

# 肝素通过 Toll 样受体 4 减少脂多糖刺激人内皮细胞粒细胞集落刺激因子的表达

李旭 刘一娜 马晓春

**【摘要】** 目的 观察肝素对脂多糖 (LPS) 刺激人内皮细胞粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 水平的影响,并探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 在其过程中的可能作用。方法 体外培养人肺微血管内皮细胞 (HPMEC),取传代培养至第 3~5 代细胞用于实验。实验 1:将细胞分为对照组、LPS 刺激组 (LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、LPS + 0.1 U/mL 肝素组和 LPS + 1 U/mL 肝素组 4 组,肝素作用组于 LPS 刺激前 15 min 加入相应剂量普通肝素,对照组加入与 LPS 等量的磷酸盐缓冲液 (PBS);于 LPS 刺激 24 h 后收集细胞上清,采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定白细胞介素-6 (IL-6)、G-CSF 水平,以明确肝素对 HPMEC 的作用。实验 2:另取细胞,分别于加入 PBS 或 LPS 前 4 h 加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  球形红细菌 LPS (LPS-RS, 一种 TLR4 拮抗剂);于 LPS 刺激 24 h 后收集细胞上清,测定 IL-6、G-CSF 水平,以明确 TLR4 在 LPS 诱导 HPMEC 损伤中的作用。实验 3:另取细胞,分为对照组、LPS 刺激组、LPS + 0.1 U/mL 肝素组和 LPS + 1 U/mL 肝素组,处理方法同实验 1;于 LPS 刺激 1 h 后收集细胞,采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 测定 TLR4 蛋白表达,以明确肝素对 TLR4 的作用。结果 ① 与对照组比较, LPS 刺激组 IL-6 及 G-CSF 水平明显增高 [IL-6 (ng/L): 655.9  $\pm$  58.3 比 75.5  $\pm$  18.2, G-CSF (ng/L): 388.7  $\pm$  36.2 比 35.3  $\pm$  12.6, 均  $P < 0.05$ ];与 LPS 刺激组比较,0.1 U/mL 和 1 U/mL 肝素预处理均可明显降低 IL-6 及 G-CSF 水平 [IL-6 (ng/L): 518.2  $\pm$  64.6、489.1  $\pm$  75.6 比 655.9  $\pm$  58.3, G-CSF (ng/L): 298.8  $\pm$  41.0、273.4  $\pm$  33.2 比 388.7  $\pm$  36.2, 均  $P < 0.05$ ],两个肝素组间无明显差异,但以 1 U/mL 肝素作用较明显。② LPS-RS 可明显抑制 LPS 诱导的 IL-6、G-CSF 水平增高 [IL-6 (ng/L): 139.1  $\pm$  37.6 比 655.9  $\pm$  58.3, G-CSF (ng/L): 73.7  $\pm$  19.7 比 388.7  $\pm$  36.2, 均  $P < 0.05$ ];而单独应用 LPS-RS 对细胞因子无明显影响 [IL-6 (ng/L): 118.2  $\pm$  42.1 比 75.5  $\pm$  18.2, G-CSF (ng/L): 48.4  $\pm$  26.8 比 35.3  $\pm$  12.6, 均  $P > 0.05$ ]。③ LPS 刺激 1 h 后 TLR4 蛋白表达 (灰度值) 明显高于对照组 (0.87  $\pm$  0.23 比 0.36  $\pm$  0.12,  $P < 0.05$ );0.1 U/mL 和 1 U/mL 肝素预处理均可明显抑制 LPS 诱导的 TLR4 蛋白表达 (0.68  $\pm$  0.18、0.62  $\pm$  0.26 比 0.87  $\pm$  0.23, 均  $P < 0.05$ )。结论 LPS 刺激下 HPMEC 中 IL-6、G-CSF 表达增加,肝素可能通过调节 TLR4 降低其表达水平,从而发挥细胞保护作用。

**【关键词】** 脂多糖; 内皮细胞; 普通肝素; Toll 样受体; 粒细胞集落刺激因子

**Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of granulocyte colony-stimulating factor in human endothelial cells through Toll-like receptor 4 signaling pathway** Li Xu, Liu Yina, Ma Xiaochun.

Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

Corresponding author: Ma Xiaochun, Email: xcma2972@sina.com

**【Abstract】 Objective** To determine the effect of unfractionated heparin (UFH) on lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and the role of Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in this process. **Methods** Human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) were cultured in vitro, and the cells between passages 3 and 5 were used in the experiments. Experiment I: the cells were divided into four groups as follows: control group, LPS stimulation group (LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), LPS + 0.1 U/mL UFH group, and LPS + 1 U/mL UFH group. HPMECs in UFH groups were treated with 0.1 U/mL or 1 U/mL UFH 15 minutes before LPS stimulation, and HPMECs in control group were treated with an equal volume of phosphate-buffered saline (PBS) instead. The concentrations of interleukin-6 (IL-6) and G-CSF in cell culture supernatants were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 24 hours after LPS challenge to detect the effect of UFH on HPMECs. Experiment II: HPMECs were treated with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rhodobacter sphaeroides LPS (LPS-RS,

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2015.02.001

基金项目:国家自然科学基金(81101411);辽宁省自然科学基金(2013021061)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院重症医学科

通讯作者:马晓春, Email: xcma2972@sina.com

antagonist for TLR4) 4 hours before the addition of PBS or LPS. The concentrations of IL-6 and G-CSF in cell culture supernatants were determined 24 hours after LPS stimulation to detect the effect of TLR4 on LPS-induced HPMEC injury. Experiment III: HPMECs were divided into four groups as before: control group, LPS stimulation group, LPS + 0.1 U/mL UFH group, LPS + 1 U/mL UFH group. Treatments to cells were the same as experiment I. The protein expression of TLR4 in HPMECs was determined by Western Blot 1 hour after LPS stimulation to detect the effect of UFH on TLR4. **Results** ① Compared with control group, the levels of IL-6 and G-CSF in LPS stimulation group were increased [IL-6 (ng/L):  $655.9 \pm 58.3$  vs.  $75.5 \pm 18.2$ , G-CSF (ng/L):  $388.7 \pm 36.2$  vs.  $35.3 \pm 12.6$ , both  $P < 0.05$ ]. Compared with those of LPS stimulation group, in LPS + 0.1 U/mL UFH group and LPS + 1 U/mL UFH group, the levels of IL-6 and G-CSF were significantly decreased [IL-6 (ng/L):  $518.2 \pm 64.6$ ,  $489.1 \pm 75.6$  vs.  $655.9 \pm 58.3$ , G-CSF (ng/L):  $298.8 \pm 41.0$ ,  $273.4 \pm 33.2$  vs.  $388.7 \pm 36.2$ , all  $P < 0.05$ ]. The results indicated that 1 U/mL UFH had better results, though there was no statistical significance between the results of two UFH groups. ② LPS-induced up-regulation of IL-6 and G-CSF levels was prevented by LPS-RS [IL-6 (ng/L):  $139.1 \pm 37.6$  vs.  $655.9 \pm 58.3$ , G-CSF (ng/L):  $73.7 \pm 19.7$  vs.  $388.7 \pm 36.2$ , both  $P < 0.05$ ]. LPS-RS alone had no effect on cytokines [IL-6 (ng/L):  $118.2 \pm 42.1$  vs.  $75.5 \pm 18.2$ , G-CSF (ng/L):  $48.4 \pm 26.8$  vs.  $35.3 \pm 12.6$ , both  $P > 0.05$ ]. ③ Compared with control group, the protein expression of TLR4 (grey value) in LPS stimulation group was significantly upregulated after 1 hour ( $0.87 \pm 0.23$  vs.  $0.36 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ ). UFH with 0.1 U/mL and 1 U/mL lowered TLR-4 protein expression induced by LPS ( $0.68 \pm 0.18$ ,  $0.62 \pm 0.26$  vs.  $0.87 \pm 0.23$ , both  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expressions of IL-6 and G-CSF were increased obviously in LPS treated HPMECs. UFH might take its therapeutic effect through TLR4-dependent pathway.

**【Key words】** Lipopolysaccharide; Endothelial cell; Unfractionated heparin; Toll-like receptor; Granulocyte colony-stimulating factor

粒细胞集落刺激因子(G-CSF)来源于单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等造血细胞,以及成纤维细胞和内皮细胞等非造血细胞,它能与细胞表面的特定受体结合,在中性粒细胞等造血祖细胞生成、存活、增生、分化和成熟过程中起关键作用<sup>[1-2]</sup>。G-CSF主要动员并活化骨髓来源的细胞(包括中性粒细胞),可避免中性粒细胞凋亡,并加强其吞噬、趋化和活性氧物质生成<sup>[3]</sup>。G-CSF活化成熟的粒细胞和巨噬细胞促进其迁移到炎症部位,并通过抑制其进一步迁移,使其集聚到感染部位。同时,G-CSF可促进造血干细胞的生成,使粒细胞和巨噬细胞产生增加,从而发挥抗感染作用<sup>[4]</sup>。在肺炎链球菌和大肠杆菌感染的小鼠模型中,重组G-CSF可通过增加中性粒细胞数量或提高其功能,从而促进细菌清除,改善存活率<sup>[5-6]</sup>。肝素在临床中广泛用于预防和治疗血栓形成,其抗凝作用得到大家公认。近年研究表明,肝素除抗凝作用外,还具有抗炎、抑制细胞凋亡或补体活化等多种生物学活性<sup>[7-10]</sup>,但具体机制并不十分明确。因此,本研究旨在通过观察脂多糖(LPS)刺激人内皮细胞G-CSF水平的变化以及Toll样受体4(TLR4)可能的作用,探讨肝素对其水平的影响,从而证实肝素的多重作用,并为肝素在临床脓毒症患者中的应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料:人肺微血管内皮细胞株(HPMEC)

购自上海拜力生物技术有限公司;胎牛血清、DMEM培养基(美国HyClone公司);LPS(美国Sigma公司);球形红细菌LPS(LPS-RS,一种TLR4拮抗剂,美国Invitrogen公司);人白细胞介素-6(IL-6)和G-CSF酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于美国R&D公司;TLR4多克隆抗体和 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体购于美国Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 细胞培养:**HPMEC培养于含10%胎牛血清和1%青/链霉素的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中培养,每隔1~2d换液1次,直至90%融合,取第3~5代细胞用于实验。

### 1.3 细胞分组及处理

**1.3.1 实验1:**按 $1 \times 10^6$ 个/mL密度将HPMEC接种于6孔板,每孔2mL,过夜,达到70%融合后,将细胞分为对照组、LPS刺激组、LPS+肝素0.1U/mL组和LPS+肝素1U/mL组4组。肝素作用组均于10 $\mu$ g/mL LPS刺激前15min加入相应剂量普通肝素;对照组给予与LPS等量的磷酸盐缓冲液(PBS)。于LPS刺激24h后收集细胞上清测定细胞因子,以明确肝素对HPMEC的作用。

**1.3.2 实验2:**另取部分细胞,分别于加入PBS或LPS前4h加入5 $\mu$ g/mL LPS-RS,于LPS刺激24h后收集细胞上清测定细胞因子,以明确TLR4在

LPS 诱导 HPMEC 损伤中的作用。

**1.3.3 实验 3:**另取细胞,分为对照组、LPS 刺激组、LPS + 0.1 U/mL 肝素组和 LPS + 1 U/mL 肝素组,各组处理方法同实验 1,于 LPS 刺激 1 h 后收集细胞,测定 TLR4 蛋白表达,以明确肝素对 TLR4 的作用。

#### 1.4 检测指标及方法

**1.4.1 细胞因子测定:**各组在 LPS 刺激 24 h 后收集细胞上清,4 °C 下 4 000 r/min (离心半径 3 cm) 离心 20 min 取上清,应用 ELISA 方法测定 IL-6、G-CSF 水平。操作严格按照试剂盒说明书进行,每组样本取 3 个复孔。

**1.4.2 TLR4 蛋白表达测定:**采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测。LPS 刺激 1 h 后收集细胞提取总蛋白,考马斯亮蓝定量。各组取等量蛋白 20 μg,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离,转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,于 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 1 h。加入 TLR4 (1:1 000 稀释)、β-actin (1:2 000 稀释) 特异性抗体 4 °C 孵育过夜。1×含吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 2 h,1×PBST 洗膜 3 次。以电化学发光 (ECL) 法检测,通过 X 胶片获得蛋白信号。Image J 软件分析灰度值,以目的蛋白和 β-actin 的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

**1.5 统计学处理:**计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,计量数据采用单因素方差分析,方差齐时用 LSD 法检验,方差不齐采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肝素对 IL-6、G-CSF 水平的影响 (表 1):**LPS 刺激 HPMEC 24 h 后,IL-6、G-CSF 水平明显高于对照组 (均  $P < 0.05$ );肝素预处理可降低 IL-6、G-CSF 水平 (均  $P < 0.05$ ),以 1 U/mL 肝素作用更较好。

表 1 肝素对 LPS 刺激 HPMEC 24 h 后 IL-6 和 G-CSF 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (孔)	IL-6 (ng/L)	G-CSF (ng/L)
对照组	3	75.5 ± 18.2	35.3 ± 12.6
LPS 刺激组	3	655.9 ± 58.3 <sup>a</sup>	388.7 ± 36.2 <sup>a</sup>
LPS + 肝素 0.1 U/mL 组	3	518.2 ± 64.6 <sup>b</sup>	298.8 ± 41.0 <sup>b</sup>
LPS + 肝素 1 U/mL 组	3	489.1 ± 75.6 <sup>b</sup>	273.4 ± 33.2 <sup>b</sup>
F 值		89.416	56.783
P 值		0.000	0.000

注: LPS 为脂多糖,HPMEC 为人肺微血管内皮细胞,IL-6 为白细胞介素 -6, G-CSF 为粒细胞集落刺激因子;与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 刺激组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

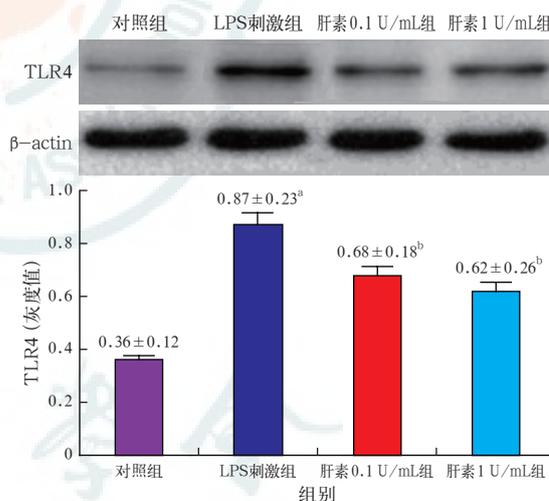
**2.2 TLR4 信号通路的作用 (表 2):**LPS-RS 可明显抑制 LPS 引起的 IL-6、G-CSF 水平增高 (均  $P < 0.05$ );仅应用 LPS-RS 对细胞因子水平无明显影响。

表 2 TLR4 在 LPS 刺激 HPMEC 24 h 后产生 IL-6 和 G-CSF 中的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (孔)	IL-6 (ng/L)	G-CSF (ng/L)
对照组	3	75.5 ± 18.2	35.3 ± 12.6
LPS 刺激组	3	655.9 ± 58.3 <sup>a</sup>	388.7 ± 36.2 <sup>a</sup>
LPS-RS 对照组	3	118.2 ± 42.1 <sup>b</sup>	48.4 ± 26.8 <sup>b</sup>
LPS + LPS-RS 组	3	139.1 ± 37.6 <sup>b</sup>	73.7 ± 19.7 <sup>b</sup>
F 值		70.704	35.264
P 值		0.000	0.000

注: TLR4 为 Toll 样受体 4, LPS 为脂多糖,HPMEC 为人肺微血管内皮细胞,IL-6 为白细胞介素 -6, G-CSF 为粒细胞集落刺激因子, LPS-RS 为 TLR4 拮抗剂球形红细菌 LPS;与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 刺激组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

**2.3 肝素对 TLR4 蛋白表达的影响 (图 1):**LPS 刺激 1 h 后 TLR4 蛋白表达明显高于对照组 ( $P < 0.05$ );肝素预处理可减少 TLR4 蛋白表达 (均  $P < 0.05$ ),以 1 U/mL 肝素作用较好。



注: LPS 为脂多糖,HPMEC 为人肺微血管内皮细胞, TLR4 为 Toll 样受体 4, β-actin 为 β-肌动蛋白;与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 LPS 刺激组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 肝素对 LPS 刺激 HPMEC 1 h 后 TLR4 蛋白表达的影响

## 3 讨论

脓毒症是宿主防御机制对入侵病原微生物的过度炎症反应<sup>[11-13]</sup>,病死率高达 30% ~ 70%,是重症加强治疗病房 (ICU) 患者最主要的死亡原因<sup>[14]</sup>。近年研究表明,脓毒症的病理生理过程包括两个部分,即高凝状态导致的血栓形成和血管内皮细胞功能障碍<sup>[15]</sup>。脓毒症时,在炎症因子作用下,一方面可刺激组织因子表达,启动外源性凝血途径,从而导致高凝

状态和纤溶抑制,进而使循环系统中微血栓形成;另一方面作用于内皮细胞和白细胞并导致其活化,活化的白细胞在血管内皮上滚动、黏附,导致内皮细胞损伤,发生形态学改变和功能改变,进而使内皮细胞变成促凝表面,并释放炎症因子。因此,脓毒症过程中凝血和炎症相互作用,形成恶性循环,最终导致微血管阻塞、微循环障碍和组织循环状态恶化<sup>[16-18]</sup>。

肝素是一种异质性的、高度硫酸化的氨基葡聚糖,是临床上广泛应用的抗凝剂,除抗凝作用外,还具有有一系列细胞保护作用,如抑制炎症反应<sup>[19-21]</sup>、防止凋亡<sup>[22]</sup>、调节血管黏附<sup>[23-24]</sup>。肝素在临床应用中对于脓毒症患者有积极效应<sup>[25-26]</sup>,但这绝非是由于其单一的抗凝作用,既然脓毒症是炎症和凝血的交织,所以近年来本课题组致力于探讨肝素是否对脓毒症具有抗炎作用及其具体机制。体内及体外研究证实,肝素可通过抑制核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活化而发挥抗炎作用<sup>[7,27]</sup>,但是否有其他机制参与仍需进一步探讨。脓毒症时肺是最早也是最受累的器官,基于内皮细胞和微循环障碍在脓毒症发生发展过程中起关键作用,且前期研究多为探讨大血管内皮细胞,因此本研究选择 HPMEC 作为研究对象。

G-CSF 是粒细胞特异性因子,但在内皮细胞中也发现了其受体,并发挥着生物学活性<sup>[28-29]</sup>。血管内皮细胞是位于血管内表面隔离血细胞和血管外组织的一层屏障,在维持出凝血平衡、控制免疫和炎症反应中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。目前研究认为,内皮细胞主动参与到炎症反应、免疫反应和血栓形成的过程中<sup>[30-31]</sup>。内皮细胞受到刺激后可以产生粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、G-CSF 等细胞因子<sup>[32]</sup>;反过来,细胞因子可刺激或抑制内皮细胞的生长和功能<sup>[33]</sup>。这些造血干细胞生长因子对内皮细胞的影响与患者临床表现很相关,尤其中心静脉血栓形成、内皮渗漏综合征<sup>[34-35]</sup>。本研究发现,LPS 刺激 HPMEC 可以引发高度特异性炎症反应,特点是 IL-6、G-CSF 产生增加;肝素预处理可降低炎症因子水平,从而提示肝素可能通过抑制 IL-6、G-CSF 水平发挥对微血管内皮细胞的保护作用。

组织损伤或感染后,机体启动对入侵病原微生物的第一道防线,即先天性免疫反应,从而引发机体炎症反应、清除病原微生物和促进组织修复。这种反应是通过 TLR 等病原识别受体 (PRR) 识别病原相关分子模式 (PAMP) 实现的<sup>[36]</sup>。TLR4 是细菌 LPS 的受体,LPS 可导致其活化,并进一步活化巨噬细胞,

表达组织相容性复合物 I 和 II,从而表达细胞因子和趋化因子,并启动获得性免疫反应和炎症反应<sup>[37]</sup>。

本研究中为了明确 LPS 引起的 IL-6、G-CSF 上调是否与 TLR4 活化有关,分别于加入 PBS 或 LPS 前 4 h 加入 TLR4 拮抗剂 LPS-RS,其可通过与髓样分化蛋白-2 (MD-2) 结合抑制 TLR4 活化。结果显示,加入 TLR4 拮抗剂后,可减少 LPS 刺激下 IL-6、G-CSF 的产生,且几乎接近对照组水平,提示 LPS 可能通过 TLR4 途径刺激 IL-6、G-CSF 的产生。肝素预处理可减少 TLR4 蛋白表达,提示肝素可能通过 TLR4 途径调节 IL-6、G-CSF 的产生。

### 参考文献

- [1] Basu S, Dunn A, Ward A. G-CSF: function and modes of action (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 10 (1): 3-10.
- [2] Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor [J]. *Blood*, 1991, 78 (11): 2791-2808.
- [3] 于景敏,孟志云,窦桂芳. 粒细胞集落刺激因子的研究新进展 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16 (2): 452-456.
- [4] Koeffler HP, Gasson J, Ranyard J, et al. Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Blood*, 1987, 70 (1): 55-59.
- [5] Nelson S. Novel nonantibiotic therapies for pneumonia: cytokines and host defense [J]. *Chest*, 2001, 119 (2 Suppl): 419S-425S.
- [6] Knapp S, Hareng L, Rijnevelde AW, et al. Activation of neutrophils and inhibition of the proinflammatory cytokine response by endogenous granulocyte colony-stimulating factor in murine pneumococcal pneumonia [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189 (8): 1506-1515.
- [7] Li X, Zheng Z, Li X, et al. Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF- $\kappa$ B activation on endothelial cell [J]. *Cytokine*, 2012, 60 (1): 114-121.
- [8] Yagmurur MC, Turk E, Moray G, et al. Effects of heparin on bacterial translocation and gut epithelial apoptosis after burn injury in the rat: dose-dependent inhibition of the complement cascade [J]. *Burns*, 2005, 31 (5): 603-609.
- [9] 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.
- [10] 李旭,郑振,马晓春. 肝素对急性肺损伤大鼠基质金属蛋白酶 2 和 9 活性的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2012, 24 (10): 608-611.
- [11] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (4): 1250-1256.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29 (7): 1303-1310.
- [15] Wenzel RP. Treating sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (13): 966-967.
- [16] 马晓春. 应加深脓毒症微循环功能障碍的认识 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23 (2): 66-67.
- [17] Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341 (8): 586-592.
- [18] 马晓春,李旭. 肝素在脓毒症治疗中的应用前景 [J]. *中国危重*

- 病急救医学, 2010, 22 (9) : 566-569.
- [19] Tyrell DJ, Killeather S, Page CP. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant [J]. Trends Pharmacol Sci, 1995, 16 (6) : 198-204.
- [20] Harada N, Okajima K, Uchiba M. Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats [J]. Crit Care Med, 2006, 34 (7) : 1883-1891.
- [21] Morrison AM, Wang P, Chaudry IH. A novel nonanticoagulant heparin prevents vascular endothelial cell dysfunction during hyperdynamic sepsis [J]. Shock, 1996, 6 (1) : 46-51.
- [22] Yagmurdu MC, Turk E, Moray G, et al. Effects of heparin on bacterial translocation and gut epithelial apoptosis after burn injury in the rat : dose-dependent inhibition of the complement cascade [J]. Burns, 2005, 31 (5) : 603-609.
- [23] Matzner Y, Marx G, Drexler R, et al. The inhibitory effect of heparin and related glycosaminoglycans on neutrophil chemotaxis [J]. Thromb Haemost, 1984, 52 (2) : 134-137.
- [24] Freischlag JA, Colburn MD, Quiñones-Baldrich WJ, et al. Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril [J]. J Surg Res, 1992, 52 (5) : 523-529.
- [25] 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.
- [26] 艾宇航, 张丽娜, 龚华, 等. 低分子肝素治疗脓毒症的前瞻性临床研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17 (12) : 736-739.
- [27] Li X, Li Z, Zheng Z, et al. Unfractionated heparin ameliorates lipopolysaccharide-induced lung inflammation by downregulating nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Inflammation, 2013, 36 (6) : 1201-1208.
- [28] Nicola NA, Metcalf D. Binding of the differentiation-inducer, granulocyte-colony-stimulating factor, to responsive but not unresponsive leukemic cell lines [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984, 81 (12) : 3765-3769.
- [29] Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, et al. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate [J]. Nature, 1989, 337 (6206) : 471-473.
- [30] Pober JS. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology [J]. Am J Pathol, 1988, 133 (3) : 426-433.
- [31] Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules [J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11 : 767-804.
- [32] Fibbe WE, Daha MR, Hiemstra PS, et al. Interleukin 1 and poly (rI) .poly (rC) induce production of granulocyte CSF, macrophage CSF, and granulocyte-macrophage CSF by human endothelial cells [J]. Exp Hematol, 1989, 17 (3) : 229-234.
- [33] Saegusa Y, Ziff M, Welkovich L, et al. Effect of inflammatory cytokines on human endothelial cell proliferation [J]. J Cell Physiol, 1990, 142 (3) : 488-495.
- [34] Champlin RE, Nimer SD, Ireland P, et al. Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor [J]. Blood, 1989, 73 (3) : 694-699.
- [35] Brandt SJ, Peters WP, Atwater SK, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation [J]. N Engl J Med, 1988, 318 (14) : 869-876.
- [36] Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs : a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity [J]. Trends Immunol, 2006, 27 (8) : 352-357.
- [37] Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS : the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury [J]. Glia, 2010, 58 (3) : 253-263.

(收稿日期: 2014-06-30) (本文编辑: 孙茜)

## • 科研新闻速递 •

### 超敏肌钙蛋白 T 是急诊疑似感染患者院内病死率的独立预测因子：一项前瞻性观察推导研究

为评估超敏肌钙蛋白 T (hs-cTnT) 对预测急诊科疑似感染患者预后的准确性, 荷兰学者进行了一项前瞻性观察性研究。该研究采用多变量 logistic 回归分析 hs-cTnT 对住院病死率的预测价值。结果显示, 死亡者 ( $n=23$ ) hs-cTnT (ng/L) 明显高于存活者 [ $n=269$ ; 57 (25.90) 比 15 (7.28),  $P<0.001$ ]。此外, hs-cTnT 最低组病死率为 0, 因此可以很好地预测存活。第二四分位数多变量 logistic 回归分析显示, hs-cTnT 是院内病死率的独立预测因子, 与 hs-cTnT 第二四分位数比较, hs-cTnT 第三和第四四分位数校正优势比 (OR) 分别为 2.2 [95% 可信区间 (95%CI) = 0.4 ~ 12.1] 和 5.8 (95%CI = 1.2 ~ 27.3)。hs-cTnT 的受试者工作特征曲线下面积 (AUC) 为 0.81 (0.74 ~ 0.88), 与 PIRO (易感性、感染、反应和器官功能衰竭分级) 的 AUC [0.78 (0.68 ~ 0.87)] 相似 ( $P>0.05$ )。整体 hs-cTnT 的阴性预测值为 99%。该研究证实, 对于急诊疑似感染的患者, 经常使用的生物标志物 hs-cTnT 是住院病死率的独立预测因素, 具有优良的判别性能。未来的研究应集中在 hs-cTnT 对现有的危险分层工具的附加价值上。

折楔 \* 穆夹咆 \* 衬韵俳 < Ck cpe K cb H > \* 0. / 2 \* 1 / & // ' 8 660+666

f m 8-u u u, l a ' g l k , l g, emt-ns ' k cb-01743054

### 延迟抗菌药物治疗可增加脓毒症患儿病死率和器官功能障碍持续时间

延迟抗菌药物治疗与成人脓毒症不良预后相关, 但有关抗菌药物使用时间与脓毒症患儿病死率和器官功能的研究数据十分有限。有学者进行了一项单中心回顾性观察研究, 以了解抗菌药物使用时间对严重脓毒症或脓毒性休克患儿病死率和器官功能障碍的影响。该研究纳入了儿科重症加强治疗病房 (ICU) 130 例严重脓毒症或脓毒性休克患儿。结果显示, 从发现脓毒症到初始抗菌药物治疗的平均时间为 140 (74 ~ 277) min, 其中恰当使用抗菌药物治疗的平均时间是 177 (90 ~ 550) min。从发现脓毒症到初始抗菌药物使用每延迟 1 h 的死亡风险不断升高, 但延迟到 3 h 才有统计学意义。经个体混杂因素调整后的倾向评分分析显示, 延迟超过 3 h 进行初始抗菌药物治疗和恰当抗菌药物治疗患者的死亡风险比值比分别为 3.92 [95% 可信区间 (95%CI) = 1.27 ~ 12.06] 和 3.59 (95%CI = 1.09 ~ 11.76)。将病情严重程度匹配后, 延迟超过 3 h 进行初始抗菌药物治疗和恰当抗菌药物治疗的 ICU 死亡风险比值比分别增加到 4.84 (95%CI = 1.45 ~ 16.2) 和 4.92 (95%CI = 1.30 ~ 18.58)。初始抗菌药物延迟超过 3 h 还与更少的无器官衰竭天数相关 [16 (1 ~ 23) 比 20 (6 ~ 26),  $P=0.04$ ]。该研究证实了延迟抗菌药物治疗可延长器官功能障碍时间, 是脓毒症患儿死亡的独立危险因素。

折楔 \* 穆夹咆 \* 衬韵俳 < A pgr A -pc K cb > \* 0. / 2 \* 20 & // ' 802. 7+02/5

f m 8-u u u, l a ' g l k , l g, emt-ns ' k cb-03/26375