文章编号:1000-5404(2005)18-1855-04

论著

凝血酶致大鼠肺微血管通透性及血浆 VEGF 含量改变的实验研究

王 震,陶国才,陈 杰,崔 剑,顾健腾 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

提 要:目的 复制凝血酶诱导大鼠急性肺损伤模型,验证凝血酶的炎症效应,并评估血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在凝血酶炎症效应中的作用。**方法** 72只SPF级SD大鼠以1%戊巴比妥钠溶液(60 mg/kg)麻醉后随机分为3组,每组24只。正常对照组C组,予生理盐水2 ml/kg尾静脉注射;凝血酶0.5 U/kg(T_1组)和1 U/kg(T_2组)处理组,于处理后0.5、2、6、12 h 4个时相点采集标本,每时相点6只。检测大鼠肺湿/干比,荧光素钠法检测肺微血管通透性变化,酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清中VEGF浓度,及病理学观察。**结果** 与C组比较,T_1、T_2组0.5、2 h两个时相点肺湿/干比、肺组织中荧光素钠浓度均显著增高($P<0.01$),血清VEGF浓度检测显著增高($P<0.01$);6 h及12 h两时相点与对照组比较无显著差异。**结论** 凝血酶可引起大鼠肺微血管通透性的可逆性改变,这种炎症效应可能与VEGF释放的变化有关。

关键词:凝血酶;微血管通透性;急性肺损伤;VEGF
中图法分类号:R322.13;R446.11;R977.6 **文献标识码**:A

Changes of VEGF expression and pulmonary microvascular permeability by thrombin injection in rats

WANG Zhen, TAO Guo-cai, CHEN Jie, CUI Jian, GU Jian-teng (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of the VEGF expression and pulmonary microvascular permeability after extrinsic thrombin injection in rats. **Methods** Seventy-two SD rats, weighting 200 – 230 g, were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (60 mg/kg) after the rat models were established by extrinsic thrombin injection through vena caudalis. Then the blood was collected for detecting the serum concentration of VEGF by ELISA, the left lung was kept for W/D lung weight ratio measurement, the right lung was lavaged and BALF was collected to count the number of total leucocytes and neutrophil, the fluorescein sodium (FINa) content was measured with flurospectrophotometer in lungs to evaluate the pulmonary microvascular permeability at different time points of 0.5, 2, 6 and 12 h after thrombin injection at dose of 0.5 U/kg and 1 U/kg while the control group were injected with normal saline instead. **Results** The W/D lung weight ratio and microvascular permeability in thrombin groups increased at 0.5 h and 2 h ($P<0.01$), then decreased at 6 h and 12 h as compared with the control group. The serum VEGF expression also showed a remarkable increase at 0.5 and 2 h in thrombin groups ($P<0.01$), but the counts of leucocytes and neutrophil showed no changes. **Conclusion** Thrombin can induce the reversible inflammatory effects in rats in a dose-dependent manner. The VEGF expression maybe involve in the acute lung injury induced by thrombin activation.

Key words: thrombin; microvascular permeability; acute lung injury; vascular endothelial growth factor

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)的机械物理因素、肺缺血再灌注诱发的全身(系统)炎性反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)等多种因素可诱发急性肺损伤(acute lung injury, ALI),而CPB中凝血机能紊乱可能是导致SIRS的重要原因之一,而CPB中凝血机制紊乱诱发的炎症反应又可能与CPB造成的以凝血酶为代表的凝血因子的浓度和活性的显著升高紧密相关[1]。

凝血酶(thrombin)是凝血过程中的关键酶,能够激活血小板、促进凝血。凝血酶的诸多作用不仅包含凝块的形成,还包含了对多种已知细胞在血管损伤导致的系统性炎症反应中所起的广泛细胞间效应。已有不少研究[2,3]揭示,凝血酶及PARs家族与脑水肿、脑损伤关系密切。目前,使用外源性凝血酶静注以诱导产生ALI甚至ARDS的动物模型还少见报道。在动物模型上复制凝血酶的致炎作用,对促进凝血酶在CPB

作者简介:王 震(1976-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事围术期器官保护方面的研究,现在第三军医大学大坪医院麻醉科。电话:(023)68757347,E-mail: yoyonet@163.com
通讯作者:陶国才,电话:(023)68754197,E-mail: tgctsc@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-06-03;修回日期:2005-07-06

中肺损伤发生机制中的研究有重要价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

72只SPF级雌性SD大鼠，体质量200～230 g（由第三军医大学实验动物中心提供）。按随机数字表法分为3组，每组24只。腹腔注射戊巴比妥钠（60 mg/kg）麻醉后，正常对照组C组，予生理盐水2 ml/kg尾静脉注射；凝血酶0.5 U/kg（T_1组）和1 U/kg（T_2组）处理组，于处理后0.5、2、6、12 h 4个时相点采集标本，每时相点6只。

1.2 试剂

凝血酶（thrombin）由美国Sigma公司提供，用无菌生理盐水按0.1 U/μl比例稀释配成溶液，置4 ℃冰箱保存待用；荧光素钠（fluorescein natrium，FINa）由西南医院眼科惠赠，用无菌生理盐水配制1 %的FINa溶液，置4 ℃冰箱保存待用；大鼠VEGF－ELISA检测试剂盒由美国R&D公司提供；L2500型荧光分光光度计为日本日立公司制造，2010型酶标仪为奥地利Anthos公司制造。

1.3 方法

1.3.1 凝血酶处理大鼠模型的建立　参照Momi等[4]方法，经尾静脉注入各组处理药物。到点后，动物经由颈动脉放血处死后采集标本。

1.3.2 BALF内白细胞总数及中性粒细胞计数　4 ℃无菌生理盐水灌洗右肺，每次5 ml，共2次，每次灌洗停留2 min，收集BALF，平均回收率约60 %。混匀后，4 ℃ 2 000 r/min离心10 min，取1 ml沉淀涂片，光镜下用血球计数尺计数白细胞总数及中性粒细胞数。

1.3.3 肺组织湿/干比（W/D）测定　取肺左叶称湿重后置于80 ℃烤箱72 h内烤至恒重后称干重，计算W/D。

1.3.4 微血管通透性测定　动物经颈动脉放血处死后，仿廖克龙等[5]的方法于右房剪一小口用无菌生理盐水60～70 ml灌注至左房流出清亮液体。然后取尾叶称重，加入3 ml无菌生理盐水中匀浆，4 000 r/min离心10 min，取1 ml上清液，在日立L-2500型荧光分光光度计测定荧光强度，激发光波长为437 nm，发射光波长为518 nm，狭缝5 nm，制作FINa浓度与荧光强度标准曲线，依据标准曲线得出不同脏器各观测时相点FINa肺组织含量观测值，再按公式（观测值×3/尾叶重量＝实际值）计算得到结果。

1.3.5 ELISA法定量检测血清中VEGF表达　标本采集：从颈动脉采血1 ml，室温放置30 min后以3 000 r/min离心10 min，分离血清送－80 ℃冰箱保存待检；ELISA检测操作：按试剂盒说明操作，酶标仪波长450 nm下读取吸光度，根据标准曲线得出VEGF浓度。

1.3.6 病理学观察　取灌洗后的右肺以10 %甲醛溶液自气管灌注固定，石蜡包埋切片后经HE染色在普通光学显微镜下观察。

1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，T_1、T_2组各时相点数据分别与对照组数据比较，采用多因素析因方差分析，组内数据有显著差异者两两比较若方差齐性则采用q检验，方差不齐则按Dunnett's C方法比较。应用SPSS 10.0统计分析软件进行处理。

2 结果

2.1 BALF中白细胞总数及中性粒细胞计数

各时相点比较，C、T_1、T_2组的白细胞计数和中性粒细胞计数均未见显著性差异（$P>0.05$）。

2.2 肺湿/干比测定

组间比较：与C组比较，T_1、T_2组0.5、2 h点W/D增高非常显著（$P<0.01$），且0.5 h点T_1、T_2比较有显著差异（$P<0.05$），其余各观察点与对照比较则无显著性差异（$P>0.05$）。组内比较：T_1、T_2组各组内0.5、2 h点W/D与其余各观察点相比差异非常显著（$P<0.01$），且0.5、2 h点比较有显著差异（$P<0.01$），6 h与12 h点比较则无显著性差异（$P>0.05$），见表1。

表1 凝血酶处理后肺组织湿/干比（W/D）变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of W/D lung weight ratio after thrombin injection（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	W/D lung weight ratio			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h
C	5.10±0.11	5.04±0.13	5.07±0.12	5.06±0.076
T_1	6.04±0.10*▲	5.58±0.074*▲	5.03±0.13	5.02±0.091
T_2	6.27±0.14*	5.68±0.086*	5.05±0.10	5.04±0.12

*：$P<0.01$，*vs* C；▲：$P<0.05$，*vs* T_2

2.3 微血管通透性测定

组间比较：与C组比较，T_1、T_2组0.5、2 h点肺组织FINa析出量增高非常显著（$P<0.01$），且T_1、T_2比较有显著差异（$P<0.05$），其余各观察点与对照比较则无显著性差异（$P>0.05$）。组内比较：T_1、T_2组各组内0.5、2 h点肺组织FINa析出量与其余各观察点相比差异非常显著（$P<0.01$），且0.5、2 h点比较有显著差异（$P<0.01$），6 h与12 h点比较则无显著性差异（$P>0.05$），见表2。

表2 凝血酶处理后肺组织FINa析出量变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，μg/g）

Tab 2 Changes of FINa in lung tissue after thrombin injection（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，μg/g）

Group	FINa in lung tissue			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h
C	1.31±0.054	1.31±0.078	1.30±0.035	1.29±0.035
T_1	2.03±0.057*▲	1.48±0.054*▲	1.32±0.058	1.32± 0.048
T_2	2.55±0.127*	1.53±0.043*	1.30±0.046	1.31±0.050

*：$P<0.01$，*vs* C；▲：$P<0.01$，*vs* T_2

2.4 大鼠血清中VEGF表达的比较

组间比较：与C组比较，T_1、T_2组0.5、2 h点血清VEGF表达增高非常显著（$P<0.01$），且T_1、T_2比较有显著差异（$P<0.05$），其余各观察点与对照比较则无显著性差异（$P>0.05$）。组内比较：T_1、T_2组各组内0.5、2 h点血清VEGF表达与其余各观察点相比差异非常显著（$P<0.01$），且0.5、12 h点比较有显著差异（$P<0.01$），6 h与12 h点比较则无显著性差异（$P>0.05$），见表3。

表 3　凝血酶处理后血清 VEGF 表达量变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，pg/ml）

Tab 3　Changes of serum VEGF levels after thrombin injection（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，pg/ml）

Group	Serum VEGF levels			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h
C	10.03 ± 1.75	9.54 ± 2.14	9.67 ± 0.945	9.21 ± 1.40
T_1	18.38 ± 1.35 *▲	13.30 ± 1.21 *▲	10.01 ± 1.34	10.62 ± 1.14
T_2	24.69 ± 2.78 *	14.06 ± 1.16 *	9.87 ± 1.29	9.92 ± 1.22

*：$P<0.01$，*vs* C；▲：$P<0.05$，*vs* T_2

2.5　病理学观察

C 组及 T_1、T_2 组 6、12 h 各点的肺组织镜下结构完整，肺泡腔清晰、肺泡间隔无水肿、少量炎细胞浸润；T_1、T_2 组 0.5、2 h 点的肺组织切片镜下可见血管周水肿、肺泡间隔水肿增宽、局部肺泡壁增厚、局部有淋巴细胞、中性粒细胞等炎细胞浸润，但未见肺泡腔内有炎细胞、红细胞、渗出等病变，见图 1、2。

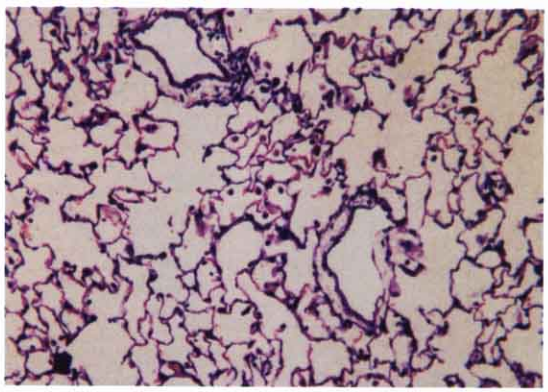


图 1　C 组，肺泡结构完整，未见间质水肿、炎细胞浸润（HE×200）

Fig 1　Normal structure of pulmonary alveolus without interstitial edema and inflammatory cells in control group（HE×200）

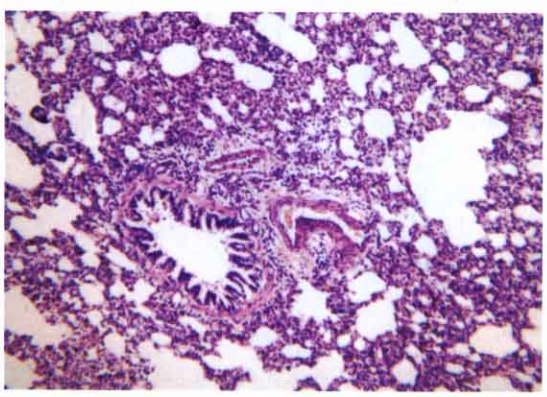


图 2　T_2 组 0.5 h 观察点，间质水肿明显，间质中大量炎细胞浸润（HE×200）

Fig 2　Obvious interstitial edema with many inflammatory cells infiltrating in the lung tissue at 0.5 h in T_2 group（HE×200）

3　讨论

机体内环境稳定是维持机体生命活动和各个脏器正常功能的重要条件之一，在创伤、感染、休克等病理条件下脏器微血管通透性改变是导致内环境紊乱的重要原因，通过对脏器微血管通透性的定量研究，可以为进一步认识这些病理生理过程提供重要的依据。

对脑损伤、体外循环并发症的研究表明血液中的凝血酶不仅参与对凝血因子的激活，而且通过适当的受体参与一系列细胞间反应特别是炎症过程。凝血酶主要通过 G 蛋白耦联的蛋白酶激活受体（PAR）[6]，引发细胞反应。其中，凝血酶与 PAR1 结合引起受体膜外 N 端精 41 - 丝 42 肽链切开，于是在 N 端暴露一个新的肽段，这个新肽段作为“栓系”配体，从而自身激活受体，触发 Ca^{2+} 流动及一系列第二信使。在体内，凝血酶是一多功能的丝氨酸蛋白酶，它通常产生于内皮细胞表面凝血瀑布过程中，除水解纤维蛋白原成纤维蛋白外，凝血酶也通过对白细胞和内皮细胞的效应在急性和慢性炎症过程中发挥重要作用。因为凝血酶是中性粒细胞和单核细胞的趋化物，通过对内皮细胞的作用介导白细胞粘附到血管壁上。凝血酶刺激内皮细胞可引起一系列反应，这些反应包括内皮细胞对血浆蛋白的通透性增加及释放一些可溶性介质，如血小板激活因子（platelet activating factor，PAF）、白介素-8（interleukin-8，IL-8）、VEGF 及基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）。在对脑水肿发生机制的研究中，不少报道就认为凝血酶可能通过调节血管内皮屏障的通透功能等作用参与其中[7,8]。也有学者报道[9,10]体外循环鱼精蛋白中和肝素后，患者体内凝血酶浓度和活性出现增高，相应凝血酶与抗凝血酶Ⅲ（AT-Ⅲ，antithrombin Ⅲ）复合物浓度也相应增高，直至 2 ~ 6 h 后恢复正常，进而怀疑这种现象与体外循环后非心源性肺水肿有关[1]。本研究结果显示 0.5、2 h 两时相点肺湿干重比、FINa 浓度及血清 VEGF 表达凝血酶处理组都比对照组显著升高，且呈剂量依赖，随时间衰减。这一结果提示凝血酶有可能是导致大鼠急性肺损伤的因素之一。而 6、12 h 点，损伤作用的消退也提示凝血酶的损伤作用在缺乏持续刺激的条件下可能会自然逆转。本研究也验证了凝血酶可以刺激 VEGF 表达增强，肺微血管屏障通透性也随着 VEGF 释放增多而增高。这既有可能是血小板脱颗粒释放 VEGF，也有可能是多种细胞分泌 VEGF 上调[11,12]。但本实验未观察到凝血酶诱导中性粒细胞聚集的增高。总而言之，有关凝血酶在急性肺损伤发生机制中的作用，还存有许多争议，尚待进一步的研究阐明。

参考文献：

[1] Velan T, Chandler W L. Effects of surgical trauma and cardiopulmonary bypass on active thrombin concentrations and the rate of thrombin inhibition *in vivo*[J]. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003, 33(3): 144 - 156.

[2] Wang H, Ubl J J, Reiser G. Four subtypes of protease-activated recep-

tors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling[J]. Glia, 2002, 37(1): 53-63.
[3] Xi G, Hua Y, Wu J, *et al*. Increase of brain thrombin concentration in cerebral ischemia[J]. Stroke, 2002, 33: 399.
[4] Momi S, Nasimi M, Colucci M, *et al*. Low molecular weight heparins prevent thrombin-induced thrombo-embolism in mice despite low antithrombin activity. Evidence that the inhibition of feed-back activation of thrombin generation confers safety advantages over direct thrombin inhibition[J]. Haematologica, 2001, 86(3): 297-302.
[5] 廖克龙，朱佩芳，王正国，等. 胸部撞击伤、内毒素血症及其复合损伤对大鼠肺血管通透性的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(2)：199-200.
[6] Dugina T N, Kiseleva F V, Chistov I V, *et al*. Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation[J]. Biochemistry (Mosc), 2002, 67 (1): 65-74.
[7] 曹学兵，陈志斌，关景霞，等. 凝血酶对大鼠脑微血管内皮细胞的影响[J]. 微循环学杂志，2003，13(4)：9-10.
[8] Masada T, Hua Y, Xi G, *et al*. Attenuation of intracerebral hemorrhage and thrombin-induced brain edema by overexpression of interleukin-1 receptor antagonist[J]. J Neurosurg, 2001, 95(4): 680-686.
[9] 魏文宁，杨 焰，杨 锐，等. 体外循环围术期凝血酶-抗凝血酶复合物改变的意义[J]. 中华胸心血管外科杂志，2003，19(6)：346-347.
[10] Urdaneta F, Lobato E B, Kirby R R, *et al*. Noncardiogenic pulmonary edema associated with protamine administration during coronary artery bypass graft surgery[J]. J Clin Anesth, 1999, 11(8): 675-681.
[11] Ollivier V, Chabbat J, Herbert J M, *et al*. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(5): 1374-1381.
[12] Bassus S, Herkert O, Kronemann N, *et al*. Thrombin causes vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(9): 1550-1555.

（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)18-1858-01

腮腺切除术式对腮腺功能的影响

Effects of parotidectomy on parotid function

王 占 （河南省平顶山市第一人民医院口腔科，平顶山 467000）

腮腺肿瘤以混合瘤最多见，以手术切除为主要治疗手段，腮腺切除保留面神经术是治疗腮腺区肿瘤的一种有效方法。本研究分析腮腺切除术后腮腺功能异常的发生及其与手术切除范围、及其它可能影响因素的关系，以确定术后有腮腺病损的病人，如何能安全切除肿瘤又降低术后腮腺功能损伤的程度。

1 材料与方法

1.1 对象

我科1995年5月至2004年5月收治的腮腺混合瘤病人62例，选择混合瘤位于腮腺浅叶者52例。腮腺区域性切除32例，男20例，女12例，两者之比为1.7∶1；年龄最小16岁，最大75岁，平均34.8岁，以30~50岁多见，25例占80.3%；病程最长23年，最短2周，平均3.7年；肿瘤直径1.0~4.0 cm，以2.5~3.5 cm最多；位于左侧腮腺16例，右侧12例，双侧2例；耳前区4例，耳垂下22例，下颌角区6例。术前针吸活检13例。肿瘤及腮腺浅叶摘除术20例，肿瘤与腮腺全切除10例为对照组。两组病例的手术标本全部经病理切片检查，确诊为腮腺混合瘤，术前均无腮腺功能障碍。恶性肿瘤及面神经全切者不做统计。

1.2 方法

术后对所有病例随访，随访时间为1~9年，平均3年。根据不同的术式，分别了解术后腮腺功能的损伤和恢复情况。腮腺功能主要查唾液分泌功能、面部畸形，术后出现味觉出汗综合征等几方面情况。

2 结果

62例中腮腺区域性切除32例，术后局部积液5例(15.6%)，经穿刺抽出积液加压包扎2周后消失。术后出现味觉出汗综合征4例(12.5%)，症状较轻。面部凹陷畸形轻，疤痕短，挤压腮腺区有清亮涎液自导管口溢出。腮腺全切除10例及浅叶摘除20例中，术后出现局部积液6例，占20%；穿刺抽积液加压包扎2周后2例消失；4例发生涎瘘(13.3%)，小剂量放疗后痊愈。面部凹陷畸形明显，疤痕长，腮腺无分泌功能，术后出现味觉出汗综合征15例(50%)，症状较重。所有手术均未出现永久性面瘫，无肿瘤复发。

3 讨论

腮腺肿瘤可发生于从新生儿到老年的任何年龄，但多见于40~60岁，高发病年龄为31~50岁[1]。丁熙等[2]统计腮腺肿瘤以上皮肿瘤为主占89.7%，腺瘤占74.09%，腺瘤中多形性腺瘤占85.65%。李瑞春等[3]报道在腮腺包块中，多形性腺瘤占63.1%。

保留面神经的腮腺浅叶或全腮腺切除术已成为治疗腮腺病损的经典手术，但其创伤较大，易损伤面神经。腮腺多形性腺瘤的治疗必须手术切除。为降低术后复发率，经典术式在保留面神经的前提下，对于腮腺浅叶的多形性腺瘤作肿瘤与浅

（下转1862页）

作者简介：王 占(1963-)，男，河南省平顶山市人，主治医师，主要从事口腔颌面外科方面的研究，发表论文9篇。电话：(0375)3399105，E-mail：wangzhan333@sina.com

收稿日期：2005-01-12；修回日期：2005-05-30