

• 研究报告 •

血必净注射液对脓毒症大鼠外周血组织因子微粒表达的影响

殷冬梅 孙茜 李银平 董宁 姚咏明

【摘要】 目的 观察血必净注射液对脓毒症发病过程中外周血组织因子微粒表达的影响。方法 104只Wistar雄性大鼠随机分为正常对照组(8只)、假手术组(32只)、脓毒症模型组(32只)、血必净治疗组(32只),后3组分别于术后6、12、24、72h取2ml抗凝血制备微粒标本,检测组织因子微粒表达水平的动态变化。结果 CLP后6h外周血组织因子微粒表达达高峰,随时间延长逐渐降低,至72h仍高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。假手术组在24h组织因子微粒表达水平出现一个高峰,远远高于正常对照组($P < 0.05$)。血必净注射液干预治疗后,外周血组织因子微粒表达水平术后6h即明显低于脓毒症组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),72h微粒表达已恢复到正常水平。结论 正常大鼠外周血内有少量微粒表达;脓毒症大鼠外周血内组织因子循环微粒表达水平显著升高;血必净注射液能明显降低循环微粒的水平。

【关键词】 脓毒症; 微粒; 组织因子; 血必净注射液

本课题组前期的研究显示,凝血功能紊乱贯穿脓毒症整个病理过程,凝血级联反应是脓毒症发生发展和预后的决定因素之一^[1-2]。微粒具有促进凝血与血栓形成等多种生物学活性,可介导许多疾病的凝血机制紊乱,研究微粒的功能有助于深化对凝血机制障碍的认识,并为凝血功能障碍调控提供潜在的干预目标。本实验中观察血必净注射液对脓毒症大鼠外周血组织因子(TF)微粒表达的影响,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂:多克隆羊抗人TF IgG一抗(美国 Diagnostica Inc 公司);Cy5标记的膜联蛋白V (Annexin V, 美国 BD Pharmingen™ 公司);异硫氰酸荧光素(FITC)标记的驴抗羊 IgG 二抗(美国 Santa 公司)。设门用的荧光微球(美国 Molecular Probes 公司);计数用的非荧光微球(美国 Bangs Laboratories 公司)。

1.2 动物模型制备和分组:体重220~250g的雄性Wistar大鼠由中国医学科学院实验动物研究所提供,按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、脓毒症

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.09.017

基金项目:天津市医药卫生中西医结合科研基金项目(2005088);天津市科技创新专项基金项目(06F22DSH00403)

作者单位:300050天津市天和医院(殷冬梅、孙茜、李银平);300048北京,解放军总医院第一附属医院(董宁、姚咏明)

通信作者:李银平,Email:cccm.23042150@yahoo.com.cn

模型组和血必净治疗组,后3组再分为术后6、12、24、72h4个亚组,每个亚组8只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制严重腹腔感染致脓毒症模型^[3]。假手术组仅开腹翻动盲肠后关腹。血必净治疗组于相应时间点经大鼠阴茎背静脉注射血必净注射液(天津红日药业股份有限公司)4ml/kg;假手术组和脓毒症组注射等量生理盐水。于相应时间点麻醉后活杀大鼠,经腹主动脉取血标本备测。

1.3 外周血TF微粒表达的检测:取腹主动脉血,经枸橼酸钠抗凝,两步法离心分离乏血小板血浆(PFP),-80℃保存。取250μl PFP,20℃下离心15min获取微粒碎片,弃去225μl上清液,加入225μl缓冲液(NaCl 140mmol/L, KCl 4.5mmol/L, MgCl₂ 1mmol/L, CaCl₂ 2.5mmol/L, HEPES 10mmol/L, pH 7.4, 0.2μm滤膜过滤),再次离心;弃去225μl上清液,加75μl缓冲液,重悬。将100μl富含微粒的悬液按每份标本5μl进行检测,加35μl缓冲液和5μl牛血清白蛋白(BSA)稀释,室温孵育15min。为了计数表达TF微粒的数量,加入5μl Cy5-Annexin V、5μl一抗(终浓度1μg/μl)和5μl二抗(终浓度1μg/μl)暗室孵育15min,然后加入200μl缓冲液终止孵育,再次离心。弃去200μl上清液,加入200μl缓冲液和100μl计数微球重悬,制成微粒悬液,用FACSsort流式细胞仪进行分析,获得数据。根据前向光散射(FSC)和侧向光散射(SSC)散点图划分出检测微球门,应用7.2μm和1.0μm微球作为内参照检测微粒,以

1.0μm微粒用于设门,7.2μm乳胶微球用于定量,以结合Annexin V和结合TF的抗体来定义表达TF的微粒。Cy5-Annexin V测量用自发荧光作对照,结合TF的抗体用不加荧光标记的二抗,只加抗TF IgG一抗作对照。

1.4 统计学处理:使用SPSS 13.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用t检验或方差分析,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表1结果显示,CLP后6h外周血TF微粒表达达高峰,但随时间延长逐渐降低,至72h仍然高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);假手术组仅TF微粒表达在24h时出现了一个高峰,高于正常对照组($P < 0.05$);血必净治疗组TF微粒表达较脓毒症组明显降低,在术后6h即可显示出明显差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),72h恢复到正常水平。

3 讨论

业已明确,脓毒症时由于炎性细胞过度激活,产生和释放大量的细胞因子,这些释放到血液中的细胞因子通过各种途径激活了凝血系统,机体随即产生抗凝物质和启动纤维蛋白溶解系统。同时纤溶系统及生理性的抗凝系统受到不同程度的抑制,血液处于高凝状态,微血管内微血栓广泛形成,导致微循环障碍^[4]。

微粒是细胞在活化或凋亡时从细胞膜表面以生芽方式脱落的膜性小囊泡,是细胞活化或凋亡的标志。微粒通过暴露其表面携带负电荷的磷脂和TF将生物活性因子传递到其他细胞核,在体内

启动凝血途径而使机体处于高凝状态并产生血栓;同时微粒间的相互作用以及在微粒和细胞间的信号传递过程中,相关细胞产生某些细胞因子、细胞黏附分子、生长因子和 TF,调节内皮功能^[5-6]。各种细胞来源的微粒如单核细胞微粒、内皮细胞微粒和血小板微粒在其表面表达 TF。体内外研究发现,表达 TF 的微粒在凝血过程中发挥着重要的作用,而且微粒能在细胞或微粒间传递生物信号并抑制依赖于内皮细胞的血管扩张^[7]。血液前凝血活性(高凝状态)在一定程度上与血液循环中表达 TF 的微粒水平有关。外周血中微粒水平的监测可以作为监测血栓持续存在或复发的标志。

本研究显示,脓毒症大鼠外周血 TF 微粒表达水平在术后 6 h 最高,表明此时血小板、血管内皮细胞或血细胞凋亡或活化的数量增多,细胞膜脱落形成表达 TF 微粒的数量增多。这些微粒黏附于活化的血小板上,引起了更强的凝血酶活性增强,激活体内凝血系统。

单核细胞是目前发现外周血中已知能表达 TF 的惟一细胞^[8]。分离单核细胞用内毒素刺激能表达 TF^[9]。毒素刺激单核细胞可使蛋白沉积和血栓形成。抗 TF 单克隆抗体能够抑制这些反应过程^[10]。单核细胞已被证明在侵袭性肿瘤、白血病、脓毒症、心肌梗死及糖尿病患者的体外循环中能表达 TF^[11]。除了表达 TF,单核细胞在体内外毒素刺激后可以释放 TF 阳性的微粒。Mallat 等^[12]报道,在动脉粥样硬化斑块中单核细胞和淋巴细胞微粒保留 TF 活性。在内毒素血症患者中,已经观察到微粒含 TF 高于正常人的 8 倍^[13]。在流行性脑膜炎患者中发现,来自血小板和粒细胞的微粒与 TF 的促凝活性有关^[14]。表明升高的循环微粒水平可作为脓毒症患者有凝血障碍或弥散性血管内凝血(DIC)形成风险持续存在或复发的标志物。

DIC 是脓毒症严重的并发症,也是脓毒症进一步诱发多器官功能障碍综合征(MODS)的重要因素。根据 DIC 的临床特点,可以将其归属于中医学“瘀血症”的范畴,从中医学的基本理论来看,导致“瘀血症”的病因包括气虚、阴虚、阳虚、血虚、热毒、痰浊、寒凝等。因此,活血化瘀是治疗 DIC 的基本法则。

研究发现,血必净注射液对内毒素损伤和 MODS 患者的内皮细胞具有保

表 1 血必净注射液对脓毒症大鼠外周血 TF 微粒表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	微粒(个/ μ l)			
	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 72 h
正常对照组	116.32±48.61	116.32±48.61	116.32±48.61	116.32±48.61
假手术组	106.80±23.80	100.68±43.62	222.68±62.02 ^a	143.04±34.29
脓毒症组	280.80±78.34 ^{bd}	188.32±40.97 ^{bc}	178.08±78.52 ^{bd}	154.24±54.69 ^a
血必净治疗组	101.76±57.34 ^{df}	108.00±49.50 ^e	116.40±27.48 ^{cf}	112.20±41.84

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与假手术组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与脓毒症组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$

护作用^[15],可防治血小板及白细胞的中毒性损伤,抑制血栓素的爆发释放,从而防治凝血功能紊乱和微循环障碍,改善患者病情严重程度。本实验结果显示,给予血必净注射液后能降低 CLP 后脓毒症大鼠 TF 微粒的表达水平。已有研究证明血必净注射液可以影响外周血 TF 的蛋白含量和基因表达,还可改变细胞膜功能,如稳定性和流动性,以及细胞内钙离子浓度、蛋白质定位和细胞膜穴样凹陷,降低细胞活化或凋亡,导致较低水平的微粒释放^[16]。脓毒症中微粒支持凝血主要是通过内源性凝血通路。

参考文献

[1] 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.
 [2] 李银平,郑贵军,武子霞,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠活化蛋白 C 及凝血功能的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(6): 361-366.
 [3] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. Surgery, 1979, 85(2): 205-211.
 [4] Bauer I, Bauer M, Raddatz A, et al. Influence of gender on stimulated cytokine response in patients with severe sepsis. Anaesthesist, 2006, 55(5): 515-527.
 [5] Morel O, Toto F, Hugel B, et al. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. Curr Opin Hematol, 2004, 11(3): 156-164.
 [6] Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles; a wide-angle perspective. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 30(2): 111-142.
 [7] Craft JA, Masci PP, Roberts MS, et al. Increased platelet-derived microparticles in the coronary circulation of percutaneous transluminal coronary angioplasty patients. Blood Coagul Fibrinolysis, 2004, 15(6): 475-482.

[8] Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. Blood, 1988, 71(1): 1-8.
 [9] van der Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH, et al. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994, 5(2): 211-220.
 [10] Barstad RM, Hamers MJ, Kierulff P, et al. Procoagulant human monocytes mediate tissue factor/factor VIIa-dependent platelet-thrombus formation when exposed to flowing nonanticoagulated human blood. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15(1): 11-16.
 [11] Francis JL, Carvalho M, Francis DA. The clinical value of tissue factor assays. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(Suppl 1): S37-44.
 [12] Mallat Z, Hugel B, Ohan J, et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques; a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. Circulation, 1999, 99(3): 348-353.
 [13] Aras O, Shet A, Bach RR, et al. Induction of microparticle and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. Blood, 2004, 103(12): 4545-4553.
 [14] Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood, 2000, 95(3): 930-935.
 [15] 曹书华,王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8): 489-491.
 [16] 归咏刚,姚咏明,柴艳芬. 血必净注射液对内毒素刺激大鼠单核细胞组织因子的影响. 中华实验外科杂志, 2009, 26(3): 289-291.

(收稿日期: 2009-08-08)
(本文编辑: 保健媛)