

• 论著 •

低分子肝素和阿司匹林对急性肺损伤的治疗作用

栾正刚 娜拉·普鲁 章志丹 马晓春

【摘要】 目的 探讨核转录因子- κ B(NF- κ B)活化对急性肺损伤(ALI)大鼠 P-选择素、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响,并观察低分子肝素(LMWH)和阿司匹林(ASA)对 ALI 的保护作用,并探讨其机制。**方法** 尾静脉注射内毒素制备 ALI 大鼠模型。60 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组、ALI 组、LMWH 组和 ASA 组,每组 15 只。观察 NF- κ B、ICAM-1 和 P-选择素在肺组织中的表达情况。**结果** ALI 组肺组织 NF- κ B 活性显著增强,ICAM-1、P-选择素明显表达于血管内皮细胞和支气管上皮细胞膜(P 均 <0.05);LMWH 组和 ASA 组 NF- κ B、ICAM-1、P-选择素活性降低,炎症反应和病理损伤明显减轻,ASA 组治疗效果优于 LMWH 组(P 均 <0.05)。**结论** NF- κ B 活化在 ALI 发病机制中起作用,NF- κ B 参与活化中性粒细胞、血管内皮细胞等多种炎症细胞,并且调控 ICAM-1、P-选择素基因的表达进而造成肺组织损伤。LMWH 通过改善微循环,间接抑制 NF- κ B 活化,减少中性粒细胞及血小板的黏附进而减轻肺损伤。ASA 通过抗氧化特性直接抑制 NF- κ B 活化而减轻肺损伤。

【关键词】 肺损伤,急性; 核转录因子- κ B; 低分子肝素; 黏附分子

Therapeutic effects of low molecular weight heparin and aspirin on acute lung injury in rat LUAN Zheng-gang, NALA Pulu, ZHANG Zhi-dan, MA Xiao-chun. Department of Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

【Abstract】 Objective To investigate the possible effects of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation on the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and P-selectin in murine acute lung injury (ALI) and assess the potential beneficial effects and mechanism of low molecular weight heparin (LMWH) and aspirin (ASA). **Methods** Rat ALI model was reproduced by injection of lipopolysaccharide into tail vein. Sixty rats were divided randomly into four groups ($n=15$): normal control group, ALI group, LMWH group and ASA group. The change in NF- κ B activity in the lung to show its relation with ICAM-1 and P-selectin was observed by immunohistochemistry. **Results** Compared with normal control group, the activity of NF- κ B and the expression of ICAM-1 and P-selectin increased significantly in the lung tissue of ALI group (all $P<0.05$). Compared with ALI group, the level of NF- κ B activity and the expression of ICAM-1 and P-selectin were obviously down regulated, and also the pathological lesion and inflammatory response of lung were improved in LMWH and ASA groups. However, the therapeutic effects of ASA were stronger than those of LMWH (all $P<0.05$). **Conclusion** NF- κ B activation plays an important role in ALI. NF- κ B takes part in the activation of many kinds of inflammatory cells such as neutrophil, endothelial cells and so on, and it adjusts the genetic expression of ICAM-1 and P-selectin. LMWH and ASA show their beneficial effects on lung injury in both functional and morphological aspects. But the mechanism is different. LMWH can indirectly inhibit the activation of NF- κ B, improve lung microcirculation and decrease the adhesion of neutrophil and platelet. ASA plays the role as an inhibitor of NF- κ B activation.

【Key words】 acute lung injury; nuclear factor- κ B; low molecular weight heparin; adhesion molecular

目前的研究表明,机体在遭受各种严重损伤后可引起全身炎症反应综合征(SIRS),而导致急性肺损伤(ALI)的发生,其中由感染所引起的 SIRS 是引起 ALI 的最常见病因。我们通过建立 ALI 动物模型,观察核转录因子- κ B(NF- κ B)活化在 ALI 中的作用及其对细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和 P-选择素表达的影响,同时观察阿司匹林(ASA)和低分

子肝素(LMWH)对 ALI 的保护作用,并探讨其相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂:健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 200~250 g(由中国医科大学动物中心提供)。内毒素(LPS)、ASA 购自美国 Sigma 公司,LMWH 购自法国赛诺菲-温莎公司。NF- κ B(P65)和 ICAM-1、P-选择素一抗、免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。髓过氧化物酶(MPO)、血清丙二醛(MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20042084)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院 ICU

作者简介:栾正刚(1976-),男(汉族),辽宁沈阳人,医学博士,医师。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与 ALI 模型制备:将 60 只大鼠按随机数字表法分成正常对照组、ALI 组、LMWH 组和 ASA 组,每组 15 只。先用体积分数为 75% 的乙醇洗鼠尾,再涂适量二甲苯,待尾静脉充盈可辨时,即从尾静脉注射 LPS 5 mg/kg 制备 ALI 模型。LMWH 组制模后立即皮下注射 LMWH 1 U/g, ASA 组制模后立即腹腔注射 ASA 100 mg/kg,正常对照组、ALI 组腹腔注入等量生理盐水。

1.2.2 观察指标:模型成功后 6 h,取材待测。

1.2.2.1 动脉血氧分压(PaO₂):血气分析仪测定。

1.2.2.2 血清 MDA:采用分光光度法测定。

1.2.2.3 肺组织病理学变化:光镜下观察。

1.2.2.4 肺组织 MPO 活性:比色法测定。

1.2.2.5 肺组织 NF-κB、ICAM-1 和 P-选择素活性检测:石蜡切片,常规处理。按试剂盒说明行卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC)染色,一抗用兔抗大鼠 NF-κB P65 抗体,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。NF-κB 活化后,单核/巨噬细胞、中性粒细胞(PMN)、内皮细胞核染有黄褐色颗粒者定为阳性;ICAM-1、P-选择素主要在血管内皮细胞和支气管上皮细胞膜上,染有黄褐色颗粒为阳性。图像分析以积分吸光度(OA)值表示 NF-κB、ICAM-1 和 P-选择素表达强度。

1.3 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计分析软件对数据进行处理,采用单因素方差分析和 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学检查:光镜下,正常对照组肺组织结构清晰,肺泡壁完整,肺间质无渗出。ALI 组肺内小血管及肺泡隔毛细血管扩张充血,肺泡壁破裂,肺泡隔及肺泡腔内出血,肺泡塌陷实变,肺间质水肿、肺泡隔增宽,小血管周围、肺泡隔及肺泡腔内单核/巨噬细胞增多,肺泡和肺间质中有大量 PMN 浸润。LMWH 组和 ASA 组肺组织病理改变明显减轻,可见轻度肺水肿,少见出血,肺间质充血、水肿明显减轻,肺泡和肺间质 PMN 浸润减少。

2.2 各组 PaO₂、血清 MDA 含量、肺组织 MPO 活性的变化(表 1):ALI 组血清 MDA、肺组织 MPO 活性均明显高于正常对照组,PaO₂ 明显低于正常对照组 (*P* 均 < 0.05); LMWH 组和 ASA 组血清 MDA、肺组织 MPO 活性均明显高于正常对照组,但低于 ALI 组,PaO₂ 改善明显,且 ASA 组的干预

效果要明显优于 LMWH 组 (*P* 均 < 0.05)。

表 1 PaO₂、血清 MDA 含量和肺组织 MPO 活性变化($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 1 Changes of PaO₂, serum MDA content and MPO activity in lung tissue($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	PaO ₂ (mm Hg)	MDA(μmol/L)	MPO(U/g)
正常对照组	95.93±2.79	2.19±0.72	5.15±1.04
ALI 组	75.60±5.30*	10.62±1.65*	12.77±2.03*
LMWH 组	80.73±4.74* [#]	7.01±1.08* [#]	9.70±1.25* [#]
ASA 组	87.80±5.93* ^{#△}	4.23±1.16* ^{#△}	8.10±1.17* ^{#△}

注:与正常对照组比较:**P* < 0.05;与 ALI 组比较:[#]*P* < 0.05;

与 LMWH 组比较:[△]*P* < 0.05;1 mm Hg = 0.133 kPa

2.3 NF-κB、ICAM-1、P-选择素在大鼠肺组织中的表达(表 2):正常对照组 NF-κB 在部分炎症细胞和肺泡间质细胞浆中有表达,细胞核内则不表达;ALI 组 NF-κB 在浸润的单核/巨噬细胞和 PMN 核内有显著表达;LMWH 组和 ASA 组 NF-κB 在炎症细胞和肺泡间质细胞的表达明显低于 ALI 组。正常对照组 ICAM-1、P-选择素则表达阴性;ALI 组肺组织中 ICAM-1、P-选择素明显表达于血管内皮细胞和支气管上皮细胞膜;LMWH 组和 ASA 组 ICAM-1、P-选择素的表达强度低于 ALI 组。

表 2 肺组织 NF-κB 活性和 ICAM-1、P-选择素表达水平的变化($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Changes of NF-κB activity and ICAM-1, P-selectin levels in lung tissue($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	NF-κB(OA 值)	ICAM-1(OA 值)	P-选择素(OA 值)
正常对照组	5.80±1.17	2.10±0.85	3.91±1.23
ALI 组	30.53±4.22*	18.69±1.49*	16.87±1.27*
LMWH 组	19.47±3.39* [#]	10.84±1.73* [#]	11.55±1.11* [#]
ASA 组	11.49±2.70* ^{#△}	6.79±1.83* ^{#△}	8.48±1.03* ^{#△}

注:与正常对照组比较:**P* < 0.05;与 ALI 组比较:[#]*P* < 0.05;

与 LMWH 组比较:[△]*P* < 0.05

3 讨论

ALI 是由感染等多因素引起的以 PMN 浸润为主的肺组织炎症反应,伴有肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)等细胞因子和 ICAM、血管内皮黏附分子(VCAM)、P-选择素等黏附分子的过度表达^[1]。多种炎性介质的产生和肺组织的广泛损害可引起急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和多器官功能障碍综合征(MODS)。近年来的研究表明,NF-κB 与炎症反应密切相关,多种炎症介质基因启动子和增强子中存在一个或多个 κB 序列,如 TNF、IL-1 和 ICAM、VCAM、P-选择素等,活化的 NF-κB 可单独或与其他转录因子协同参与上述介质基因的诱导表达^[2]。

本实验中通过大鼠尾静脉注射 LPS 成功复制 ALI 动物模型,可观察到肺脏中有大量炎症细胞聚集,聚集的炎症细胞堵塞毛细血管致微循环障碍并释放大量炎症介质。ALI 时肺组织 MPO 及血清 MDA 均明显升高,提示肺组织内大量 PMN 浸润及肺血管内皮细胞损伤。PMN 是创伤、休克和感染等引发的缺血/再灌注与失控性炎症反应的重要效应器,但其需与内皮细胞黏附并经内皮细胞向细胞外基质迁移,进而释放过氧化氢、超氧阴离子、蛋白水解酶等致组织损伤。

血管内皮细胞是 LPS 作用的主要靶细胞之一,可以分泌多种炎症介质和细胞因子,如前列腺素(PGs)、血栓素 A_2 (TXA₂)、一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、IL-1、TNF- α 、ICAM-1、E-选择素、P-选择素等,参与机体凝血与抗凝、免疫应答、炎症反应的调控等过程,并有调节凝血、毛细血管通透性、血管张力和白细胞黏附的作用^[3]。内皮细胞是 PMN 穿过内皮所必需的,而 PMN 通过 CD11b/CD18 与内皮细胞上的 ICAM-1、P-选择素形成牢固结合,黏附在内皮周围,可释放氧自由基、脂质代谢产物和蛋白酶等,损伤内皮细胞,增加内皮通透性,改变内皮细胞的功能。另外,内皮细胞与 PMN 黏附,或 PMN 相互黏附、聚集,造成微血管阻塞,导致缺血、缺氧进而导致器官功能损害^[4-6]。

NF- κ B 活性变化调节 ICAM-1、P-选择素的表达,进而显著影响白细胞的激活、黏附、浸润及炎症反应和组织损伤的程度。本实验结果显示,ALI 时肺组织 NF- κ B 活性显著增强,ICAM-1、P-选择素高表达,提示 ICAM 与 CD11b/CD18 的相互作用是 PMN 黏附迁移的重要因素;而 P-选择素的一过性高表达与早期炎症有关,可引起内皮细胞、血小板、PMN、单核细胞间的相互作用黏附,参与炎症与血栓的形成^[4]。

本实验中给予 LMWH 和 ASA 两种干预措施后,肺组织 MPO 和血清 MDA 均下降,PaO₂ 上升,肺组织病理变化减轻,NF- κ B 活性和 ICAM、P-选择素表达下降,而 ASA 作用明显强于 LMWH。证实 NF- κ B 活化参与了 ALI 的发病且起到关键性作用,抑制其活化可改善大鼠肺损伤。ASA 通过抑制环氧合酶的活性,阻抑致炎的 PGs 合成;ASA 是 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)激酶的特异性抑制剂,通过其抗氧化剂的特性抑制 I κ B 降解,进而抑制 NF- κ B 活化^[7-11];并在基因转录水平抑制 NF- κ B 介导的 ICAM-1、P-选择素等一系列细胞因子和炎症介质

的基因表达。

LMWH 减轻肺损伤的机制^[12,13]: ①抗凝、抗血栓形成。②通过电荷依赖性机制防止血小板、红细胞黏附、聚集;结合并灭活对血管有损伤作用的活性物质以保护内皮细胞并促进损伤的内皮细胞修复和生长。③抗自由基损伤作用。肝素能抑制被激活的 PMN 呼吸爆发,并能阻止 PMN 的黏附,避免 PMN 释放自由基和溶酶体酶。④肝素通过与 P-选择素相互作用而抑制 P-选择素介导的活化血小板与白细胞间相互作用。⑤LMWH 尚有抗炎、抗过敏、抗补体、增强网状内皮系统吞噬细胞活性、直接抗内毒素等作用。综上所述,LMWH 可通过改善微循环间接抑制 NF- κ B 的活化,进而减轻炎症反应,改善肺损伤。

参考文献:

- 1 季宪飞,黄亮. 细胞黏附分子与急性肺损伤[J]. 中国危重病急救医学,2004,16:444-446.
- 2 Collins T, Read M A, Neish A S, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers[J]. FASEB J, 1995, 9:899-909.
- 3 Yamaguchi H, Ishii E, Tashiro K, et al. Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis[J]. Leuk Lymphoma, 1998, 31: 61-69.
- 4 Terada L S, Hybertson B M, Connelly K G, et al. XO increases neutrophil adherence to endothelial cells by a dual ICAM-1 and P-selectin-mediated mechanism[J]. J Appl Physiol, 1997, 82: 866-873.
- 5 Tanaka N, Murata A, Uda K, et al. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model[J]. Crit Care Med, 1995, 23:901-908.
- 6 Barnett C C, Moore E E, More F A, et al. Intercellular adhesion molecule-1 promotes neutrophil-mediated cytotoxicity[J]. Surgery, 1995, 118:171-175.
- 7 Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, et al. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis[J]. Crit Care Med, 2002, 30(5 Suppl):S302-S312.
- 8 Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16:225-260.
- 9 Boldt J, Papsdorf M, Piper S N, et al. Continuous heparinization and circulating adhesion molecules in the critically ill[J]. Shock, 1999, 11:13-18.
- 10 Shackelford R E, Alford P B, Xue Y, et al. Aspirin inhibits tumor necrosis factor- α gene expression in murine tissue macrophages[J]. Mol Pharmacol, 1997, 52:421-429.
- 11 郭振辉,洪新,毛宝龄,等. 阿司匹林的抗炎机制研究[J]. 中国危重病急救医学,2000,12:602-605.
- 12 Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7 Suppl):S36-S41.
- 13 Hack C E, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7 Suppl): S21-S27.

(收稿日期:2005-11-12 修回日期:2006-05-24)

(本文编辑:李银平)