

损伤部位迁移分化的一系列相关研究,笔者推测,该中药经验方可能在一定程度上提高上述两类因子的水平,进而影响到骨髓干细胞的迁移分化,改善部分心功能。本实验由于未对骨髓干细胞的迁移分化进行相关验证,上述推测目前仅存在理论依据。骨髓干细胞迁移分化的程度如何,心肌 1 号究竟通过何种机制改善心功能,如何促进组织分泌 SDF-1、SCF,这些因子的表达水平与中药方剂的浓度及疗程长短是否存在相关性等问题,皆有待进一步的研究。随着医学的不断进步,中医药治疗由经验医学逐渐迈向循证医学模式,必将在治疗心肌损伤性疾病的领域中发挥越来越大的作用。

参考文献

- 1 Arad M, Freimark D. Predicting prognosis in dilated cardiomyopathy [J]. *Isr Med Assoc J*, 2012, 4(11): 687-689
- 2 Penn MS, Pastore J, Miller T, *et al*. SDF-1 in myocardial repair [J]. *Gene Ther*, 2012, 19(6): 583-587
- 3 屈自鸣, 俞坚武, 赵仲牛, 等. β -肾上腺素受体过度激动致大鼠心肌细胞凋亡及 Fas, Bcl-2 蛋白表达的实验研究[J]. *心脏杂*

- 志, 2005, 17: 232-234
- 4 Yang QY, Chen KJ, Lu S, *et al*. Research progress on mechanism of action of Radix Astragalus in the treatment of heart failure [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(3): 235-240
- 5 杨庆有, 冼绍祥, 孙慧茹, 等. 黄芪含药血清诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2008, 35(6): 832-834
- 6 汪丽芳, 马元, 屈百鸣. 心肌 1 号对大鼠异丙肾上腺素心肌损伤的骨髓干细胞修复作用研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(6): 1461-1465
- 7 Abbott JD, Huang Y, Liu D, *et al*. Stromal cell-derived factor-1 alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury[J]. *Circulation*, 2004, 110(21): 3300-3305
- 8 杨敏, 闫纯英, 吴贤仁, 等. 干细胞因子动员骨髓干细胞归巢梗死心肌的特性变化[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(26): 67-70
- 9 谭艳芳, 殷小成. 黄芪甲甙对骨髓间充质干细胞分泌干细胞因子的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(4): 290-292

(收稿日期: 2013-07-02)

(修回日期: 2013-07-18)

fgl2 凝血酶原酶在重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的表达意义

叶晓华 怀佳萍 丁进 黄智铭

摘要 **目的** 探讨重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肝损伤中 fgl2 凝血酶原酶的表达情况及意义。**方法** SD 大鼠采用数表法随机均分为假手术(SO)组和 SAP 组,各 24 只。采用逆行胆胰管注射 4% 牛磺胆酸钠法制备大鼠 SAP 模型。收集术后 1、4 及 8h 时点肝脏标本,行常规病理检查及 Masson 染色随机计数肝脏微血管内微血栓形成的阳性血管数;血样检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST);实时定量(real-time)PCR 法、免疫组织化学法测定 fgl2 凝血酶原酶在大鼠肝脏的表达情况。**结果** 组织病理学检查示 SAP 大鼠肝组织内炎细胞浸润及坏死;fgl2 凝血酶原酶在 SAP 大鼠肝脏微血管内皮细胞高表达($P < 0.01$);SAP 组肝脏微血管可见微血栓形成;SAP 大鼠阳性血管率显著高于 SO 组($P < 0.01$),且与肝脏 fgl2 凝血酶原酶表达呈正相关($r = 0.948, P < 0.01$);SAP 组肝脏病理学评分显著高于 SO 组($P < 0.01$)且与 fgl2 凝血酶原酶表达呈正相关($r = 0.704, P < 0.01$)。**结论** fgl2 凝血酶原酶在 SAP 大鼠肝脏中的异常表达可能通过介导微血栓形成导致 SAP 相关性肝损伤的进展;其表达水平可能与 SAP 相关性肝损伤的病理损害程度相关。

关键词 纤维蛋白原样 2 凝血酶原酶 肝损伤 微血栓 重症急性胰腺炎

Significance of Fibrinogen-like Protein 2 in Severe Acute Pancreatitis-associated Liver Injury. Ye Xiaohua, Huai Jiaping, Ding Jin, Huang Zhiming. Department of Gastroenterology, Department of Intensive Care Unit, Jinhua Municipal Central Hospital, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To investigate whether fibrinogen-like protein 2 is involved in severe acute pancreatitis (SAP)-associated liver injury. **Methods** The rats were randomly divided into sham-operation (SO) group and SAP group. SAP rat model was induced by

作者单位: 321000 浙江省金华市中心医院消化内科(叶晓华、丁进), ICU(怀佳萍); 325000 温州医科大学附属第一医院消化内科(黄智铭)

通讯作者: 丁进, 电子信箱: 45338363@qq.com; 黄智铭, 电子信箱: wzhzm123@163.com

retrograde injection of 4% sodium taurocholate. Liver samples were collected at 1h, 4h, and 8h after induction. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) concentration were assayed. Microthrombosis in the liver was observed by Masson staining. fgl2 prothrombinase expression was analyzed by real-time PCR and immunohistochemistry methods. **Results** Inflammatory cells infiltration and necrosis were observed in liver tissues in SAP group. Immunohistochemistry staining showed that fgl2 prothrombinase was localized specifically to the endothelial cells of intrahepatic veins and hepatic sinusoids. Furthermore, Masson staining demonstrated that the proportion of hepatic microthrombotic capillaries in SAP group was markedly increased in comparison to SO group and closely correlated with fgl2 expression ($r=0.948$, $P<0.01$). In addition, there was a positive correlation between fgl2 expression and the severity of hepatocellular injury as indicated by hepatic pathological grade ($r=0.704$, $P<0.01$). **Conclusion** fgl2 prothrombinase may contribute to microthrombosis in SAP-associated liver injury, and fgl2 prothrombinase expression may correlate with the severity of hepatocellular injury in SAP.

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

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见急重症,常可并发肝、肾、肠道等胰外器官损伤,进而可致多器官功能障碍(MODS)。肝脏是SAP病程中所累及的主要器官之一,且肝脏损害程度与SAP病情密切相关^[1,2]。近年来学者研究认为肝脏中的微循环变化参与了肝组织损伤和肝功能异常的发生发展过程,并且研究发现在动物模型中利用肝素抗凝等改善微循环治疗手段具有一定治疗作用^[3,4]。fgl2凝血酶原酶属于是纤维蛋白超家族中的一员,可以直接催化凝血酶原形成有活性的凝血酶,并迅速启动凝血过程,是调控微血栓形成的重要因子^[5]。笔者先前研究发现fgl2凝血酶原酶参与了SAP大鼠胰腺损伤的病理生理机制^[6]。然而fgl2凝血酶原酶与SAP相关性肝损伤的研究目前鲜有报道。本研究目的主要是观察fgl2凝血酶原酶在大鼠SAP模型肝脏内的表达情况,探讨其在SAP相关性肝损伤中的机制及作用,为研究SAP相关性肝损伤中微循环障碍及引起肝损伤和功能障碍的发病机制提供新的思路。

材料与方法

1. 动物分组及模型建立:健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体质量 200~250g,由温州医科大学实验动物中心提供。将大鼠随机分为假手术(SO)组和 SAP 组;各组又分为 1、4、8h 3 个时点。术前采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠。SAP 组大鼠采用 4% 牛磺胆酸钠(Sigma 公司)1ml/kg 体重逆行胰胆管穿刺注射制模。SO 组仅行剖腹假手术。术后 1、4、8h 分批处死大鼠($n=8$),留取下腔静脉血、肝脏标本待测。

2. 生化指标检测:丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)浓度使用 HITACHI 全自动生化分析仪检测。

3. 肝脏组织形态学检查:肝脏组织常规脱水,石蜡包埋,切片,行 HE 染色及 Masson 染色。镜下观察胰腺病理改变并参照文献[7]进行肝脏病理学评分。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. 实时荧光定量 PCR:采用 Trizol 法(Invitrogen 公司)提取总 RNA,取 4 μg 总 RNA 反转录合成第一链 cDNA(MBI 公司)。引物由上海捷瑞生物公司合成:fgl2 上游引物 5'-cctg-gagattgtggttcgt-3',下游引物 5'-taccatgcctttctccaagg-3',扩增片段长 153 bp; β -actin 上游引物 5'-tgtcaccaactgggacgata-3',下游引物 5'-gggggtgtgaaggtctcaaa-3',扩增片段长 153 bp。PCR 反应体系:real-time PCR Mix 32 μl (上海达为科公司),上游引物 F 1 μl ,下游引物 R 1 μl ,TaqMan probe 1 μl ,ddH₂O 13 μl ,cDNA 模板 2 μl ,总体积 50 μl 。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2min;95 $^{\circ}\text{C}$ 5min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15s,循环 40 次。采用 ABI-7500 荧光定量分析仪进行分析。

5. 免疫组化染色:采用 Envision 试剂盒(DAKO 公司)行肝脏 fgl2 凝血酶原酶免疫组化染色。兔抗大鼠 fgl2 凝血酶原酶多克隆抗体(北京博奥森,1:100)作一抗。EnVision 试剂(HRP-R/M)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染。盐酸乙醇分化,氨水反蓝,中性树胶封片。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。

6. 统计学方法:采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析。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. 生化指标测定结果:与 SO 组相比,SAP 组 1、4 和 8h 时点 ALT/AST 水平升高($P<0.01$)。SO 组各时点间比较,差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2. 病理学检测结果:肉眼下见肝脏稍大,表面可见明显出血点。镜下早期(1h)可见肝细胞肿胀,呈现大面积气球样和水样变性,肝小叶结构基本完整,汇管区少量炎性细胞浸润,偶见孤立性、非局灶性坏死灶。随时间延长(4、8h),可见中央静脉周围肝细胞的点灶状或条索状坏死区域逐渐扩大,出现融合性坏死灶(图 1)。

表 1 各组大鼠术后各时点生化指标值($n=8,\bar{x}\pm s,U/L$)

组别	ALT			AST		
	1h	4h	8h	1h	4h	8h
SO 组	32.13±5.167	34.13±6.896	29.63±5.755	27.63±13.298	29.00±13.331	31.50±9.517
SAP 组	77.25±11.235 ^b	104.50±12.75 ^b	171.00±16.527 ^b	219.50±24.86 ^b	440.25±74.50 ^b	608.75±138.12 ^b

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

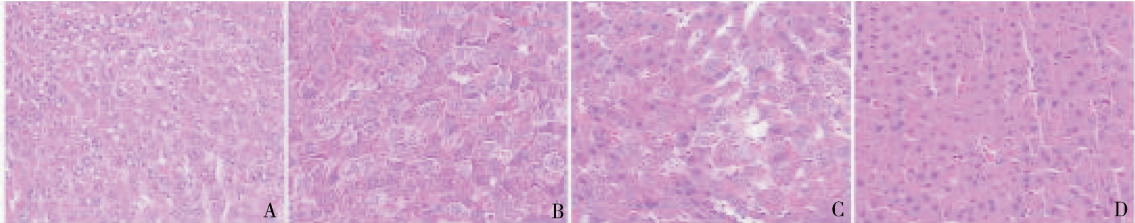


图 1 各组大鼠术后 HE 染色($\times 200$)
A. SAP 组 1h;B. SAP 组 4h;C. SAP 组 8h;D. SO 组 8h

3. 微血栓观察结果:Masson 染色用于观察原位血栓形成^[6]。镜下可见原位血栓与肝血窦和肝内静脉分支紧密相连。SAP 组各时点的 Masson 染色阳性血管率显著高于 SO 组($P<0.01$),且随时间延长逐渐增加($P<0.01$,表 2、图 2)。

表 2 各组大鼠术后各时点肝脏阳性血管率($n=8,\bar{x}\pm s,\%$)

组别	1h	4h	8h
SAP	30.62±2.26 ^b	49.00±3.46 ^b	70.13±3.36 ^b
SO	3.50±2.78	3.75±1.83	5.13±2.23

与 SO 组同一时点比较,^b $P<0.01$;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, $P>0.05$

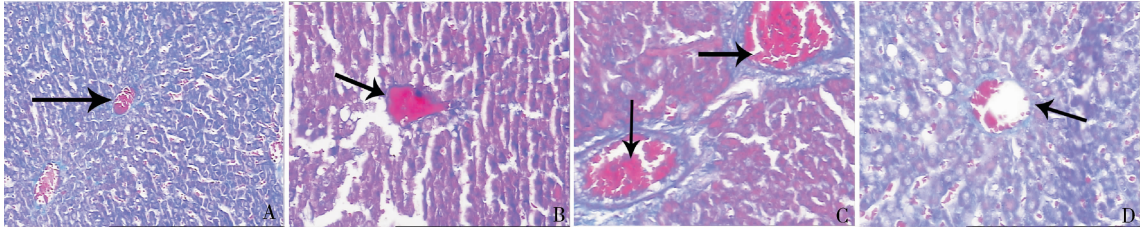


图 2 各组大鼠术后 Masson 染色($\times 200$)
A. SAP 组 1h;B. SAP 组 4h;C. SAP 组 8h;D. SO 组 8 h(箭头所示为微血栓主要位于肝血窦内皮)

4. 肝脏 fgl2 表达:SAP 组大鼠肝脏 fgl2 mRNA 和 fgl2 凝血酶原酶蛋白表达相对正常大鼠均显著上调,且随病程延长逐渐升高(表 3)。免疫组化染色显示,

fgl2 凝血酶原酶主要表达在 SAP 组大鼠肝血窦和肝内静脉的内皮细胞(图 3)。

表 3 各组大鼠术后各时点胰腺 fgl2 mRNA 和蛋白表达量($n=8,\bar{x}\pm s$)

组别	1h		4h		8h	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
SAP	1.486±0.116 ^b	1.347±0.534 ^b	1.940±0.153 ^b	2.130±0.580 ^b	2.530±0.118 ^b	3.270±0.610 ^b
SO	0.987±0.064	0.100±0.031	0.922±0.093	0.126±0.047	0.997±0.059	0.127±0.036

与 SO 组同一时点比较,^b $P<0.01$;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, $P>0.05$

5. 相关性分析:将 SAP 组大鼠肝脏组织 fgl2 凝血酶原酶表达水平与 Masson 染色阳性血管率及肝脏病理学分级分别行 Pearson 相关分析,结果显示 SAP 组大鼠胰腺内 fgl2 凝血酶原酶表达水平与阳性血管率($r=0.948,P<0.01$)及肝脏病理学分级($r=$

0.704, $P<0.01$)均存在相关性。

讨 论

微循环改变是 SAP 早期重要的病理生理过程,它不仅仅发生于胰腺,而是涉及众多器官诸如肝脏、肺脏和肠道等^[1,2]。SAP 相关肝损伤是 SAP 病程中

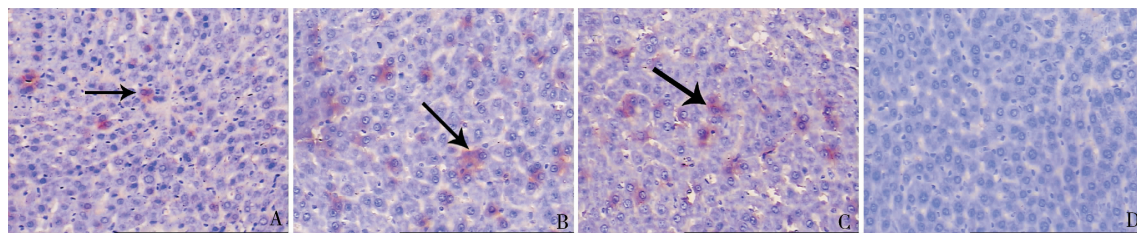


图3 各组大鼠术后各时点肝脏 fg12 免疫组化染色 (×200)

A. SAP 组 1h; B. SAP 组 4h; C. SAP 组 8h; D. SO 组 8h(箭头所示为 fg12 凝血酶原酶主要表达在 SAP 组肝窦及内皮细胞)

的主要病理生理事件之一,并且其微循环障碍的进展可能进一步加重 SAP 的严重程度。SAP 病程中,肝内微循环的变化参与了肝脏形态学变化和肝功能障碍的发生发展过程^[3]。本研究显示 SAP 组大鼠肝功能受损;病理学检测发现肝脏组织损伤较严重,Masson 染色进一步证实肝血窦及肝内静脉若干分支可见原位微血栓形成,提示 SAP 大鼠相关性肝损伤可能与其微循环障碍相关。

近年来发现的 fg12 凝血酶原酶属于纤维蛋白原家族成员,其生物学作用与活化的凝血因子 Xa 类似,可直接催化凝血酶原转变成有活性的凝血酶。在某些病理情况下,可表达于活化的巨噬细胞、内皮细胞和淋巴细胞等免疫活性细胞表面^[5,8]。与常规凝血途径不同,fg12 凝血酶原酶通过“免疫凝血”机制产生作用,即通过诱发炎细胞聚集,引起局部组织 fg12 凝血酶原酶高表达,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,从而导致器官形态学变化和功能障碍^[8,9]。研究发现,用病毒、细菌脂多糖等刺激小鼠巨噬细胞表达 fg12 凝血酶原酶后,巨噬细胞出现明显的促凝活性。fg12 凝血酶原酶的表达上调在某些以微血管病变为特征的疾病尤为突出^[10]。笔者先前研究发现,SAP 大鼠胰腺微血管内存在 fg12 凝血酶原酶的高表达,但目前关于 fg12 凝血酶原酶在 SAP 相关性肝损伤中的作用机制鲜有报道^[6]。

本研究通过 RT-PCR 发现,fg12 凝血酶原酶在 SO 组低表达,SAP 组注射 4% 牛磺胆酸钠后 1h 即出现表达上调,且随时间延长逐渐增加,同时伴有以原位微血栓形成。通过免疫组化研究也进一步证明,SAP 组肝脏血窦及肝内静脉若干分支(尤其内皮细胞)有大量的 fg12 凝血酶原酶表达,而 SO 组则未见其表达,均提示血管内皮损伤激活了 fg12 凝血酶原酶的高度表达,后者参与并促进了 SAP 相关性肝损伤的肝脏微血管原位血栓的形成过程。另外,相关性分

析提示 fg12 凝血酶原酶表达与 Masson 染色阳性血管率($r=0.948, P<0.01$)及肝脏病理评分($r=0.704, P<0.01$)具有显著相关性,提示 fg12 凝血酶原酶在炎症因子调控下表达上调引起微血栓形成,从而导致肝脏细胞缺血缺氧而促进 SAP 相关性肝损伤的发生与发展,并且通过检测 fg12 凝血酶原酶的表达有可能早期了解肝脏损伤程度,为早期诊断 SAP 相关性肝损伤发生寻找新的指标。这一新的研究发现,为研究原位微血栓形成在 SAP 相关性肝损伤的作用的病理机制提供了新的思路。

参考文献

- 1 孙俊涛,许刚,田克立,等. PPAR γ 激动剂对急性胰腺炎小鼠肝损伤的影响[J]. 中华胰腺病杂志,2010,10(2):138-140
- 2 李文星,熊泽翼,郭建红,等. 肠源性内毒素与 Treg 在重症急性胰腺炎肝损伤中的作用[J]. 中华肝胆外科杂志,2012,18(7):552-555
- 3 Panek J, Zasada J, Pofiniczek M. Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis[J]. Przegl Lek, 2007, 64(6):435-437
- 4 陈梅福,王方明. 重症急性胰腺炎治疗的进展[J]. 临床肝胆病杂志,2012,28(8):571-572
- 5 Melnyk MC, Shalev I, Zhang J, et al. The prothrombinase activity of FGL2 contributes to the pathogenesis of experimental arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2011, 40(4):269-278
- 6 叶晓华,陈坛轲,杜勇,等. fg12 参与重症急性胰腺炎大鼠微血栓形成[J]. 医学研究杂志,2012,41(10):138-141
- 7 廉波. 尿激酶对大鼠急性重症胰腺炎肝脏微循环障碍的作用[D]. 沈阳:中国医科大学,2005
- 8 Ding Y, 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 Technolog Med Sci, 2010, 30(5):575-581
- 9 Su G, Liu K, Wang Y, et al. Fibrinogen-like protein 2 expression correlates with microthrombosis in rats with type 2 diabetic nephropathy[J]. Journal of Biomedical Research, 2011, 25(2):120-127
- 10 李学军,宋善俊,魏文宁,等. 人 fg12 凝血酶原酶基因的真核表达及其凝血功能研究[J]. 华中科技大学学报·医学版,2011,40(1):80-83,87

(收稿日期:2013-07-07)

(修回日期:2013-07-15)