较模型组明显减低, 提示电针的干预对防止高凝状态的形成为有效的。

TAT 是凝血酶与它的主要拮抗物抗凝血酶 III 结合形成的, 是反映凝血酶生成和活性增高的分子标志物, TAT 浓度升高表明高凝血酶的产生^[13-15]。TAT $> 3.0 \mu\text{g/L}$ 为增高, 有助血栓前状态的诊断^[16]。Komuro Y^[17]认为 TAT 在提示高凝状态方面是灵敏的。Psuja P^[18]的研究也肯定了 TAT 早期识别高凝状态的作用。有研究认为, 术前 TAT 的检测可作为术后预测是否并发血栓及凝血状态改善的指标, 联合检测 D-Dimer 和 TAT, 对排除血栓前状态及血栓的价值很高^[19]。血浆 TAT 水平可以很好地代表凝血酶的生成, 通过这项检测来衡量体内的高凝状态, 以及观察患者的病情与凝血异常的关系及其动态变

化^[20]。姚宁等^[21]研究结果显示,急性白血病患者治疗前TAT水平明显高于正常对照组,提示急性白血病患者治疗前体内存在一种高凝状态,并且血浆中TAT及D-Dimer水平在急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)患者治疗第7天时已明显下降。TAT的检测有助于急性白血病患者初治时高凝状态的防治及弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)的早期判断早期治疗。本实验研究结果可以看出造模后第1天,模型组和电针组TAT水平明显增高,与空白组有显著差异;造模后第4天,电针组较模型组TAT含量明显减低,且有明显差异;造模后第7天,模型组和电针组的TAT含量均呈下降趋势,但下降幅度小,且有明显差异。这提示我们,电针可以防止家兔钝器伤后TAT的升高,从而防止高凝状态的形成。

高凝状态属于中医的血瘀证范畴,气滞血瘀是创伤早期的基本病机。足三里穴又名下陵、鬼邪、下三里,属足阳明胃经,为胃经之合穴、亦为胃经之下合穴,是四总穴之一,回阳九针穴之一,其定位在犊鼻穴下3寸,距胫骨前嵴外侧1横指,当胫骨前肌之上。具有健脾和胃,行气活血,疏通经络之功。阿是穴活血化瘀之功更是早就获得国际的认可。足三里配合阿是穴共奏行气活血化瘀之功,本研究结果表明,电针可以有效防止家兔钝器伤后D-Dimer和TAT的升高,从而预防高凝状态的形成。

高凝状态是一种复杂的病理状态,受诸多因素影响,本实验由于实验条件有限,样本量相对较少,实验结果仍需大样本研究进一步证实;同时,电针的刺激强度以及其他的穴位对高凝状态的分子标志物是否有影响,也有待进一步研究。

参考文献

[1] Jeong Min Lee, Jun Hyeok Lim, Jung-Soo Kim, et al. Multiple hypercoagulability disorders at presentation of non-small-cell lung cancer[J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2014, 77(1):34—37.
 [2] Zhang LD, Liu HB, Li YN, et al. Correlation analysis between plasma D-dimer levels and orthopedic trauma severity [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(17):3133—3136.
 [3] 许俊堂,王荣山.血栓相关的血液学指标及其意义[J].中华检验医学杂志,2000,23(6):382—384.
 [4] Xu G, Zhang YL, Huang W, et al. Relationship between plasma D-dimer levels and clinicopathologic parameters in

resectable colorectal cancer patients[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(6):922—923.
 [5] von Kanel R, Dimsdale JE, Adler KA, et al. Effects of non-specific beta-adrenergic stimulation and blockade on blood coagulation in hypertension[J]. J Appl Physiol (1985), 2003, 94(4):1455—1459.
 [6] Matyas Benyo, Tibor Flasko, Zsuzsanna Molnar, et al. Follow-up of thrombin generation after prostate cancer surgery: global test for increased hypercoagulability[J]. PLoS One, 2012, 7(12):e51299.
 [7] Koenig W, Rothenbacher D, Hoffmeister A, et al. Plasma fibrin D-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a large case-control study[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(10):1701—1705.
 [8] 区锦燕,廖荣宗,周曙,等.股骨多段闭合骨折病人术前凝血功能的变化[J].中华麻醉学杂志,2004,24(7):534—536.
 [9] 赵超.D-二聚体在诊断严重创伤患者手术后深静脉血栓形成中的应用[J].实用医药杂志,2010,27(2):157
 [10] 高建刚,张丽英,刘风华,等.骨折病人凝血功能与D-二聚体检测结果的分析[J].内蒙古医学院学报,2005,27(2):114—115.
 [11] Owings JT, Gosselin RC, Anderson JT, et al. Practical utility of the D-dimer assay for excluding thromboembolism in severely injured trauma patients[J]. J Trauma, 2001, 51(3):425—430.
 [12] 吕鹏飞,刘宁青,梁玉龙,等.脉络舒通颗粒对下肢骨折后大鼠血液高凝状态的影响[J].山东医药,2013,53(37):29—30.
 [13] Kotschy M, Witkiewicz W, Grendziak R, et al. Selected clotting factors in blood of patients with abdominal aortic aneurysms[J]. Kardiologia, 2012, 70(6):574—579.
 [14] Laurent Robriquet, François Collet, Antoine Tournays, et al. Intravenous administration of activated protein C in Pseudomonas-induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response[J]. Respir Res, 2006, 7(1):41.
 [15] Hobbs SD, Marshall T, Fegan C, et al. The constitutive procoagulant and hypofibrinolytic state in patients with intermittent claudication due to infrainguinal disease significantly improves with percutaneous transluminal balloon angioplasty[J]. J Vasc Surg, 2006, 43(1):40—46.
 [16] 黄树勇.自拟活血通脉汤干预髋部骨折后血液高凝状态的临床研究[D].广州:广州中医药大学,2010.
 [17] Komuro Y, Sekiguchi J, Nomura S, et al. Blood coagulation activity during microsurgery[J]. Ann Plast Surg, 1998, 40(1):53—58.
 [18] Psuja P, Zozulińska M, Turowiecka Z, et al. Plasma markers of hypercoagulability in patients with serious infections and risk of septic shock[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2002, 8(3):225—230.
 [19] 徐军.ELISA检测D-Dimer、APA、TAT探讨恒古骨伤愈合剂治疗兔TDVT分子机理的实验研究[D].昆明:昆明医学院,2009.
 [20] 路亚枫,翟艳芬,胡大一,等.冠心病患者血浆TF、TAT水平的变化及其临床意义[J].中华心血管病杂志,2004,32(z1):425.
 [21] 姚宁.急性白血病患者TAT、vWF、DD的检测及临床意义[D].南宁:广西医科大学,2007.