

蛇毒血凝酶在肺癌根治术中的止血效果分析及其对凝血酶受体-1的影响

沈国满

(青海大学附属医院 药剂科,青海 西宁 810001)

[摘要] **目的** 探讨蛇毒血凝酶在肺癌根治术中的止血效果及其对凝血酶受体-1 (protease-activated receptor-1, PAR-1) 的影响。**方法** 选取 86 例经病理证实为肺癌患者,随机分为观察组和对照组,其中对照组采用止血敏,观察组采用蛇毒血凝酶,分别在手术前后测定出血量,凝血系统相关因子,采用酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA) 测定 P-选择素,流式细胞术测定血小板 PAR-1, Western blot 测定肺癌组织中 PAR-1 的表达情况,对所得数据采用统计学分析。**结果** 观察组在术中及术后 2d 出血量,显著低于对照组,差异具有统计学差异 ($P < 0.05$); 流式细胞术检测结果发现,观察组中组内不同时间段 PAR-1 阳性率及 P-选择素无统计学意义,同对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$); Western Blot 检测发现蛇毒血凝酶对肺癌患者组织中 PAR-1 影响不明显,而对照组具有统计学差异 ($P < 0.05$)。**结论** 蛇毒血凝酶在肺癌根治术中可以减少出血量,对凝血系统作用较为稳定,对 P-选择素和 PAR-1 影响较小,这一结果提示蛇毒血凝酶可能在肺癌根治术患者止血过程中不会使患者出现全身血液高凝状态,即不会导致凝血酶受体高表达从而引起的肿瘤细胞转移。

[关键词] 蛇毒血凝酶;肺癌根治术;止血;凝血酶受体-1

[中图分类号] R656 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-1678(2014)04-0070-03

The hemostatic effect of hemocoagulase in lung cancer radical surgery analysis and its effect on PAR-1

SHEN Guo-man

(Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate hemocoagulase hemostatic effect in lung cancer radical surgery and its effect on protease-activated receptor-1 (PAR-1). **Methods** 86 cases of pathologically confirmed lung cancer patients were randomly divided into control group and observation group, which controls were used etamsylate, observation group were used hemocoagulase, then to measure the amount of bleeding, clotting system-related factors before and after surgery, using ELISA assay to detect P-selectin, flow cytometry to measure platelet PAR-1, Western Blot to determine lung tissue expression of PAR-1, and the resulting data were statistically analyzed. **Results** The blood loss of observation group during surgery and postoperative 2d compared with the control group, had a significant difference ($P < 0.05$); flow cytometry results showed that, PAR-1-positive rate and P-selectin in different time periods in observation group were no statistically significant, while had a statistically significant compared with control group ($P < 0.05$); Western Blot detected hemocoagulase of lung tissue in patients with PAR-1 had no obvious effect, while control group had significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Venin hemocoagulase in lung cancer radical surgery can reduce the amount of bleeding, and be more stable for the role of the coagulation system, as well as less effect on the P-selectin and PAR-1. The results suggest that vonin hemocoagulase might not make patients with systemic hypercoagulable state in patients undergoing radical process with lung cancer, in other words it might not lead to PAR-1 highly expression to cause tumor cell metastasis.

[Keywords] hemocoagulase; radical surgery of lung cancer; hemostatic; protease-activated receptor-1

肺癌组织在周围释放激肽释放酶导致周围细胞炎性因子以及弹性蛋白酶释放增加,因此在肺癌根治术中渗出的血液很难凝固,此外肺癌病灶部位与胸壁黏连,在手术清扫淋巴结时创面

出血更多^[1]。蛇毒血凝酶的主要成分为广西圆斑蝥蛇蛇毒的提取物,在临床上主要用于出血性疾病的治疗,临床研究显示该药可以明显缩短出血时间,减少出血量,且不会形成血栓,出现内凝血现象^[2]。蛇毒血凝酶能促进血液凝固,但是凝血系统中诸多分子是肿瘤细胞发生、转移的关键因素,凝血酶受体-1 (protease-activated receptor-1, PAR-1) 是肿瘤细胞转移的主要分之一^[3-4]。蛇毒血凝酶在肺癌根治术中对 PAR-1 的影响值得研究。本研究

资助项目:国家自然科学基金(21002025)

作者简介:沈国满,男,本科,主治医师,研究方向:蛇毒血凝酶及其药物研究, E-mail: 704420757@qq.com.

采用蛇毒凝血酶对肺癌根治术患者凝血系统以及 PAR-1 的影响,初步探讨蛇毒凝血酶在肺癌根治术中使用的安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2010年2月~2013年12月青海大学附属医院就诊的86例患者,经病理检测证实为肺癌。其中男性患者48例,女性患者38例;年龄42~74岁,平均年龄为(59.1±6.1)岁。患者在手术前行ASA评分均为I-II级,且均无肝、肾功能以及凝血功能异常,在手术前也未服用过止血或者抗凝相关药物。患者在接受研究和手术前均签订知情同意书并经医院伦理委员会同意。采用随机数字表示法,患者被分为2组:对照组和观察组,其中对照组采用止血敏,每组40例;观察组采用蛇毒凝血酶。2组患者在年龄、性别、体重以及凝血功能方面均无统计学差异,具有可比性。另外6例患者不愿接受止血药物采用的是生理盐水进行简单对照。手术均由同一组医师完成。另需要排除以下情况:①患者近1个月内服用过抗凝血药物或者止血相关药物;②合并心脑血管疾病的患者;③因其他原因不能行手术的患者。

1.2 方法 对照组:患者在手术前半小时按照0.5 g/mL生理盐水中静脉注射,手术结束后每天给予酚磺乙胺止血敏(湖北中佳药业有限公司,国药准字H42020621)0.5 g/mL,连续2d。观察组:术前半小时内静脉注射蛇毒凝血酶[兆科药业(合肥)有限公司,国药准字H20060895]2 ku,术后仍给予蛇毒凝血酶2 ku/d,连续2d。

1.3 观察指标 2组患者分别在术前24 h(T₁)、术后20 min内(T₂)、术后24 h(T₃)及48 h(T₄)抽取静脉血,所有血样采用自动凝血分析仪测定凝血酶原时间(prothrombin time,PT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、活化部分凝血酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、D-D二聚体、血小板计数及聚集率。记录手术所需时间,测量肺癌根治术中以及手术后3d出血量。采用流式细胞仪测定血小板 PAR-1、ELISA试剂盒测定血浆中P-选择素以及Western blot测定肺癌组织中PAR-1。

1.4 统计学方法 采用SPSS17.0统计软件包以及ImageJ4.2对数据以及图片进行处理;对正态计量数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用t检验,计数资料采用卡方检验。所有数据通过统计学比较,以P<0.05作为具有显著性差异的判断标准。

2 结果

2.1 2组患者出血量、手术时间情况比较 通过表1显示,对照组与观察组手术时间分别为(149.1±43.8)min和(152.6±46.2)min,2组相比较差异无统计学意义;观察组术中出血量显著低于对照组,差异具有统计学意义(P<0.05);术后1d、2d,观察组术中出血量显著低于对照组,2组相比具有显著性差异(P<0.01),术后3d,2组相比无显著性差异(见表1)。

表1 2组患者出血量、手术时间情况比较

Tab.1 Comparison of the amount of bleeding and operative time in two groups

组别	手术时间 (min)	出血量(mL)			
		术中	术后1d	术后2d	术后3d
对照组	152.6±46.2	116.6±29.4	141.8±30.6	134.5±22.9	108.6±21.4
观察组	149.1±43.8	99.3±21.5*	119.7±23.7**	107.2±26.3**	101.7±19.9

*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较, compared with control group

2.2 凝血相关指标变化情况 通过表2发现,观察组的PT、APTT在T₃时间段相对于T₁差异具有统计学意义(P<0.05),D-D二聚体T₄相对于T₁差异具有统计学意义(P<0.05)。对照组PT、APTT、FIB以及D-D二聚体在不同时间具有统计学意

义(P<0.05);而血小板计数2者无差别,组内比较也没有显著的统计学差异(见表2)。

表2 凝血相关指标变化情况

Table 2 Coagulation changes of related indicators

组别	例数	时间	凝血酶原 时间 (PT, s)	活化部分 凝血酶时 间(APTT, s)	纤维蛋白 原(FIB, μg/L)	D-D二聚体 (μg/L)	血小板计数 (×10 ⁹ /L)
对照组	40	T ₁	16.1±2.2	41.2±2.3	2.9±0.8	320.9±47.4	209.3±48.3
		T ₂	13.9±1.4*	38.9±8.1	2.1±0.9	331.5±50.3	199.7±37.9
		T ₃	15.7±1.6	41.2±6.7	2.4±1.0	344.9±46.8*	210.7±51.2
		T ₄	15.9±2.0	39.9±6.8	2.8±0.9	346.8±45.3*	214.3±44.8
观察组	40	T ₁	14.9±2.3*	38.7±4.1*	3.9±1.2	345.7±45.7*	205.2±46.6
		T ₂	13.4±1.7	35.1±7.3**	4.1±1.1*	337.8±51.5	203.9±41.8
		T ₃	12.7±2.1**	36.1±6.9**	3.7±1.0	351.9±42.8	207.8±47.1
		T ₄	14.5±1.8	36.2±7.5**	4.2±1.0*	321.8±53.0**	211.5±50.2

*P<0.05, 与对照组比较, compared with control group; **P<0.05, 组内与T₁比较, compared with T₁ within group

2.3 各时间段血清中PAR1、P-选择素变化情况 通过表3显示,对照组中PAR-1在血清中表达,手术治疗前(即T₁),相对T₃具有统计学意义(P<0.05)。观察组PAR-1和P-选择素在血清中表达,手术治疗前后并不具有统计学意义;观察组PAR1在T₁、T₂相对于对照组T₁、T₂具有统计学意义(P<0.05),而P-选择素在T₂、T₃具有统计学意义(P<0.05,见表3)。

表3 各时间段血清中PAR1、P-选择素变化情况

Tab.3 Changes of the serum PAR1, P-selectin expression at each time

组别	项目	T ₁	T ₂	T ₃
对照组	PAR1 阳性率(%)	33.2±5.1	24.6±4.8	17.1±4.2*
	P-选择素(ng/L)	112.3±34.5	115.9±29.8	124.5±28.8
观察组	PAR1 阳性率(%)	11.2±1.7*	9.5±1.1*	10.5±0.9
	P-选择素(ng/L)	107.4±31.8	100.5±22.7*	109.8±23.8*

*P<0.05, 与对照组比较, compared with control group; **P<0.05, 组内与T₁比较, compared with T₁ within group

2.4 Western Blot检测肺癌组织中PAR1的表达情况 通过Western Blot比较分析我们发现,蛇毒凝血酶对患者肺癌组织的影响较小,同生理盐水组相比较无统计学意义。而止血敏对对照组同生理盐水组比较具有显著性差异(P<0.05,见图1)。

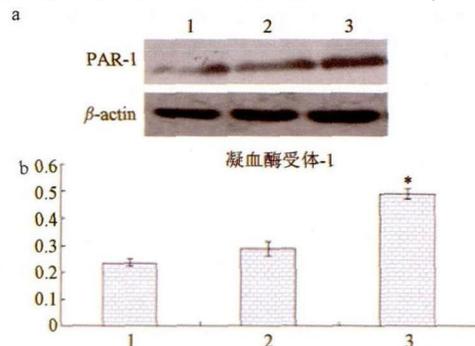


图1 Western Blot检测组织中PAR1表达情况和灰度值分析

a. PAR1表达情况; b. PAR1灰度值分析

1. 生理盐水组; 2. 蛇毒凝血酶观察组; 3. 止血敏对照组

*P<0.05, 与生理盐水组比较

Fig.1 Analysis of gray value of tissue PAR1 by Western Blot detection

a. Western Blot results; b. Protein luminance ratio results

1. saline group; 2. hemocoagulase observation group; 3. dicyclone control group

*P<0.05, compared with saline group

3 讨论

目前有研究显示^[7],癌周组织出现的异常血管新生是导致癌细胞转移扩散的重要因素。异常血管新生导致癌周微血管密度增加,增加了癌症手术的治疗风险^[8]。因此在癌症手术中常常因为出血而导致手术时间延长、有的甚至大出血而死亡。本研究显示,蛇毒血凝酶在手术中具有显著降低出血量且具有统计学意义($P < 0.05$),手术后前两天的出血量相对于对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在对患者凝血功能的影响指标中,发现蛇毒血凝酶与对照组相比,凝血酶原时间以及活化部分凝血酶时间具有统计学差异($P < 0.05$),而纤维原蛋白、血小板计数以及D-D二聚体2者相比较并无显著性差异。观察组中各时间段凝血功能相关指标较为稳定。我们初步断定蛇毒血凝酶在整个手术期间以及术后恢复中能够产生明显的止血效果,可能与其对凝血功能的影响要强于止血敏的效果。从蛇毒血凝酶对手术时间中的出血量以及凝血功能的影响来看,蛇毒血凝酶在肺癌根治术中应用是可行的。

血小板的生理功能主要是参与血栓的形成和止血,任何凝血过程都会涉及到血小板的活化^[9],血小板表面表达 PAR-1 以及凝血酶受体-4,其中凝血酶最易与 PAR-1 结合而发挥凝血效果^[10],凝血系统的多种因子参与了肿瘤的发生发展^[11]。目前大多数学者认为凝血酶受体对于肿瘤的发生、发展,尤其是癌细胞转移上占有很重要的作用^[12]。蛇毒血凝酶在外科手术中的应用非常广泛,那么在癌症手术中是否可以应用是值得研究和探讨的^[13]。为了进一步研究蛇毒血凝酶在肺癌根治术中应用的安全性以及对肺癌患者本身凝血系统等是否会造成影响,本文初步研究了蛇毒血凝酶对癌症患者组织中 PAR-1 的影响。采用流式细胞术检测血小板 PAR-1,结果显示,患者血小板 PAR-1 的表达并未出现明显升高的现象,尤其与止血敏比较,具有非常显著的差异。这一研究结果提示,蛇毒血凝酶在肺癌根治术中应用尤其是止血方面是安全有效的。

目前一些止血药物应用不慎容易出现血栓,有研究报道蛇毒血凝酶在临床应用上不仅可以达到止血的效果,而且可以避免血栓的形成,其原因主要是蛇毒血凝酶只在出血部位止血,而并不会打破凝血-纤溶系统的平衡,因而不会引起正常血管内凝血^[14]。通过研究显示^[15],蛇毒血凝酶对凝血酶原时间以及活化部分凝血酶时间的作用相对于对照组具有统计学差异($P < 0.05$),其时间相对于对照组时间较短,这一结果提示蛇毒血凝酶能更快发挥止血效果。P-选择素与 PAR-1 表达呈正相关,其表达使血小板和内皮细胞大量激活,从而使肿瘤患者血液处于高凝状态并诱导肿瘤细胞与血小板、血管内皮细胞相互作用,进一步诱导肿瘤细胞的生长以及转移。因此,本研究选取 P-选择素作为指标,主要是在考察蛇毒血凝酶对血小板活化的影响,从而分析蛇毒血凝酶是否会造成患者血液处于高凝状态甚至血栓。通过研究结果显示,蛇毒血凝酶对肺癌根治术患者血浆中 P-选择素影响较小,与对照组比较具有统计学意义($P < 0.05$)。值得提出的是本研究并未探讨蛇毒血凝酶对肿瘤转移的影响,尤其是对肿瘤细胞的影响。后期可以从蛇毒血凝酶对肿瘤细胞是否有影响这一角度入手,从而开发出在癌症手术中有效安全的止血药物提供依据。

总之,通过研究显示,蛇毒血凝酶在肺癌根治术中可以减少

出血量,对凝血系统影响较小,通过对 P-选择素和 PAR-1 进行检测,发现蛇毒血凝酶对其影响较小,这一结果提示蛇毒血凝酶可能在肺癌根治术患者止血过程中不会使患者出现全身血液高凝状态,即不会导致凝血酶受体高表达从而引起的肿瘤细胞转移的可能。CP

参考文献

- [1] 曾其毅. 经纤支镜注入立止血治疗肺癌纤支镜活检后出血疗效观察[J]. 航空航天医学杂志, 2011, 22(11): 1351-1353.
- [2] 许航宇, 舒海荣. 白眉蛇毒血凝酶在内镜鼻窦手术中的止血效果[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(1): 54-57.
- [3] Franchini M, Montagnana M, Favaloro EJ, et al. The bidirectional relationship of cancer and hemostasis and the potential role of anticoagulant therapy in moderating thrombosis and cancer spread[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35(7): 644-653.
- [4] Hansen KK, Oikonomopoulou K, Li Y, et al. proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of cancer and diseases of the cardiovascular, musculoskeletal, nervous and gastrointestinal systems[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2008, 377(4-6): 377-379.
- [5] 凌琪, 郭一军, 陈斌鑫. 醋酸去氨加压素和蛇毒血凝酶在胃癌根治术围手术期止血作用的对比研究[J]. 中华普通外科杂志, 2008, 23(12): 971-973.
- [6] 张军, 柳苍生, 王生华, 等. 蛇毒血凝酶对肺结核患者术中出血量与凝血功能的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(40): 71-72.
- [7] 朱蕴兰, 李爽, 于丰源, 等. 凝血酶受体在多发性骨髓瘤细胞 XG-1 增殖和抗凋亡作用中的机制[J]. 苏州大学学报(医学版), 2010, 30(1): 15-18.
- [8] 姜亚军, 常诚, 张琳, 等. 脑出血后脑组织内凝血酶受体 1 (PAR1) 的表达及其病理意义[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(2): 100-103.
- [9] 王征, 耿平, 左丽, 等. 肿瘤化疗患者 P-选择素、TF 状态及川芎嗪对其影响的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 912-914.
- [10] St Hill CA. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis [J]. *Front Biosci*, 2011, 1(17): 3233-3251.
- [11] Schwock J, Dhani N, Hedley DW. Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth factor and metastasis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(1): 77-79.
- [12] 吕骅, 朱明炜, 崔红元, 等. 白眉蛇毒血凝酶对老年腹腔镜胆囊切除患者的止血作用和安全性探讨[J]. 中华老年医学杂志, 2013, 32(4): 393-397.
- [13] 费建文, 姜俊杰, 周冬梅, 等. 老年人关节置换术后静脉血栓栓塞症的防治[J]. 中华老年医学杂志, 2012, 31: 136-139.
- [14] Wei JM, Zhu MW, Zhang ZT, et al. A multicenter, phase III trial of hemocoagulase Agkistrodon: hemostasis, coagulation, and safety in patients undergoing abdominal surgery. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123: 589-593.
- [15] 汪宏梅. 结肠癌组织中蛋白酶活化受体-1 的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24): 3320-3323.

(编校: 谭玲)