

fgl2 参与重症急性胰腺炎大鼠微血栓形成

叶晓华 陈坛轲 杜 勇 黄智铭 吴金明 吴建胜

摘 要 **目的** 研究纤维蛋白原样 2 (fgl2) 凝血酶原酶在重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 大鼠胰腺微血栓形成中的作用。**方法** 48 只 SD 大鼠随机平均分为假手术 (SO) 组, 重症急性胰腺炎 (SAP) 组, 每组 24 只。SAP 组通过胰胆管逆行注射 4% 牛磺胆酸钠方法诱发。各组于术后 1、4 和 8h 分批处死大鼠 (各时点 8 只), HE 染色及 Masson 染色观察大鼠胰腺病理改变, 随机计数微血管中血栓形成的阳性血管率; 实时 (real-time) 荧光定量 PCR 法、免疫组织化学法测定 fgl2 凝血酶原酶在大鼠胰腺中的表达。**结果** 与 SO 组相比, fgl2 凝血酶原酶在 SAP 大鼠组胰腺微血管内皮高表达 ($P < 0.01$); SAP 大鼠组胰腺微血管中可见微血栓形成; SAP 大鼠组中阳性血管率显著高于 SO 组 ($P < 0.01$), 且与胰腺 fgl2 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.878, P < 0.01$)。**结论** fgl2 凝血酶原酶可能通过介导胰腺内微血栓的形成而促进重症急性胰腺炎的发生与发展。

关键词 纤维蛋白原样 2 凝血酶原酶 微血栓形成 重症急性胰腺炎

Fibrinogen-like Protein 2 Expression Contributes to Microthrombosis in Rats with Severe Acute Pancreatitis. Ye Xiaohua, Chen Tanzhou, Du Yong, Huang Zhiming, Wu Jinming, Wu Jiansheng. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the role of fibrinogen-like protein 2 (fgl2), prothrombinase in microthrombosis in rats with acute pancreatitis (SAP). **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley (SD) rats weighing 200-250g were randomly divided into two groups: SAP group ($n = 24$) and sham-operation (SO) group ($n = 24$). 4% sodium taurocholate were retrograde injected into rats' biliopancreatic ducts to induce SAP. Samples were harvested immediately at 1h, 4h, 8h time point after operations in both groups. HE and Masson staining were applied to observe the pathological changes in pancreatic tissues, and the amount of arterioles with microembolization was calculated. The expression of fgl2 prothrombinase in pancreatic tissue was examined by real-time PCR and immunohistochemistry methods. **Results** Levels of fgl2 prothrombinase expression were markedly elevated and were found significant differences in pancreatic microvascular endothelial cells in rats that developed SAP compared to those in SO group. Masson staining showed that microthrombosis in rats with SAP were significantly increased and closely correlated with fgl2 prothrombinase expression in pancreatic tissues ($r = 0.878, P < 0.01$). **Conclusion** Fgl2 prothrombinase may result in the development of SAP by mediating microthrombosis in pancreas.

Key words Fibrinogen-like protein 2; Microthrombosis; Severe acute pancreatitis

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是腹部外科常见病之一, 常可并发全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能衰竭 (MOF), 病死率极高^[1]。近年来学者研究认为急性胰腺炎的发生与胰腺微循环障碍有密切关系, 它参与了向重症急性胰腺炎演进的复杂病理生理过程^[2]。fgl2 凝血酶原酶又称纤维介素, 可直接活化凝血酶原成为凝血酶原酶, 从而迅速启动凝血过程, 并参与多种疾病的凝血局部反应^[3-5]。本实验旨在牛磺胆酸钠诱导大鼠重症急性胰腺炎模型中, 观察 fgl2 凝血酶原酶在 SAP 大鼠胰腺中的表达, 探讨其在 SAP 胰腺微血管病变中的作用及机制, 为研究微循环障碍在重症急性胰腺炎中的

作用及导致胰腺功能障碍和组织损伤的病理机制提供新的思路。

材料与方法

1. 实验材料: (1) 动物: 健康 SD 雄性大鼠, 质量 200 ~ 250g, 由温州医学院实验动物中心提供。(2) 主要试剂与仪器: 牛磺胆酸钠购自 Sigma 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; First strand cDNA synthesis kit 购自 MBI 公司; PCRmix 试剂盒购自上海达为科生物公司; 兔抗大鼠 fgl2 凝血酶原酶多克隆抗体购自北京博奥森公司; EnVision 试剂购自 Dako 公司; 实时荧光定量 PCR 仪及 7500 Sequence Detection System 为 ABI 公司产品; 显微镜为 Olympus 公司产品; 全自动生化分析仪为 Hitachi 公司产品。

2. 实验方法: (1) 模型制备及分组: 实验前禁食过夜, 自由饮水。将 48 只大鼠随机分成两组: 假手术组 (SO)、重症急性胰腺炎 (SAP) 组, 每组各 24 只。SAP 组大鼠采用 4% 的牛磺胆酸钠 1ml/kg 胰胆管逆行穿刺匀速注射制模。SO 组仅翻动

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院消化内科

通讯作者: 黄智铭, 电子邮箱: wyyhzhiming@126.com

胰腺几次即关腹。术后 1、4、8h 分批处死大鼠(各时点 8 只),留取下腔静脉血、胰腺标本待测。(2)血清淀粉酶检测:采用全自动生化分析仪检测。(3)胰腺组织病理形态学观察:胰腺组织常规脱水,石蜡包埋,切片,行 HE 染色及 Masson 染色。镜下观察胰腺病理改变。随机观察 100 根管壁外径 $\leq 100\mu\text{m}$ 的微血管,并计算阳性血管率。(4)实时定量(real-time)PCR 检测胰腺组织中 fgl2 表达:采用 Trizol 法提取总 RNA,取 4 μg 总 RNA 反转录合成第一链 cDNA,引物由上海捷瑞生物工程有 限 公 司 设 计。引 物 序 列:fgl2 上 游 引 物:5'-CCTG-GAGATTGTGCTTTCGT-3',下游引物:5'-TACCATGC-CTTCTCCAAGG-3',扩增片段长 153 bp; β -actin 上游引物:5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3',下游引物:5'-GGGGT-GTTGAAGGTCTCAAA-3',扩增片段长 153 bp。反应条件:50℃ 2min;95℃ 5min,95℃ 15s,循环 40 次。反应完成后,根据反应曲线计算 threshold cycle(Ct 值)并计算目的基因相对表达量,目的基因量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。(5)免疫组化染色:使用 Envision 法进行 fgl2 免疫组化染色。按 Envision 试剂盒说明操作。兔抗大鼠 fgl2 凝血酶原酶多克隆抗体(1:100)为一抗。EnVision 试剂(HRP-R/M)37℃ 孵育 30min,DAB 显色,苏木精复染。盐酸乙醇分化,氨水反蓝,最后脱水、透明、封片,镜检。PBS 代替一抗作为阴性对照。各切片在 200 倍光镜下随机选取 10 个视野采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定其平均吸光度值并进行半定量分析。

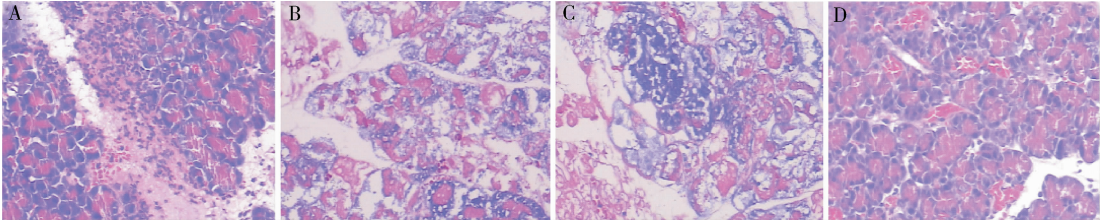


图 1 各组大鼠术后 HE 染色(×200)
A. SAP 组 1h;B. SAP 组 4h;C. SAP 组 8h;D. SO 组 8h

Masson 染色用于观察微血栓形成,光镜下显示为高亮红色区。Masson 染色显示血栓于胰腺微血管内皮,说明是由纤维蛋白形成的原位血栓。Masson 染色阳性血管率在 SAP 组中的各时点显著高于正常组($P < 0.01$)且具有增加的趋势($P < 0.01$,表 2、图 2)。

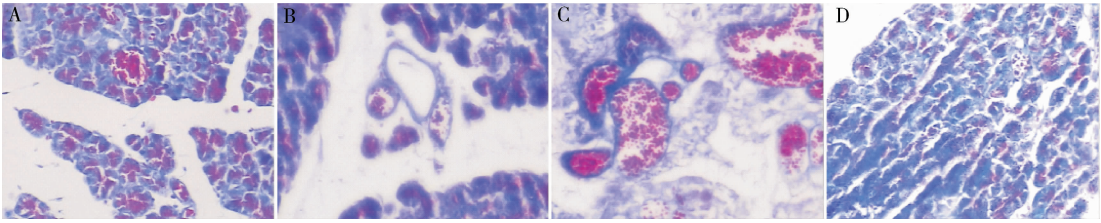


图 2 各组大鼠术后 Masson 染色(×200)
A. SAP 组 1h;B. SAP 组 4h;C. SAP 组 8h;D. SO 组 8h

3. 统计学方法:采用 SPSS 15.0 软件包进行统计学分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行正态性检验和方差齐性分析,采用单因素方差分析进行组间、组内差异性检验。两连续变量关联强度使用 Pearson 相关系数(r)表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血清淀粉酶检测结果:SAP 组血清淀粉酶较 SO 组在各时间点均显著升高(各时点 $P < 0.01$)。SO 组各时点间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 各组大鼠术后各时点血清淀粉酶值(U/L)					
组别	<i>n</i>	1h	4h	8h	
SAP	24	2881.88 $\pm$ 615.25 [#]	5162.88 $\pm$ 735.41 [#]	6955.75 $\pm$ 1134.47 [#]	
SO	24	1788.25 $\pm$ 562.73	1804.50 $\pm$ 540.51	2100.63 $\pm$ 824.37	

与 SO 组同一时点比较,[#] $P < 0.01$;SO 组各时点间比较, $P > 0.05$

2. 形态学观察结果:镜下,SO 组 1、4、8h 各时点胰腺组织形态未见异常,胰腺小叶清晰;SAP 组 1h 时胰腺间质水肿,伴少量炎细胞浸润;4h 后胰腺间质水肿,出血,炎细胞浸润显著增加;8h 时严重出血坏死,见大量中性粒细胞和单核细胞浸润(图 1)。

表 2 各组大鼠术后各时点胰腺阳性血管率				
组别	<i>n</i>	1h	4h	8h
SAP	24	0.27 $\pm$ 0.09 [#]	0.54 $\pm$ 0.19 [#]	0.80 $\pm$ 0.13 [#]
SO	24	0.086 $\pm$ 0.037	0.085 $\pm$ 0.045	0.106 $\pm$ 0.070

与 SO 组同一时点比较,[#] $P < 0.01$;SAP 组各时点比较,阳性血管率逐渐升高, $P < 0.01$;SO 组各时点间比较, $P > 0.05$

3. fg12 mRNA 及蛋白质的表达:SAP 组大鼠胰腺的 fg12 mRNA 和胰腺 fg12 蛋白质表达相比 SO 组均明显升高,且随病程延长逐渐增多(表 3)。免疫组化染

色显示,fg12 主要表达在 SAP 组大鼠胰腺微血管内皮细胞(图 3)。

表 3 各组大鼠术后各时点胰腺 fg12 mRNA 和蛋白表达量

组别	n	1h		4h		8h	
		蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
SAP	24	1.79 ± 0.46 [#]	3.91 ± 1.28 [#]	4.54 ± 0.55 [#]	9.85 ± 3.09 [#]	6.07 ± 0.94 [#]	12.87 ± 3.05 [#]
SO	24	0.81 ± 0.25	1 ± 0.67	0.87 ± 0.32	1.14 ± 0.61	1.02 ± 0.41	1.18 ± 0.46

与 SO 组同一时点比较,[#] $P < 0.01$;SAP 组各时点比较,mRNA 及蛋白表达量逐渐升高, $P < 0.01$;SO 组各时点间比较, $P > 0.05$

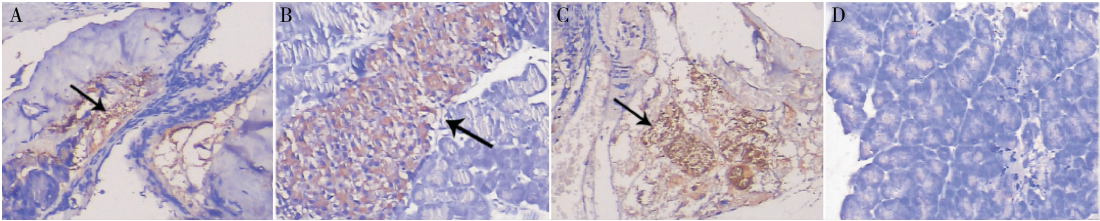


图 3 各组大鼠术后各时点 fg12 免疫组化染色(×200)

A. SAP 组 1h;B. SAP 组 4h;C. SAP 组 8h;D. SO 组 8h

4. 胰腺 fg12 表达与阳性血管率相关性分析:将 SAP 组大鼠胰腺组织 fg12 凝血酶原酶表达水平与每 100 根微血管中阳性血管率进行 *Pearson* 相关分析。结果显示 SAP 组大鼠胰腺内 fg12 凝血酶原酶表达的平均吸光度值与阳性血管率存在显著相关($r = 0.878, P < 0.01$)。

讨 论

急性胰腺炎可引起一系列免疫反应,影响病程发展及预后。在此进程中,凝血系统的功能也随之发生重大变化,其中主要有胰腺的微循环功能障碍^[2]。目前主要认为巨噬细胞、中性粒细胞和内皮细胞激活,引起促炎细胞因子和炎症介质过度释放是胰腺微循环障碍发生的主要机制^[6]。微循环障碍时的低血容量可导致血液的高凝状态。本研究结果显示 SAP 大鼠胰腺内原位微血栓形成,提示 SAP 大鼠胰腺功能障碍及组织损伤与其微循环功能障碍密切相关。fg12 凝血酶原酶的促凝途径与经典的内外源凝血途径不同,它可直接激活凝血酶原转变为有活性的凝血酶而促进凝血,同时 fg12 凝血酶原酶接受细胞因子调控,具有促凝血和炎症的双重作用,Levy 将 fg12 凝血酶原酶的促凝途径,称为“免疫凝血”^[3,7,8]。有研究报道,fg12 凝血酶原酶高表达于小鼠 MHV-3 爆发性肝炎、自发性流产、器官移植排斥反应等疾病的病理过程中^[9,10]。它可通过触发急性炎症细胞聚集,

在局部组织高表达,启动局部凝血过程,导致纤维蛋白沉积、微血栓形成、微循环障碍,最终导致脏器形态学变化和功能障碍。

本研究结果显示 SAP 大鼠胰腺本研究结果显示 SAP 大鼠胰腺中 fg12 mRNA 相比 SO 组显著升高($P < 0.01$),且随病程延长而逐渐增加($P < 0.01$)。推测在胰腺炎病程中,炎症因子协同刺激大鼠微血管内皮细胞中 fg12 凝血酶原酶基因,首先在转录水平上表达增高,再进一步增加凝血酶原酶合成,然后通过激活凝血系统导致胰腺组织微血管内血栓形成,从而使胰腺坏死发生。免疫组化结果显示 SAP 大鼠胰腺微血管内皮细胞中可见 fg12 凝血酶原酶蛋白高表达,且表达水平与微血栓阳性血管率正相关($r = 0.878, P < 0.01$)。该结果提示 fg12 凝血酶原酶可能通过介导胰腺内微血栓的形成而促进重症急性胰腺炎的发生与发展。

参考文献

1 陈丽倩,翟科,金尹,等. 急性坏死性胰腺炎胰腺组织中褪黑激素受体表达及褪黑激素干预作用[J]. 中华内科杂志,2010,49(11): 959-962

2 金太欣,张家衡,吴彪. 川芎嗪对急性胰腺炎大鼠血浆血栓素、前列环素的影响[J]. 中国普通外科杂志,2006,15(6):470-472

3 Levy GA, Liu MF, Ding JW, et al. Molecular and functional analysis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis [J]. Am J Pathology, 2000, 156(4): 1217-1224

4 Ding YP, Liu K, Wang Y, et al. Expression and significance of fg12

- prothrombinase in cardiac microvascular endothelial cells of rats with type 2 Diabetes[J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2010, 30(5): 575 - 581
- 5 Su K, Chen F, Yan WM, *et al.* Fibrinogen - like protein 2/fibroleukin prothrombinase contributes to tumor hypercoagulability via IL - 2 and IFN - γ [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(39): 5980 - 5989
- 6 林旭红, 李永渝. 急性胰腺炎发病机制及相关治疗的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(5): 1029 - 1032, 1040
- 7 Chan CW, Chan MW, Liu MF, *et al.* Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, FGL2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity [J]. J Immunol, 2002, 168: 5170 - 5177
- 8 Levy GA, Marsden R, Zhong EH, *et al.* Strategies to prevent thrombosis in xenotransplants [J]. Transplant Proc, 1998, 30: 458 - 2460
- 9 Ning Q, Sun Y, Han M, *et al.* Role of fibrinogen - like protein 2 prothrombinase/fibroleukin in experimental and human allograft rejection [J]. J Immunol, 2005, 174(11): 7403 - 7411
- 10 Zhu CL, Yun WM, Zhu F, *et al.* Fibrinogen - like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3 - induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis B [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(44): 6936 - 6940
- (收稿: 2012 - 02 - 05)
(修回: 2012 - 02 - 24)

中青年肥胖人群平板运动试验结果分析

陈 斓 谢 玮 胡伟航 张 磊 单米亚

摘 要 **目的** 通过平板运动试验, 分析比较中青年肥胖人群身体功能的相关指标。**方法** 在笔者医院体检中心体检的健康人群中选出 195 名志愿者 (18 ~ 59 岁), 根据 BMI 指数分为正常组和 BMI 轻、中、重度增高组, 用 Bruce 极量运动方案对每一个受试者进行极量平板运动试验。通过对每一个受试者的运动持续时间、极量心率、运动终止即刻代谢当量值 (MET)、身体活动评分、RPE 等指标分析, 对结果进行多元回归分析, 得出极量运动持续时间的回归方程。**结果** 到达极量运动时间的多元回归方程: $y = 166.947 + 45.433x_1 - 4.087x_2 - 0.696x_3 - 0.178x_4 + 0.452x_5$, x_1 为 METS, x_2 为极量 RPE, x_3 为 BMI, x_4 为极量收缩压, x_5 为身体活动评分, 校正 $r^2 = 0.932$, ($P < 0.01$)。**结论** 数据表明肥胖人群身体机能各项指标与正常对照组均有明显差异, 其原因在于他们之间运动耐量和体重的差别。

关键词 平板运动试验 肥胖症 身体功能 BMI 指数

Analysis of Results of Young and Middle - aged Obese People with Treadmill Exercise Test. Chen Lan, Xie Wei, Hu Weihang, *et al.* Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To analyze and compare related indicators of physical function of young and middle - aged obese people by treadmill exercise test. **Methods** We selected 195 healthy population volunteers (18 - 59 years) from physical examination in our hospital medical center. According to the BMI index, the people is divided into normal group and BMI light, moderate and severe groups increased. We chose maximal treadmill exercise test for each subjects with Bruce maximal exercise program. The maximal exercise duration of regression equation can be resulted from the multiple regression analysis of each subject's exercise duration, maximal heart rate, exercise immediate termination of metabolic equivalent values (MET), physical activity score, RPE and other indicators. **Results** Time to reach maximal result of multiple regression equation: $y = 166.947 + 45.433 x_1 - 4.087x_2 - 0.696x_3 - 0.178x_4 + 0.452 x_5$, x_1 for the METS, x_2 for the most amount of RPE, x_3 for the BMI, x_4 for the maximal systolic blood pressure, x_5 for the physical activity score, corrected $r^2 = 0.932$, ($P < 0.01$). **Conclusion** Data show that obese people with normal body function indicators showed significant differences in the control group. The reason lies in the differences of exercise tolerance and the weight.

Key words Treadmill exercise test; Obesity; Physical function; Body mass index

在我国, 随着社会经济水平的高速增长, 肥胖的发生率正逐年增加 (尤其是青年人中), 其危害性也

逐渐明朗化。单纯性肥胖不仅是冠心病、高血压、糖尿病、脑血管意外的危险因素, 还会降低人的自然寿命^[1~3]。而在青年人群中随着体重增加, 身体功能也随之下降^[4]。国外有研究表明身体功能是与心血管疾病的病死率呈负相关的^[5,6]。运动试验证实, 身体

基金项目: 浙江省卫生厅医药卫生科学研究基金资助项目 (2009)
作者单位: 310006 浙江省杭州市第一人民医院心电功能科
通讯作者: 谢玮, 电子信箱: syxw@hotmail.com