

## • 论著 •

肝素通过抑制一氧化氮合酶和转化生长因子- $\beta$ /Smad 信号转导途径减轻脂多糖致大鼠急性肺损伤

穆恩 丁仁或 安欣 李鑫 陈松 马晓春

**【摘要】** 目的 探讨肝素对脂多糖 (LPS) 致急性肺损伤 (ALI) 的保护作用及可能机制。方法 32 只 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、肝素对照组、模型组和肝素治疗组, 每组 8 只。采用气管内滴入 LPS 1 mg/kg 的方法制备大鼠 ALI 模型, 对照组和肝素对照组滴入等量生理盐水; 肝素对照组和肝素治疗组于制模后每小时静脉注射肝素 50 U/kg。24 h 后各组大鼠进行肺泡灌洗, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症介质表达; 取肺组织, 测定肺湿/干质量 (W/D) 比值, 光镜下观察肺组织病理改变, 并检测其丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 和髓过氧化物酶 (MPO) 水平; 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肺组织诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达; 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织 iNOS、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 和磷酸化 Smad 表达; 免疫组化法检测肺组织 iNOS 表达。**结果** 光镜下观察对照组和肝素对照组肺组织结构完整、肺泡腔清晰; 模型组肺泡壁增厚, 有明显的炎性细胞浸润、肺泡出血和结构破坏; 肝素治疗组病理改变较模型组明显减轻。与对照组和肝素对照组比较, 模型组肺 W/D 比值, 肺组织 MDA、NO、MPO, BALF 中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平均明显升高。与模型组比较, 肝素治疗组肺 W/D 比值, 肺组织 MDA、NO、MPO, BALF 中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均明显降低 [W/D 比值:  $7.54 \pm 0.17$  比  $10.69 \pm 0.15$ , MDA (mmol/mg):  $2.01 \pm 0.30$  比  $2.51 \pm 0.25$ , NO ( $\mu$ mol/L):  $3.07 \pm 0.21$  比  $3.89 \pm 0.14$ , MPO (U/g):  $1.94 \pm 0.09$  比  $2.74 \pm 0.20$ , TNF- $\alpha$  ( $\mu$ g/L):  $201.80 \pm 0.27$  比  $297.53 \pm 0.34$ , IL-6 ( $\mu$ g/L):  $38.41 \pm 0.25$  比  $46.31 \pm 0.31$ , 均  $P < 0.05$ ]。RT-PCR 结果显示, 肝素治疗组 iNOS mRNA 表达明显低于模型组 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :  $3.04 \pm 0.18$  比  $4.37 \pm 0.15$ ,  $P < 0.05$ )。Western Blot 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组肺组织 iNOS、TGF- $\beta$ 1 蛋白表达及 Smad2、Smad3 磷酸化水平明显增加; 而肝素治疗组蛋白表达较模型组明显受到抑制。免疫组化结果显示, 肝素治疗组肺泡上皮细胞和微血管内皮细胞 iNOS 阳性细胞表达较模型组明显减少。**结论** 肝素能通过抑制一氧化氮合酶的表达和 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导途径来发挥对 LPS 致大鼠 ALI 的保护作用。

**【关键词】** 肝素; 一氧化氮合酶; 转化生长因子- $\beta$ /Smad 信号转导途径; 急性肺损伤; 急性呼吸窘迫综合征

**Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling pathway** Mu En \*, Ding Renyu, An Xin, Li Xin, Chen Song, Ma Xiaochun. \*Department of Critical Care Medicine, Tianjin Hospital, Tianjin 300210, China

Corresponding author: Ma Xiaochun, Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China, Email: xcma2972@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether heparin has a beneficial effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) in rats, and to explore the possible underlying mechanisms. **Methods** Thirty-two adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into the control, heparin control, model, and heparin treatment groups, with 8 in each group. ALI rat model was reproduced by intratracheal instillation of LPS at a dose of 1 mg/kg. The rats in the control and heparin control groups received an equal volume of normal saline at the same times. The rats in the heparin control and heparin treatment groups were intravenously received 50 U/kg heparin every 1 hour after the induction of ALI. Animals were sacrificed 24 hours after LPS challenge. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue samples were collected. Histopathological evaluation, lung wet/dry (W/D) ratio, malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and myeloperoxidase (MPO) were analyzed. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the concentration of inflammatory factor in BALF. Expression of inducible nitric oxide synthase

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.009

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金项目 (20111102)

作者单位: 300210 天津市天津医院外科 ICU (穆恩); 110001 辽宁沈阳, 中国医科大学附属第一医院重症医学科 (丁仁或、安欣、李鑫、陈松、马晓春)

通信作者: 马晓春, Email: xcma2972@sina.com

(iNOS) mRNA in the lung of rats was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Western Blot was used to determine the expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and phosphorylation of Smad in the lung tissues. The expression of iNOS in lung was determined by immunohistochemistry. **Results** In the control and heparin control groups, lung tissue showed a normal structure and clear pulmonary alveoli under a light microscope. In the model group, ALI characters such as extensive thickening of the alveolar wall, significant infiltration of inflammatory cells, demolished structure of pulmonary alveoli, and hemorrhage were found. In the heparin treatment group, heparin treatment markedly alleviated LPS-induced these pathological changes in lung. Compared with control and heparin control groups, lung W/D ratio, lung MDA, NO and MPO levels, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in BALF in the model group were increased significantly. Compared with the model group, lung W/D ratio, lung MDA, NO and MPO levels, and TNF- $\alpha$  and IL-6 in BALF in the heparin treatment group were significantly decreased [W/D ratio:  $7.54 \pm 0.17$  vs.  $10.69 \pm 0.15$ , MDA (mmol/mg):  $2.01 \pm 0.30$  vs.  $2.51 \pm 0.25$ , NO ( $\mu\text{mol/L}$ ):  $3.07 \pm 0.21$  vs.  $3.89 \pm 0.14$ , MPO (U/g):  $1.94 \pm 0.09$  vs.  $2.74 \pm 0.20$ , TNF- $\alpha$  ( $\mu\text{g/L}$ ):  $201.80 \pm 0.27$  vs.  $297.53 \pm 0.34$ , IL-6 ( $\mu\text{g/L}$ ):  $38.41 \pm 0.25$  vs.  $46.31 \pm 0.31$ , all  $P < 0.05$ ]. RT-PCR showed that the expression of iNOS mRNA in the heparin treatment group was significantly lower than that in the model group ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :  $3.04 \pm 0.18$  vs.  $4.37 \pm 0.15$ ,  $P < 0.05$ ). Western Blot showed that compared with control group, the protein expressions of iNOS and TGF- $\beta$ 1, and phosphorylation of Smad2 and Smad3 were significantly increased, and the heparin could inhibit the protein expressions compared with model group. Immunohistochemistry showed that positive expressions of iNOS in alveolar epithelial cell and capillary endothelial cell in the heparin treatment group were significantly lower than those in the model group. **Conclusion** Heparin significantly ameliorated the lung injury induced by LPS in rats via the inhibition of nitric oxide synthase expression and the TGF- $\beta$ /Smad pathway.

**【Key words】** Heparin; Nitric oxide synthase; Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling pathway; Acute lung injury; Acute respiratory distress syndrome

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS) 是危重病医学常见的临床综合征,由于缺乏有效的治疗方法,病死率长期居高不下,是临床医学研究的热点和难点<sup>[1]</sup>。传统观点认为,局部或全身的炎症反应失衡是 ALI/ARDS 的主要发病机制。然而,针对肺损伤的抗炎治疗却大多以失败告终<sup>[2]</sup>。20 世纪 90 年代以来,人们逐渐认识到炎症反应失衡和凝血功能紊乱之间有密不可分的联系,凝血功能紊乱也是 ALI/ARDS 的发病基础之一,抗凝治疗可能是治疗 ALI/ARDS 的新思路<sup>[3-4]</sup>。肝素是临床常用的抗凝药物,主要用于弥散性血管内凝血 (DIC) 和血栓性疾病的治疗。近年来研究发现,肝素除具有抗凝活性外,还有抑制炎症介质释放、保护血管内皮细胞损伤等多种生物活性<sup>[5]</sup>。有研究显示,吸入肝素可能减轻烟雾吸入导致的绵羊 ALI<sup>[6]</sup>,但全身应用肝素对 ALI 是否具有同样的作用目前尚不清楚。本研究通过脂多糖 (LPS) 诱导大鼠 ALI,探讨肝素对 ALI 的保护作用及可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂:** LPS 购自美国 Sigma 公司,肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 和转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自美国 RapidBio 公司,肺组织丙二醛 (MDA) 试剂盒购自北京碧云天公司,一氧化

氮 (NO)、髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和 Smad 抗体购自美国 Sigma 公司。

**1.2 动物分组及模型制备:** 32 只雄性 SD 大鼠,体质量 240 ~ 260 g,由中国医科大学实验动物部提供,动物合格证号: SCXK2010-0005。按随机数字表法将动物分为对照组、肝素对照组、模型组、肝素治疗组,每组 8 只。经鼠尾静脉注射苯巴比妥 50 mg/kg 麻醉大鼠后,再气管内滴入 LPS 1 mg/kg 制备 ALI 模型<sup>[7]</sup>;对照组和肝素对照组动物则气管内滴入等量生理盐水。肝素对照组和肝素治疗组大鼠在气管内滴入生理盐水或 LPS 后每小时经鼠尾静脉注射肝素 50 U/kg,直至处死动物<sup>[8]</sup>。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.3 标本收集及处理:** 滴入 LPS 或生理盐水后 24 h 每组大鼠进行左肺灌洗,收集支气管肺泡灌洗液 (BALF),离心取上清液备检。取右肺中叶测湿/干质量 (W/D) 比值;右肺上叶以 10% 甲醛溶液浸泡用于组织学检测;右肺下叶用液氮保存用于反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测。

**1.3.1 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平检测:** 用 ELISA 法检测,严格按照试剂盒要求操作。

**1.3.2 肺组织病理学观察:** 取部分肺组织经甲醛溶

液固定、石蜡包埋、切片、苏木素 - 伊红 (HE) 染色, 光镜下观察。

**1.3.3 肺组织 MDA、NO、MPO 活性检测:**采用硫代巴比妥酸比色法检测肺组织 MDA 含量;采用硝基还原酶法测定 BALF 中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度,以代表 NO 含量;采用化学比色法测定肺组织 MPO 浓度<sup>[8]</sup>,操作均按试剂盒要求进行。

**1.3.4 实时定量 RT-PCR 法检测肺组织 iNOS 的 mRNA 表达:**取部分肺组织,按照 TRIzol 法常规提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,进行实时 PCR 扩增,采用荧光定量仪分析。iNOS 引物序列:上游 5'-TCTCCCGAAACGCTACACTT-3', 下游 5'-CGTCTGCGGAAGAACAATC-3'; β - 肌动蛋白 (β -actin) 作为内参,上游 5'-ACGTTGACATCCGTAAAGAC-3', 下游 5'-GAAGGTGGACAGTGAGGC-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法,对目的基因与 β -actin 的比值进行相对定量。

**1.3.5 Western Blot 检测肺组织 iNOS、TGF-β1、Smad2 和 Smad3 的蛋白表达:**取 100 mg 肺组织剪碎后加裂解液进行超声粉碎,离心取上清液,BCA 法测定蛋白含量;取含总蛋白的样本,经凝胶电泳后转膜,Tris 缓冲液 (TBS) 洗涤,室温下脱脂奶粉封闭,分别加 iNOS 抗体 (1:1 000 稀释)、TGF-β 抗体 (1:1 200 稀释)、抗 Smad2 抗体 (1:1 000 稀释)、抗 Smad3 抗体 (1:1 000 稀释) 过夜,TBS 冲洗后加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 室温下孵育,免疫印迹化学发光法 (ECL) 显色,凝胶图像处理系统分析目标条带的吸光度 (A) 值。

**1.3.6 免疫组化检测 iNOS 表达:**取部分肺组织经甲醛溶液固定、石蜡包埋后行 5 μm 厚连续切片,常规脱蜡、脱水,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液洗涤,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液消除内源性过氧化物酶,胰蛋白酶修复,正常兔血清封闭非特异性抗原,滴加 1:200 iNOS 多克隆抗体,4 °C 过夜,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤,滴加二抗,

室温孵育 30 min, PBS 漂洗后 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色,苏木素复染、脱水、透明后封片,光镜下观察,以细胞核呈棕黄色染色为阳性细胞。

**1.4 统计学分析:**数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织病理学改变:**光镜下观察对照组和肝素对照组肺组织结构完整、肺泡腔清晰;模型组肺泡壁增厚、明显的炎性细胞浸润、肺泡出血和结构破坏;肝素治疗组病理改变较模型组明显减轻。提示肝素可以改善 LPS 致大鼠肺损伤。

**2.2 肺组织 W/D 比值 (表 1):**对照组和肝素对照组肺 W/D 比值无差异 (*P* > 0.05),提示肝素本身对肺 W/D 比值无影响。模型组肺 W/D 比值较对照组明显增加 (*P* < 0.05);肝素治疗组肺 W/D 比值较模型组明显下降 (*P* < 0.05),提示肝素可以减轻 LPS 致大鼠肺水肿。

**2.3 肺组织 MDA、NO 含量和 MPO 活性 (表 1):**与对照组比较,模型组肺组织 MDA、NO、MPO 均明显增加 (均 *P* < 0.05);肝素治疗组肺组织 MDA、NO、MPO 均较模型组明显下降 (均 *P* < 0.05)。对照组与肝素对照组间无差异。

**2.4 BALF 中 TNF-α、IL-6 水平 (表 1):**对照组和肝素对照组大鼠 BALF 中仅有少量 TNF-α 和 IL-6 表达。模型组大鼠 BALF 中 TNF-α 和 IL-6 水平均较对照组显著增加 (均 *P* < 0.05);而肝素可抑制 LPS 所致 TNF-α 和 IL-6 表达增加 (均 *P* < 0.05)。

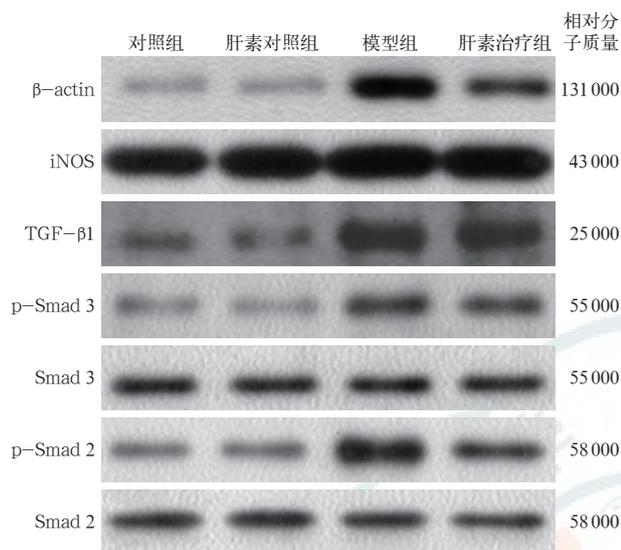
**2.5 肺组织 iNOS 的表达:**RT-PCR 检测结果显示 (表 1),与对照组比较,模型组肺组织 iNOS mRNA 表达明显增加 (*P* < 0.05);肝素能显著抑制 LPS 所致大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达增加 (*P* < 0.05)。

**表 1 肝素对 LPS 致急性肺损伤大鼠肺组织 W/D 比值、MDA、NO、MPO、iNOS mRNA 以及 BALF 中 TNF-α、IL-6 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	肺组织中检测结果				BALF 中检测结果		
		W/D 比值	MDA (mmol/mg)	NO (μmol/L)	MPO (U/g)	iNOS mRNA (2 <sup>-ΔΔCt</sup> )	TNF-α (μg/L)	IL-6 (μg/L)
对照组	8	4.98 ± 0.09	1.52 ± 0.15	2.52 ± 0.08	1.33 ± 0.10	0.99 ± 0.10	97.15 ± 0.14	21.45 ± 0.17
肝素对照组	8	4.96 ± 0.04	1.37 ± 0.24	2.49 ± 0.12	1.47 ± 0.21	1.02 ± 0.13	89.41 ± 0.12	27.37 ± 0.21
模型组	8	10.69 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.25 <sup>a</sup>	3.89 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.74 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.37 ± 0.15 <sup>a</sup>	297.53 ± 0.34 <sup>a</sup>	46.31 ± 0.31 <sup>a</sup>
肝素治疗组	8	7.54 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.07 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.94 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.04 ± 0.18 <sup>b</sup>	201.80 ± 0.27 <sup>b</sup>	38.41 ± 0.25 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值		24.794	38.549	38.563	27.376	24.389	77.473	27.879
<i>P</i> 值		0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000

注: LPS 为脂多糖, W/D 为湿 / 干质量比值, MDA 为丙二醛, NO 为一氧化氮, MPO 为髓过氧化物酶, iNOS 为诱导型一氧化氮合酶, BALF 为支气管肺泡灌洗液, TNF-α 为肿瘤坏死因子 -α, IL-6 为白细胞介素 -6; 与对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

Western Blot 检测结果显示 (图 1), iNOS 蛋白及 mRNA 表达具有同样的趋势。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, iNOS 为诱导型一氧化氮合酶, TGF- $\beta$ 1 为转化生长因子- $\beta$ 1, p-Smad2 为磷酸化 Smad2, p-Smad3 为磷酸化 Smad3,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

图 1 Western Blot 检测各组大鼠肺组织 iNOS、TGF- $\beta$ 1 及 p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达

免疫组化结果显示 (图 2), 对照组和肝素对照组肺组织中仅少数肺泡巨噬细胞内有少量 iNOS 阳性细胞; 模型组肺泡上皮细胞和微血管内皮细胞中均可见明显的 iNOS 阳性细胞表达; 肝素治疗组上述部位的 iNOS 阳性细胞表达明显减少。

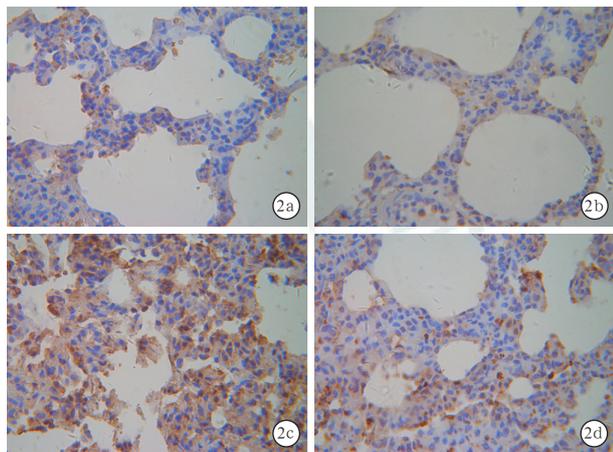


图 2 光镜下观察各组大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达 细胞核呈棕黄色染色为阳性细胞。对照组 (a) 和肝素对照组 (b) 肺泡巨噬细胞内有少量 iNOS 阳性细胞表达; 模型组 (c) 肺泡上皮细胞和微血管内皮细胞可见明显 iNOS 阳性细胞表达; 肝素治疗组 (d) iNOS 阳性细胞表达较模型组明显减少 免疫组化 中倍放大

## 2.6 肺组织 TGF- $\beta$ 1 表达及 Smad2、Smad3 磷酸化

(图 1): Western Blot 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组肺组织 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达及 Smad2、Smad3 磷酸化均显著增加; 肝素则能显著抑制 LPS 所致大鼠肺组织 TGF- $\beta$ 1 表达增加及 Smad2、Smad3 的磷酸化。提示肝素可能通过抑制 TGF- $\beta$ /Smad 途径发挥对 LPS 所致大鼠肺损伤的保护作用。

## 3 讨论

由于 ALI/ARDS 的病因多样, 发病机制复杂, 治疗手段有限, 目前仍以去除病因基础上的支持治疗为主<sup>[9]</sup>。目前认为, 过度的炎症介质释放和炎性细胞的活化、聚集是脓毒症和 ALI/ARDS 的重要发病机制<sup>[10-11]</sup>。然而迄今未有临床试验证实调控炎症反应的治疗能改善 ALI/ARDS 的预后<sup>[12]</sup>。近年研究发现, 炎症反应与凝血功能紊乱具有“交叉对话”, 二者作为共同的始动因素在脓毒症的发病过程中起到重要作用<sup>[13-14]</sup>。因此, 对凝血功能紊乱的干预可能是治疗脓毒症和 ALI/ARDS 的一个新思路<sup>[15-17]</sup>。本研究主要探讨传统的抗凝剂肝素在 LPS 所致大鼠肺组织中的作用及其可能机制。

有研究发现, 肝素除抗凝外还具有潜在的抗炎活性。研究表明, 肝素能抑制 p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p38MAPK) 和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的活性, 并减少肺损伤模型动物 BALF 中炎症介质的释放<sup>[8, 18-19]</sup>, 而肝素能否通过其他途径发挥其对 ALI/ARDS 的保护作用目前未见报道。本研究发现: 肝素可明显减轻 LPS 所致大鼠肺损伤程度, 表现为肺组织病理改变减轻, 肺 W/D 比值下降, MDA、NO 含量减少, MPO 活性下降, BALF 中促炎介质 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和肺组织 TGF- $\beta$ 1 水平降低。此外, 肝素还能抑制大鼠肺组织中 Smad2 和 Smad3 的磷酸化, 提示肝素对 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导途径具有抑制作用, 后者可能代表肝素抗炎活性的一个新机制。

LPS 可以刺激大鼠肺组织 iNOS 表达和 NO 的过度释放, 过度的 NO 释放对肺组织的直接损伤被认为是 ALI 的发病机制之一。实验研究表明<sup>[20-21]</sup>: LPS 可以刺激肺内多种细胞表达 iNOS, 如中性粒细胞、巨噬细胞、支气管上皮细胞和肺动脉平滑肌细胞; 过度的 NO 释放能通过直接损伤肺组织并增加过氧化亚硝酸盐生成, 加重肺损伤; 应用特异性 iNOS 抑制剂可抑制 iNOS, 减轻肺损伤。本研究发现, 气管内滴入 LPS 后 24 h 大鼠肺组织 iNOS 的 mRNA 和蛋白表达均显著增加, 应用肝素能同时抑制 LPS 所致的 iNOS mRNA 和蛋白表达增加, 并减少 NO 的

合成,提示肝素能在转录水平抑制 LPS 致 ALI 大鼠 iNOS 表达,其确切机制仍需深入探讨。

研究发现,促炎细胞因子 TGF-β1 在肺损伤后期的肺纤维化形成中起重要作用, TGF-β /Smad 信号转导途径的激活包括 I 型受体介导的 Smad2 和 Smad3 的磷酸化<sup>[22-23]</sup>。最近有研究发现, ALI 早期即有 TGF-β /Smad 途径激活,提示 TGF-β 可能参与了 ALI 发病过程<sup>[24-26]</sup>。本研究发现,气管内滴入 LPS 后 24 h 大鼠肺组织 TGF-β1 表达明显增加,肝素能有效抑制 TGF-β1 表达和 Smad2、Smad3 磷酸化,表明肝素至少部分通过抑制 TGF-β /Smad 途径来发挥对脓毒症肺损伤的保护作用。

综上所述,本研究结果表明,肝素对 LPS 所致的大鼠 ALI 具有保护作用,可能与以下机制有关:① 肝素能抑制大鼠肺组织 iNOS 表达并减少 NO 合成;② 肝素能抑制肺组织炎症介质释放;③ 肝素能抑制 TGF-β /Smad 信号转导途径激活。

本研究的缺陷是没有对大鼠肺损伤时局部和全身凝血功能的改变以及肝素对凝血指标的影响进行深入研究,在今后的研究中拟进一步探讨肺损伤时凝血紊乱与炎症反应的关系及肝素的可能作用。

参考文献

[1] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 2000, 342 (18): 1334-1349.

[2] Fernandes AB, Zin WA, Rocco PR. Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38 (2): 147-159.

[3] Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 147-163.

[4] 穆恩, 马晓春. 抗凝治疗——急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征治疗的新思路[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (1): 55-59.

[5] Lever R, Page CP. Novel drug development opportunities for heparin [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1 (2): 140-148.

[6] Murakami K, McGuire R, Cox RA, et al. Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep [J]. Shock, 2002, 18 (3): 236-241.

[7] Ritter C, da Cunha AA, Echer IC, et al. Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat [J]. Crit Care Med, 2006, 34 (2): 471-477.

[8] Wang M, He J, Mei B, et al. Therapeutic effects and anti-inflammatory mechanisms of heparin on acute lung injury in rabbits [J]. Acad Emerg Med, 2008, 15 (7): 656-663.

[9] 刘军, 邹桂娟, 李维勤. 急性呼吸窘迫综合征的诊断新进展[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (2): 70-73.

[10] 吴允孚, 陈刚, 席与斌. 血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (3): 181-182.

[11] 张晓娟, 章志丹, 穆恩, 等. 脓毒症患者早期应用血必净注射液治疗的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (3): 172-174.

[12] 赵聪, 马晓春. 急性呼吸窘迫综合征患者适用糖皮质激素治疗吗? [J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27 (4): 310-312.

[13] 赵聪, 章志丹, 张晓娟, 等. 小剂量肝素治疗脓毒症的临床分析[J]. 中华内科杂志, 2009, 48 (7): 566-569.

[14] 赵聪, 马晓春. 脓毒症的抗凝治疗[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (2): 113-116.

[15] 李春盛, 何新华, 桂培春. 大黄对急性肺损伤大鼠血浆和支气管肺泡灌洗液中炎症细胞因子表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12 (5): 306-308.

[16] 李旭, 张晓娟, 马晓春. 肝素对脂多糖诱导内皮细胞损伤中基质金属蛋白酶及其组织抑制剂基因表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24 (8): 490-492.

[17] 刘志永, 朱红, 马晓春. 肝素治疗脓毒症的系统评价[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (3): 135-141.

[18] 韩旭东, 黄晓英, 葛志华, 等. 持续小剂量肝素治疗脓毒症患者急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合症的临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15 (12): 1730-1732.

[19] 马明明, 李岩, 朱委委, 等. 芹菜素对脂多糖致小鼠急性肺损伤的作用机制研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 170-174.

[20] Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation [J]. Crit Care Med, 2010, 38 (2 Suppl): S26-34.

[21] Kobayashi A, Hashimoto S, Kooguchi K, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis [J]. Chest, 1998, 113 (6): 1632-1639.

[22] Wesselkamper SC, Case LM, Henning LN, et al. Gene expression changes during the development of acute lung injury: role of transforming growth factor beta [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172 (11): 1399-1411.

[23] Fathy RJ, Lichtenberger F, McKeegan CB, et al. The acute respiratory distress syndrome: a role for transforming growth factor-beta 1 [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28 (4): 499-503.

[24] Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses [J]. Cell, 1998, 95 (6): 737-740.

[25] Lu Q, Harrington EO, Jackson H, et al. Transforming growth factor-beta1-induced endothelial barrier dysfunction involves Smad2-dependent p38 activation and subsequent RhoA activation [J]. J Appl Physiol (1985), 2006, 101 (2): 375-384.

[26] Lee JH, Lee H, Joung YK, et al. The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF-β /Smad signaling pathway [J]. Biomaterials, 2011, 32 (5): 1438-1445.

(收稿日期: 2014-09-14) (本文编辑: 李银平)

• 书讯 •

《急诊内科手册》第 2 版由人民卫生出版社出版发行

由南方医科大学附属深圳宝安医院急诊医学科张文武教授组织主编的《急诊内科手册》第 2 版由人民卫生出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售 (定价: 53.0 元 / 本)。

本书是一部急诊内科学方面的工具书, 共 16 章约 83 万字。分别叙述了常见内科急症症状的诊断思路与处理原则, 休克、多器官功能障碍综合征、急性中毒、水电解质与酸碱平衡失调, 内科各系统疾病急诊的诊断与治疗措施等, 并较详细地介绍了内科常用急救诊疗技术。内容丰富, 资料新颖, 实用性强。是急诊医师、内科医师和社区医师必备的工具书, 并可作为急诊医学教学和进修的参考读物。

