

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520081153431

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

活化蛋白 C 及炎症细胞因子对创伤感染后
DIC 的防治研究

Experimental research of activated protein C and
inflammatory cytokine to treat on Disseminated
Intravascular Coagulation induced by trauma and infection

林国强

指导教师姓名: 王玮 副教授

专业名称: 内科学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩日期: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学附属东南医院王玮副教授领导的)课题(组)的研究成果,获得(福建省青年人才基金、南京军区十一五)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学附属东南医院动物)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

中文摘要

目的: 研究创伤感染继发弥散性血管内凝血 (DIC) 过程中机体凝血、纤溶、炎症因子及病理变化及其相互作用机制, 并研究活化蛋白 C (APC) 对 DIC 的防治作用。

方法: 通过致伤并给予内毒素静滴的方法, 建立创伤感染后 DIC 模型, 进行凝血指标 (PT、APTT)、D-二聚体、血小板 (PLT) 检测, 同时对模型进行白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-10 (IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 检测, 了解机体炎症反应状况, 分析凝血异常与炎症细胞因子相互作用机制, 并取肺、肾组织进行病理学观察。在模型建立基础之上, 给予 rhAPC 处理, 观察上述各指标的变化。

结果:

1. 创伤感染诱发 DIC 模型建立。

单纯创伤组 (T)、单纯感染组 (I)、创伤感染组 (T+I) 的 PT、APTT、D-二聚体、PLT 与对照组 (C) 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 T、I 组相比, T+I 组 12h~24h 间 PT、APTT、D-二聚体均明显延长或升高, PLT 明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); T 组、I 组、T+I 组肺肾病理均可见不同程度的损伤和微血栓, T+I 组尤甚, 但肾脏改变不如肺脏典型。

2. 创伤感染性 DIC 模型中炎症细胞因子表达情况

单纯创伤组 (T)、单纯感染组 (I)、创伤感染组 (T+I) 中 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 与对照组 (C) 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 T、I 组相比, T+I 组 2h~24h 间 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。DIC 前期应用 IL-10 可以导致 TNF- α 、IL-1 等促炎因子表达降低; DIC 后 6~24h 应用 IL-10 抗体可以有效降低 IL-10 水平。

3. rhAPC 在一定程度上能减轻创伤后感染继发 DIC 的严重程度。

与 DIC 组相比, rhAPC 组 2h 时 APTT、PT 值延长, 2h~6h 间 D-二聚体水平有所下降, PLT 数值有所升高, 2h~6h 间 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 有所降低, 心肺组织中 MPO 水平均有所下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

与低剂量 APC (LAPC 组) 相比, 高剂量 APC (HAPC) 组 2h 时 APTT、

PT 值延长, 2h~6h 间 PLT 升高, D-二聚体下降, 2h~6h 间 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 下降, 心肺组织 MPO 下降, 差异有统计学意义 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

结论:

- 1、应用创伤联合内毒素方法可以成功制备创伤感染继发 DIC 模型
- 2、创伤、感染均可导致炎性细胞因子释放增加, 创伤合并感染时更明显, 并且早期以 TNF- α 、IL-1 β 等促炎性细胞因子为主, 后期以 IL-10 等抑炎性细胞因子为主; DIC 前期应用 IL-10 而 DIC 发生后应用 IL-10 抗体, 可以减缓创伤后感染继发 DIC 的发展。
- 3、活化蛋白 C 在一定程度上能延长 APTT 等凝血指标, 但此作用可能与用药时间相关, 能降低 D-二聚体水平, 减轻血小板的消耗, 减轻创伤感染性 DIC 的严重程度; 能下调 TNF- α 、IL-1 β 等促炎细胞因子的水平, 能上调 IL-10 的水平, 但是具体的作用机制仍有待进一步研究。

关键词: 活化蛋白 C; 创伤; 脓毒症; DIC; 炎症细胞因子

Abstract

Objective Setting up the experimental rabbit model of disseminated intravascular coagulation (DIC) induced by trauma with endotoxin so as to observe the change of coagulation, fibrinolysis and inflammation, meanwhile observe the effect of activated protein C on the coagulation, fibrinolysis and inflammation, to investigate its treatment effect of DIC. **Methods** Experimental rabbit model of DIC was established by trauma and infection, the parameters of DIC were measured, including Prothrombin time(PT), Activated partial thromboplastin time(APTT), Platelet(PLT), D-dimer, and the IL-10, IL-1 β , TNF- α also been tested to understand the state of inflammatory reaction, then the tissue of the lung and kidney were taken for histopathological observation. After APC treatment of DIC, the indices above were tested again. **Results** First, the animal model was constructed. There were obvious differences of parameters (PT, APTT, PLT, D-dimer, IL-1 β , IL-10, TNF- α) between the control group and the other three groups. Compared with the T group and I group, PT, APTT and D-dimer were significantly prolonged or elevated and PLT significantly decreased during 12h~24h, and TNF- α , IL-1 β , IL-10 were significantly elevated during 2h~24h in T+I group ($P < 0.05$ & $P < 0.01$); Various damage of lung and kidney and microthrombus formation were observed in T group, I group and T+I group, and the changes in the lung of the T+I group were especially serious. The level of TNF- α and IL-1 β could be reduced by preventively using IL-10 in the prophase of DIC, meanwhile the level of IL-10 could be reduced by using anti-IL-10 antibody in the developmental phase of DIC. Second, rhAPC, to some extent, can alleviate the severity of DIC secondary to post-traumatic infection. Compared with the DIC group, PT, APTT were prolonged at 2h, D-dimer were significantly declined and PLT elevated during 2h~6h, TNF- α , IL-1 β and IL-10 were significantly decreased during 2h~6h in the APC group ($P < 0.05$ & $P < 0.01$), the MPO of the APC group were lower than the MPO of the DIC group. Meanwhile compared with the low dose APC group, the PT, APTT of APC group were prolonged at 2h, and the D-dimer decreased, the PLT elevated during

2h~6h, TNF- α , IL-1 β and IL-10 were significantly decreased during 2h~6h($P<0.05$ & $P<0.01$). the MPO of the HAPC group were lower than the MPO of the LAPC group. **Conclusion** The experimental model of DIC induced by trauma with endotoxin could be set up. Trauma, infection can lead to increased release of inflammatory cytokines, when trauma combined with infection is more obvious, the pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β were more obvious in the early stage, while the IL-10 were obvious in the late stage. Preventively using IL-10 in the prophase of DIC or using anti-IL-10 antibody in the developmental phase of DIC maybe have positive function to treat DIC. RhAPC, to some extent, can prolonged the APTT, PT, and it maybe related to the length of treatment time; APC can reduced the level of the D-dimer, the pro- inflammatory cytokines and elevated the PLT, IL-10, but the specific mechanism remains to be further study.

Keywords: activated protein C; trauma; sepsis; DIC; inflammatory cytokine

目 录

中文摘要	IV
ABSTRACT	VI
缩略词表	XIII
前 言.....	1
第一章 创伤继发感染诱导兔弥散性血管内凝血模型建立.....	3
试剂与仪器.....	3
1 试剂与药品.....	3
2 仪器.....	3
方 法.....	4
1 实验动物.....	4
2 分组.....	4
3 动物模型的建立.....	4
4 观测指标.....	5
5 动物模型 DIC 判断标准.....	6
6 统计学处理.....	6
结 果.....	7
1 家兔一般情况变化.....	7
2 DIC 指标变化情况.....	7
3 器官损伤程度.....	11
讨 论.....	14
1 创伤与 DIC 的关系.....	15
2 内毒素与 DIC 的关系.....	15
3 创伤感染与 DIC 的关系.....	16
结 论.....	17
第二章 创伤感染性 DIC 中炎症细胞因子作用的初步探讨.....	18
试剂与仪器.....	18
1 试剂与药品.....	18
2 仪器.....	18

方 法	18
1 实验动物.....	18
2 实验分组.....	19
3 实验模型建立.....	19
4 检测炎症细胞因子指标及方法.....	19
5 统计学处理.....	21
结 果	21
1 TNF- α 数值变化情况.....	21
2 IL-1 β 数值变化情况.....	22
3 IL-10 数值变化情况.....	23
4 应用 IL-10 后 TNF- α 、IL-1 的表达情况.....	24
5 应用 IL-10 抗体后 IL-10 的表达情况.....	24
讨 论	25
结 论	28
第三章 活化蛋白 C 对创伤感染后 DIC 的防治研究	29
试剂与仪器	29
1 试剂与药品.....	29
2 仪器.....	29
方 法	29
1 实验动物.....	29
2 实验分组.....	30
3 动物模型的建立及干预.....	30
4 观测指标.....	30
5 统计学处理.....	33
结 果	33
1 家兔一般情况变化.....	33
2 DIC 指标变化情况.....	33
3 器官损伤程度.....	41
讨 论	44
1 创伤感染后 DIC 中蛋白 C 系统的变化.....	45
2 蛋白 C 一般生物学特性.....	45
3 APC 在创伤感染后 DIC 中的保护性作用.....	46
结 论	50
附 录	58
在校期间发表论文	66
致 谢	67

Table of Contents

Abstract in Chinese	VII
Abstract in English	XI
Abbreviation table	XIV
Preface	1
Chapter 1 Setting up the experimental rabbit model of Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) induced by trauma with endotoxin	3
Reagents and Instruments	3
1 Reagents and Drugs	3
2 Instruments.....	3
Methods	4
1 Experimental animals.....	4
2 Groups.....	4
3 Establishment of model.....	4
4 Observation parameters	5
5 Evaluation criteria of animal model.....	6
6 Statistical analysis	6
Results	7
1 General states change of rabbits	7
2 DIC parameters	7
3 Degree of organ injuries.....	11
Discussion	14
1 Relationship between trauma and DIC	15
2 Relationship between endotoxin and DIC	15
3 Relationship between post-trauma infection and DIC	16

Conclusions	17
chapter 2 Experimental studies of the role of inflammatory cytokines in DIC induced by trauma and infection	
.....	18
Reagents and Instruments	18
1 Reagents and Drugs	18
2 Instruments.....	18
Methods	18
1 Experimental animals.....	18
2 Groups.....	19
3 Establishment of model.....	19
4 Inflammotory parameters.....	19
5 Statistical analysis.....	21
Results.....	21
1 The change of TNF- α	21
2 The change of IL-1 β	22
3 The change of IL-10.....	23
4 The change of TNF- α IL-1 after using IL-10	24
5 The change of IL-10 after using IL-10 antibody	24
Discussion	25
Conclusions	28
Chapter 3 Experimental studies of recombinant human activated protein C therapy on DIC induced by trauma and infection	
.....	29
Reagents and Instruments	29
1 Reagents and Drugs	29
2 Instruments.....	29
Methods	29

Table of Contents

1 Experimental animals.....	29
2 Groups.....	30
3 Animal model construction and intervention.....	30
4 Observation parameters	30
5 Statistical analysis.....	33
Results.....	33
1 General states change of rabbits	33
2 DIC parameters	33
3 Degree of organ injuries.....	41
Discussion	44
1 The change of protein C system in DIC induced by trauma and infection.....	45
2 General biological features of protein C.....	45
3 Role of APC in the treatment of DIC induced by post-trauma infection.....	46
Conclusions	50
Appendix.....	58
Publication of papers in school.....	66
Acknowledgement.....	67

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
DIC	disseminated intravascular coagulation	弥散性血管内凝血
LPS	lipopolysaccharides	脂多糖
PT	prothrombin time	凝血酶原时间
APTT	activated partial thromboplastin time	活化部分凝血活酶时间
IL-1	interlukin-1	白介素-1
IL-10	interlukin-10	白介素-10
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1	纤溶酶原激活物抑制剂-1
β -EP	β -endorphin	β -内啡肽
TM	thrombomodulin	凝血酶调节蛋白
tPA	tissue plasminogen activator	组织型纤溶酶原激活物
MPO	myeloperoxidase	髓过氧化物酶
EPCR	endothelial cell protein C receptor	内皮细胞蛋白 C 受体
MIP-1- α	macrophage inflammatory protein-1-alpha	巨噬细胞炎性蛋白-1- α
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1	单核细胞趋化蛋白-1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1	细胞间黏附分子-1
VCAM-1	vascular endothelial cell adhesion molecule-1	血管内皮细胞黏附分子-1
PAR-1	protease activated receptor-1	蛋白酶激活受体-1

前言

弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)是一种由多种致病因素诱发的凝血-纤溶为特征的病理过程。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。在 DIC 的诸多致病因素中, 创伤和感染是最常见的两种。

目前, 单纯的抗生素、血浆置换等常规治疗方法效果欠理想, 建立 DIC 动物模型可进一步揭示 DIC 发病全过程中凝血、纤溶、炎症等系统的变化情况, 为探究 DIC 的发病机制及防治奠定基础。目前常用的 DIC 模型是通过给予内毒素制备的感染性 DIC 模型, 此外尚有学者应用凝血酶、组织凝血活酶等复制 DIC 动物模型, 这并不能很好反映临床上常遇见的问题, 虽然创伤、感染均可导致 DIC^[1], 但是临床上创伤合并感染导致的 DIC 要更常见, 且临床后果更严重、死亡率更高, 故应用创伤联合内毒素方法制备的创伤感染性 DIC 模型能更真实的反应临床上遇见的问题。目前用于制备 DIC 模型的实验动物有许多, 如家兔、小鼠、犬等。国内最常用家兔, 因其来源充足、性情温驯且价格较低廉, 个体差异较小, 重复性好, 采血量满足实验要求。故本实验采用家兔作为制作 DIC 模型的实验动物, 采用创伤联合内毒素的方法制备家兔创伤感染性 DIC 模型。

近年来研究已经表明, 严重创伤、感染时机体内均存在炎症反应及炎症因子的大量分泌, 并且已知炎症与凝血之间存在密切的联系, 炎症因子在其中起重要的桥接作用^[2]。同样, DIC 作为创伤、感染的进一步恶化的较严重的病理环节, 其发生时, 机体内亦存在明显的炎症反应, 并伴随大量炎症细胞因子的分泌及凝血系统的活化。分泌的大量炎症细胞因子对凝血系统的激活起重要作用, 如 TNF- α 和 IL-1 等可以通过促使单核细胞、平滑肌细胞、内皮细胞组织因子(TF)表达上调而激活外源性凝血途径, 导致凝血酶原激活产生大量凝血酶导致血栓形成, 此外尚能促进单核细胞、内皮细胞及血小板等合成分泌循环型 TF^[3, 4]; 大量活化的凝血因子, 又反过来调节炎症细胞因子, 如生成的凝血酶能促进抑炎性细胞因子 IL-10 分泌, 而抑制促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 等的分泌, 从而通过负反馈在一定程度上抑制炎症反应; 其他的凝血系统成分活化后也参与了炎症的调节, 能促进或抑制炎症反应^[5-7]。目前关于感染性 DIC 中存在炎症反应及大量炎

症细胞因子的合成已得到一致的认可，但是关于炎症细胞因子在感染性 DIC 发展中的动态性变化的研究相对较少，而关于创伤感染性 DIC 中的炎症因子的表达及其表达规律研究则更少，故我们在创伤感染性 DIC 模型建立基础上对炎症细胞因子的表达情况进行检测，了解创伤感染性 DIC 中炎症因子的表达情况及规律，为下一步通过免疫调节方法治疗 DIC 提供一定的实验基础。

活化蛋白 C (APC) 是内源性的调节炎症与凝血的重要的物质，其前体是蛋白 C，是机体生理性抗凝系统重要成员，当凝血酶-血栓调节蛋白复合物生成后，蛋白 C 被裂解生成 APC，其是一种维生素 K 依赖的丝氨酸蛋白酶，主要在肝脏、内皮细胞合成，其通过灭活因子 Va、VIIIa 而发挥抗凝作用，通过抑制纤溶酶原激活物抑制剂发挥促纤溶作用，二者共同阻止血栓的进一步形成；此外 APC 尚可通过抑制凝血酶生成和下调 NF- κ B 发挥抗炎作用；APC 尚有抗凋亡促增殖的特性^[8, 9]。

大量研究均发现，在脓毒症时体内 APC 的水平明显降低，其水平与患者预后密切相关，作为脓毒症病理环节的 DIC，同样存在 APC 水平降低及功能障碍的问题^[10, 11]。重组人活化蛋白 C (rhAPC) 是内源 APC 的糖蛋白类似物，氨基酸构成、结构、生物效应与内源 APC 相似。目前国外 rhAPC 主要用于重症感染的治疗，无论动物实验还是临床实验均发现 rhAPC 可明显降低脓毒症的病死率^[12, 13]，亦有学者研究并发现 rhAPC 对感染性 DIC 的治疗有积极的效果，但 rhAPC 对创伤感染性 DIC 的效果如何尚未进行研究，而国内关于 APC 的研究主要集中在其对脓毒症的作用以及应激损伤、糖尿病等领域，关于 APC 对感染性 DIC 及创伤感染性 DIC 的作用的研究甚少。

本研究通过 rhAPC 干预创伤感染性 DIC 模型，观察家兔的各项 DIC 指标以及炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 浓度的变化，初步探讨 rhAPC 对创伤感染性 DIC 的防治作用机制，并评价其治疗效果，为临床上创伤感染性 DIC 的治疗提供一定的基础。

第一章 创伤继发感染诱导兔弥散性血管内凝血模型建立

弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)是一种是在基础病基础上,由特定诱因引发的以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^[14, 15]。

建立 DIC 动物模型可进一步揭示 DIC 发病全过程中凝血、纤溶、炎症等系统的变化情况,为探究 DIC 的发病机制及防治奠定基础。本实验通过制造家兔腹部开放伤,并静脉注入大肠杆菌内毒素,制备创伤后感染继发 DIC 动物模型,为深入研究创伤后感染继发 DIC 的发病机制及防治提供一定的实验依据。

试剂与仪器

1 试剂与药品

速眠新 II 号 (2.0ml/支,批号:兽药字(2009)070011582,吉林省华牧动物保健有限公司生产)

盐酸氯胺酮 (2ml/支,0.1g/支) (批号:KH080405,江苏恒瑞医药有限公司)

10%甲醛 (解放军 175 医院病理科提供)

乙醚 (四川西陇化工有限公司生产)

内毒素(LPS L2880 美国 Sigma 公司)

凝血酶原时间 (PT) 检测试剂(法国 STAGO 公司)

活化部分凝血活酶时间(APTT)检测试剂(法国 STAGO 公司)

D-二聚体检测试剂盒(福州贝肯医疗设备有限公司)

2 仪器

法国 STAGO 公司 STA Compact 全自动凝血分析仪

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库