

脂多糖诱导小鼠血小板减少症可能与凝血及炎症反应无关

吉祥 姚芳超 王兵 王勇强 曹书华 王玉亮

【摘要】 目的 探讨脂多糖 (LPS) 诱导小鼠血小板减少症 (TCP) 与凝血及炎症反应的关系。**方法** 按随机数字表法将 48 只雄性 C57BL/6 小鼠分为对照组及低剂量、高剂量 LPS 处理组, 每组再按观察时间随机分为 4 h 和 24 h 两个亚组, 每个亚组 8 只。低剂量和高剂量 LPS 组分别经腹腔注射 0.5 mg/kg 和 50 mg/kg LPS, 对照组注射等量生理盐水。于观察时间点取小鼠内眦血, 测定血小板计数 (PLT), 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血浆凝血酶-抗凝血酶复合物 (TAT)、D-二聚体、纤维蛋白原降解产物 (FDP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素-6 (IL-6)。**结果** 与对照组比较, 低剂量和高剂量 LPS 组 4 h、24 h 时 PLT ($\times 10^9/L$) 均显著下降 (4 h: 660.65 ± 180.48 、 568.55 ± 117.99 比 1199.13 ± 110.54 , 24 h: 505.63 ± 218.92 、 256.33 ± 72.86 比 1229.13 ± 118.37 , 均 $P < 0.05$), 且高剂量组较低剂量组降低更为明显 (均 $P < 0.05$)。析因分析显示, LPS 剂量、作用时间均对 PLT 有影响 ($F_1 = 135.660$, $P_1 = 0.000$, $F_2 = 12.120$, $P_2 = 0.001$), LPS 剂量和作用时间对 PLT 的影响具有交互效应 ($F = 5.580$, $P = 0.007$)。与对照组比较, 低剂量和高剂量 LPS 组 4 h、24 h 时 TAT (ng/L, 4 h: 1.10 ± 0.59 、 0.22 ± 0.13 比 3.47 ± 1.73 , 24 h: 1.18 ± 0.68 、 0.39 ± 0.29 比 3.19 ± 1.27), TNF- α (nmol/L, 4 h: 87.35 ± 12.29 、 93.70 ± 5.25 比 101.59 ± 10.96 , 24 h: 81.94 ± 8.26 、 93.23 ± 4.71 比 102.84 ± 10.56) 和 IL-6 (ng/L, 4 h: 81.78 ± 7.82 、 78.59 ± 9.06 比 110.88 ± 9.66 , 24 h: 76.03 ± 9.85 、 71.34 ± 3.69 比 110.88 ± 10.35) 均显著降低 (均 $P < 0.05$), 且高剂量组 4 h、24 h 时 TAT 较低剂量组进一步降低, 24 h TNF- α 较低剂量组进一步升高 (均 $P < 0.05$)。TAT、TNF- α 和 IL-6 仅受 LPS 剂量影响 (TAT: $F = 42.350$, $P = 0.000$; TNF- α : $F = 14.810$, $P = 0.000$; IL-6: $F = 81.910$, $P = 0.000$), 而不受 LPS 作用时间影响 (TAT: $F = 0.002$, $P = 0.967$; TNF- α : $F = 0.342$, $P = 0.562$; IL-6: $F = 2.973$, $P = 0.092$); LPS 剂量与作用时间对 TAT、TNF- α 和 IL-6 的影响均无交互效应 (TAT: $F = 0.236$, $P = 0.791$; TNF- α : $F = 0.572$, $P = 0.569$; IL-6: $F = 0.774$, $P = 0.468$)。LPS 剂量和作用时间对 D-二聚体无影响 ($F_1 = 2.448$, $P_1 = 0.099$, $F_2 = 0.024$, $P_2 = 0.877$), 对 FDP 也无影响 ($F_1 = 0.106$, $P_1 = 0.900$, $F_2 = 0.013$, $P_2 = 0.908$); 也不存在交互效应 (D-二聚体: $F = 0.002$, $P = 0.998$; FDP: $F = 0.582$, $P = 0.563$)。**结论** LPS 可诱导小鼠发生 TCP, 但这种作用可能与凝血系统活化及过度炎症反应无关。

【关键词】 脂多糖; 内毒素; 脓毒症; 血小板减少症; 弥散性血管内凝血

Thrombocytopenia induced by lipopolysaccharide may be not related to coagulation and inflammatory response Ji Xiang*, Yao Fangchao, Wang Bing, Wang Yongqiang, Cao Shuhua, Wang Yuliang. *First Center Clinical

College of Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Wang Yongqiang, Emergency Medicine Research Institute, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China, Email: yongqiangwang1962@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the relationship between thrombocytopenia (TCP) induced by lipopolysaccharide (LPS) and coagulation or inflammatory response in mouse. **Methods** Forty-eight C57BL/6 mice were divided into control group, low-dose, and high-dose LPS treatment groups by random number table method, and each group was subdivided into 4-hour and 24-hour subgroups randomly, with 8 mice in each subgroup. 0.5 mg/kg or 50 mg/kg LPS was injected intraperitoneally in low-dose or high-dose group respectively, and equal amount of normal saline was injected in control group. Blood was collected from endocanthal vein at the specified time point, platelet count (PLT) was counted, and the levels of thrombin antithrombin complex (TAT), D-dimer, fibrinogen degradation product (FDP), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with control group, PLT ($\times 10^9/L$) at 4 hours and 24 hours in low-dose and high-dose

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.09.011

基金项目: 天津市卫计委攻关课题 (14KG101); 国家临床重点专科建设项目 (2011-873)

作者单位: 300192 天津医科大学一中心临床学院 (吉祥); 300192 天津市第一中心医院急救医学研究所 (姚芳超、王兵、王勇强、曹书华); 300384 天津, 卫生部危重病急救医学重点实验室 (王玉亮)

通讯作者: 王勇强, Email: yongqiangwang1962@sina.com

LPS groups was significantly decreased (4 hours: 660.65 ± 180.48 , 568.55 ± 117.99 vs. $1\ 199.13 \pm 110.54$; 24 hours: 505.63 ± 218.92 , 256.33 ± 72.86 vs. $1\ 229.13 \pm 1\ 189.37$, all $P < 0.05$), and the changes were more obvious in high-dose LPS group compared with those of the low-dose LPS group (all $P < 0.05$). Factorial analysis showed that the changes in PLT were related with LPS dosage and time ($F_1 = 135.660$, $P_1 = 0.000$; $F_2 = 12.120$, $P_2 = 0.001$). It was also found that there was an interactive effect of the dose of LPS and time on PLT ($F = 5.580$, $P = 0.007$). Compared with control group, TAT, TNF- α , and IL-6 at 4 hours and 24 hours in low-dose and high-dose LPS groups were significantly decreased [TAT (ng/L) at 4 hours: 1.10 ± 0.59 , 0.22 ± 0.13 vs. 3.47 ± 1.73 ; 24 hours: 1.18 ± 0.68 , 0.39 ± 0.29 vs. 3.19 ± 1.27 ; TNF- α (nmol/L) at 4 hours: 87.35 ± 12.29 , 93.70 ± 5.25 vs. 101.59 ± 10.96 , 24 hours: 81.94 ± 8.26 , 93.23 ± 4.71 vs. 102.84 ± 10.56 ; IL-6 (ng/L) at 4 hours: 81.78 ± 7.82 , 78.59 ± 9.06 vs. 110.88 ± 9.66 , 24 hours: 76.03 ± 9.85 , 71.34 ± 3.69 vs. 110.88 ± 10.35 , all $P < 0.05$]. TAT at 4 hours and 24 hours in high-dose LPS group was further decreased, and TNF- α at 24 hours was increased as compared with those of low-dose LPS group (all $P < 0.05$). TAT, TNF- α and IL-6 were influenced only by different dosage of LPS (TAT: $F = 42.350$, $P = 0.000$; TNF- α : $F = 14.810$, $P = 0.000$; IL-6: $F = 81.910$, $P = 0.000$), not time (TAT: $F = 0.002$, $P = 0.967$; TNF- α : $F = 0.342$, $P = 0.562$; IL-6: $F = 2.973$, $P = 0.092$). Changes in TAT was not found to be related with the dose of LPS and its time of action, or levels of TNF- α and IL-6 (TAT: $F = 0.236$, $P = 0.791$; TNF- α : $F = 0.572$, $P = 0.569$; IL-6: $F = 0.774$, $P = 0.468$). The dosage of LPS and time of admission showed no influence on D-dimer ($F_1 = 2.448$, $P_1 = 0.099$; $F_2 = 0.024$, $P_2 = 0.877$). The effect of different doses of LPS and time of administration showed no influence on FDP ($F_1 = 0.106$, $P_1 = 0.900$; $F_2 = 0.013$, $P_2 = 0.908$), and no interactive effects were found (D-dimer: $F = 0.002$, $P = 0.998$; FDP: $F = 0.582$, $P = 0.563$). **Conclusion** LPS can induce TCP in mouse, but this effect may not related to the activation of coagulation system and excessive inflammatory response.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Endotoxin; Sepsis; Thrombocytopenia; Disseminated intravascular coagulation

已有研究显示,脓毒症是危重症患者发生血小板减少症(TCP)的独立危险因素^[1];在严重脓毒症或脓毒性休克患者中,TCP发生率可达47.6%^[2]。TCP既是脓毒症的重要诊断依据^[3-4],也是评价患者预后的重要依据^[5]。TCP可增加脓症患者严重出血及急性肾损伤(AKI)的发生率,并延长重症加强治疗病房(ICU)住院时间^[2]。革兰阴性(G⁻)菌是脓毒症的常见致病菌,其产生的脂多糖(LPS)可诱导TCP发生,但其确切机制并不明确。弥散性血管内凝血(DIC)曾被认为是脓毒症时导致TCP的原因^[6];也有研究表明,脓毒症时TCP可不依赖DIC而单独发生^[6-9]。体外诱导小鼠血小板凋亡的研究发现,LPS通过凝血系统过度活化或过度炎症反应介导TCP的观点受到质疑^[10]。本实验通过单次腹腔注射LPS制备小鼠内毒素血症模型,观察LPS诱导的TCP与凝血系统状态及炎症反应的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:大肠杆菌LPS(血清型O111:B4)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA·Na₂,美国Sigma公司),凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、纤维蛋白原降解产物(FDP)、D-二聚体酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(武汉USCN公司),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(美国RayBiotech公司)。

1.2 实验动物分组及模型制备:8周龄SPF级雄性

C57BL/6小鼠48只,购自解放军军事医学科学院实验动物中心(动物合格证号:SCXK-2007-004),于天津市血液病研究所动物实验中心SPF级环境适应性饲养1周,期间自由进食水,光控周期12h。按随机数字表法将小鼠分为对照组及低剂量、高剂量LPS处理组,每组再按观察时间随机分为4h、24h两个亚组,每个亚组8只。低剂量、高剂量LPS组分别经腹腔注射0.5mg/kg、50mg/kg LPS生理盐水溶液,对照组给予等量生理盐水。LPS剂量通过预实验确定,在观察时间内无动物死亡。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血小板计数(PLT):于相应时间点取小鼠内眦血,EDTA·Na₂抗凝,取30 μ L抗凝全血至120 μ L血常规样本稀释液中,反复吹打,使之充分混匀后上机测定PLT。

1.3.2 ELISA检测TAT、D-二聚体、FDP、TNF- α 及IL-6水平:将剩余全血离心提取上清,-80℃冻存用于ELISA检测,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理:用SPSS 20.0软件统计数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同时间点不同处理组间及同一处理组不同时间点间比较用单因素方差分析,LPS剂量与作用时间的交互效应用析因设计资料的方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 对 PLT 的影响 (表 1~2):与对照组比较,低、高剂量 LPS 组 4 h 和 24 h 时 PLT 均显著下降,且高剂量组 PLT 较同时间点低剂量组下降更明显(均 $P < 0.05$)。析因设计的方差分析显示,LPS 剂量、LPS 作用时间对 PLT 均有影响,且 LPS 剂量和作用时间对 PLT 的影响存在交互效应(均 $P < 0.01$)。

2.2 LPS 对 TAT 的影响 (表 1~2):与对照组比较,低、高剂量 LPS 组 4 h 和 24 h 时 TAT 均显著下降,且高剂量组 TAT 较同时间点低剂量组下降更明显(均 $P < 0.05$)。析因设计的方差分析显示,LPS 剂量对 TAT 有影响($P < 0.01$),LPS 作用时间对 TAT 无影响($P > 0.05$);而 LPS 剂量和作用时间对 TAT 的影响不存在交互效应($P > 0.05$)。

2.3 LPS 对 D-二聚体的影响 (表 1~2):与对照组比较,低、高剂量 LPS 组 4 h 和 24 h 时 D-二聚体差异均无统计学意义。析因设计的方差分析显示,LPS 剂量、LPS 作用时间对 D-二聚体均无影响,且 LPS 剂量和作用时间对 D-二聚体的影响不存在交互效应(均 $P > 0.05$)。

2.4 LPS 对 FDP 的影响 (表 1~2):与对照组比较,低、高剂量 LPS 组 4 h 和 24 h 时 FDP 差异均无统计学意义。析因设计的方差分析显示,LPS 剂量、LPS 作用时间对 FDP 均无影响,且 LPS 剂量和作用时间对 FDP 的影响不存在交互效应(均 $P > 0.05$)。

2.5 LPS 对 TNF- α 的影响 (表 1~2):与对照组比较,4 h 时低剂量 LPS 组 TNF- α 显著下降($P <$

0.05),高剂量组 TNF- α 虽有下降但差异无统计学意义($P > 0.05$);24 h 时各剂量 LPS 处理组 TNF- α 均较对照组显著下降,但高剂量组较低剂量组进一步升高($P < 0.05$)。析因设计的方差分析显示,LPS 剂量对 TNF- α 有影响($P < 0.05$),LPS 作用时间对 TNF- α 无影响($P > 0.05$);而 LPS 剂量和作用时间对 TNF- α 的影响不存在交互效应($P > 0.05$)。

2.6 LPS 对 IL-6 的影响 (表 1~2):与对照组比较,低、高剂量 LPS 组 4 h 和 24 h 时 IL-6 水平均显著降低(均 $P < 0.05$);高剂量组 IL-6 水平虽较同时间点低剂量组有所降低,但差异无统计学意义。析因设计的方差分析显示,LPS 剂量对 IL-6 有影响($P < 0.01$),LPS 作用时间对 IL-6 则无影响($P > 0.05$);而 LPS 剂量和作用时间对 IL-6 的影响不存在交互效应($P > 0.05$)。

3 讨 论

血小板是一种来自于巨核细胞的无核细胞颗粒,除参与凝血功能外,还参与调节机体炎症反应和免疫反应^[11-13]。脓毒症是感染引起的全身性炎症反应,可通过多种机制导致血小板受损,是 TCP 发生的独立危险因素^[1]。由于方法学差异及采用的诊断标准不同,TCP 发生率波动于 22%~58%^[14-16]。

TNF- α 和 IL-6 是脓毒症早期炎症标志物^[17],在介导炎症反应发生发展中起到重要作用,并且与凝血机制异常有明显相关性^[18]。但有研究显示,脓毒症或内毒素血症时释放的细胞因子,如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 并不能活化血小板,炎性介质

表 1 不同剂量 LPS 处理不同时间对血小板减少症小鼠 PLT、TAT、D-二聚体、FDP、TNF- α 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数 (只)	PLT ($\times 10^9/L$)	TAT (ng/L)	D-二聚体 (ng/L)	FDP (ng/L)	TNF- α (nmol/L)	IL-6 (ng/L)
对照组	4 h 点	8	1 199.13 $\pm$ 110.54	3.47 $\pm$ 1.73	18.89 $\pm$ 9.31	26.18 $\pm$ 12.69	101.59 $\pm$ 10.96	110.88 $\pm$ 9.66
	24 h 点	8	1 229.13 $\pm$ 1 189.37	3.19 $\pm$ 1.27	18.76 $\pm$ 9.27	27.43 $\pm$ 14.26	102.84 $\pm$ 10.56	110.88 $\pm$ 10.35
低剂量 LPS 组	4 h 点	8	660.65 $\pm$ 180.48 ^a	1.10 $\pm$ 0.59 ^a	14.52 $\pm$ 1.62	25.57 $\pm$ 12.40	87.35 $\pm$ 12.29 ^a	81.78 $\pm$ 7.82 ^a
	24 h 点	8	505.63 $\pm$ 218.92 ^a	1.18 $\pm$ 0.68 ^a	14.14 $\pm$ 0.45	32.57 $\pm$ 21.48	81.94 $\pm$ 8.26 ^a	76.03 $\pm$ 9.85 ^a
高剂量 LPS 组	4 h 点	8	568.55 $\pm$ 117.99 ^{ab}	0.22 $\pm$ 0.13 ^{ab}	16.08 $\pm$ 4.17	32.72 $\pm$ 26.35	93.70 $\pm$ 5.25	78.59 $\pm$ 9.06 ^a
	24 h 点	8	256.33 $\pm$ 72.86 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.29 ^{ab}	15.80 $\pm$ 3.24	26.25 $\pm$ 14.41	93.23 $\pm$ 4.71 ^{ab}	71.34 $\pm$ 3.69 ^a

注:LPS 为脂多糖,PLT 为血小板计数,TAT 为凝血酶-抗凝血酶复合物,FDP 为纤维蛋白原降解产物,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-6 为白细胞介素-6;与对照组同期比较,^a $P < 0.05$;与低剂量 LPS 组同期比较,^b $P < 0.05$

表 2 不同剂量脂多糖作用不同时间对血小板减少症小鼠各指标影响的析因分析结果

变异来源	PLT		TAT		D-二聚体		FDP		TNF- α		IL-6	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
剂量	135.660	0.000	42.350	0.000	2.448	0.099	0.106	0.900	14.810	0.000	81.910	0.000
时间	12.120	0.001	0.002	0.967	0.024	0.877	0.013	0.908	0.342	0.562	2.973	0.092
剂量 $\times$ 时间	5.580	0.007	0.236	0.791	0.002	0.998	0.582	0.563	0.572	0.569	0.774	0.468

注:PLT 为血小板计数,TAT 为凝血酶-抗凝血酶复合物,FDP 为纤维蛋白原降解产物,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-6 为白细胞介素-6

介导了脓毒症的发生,但不能直接介导 TCP 的发生^[19]。本实验中经腹腔注射低剂量 LPS 后 4 h 及 24 h 均可引起血小板明显减少,但并未观察到细胞因子“风暴”式的释放反应;相反,血中 IL-6 和 TNF- α 浓度均明显低于对照组。说明对于 LPS 刺激所引起的炎症反应状态可因刺激方式不同而有差异。Aslam 等^[20]检测了腹腔注射 1 μ g LPS 后 4 h 内小鼠血浆 TNF- α 的变化,结果显示, TNF- α 浓度于注射 LPS 后 1 h 达最高,至 4 h 时已回落至基线水平。说明重复暴露于 LPS 反而会引起促炎细胞因子释放减少^[21]。在本实验中未观察到 TNF- α 和 IL-6 表达上调的现象,可能与选择的观察时间点及 LPS 剂量有关。

此外,有研究证实血小板参与调节 LPS 诱导的 TNF- α 生成^[20], LPS 攻击小鼠后,血浆 TNF- α 水平可因血小板数量的减少而下降,因此也不能除外血小板减少所致的促炎细胞因子表达下调。本实验应用析因设计资料的方差分析结果表明,在两个观察时间点尽管可以观察到不同剂量 LPS 组间 PLT 有显著改变,但促炎细胞因子浓度并无明显差异,也就是说,在 LPS 诱导 TCP 发生的同时,并未观察到过度增强的炎症反应,相反则是处于一种炎症抑制状态,炎症反应的变化趋势与 PLT 的变化趋势是不一致的。因此,无法用过度炎症反应导致血小板消耗增加来解释 LPS 诱导 TCP 的发生,可见 TCP 的发生并不需要过度的炎症反应参与。

全身炎症反应时释放出的 TNF- α 、IL-1、IL-6 等促炎介质可诱导内皮细胞和单核细胞增强组织因子的表达,从而激活凝血,同时可损害内皮细胞的抗凝功能,导致凝血系统功能异常^[22];临床上可以从仅有实验室检查异常的亚临床表现发展到严重的 DIC,后者可出现严重 TCP。以往的研究表明, DIC 启动后凝血系统活化引起的血小板消耗参与了细菌感染诱导的 TCP,但也有研究发现脓毒症时 TCP 未必发生于 DIC 阶段。Oppenheimer 等^[9]的研究发现,无论是成人还是儿童脓毒症患者,在尚无明确 DIC 发生证据的脓毒症早期即可频繁检出 TCP。Sheu 等^[23]发现,与正常动物相比, LPS 处理大鼠肺小血管内尽管可见大量血小板聚集,但并未观察到纤维素血栓形成,而且聚集于肺小血管内的血小板并未发生脱颗粒反应,提示以凝血系统活化作为 LPS 诱导 TCP 发生的理由可能并不充分。应用 ⁵¹Cr 标记的血小板回输至大鼠体内后,单剂量静脉注射 LPS

(4 mg/kg),通过对不同器官放射活性的检测发现,放射标记的血小板主要聚集于肝内,而在肺、肾和脾等器官内的分布并未发生改变。但 Andonegui 等^[24]的研究显示,⁵¹Cr 标记血小板在低剂量 LPS 处理的小鼠体内主要分布于肺,而肝、脾及其他器官并未发现明显的血小板聚集,这种器官分布特异性的差异可能与 LPS 剂量不同有关。Yang 等^[25]用钩端螺旋体感染荷兰猪制备 TCP 模型,通过对多种凝血分子标志物的检测发现,反映凝血酶活化的指标 TAT 在钩端螺旋体感染后呈下降趋势, D-二聚体和 FDP 显著增加,但在肝、肺、肾均未观察到血小板血栓或纤维蛋白性血栓,因此未能得出凝血对 TCP 有影响的阳性结果。Camerer 等^[26]分别应用 20、30、60 mg/kg LPS 攻击野生型小鼠,通过检测 TAT、抗凝血酶-III (AT-III) 水平和微血管纤维沉降评价凝血系统活化程度,结果发现, LPS 在引起明显 TCP 的同时,可引起 TAT、AT-III 水平显著升高,肝内微血管可见纤维蛋白原沉降,提示 LPS 在引起 TCP 的同时也激活了凝血系统;但研究者应用同样的方法分别攻击凝血酶受体蛋白酶活化受体 (PAR) 缺陷小鼠 Par1^{-/-}、Par2^{-/-}、Par4^{-/-},并没能阻止 TCP 的发生,表明凝血酶引起的血小板活化在 LPS 诱导 TCP 的发生中并未起作用;在对纤维蛋白原缺陷小鼠 Fibr^{-/-}的研究中也得到了同样的结果,而应用水蛭素 AT 处理后, DIC 虽改善,但 TCP 并未减轻。这些结果表明 LPS 诱导的 TCP 与凝血系统的活化无关。

AT 是最重要的抗凝物质之一,主要在肝和内皮细胞合成,对丝氨酸蛋白酶有抑制作用,因此对凝血酶的激活有抑制作用。TAT 是凝血酶与 AT 结合的产物,其血浆浓度升高可反映凝血酶生成增加,其高敏感性有助于检测低水平活化的凝血反应^[27]。本实验中腹腔注射 LPS 后 4 h,血中 TAT 水平显著下降,且高剂量组低于低剂量组,提示凝血酶的生成受到了抑制。Yang 等^[25]也观察到 TAT 在 24 h 内趋于下降,只是下降程度明显减轻,可能与钩端螺旋体内毒素毒性较大肠杆菌低有关。研究者应用光谱光度测量分析不同来源的 LPS 对凝血酶和纤溶酶活性的影响发现:内毒素血症时纯凝血酶的活性下降,说明 LPS 介导的凝血酶活性受抑可被血浆凝溶胶蛋白和重组内毒素中和蛋白逆转。在血小板活化前将凝溶胶蛋白和 LPS 共同培养,可抑制血小板聚集和分泌。此外,当与 LPS 共培养的凝血酶诱导纤维蛋白凝胶形成时,或当纤维蛋白凝胶形成期间纤维

蛋白原溶液中含有 LPS,都可导致纤维蛋白凝胶降解性剪切系数下降, LPS 介导的凝血酶活性受抑可促进脓毒症时凝血功能的紊乱。尽管本实验未能明确 TAT 这种变化趋势是否由 LPS 对凝血酶的直接抑制造成,但通过 TAT 的变化并未观察到凝血系统的过度活化。

纤溶系统在凝血启动后被激活,包括功能相互制衡的纤溶酶原、纤溶酶原激活物和纤溶抑制物。纤溶酶原的主要生理功能是在各种纤溶酶原激活物的作用下形成纤溶酶。纤溶酶可降解非交联的纤维蛋白生成非交联的 FDP, FDP 升高是纤溶亢进的指标之一,但也间接反映了凝血系统活性增高。非交联的纤维蛋白在活化的凝血因子 XIII 作用下形成交联的纤维蛋白,纤溶酶降解交联的纤维蛋白,使之产生交联纤维蛋白降解产物,如 D-二聚体,而 D-二聚体水平升高可作为反映体内高凝状态和纤溶活性亢进的较敏感指标。本实验显示,无论是 LPS 剂量还是 LPS 作用时间均未引起 D-二聚体和 FDP 的明显变化,表明小鼠体内未出现高凝或纤溶系统活化状态,结合 TAT 的变化,说明上游凝血系统活化受抑制,其下游产物的生成自然不会升高,故本实验中未观察到 LPS 诱导的 TCP 伴随明显的凝血系统过度活化,因此 LPS 诱导的 TCP 并不需要过度活化的凝血系统参与。

综上所述,本实验中单剂量 LPS 攻击小鼠后,炎症反应标志物及凝血活化标志物的变化均未能体现出过度炎症反应及凝血系统高度活化的状态,无法用过度炎症反应及凝血系统活化来解释 LPS 诱导的 TCP,因此, LPS 诱导小鼠 TCP 可能不需要凝血系统及炎症反应过度活化的机制介导。

参考文献

- [1] 王兵,韩鹏赢,李红洁,等.危重患者血小板减少症发病危险因素及预后分析[J].中国急救医学,2008,28(12):1072-1076.
- [2] Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, et al. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome [J]. J Intensive Care, 2013, 1(1):9.
- [3] 姚咏明,盛志勇,林洪远,等.脓毒症定义及诊断的新认识[J].中华危重病急救医学,2004,16(6):321-324.
- [4] 姚咏明,盛志勇,林洪远,等.2001 年国际脓毒症定义会议关于脓毒症诊断的新标准[J].中华危重病急救医学,2006,18(11):645.
- [5] 江稳强,欧阳维富,陈纯波,等.血浆血管内皮生长因子浓度与血小板计数比值对脓毒症预后的预测作用[J].中华危重病急救医学,2014,26(7):484-488.
- [6] Neame PB, Kelton JG, Walker IR, et al. Thrombocytopenia in septicemia; the role of disseminated intravascular coagulation [J]. Blood, 1980, 56(1):88-92.
- [7] Riedler GF, Straub PW, Frick PG. Thrombocytopenia in septicemia. A clinical study for the evaluation of its incidence and diagnostic value [J]. Helv Med Acta, 1971, 36(1):23-38.
- [8] Corrigan JJ Jr. Thrombocytopenia: a laboratory sign of septicemia in infants and children [J]. J Pediatr, 1974, 85(2):219-221.
- [9] Oppenheimer L, Hrynuk WM, Bishop AJ. Thrombocytopenia in severe bacterial infections [J]. J Surg Res, 1976, 20(3):211-214.
- [10] 吉祥,姚芳超,王兵,等.大肠杆菌脂多糖体外诱导小鼠血小板凋亡的研究[J].中华危重病急救医学,2015,27(80):677-681.
- [11] Danese S, de la Motte C, Reyes BM, et al. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification [J]. J Immunol, 2004, 172(4):2011-2015.
- [12] Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments [J]. Immunity, 2003, 19(1):9-19.
- [13] 孙振朕,朱科明,邓小明.血小板和中性粒细胞在脓毒症中作用机制的研究进展[J].中华危重病急救医学,2011,23(8):502-504.
- [14] Sharma B, Sharma M, Majumder M, et al. Thrombocytopenia in septic shock patients—a prospective observational study of incidence, risk factors and correlation with clinical outcome [J]. Anaesth Intensive Care, 2007, 35(6):874-880.
- [15] Gafter-Gvili A, Mansur N, Bivas A, et al. Thrombocytopenia in *Staphylococcus aureus* bacteremia: risk factors and prognostic importance [J]. Mayo Clin Proc, 2011, 86(5):389-396.
- [16] Vandijk DM, Blot SI, De Waele JJ, et al. Thrombocytopenia and outcome in critically ill patients with bloodstream infection [J]. Heart Lung, 2010, 39(1):21-26.
- [17] 张柳,安友仲.脓毒症的阶段性生物标志物[J].中华危重病急救医学,2011,23(8):509-512.
- [18] 曾文美,毛璞,黄勇波,等.脓毒症预后影响因素分析及预后价值评估[J].中国中西医结合急救杂志,2015,22(2):118-123.
- [19] Leytin V, Shakoor S, Mody M, et al. Sepsis- and endotoxemia-generated cytokines do not trigger activation of human platelets [J]. Crit Care Med, 2002, 30(12):2771-2773.
- [20] Aslam R, Speck ER, Kim M, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo [J]. Blood, 2006, 107(2):637-641.
- [21] Wysocka M, Robertson S, Riemann H, et al. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness [J]. J Immunol, 2001, 166(12):7504-7513.
- [22] 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[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(6):361-364.
- [23] Sheu JR, Hung WC, Wu CH, et al. Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia [J]. Circulation, 1999, 99(23):3056-3062.
- [24] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4 [J]. Blood, 2005, 106(7):2417-2423.
- [25] Yang HL, Jiang XC, Zhang XY, et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation [J]. BMC Infect Dis, 2006, 6:19.
- [26] Camerer E, Cornelissen I, Kataoka H, et al. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia [J]. Blood, 2006, 107(10):3912-3921.
- [27] Takahashi H, Wada K, Niwano H, et al. Comparison of prothrombin fragment 1 + 2 with thrombin-antithrombin III complex in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 1992, 3(6):813-818.

(收稿日期:2015-05-19)

(本文编辑:李银平)