

枯否细胞通过组织因子对大鼠急性胰腺炎凝血系统变化的影响

幸定培¹, 龚建平¹, 冯虎翼², 吴念², 吴伟¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010; 2. 重庆市第五人民医院肝胆外科, 重庆 400062)

【摘要】目的:观察大鼠急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)组织因子(tissue factor, TF)及凝血系统的变化,探讨枯否细胞(kupfer cells, KCs)通过组织因子对大鼠 AP 凝血系统的作用。**方法:**108 只 SD 大鼠完全随机分为假手术(sham operation, SO)组、轻症胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)组、重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)组、SO+氯化钆(GdCl₃)组、MAP+GdCl₃组、SAP+GdCl₃组。GdCl₃预处理组在诱发 AP 模型前 24 h 予尾静脉注射 GdCl₃(10 mg/kg, 0.1 ml),分别用 1.5%和 5%的牛黄胆酸钠胰胆管逆行注射诱导 MAP 和 SAP 模型。建模后或假手术组分别于术后 6、12、24 h 处死大鼠,检测其血清中淀粉酶及凝血项目的变化;ELISA 法检测血清中 TF 的含量;分离并培养 KCs,采用 Western blot 法检测其 TF 的蛋白含量;免疫组化检测肝脏中 TF 蛋白的表达;HE 染色检测胰腺组织病理损伤情况。**结果:**MAP 和 SAP 组大鼠血清中淀粉酶含量明显高于 SO 组($P<0.01$),与 MAP+GdCl₃组、SAP+GdCl₃组各相应时间点比较无明显差异。同时时间点 MAP 组和 SAP 组较 SO 组血清中 TF 含量明显升高,MAP+GdCl₃组和 SAP+GdCl₃组较 MAP 组和 SAP 组明显降低($P<0.05$)。MAP 和 SAP 组大鼠肝脏中 TF 蛋白表达较 SO 组表达明显增加。MAP+GdCl₃和 SAP+GdCl₃组 KCs 中 TF 蛋白含量较 MAP 组和 SAP 组明显降低($P<0.05$)。SAP 组较 MAP 和 SO 组大鼠血清凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、纤维蛋白原浓度(fibrinogen, FIB)明显升高,SAP+GdCl₃组较 SAP 组明显降低($P<0.05$)。大鼠胰腺病理切片显示,MAP 组胰腺间质水肿,SAP 组胰腺呈凝固性坏死,伴有大量炎症细胞浸润,MAP+GdCl₃和 SAP+GdCl₃组分别较 MAP 和 SAP 组病理损伤明显减轻。**结论:**AP 时 KCs 中 TF 表达明显增加,并能导致凝血象的改变,抑制 KCs 功能可有效降低 AP 时 TF 的表达,减少凝血象的改变,从一定程度上可降低 AP 的发生和发展。

【关键词】枯否细胞;组织因子;急性胰腺炎;凝血象**【中图分类号】**R657.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-07

Effects of Kupffer cells on coagulation function of rats with acute pancreatitis through tissue factor

Xing Dingpei¹, Gong Jianping¹, Feng Huyi², Wu Nian², Wu Wei¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, The Fifth People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To observe the changes of tissue factor(TF) and coagulation function in rats with acute pancreatitis(AP) and to explore the role of Kupffer cells(KCs) in cruor function in AP rats via TF. **Methods:** Totally 108 SD rats are randomly divided into 6 groups including sham operation(SO) group, mild acute pancreatitis(MAP) group, severe acute pancreatitis(SAP) group, SO+gadolinium chloride(GdCl₃) group, MAP+GdCl₃ group, SAP+GdCl₃ group. Rats in GdCl₃ pretreatment group were injected with GdCl₃(10 mg/kg, 0.1 ml) through the vena caudalis at 24 h before the establishment of AP model. Rats were retrograde infected with 1.5% or 5% of sodium taurocholate through bile duct to establish MAP model and SAP model. The rats were killed at 6, 12, 24 h after AP treatment or sham operation. Changes in serum amylase and coagulation makers were detected. The content of TF in serum was measured by ELISA. KCs was isolated and cultured, and then the expression of TF protein was detected by Western blot. The TF expression in liver tissues was measured by immunohistochemistry. The pathological damage of the pancreatic tissue was detected by HE staining. **Results:** The content of serum amylase was significantly higher in MAP and SAP group than in SO group($P<0.01$), while

作者介绍: 幸定培, email: 896989475@qq.com,

研究方向: 肝胆外科学。

通信作者: 龚建平, Email: gongjianping11@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(编号: 81301618)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150415.2102.001.html>

(2014-10-30)

there was no significant difference between MAP group, SAP group and MAP+GdCl₃ group, SAP+GdCl₃ group. The contents of TF markedly increased in MAP and SAP groups compared with those in SO group, while distinctively decreased compared with those in MAP+GdCl₃ and SAP+GdCl₃ group($P<0.05$). The TF protein expressions in the livers of rats in MAP and SAP groups

distinctively increased compared with those in SO group. TF protein contents of KCs were obviously lower in MAP+GdCl₃ and SAP+GdCl₃ groups than in MAP and SAP groups ($P<0.05$). Plasma concentrations of the prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and fibrinogen (FIB) in SAP group obviously increased compared with those in MAP groups and SO groups while markedly decreased in SAP+GdCl₃ group compared with those in SAP group ($P<0.05$). The pathological section of rat pancreas showed that the pancreatic interstitial of MAP group was oedematous while the pathological damage of MAP+GdCl₃ group was alleviated compared with that of MAP group. Pancreas of SAP group was in coagulation necrosis with a large number of inflammatory cells while the pathological damage of SAP+GdCl₃ group was obviously alleviated compared with that of SAP group. **Conclusion**: Significant increases of TF expression of KCs leading to the change of coagulation makers after the onset of AP. TF expression and the coagulation can be effectively reduced by inhibiting KCs, which can reduce the occurrence and development of AP to some extent.

【Key words】Kupffer cells; tissue factor; acute pancreatitis; blood coagulation function

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是一种临床常见严重的疾病, 尽管在过去的二十多年里对其研究取得了重大进步, 但其发病机制复杂, 至今尚未完全清楚^[1-3]。重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是以胰腺弥漫性出血和组织坏死为特征的危重急腹症, 死亡率高达 20%~30%。早期预测和正确评估急性胰腺炎的严重程度, 避免轻症急性胰腺炎 (mild acute pancreatitis, MAP) 向 SAP 的转化, 在临床治疗中尤为重要。近年来研究发现微循环障碍在 AP 发生、发展的过程中起着重要作用, 胰腺微循环障碍作为一种持续的损伤机制贯穿于 AP 发展的整个过程, 是 MAP 向 SAP 转化的重要因素, 是产生多器官功能衰竭甚至死亡的主要机制。AP 早期即伴发机体凝血系统的异常, 而积极地纠正和改善微循环可以明显减轻 AP 的病变程度、改善预后^[4]。

组织因子 (tissue factor, TF) 是一个分子量为 47 kD 的跨膜糖蛋白, 与活化的凝血因子 VII (F VIIa) 结合后, 特异地催化凝血因子 X 成为活化的凝血因子 X (F Xa), 启动和延续外源性凝血途径。近期通过研究一些易产生高凝状态的疾病, 发现循环中组织因子也存在于在内源性及外源性凝血途径中, 说明 TF 从血栓形成的起始到发展阶段都发挥非常重要的作用^[5-6], TF 作为凝血过程关键启动因子激活凝血酶原的一系列反应, 但是目前有关 TF 确切的生成及作用机制并不完全清楚。TF 作为凝血过程关键启动因子激活凝血酶原的一系列反应, 如果下调 TF 的表达可以抑制凝血过程, 从一定程度上可降低 AP 的发生和发展。本文旨在通过构建 GdCl₃ 阻断大鼠枯否细胞 (kupffer cells, KCs) 功能的 AP 模型, 探讨 KCs 通过组织因子对大鼠急性胰腺炎凝血系统

的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶均购于南美 Hyclone 公司, 牛磺胆酸钠、氯化钆、IV 型胶原酶购于美国 sigma 公司, 抗 TF 抗体购于 abcam 公司, 大鼠血清 TF-ELISA 试剂盒购于 USCNK 公司。

1.2 实验动物分组模型建立及标本采集

健康成年的 SD 大鼠 108 只, 体重 250~300 g, 清洁级, 购自重庆医科大学实验动物中心, 实验中对动物符合动物伦理学标准。采用完全随机法分为假手术组 (sham operation, SO)、MAP、SAP、SO+GdCl₃、MAP+GdCl₃、SAP+GdCl₃, 每组 18 只。大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水, 造模前 24 h 干预组经尾静脉注射 GdCl₃ (0.1 mg/kg)。4% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 常规备皮、消毒、铺巾, 取上腹正中切口进入腹腔, 顺胆管找到十二指肠乳头开口处, 游离 0.5 cm 左右下端胆总管, 以头皮静脉针在胆胰管开口处逆行穿刺十二指肠前壁, 通过十二指肠乳头插入胆胰管远端约 0.5 cm, 分别在近肝门及胆胰管开口处将胆管两端钳闭, 以 0.2 ml/min 速度分别注入 1.5%、5% 牛磺胆酸钠 (0.1 ml/100 g) 建立 MAP、SAP 模型, 注射完毕后保持 5 min 拔出穿刺针, 去除动脉夹, 压迫穿刺处, 见无胆漏, 胆管下端及胰管充血标志建模成功, 两层关腹。假手术组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次。每组造模后分别于 6、12、24 h 经腹主动脉取血后各处死大鼠 6 只, 所得血液经 3 000 r/min 离心 8 min, 取上清, 检测血清中淀粉酶及凝血象的变化。取部分肝脏、胰腺组织 4% 多聚甲醛固定作 H-E 染色及免疫组化。另取部分肝脏组织按下述方法分离出肝脏 KCs。

1.3 KCs 分离培养及鉴定, Western blot 检测其 TF 蛋白含量

按参考文献^[7]进行 KCs 分离, PBS 缓冲液原位肝脏门静脉灌注后, 取肝脏入培养皿中, 去除多余脂肪及纤维组织, PBS 冲洗 2、3 次。将肝脏分离成细小碎片, 用 1 mg/ml IV 型胶

原酶 30 ml 在 37 ℃ 恒温箱中消化 30 min, 期间轻轻吹打 2、3 次。经 200 目过滤网取过滤液, 经 4 步离心法分离出 KCs。用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基进行培养。吞墨试验进行 KCs 鉴定。用 Western blot 方法检测 KCs 中 TF 蛋白含量, 按照试剂盒说明操作, 采用 Quantity one 4.0 图像分析软件扫描分析。

1.4 ELISA 大鼠血清 TF 检测

采用大鼠 TF-ELISA 试剂盒均按说明书进行。

1.5 组织学和免疫组织化学检测

取大鼠胰腺组织, 4% 多聚甲醛固定, 经脱水和石蜡包埋后切片用 HE 染色, 光镜下观察胰腺组织损伤程度。取大鼠肝脏组织 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱蜡、水化、干燥, 加入 1:100 的大鼠抗 TF 抗体, 并用 ABC 试剂盒检查, DAB 染色后用苏木精衬染, 光镜下观察大鼠急性胰腺炎肝脏 TF 表达情况。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计软件分析, 所得数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 满足方差齐性时, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 法检验; 不满足方差齐性时, 组间比较用秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 血清淀粉酶

大鼠在急性胰腺炎时, 血清淀粉酶明显升高。大鼠建模 12 h 时间点, 6 组血清淀粉酶比较, 差异有统计学意义 ($F=434.7, P<0.01$); 进一步两两比较, MAP 组较 SO 组明显升高 ($P<0.01$), SAP 组较 SO 组明显升高 ($P<0.01$), 但 GdCl₃+SAP 组与 SAP 组相比无统计学差异 ($P=0.24$) (表 1)。

表 1 术后每个时间点在各组中大鼠血清淀粉酶比较
(IU/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of rat serum levels of amylase in six groups at 6, 12, 24 h after the operation (IU/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
SO	1 101 $\pm$ 52	1 028 $\pm$ 53	1 018 $\pm$ 41
MAP	2 186 $\pm$ 241	2 842 $\pm$ 310	3 112 $\pm$ 325
SAP	3 781 $\pm$ 376	5 973 $\pm$ 452	6 832 $\pm$ 582
SO+GdCl ₃	1 023 $\pm$ 51	1 051 $\pm$ 56	1 107 $\pm$ 45
MAP+GdCl ₃	2 268 $\pm$ 227	2 749 $\pm$ 352	3 031 $\pm$ 341
SAP+GdCl ₃	3 923 $\pm$ 341	5 868 $\pm$ 483	6 736 $\pm$ 531
<i>F</i> 值	391.21	434.68	571.98
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 胰腺组织病理切片光镜检测

大鼠假手术及 MAP、SAP 模型建立后, 分别于 6、12、24 h 处死大鼠, 取胰腺组织做 HE 染色。假手术组成正常胰腺结构, 腺泡细胞排列紧密, 无炎症细胞浸润 (图 1A)。SO+GdCl₃ 组胰腺 (图 1B) 与正常胰腺无差异。MAP 可见胰腺间质水肿,

腺泡细胞排列疏松, 其间少至中量炎症细胞浸润, 整体结构较为完整 (图 1C), MAP+GdCl₃ 组 (图 1D) 胰腺较 MAP 组病理损伤有所减轻。SAP 模型组胰腺可见凝固性坏死, 结构模糊, 其间可见大量炎性细胞浸润, 腺泡破裂轮廓模糊, 腺泡细胞核固缩、坏死, 呈现典型的重症胰腺炎病理改变 (图 1E), SAP+GdCl₃ 组 (图 1F) 胰腺较 SAP 组病理损伤明显减轻。

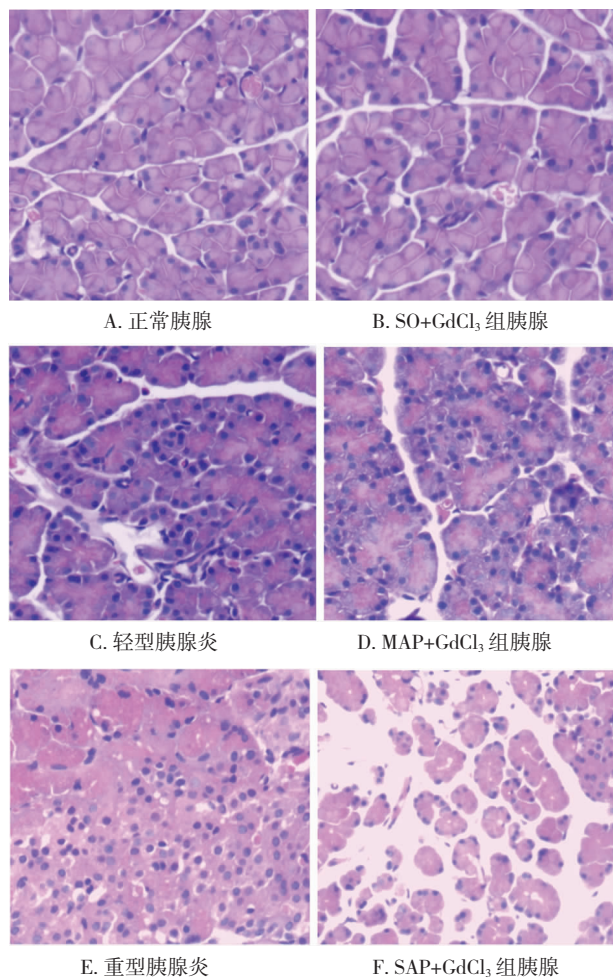


图 1 胰腺组织病理切片光镜检测 (200 $\times$)

Fig.1 Pancreatic tissue pathological light detection (200 $\times$)

2.3 血清 TF

测得术后不同时间点各组大鼠血清中 TF 数值可见, 急性胰腺炎时大鼠血清中 TF 明显升高, GdCl₃ 处理后血清中 TF 明显降低。大鼠建模 12 h 时间点, 6 组血清 TF 比较, 差异有统计学意义 ($F=56.60, P<0.01$), 进一步两两比较, MAP 组大鼠血清中 TF 较 SO 组明显升高 ($P=0.02$), SAP 组较 SO 组明显升高 ($P<0.01$), 而 MAP+GdCl₃ 较 MAP 组明显降低 ($P=0.03$), SAP+GdCl₃ 组较 SAP 组明显降低 ($P<0.01$)。

2.4 免疫组化检测

大鼠急性胰腺炎 SO、MAP、SAP 模型 12 h 后肝脏组织 TF 蛋白的表达 (图 2)。可见 SO 组大鼠肝脏组织 TF 蛋白表达成弱阳性, SAP 组 TF 蛋白较 SO 组及 MAP 组明显增强。

表 2 术后每个时间点在各组中大鼠血清 TF 比较
(ng/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of rat serum levels of TF in six groups
at 6, 12, 24 h after the operation (ng/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
SO	8.235 ± 1.105	8.153 ± 1.083	8.239 ± 1.120
MAP	9.542 ± 1.214	10.453 ± 0.225	11.863 ± 1.316
SAP	13.143 ± 1.537	14.472 ± 1.623	15.025 ± 1.805
SO+GdCl ₃	7.213 ± 1.088	7.153 ± 1.096	7.165 ± 1.103
MAP+GdCl ₃	8.235 ± 1.132	8.851 ± 1.211	9.104 ± 1.215
SAP+GdCl ₃	11.162 ± 1.316	12.018 ± 1.343	12.924 ± 1.386
<i>F</i> 值	29.70	56.60	70.53
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

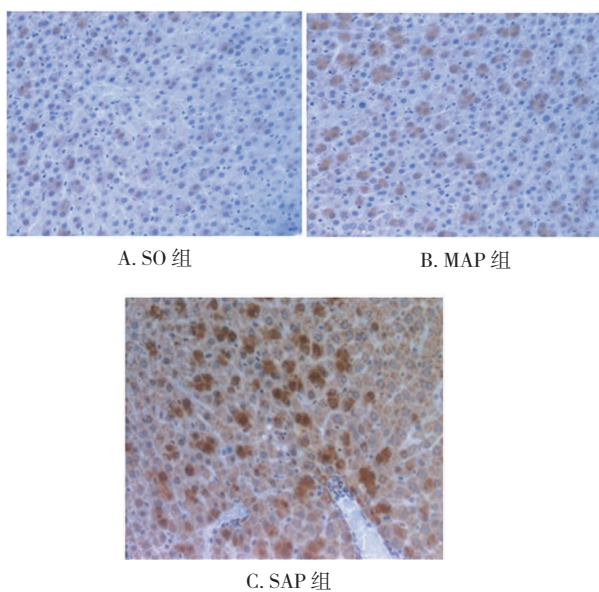


图 2 TF 在各组大鼠肝组织中的表达(200×)

Fig.2 Immunohistochemical expression of TF in the rat liver
tissue in each group(200×)

2.5 KCs 吞墨试验

在细胞培养液中加入 40 μ l 灭菌的碳素墨水后摇匀,放入培养箱中继续培养 2 h 后观察细胞吞噬墨汁的情况,镜下见 KCs 伸出伪足明显,细胞胞浆内吞噬了大量墨汁颗粒,活力较好(图 3)。

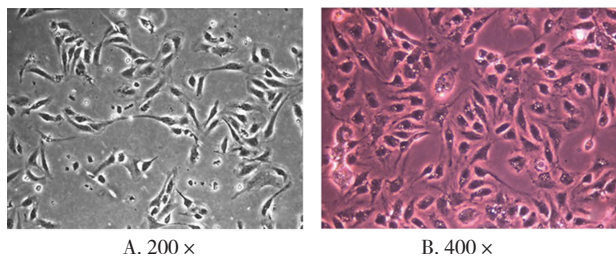


图 3 KCs 吞墨试验

Fig.3 Capability of KCs assessed by phagocytosis assay of ink
phagocytosing

2.6 Western blot 检测 KCs 中 TF 蛋白含量

大鼠建模 12 h 后,取部分肝脏组织,分离培养 KCs, Western blot 检测 KCs 中 TF 蛋白含量;各条带灰度值与 Tublin 灰度值的比值作为相对蛋白含量水平,以 $\bar{x} \pm s$ 表示(见图 4)。6 组 KCs 中 TF 蛋白含量相比较,差异有统计学意义($F=304.82, P<0.05$);进一步两两比较,MAP 组较 SO 组 TF 蛋白表达量明显升高($P=0.03$),SAP 组较 SO 组 TF 蛋白表达量明显升高($P=0.02$),Gdcl3+MAP 组较 MAP 组 TF 蛋白表达量明显减少($P=0.01$),Gdcl3+SAP 组较 SAP 组明显降低($P=0.01$)。

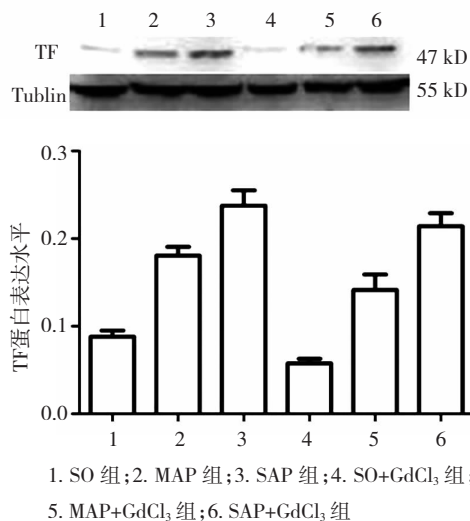


图 4 Western blot 检测各组中 TF 的蛋白表达水平

Fig.4 Protein expression of TF in each group detected
by Western blot

2.7 大鼠凝血象检测检测结果

测得术后每个时间点各组大鼠血清中 PT 数值可见,大鼠 SAP 时血清中 PT 明显延长,经 GdCl₃ 处理的 SAP 大鼠血清 PT 明显缩短。术后 12 h 时间点,6 组血清中 PT 相比较差异有统计学意义($F=126.00, P<0.05$),进一步两两比较,MAP 组大鼠血清中 PT 较 SO 组无明显变化($P=0.39$);SAP 组较 SO 组明显升高($P<0.01$),SAP+GdCl₃ 组较 SAP 组明显降低($P=0.01$)(表 3)。

表 3 术后每个时间点在各组中大鼠血清 PT 比较
(s, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of rat serum levels of PT in six groups
at 6, 12, 24 h after the operation (s, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
SO	13.25 ± 0.58	13.62 ± 0.61	13.45 ± 0.57
MAP	13.76 ± 0.64	13.42 ± 0.57	13.37 ± 0.59
SAP	18.86 ± 0.75	22.05 ± 0.94	25.53 ± 1.16
SO+GdCl ₃	12.98 ± 0.59	13.09 ± 0.65	13.35 ± 0.56
MAP+GdCl ₃	13.56 ± 0.49	13.49 ± 0.53	13.64 ± 0.63
SAP+GdCl ₃	15.67 ± 0.64	18.91 ± 0.78	20.32 ± 0.91
<i>F</i> 值	52.30	126.00	248.66
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

测得术后每个时间点各组大鼠血清中 APTT 数值可见,大鼠 SAP 时血清中 APTT 明显延长,经 GdCl_3 处理的 SAP 大鼠血清 APTT 明显缩短。术后 12 h 时间点,6 组血清中 APTT 相比较差异有统计学意义 ($F=126.42, P<0.05$),进一步两两比较,MAP 组大鼠血清中 APTT 较 SO 组无明显变化 ($P=0.90$);SAP 组较 SO 组明显升高 ($P<0.01$),SAP+ GdCl_3 组较 SAP 组明显降低 ($P=0.01$) (表 4)。

表 4 术后每个时间点在各组中大鼠血清 APTT 比较

(s, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of rat serum levels of APTT in six groups at 6, 12, 24 h after the operation (s, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
SO	18.31 $\pm$ 2.16	18.13 $\pm$ 2.23	18.27 $\pm$ 2.18
MAP	18.28 $\pm$ 2.09	18.26 $\pm$ 2.20	18.19 $\pm$ 2.22
SAP	24.25 $\pm$ 2.32	36.13 $\pm$ 2.85	50.18 $\pm$ 3.16
SO+ GdCl_3	18.24 $\pm$ 2.06	18.29 $\pm$ 2.13	18.30 $\pm$ 2.15
MAP+ GdCl_3	18.26 $\pm$ 2.13	18.24 $\pm$ 2.16	18.19 $\pm$ 2.23
SAP+ GdCl_3	20.13 $\pm$ 3.15	31.86 $\pm$ 2.53	43.84 $\pm$ 2.98
F 值	5.61	126.42	207.53
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

测得术后每个时间点各组大鼠血清中 FIB 数值可见,大鼠 SAP 时血清中 FIB 明显升高,经 GdCl_3 处理的 SAP 大鼠血清 FIB 明显降低。术后 12 h 时间点,6 组血清中 FIB 相比较差异有统计学意义 ($F=39.05, P<0.05$),进一步两两比较,MAP 组大鼠血清中 FIB 较 SO 组无明显变化 ($P=0.13$);SAP 组较 SO 组明显升高 ($P<0.01$),SAP+ GdCl_3 组较 SAP 组明显降低 ($P=0.01$) (表 5)。

表 5 术后每个时间点在各组中大鼠血清 FIB 比较

(g/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.5 Comparison of rat serum levels of FIB in six groups at 6, 12, 24 h after the operation (g/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
SO	2.18 $\pm$ 0.23	2.23 $\pm$ 0.25	2.21 $\pm$ 0.22
MAP	2.27 $\pm$ 0.24	2.31 $\pm$ 0.25	2.14 $\pm$ 0.28
SAP	2.96 $\pm$ 0.26	3.56 $\pm$ 0.28	4.27 $\pm$ 0.31
SO+ GdCl_3	2.38 $\pm$ 0.26	2.15 $\pm$ 0.20	2.23 $\pm$ 0.19
MAP+ GdCl_3	2.17 $\pm$ 0.21	2.40 $\pm$ 0.26	2.41 $\pm$ 0.22
SAP+ GdCl_3	2.54 $\pm$ 0.23	3.01 $\pm$ 0.27	3.74 $\pm$ 0.38
F 值	10.48	39.05	51.88
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

AP 是一种常见的临床疾病,其发病迅速,大约 10%~15% 的患者会发展成 SAP,其中 10%~30% 可能死于 SAP 相关并发症。尽管在 AP 的诊断和管理在不断完善,但其死亡率却没有显著下降^[8]。AP 的发

病机制至今仍不十分清楚,目前主要有“自身消化学说”、“微循环障碍学说”和“白细胞过度激活学说”等,其中“自身消化学说”曾经被人们广泛接受,但其也不能很好的解释 SAP 的发病过程。近年来,微循环障碍在 AP 发生和发展中的作用逐渐受到重视,其作为 AP 的始动因素和引起胰腺出血坏死等严重病变的促变因素贯穿于 AP 发展的整个过程,在胰腺持续和加剧受损害过程中起着重要作用^[9]。研究中发现,AP 患者凝血和纤溶系统在早期就出现明显变化,尤其见于 SAP 患者,并且可以应用 CloFAL 分析系统检测 AP 患者早期的凝血和纤溶系统的变化,为临床改善 AP 微循环的治疗提供早期检测^[10]。而凝血功能障碍又可以加重胰腺微循环障碍,引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)甚至出现多器官功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),从而导致 SAP 患者死亡^[11]。所以,凝血功能障碍在 SAP 病情发展的过程中具有重要意义,可见改善 SAP 患者的凝血功能,防止 SAP 患者病情的进一步恶化,值得深入研究。

研究发现凝血与炎症反应之间有着密不可分的联系。在炎症中单核/巨噬细胞、内皮细胞受内毒素刺激时,产生炎症因子的同时还表达 TF,而 TF 又是凝血反应中的重要启动因子,凝血系统被激活后反作用于炎症反应,使炎症反应进一步加重,从而形成两个系统间的“Cross talking”^[12-13]。TF 是一种跨膜糖蛋白,分子量为 47 kD,它与活化的凝血因子 VII 结合,激活凝血因子 X 成为活化的凝血因子 X,从而启动和延续外源性凝血途径。TF 主要表达于血管外组织,但近期研究发现循环中 TF 不仅存在于外源性凝血途径中,也存在于在内源性凝血途径中,说明 TF 在血栓形成的起始和发展阶段都发挥十分重要的作用^[15-16],但是目前有关 TF 生成及作用机制并未完全明确。已有研究证实,单核细胞受到内毒素刺激或者血管内皮细胞受到 TNF- α 刺激后,都能表达和释放出含有 TF 的膜微粒,并且这些膜微粒有明确的 TF 相关促凝血活性^[14-15]。并且使用高速离心去除 TF 膜微粒可明显减弱此传递过程,说明血小板源 TF 并非由血小板本身合成,而很可能是来源于单核细胞^[16-17]。单核细胞受 LPS、TNF- α 及 IL-1 等刺激后诱导 TF 高表达,将 TF 传递给血小板,形成血小板源 TF 参与病理性凝血过程。随着研究的逐渐深入,目前发现嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等多种细胞在一定的条件下均可表达 TF。在低氧诱导凝血活化的小鼠模型中,肺血管外纤维蛋白沉

积的量与局部表达 TF 的巨噬细胞的量呈正相关,而这些巨噬细胞正是来源于循环中的单核细胞,正常人和大鼠中 KCs 均表达 TF^[18],可见单核细胞可能是 TF 产生的主要来源。研究发现 KCs 在 AP 的发展中起着重要作用,在 SAP 时可出现肝脏损害等多脏器功能障碍,GdCl₃ 阻断 KCs 功能可以明显降低肝脏及胰腺的炎症损伤^[19-20]。所以推测 KCs 可能通过表达 TF 参与凝血调控,TF 作为凝血过程中关键启动因子激活凝血酶原的一系列反应,如果下调 TF 的表达可以抑制凝血过程,从一定程度上可降低 AP 的发生和发展。

本实验研究发现,MAP 组和 SAP 组中大鼠血清淀粉酶较 SO 组明显升高,然而 MAP+GdCl₃ 组与 MAP 组相比、SAP+GdCl₃ 组与 SAP 组相比无明显差别,说明抑制 KCs 功能对胰腺本身产生淀粉酶无明显影响。MAP 组和 SAP 组中大鼠血清 TF 较 SO 组明显升高,且抑制 KCs 功能后,血清中 TF 的表达量明显降低;MAP 组和 SAP 组中 KCs 内 TF 蛋白表达量明显升高,MAP+GdCl₃ 组较 MAP 组 TF 蛋白明显降低,SAP+GdCl₃ 组较 SAP 组 TF 蛋白也明显降低,说明抑制 KCs 功能可以明显降低 AP 血清中 TF 和 KCs 内 TF 蛋白量的表达。SAP 组中大鼠血清 PT、APT、TFIB 较 MAP 组和 SO 组明显升高,SAP+GdCl₃ 组较 SAP 组明显降低,而 MAP 组与 SO 组无明显变化,说明抑制 KCs 功能可以明显降低 SAP 中 PT、APTT 和 FIB;MAP 组凝血象较 SO 组无明显变化,可能是因为 MAP 病情相对较轻,机体尚可以代偿,较轻的纤溶亢进不足以引起明显低凝状态,早期凝血和纤溶功能还不能体现出明显的异常。由此认为在 AP 尤其是 SAP 的早期凝血系统就出现明显变化,而凝血功能障碍又进一步加重胰腺微循环障碍,抑制 KCs 功能可以明显降低 TF 的表达,改善 AP 早期的微循环障碍,减缓或阻止 MAP 向 SAP 转化的过程,从而减轻或延缓 AP 的发生和进展。然而 KCs 作用于 TF 的机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sah RP, Garg P, Saluja AK. Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(5): 507-515.
- [2] Batcioglu K, Gul M, Uyumlu AB, et al. Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein induced acute pancreatitis[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2009, 42(9): 776-782.
- [3] Wang GJ, Gao CF, Wei D, et al. Acute pancreatitis: etiology and common pathog-Enesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(12): 1427 - 1430.

- [4] Grauvogel J, Grauvogel TD, Gebhard MM, et al. Combined effects of chronic and acute ethanol on pancreatic injury and microcirculation[J]. *Pancreas*, 2012, 41(5): 717-723.
- [5] Chen VM. Tissue factor de-encryption, thrombus formation, and thiol-disulfide exchange[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2013, 39(1): 40-47.
- [6] Ettelaie C, Collier ME, Mei MP, et al. Enhanced binding of tissue factor-microparticles to collagen-IV and fibronectin leads to increased tissue factor activity in vitro[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(1): 61-71.
- [7] Zeng WQ, Zhang JQ, Li Y, et al. A new method to isolate and culture rat kupffer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): 82-91.
- [8] Vaz J, Akbarshahi H, Andersson R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(5): 616-630.
- [9] Barkay O, Niv E, Santo E, et al. Low-dose heparin for the prevention of post-ERCP pancreatitis: a randomized placebo-controlled trial[J]. *Surg Endosc*, 2008, 22(9): 1971-1976.
- [10] Zhu R, Wei S, Wu C, et al. Utility of clot formation and lysis assay to monitor global coagulation state of patients with severe acute pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(5): 1399-1403.
- [11] Doctor N, Philip S, Gandhi V, et al. Analysis of the delayed approach to the management of infected pancreatic necrosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(3): 366-371.
- [12] Doronin K, Flatt JW, Paolo NC, et al. Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus[J]. *Science*, 2012, 338(6108): 795-798.
- [13] van der Poll T, de Boer JD, Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2011, 24(3): 273-278.
- [14] Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, et al. Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45427.
- [15] Ettelaie C, Elkeeb AM, Maraveyas A, et al. p38 α phosphorylates serine 258 within the cytoplasmic domain of tissue factor and prevents its incorporation into cell-derived microparticles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(3): 613-621.
- [16] Woei-A-Jin FJ, De Kruif MD, Garcia RP, et al. Microparticles expressing tissue factor are concurrently released with markers of inflammation and coagulation during human endotoxemia[J]. *Thromb Haemost*, 2012, 10(6): 1185-1188.
- [17] Kleinjan A, Böing AN, Sturk A, et al. Microparticles in vascular disorders; how tissue factor-exposing vesicles contribute to pathology and physiology[J]. *Thromb Res*, 2012, 130(1): 71-73.
- [18] Thaler J, Ay C, Mackman N, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(7): 1363-1370.
- [19] Wei SD, Huang QY, Li JZ, et al. Taurine attenuates liver injury by downregulating phosphorylated p38 MAPK of Kupffer cells in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Inflammation*, 2012, 35(2): 690-791.
- [20] Chneider L, Hackert T, Longerich T, et al. Effects of gadolinium chloride and glycine on hepatic and pancreatic tissue damage in alcoholic pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2010, 39(4): 502-509.

(责任编辑:关蕴良)