

[24] Vinuesa CG, Tangye SG. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(11): 853-865.

[25] Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, et al. Follic-

ular helper T cells: lineage and location[J]. Immunity, 2009, 30(3): 324-335.

(收稿日期: 2010-12-16 修回日期: 2011-03-22)

· 综 述 ·

活化蛋白 C 在防治重症脓毒症继发 DIC 中的作用*

林国强, 李楠楠 综述, 王伟金[△] 审校

(中国人民解放军第一七五医院、厦门大学附属东南医院血液科, 福建漳州 363000)

关键词: 活化蛋白 C; 脓毒症; 弥散性血管内凝血

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)23-2379-03

弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 是一种在原发病基础上, 由特定诱因引发的凝血活化并导致广泛微血栓形成, 损害组织、器官血液供应, 继而出现细胞和组织供氧紊乱, 器官功能障碍直至急性功能衰竭; 同时因大量凝血因子和血小板被消耗, 微血栓形成继发纤维蛋白溶解亢进, 导致广泛性出血, 进一步加重器官损害, 形成恶性循环。临床上以血栓形成、微循环障碍、出血及微血管病性溶血、多脏器功能障碍等为突出表现^[1-2]。常见的临床主要基础疾病有: 感染、肿瘤、病理产科、手术及创伤等, 其中感染, 尤其是重症感染, 是引发 DIC 的最常见原因。随着对其发病机制研究的不断深入, 诊疗观念不断更新, 新近研究发现活化蛋白 C 具有抗凝、促纤溶、抗炎、抗凋亡、保护细胞等功能, 并被应用于治疗重症脓毒症继发的 DIC, 收到了较好的效果, 从此掀起了关于活化蛋白 C 治疗脓毒症及 DIC 的热潮。

1 感染性 DIC 的主要发病机制

在诸多原发病中, 感染, 特别是严重的感染是引起 DIC 最常见的原因。感染病原体包括细菌和病毒、真菌及其他病原体, 其中细菌感染发生率最高, 约 30%~50% 的革兰阴性杆菌败血症合并 DIC, 但也有不少的报道表明革兰阳性菌败血症并发 DIC 的病例几乎与革兰阴性杆菌败血症相同^[1]。关于感染性 DIC 的病理机制, 研究得较多的是革兰阴性细菌感染, 其中内毒素是关键因素, 致病机理包括以下几个方面。

1.1 血管内皮细胞损害 血管内皮细胞在维持机体凝血功能平衡中起重要作用, 严重感染时单核-巨噬细胞被激活, 释放 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症介质, 通过各种信号通路如钙离子介导的信号通路、丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 介导的信号通路等导致内皮细胞受损害, 表面受体发生改变, 凋亡增加, 并释放环氧合酶等炎性介质及组织因子 (tissue factor, TF)^[3]; 此外内毒素能激活中性粒细胞, 在还原型辅酶 II (nicotinamide-adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt, NADPH) 氧化酶催化下发生呼吸爆发, 产生大量的氧自由基, 氧自由基通过细胞膜、DNA 等多种途径损害血管内皮细胞。

1.2 凝血系统激活 脓毒症时脂多糖通过血管内皮细胞表面的模式识别受体结合促进 TF、TNF 表达, 导致外源性凝血途径激活。同时研究发现, 用抗体选择性阻断内源性凝血途径 (抗Ⅲ或抗Ⅺa), 不能阻断 DIC 的发生, 而阻断Ⅺa 可减少 DIC 发生, 表明脓毒症时内毒素主要通过激活组织因子 (TF) 途径

而激活凝血过程^[4]。内毒素还能促使单核-巨噬细胞合成 TNF, TNF 是诱导 IL-1、IL-6、IL-8 及其自身的基因表达引起级联反应的始发因子, 大量生成的 IL-6 和 IL-8 可诱导 TF 的表达, 可进一步加速凝血过程的活化和炎症反应的程度^[5-7]。

1.3 血小板活化 病原体激活内皮细胞和单核细胞炎症系统后, 导致血小板活化因子释放, 同时导致 IL-6、IL-8 和 TNF- α 等细胞因子大量生成, 这些细胞因子促进血小板活化、聚集并黏附在血管内皮细胞表面, 从而激活凝血系统和炎症^[8]。

此外, 内毒素等尚可导致蛋白 C (protein C, PC) 等抗凝系统受损害, 原因有: 炎症激活凝血系统后导致继发性消耗增多, 血管内皮细胞表面活化蛋白受体减少, 导致其功能障碍。Tang 等^[9]研究认为内毒素还通过增加组织纤溶酶原激活物和纤溶酶, 灭活组织因子途径抑制剂 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI), 减弱其对 TF 介导的外源性凝血途径的抑制作用。

总之, 在严重脓毒症及继发的 DIC 中存在多条炎症途径被激活, 同时伴有凝血-纤溶系统的功能失调, 并且炎症与凝血互为因果, 形成恶性循环, 促进了 DIC 的发生、发展。

2 活化蛋白 C (activated protein C, APC) 的理化特征及作用机制

严重脓毒症及其继发的 DIC 是近年来危重病治疗领域的一大难题, 虽然涌现出许多新的治疗方法, 但是效果却不尽如人意。APC 的出现, 给脓毒症及 DIC 的治疗带来了新的希望, 开辟了新的途径。

APC 是 PC 的活性形式, PC 是一类维生素 K 依赖性糖蛋白酶类物质, 由 155 个氨基酸的轻链和 304 个氨基酸的重链构成, 正常情况下以无活性的酶原形式存在于血液中, 当凝血系统活化后, 凝血酶大量生成, 其与内皮细胞表面的凝血酶调节蛋白结合形成凝血酶-凝血酶调节蛋白复合物, 在此复合物作用下 PC 被裂解成为一个由 12 个氨基酸残基组成的活性多肽, 即转化为其活性形式, 并且此活化过程通过 PC 与内皮细胞、单核细胞、中性粒细胞等表面的内皮细胞蛋白 C 受体 (endothelial cell protein C receptor, EPCR) 结合后被进一步放大^[10-11]。在严重脓毒症血症患者中, PC 系统存在严重的功能障碍, 诸多动物实验及临床观察发现, 给予应用 APC 后能明显改善脓毒症血症的预后, 降低病死率, 随后的研究不断发现, APC 有抗炎、抗凝、抗凋亡等作用, 其具体生物学作用机理涉及如下:

* 基金项目: 福建省青年人才项目 (2006F3149)。△ 通讯作者, Tel: 13607574237; E-mail: wangwei22002@yahoo.com.cn。

2.1 抗凝血作用 大量研究均证实 APC 的抗凝作用机制主要表现为丝氨酸蛋白酶活性,在蛋白质 S、磷脂、 Ca^{2+} 等协同因子辅助下,通过不可逆性水解灭活 FV a、FVIII a,阻断凝血酶的产生。此外,APC 通过结合纤维蛋白溶解原活化抑制因子-1,使后者不能抑制纤维蛋白溶解原活化以及阻止凝血酶活化纤溶抑制因子,进而诱导纤溶酶原激活物的释放,导致纤溶系统激活。Lay 等^[12] 研究发现有 PC 基因缺陷的小鼠出生后不能正常生存,然后用转基因方法给予转入 PC 基因后小鼠可存活,并且 PC 水平只要维持在正常值的 1%~3% 即可维持小鼠的正常生长、发育,但是该类小鼠容易形成血栓,这进一步证实了 APC 调节凝血系统作用的重要性。此外,血管内皮细胞表面的 APC 的受体 EPCR 能结合 FVII,通过内化作用减少血浆中 VII 因子起到抗凝作用^[13]。APC 还可限制 FII a 与血小板的结合及抑制 EPCR 依赖性组织因子的释放,从而阻断内、外源性凝血途径。同时这一特点,也为其具有出血这一不良反应埋下了隐患。

2.2 抗炎作用 最初在大量实验中观察到 APC 有抗炎的作用,该作用过去被认为 APC 可以通过阻止凝血酶的形成,阻止炎症介质的释放,从而起到抗炎作用,这种抗炎作用被认为是抗凝依赖性。最近研究不断发现,APC 可以直接抑制炎症反应,而不依赖于其抗凝血特性。Lay 等^[12] 对 PC 基因缺陷的小鼠给予腹腔注射大肠杆菌内毒素后发现其体内的炎症反应较正常小鼠明显剧烈,给予注射内毒素后再给予应用重组 APC,体内炎症明显减轻。此外尚有大量研究均证实 APC 能作用于血管内皮细胞、单核细胞、巨噬细胞及中性粒细胞引起 TNF- α 、IL-6、IL-8、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha, MIP-1 α) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 等促炎性细胞因子及 E-选择素、细胞间黏附分子-1 等黏附分子表达下降,抑制白细胞迁移,减轻炎症反应^[14]。同时,APC 能通过上调 IL-10 等抑炎性细胞因子起到抑制炎症反应的作用^[15]。

目前研究发现,内皮细胞、中性粒细胞及单核-巨噬细胞等表面 EPCR 和蛋白酶激活受体-1 (protease activated receptor-1, PAR-1) 可能是其发挥抗炎作用的关键着力点^[13,16]。APC 与其受体结合后可通过下调组织因子和核转录因子- κB 的表达,降低核转录因子- κB 亚基的表达,从而控制其下游的 TNF、各类黏附分子等靶基因的表达,从而减轻炎症反应,抑制细胞迁移;通过抑制 MAPK 激活导致 APC 表达降低;值得注意的是 APC 对中性粒细胞迁移有抑制作用,但并不影响其合成、释放各种酶的功能,其迁移抑制作用可以被抗 EPCR 抗体所阻断;而单核-巨噬细胞则可抑制其释放 MCP-1 等促炎因子,并且此类抑制作用并不能被抗 EPCR 抗体所阻断,这提示可能尚存在其他作用途径^[17]。总之,APC 的靶细胞范围之广、功能之多、机制之复杂,远远超出学者们的预料,有待于广大科研人员进一步深入探究。

2.3 抗细胞凋亡及促进细胞增殖 许多研究显示,细胞凋亡在炎症反应中起重要作用,严重脓毒症及 DIC 中,细胞凋亡导致器官功能的衰竭。近许多研究发现 APC 有抗细胞凋亡、促进细胞增殖的作用。有资料显示,APC 可以通过与其受体结合后强化细胞抑制凋亡基因 bcl-2 的表达,抑制 P53 的作用,起到抗凋亡作用。Xue 等^[10] 研究发现,皮肤表皮细胞通过自分泌方式释放 APC,APC 与其受体 EPCR 结合后能通过激活细胞外信号调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein 1/2, ERK1/2),促进表皮细胞的增殖,抑制细胞凋亡,同时能通过增加金属蛋白酶的活性促进表皮细胞的迁移,利于伤口

愈合,并且作用需在表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 辅助下完成,而 O'Brien 等^[18] 证实 APC 作用于人脐静脉内皮细胞可引起磷酸化的 ERK1/2 增多,活化的 ERK 进一步激活下游的早期生长反应因子 (early growth response factor, EGR),增强其对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 的抑制,导致细胞凋亡受阻,但此作用依赖于 PAR-1 和鞘氨醇-1-磷酸受体 (sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1),而与 EPCR 受体无关。这进一步体现了 APC 作用及其机制的复杂性,需进一步深入研究。

此外,有研究发现 PC 抑制剂 (protein C inhibitor, PCI) 可以抑制肝细胞生长因子介导的肝细胞损伤后的再生,应用抗 PCI 后可以恢复 APC 的促细胞增殖作用,这也从反面证实了 APC 能促进细胞增殖的作用,同时也提供了研究 APC 新的切入点^[19]。

尚有相关资料显示,APC 能改善脓毒血症动物的微循环,减轻血管渗漏,减轻缺血-再灌注损伤,鉴于脓毒血症与缺血-再灌注临床表现、体内血流动力学、细胞因子及黏附分子等表达极为相似,有学者在由心跳骤停等非原发性感染性疾病引起的缺血-再灌注模型中研究 APC 的作用,但是 APC 并没有像在脓毒症中一样能改善微循环,减轻血管渗漏,部分原因可能与缺血-再灌注与脓毒血症中内皮细胞最初损伤因素不同有关^[20]。这进一步提示 APC 有严格的适应证。

3 临床应用及存在的问题

近年来,随着对 APC 作用及脓毒症、DIC 发病机制研究的不断深入,有关 APC 治疗脓毒血症及 DIC 的临床报道不断出现。1998~2000 年期间进行的临床多中心实验 (1 690 例严重感染患者参加的随机双盲、安慰剂对照试验中 (PROWESS),入选患者随机分为重组人活化蛋白 C (recombinant human activated protein C, rhAPC) 或安慰剂对照组,其中 rhAPC 组 850 例,以 $24 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度连续静滴 96 h,观察治疗后第 28 天的病死率) 研究发现,在 28 d 的研究过程中, rhAPC 治疗可使死亡的相对危险率降低 19.4%、绝对危险率降低 6.1% (第 28 天 rhAPC 组病死率 24.7%,而安慰剂组为 30.8%, $P=0.0049$)^[21]。随后进行的一项全球性、多中心、前瞻性研究 (PROGRESS) 对来自 37 个国家的 14 543 例参与研究的患者进行研究发现, rhAPC 治疗可以使患者死亡几率降低 28%,相对危险率降低 17%^[22];同时 Hodder 等^[23] 研究发现在重症脓毒症继发 DIC 及器官功能障碍后 24 h 内使用 rhAPC 比 24 h 后应用能明显降低病死率,这提示掌握好适应证后及早应用 rhAPC 对于降低患者病死率有重要意义。

Longo 等^[24] 做的一项关于严重脓毒症幸存者健康的生活质量和资源利用的长期随访调查研究发现, rhAPC 能明显缩短患者的住院时间,并能明显改善患者的预后,提高生活质量,并减低患者的医疗资源的利用。这显示出 APC 治疗重症脓毒血症所具备的独特的优越性。当然,任何药物均有其不良反应, APC 也难逃这一规律。

Bernard 等^[25] 对所有 II、III 期临床试验中接受 rhAPC 治疗的 2 786 例成年严重感染患者的安全性数据分析发现,在应用 APC 期间和应用后 28 d 内严重出血事件的发生率分别是 2.8% 和 5.3%,在 ADDRESS 研究中, rhAPC 治疗组出血发生率为 2.4%,大于安慰剂组 1.2% ($P=0.02$)^[26]。这提示出血是不良反应之一,另外某些敏感患者有可能发生过敏反应。针对其存在的不良反应,2003 年新西兰医学杂志亦发布了临床应用 rhAPC 的指南,指出了其适应证及禁忌证,在此不再赘

述。

4 小 结

总之,严重脓毒血症及其继发的 DIC 等涉及多系统的损害,治疗上必然需要综合性治疗:抗凝血、抗炎、保护细胞减轻组织损害等,rhAPC 集抗凝、抗炎、抗凋亡、促进细胞增殖、促进组织修复等作用于一体,理论上 APC 能同时从多方面有效阻止严重脓毒血症及 DIC 的发展,临床应用中亦证实了这一点。当然,在发现此药优点同时,亦要看到出血等不良反应,按照指南合理使用,尽量将不良反应减至最低。目前其作用机制、安全性、不良反应尚未完全明了,仍有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Levi M. Disseminated intravascular coagulation [J]. Crit Care Med,2007,35(9):2191-2195.
- [2] 陈晓霞,王智明,罗贤生,等. 30 例白血病合并弥散性血管内凝血的临床分析[J]. 重庆医学,2010,39(5):599-600.
- [3] Jung WK,Choi I,Lee DY,et al. Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264. 7 macrophages via the p38/ERK and NF-kappaB pathways[J]. Int J Biochem Cell Biol,2008,40(11):2572-2582.
- [4] Levi M,Schouten M,der Poll TV. Sepsis,coagulation,and antithrombin: old lessons and new insights [J]. Semin Thromb Hemost,2008,34(8):742-746.
- [5] Huisse MG,Pease S,Hurtado-Nedelec M,et al. Leukocyte activation:the link between inflammation and coagulation during heatstroke. A study of patients during the 2003 heat wave in Paris[J]. Crit Care Med,2008,36(8):2288-2295.
- [6] 石世平,龙泽宏. 清胰汤与生长抑素联合治疗急性重症胰腺炎的临床观察[J]. 重庆医学,2010,39(5):595-596.
- [7] 李照辉,徐丽娟,卢晓绍,等. 连续性肾脏替代治疗对脓毒症患者血清 IL-1 β 、IL-6、CRP 的影响 [J]. 山东医药,2010,50(37):65-66.
- [8] Rizvi AZ,Swain JR,Davies PS,et al. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(16):6321-6325.
- [9] Tang H,Ivanciu L,Popescu N,et al. Sepsis-induced coagulation in the baboon lung is associated with decreased tissue factor pathway inhibitor[J]. Am J Pathol,2007,171(3):1066-1077.
- [10] Xue M,Campbell D,Jackson CJ. Protein C is an autocrine growth factor for human skin keratinocytes [J]. J Biol Chem,2007,282(18):13610-13616.
- [11] Griffin JH,Fernandez JA,Gale AJ,et al. Activated protein C[J]. J Thromb Haemost,2007,5(Suppl 1):73-80.
- [12] Lay AJ,Donahue D,Tsai MJ,et al. Acute inflammation is exacerbated in mice genetically predisposed to a severe protein C deficiency[J]. Blood,2007,109(5):1984-1991.
- [13] Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis [J]. Haematologica,2008,93

- (6):812-816.
- [14] Alsasser G,Warshaw AL,Thayer SP,et al. Decreased inflammation and improved survival with recombinant human activated protein C treatment in experimental acute pancreatitis[J]. Arch Surg,2006,141(7):670-677.
- [15] Toltl LJ,Beaudin S,Liaw PC. Activated protein C up-regulates IL-10 and inhibits tissue factor in blood monocytes [J]. J Immunol,2008,181(3):2165-2173.
- [16] Thiyagarajan M,Cheng T,Zlokovic BV. Endothelial cell protein C receptor:role beyond endothelium[J]. Circ Res,2007,100(2):155-157.
- [17] Okajima K. Regulation of inflammatory responses by activated protein C: the molecular mechanism(s) and therapeutic implications[J]. Clin Chem Lab Med,2004,42(2):132-141.
- [18] O'Brien LA,Richardson MA,Mehrbod SF,et al. Activated protein C decreases tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand by an EPCR-independent mechanism involving Egr-1/Erk-1/2 activation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2007,27(12):2634-2641.
- [19] Hamada T,Kamada H,Hayashi T,et al. Protein C inhibitor regulates hepatocyte growth factor activator-mediated liver regeneration in mice[J]. Gut,2008,57(3):365-373.
- [20] Teschendorf P,Padosch SA,Del VYFD,et al. Effects of activated protein C on post cardiac arrest microcirculation;an in vivo microscopy study[J]. Resuscitation,2009,80(8):940-945.
- [21] Bearden DT,Garvin CG. Recombinant human activated protein C for use in severe sepsis[J]. Ann Pharmacother,2002,36(9):1424-1429.
- [22] Martin G,Brunkhorst FM,Janes JM,et al. The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa(activated)use and patient outcomes[J]. Crit Care,2009,13(3):R103.
- [23] Hodder RV,Hall R,Russell JA,et al. Early drotrecogin alfa(activated) administration in severe sepsis is associated with lower mortality:a retrospective analysis of the Canadian ENHANCE cohort[J]. Crit Care,2009,13(3):R78.
- [24] Longo CJ,Heyland DK,Fisher HN,et al. A long-term follow-up study investigating health-related quality of life and resource use in survivors of severe sepsis:comparison of recombinant human activated protein C with standard care[J]. Crit Care,2007,11(6):R128.
- [25] Bernard GR,Macias WL,Joyce DE,et al. Safety assessment of drotrecogin alfa(activated)in the treatment of adult patients with severe sepsis[J]. Crit Care,2003,7(2):155-163.
- [26] Abraham E,Laterre PF,Garg R,et al. Drotrecogin alfa (activated)for adults with severe sepsis and a low risk of death[J]. N Engl J Med,2005,353(13):1332-1341.