

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.021

内毒素血症犬白细胞去除后组织因子及组织因子途径抑制物的变化*

周顺刚¹,贺志高²,黄显凯³,陈方祥^{3△}

(1. 甘肃省兰州军区兰州总医院创伤骨科 730050; 2. 兰州军区乌鲁木齐总医院重症监护室 830000; 3. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所 400042)

摘要:目的 观察部分外周血白细胞去除(LCAP)后内毒素血症犬血浆中组织因子(TF)及组织因子途径抑制物(TFPI)的变化,探讨去除白细胞对内毒素血症犬凝血功能的影响。方法 雄性杂种犬 30 只,采用随机数字表法分为血清脂酶(LPS)组(L组)、假 LCAP 组(S组)及 LCAP 处理组(T组),每组 10 只。L 组仅经静脉输注 2 mg/kg LPS 建立内毒素血症犬模型,不行 LCAP;T 组在建模后 12~14 h 使用自动连续血流细胞分离机进行 LCAP;S 组建模后 12~14 h 行假 LCAP(将去除的终产物回输入体内)。观察建模后 12、36 h 各组动物血浆中的 TF 及 TFPI 水平,并计算 TF/TFPI 值。结果 在 36 h 时,与 L 组及 S 组比较,T 组犬 LCAP 后血浆中 TF 水平明显降低($P<0.05$),TFPI 水平明显升高($P<0.05$),TF/TFPI 值降低($P<0.05$)。而 L 组与 S 组各指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 部分 LCAP 可降低血浆中 TF/TFPI 值,从而改善凝血功能障碍。

关键词:内毒素血症;白细胞去除术;组织因子;抑制物

中图分类号:R34

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)28-3760-03

The level of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in plasma of endotoxemic dog after partial removal of the leukocytes*

Zhou Shungang¹, He Zhigao², Huang Xiankai³, Chen Fangxiang^{3△}

(1. Department of Orthopedic Trauma, Lanzhou Military Region General Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. ICU of Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 3. Research Institute of Surgery, Daping Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the levels of TF and TFPI in peripheral blood of endotoxemic dog after partial removal of the leukocytes, and explore the influence of Leukapheresis to coagulation function of endotoxemic dog. Methods 30 male mongrel dogs were randomly divided into LPS group (group L), sham leukocytapheresis (LCAP) group (group S) and LCAP treatment group (group T). Group L was used to establish endotoxemia model by injection of LPS (2 mg/kg), but did not receive LCAP; group T received LCAP by automated continuous-flow blood cell separator from 12 to 14 h after injected of LPS; group S received sham LCAP from 12 to 14 h after injection of LPS (the end products were transfused back to the body of dog). After 12, 36 h injection of LPS, observation of the levels of TF and TFPI of plasma in each group animals and calculation of the ratios of TF/TFPI were made. Results At 36 h, the level of TF in plasma in group T was statistically lower than that in group L and S ($P<0.05$), the level of TFPI in plasma in group T was statistically higher than that in group L and S ($P<0.05$), the ratio of TF/TFPI in group T was statistically lower than that in group L and S ($P<0.05$), there was no statistical difference between group L and group S ($P>0.05$). Conclusion The ratio of TF/TFPI lows when the leukocytes of plasma were partially removed, and improves blood coagulation dysfunction.

Key words: endotoxemia; leukapheresis; tissue factor; inhibitor

有研究显示,白细胞特别是中性粒细胞升高是内毒素血症的重要特征,也是造成内毒素血症肺损伤的关键因素之一^[1-2],且在脓毒症中也存在着凝血功能异常。前期研究显示,去除白细胞可通过活化蛋白 C、血栓调节蛋白及纤溶酶原激活物抑制剂-1 等改善凝血纤溶功能^[3]。但还未对组织因子(tissue factor, TF)及组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)进行研究。为此,本研究观察了内毒素血症时部分外周血行白细胞去除(leukocytapheresis, LCAP)后血浆中 TF 及 TFPI 水平,旨在初步探讨活化的白细胞对脓毒症犬凝血功能的影响。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器及试剂 血清脂酶(LPS)(O55:B5, Sigma 公司),血气分析仪(i-STAT, Abbott Laboratories 公司,美国),白细胞分离机及分离配件(COM. TEC, Fresenius HemoCare GmbH 公司,德国),BP-408 MARK III 四道生理记录仪(Colin

公司,日本),Newport E-200 呼吸机(Newport Medical Instruments 公司,美国)。TF、TFPI ELISA 试剂盒(Abcam 公司,英国)。

1.2 实验动物 健康雄性杂种犬 30 只,体质量(15.6±2.9) kg,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物实验中心提供。试验前常规禁食、禁饮水 12 h,速眠新 II 0.04 mL/kg 静脉麻醉,1.5%戊巴比妥钠以 1 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 静脉注射维持,采用控制性机械通气模式,实验过程中吸氧浓度不变(29%),呼吸频率 18 次/min,初始潮气量 10 mL/kg,吸呼比 1:2,必要时调节潮气量,使血二氧化碳分压(PaCO₂)维持在 40 mm Hg 左右。切开右侧股动脉插入动脉导管,以监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)及采血查血气;切开左右股静脉及左后肢隐静脉,以备输液及接入白细胞分离导管。根据 MAP、肺动脉楔压调整输液速度:正常情况下,以 7 mL·kg⁻¹·h⁻¹ 速度补充乳酸林格液;当 MAP<70 mm Hg

* 基金项目:军队十一五课题资助项目(08Z024)。 作者简介:周顺刚(1976-),主治医师,硕士,主要从事创伤休克输血输液方面的研究。

△ 通讯作者, E-mail: chenfangx998@sina.com。

时,以 10 mL · kg⁻¹ · h⁻¹ 速度进行补充;但当肺动脉楔压大于 18 mm Hg 时,补液速度恢复至 7 mL · kg⁻¹ · h⁻¹。

1.3 动物分组及内毒素血症犬模型的建立 按 Tobor 等^[4] 建立犬内毒素血症模型的方法给药,LPS 以 2 mg/kg 输注,并将其用 100 mL 生理盐水稀释,用微量输液泵经中心静脉 30 min 内输入完毕。实验犬采用随机数字表法分为内毒素组(L 组)、假 LCAP 组(S 组)及 LCAP 处理组(T 组),每组 10 只。L 组只行 LPS 输注,不行 LCAP;T 组在 LPS 输注后 12~14 h 行 LCAP(根据预实验结果,LPS 后 12 h 白细胞已升至基础水平,中性粒细胞比例高于基础水平);S 组在 LPS 输注后 12~14 h 行假 LCAP(将去除的终产物回输入体内)。连续观察动物外周白血细胞及血气分析结果的变化。

1.4 LCAP 步骤 选择单核细胞分离程序进行 LCAP。将受试动物的性别,体质量,身长,LCAP 前血细胞比容、白细胞计数等指标输入血细胞分离机,由仪器自动计算 LCAP 参数单次循环血量、循环次数、白细胞膜收集量、预计处理的总血量及终产物体积。经左右股静脉置管分别接入血细胞分离机的进血端和出血管,体外循环血量 150 mL(占犬血量约 10%),枸橼酸钠与血液的比例为 1:9。S、T 组体外循环血量分别为(76±23)、(78±21)mL/kg($P>0.05$),S、T、L 组枸橼酸钠用量分别为(8.3±1.6)、(8.0±1.3)、(8.1±1.4)mL/kg($P>0.05$),T 组终产物体积为(7.2±0.9)mL/kg,白细胞计数为(7.16±1.24)×10¹⁰/L。

1.5 检测指标 分别于注射 LPS 后 12、36 h 抽取外周血,立即 4℃下 3 000 r/min 离心 10 min,上清-80℃冻存待测。肺泡灌洗液中中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase,NE),血浆 TF、TFPI 水平的检测采用 ELISA 法,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,组间的两两多重比较采用 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血浆 NE 水平 T 组血浆中 NE 水平在 36 h 明显低于 L 组及 S 组($P<0.05$),L 组与 S 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 NE 在各组血浆中水平($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	n	12 h	36 h
L 组	10	408.160±50.245	646.208±51.064 ^a
S 组	10	392.414±41.724	656.697±41.124 ^a
T 组	10	369.911±39.305	618.677±32.171

^a: $P<0.05$,与 T 组比较。

2.2 各组血浆 TF 水平 T 组血浆中 TF 水平在 36 h 明显低于 L 组及 S 组($P<0.05$),L 组与 S 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 TF 在各组血浆中水平($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	n	12 h	36 h
L 组	10	46.81±7.17	145.53±9.97 ^a
S 组	10	44.73±5.00	145.87±12.51 ^a
T 组	10	43.92±5.60	135.52±6.76

^a: $P<0.05$,与 T 组比较。

2.3 各组血浆 TFPI 水平比较 T 组血浆中 TFPI 水平在 36 h 明显高于 L 组及 S 组($P<0.05$),L 组与 S 组比较差异无统

计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 TFPI 在各组血浆中水平($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	n	12 h	36 h
L 组	10	33.84±8.61	35.65±8.02 ^a
S 组	10	35.40±7.60	35.73±8.01 ^a
T 组	10	33.36±5.01	43.64±6.08 ^a

^a: $P<0.05$,与 T 组比较。

2.4 各组在 36 h 的 TF/TFPI 的比值 L 组为 4.08,S 组为 4.09,T 组为 3.11;T 组分别与 S 组和 L 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

炎症与凝血是一个相互作用的过程,炎症可加重凝血功能紊乱^[5-6]。其改变机制包括:脓毒症时释放炎症递质、TF 等启动外源性凝血途径、受损内皮细胞活化加重炎症与高凝状态;抗凝血酶、活化蛋白 C 等抗凝物受损^[7];纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)致纤溶受抑等。纤溶与凝血失衡,导致凝血酶生成及纤维蛋白沉积增多,最终导致弥散性血管内凝血(DIC)和器官功能不全发生^[8]。并且,凝血功能的紊乱,也加重炎症。凝血级联反应中多种蛋白酶(如 Xa 和凝血酶、TF-VIIa 复合物等)均能通过活化蛋白 C 耦联的蛋白酶活化受体(PAR),而激活丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)、蛋白激酶 C(PKC)和核因子- κ B(NF- κ B)信号通路使多种炎症因子表达上调,导致炎症加重^[9-10]。TF/VIIa 因子复合物能使促炎介质激活,有体内研究证明,给健康志愿者输注重组 VIIa 因子可提高血浆白细胞介素(IL)-6 和 IL-8 的水平^[11]。体外实验研究表明,PAI-1 通过抑制 IL-8/硫酸肝素/多配体聚糖从内皮细胞上脱落,使内皮细胞上 IL-8 引起 PMN 黏附到内皮细胞上并迁移至炎症部位。有体外研究表明,将 PAI-1 加到内毒素诱导的中性粒细胞中,可通过 Jun 氨基末端激酶(JNK)途径提高 NF- κ B 的核转位,使促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 的产生增多促进炎症发展^[12]。活化蛋白 C 也有抗炎作用,活化蛋白 C 可通过抑制单核细胞上的活化蛋白-1(AP-1)和 NF- κ B 的活性而抑制 TNF- α 的产生,发挥抗炎作用^[13]。通过内毒素诱导的人肺部炎症模型的随机双盲对照试验,证明活化蛋白 C 能明显抑制肺泡中白细胞聚集、减少中性粒细胞的体内外趋化性^[14]。另外有实验证实,凝血酶通过与细胞膜上的 PAR-1、3 及 4 结合,也可激活细胞参与炎症反应。

大量基础实验及临床研究表明,严重创伤、感染等引起的脓毒症,多数存在低体温、酸中毒及凝血功能障碍等情况,被称为死亡三联征。其中凝血功能异常是导致脓症患者死亡的主要原因之一,而脓毒症是如何引起凝血功能异常的目前研究还较少。严重感染存在白细胞特别是中性粒细胞的升高,而活化的中性粒细胞可释放大量的 NE,本实验也检测到脓毒症犬血浆中有大量的 NE,通过部分 LCAP 后,降低了 NE 的水平;同时也发现脓毒症犬也存在凝血功能异常,主要表现为 TF 及 TFPI 升高,通过部分 LCAP 后,TF 有所降低,TFPI 有所升高,且差异有统计学意义($P<0.05$)。这可能是活化的中性粒细胞本身释放 TF 及对血管内皮细胞损伤后造成大量的 TF 入血所致,使血浆中 TF 水平升高,从而导致凝血功能增强,形成血栓^[15];本次研究显示脓毒症犬存在 TFPI 降低,与 Tang 等^[16]对脓毒症犬的 TFPI 研究一致。这可能为活化的中性粒细胞释放的 NE 对 TFPI 有降解作用,使得 TFPI 降低,造成 TF/TFPI 值升高,导致凝血功能紊乱。本实验通过 LCAP 降低脓毒症犬的中性粒细胞水平,从而降低血浆中的 TF 水

平,升高血浆中的 TFPI 水平,降低 TF/TFPI 值,从而改善脓毒症犬的凝血功能。这也可能是降低脓毒症犬的病死率的另一重要原因,但其具体机制还需进一步研究。

严重脓毒症患者,特别是发展到急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征的患者,目前仍无特殊有效治疗的方法,现主要通过控制感染及各种支持治疗来维持生命。本实验表明,脓毒症犬通过部分 LCAP 后,可降低血浆中白细胞特别是中性粒细胞水平,降低 NE 的水平,从而减轻脓毒症犬的毒血症症状,也改善了凝血、纤溶功能,降低病死率,为严重脓毒症患者的治疗提供了一个新治疗策略,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hashimoto S, Okayama Y, Shime N, et al. Neutrophil elastase activity in acute lung injury and respiratory distress syndrome[J]. *Respirology*, 2008, 13(4): 581-584.
- [2] Abraham E. Neutrophils and acute lung injury[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4 Suppl): 195-199.
- [3] 周顺刚,贺志高,黄显凯,等. 白细胞去除对内毒素血症犬凝血功能及肺损伤的影响[J]. *中华创伤杂志*, 2011, 27(3): 264-269.
- [4] Tabor OR, Kiel OP, Jacobs RF. Receptor-mediated ingestion responses by lung macrophages from a canine model of ARDS[J]. *Leukoc Biol*, 1987, 41(6): 539-543.
- [5] O'Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation[J]. *Top Companion Anim Med*, 2012, 27(2): 46-52.
- [6] Petros S, Kliem P, Siegemund T, et al. Thrombin Generation in severe sepsis[J]. *Thromb Res*, 2012, 129(6): 797-800.
- [7] Ishikura H, Nishida T, Murai A, et al. New diagnostic strategy for sepsis-induced disseminated intravascular coagulation; a prospective single-center observational study[J]. *Crit Care*, 2014, 18(1): R19.
- [8] Key NS, Ely EW. Coagulation inhibition for sepsis[J].

Curr Opin Hematol, 2002, 9(5): 416-421.

- [9] Levi M, van der Poll T, Büller HR[J]. Bidirectional relation between inflammation and coagulation[J]. *Circulation*, 2004, 109(22): 2698-2704.
- [10] Glunz PW, Zhang X, Zou Y, et al. Nonbenzamidinium acyl-sulfonamide tissue factor-factor VIIa inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(18): 5244-5248.
- [11] Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor-and factor X dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5255-5260.
- [12] Kwak SH, Wang XQ, He Q, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 potentiates LPS-induced neutrophil activation through a JNK-mediated pathway[J]. *Thromb Haemost*, 2006, 95(5): 829-835.
- [13] Yuksei M, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes[J]. *Thromb Haemost*, 2002, 88(2): 267-273.
- [14] Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, et al. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis[J]. *Blood*, 2004, 104(13): 3878-3885.
- [15] Maugeri N, Brambilla M, Camera M, et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and Express functional tissue factor upon stimulation[J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(6): 1323-1330.
- [16] 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.

(收稿日期: 2014-05-27 修回日期: 2014-07-17)

(上接第 3759 页)

- quantification of in vivo spectra in the presence of propylene glycol[J]. *Magn Reson Med*, 2008, 59(3): 631-635.
- [9] 陈双庆,王培军,滕皋军,等. APP/PS1 转基因阿尔茨海默病小鼠的 MR 波谱定量分析[J]. *中华放射学杂志*, 2010, 44(6): 657-662.
 - [10] Woo CW, Lee BS, Kim ST, et al. Correlation between lactate and neuronal cell damage in the rat brain after focal ischemia; An in vivo 1H magnetic resonance spectroscopic (1H-MRS) study[J]. *Acta radiol*, 2010, 51(3): 344-350.
 - [11] Filibian M, Frasca A, Maggioni D, et al. In vivo imaging of glia activation using 1H-magnetic resonance spectroscopy to detect putative biomarkers of tissue epileptogenicity[J]. *Epilepsia*, 2012, 53(11): 1907-1916.
 - [12] Dogan M, Turtay MG, Oguzturk H, et al. Effects of electromagnetic radiation produced by 3G Mobile phones on rat brains; magnetic resonance spectroscopy, biochemical, and histopathological evaluation[J]. *Hum Exp Toxicol*,

2012, 31(6): 557-564.

- [13] Leib J, Braun J, Schilling A, et al. In vivo 1H magnetic resonance spectroscopy of rat brain after valproate administration[J]. *Neuroradiology*, 2004, 46(5): 363-367.
- [14] Ma Z, Wang SJ, Li CF, et al. Increased metabolite concentration in migraine rat model by proton MRS spectroscopy in vivo and ex vivo[J]. *Neurol Sci*, 2008, 29(5): 337-342.
- [15] Arnold DL, de Stefano N, Matthews PM, et al. N-acetylaspartate: usefulness as an indicator of viable neuronal tissue[J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(6): 823-825.
- [16] 赵光明,陈克敏,柴维敏,等. 大鼠三叉神经慢性疼痛模型丘脑 1H-MRS 分析[J]. *放射学实践*, 2008, 23(12): 1294-1297.
- [17] Zimmerman RA, Wang Z. Proton magnetic resonance spectroscopy[J]. *Crit Rev Neurosurg*, 1999, 9(3): 161-166.

(收稿日期: 2014-06-19 修回日期: 2014-07-22)