

## • 研究报告 •

## 早期抗凝对脂多糖致急性肺损伤大鼠的保护作用

佟欣 栾婷 李国福 臧彬

**【摘要】目的** 观察早期应用肝素对脂多糖(LPS)致急性肺损伤(ALI)大鼠的保护作用。**方法** 健康清洁级SD大鼠40只,按照随机数字表法分为对照组、模型组和大、小剂量肝素组,每组10只。采用尾静脉注射大肠杆菌LPS 5 mg/kg制备ALI动物模型。大、小剂量肝素组分别在给予LPS后1 min静脉注射1 000 U/kg、250 U/kg肝素;对照组则给予等量生理盐水。各组分别于注射LPS后4 h经右颈静脉取血检测凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)及纤维蛋白原(FIB)水平;经右股动脉采血进行血气分析。取血后6 h,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织Toll样受体4(TLR4)mRNA表达。**结果** 与对照组比较,模型组PT、TT明显缩短[PT(s): $4.45 \pm 1.17$ 比 $6.58 \pm 0.59$ ,  $t=2.237$ ,  $P=0.045$ ; TT(s): $13.29 \pm 1.15$ 比 $15.17 \pm 1.08$ ,  $t=2.765$ ,  $P=0.019$ ], FIB明显下降(g/L: $1.80 \pm 0.12$ 比 $4.60 \pm 0.57$ ,  $t=2.813$ ,  $P=0.032$ );与模型组比较,大、小剂量肝素组PT、APTT均明显延长[PT(s): $12.98 \pm 1.25$ 、 $9.88 \pm 0.72$ 比 $4.45 \pm 1.17$ , APTT(s): $46.60 \pm 2.01$ 、 $44.08 \pm 1.46$ 比 $39.53 \pm 2.89$ ,  $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ], FIB显著降低(g/L: $2.10 \pm 0.43$ 、 $2.50 \pm 0.57$ 比 $1.80 \pm 0.12$ ,  $P<0.01$ 和 $P<0.05$ );而不同剂量肝素组间凝血指标比较差异无统计学意义。模型组血气分析指标较对照组均明显下降;小剂量肝素组PaO<sub>2</sub>较模型组明显改善(mmHg(1 mmHg=0.133 kPa): $80.87 \pm 11.65$ 比 $65.37 \pm 3.58$ ,  $t=2.903$ ,  $P=0.017$ ),而大剂量肝素组与模型组相比氧合改善无统计学差异。模型组BALF中TNF- $\alpha$ 及肺组织TLR4 mRNA表达均较对照组明显升高[TNF- $\alpha$ (ng/L): $534.36 \pm 65.33$ 比 $125.13 \pm 11.61$ ,  $t=4.932$ ,  $P=0.000$ ; TLR4 mRNA(灰度值): $2.451 \pm 0.028$ 比 $0.998 \pm 0.021$ ,  $t=4.687$ ,  $P=0.001$ ];不同剂量肝素组BALF中TNF- $\alpha$ 及肺组织TLR4 mRNA表达均较模型组下降,小剂量肝素组下降尤为显著[TNF- $\alpha$ (ng/L): $310.43 \pm 41.01$ 比 $534.36 \pm 65.33$ ,  $t=2.238$ ,  $P=0.021$ ; TLR4 mRNA(灰度值): $1.775 \pm 0.025$ 比 $2.451 \pm 0.028$ ,  $t=2.761$ ,  $P=0.011$ ]。**结论** 肝素早期抗凝治疗对LPS致ALI大鼠凝血功能紊乱有改善作用,以小剂量治疗较适宜;肝素早期抗凝作用可能通过下调TLR4 mRNA表达,抑制炎症反应,改善氧合而起作用。

**【关键词】** 肺损伤,急性; 肝素; 抗凝治疗; Toll样受体4

急性肺损伤(ALI)是指在机体遭受各种应激源进入体内后,引起肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞变性坏死,造成弥漫性肺间质及肺泡水肿病变,氧弥散性障碍,从而导致严重低氧,出现呼吸功能不全或呼吸衰竭<sup>[1]</sup>。大量动物实验及临床研究发现,ALI的发生机制为“瀑布样”炎症反应,导致肺毛细血管上皮细胞损伤,激活了机体的凝血和纤溶系统,早期高凝状态,消耗了大量的凝血因子、纤维蛋白原及血小板等促凝物质,在微循环中形成和沉积了大量的血栓及纤维蛋白,导致微循环障碍,组织缺血、缺氧,这在ALI的发展中起到重要的作用<sup>[2-3]</sup>。许多研究显示早期应用肝素可缓解早期高凝状态,改善凝血功能异常,从而改善ALI预后。本研究通过脂多糖(LPS)诱导致大鼠ALI模型,探讨早期应用肝素对机体的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组及模型制备:** 250~300 g清洁级SD大鼠40只,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2009-0004。自由摄食、饮水。按随机数

字表法将大鼠分成对照组、模型组及大、小剂量肝素组,每组10只。腹腔注射水合氯醛300 mg/kg麻醉大鼠后,分别经左颈静脉及右股动脉置入24号套管针。由左颈静脉注射大肠杆菌LPS(E.Coli, O55:B5,美国Sigma公司)5 mg/kg复制ALI模型。大、小剂量肝素组分别在给予LPS后1 min静脉注射肝素1 000 U/kg、250 U/kg;对照组给予等量生理盐水。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.2 检测指标及方法:**以注射LPS后4 h为取样时间点,经左颈静脉取血测定凝血功能指标,经右股动脉采血检测血气分析。采血后6 h处死大鼠,用生理盐水经左主支气管进行肺灌洗,并回收支气管肺泡灌洗液(BALF),于-70℃冰箱保存备用;同时取右肺备用。

**1.2.1 凝血功能测定:**检测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、血浆纤维蛋白原(FIB)水平。

**1.2.2 BALF中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平测定:**采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定BALF上清液中TNF- $\alpha$ 水平,试剂盒购自美国B&D公司,严格按试剂盒说明书操作。

**1.2.3 肺组织Toll样受体4(TLR4)mRNA表达测定:**采用TRIzol一步法提取肺组织总RNA,扩增产物用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)定量分析,实验用引物由上海生物

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.014

基金项目:辽宁省教育厅高等学校科研项目(2008825)

作者单位:110004 辽宁沈阳,中国医科大学附属盛京医院重症医学科

通信作者:李国福, Email: ligf@sj-hospital.org

工程有限公司合成。TLR4 引物序列:上游 5'-GCCGGAGACT TATTGTGGTGG-3', 下游 5'-ATGCGTTTTAGGCCGACAGATT T-3';内参照  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 引物序列:上游 5'-GCAG AAGCAAATCACAGCCGT-3', 下游 5'-GCTGATCCACATCTGC TGGAT-3'。严格按照说明书设置反应条件。采用凝胶系统 分析软件扫描各条带灰度值,以目的基因与内参照基因的灰 度比值表示。

**1.3 统计学处理:**采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计 量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间差异符合正态分 布时采用  $t$  检验,不符合正态分布时进行方差齐性检验;方 差齐性者采用校正  $t$  检验,方差不齐者采用非参数检验;计 数资料用  $\chi^2$  检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组凝血指标比较 (表 1):**与对照组比较,模型组 PT、 TT 明显缩短, FIB 明显下降 (均  $P < 0.05$ ), 而 APTT 缩短差 异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );与模型组比较,大、小剂量肝素 组 PT、APTT 均明显延长, FIB 显著增加,大剂量肝素组 TT 明显延长 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而小剂量肝素组 TT 差异无 统计学意义 ( $P > 0.05$ )。不同剂量肝素组间各凝血指标差 异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

**2.2 各组动脉血气分析指标比较 (表 1):**与对照组比较,模 型组 pH 值、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、剩余碱均明显降低 (均  $P < 0.05$ )。 与模型组比较,小剂量肝素组 PaO<sub>2</sub> 及大、小剂量肝素组 PaCO<sub>2</sub> 均明显改善 (均  $P < 0.05$ ), 大、小剂量肝素组 pH 值、 剩余碱及大剂量肝素组 PaO<sub>2</sub> 均无明显差异 (均  $P > 0.05$ )。

**2.3 各组 BALF 中 TNF- $\alpha$  及肺组织 TLR4 mRNA 表达比较 (表 2):**与对照组比较,模型组 BALF 中 TNF- $\alpha$  水平及肺组 织 TLR4 mRNA 表达均明显升高 (均  $P < 0.01$ )。与模型组 比较,不同剂量肝素组 BALF 中 TNF- $\alpha$  水平及肺组织 TLR4 mRNA 表达均降低,其中以小剂量肝素组降低更为明显 (均  $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

本研究通过注入 LPS 制备大鼠 ALI 模型,该模型是一 种比较成熟的制模方法<sup>[4]</sup>。LPS 进入机体后直接损伤或通

**表 2 不同剂量肝素对脂多糖致急性肺损伤大鼠 BALF 中 TNF- $\alpha$  及肺组织 TLR4 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	BALF 中 TNF- $\alpha$ (ng/L)	肺 TLR4 mRNA (灰度值)
对照组 (1)	10	125.13 $\pm$ 11.61	0.998 $\pm$ 0.021
模型组 (2)	10	534.36 $\pm$ 65.33	2.451 $\pm$ 0.028
大剂量肝素组 (3)	10	495.15 $\pm$ 54.42	2.233 $\pm$ 0.023
小剂量肝素组 (4)	10	310.43 $\pm$ 41.01	1.775 $\pm$ 0.025
组间比较 1:2 的 $t/P$ 值		4.932 / 0.000	4.687 / 0.001
1:3 的 $t/P$ 值		3.268 / 0.007	3.169 / 0.010
1:4 的 $t/P$ 值		2.765 / 0.019	2.769 / 0.023
2:3 的 $t/P$ 值		2.382 / 0.055	2.332 / 0.059
2:4 的 $t/P$ 值		2.238 / 0.021	2.761 / 0.011
3:4 的 $t/P$ 值		1.962 / 0.099	2.039 / 0.091

注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子 - $\alpha$ , TLR4 为 Toll 样受体 4

过激活炎症因子间接损害肺毛细血管内皮细胞,释放组织因 子 (TF)。TF 通过激活 VIII 因子,与之形成复合物,进一步激 活因子 X 形成活化的 X<sub>a</sub>, 促进凝血酶的生成,使纤维蛋白原 转换为纤维蛋白,导致凝血功能异常<sup>[5-6]</sup>。LPS 诱导大鼠机 体产生大量细胞因子和炎症介质,这些细胞因子及炎症介质 进入血液破坏血管内皮,使其血管通透性增高,血液向组织 外渗出造成组织水肿,血液中的液体和白蛋白减少造成血液 浓缩、血液黏滞性增高也是促成高凝状态的因素<sup>[7]</sup>。本实验 模型组在静脉注射 LPS 4 h 后 PT 和 TT 明显缩短, FIB 明显 下降,也证实了 LPS 导致血液早期呈高凝状态,启动凝血活 动,使纤维蛋白原大量消耗。

肝素是在临床治疗弥散性血管内凝血 (DIC) 过程中广 泛使用的一种抗凝药物,剂量易调整、使用方便。肝素通过 抑制凝血酶活性、阻止 FIB 转化为纤维蛋白、防止血小板聚 集的方式发挥抗凝作用。很多研究发现,肝素可刺激血管内 皮细胞释放组织因子途径抑制剂 (TFPI),协同发挥抗凝作 用<sup>[8-9]</sup>。肝素与抗凝血酶 (AT) 结合后加速 AT 灭活凝血酶, 从而产生强大的抗凝作用<sup>[10]</sup>。本实验在注入 LPS 后 1 min 静脉注射肝素,小剂量为 250 U/kg、大剂量为 1 000 U/kg,结 果发现,与模型组相比,PT、APTT 明显延长, FIB 含量升高,

**表 1 不同剂量肝素对脂多糖致急性肺损伤大鼠凝血功能指标及血气分析指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	PT (s)	TT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	pH 值	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	剩余碱 (mmol/L)
对照组 (1)	10	6.58 $\pm$ 0.59	15.17 $\pm$ 1.08	42.23 $\pm$ 1.75	4.60 $\pm$ 0.57	7.43 $\pm$ 0.18	89.37 $\pm$ 5.64	37.11 $\pm$ 5.21	-0.62 $\pm$ 0.33
模型组 (2)	10	4.45 $\pm$ 1.17	13.29 $\pm$ 1.15	39.53 $\pm$ 2.89	1.80 $\pm$ 0.12	7.29 $\pm$ 0.25	65.37 $\pm$ 3.58	25.43 $\pm$ 4.89	-5.87 $\pm$ 0.25
大剂量肝素组 (3)	10	12.98 $\pm$ 1.25	20.23 $\pm$ 1.54	46.60 $\pm$ 2.01	2.10 $\pm$ 0.43	7.36 $\pm$ 0.26	72.33 $\pm$ 3.89	29.17 $\pm$ 4.61	-2.87 $\pm$ 0.12
小剂量肝素组 (4)	10	9.88 $\pm$ 0.72	19.18 $\pm$ 1.17	44.08 $\pm$ 1.46	2.50 $\pm$ 0.57	7.47 $\pm$ 0.17	80.87 $\pm$ 11.65	32.51 $\pm$ 5.49	-2.57 $\pm$ 0.22
组间比较 1:2 的 $t/P$ 值		2.237 / 0.045	2.765 / 0.019	2.487 / 0.052	2.813 / 0.032	2.765 / 0.020	2.765 / 0.019	2.758 / 0.026	2.765 / 0.019
1:3 的 $t/P$ 值		2.903 / 0.017	2.115 / 0.068	2.381 / 0.054	2.632 / 0.039	2.130 / 0.065	2.632 / 0.039	2.237 / 0.045	2.112 / 0.065
1:4 的 $t/P$ 值		2.758 / 0.026	1.988 / 0.087	2.387 / 0.054	2.515 / 0.041	2.142 / 0.060	1.932 / 0.095	1.892 / 0.010	1.812 / 0.101
2:3 的 $t/P$ 值		5.672 / 0.000	4.583 / 0.001	4.928 / 0.000	3.291 / 0.008	2.332 / 0.059	1.912 / 0.098	1.732 / 0.015	2.232 / 0.050
2:4 的 $t/P$ 值		2.823 / 0.030	2.132 / 0.065	4.143 / 0.002	2.765 / 0.020	2.212 / 0.051	2.903 / 0.017	1.692 / 0.015	2.229 / 0.051
3:4 的 $t/P$ 值		2.112 / 0.071	1.812 / 0.100	2.483 / 0.052	2.453 / 0.057	2.132 / 0.065	2.152 / 0.065	1.762 / 0.015	0.712 / 0.500

注: PT 为凝血酶原时间, TT 为凝血酶时间, APTT 为活化部分凝血活酶时间, FIB 为纤维蛋白原, PaO<sub>2</sub> 为动脉血氧分压, PaCO<sub>2</sub> 为动脉 血二氧化碳分压; 1 mmHg = 0.133 kPa

差异均有统计学意义。因此可以认为,肝素可改善 ALI 的凝血异常,阻止 DIC 的发展<sup>[11]</sup>。本实验中大量肝素组 APTT 显著延长,该结果提示各种出血并发症的发生会随之增加。因此,小剂量应用肝素就可以达到抗凝目的,并且减少并发症发生。

ALI 的病理生理基础为毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,毛细血管通透性增加导致肺水肿,急性肺水肿引起急性呼吸功能不全或衰竭,在此过程中机体凝血系统激活,微循环中大量血栓形成,组织出现缺血、缺氧,进一步加重肺组织损伤,这种恶性循环导致机体出现了严重不可逆的损伤。因此,早期针对凝血和纤溶系统功能的调节,可能是临床上治疗 ALI 的一个重要手段<sup>[12]</sup>。本实验显示,在应用小剂量肝素后 PaO<sub>2</sub> 明显升高,证实改善凝血和纤溶后氧合得到了很好的改善。而大量肝素组与模型组比较氧合改善无统计学差异,可能与大量肝素应用后增加肺部出血风险有关,有待进一步研究。

在 ALI 的发生机制中,炎症反应的激活起主导作用,凝血和纤溶紊乱导致的纤维蛋白复合物沉积也促进了炎症反应的发生发展<sup>[13-14]</sup>。很多研究显示,在致病菌进入体内后首先与 TLR 结合,经过信号转导通路最终激活核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和干扰素 (IFN) 的转录,合成大量的前炎症介质如 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素 (IL- $\beta$ 、IL-1、IL-6、IL-10) 和单核细胞趋化蛋白 (MIP) 等因子,有些炎症因子对组织产生直接损伤或通过激活其他免疫反应对组织产生间接损伤。因子和因子之间相互激活促进合成,最终形成炎症“瀑布”反应,影响疾病的预后<sup>[15-19]</sup>。研究证实 TLR4 在革兰阴性杆菌 LPS 的感染中起重要作用,LPS 进入体内后可引起 TLR4 大量表达,因此从 TLR4 的表达量就可以说明炎症反应的程度<sup>[20-21]</sup>。本研究在早期应用肝素改善 ALI 大鼠氧合的研究中,TLR4 的表达量明显下降,有统计学意义,说明肝素对炎症反应有一定的抑制作用;而在不同剂量肝素组间对比,TLR4 表达量无明显差异,说明肝素的剂量对 TLR4 表达无明显相关性。本实验从 BALF 中 TNF- $\alpha$  的水平进一步说明,应用肝素后肺部炎症反应得到了一定程度的减轻,但大量应用肝素不能明显抑制炎症反应,反而增加出血风险。因此,早期应用小剂量肝素可明显减轻 ALI 的炎症反应,改善肺组织氧合,但其具体的作用机制仍需进一步研究。

#### 参考文献

[1] 王小红,董晨明,张红松. 毛细血管渗漏综合征的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志,2012,19(2):123-125.

- [2] MacLaren R, Stringer KA. Emerging role of anticoagulants and fibrinolytics in the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(6):860-873.
- [3] 樊麦英,肖奇明. 急性肺损伤抗凝治疗的研究现状[J]. 中国中西医结合急救杂志,2004,11(6):388-390.
- [4] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3):L379-399.
- [5] 姚楷,王美堂,霍正禄. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征血凝状态异常及抗凝治疗进展[J]. 中国急救医学,2007,27(5):460-464.
- [6] 雷联会,俞森洋. 急性肺损伤与凝血功能异常的研究进展[J]. 中外医疗,2008,27(10):78-79.
- [7] 刘贵明,丁学琴,许国忠,等. 内毒素预处理对内毒素血症大鼠弥散性血管内凝血的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2004,24(11):862-863.
- [8] 马晓春. 应重视脓毒症的抗凝治疗[J]. 中国危重病急救医学,2010,22(9):516-517.
- [9] Laterre PF, Wittebole X, Dhainaut JF. Anticoagulant therapy in acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4 Suppl):S329-336.
- [10] 刘泽霖. 血栓性疾病的诊断与治疗[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006:239.
- [11] 汪宗昱,杨拔贤,朱曦,等. 普通肝素雾化吸入对内毒素性肺损伤大鼠肺泡局部凝血及炎症反应的影响[J]. 中国危重病急救医学,2011,23(4):239-242.
- [12] 陈龙,王瑞兰,张君,等. 肝素对急性肺损伤大鼠不同时期凝血功能影响[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2011,4(2):128-131.
- [13] MacLaren R, Stringer KA. Emerging role of anticoagulants and fibrinolytics in the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, 27(6):860-873.
- [14] 姚咏明,盛志勇. 脓毒症研究的若干新动态[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(6):323-325.
- [15] Jiang D, Liang J, Fan J, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan [J]. *Nat Med*, 2005, 11(11):1173-1179.
- [16] Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, et al. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts [J]. *Crit Care*, 2010, 14(3):R103.
- [17] Bosmann M, Russkamp NF, Ward PA. Fingerprinting of the TLR4-induced acute inflammatory response [J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(3):319-323.
- [18] 王烁,聂秀红,郭德玉,等. 急性肺损伤家兔早期中性粒细胞相关功能的变化研究[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(7):403-408.
- [19] 陈松,马晓春. 肝素对脓毒症大鼠静脉血白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  和血管紧张素 II 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学,2010,22(9):555-556.
- [20] Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2):169-176.
- [21] Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, et al. Role of toll-like receptor 4 in the pathophysiology of severe acute pancreatitis in mice [J]. *Surg Today*, 2007, 37(10):867-873.

(收稿日期:2014-04-16)(本文编辑:李银平)

## · 读者 · 作者 · 编者 ·

### 本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体质量;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析。