

• 论著 •

肠系膜淋巴管结扎对急性失血大鼠血液凝固性的影响

赵自刚 刘春艳 张玉平 张静 赵永泉 牛春雨

【摘要】 目的 观察结扎肠系膜淋巴管对急性失血大鼠血小板功能、体外血栓形成以及凝血功能的影响,探讨肠淋巴途径在急性失血时血液凝固性变化中的作用。方法 按随机数字表法将 20 只雄性 Wistar 大鼠分为失血组与结扎组,每组 10 只。采用经右颈总动脉匀速放血(失血量为全血量的 1/4)的方法制备急性失血大鼠模型。结扎组失血后行肠系膜淋巴管结扎,失血组仅在肠系膜淋巴管下穿线但不结扎,记录 24 h 大鼠存活情况。失血后 24 h 将存活大鼠再次全麻,经左颈总动脉迅速放血 6 ml。检测实验前后血小板黏附率、血小板聚集率、体外血栓形成率及凝血功能指标的变化,计算脑血流量。结果 急性失血后 24 h,失血组存活 6 只(60%),结扎组存活 9 只(90%),结扎组存活率高于失血组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与实验前相比,两组血小板黏附率、血小板聚集率、纤维蛋白原(Fib)均显著升高,凝血酶时间(TT)显著延长,脑血流量显著降低;失血组活化部分凝血活酶时间(APTT)显著延长,血栓湿长、干长、湿重、干重和血栓形成率均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验后结扎组血小板黏附率 $[(15.02\pm 1.24)\%]$,血小板聚集率(1 min、3 min 及最大聚集率),血栓湿长、干长、湿重、干重,血栓形成率 $[(46.2\pm 6.9)\%]$,APTT $[(21.04\pm 5.53)s]$,Fib 含量 $[(433.67\pm 13.97)g/L]$ 均显著低于失血组[分别为 $(18.54\pm 1.18)\%$ 、 $(69.8\pm 6.9)\%$ 、 $(26.35\pm 6.26)s$ 、 $(510.96\pm 35.59)g/L$,脑血流量 $[(485.1\pm 41.4)ml\cdot kg^{-1}\cdot min^{-1}]$ 显著高于失血组 $[(417.8\pm 42.2)ml\cdot kg^{-1}\cdot min^{-1}]$, $P<0.05$ 或 $P<0.01$]。结论 急性失血可导致大鼠血液高凝、体外血栓形成增多,肠系膜淋巴管结扎可改善急性失血大鼠的血液高凝状态。

【关键词】 肠系膜淋巴管; 结扎术; 失血; 血小板; 血栓; 凝血功能; 大鼠

Effect of mesenteric lymph duct ligation on coagulability of blood after acute loss of blood in rats ZHAO Zi-gang, LIU Chun-yan, ZHANG Yu-ping, ZHANG Jing, ZHAO Yong-quan, NIU Chun-yu. Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China
Corresponding author: NIU Chun-yu, Email: ncylyxf@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of mesenteric lymph duct ligation on platelet function, thrombus formation in vitro and coagulation function in rats with acute loss of blood, and investigate the role of intestinal lymphatic pathway on coagulability change during acute loss of blood. **Methods** Twenty male Wistar rats were randomly divided into loss of blood group ($n=10$) and ligation group ($n=10$). The acute loss of blood model was reproduced by withdrawing blood (one fourth of body whole blood volume) with an automatic withdrawal-infusion machine through right common carotid artery. In ligation group, the mesenteric lymph duct was ligated after loss of blood, and in loss of blood group only a thread was passed under the mesenteric lymph duct. The rats' survival rate at 24 hours was recorded. After 24 hours, surviving rats were anesthetized again, and 6 ml of blood was withdrew from left common carotid artery rapidly. The platelet adhesive rate, platelet aggregation rate, thrombus formation in vitro, coagulation function were determined before and after experiment, and the cerebral blood flow was measured. **Results** There were 6 rats alive in loss of blood group (60%), and 9 rats alive in ligation group (90%). The platelet adhesive rate, platelet aggregation rate, fibrinogen (Fib) content were increased in both groups, and cerebral blood flow was lower compared with before experiment significantly. The activated partial thromboplastin time (APTT) in loss of blood group, and thrombin time (TT) in both groups were prolonged. And the length of wet thrombus, wet weight of thrombus, length of dry thrombus, dry weight of thrombus and thrombus formation rate in loss of blood group were significantly increased compared with before experiment ($P<0.05$ or $P<0.01$). But in ligation group, the platelet adhesive rate $[(15.02\pm 1.24)\%]$, platelet aggregation rate (at 1 minute, 3 minutes and max aggregation rate), length of wet thrombus, wet weight of thrombus, length of dry thrombus, dry weight of thrombus, thrombus formation rate $[(46.2\pm 6.9)\%]$, APTT $[(21.04\pm 5.53)s]$ and Fib content $[(433.67\pm 13.97)g/L]$ were lower, cerebral blood flow $[(485.1\pm 41.4)ml\cdot kg^{-1}\cdot min^{-1}]$ was higher compared with loss of blood group, respectively $[(18.54\pm 1.18)\%$, $(69.8\pm 6.9)\%$, $(26.35\pm 6.26)s$, $(510.96\pm 35.59)g/L$, $(417.8\pm 42.2)ml\cdot kg^{-1}\cdot min^{-1}$, $P<0.05$ or $P<0.01$]. **Conclusion** The results indicate that acute loss of blood leads to coagulation and increased thrombosis, and mesenteric lymph duct ligation can improve hypercoagulability of blood.

【Key words】 Mesenteric lymph duct; Ligation; Loss of blood; Platelet; Thrombosis; Coagulation function; Rat

机体的凝血稳态是保证血液循环通畅的重要环节。由于手术、创伤等因素引起的急性失血事件可导致微循环障碍、缺氧、酸中毒等状况的持续存在,引起血液凝固性异常,加重失血性休克的恶化,并诱发器官功能衰竭,严重影响了患者的疗效与预后^[1]。本课题组前期针对肠淋巴途径在休克致多器官损伤发病学中的研究表明,阻断休克肠淋巴液回流可减轻大鼠肺、心、肾、肝等重要器官的炎症反应与器官损伤程度^[2-5],且证明肠淋巴途径在失血性休克致肠道屏障功能障碍和细菌/内毒素移位(BET)发病学中具有重要的作用^[6]。本研究中重点观察结扎肠系膜淋巴管(MLD)阻断肠淋巴液回流对急性失血大鼠血小板功能、体外血栓形成以及凝血功能的影响,探讨肠淋巴途径在急性失血时血液凝固性变化中的作用,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 动物分组与模型制备:清洁级 Wistar 雄性大鼠 20 只,购自中国医学科学院实验动物研究所,体重 300~350 g。按随机数字表法将大鼠均分为急性失血组和急性失血后 MLD 结扎组。实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准。肌肉注射戊巴比妥麻醉大鼠,经右颈总动脉插管;开腹,游离肠系膜上动脉(SMA)及与其相伴行的 MLD 并穿线。自右颈总动脉匀速放血(失血量为全血量的 1/4,全血量以体重 1/13 计算,放血量 ≥ 5.8 ml),3 min 内完成,复制大鼠急性失血模型,留取全血用于指标检测。放血完毕后,结扎组行 MLD 结扎,失血组仅穿线、不结扎。缝合手术伤口,记录 24 h 大鼠存活情况。放血后 24 h,将存活大鼠再次麻醉,经左颈总动脉插管,迅速放血 6.0 ml,取血待测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血小板黏附及聚集功能测定:取 3.0 ml 肝素抗凝血,离心 5 min 制备富血小板血浆 1.00 ml,取 0.55 ml 再次离心 10 min 制备贫血小板血浆,用透光法测定,根据吸光度(A)值计算血小板黏附率。取剩余的 0.45 ml 富血小板血浆,加聚集剂 ADP 40~50 μ l 诱导血小板聚集,用比浊法根据 A 值测定血小板聚集率。

1.2.2 体外血栓形成实验:取不抗凝全血 0.9 ml 注入血栓形成胶皮管中,两端相连连成环状密闭,将血栓管环放在血栓转盘上匀速转动 15 min 后,取出管内血栓测定长度,先称湿重,然后烘干测干重,计算血栓形成率。

1.2.3 凝血功能测定:另取 1.8 ml 血样,以枸橼酸钠抗凝,用全自动凝血测定仪检测凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(Fib)等凝血指标的变化。

1.2.4 脑血流量计算:依据 Grotta 等^[7]的参数分析系统计算脑血流量。

1.3 统计学处理:计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 急性失血大鼠存活情况:急性失血后 24 h,失血组存活 6 只(60%),结扎组存活 9 只(90%),结扎组大鼠存活率略好于失血组($P>0.05$)。

2.2 血小板黏附功能变化(表 1):两组实验前血小板黏附率差异无统计学意义;实验后失血组及结扎组血小板黏附率均较实验前显著升高,且失血组高于结扎组(P 均 <0.01)。

2.3 血小板聚集功能变化(表 1):两组实验前血小板聚集率差异无统计学意义。实验后失血组诱导聚集 1 min、3 min 的聚集率及最大聚集率均显著高于实验前(P 均 <0.01);结扎组仅最大聚集率高于实验前($P<0.05$)。结扎组实验后 1 min 和 3 min 的聚集率及最大聚集率均显著低于失血组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 体外血栓形成变化(表 2):两组实验前血栓长度、质量和血栓形成率比较差异均无统计学意义。实验后失血组血栓湿长、干长、湿重、干重以及血栓形成率均显著高于实验前(P 均 <0.01);而结扎组均无明显变化(P 均 >0.05)。两组间各指标比较差异有统计学意义(P 均 <0.01)。

2.5 凝血功能变化(表 2):实验后失血组 TT、APTT 及结扎组 TT 均显著高于实验前,但仍在正常范围内,且结扎组 APTT 低于失血组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);失血组及结扎组 Fib 水平均显著高于实验前,且结扎组低于失血组(P 均 <0.01)。

2.6 脑血流量变化(表 1):两组实验前脑血流量比较差异无统计学意义。实验后失血组及结扎组脑血流量均较实验前显著降低,且结扎组高于失血组(P 均 <0.01)。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370561,30770845);河北省自然科学基金项目(C2004000649,C2008000503);河北省科技计划支撑计划(07276101D-44)

作者单位:075029 张家口,河北北方学院微循环研究所

通信作者:牛春雨,Email:ncylxf@126.com

表 1 MLD 结扎对急性失血大鼠实验前后血小板黏附功能、聚集功能及脑血流量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	血小板黏附率 (%)	血小板聚集率 (%)				脑血流量 (ml · kg ⁻¹ · min ⁻¹)
			诱导 1 min	诱导 3 min	诱导 5 min	最大值	
失血组实验前	10	12.40±0.64	41.55±4.36	46.85±4.36	52.35±3.97	59.99±5.29	532.2±39.4
失血组实验后	6	18.54±1.18 ^b	50.58±5.70 ^b	58.92±3.58 ^b	54.17±2.32	70.08±5.00 ^b	417.8±42.2 ^b
结扎组实验前	10	13.16±0.94	42.95±4.96	48.96±5.26	55.33±3.03	60.72±2.61	543.0±50.4
结扎组实验后	9	15.02±1.24 ^{bd}	45.00±2.93 ^c	51.06±4.03 ^d	57.74±4.10	65.30±4.35 ^{ac}	485.1±41.4 ^{bd}

注:与本组实验前比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01;与失血组同期比较,^c*P*<0.05,^d*P*<0.01

表 2 MLD 结扎对急性失血大鼠实验前后体外血栓形成及凝血功能的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	血栓长度(mm)		血栓质量(mg)		血栓形成率 (%)	PT (s)	TT (s)	APTT (s)	Fib (g/L)
		湿长	干长	湿重	干重					
失血组实验前	10	13.8±2.9	10.8±2.3	41.5±6.7	22.5±2.6	45.8±5.6	10.05±0.43	48.45±3.75	17.40±1.23	162.87±10.95
失血组实验后	6	33.2±6.5 ^b	24.8±7.8 ^b	85.8±22.2 ^b	55.8±21.8 ^b	69.8±6.9 ^b	10.10±0.69	59.35±18.70 ^b	26.35±6.26 ^b	510.96±35.59 ^b
结扎组实验前	10	13.6±2.0	10.4±1.4	41.0±7.4	23.5±7.1	47.6±5.3	9.90±0.54	46.78±7.70	19.32±3.06	173.20±16.89
结扎组实验后	9	13.4±3.4 ^d	10.3±3.0 ^d	47.2±14.6 ^d	26.1±11.4 ^d	46.2±6.9 ^d	9.91±0.68	56.10±7.32 ^c	21.04±5.53 ^c	433.67±13.97 ^{bd}

注:与本组实验前比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01;与失血组同期比较,^c*P*<0.05,^d*P*<0.01

3 讨论

血液凝固状态在机体稳态调节中具有重要作用,血液凝固性升高是失血性休克发生弥散性血管内凝血(DIC)、导致休克难治的关键因素^[8-9];凝血异常和炎症反应及其相互作用共同加重了脓毒症的病理损害^[10]。本研究结果显示,急性失血后 24 h,大鼠血小板黏附率、血小板聚集率、体外血栓形成量及形成率均显著升高,而脑血流量减少,Fib 含量增高,其主要原因可能为急性失血引起机体处于应激状态,交感神经兴奋以及大量体液因子(包括炎症介质)释放,使血液凝固性升高,Fib 含量增高,虽具有抗感染及防止出血的作用,但也促进了血栓形成,凝血因子消耗,导致脑血流量减少。而凝血因子的小量消耗又可能是 TT、APTT 虽显著延长但仍处在正常范围的原因。因此,上述过程是诱发 DIC 形成的主要因素。

结扎 MLD 后,虽然与实验前相比血小板黏附率、血小板聚集率升高,脑血流量降低,TT 延长,Fib 水平升高,但血小板黏附率、部分时间点的血小板聚集率、血栓形成量及形成率、APTT、Fib 含量均低于失血组,脑血流量高于失血组。提示结扎 MLD 对急性失血引起的血液高凝状态具有一定的干预作用,能降低过高的血液凝固性及减少血栓形成,维持在正常状态,其机制可能与阻断肠淋巴途径以减少毒性物质经淋巴途径回流^[6]、抑制机体炎症反应,从而降低机体不良应激反应等因素有关。提示 MLD 结扎对重建急性失血后凝血与血栓形成平衡、避免

DIC 形成、保证重要器官血液灌注量是非常有利的。

综上所述,MLD 结扎可改善急性失血大鼠的血液高凝状态,其作用机制有待进一步研究。本研究结果为以淋巴为靶向,针对急性失血导致血液凝固性异常的防治提供了实验依据。

参考文献

- [1] Moroz VV, Ostapchenko DA, Meshcheriakov GN, et al. Acute hemorrhage, view on the problem. Anesteziol Reanimatol, 2002 (6):4-9.
- [2] 赵自刚,牛春雨,张静,等.肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺损伤的影响.中国危重病急救医学,2007,19(5):274-278.
- [3] 赵自刚,牛春雨,陈瑞华,等.肠淋巴途径对休克大鼠心肌自由基、炎性介质的影响.中国应用生理学杂志,2007,23(4):385-389.
- [4] 赵自刚,牛春雨,张静,等.肠系膜淋巴管结扎对休克大鼠肾功能不全的干预机制.中国病理生理杂志,2008,24(4):743-748.
- [5] 赵自刚,牛春雨,张静,等.肠淋巴途径在大鼠休克致肝脏炎症反应中的作用.中国危重病急救医学,2008,20(7):385-389.
- [6] 牛春雨,侯亚利,赵自刚,等.肠淋巴途径在失血性休克大鼠肠源性细菌/内毒素移位发病学中的作用.中国危重病急救医学,2007,19(5):266-269.
- [7] Grotta J, Ackerman R, Correia J, et al. Whole blood viscosity parameters and cerebral blood flow. Stroke, 1982,13(3):296-301.
- [8] 徐英,徐燕丽,马明洲,等.危重病患者并发弥散性血管内凝血的诊治.中华急诊医学杂志,2006,15(10):921-923.
- [9] Alimoradi J, Lisby G, Jeppesen J, et al. Streptococcus pyogenes infection with tonsillar focus as possible cause of septic shock. Ugeskr Laeger, 2009, 171(5):338-339.
- [10] 苏艳丽,王红,张淑文.脓毒症的凝血功能紊乱与抗凝治疗研究进展.中国危重病急救医学,2006,18(11):698-701.

(收稿日期:2009-06-01 修回日期:2009-10-20)

(本文编辑:李银平)