

血必净注射液对心脏骤停/心肺复苏后大鼠神经功能及生存情况的影响机制^Δ

黄德庆^{1,2*},高玉广¹,张元侃¹,王政林¹,邓海霞¹,黄夏冰¹,庞延¹,吴林^{2#}(1.广西中医药大学第一附属医院急诊科,南宁 530023;2.广西中医药大学科学实验中心,南宁 530200)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)06-0653-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.06.03



摘要 目的 基于S-亚硝基谷胱甘肽还原酶(GSNOR)/S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)途径探讨血必净注射液对大鼠心脏骤停(CA)/心肺复苏(CPR)后神经功能及生存情况影响的潜在机制。方法 以室颤法建立CA/CPR大鼠模型,以假手术组大鼠为参照,采用高通量测序分析挖掘两者差异表达基因,并结合酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测其海马组织中GSNOR、GSNO含量;筛选血必净注射液活性成分,并与GSNOR进行分子对接。将同法造模成功的大鼠分为模型组(30只)、抑制剂(GSNOR抑制剂)组(30只)、血必净组(30只)、血必净+抑制剂组(30只),并设置假手术组(30只),分别于药物首次干预后3 h、24 h、3 d时进行神经功能评价及生存情况记录,并检测上述时间点各组大鼠海马组织中GSNOR、GSNO含量,分析GSNOR、GSNO含量与大鼠改良的神经系统损害严重程度评分表(mNSS)评分的相关性。结果 GSNOR编码基因是模型组与假手术组间的差异表达基因之一;与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中GSNOR含量显著升高,而GSNO含量显著降低($P<0.05$)。血必净注射液中去甲丹参酮、鼠尾草酚酮等活性成分与GSNOR蛋白的结合能均低于 -6 kcal/mol,以氢键连接为主。动物实验结果显示,模型组大鼠各时间点的mNSS评分和海马组织中GSNOR含量均显著高于假手术组($P<0.05$),生存率和GSNO含量均显著低于假手术组($P<0.05$);各给药组大鼠上述指标均显著改善,且血必净组mNSS评分显著低于抑制剂组,抑制剂组GSNOR、GSNO含量的变化较血必净组更明显,血必净+抑制剂组各指标均显著优于血必净组和抑制剂组($P<0.05$)。GSNOR含量与mNSS评分呈正相关,GSNO含量与mNSS评分呈负相关($P<0.05$)。结论 血必净注射液可以改善CA/CPR后大鼠的神经功能,提高其生存率,该作用可能与下调GSNOR并上调GSNO有关。

关键词 血必净注射液;心脏骤停;心肺复苏;S-亚硝基谷胱甘肽;S-亚硝基谷胱甘肽还原酶

Mechanism of the effect of Xuebijing injection on neurological function and survival of rats after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation

HUANG Deqing^{1,2}, GAO Yuguang¹, ZHANG Yuankan¹, WANG Zhenglin¹, DENG Haixia¹, HUANG Xiabing¹, PANG Yan¹, WU Lin² (1. Dept. of Emergency, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Scientific Laboratory Centre, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the potential mechanism of the effect of Xuebijing injection (XBJ) on neurological function and survival of rats after cardiac arrest (CA)/cardiopulmonary resuscitation (CPR) based on the S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR)/S-nitrosoglutathione (GSNO) pathway. **METHODS** The CA/CPR rat model was established by ventricular fibrillation. Using a sham operation group as control, high-throughput sequencing was employed to analyze and mine the differentially expressed genes (DEGs). Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the contents of GSNOR and GSNO in the hippocampus; the active components of XBJ were screened and subjected to molecular docking analysis with GSNOR. The rats successfully modeled using the same method were divided into model group ($n=30$), inhibitor (GSNOR inhibitor) group ($n=30$), XBJ group ($n=30$) and XBJ+inhibitor group ($n=30$), and a sham operation group ($n=30$) was set

up. Neurological function was evaluated and survival status was recorded at 3 hours, 24 hours and 3 days after the first drug intervention. The contents of GSNOR and GSNO in the hippocampus of rats were determined in each group at the above time points, and the relationship of the contents of GSNOR and GSNO with modified neurologic severity scale (mNSS) score was analyzed. **RESULTS** GSNOR coding gene was differentially expressed between the model group and the

Δ 基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目(No.818607-89);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(No.2021KY0281);广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题(No.GXZY2021-0191)

* **第一作者** 副主任医师,硕士。研究方向:中医药防治脑系疾病、急危重症。E-mail:huangdq@gxtcmu.edu.cn

通信作者 主任医师,博士。研究方向:中医药防治脑系疾病、神经重症。E-mail:1517775008@139.com

sham operation group. Compared with the sham operation group, GSNOR content increased significantly in the hippocampus of rats in model group, while GSNO content decreased significantly ($P<0.05$). The active components of XBJ, such as 4-methylenemiltirone and salvionone, could be bound to GSNOR protein, with the binding energy lower than -6 kcal/mol, mainly connected by hydrogen bonds. Animal experiments revealed that mNSS score and GSNOR levels in the hippocampus of rats in the model group were significantly higher than those in the sham operation group ($P<0.05$), while GSNO levels and survival rate were significantly lower than those in the sham operation group ($P<0.05$). The above indexes of rats were improved significantly in administration groups, the mNSS score in the XBJ group was significantly lower than that in the inhibitor group, the content changes of GSNOR and GSNO in the inhibitor group were more obvious than those in the XBJ group, and the various indicators in the XBJ+inhibitor group were significantly better than the XBJ group and the inhibitor group ($P<0.05$). GSNOR content was positively correlated with the mNSS score, and GSNO content was negatively correlated with the mNSS score ($P<0.05$).

CONCLUSIONS XBJ can improve the neurological function of rats and enhance their survival rates after CA/CPR, the mechanism of which may be associated with the down-regulation of GSNOR and the up-regulation of GSNO.

KEYWORDS Xuebijing injection; cardiac arrest; cardiopulmonary resuscitation; *S*-nitrosoglutathione; *S*-nitrosoglutathione reductase

心脏骤停(cardiac arrest, CA)是全球患者主要的死亡原因之一,是严重的公共卫生问题^[1]。随着心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)技术的不断发展和进步,CA患者初期恢复自主循环的比例有所提高,但其总生存率并未得到明显改善,且大部分幸存者会出现中、重度神经功能缺损及认知功能障碍,甚至处于植物人状态,给其家庭及社会造成严重的疾病负担。虽然目标温度管理、体外循环支持等技术对CA/CPR患者脑损伤有益,但临床尚缺乏效果可靠的治疗措施^[2-3]。因此,挖掘CA/CPR后脑保护的治疗靶点和有效干预措施显得尤为重要。

近年来,中医药用于CA救治取得了较好的效果,其中中药制剂——血必净注射液应用广泛^[4]。该注射液由红花、赤芍、川芎、丹参、当归5味中药组成,能改善CA/CPR后患者的器官功能,并降低其死亡率^[5-6],但具体机制尚未明确。*S*-亚硝基谷胱甘肽(*S*-nitrosoglutathione, GSNO)是人体内含量丰富的亚硝基硫醇之一,也是重要生物活性物质一氧化氮(NO)的供体,能阻断脑缺血/再灌注动物模型的炎症反应和继发性脑损伤;同时,GSNO能控制NO持续少量释放,对CA/CPR致脑损伤具有改善作用^[7]。GSNO的含量受*S*-亚硝基谷胱甘肽还原酶(*S*-nitrosoglutathione reductase, GSNOR)的调节。近期研究表明,抑制CA/CPR后小鼠脑内GSNOR的表达,能够提高其脑内GSNO含量并改善其相关症状^[8]。学者在其他病种的研究中发现,血必净注射液能够增加诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的含量,提示该药的药理作用与其调节NO生物活性有关^[9]。因此,本研究拟从GSNOR/GSNO途径出发,采用高通量测序联合酶联免疫吸附测定(ELISA)验证该途径在CA/CPR大鼠体内的表达情况,并对血必净注射液主要活性成分与GSNOR进行分子对接;同时,拟以GSNOR特异性抑制剂SPL-334.1为参照,观察血必净注射液对大鼠GSNOR、GSNO表达的影响,以期明确血必净注射液对CA/CPR大鼠神经功能及生存情况影响的潜在机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ELX808型多功能酶标仪(美国BioTek公司),CDS9000型小动物麻醉机(美国SurgiVet公司),ThermoMixer C型恒温仪(德国Eppendorf公司),HPMS型动物监护仪、定制小动物手术操作系统(美国Harvard公司),NovaSeq 6000型测序系统(美国Illumina公司)等。

1.2 主要药品与试剂

血必净注射液(批号2303031,每支10 mL)购自天津红日药业股份有限公司;SPL-334.1原料药(货号T28837)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;GSNOR、GSNO ELISA检测试剂盒(货号分别为XEY-35884、FT-101490E)均购自上海梵态生物科技有限公司。

1.3 实验动物

清洁级SD大鼠160只,雄性81只、雌性79只,体重(200±20)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,生产许可证号为SCXK(湘)2019-0014。本动物实验方案经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核(批准编号DW20201011-77),符合实验动物福利伦理的相关规定。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠禁食不禁水12 h,称重后,腹腔注射3%戊巴比妥(45 mg/kg)麻醉,固定于小动物实验台上,行气管插管并实时监测,记录其呼气末二氧化碳分压;于大鼠右侧股动脉置入PE50管(深度约6 cm),行血压实时监测;以肛温表监测大鼠体温,并使其体温维持在(37.0±0.5)°C;将二导联心电图电极刺于大鼠皮下,实时监测和记录其心电活动情况。分离大鼠右侧颈外静脉,置入绝缘导管(深度约4 cm),按本课题组前期研究及相关文献^[10]方法制备CA/CPR模型;测得大鼠基础状态数据后,于诱颤前先行呼吸机通气5 min(潮气量为6 mL/kg,吸入氧浓度为21%,通气频率为100次/min);通气结束后,于大鼠右侧颈外静脉绝缘导管中插入金属导丝,通电(2

mA) 诱颤, 密切观察大鼠心电图及血压情况, 及时调整诱颤电流大小及导丝位置, 直至大鼠出现室颤心律; 诱颤 2.5~3 min 后, 关闭电源, 大鼠呈自发室颤(自诱颤心电图呈现室颤心电图波形开始, 持续室颤 6 min)。术中, 所有大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥 10 mg/(kg·h) 行麻醉维持。室颤大鼠在心脏停搏 5.5 min 时, 行呼吸机通气(吸入氧浓度为 100%, 通气频率为 200 次/min); 于心脏停搏 6 min 时, 予胸外按压(按压频率 200 次/min, 按压深度 1 cm, 按压部位为剑突上 2.8 cm) 进行复苏, 以平均动脉压(mean arterial pressure, MAP) ≥ 60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 持续 5 min 视为自主循环恢复[室颤大鼠于按压心脏 5 min 后行电击除颤, 如除颤后自主循环不能恢复, 需静脉注射肾上腺素(每次 0.1 mg); 持续按压心脏 20 min, 除颤 3 次, 自主循环仍不能恢复者, 视为复苏失败]。

2.2 差异表达基因检测与验证

取大鼠按“2.1”项下方法造模, 作为模型组; 另取大鼠只分离右侧颈外静脉并置管而不进行 CA/CPR 操作, 作为假手术组(下同)。取模型组和假手术组大鼠各 5 只(雄性 3 只、雌性 2 只), 腹腔注射 3% 戊巴比妥(45 mg/kg) 麻醉后处死, 提取其双侧海马组织(55~65 mg), 研磨成浆, 使用 TRIzol 液提取 RNA, 检测纯度和浓度后, 制备 RNA 文库; 参考 Illumina DNA Prep 文库制备自动化工作流程, 以测序系统测序, 剔除低质量的基因并筛选不表达的基因并作标准化处理后, 运用 DRAGEN Germline Pipeline 软件对 2 组样本的测序数据进行分析, 以假手术组为对照, 以 $|\log_2 FC| \geq 1$ [FC 为表达量差异倍数(fold change)]、 $P < 0.05$ 为标准^[11], 借助火山图筛选差异表达基因并确定 GSNOR 是否在其中, 同时进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。随后, 参照相应试剂盒说明书, 采用 ELISA 法以酶标仪检测 2 组大鼠海马组织中的 GSNOR、GSNO 含量, 以验证差异表达基因的分析结果。

2.3 血必净注射液活性成分筛选

在中药系统药理数据库与分析平台[Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), <http://tcmsp.com/tcmsp.php>] 和中药综合数据库[Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID), <http://119.3.41.228:8000/tcmid/>] 中搜索血必净注射液组方药材(红花、赤芍、川芎、丹参、当归)所含成分, 并运用 TCMSP 自带的“ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion)”筛选功能, 以血脑屏障透过率(blood-brain barrier, BBB) ≥ -0.3 、药物相似性评分(drug-likeness weight, DW) > 0.6 为标准^[12-13], 筛选度值(degree)排前 10 位的活性成分。

2.4 血必净注射液活性成分与 GSNOR 的分子对接验证

从 TCMSP、TCMID 数据库中获取各活性成分结构的“mol2”格式; 运用 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>) 检索成分对应靶点的蛋白构象, 使用 PyMOL 软件对蛋白进行脱水处理后以“pdb”格式导出; 利用 AutoDock 软

件对血必净注射液活性成分与 GSNOR 蛋白(PDB 编号 3qj52) 进行分子对接, 评估结合能后使用 PyMOL 软件对最优对接结构[结合能越低, 结合活性越强; 若结合能 ≤ -6 kcal/mol (1 kcal = 4.186 kJ) 则表明分子间具有较强的结合活性^[14]] 进行可视化展示。

2.5 动物实验验证

2.5.1 分组、造模与给药

取大鼠按“2.1”项下方法造模, 将造模成功的大鼠分为模型组、抑制剂组、血必净组、血必净+抑制剂组, 并设置假手术组, 每组 30 只, 雌雄各半。假手术组和模型组大鼠于术后通过颈外静脉注射与血必净组等体积的生理盐水; 抑制剂组大鼠于术后通过颈外静脉注射 6 mg/kg 的 SPL-334.1 (以生理盐水为溶剂, 剂量参考相关文献^[9] 设置); 血必净组大鼠于术后通过颈外静脉注射 4 mL/kg 的血必净注射液(剂量参考相关文献^[15] 设置); 血必净+抑制剂组大鼠于术后通过颈外静脉先后注射 SPL-334.1 和血必净注射液(剂量同各单药组); 每天 2 次, 连续 3 d。

2.5.2 取材

分别于药物首次干预后 3 h、24 h、3 d 时, 从各组中选取大鼠 10 只, 腹腔注射 3% 戊巴比妥(45 mg/kg) 麻醉后处死; 以仰卧位将四肢固定于解剖板上, 开胸后充分暴露心脏, 将灌注针头插入左心室, 剪开右心耳, 同时快速灌注生理盐水 100 mL; 灌注完毕后于冰上断头取脑, 用生理盐水冲去多余血液, 在大脑中下 1/3 交界处完整剥离双侧海马, 迅速放入 -80 °C 冰箱中保存, 备检。

2.5.3 大鼠神经功能评分及生存情况记录

分别于“2.5.2”项下取材前对各组大鼠进行神经功能评分及生存情况记录。神经功能评分采用改良的神经系统损害严重程度评分表(modified neurologic severity scale, mNSS): 该表总分为 18 分, 其中 0 分为正常、1~6 分为轻度损害、7~12 分为中度损害、13~18 分为重度损害^[16]。大鼠生存情况采用 Cox 回归分析: 使用 R 语言的“survival”包进行比例风险假设检验, 同时进行生存回归拟合并绘制生存率曲线, 使用“survminer”包和“ggplot2”包进行可视化展示。

2.5.4 海马组织中 GSNOR、GSNO 含量检测

取“2.5.2”项下各时间点各组大鼠的双侧海马组织适量, 参照相应试剂盒说明书, 采用 ELISA 法以酶标仪检测其中 GSNOR、GSNO 含量。

2.5.5 GSNOR、GSNO 含量与 mNSS 评分相关性评价

运用 Pearson 法分析 GSNOR、GSNO 含量与大鼠 mNSS 评分的相关性。

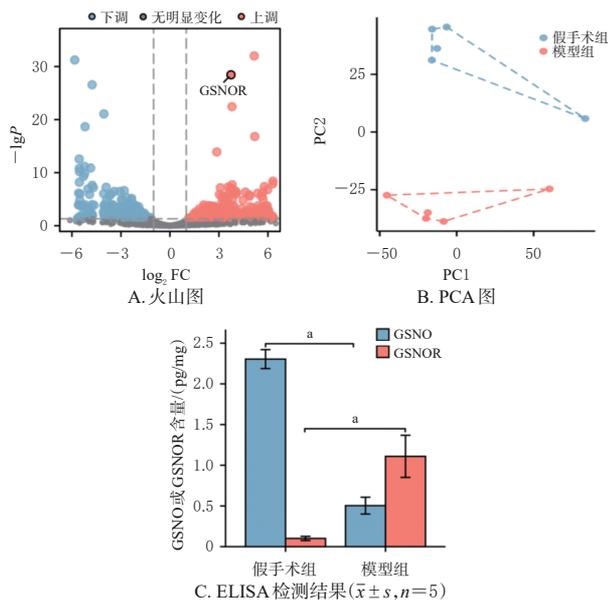
2.6 统计学方法

采用 Excel 软件录入数据, SPSS 19.0 软件进行统计分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验; 不符合正态分布或方差不齐的计量资料以中位数和四分位间距表示, 组间比较采用 *U* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 差异表达基因筛选及验证结果

经对比模型组与假手术组大鼠双侧海马组织的测序结果发现, GSNOR 编码基因在差异表达基因中(图 1A); PCA 分析结果显示, 假手术组和模型组大鼠样本的离散程度高, 两者存在明显差异(图 1B); 进一步的 ELISA 检测结果显示, 模型组大鼠海马组织中 GSNOR 含量显著高于假手术组, GSNO 含量显著低于假手术组 ($P < 0.01$, 图 1C)。



a: 组间比较, $P < 0.01$ 。

图 1 差异表达基因筛选及验证结果

3.2 血必净注射液活性成分筛选结果

根据“2.3”项下标准, 本研究最终筛选出 degree 排名前 10 位的活性成分, 包括木犀草素、异欧前胡素等, 具体见表 1。

表 1 血必净注射液中 degree 排名前 10 位的活性成分

序号	TCMSP 编号	中文名称	英文名称	degree	来源药材
1	MOL000006	木犀草素	luteolin	9	丹参
2	MOL001942	异欧前胡素	isoperimitorin	8	丹参
3	MOL007049	去甲丹参酮	4-methylenemiltirone	7	丹参
4	MOL007145	鼠尾草酚酮	salviolone	6	丹参
5	MOL000449	豆甾醇	stigmasterol	6	当归、红花
6	MOL007122	丹参酮	miltirone	6	丹参
7	MOL001601	四氢丹参酮	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	6	丹参
8	MOL000422	山柰酚	kaempferol	5	赤芍
9	MOL002135	杨梅酮	myricanone	4	川芎
10	MOL007088	隐丹参酮	cryptotanshinone	4	丹参

3.3 分子对接验证结果

异欧前胡素、去甲丹参酮、鼠尾草酚酮、豆甾醇与 GSNOR 具有较强的结合活性, 结合能分别为 -8.0 、 -9.2 、 -8.5 、 -8.1 kcal/mol, 以氢键连接为主。结果见图 2(以去甲丹参酮、鼠尾草酚酮为例)。

3.4 动物实验验证结果

3.4.1 大鼠神经功能和生存情况

首次给药后 3 h、24 h、3 d 时, 假手术组大鼠的 mNSS

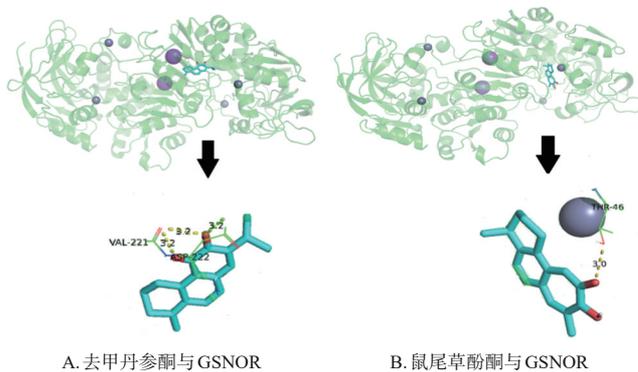


图 2 血必净注射液活性成分与 GSNOR 的分子对接图

评分均为 0 分; 模型组大鼠各时间点的 mNSS 评分均显著高于同期假手术组 ($P < 0.05$), 且有随时间延长而逐渐降低的趋势; 血必净组、抑制剂组、血必净+抑制剂组大鼠的 mNSS 评分均显著低于同期模型组 ($P < 0.05$), 且血必净组显著低于同期抑制剂组, 血必净+抑制剂组显著低于同期血必净组及抑制剂组 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 不同时间点各组大鼠 mNSS 评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$, 分)

组别	给药后 3 h	给药后 24 h	给药后 3 d
假手术组	0	0	0
模型组	7.05 ± 0.80 ^a	4.46 ± 0.30 ^a	3.84 ± 0.75 ^a
抑制剂组	5.90 ± 0.45 ^b	4.31 ± 0.24 ^b	2.98 ± 0.58 ^b
血必净组	5.21 ± 0.36 ^{bc}	2.86 ± 0.41 ^{bc}	2.12 ± 0.62 ^{bc}
血必净+抑制剂组	4.29 ± 0.82 ^{bd}	1.88 ± 0.47 ^{bd}	1.17 ± 0.16 ^{bd}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与抑制剂组比较, $P < 0.05$; d: 与血必净组比较, $P < 0.05$ 。

假手术组没有大鼠死亡, 模型组在给药后 3 h、24 h、3 d 时分别有 1、3、7 只大鼠死亡, 共死亡 11 只; 血必净组在上述时间点分别有 1、1、2 只大鼠死亡, 共死亡 4 只; 抑制剂组在上述时间点分别有 1、2、3 只大鼠死亡, 共死亡 6 只; 血必净+抑制剂组仅在首次给药后 24 h 时有 1 只大鼠死亡。各组大鼠的生存率曲线见图 3。

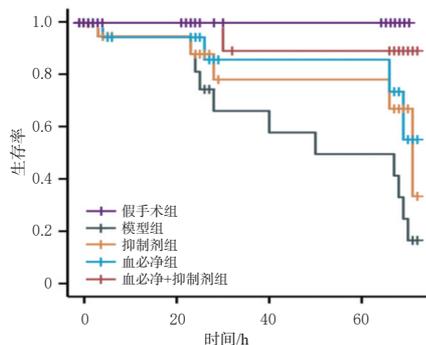


图 3 各组大鼠的生存率曲线

3.4.2 大鼠海马组织中 GSNOR、GSNO 含量

给药后 3 h、24 h、3 d 时, 模型组大鼠海马组织中 GSNOR 含量均较同期假手术组显著升高, GSNO 含量均较同期假手术组显著降低 ($P < 0.05$); 血必净组、抑制剂组、血必净+抑制剂组大鼠海马组织中 GSNOR 含量均较同期模型组显著降低, GSNO 含量均较同期模型组显

著升高 ($P < 0.05$), 且抑制剂组较同期血必净组、血必净+抑制剂组较同期血必净组及抑制剂组的变化更明显 ($P < 0.05$)。结果见表3。

表3 不同时间点各组大鼠海马组织中 GSNOR、GSNO 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mg}$)

组别	GSNOR			GSNO		
	3 h	24 h	3 d	3 h	24 h	3 d
假手术组	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	2.31 ± 0.11	2.33 ± 0.09	2.30 ± 0.09
模型组	1.11 ± 0.26 ^a	0.80 ± 0.15 ^a	0.56 ± 0.02 ^a	0.50 ± 0.02 ^a	0.73 ± 0.20 ^a	1.07 ± 0.11 ^a
抑制剂组	0.81 ± 0.17 ^b	0.43 ± 0.07 ^b	0.33 ± 0.06 ^b	0.80 ± 0.01 ^b	1.25 ± 0.05 ^b	1.56 ± 0.33 ^b
血必净组	0.94 ± 0.07 ^{bc}	0.63 ± 0.12 ^{bc}	0.45 ± 0.13 ^{bc}	0.73 ± 0.04 ^{bc}	1.14 ± 0.14 ^{bc}	1.23 ± 0.22 ^{bc}
血必净+抑制剂组	0.64 ± 0.13 ^{bd}	0.37 ± 0.08 ^{bd}	0.23 ± 0.07 ^{bd}	0.98 ± 0.02 ^{bd}	1.38 ± 0.24 ^{bd}	2.23 ± 0.31 ^{bd}

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与抑制剂组比较, $P < 0.05$; d: 与血必净组比较, $P < 0.05$ 。

3.4.3 GSNOR、GSNO 含量与 mNSS 评分的相关性

GSNOR 含量与大鼠 mNSS 评分呈正相关 ($r = 0.962, P < 0.001$), 而 GSNO 含量与大鼠 mNSS 评分呈负相关 ($r = -0.914, P < 0.001$)。结果见图4。

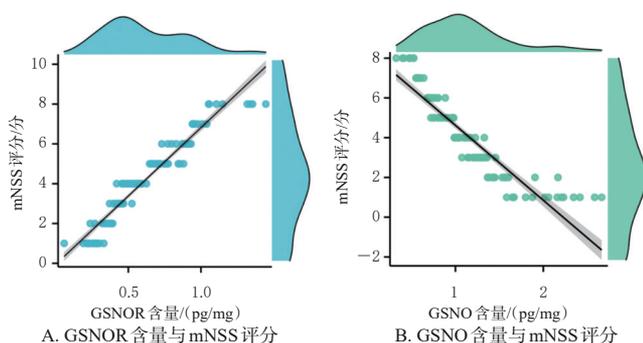


图4 大鼠海马组织中 GSNOR、GSNO 含量与其 mNSS 评分的相关性分析

4 讨论

CA/CPR 是一个复杂的病理生理过程, 全脑缺血性损伤是患者最主要的死亡原因^[2-3], 但目前该损伤的发生机制尚未明确, 故探索相关机制并寻找潜在治疗靶点和有效干预措施具有重要的临床意义。

本研究通过高通量测序分析及 ELISA 实验发现, GSNOR 编码基因是假手术组和模型组大鼠海马组织样本的差异表达基因之一; CA/CPR 后, 大鼠海马组织中 GSNOR 含量明显升高, 而 GSNO 含量则明显降低。研究指出, GSNO 对 CA/CPR 后的脑损伤具有保护作用, 其机制与控制体内 NO 持续少量释放有关^[7]; 同时, GSNO 的含量受 GSNOR 的调节, GSNOR 可通过降解 GSNO 而减弱 GSNO 的脑保护作用^[17]。由此可见, 抑制 GSNOR 表达从而增加体内 GSNO 含量, 对 CA/CPR 后缺血性脑损伤具有改善作用, GSNOR/GSNO 途径可能成为 CA/CPR 治疗的潜在途径。本研究分子对接结果提示, 血必净注射液的活性成分——异欧前胡素、去甲丹参酮、鼠尾草酚酮、豆甾醇与 GSNOR 有较强的结合活性, 提示血必净注射液脑保护作用的发挥可能是通过调控 GSNOR 的表达而实现的。

基于以上 2 项研究结果, 本课题组进一步采用动物实验进行验证。结果显示, 大鼠 CA/CPR 后, 除假手术组外, 其余各组大鼠均出现了不同程度的神经功能损伤, 并可见 GSNOR 含量升高、GSNO 含量降低。经药物干预后, 抑制剂组、血必净组、血必净+抑制剂组大鼠各评估时间点的神经功能均有明显改善, 生存率明显升高, 且 GSNOR 含量显著低于同期模型组, GSNO 含量显著高于同期模型组, 提示血必净注射液可抑制 GSNOR 表达, 从而提高体内 GSNO 含量并改善 CA/CPR 大鼠神经功能, 与既往研究结果^[7]基本一致。但值得注意的是, 既往研究采用的是高钾法建立 CA/CPR 模型^[7], 高钾法操作相对简单, 但所建动物模型可能出现无脉性心电活动或心室静止, 和临床上成人 CA 初始心律多表现为室颤不符; 同时, 由于注射氯化钾可引起动物电解质紊乱, 故还需进一步考虑电解质紊乱对实验结果的影响。而本研究所用的室颤法是建立 CA/CPR 模型的常规方法, 由于临床大部分 CA 是由室颤引起, 故此法所得模型更接近于临床成人 CA 的病理特点^[8, 18]。

血必净注射液具有活血化瘀、舒通络脉、溃散毒邪的功效, 被广泛用于重症肺炎、重症急性胰腺炎、慢性阻塞性肺疾病、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症等危重疾病的临床治疗^[19]。血必净注射液所主治瘀毒互结证的中医病机与 CA/CPR 患者缺血、缺血/再灌注损伤及全身炎症反应的病理改变相符, 故该药已被广泛用于 CA/CPR 后的治疗^[4]。本研究结果显示, 血必净组大鼠海马组织中 GSNOR 含量显著低于模型组, 而 GSNO 含量显著高于模型组, 提示血必净注射液能够抑制 GSNOR 的表达, 进而提高 GSNO 含量, 从而改善 CA/CPR 后大鼠的神经功能并提高其生存率。

本研究还发现, 血必净注射液联合 GSNOR 抑制剂对大鼠神经功能及生存率的改善效果显著优于单用血必净注射液或单用 GSNOR 抑制剂, 提示联合 GSNOR 抑制剂能明显提高血必净注射液对大鼠 CA/CPR 后脑损伤的干预效果, 可为未来的药物研发提供线索。值得注意的是, 本研究还发现, 抑制剂组大鼠各时间点的 GSNOR 含量均显著低于血必净组, GSNO 含量均显著高于血必净组, 而各评估时间点的神经功能及生存率均不及血必净组, 提示血必净注射液改善 CA/CPR 后大鼠神经功能、生存率的作用可能依赖于 GSNOR/GSNO 途径, 但同时可能涉及其他分子机制, 具体情况尚需进一步实验验证。

综上所述, 血必净注射液能够改善大鼠 CA/CPR 后的神经功能并提高其生存率, 其作用与下调 GSNOR 并上调 GSNO 有关。但血必净注射液这一作用是否还与其他信号通路有关尚需进一步探讨。

参考文献

[1] WYCKOFF M H, GREIF R, MORLEY P T, et al. 2022 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment

- recommendations; summary from the basic life support; advanced life support; pediatric life support; neonatal life support; education, implementation, and teams; and first aid task forces[J]. *Circulation*, 2022, 146(25):e483-e557.
- [2] SANDRONI C, CRONBERG T, SEKHON M. Brain injury after cardiac arrest: pathophysiology, treatment, and prognosis[J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47(12):1393-1414.
- [3] ABRAMS D, MACLAREN G, LORUSSO R, et al. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in adults: evidence and implications[J]. *Intensive Care Med*, 2022, 48(1):1-15.
- [4] 中华中医药学会. 猝死中医临床诊疗专家共识[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(10):1714-1718, 1723.
China Association of Chinese Medicine. Expert consensus on clinical diagnosis and treatment of sudden death in traditional Chinese medicine[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2020, 29(10):1714-1718, 1723.
- [5] 刘八一, 谢昌联. 血必净注射液治疗心脏骤停心肺复苏后多器官功能障碍综合征临床观察[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(6):1180-1182.
LIU B Y, XIE C L. Clinical research of Xuebijing injection on multiple organ dysfunction after cardiopulmonary resuscitation in cardiac arrest[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2016, 25(6):1180-1182.
- [6] 黄德庆, 张元侃, 高玉广, 等. 血必净注射液对心肺复苏术后患者的影响[J]. *大众科技*, 2021, 23(9):27-30, 98.
HUANG D Q, ZHANG Y K, GAO Y G, et al. Effect of Xuebijing injection on patients after cardiopulmonary resuscitation[J]. *Pop Sci Technol*, 2021, 23(9):27-30, 98.
- [7] 王建红, 周满红. S-亚硝基化谷胱甘肽还原酶抑制剂调控心搏骤停-心肺复苏后脑损伤的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34(9):995-998.
WANG J H, ZHOU M H. Research progress of S-nitrosoglutathione reductase inhibitors in the regulation of cerebral injury after cardiac arrest-cardiopulmonary resuscitation[J]. *Chin Crit Care Med*, 2022, 34(9):995-998.
- [8] HAYASHIDA K, BAGCHI A, MIYAZAKI Y, et al. Improvement in outcomes after cardiac arrest and resuscitation by inhibition of S-nitrosoglutathione reductase[J]. *Circulation*, 2019, 139(6):815-827.
- [9] 王薇, 张玉想, 李宏山, 等. 血必净注射液对脓毒症所致急性肾损伤的内皮保护作用[J]. *解放军医学杂志*, 2017, 42(3):202-206.
WANG W, ZHANG Y X, LI H S, et al. Protective effects of Xuebijing on endothelium in sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2017, 42(3):202-206.
- [10] 郭建, 王世伟, 杨正飞, 等. 窒息法和室颤法诱导建立大鼠心脏停搏模型的比较[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(4):380-385.
GUO J, WANG S W, YANG Z F, et al. Comparison between two rat models of cardiac arrest: asphyxiation and ventricular fibrillation[J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci*, 2018, 38(4):380-385.
- [11] ZANJIRBAND M, BAHARLOOIE M, SAFAEINEJAD Z, et al. Transcriptomic screening to identify hub genes and drug signatures for PCOS based on RNA-seq data in granulosa cells[J]. *Comput Biol Med*, 2023, 154:106601.
- [12] XIAO Y G, WU H B, CHEN J S, et al. Exploring the potential antidepressant mechanisms of *Pinellia* by using the network pharmacology and molecular docking[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(4):1071-1094.
- [13] ORTIZ-FERNÁNDEZ L, CARMONA E G, KERICK M, et al. Identification of new risk loci shared across systemic vasculitides points towards potential target genes for drug repurposing[J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(6):837-847.
- [14] ROSIGNOLI S, PAIARDINI A. Boosting the full potential of PyMOL with structural biology plugins[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12):1764.
- [15] 王炳今, 周厚荣. 血必净对窒息大鼠心肺复苏后氧自由基和心功能变化的干预研究[J]. *中国急救医学*, 2014, 34(3):255-258.
WANG B J, ZHOU H R. Effect of Xuebijing on free radicals and left-heart function in asphyxia rats after cardiopulmonary resuscitation[J]. *Chin J Crit Care Med*, 2014, 34(3):255-258.
- [16] THONGWONG P, WATTANATHORN J, THUKHAMMEE W, et al. The potential role of the novel orodispersible film from rice polymer loaded with silkworm pupae hydrolysate and the combined extract of holy basil and ginger for the management of stroke with stress[J]. *Biomaterials*, 2023, 299:122175.
- [17] CASTILLO O A, HERRERA G, MANRIQUEZ C, et al. Pharmacological inhibition of S-nitrosoglutathione reductase reduces cardiac damage induced by ischemia-reperfusion[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(4):555.
- [18] 袁维, 张润峰. 心脏骤停动物模型研究进展[J]. *四川医学*, 2020, 41(11):1200-1203.
YUAN W, ZHANG R F. Research progress of animal models of cardiac arrest[J]. *Sichuan Med J*, 2020, 41(11):1200-1203.
- [19] 李乐辉, 杨远征, 林润, 等. 不同剂量血必净注射液联合乌司他丁注射液治疗脓毒症合并急性肺损伤的临床观察[J]. *中国药房*, 2020, 31(13):1617-1621.
LI L H, YANG Y Z, LIN R, et al. Clinical observation of different doses of Xuebijing injection combined with ulinastatin injection in the treatment of sepsis complicated with acute lung injury[J]. *China Pharm*, 2020, 31(13):1617-1621.

(收稿日期:2023-08-30 修回日期:2024-01-21)

(编辑:张元媛)