

急性胰腺炎患者内源性硫化氢水平的变化及与凝血功能的关系

卢根林 吴爱兵 王宏宾

322000 浙江义乌,义乌市中心医院普通外一科(卢根林);523808 广东湛江,广东医学院附属医院肿瘤中心(吴爱兵);810001 青海西宁,青海大学附属医院肝胆胰外科(王宏宾)

通讯作者:卢根林, Email: lugenlin007@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.03.005

【摘要】 目的 探讨急性胰腺炎(AP)患者内源性硫化氢(H_2S)水平的变化及与凝血功能的关系。**方法** 采用前瞻性病例对照研究方法。选取2002年12月至2015年3月浙江省义乌市中心医院住院的轻症急性胰腺炎(MAP组)、重症急性胰腺炎(SAP组)患者各40例,以同期40例健康体检者作为对照(健康组)。留取空腹静脉血,测定血浆 H_2S 、凝血因子Ⅷ(FⅧ)、血管性血友病因子(vWF)、纤溶酶原(PLG)、抗凝血酶(AT)、血小板计数(PLT)、组织因子(TF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量及单核细胞蛋白酶激活受体-1(PAR-1)表达水平,并对各指标进行相关性分析。**结果** 3组研究对象性别、年龄、体质量及AP两组间病程比较差异均无统计学意义,具有可比性。与健康组比较,MAP组、SAP组血浆 H_2S 、FⅧ、vWF、TF、TNF- α 及单核细胞PAR-1表达均显著升高[H_2S ($\mu\text{mol/L}$): 67.42 ± 6.34 、 112.47 ± 12.69 比 42.57 ± 4.18 , FⅧ: (67.5 ± 5.8)%、(82.3 ± 4.7)% 比 (57.2 ± 6.4)%, vWF: (112.6 ± 9.7)%、(142.5 ± 12.5)% 比 (76.4 ± 8.2)%, TF (ng/L): 45.27 ± 4.34 、 64.76 ± 6.25 比 18.15 ± 1.89 , TNF- α (ng/L): 197.67 ± 13.62 、 324.72 ± 25.54 比 20.08 ± 2.57 , PAR-1 (荧光强度): 32.16 ± 4.43 、 56.12 ± 7.07 比 12.27 ± 2.12 , 均 $P < 0.01$], 血浆PLG、AT活性显著减低[PLG: (52.4 ± 4.7)%、(36.7 ± 3.2)% 比 (62.1 ± 5.6)%, AT: (43.2 ± 6.9)%、(35.5 ± 5.4)% 比 (53.6 ± 6.1)%, 均 $P < 0.01$], 且SAP组各指标升高或降低较MAP组更为显著(均 $P < 0.01$)。SAP组PLT明显低于健康组和MAP组($\times 10^9/L$: 8.5 ± 1.1 比 15.7 ± 2.8 、 12.4 ± 1.9 , 均 $P < 0.01$)。 H_2S 与FⅧ、vWF、TF、TNF- α 、PAR-1呈显著正相关(r 值分别为0.56、0.61、0.72、0.66、0.64, 均 $P < 0.01$), 与PLG、AT呈显著负相关(r 值分别为-0.64、-0.57, 均 $P < 0.01$)。**结论** AP患者内源性 H_2S 可上调TF、TNF- α 、PAR-1表达水平,从而介导AP患者的凝血功能障碍。

【关键词】 胰腺炎,急性; 硫化氢; 凝血功能; 肿瘤坏死因子- α ; 蛋白酶激活受体-1

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81201672); 浙江省义乌市引进人才立项项目(2012-R-04)

Change in endogenous hydrogen sulfide in patients with acute pancreatitis and its relationship to coagulation function Lu Genlin, Wu Aibing, Wang Hongbin

The First Department of General Surgery, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, Zhejiang, China (Lu GL); Oncology Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 523808, Guangdong, China (Wu AB); Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai, China (Wang HB)
Corresponding author: Lu Genlin, Email: lugenlin007@163.com

【Abstract】 Objective To study the change in endogenous hydrogen sulfide (H_2S) in patients with acute pancreatitis and its relationship to coagulation function. **Methods** A prospective case control study was conducted. Forty patients with mild acute pancreatitis (MAP group) and 40 with severe acute pancreatitis (SAP group) admitted to Yiwu Central Hospital in Zhejiang Province from December 2002 to March 2015 were enrolled. Forty healthy persons served as control (healthy control group). Blood was collected to determine the levels of H_2S , blood coagulation factor Ⅷ (FⅧ), von Willebrand factor (vWF), plasminogen (PLG), antithrombin (AT), platelet count (PLT), tissue factor (TF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and protease activated receptor-1 (PAR-1). The correlations among the above parameters were analyzed. **Results** There was no statistical significance in sex, age, body weight and time of disease among three groups, indicating it was comparable among the groups. Compared with healthy control group, the levels of H_2S , FⅧ, vWF, TF, TNF- α , and PAR-1 in MAP and SAP groups were significantly elevated [H_2S ($\mu\text{mol/L}$): 67.42 ± 6.34 , 112.47 ± 12.69 vs. 42.57 ± 4.18 , FⅧ: (67.5 ± 5.8)%, (82.3 ± 4.7)% vs. (57.2 ± 6.4)%, vWF: (112.6 ± 9.7)%, (142.5 ± 12.5)% vs. (76.4 ± 8.2)%, TF (ng/L): 45.27 ± 4.34 , 64.76 ± 6.25 vs. 18.15 ± 1.89 , TNF- α (ng/L): 197.67 ± 13.62 , 324.72 ± 25.54 vs. 20.08 ± 2.57 , PAR-1 (fluorescence intensity): 32.16 ± 4.43 , 56.12 ± 7.07 vs. 12.27 ± 2.12 , all $P < 0.01$], plasma PLG, AT activity significantly decreased [PLG: (52.4 ± 4.7)%, (36.7 ± 3.2)% vs. (62.1 ± 5.6)%, AT: (43.2 ± 6.9)%, (35.5 ± 5.4)% vs. (53.6 ± 6.1)%, all $P < 0.01$], and SAP group each index increase or decrease compared with MAP group was more significant (all $P < 0.01$). SAP group PLT was significantly lower than healthy control group and MAP group ($\times 10^9/L$: 8.5 ± 1.1 vs. 15.7 ± 2.8 , 12.4 ± 1.9 , all $P < 0.01$). H_2S was significantly positively correlated with FⅧ, vWF, TF, TNF- α , PAR-1 (r values were 0.56, 0.61, 0.72, 0.66, 0.64, all $P < 0.01$), and PLG, AT was significantly negatively correlated (r values were -0.64, -0.57, all $P < 0.01$). **Conclusion** AP patients' endogenous H_2S can up-regulate TF, TNF- α , PAR-1 expression level, thus mediating the coagulation dysfunction of AP patients.

12.27 ± 2.12, all $P < 0.01$], and PLG and AT activity were significantly decreased [PLG: (52.4 ± 4.7)%, (36.7 ± 3.2)% vs. (62.1 ± 5.6)%, AT: (43.2 ± 6.9)%, (35.5 ± 5.4)% vs. (53.6 ± 6.1)%, all $P < 0.01$]. The changes in the parameters in SAP group were more remarkable than those in MAP group (all $P < 0.01$). PLT in SAP group was significantly lower than that in healthy control and MAP groups ($\times 10^9/L$: 8.5 ± 1.1 vs. 15.7 ± 2.8, 12.4 ± 1.9, both $P < 0.01$). H₂S was positively correlated with FVIII, vWF, TF, TNF- α , and PAR-1 (r value was 0.56, 0.61, 0.72, 0.66, 0.64, respectively, all $P < 0.01$), and it was negatively correlated with PLG and AT (r value was -0.64, -0.57, both $P < 0.01$). **Conclusion** As an inflammatory factor, endogenous H₂S deteriorates coagulation function in patients with acute pancreatitis by up-regulating TF, TNF- α , and PAR-1.

【Key words】 Acute pancreatitis; Hydrogen sulfide; Coagulation function; Tumor necrosis factor- α ; Protease activated receptor-1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81201672); Yiwu Talent Introduction Project of Zhejiang Province (2012-R-04)

硫化氢(H₂S)由胱硫醚- β -合成酶、胱硫醚- γ -裂解酶催化L-半胱氨酸代谢产生^[1-2]。H₂S预处理可明显改善组织因子(TF)诱导的弥散性血管内凝血(DIC)家兔凝血,减少纤维蛋白原(FDP)生成及改善肠系膜微循环^[3]。急性胰腺炎(AP)常伴凝血功能障碍。H₂S是AP发病机制中的炎性因子^[4-5],但对AP患者凝血功能的影响及其可能机制国内外鲜见报道。本研究通过分析AP患者内源性H₂S水平与凝血指标的相关性,探讨其作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料:采用前瞻性病例对照研究方法,选取2002年12月至2015年3月义乌市中心医院住院的轻症急性胰腺炎(MAP组)、重症急性胰腺炎(SAP组)患者各40例,并以同期健康体检者40例作为对照(健康组)。

1.1.1 纳入标准:有上腹痛、腹胀、恶心、呕吐等临床症状,上腹压痛等腹部体征,血、尿淀粉酶升高,增强CT见胰腺周围渗出、坏死,符合AP诊断标准^[6]。

1.1.2 排除标准:有高血压、肺心病、慢性支气管炎、冠心病、肺气肿、糖尿病等基础疾病的患者。

1.1.3 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,经医院伦理委员会审核批准,所有检测及治疗均取得患者或家属的知情同意。

1.2 检测指标及方法:AP组于入院次日取空腹静脉血,健康组体检时空腹采血,血标本肝素抗凝。

1.2.1 血浆H₂S浓度检测:采用敏感硫电极法^[1-2,5]测定血浆H₂S浓度。

1.2.2 凝血功能检测:用Sysmex CA-1500自动血凝仪检测血浆抗凝血酶(AT)、纤溶酶原(PLG)、凝血因子VIII(FVIII)活性及血管性血友病因子(vWF)含量;用血细胞分析仪测定血小板计数(PLT)。

1.2.3 血浆TF、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量

检测:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测。

1.2.4 单核细胞蛋白激酶受体-1(PAR-1)表达检测^[7]:采集外周血单核细胞,于细胞悬液中加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠PAR-1抗体,4℃避光孵育15 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,流式细胞仪检测其平均荧光强度。

1.3 统计学处理:使用SPSS 13.0软件处理数据,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,多样本均数间两两比较采用 q 检验,两样本均数比较采用独立样本 t 检验;计数资料间比较采用 χ^2 检验;相关性采用直线相关分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料比较(表1):3组研究对象间性别、年龄、体质量比较差异均无统计学意义;MAP组与SAP组患者间病程差异也无统计学意义(均 $P > 0.05$),说明基线资料均衡,具有可比性。

表1 各组研究对象一般临床资料比较

组别	例数 (例)	性别(例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	体质量 (kg, $\bar{x} \pm s$)	病程 (h, $\bar{x} \pm s$)
		男性	女性			
健康组	40	24	16	52.8 ± 12.4	54.2 ± 5.9	
MAP组	40	22	18	51.2 ± 14.2	55.4 ± 8.7	27.8 ± 8.6
SAP组	40	25	15	48.9 ± 9.4	51.4 ± 9.8	26.4 ± 9.2

注:MAP为轻症急性胰腺炎,SAP为重症急性胰腺炎;空白代表无此项

2.2 各组H₂S和凝血功能比较(表2):MAP组、SAP组血浆H₂S、FVIII、vWF均显著高于健康组,PLG、AT活性显著低于健康组(均 $P < 0.01$),且SAP组血浆H₂S、FVIII、vWF均较MAP组进一步升高,PLG、AT活性较MAP组进一步降低(均 $P < 0.01$)。SAP组PLT明显低于健康组和MAP组(均 $P < 0.01$)。

表 2 各组研究对象血浆 H₂S、FⅧ、vWF、PLG、AT 和 PLT 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	H ₂ S(μmol/L)	FⅧ(%)	vWF(%)
健康组	40	42.57 ± 4.18	57.2 ± 6.4	76.4 ± 8.2
MAP 组	40	67.42 ± 6.34 ^a	67.5 ± 5.8 ^a	112.6 ± 9.7 ^a
SAP 组	40	112.47 ± 12.69 ^{ab}	82.3 ± 4.7 ^{ab}	142.5 ± 12.5 ^{ab}

组别	例数(例)	PLG(%)	AT(%)	PLT(×10 ⁹ /L)
健康组	40	62.1 ± 5.6	53.6 ± 6.1	15.7 ± 2.8
MAP 组	40	52.4 ± 4.7 ^a	43.2 ± 6.9 ^a	12.4 ± 1.9
SAP 组	40	36.7 ± 3.2 ^{ab}	35.5 ± 5.4 ^{ab}	8.5 ± 1.1 ^{ab}

注: MAP 为轻症急性胰腺炎, SAP 为重症急性胰腺炎, H₂S 为硫化氢, FⅧ为凝血因子Ⅷ, vWF 为血管性血友病因子, PLG 为纤溶酶原, AT 为抗凝血酶, PLT 为血小板计数;与健康组比较, ^a $P < 0.01$;与 MAP 组比较, ^b $P < 0.01$

2.3 各组血浆 TF、TNF-α 和单核细胞 PAR-1 比较(表 3): MAP 组、SAP 组血浆 TF、TNF-α 含量及单核细胞 PAR-1 荧光强度均显著高于健康组,且 SAP 组各指标较 MAP 组进一步升高(均 $P < 0.01$)。

表 3 各组研究对象血浆 TF、TNF-α 和单核细胞 PAR-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	TF(ng/L)	TNF-α(ng/L)	PAR-1(荧光强度)
健康组	40	18.15 ± 1.89	20.08 ± 2.57	12.27 ± 2.12
MAP 组	40	45.27 ± 4.34 ^a	197.67 ± 13.62 ^a	32.16 ± 4.43 ^a
SAP 组	40	64.76 ± 6.25 ^{ab}	324.72 ± 25.54 ^{ab}	56.12 ± 7.07 ^{ab}

注: MAP 为轻症急性胰腺炎, SAP 为重症急性胰腺炎, TF 为组织因子, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, PAR-1 为蛋白酶激活受体-1;与健康组比较, ^a $P < 0.01$;与 MAP 组比较, ^b $P < 0.01$

2.4 相关性分析(表 4): H₂S 与 TF、TNF-α、PAR-1、FⅧ、vWF 呈显著正相关,与 PLG、AT 呈显著负相关(均 $P < 0.01$); FⅧ和 vWF 均与 TF、TNF-α、PAR-1 呈显著正相关(均 $P < 0.01$); PLG 和 AT 均与 TF、TNF-α、PAR-1 呈显著负相关(均 $P < 0.01$)。

3 讨论

细胞因子及炎性介质可介导血管内皮细胞损伤,胶原纤维暴露启动内、外凝血系统,导致凝血功能障碍^[8-10]。血中 vWF 和 FⅧ增加可反映机体同时存在血管内皮细胞损伤及凝血系统激活^[10-11]。当机体凝血功能亢进、局部发生凝血时,与纤维蛋白结合的单链糖蛋白 PLG 被组织纤溶酶原激活剂或单链尿激酶活化为纤溶酶,启动纤溶系统^[10-12]。AT 是主要生理性抗凝物质。本研究结果显示,MAP

表 4 急性胰腺炎患者各指标的相关性

指标	r 值	P 值	指标	r 值	P 值
H ₂ S 与 FⅧ	0.56	0.007	vWF 与 TF	0.61	0.008
H ₂ S 与 vWF	0.61	0.001	vWF 与 TNF-α	0.58	0.003
H ₂ S 与 PLG	-0.64	0.003	vWF 与 PAR-1	0.56	0.002
H ₂ S 与 AT	-0.57	0.009	PLG 与 TF	-0.57	0.006
H ₂ S 与 TF	0.72	0.004	PLG 与 TNF-α	-0.57	0.005
H ₂ S 与 TNF-α	0.66	0.001	PLG 与 PAR-1	-0.65	0.007
H ₂ S 与 PAR-1	0.64	0.005	AT 与 TF	-0.74	0.004
FⅧ与 TF	0.57	0.001	AT 与 TNF-α	-0.72	0.001
FⅧ与 TNF-α	0.62	0.006	AT 与 PAR-1	-0.63	0.009
FⅧ与 PAR-1	0.52	0.002			

注: H₂S 为硫化氢, FⅧ为凝血因子Ⅷ, vWF 为血管性血友病因子, PLG 为纤溶酶原, AT 为抗凝血酶, TF 为组织因子, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, PAR-1 为蛋白酶激活受体-1

组、SAP 组血浆 FⅧ、vWF 显著高于健康组, PLG、AT 活性显著低于健康组,且 SAP 组各指标升高或降低较 MAP 组更为显著; SAP 组 PLT 明显低于健康组和 MAP 组。表明 AP 患者存在血管内皮细胞损伤和凝血、纤溶系统激活,表现为凝血功能障碍,病情越重,凝血功能障碍越明显。

TNF-α 主要由血管内皮细胞、淋巴细胞和巨噬细胞合成与分泌^[13-14]。以 TNF-α 等促炎因子大量释放为特征的过度炎症反应综合征,最终可引起机体免疫调节失衡,促使多器官功能障碍综合征(MODS)的发生^[15]。本研究发现, MAP 组、SAP 组血浆 TNF-α 含量显著升高,与文献^[5]报道结果一致。机体在感染等致病因子的刺激下, TF 表达上调,启动内、外凝血途径激活凝血系统; TF 与 FⅧ结合形成 TF-FⅧα 复合物并激活凝血酶原形成凝血酶; TF-FⅧα 复合物和凝血酶又可以结合单核细胞 PAR-1 引起 TNF-α 的合成与释放^[7]。TNF-α 激活细胞因子级联反应,诱导 TF 表达,加剧炎症级联与凝血反应的恶性循环^[7]。本研究结果显示, MAP 组、SAP 组血浆 TF、TNF-α 含量及单核细胞 PAR-1 表达均显著高于健康组,且 SAP 组各指标较 MAP 组进一步升高;相关分析显示, TF、TNF-α、PAR-1 分别与 FⅧ、vWF 呈显著正相关,分别与 PLG、AT 呈显著负相关。说明 AP 病情越严重, TF、TNF-α、PAR-1 表达量越高,凝血功能障碍越明显。

H₂S 是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的第三气体信号分子, H₂S 预处理可明显改善组织因子诱导的 DIC 家兔凝血、减少 FDP 生成及改善肠

系膜微循环^[3]。本研究发现, MAP组、SAP组血浆H₂S浓度均高于健康组,且SAP组较MAP组进一步升高;相关分析显示, H₂S与FⅧ、vWF、TNF- α 呈显著正相关,与PLG、AT呈显著负相关,提示H₂S浓度越高, AP病情越重,凝血功能障碍越明显;本研究还发现, H₂S与TF、PAR-1呈显著正相关,提示AP时内源性H₂S可上调TF、TNF- α 、PAR-1表达,介导凝血功能障碍。临床上能否通过降低血中H₂S浓度来治疗AP并纠正凝血功能障碍,还有待于进一步研究明确。

参考文献

- [1] 卢根林, 闫兴军, 邓勇, 等. 硫化氢在肠缺血-再灌注损伤大鼠肝功能障碍中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(7): 907-910. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2010.07.023.
- [2] 闫兴军, 卢根林, 邓勇. 硫化氢在肠缺血-再灌注损伤大鼠肠黏膜屏障功能障碍中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(1): 71-74. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2010.01.029.
- [3] 陆晓华, 李伟, 王国光, 等. 硫化氢对组织因子诱导的家兔弥散性血管内凝血的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(2): 92-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.003.
- [4] Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as a mediator of inflammation in acute pancreatitis: in vitro studies using isolated mouse pancreatic acinar cells [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(2): 315-326. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00024.x.
- [5] 黄惊鸿, 卢根林, 斯伟宏, 等. 硫化氢在重症急性胰腺炎患者血浆中的表达及意义[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, 18(1): 25-27. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2012.01.007.
- [6] 方裕强, 吴丽颖, 程礼, 等. 急性胰腺炎诊治指南(二)[J]. 中华胰腺病杂志, 2002, 2(2): 103-109. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2002.02.014.
- [7] 归咏刚, 姚咏明, 柴艳芬. 血必净注射液对脓毒症大鼠单核细胞组织因子及凝血功能的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(1): 32-34. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2010.01.013.
- [8] 张平平, 王庆树, 李志军, 等. 血必净注射液对脓毒症患者凝血功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(3): 198-200. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.010.
- [9] 韩宇, 高传玉, 秦秉玉, 等. 抗凝治疗对脓毒症凝血和炎症指标的影响及其意义[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(2): 102-105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.005.
- [10] 孙艺铸, 王静, 于鲁欣, 等. 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ /核转录因子- κ B转导通路在脓毒症所致凝血功能障碍中的作用[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(6): 520-524. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.020.
- [11] 李旭, 马晓春. 脓毒症内皮细胞损伤和凝血功能障碍相关的生物标志物[J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23(2): 117-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.02.019.
- [12] 李敏, 孙黔云, 赵琼, 等. 补体旁路过度激活影响体内凝血功能[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 39-44. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2014.01.010.
- [13] 赵明亮, 杨细平, 田竺, 等. 亚低温联合依达拉奉对重型颅脑创伤患者脑脊液肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-6表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(4): 258-261. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.04.008.
- [14] 张志远, 尤胜义, 于乐昌, 等. 参芪扶正注射液对脓毒症患者免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22(3): 276-280. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.012.
- [15] 毛岸荣, 黄河, 丁科, 等. 肿瘤坏死因子- α 对多器官功能障碍综合征家猪内皮细胞调控机制的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(6): 494-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.015.

(收稿日期: 2015-07-13)

(本文编辑: 保健媛, 李银平)