

肝素预处理对脓毒症小鼠血清及肺组织中中性粒细胞胞外诱捕网水平的影响

蒋静 穆盛田 张芳晓 乔艳婷 吴永然 章志丹 马晓春

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: 章志丹, Email: 13998318999@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.010

【摘要】 目的 探讨肝素预处理对脓毒症小鼠血清及肺组织中中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的影响及其作用机制。**方法** 按随机数字表法将雄性 C57BL/6J 小鼠分为对照组、模型组、肝素干预组, 每组 30 只。腹腔注射脂多糖(LPS) 30 mg/kg(溶于 100 μ L 生理盐水)建立脓毒症动物模型; 肝素干预组于制模前 30 min 皮下注射普通肝素 8 U(溶于 20 μ L 生理盐水)。各组于制模后 6 h 取血清和肺组织, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)以及反映 NETs 水平的组蛋白 2AX(H2AX)和中性粒细胞弹性蛋白酶(NE); 用 PicoGreen 荧光染料检测血清游离 DNA(cf-DNA/NETs)水平; 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织 H2AX、NE 蛋白表达。**结果** 模型组血清 TNF- α 、IL-6、H2AX、NE、cf-DNA/NETs 水平及肺组织 H2AX、NE 蛋白表达均明显高于对照组[TNF- α (ng/L): 133.0 $\pm$ 14.1 比 2.7 $\pm$ 1.0, IL-6(ng/L): 3 911.2 $\pm$ 189.2 比 298.9 $\pm$ 52.5, H2AX(ng/L): 545.5 $\pm$ 40.0 比 21.9 $\pm$ 8.3, NE(μ g/L): 6.48 $\pm$ 0.12 比 0.47 $\pm$ 0.15, cf-DNA/NETs(μ g/L): 846.3 $\pm$ 137.5 比 152.7 $\pm$ 36.4, H2AX 蛋白(灰度值): 1.14 $\pm$ 0.09 比 0.68 $\pm$ 0.04, NE 蛋白(灰度值): 0.56 $\pm$ 0.03 比 0.32 $\pm$ 0.04, 均 $P < 0.05$]。肝素预处理能明显降低脓毒症小鼠血清 TNF- α 、H2AX、NE、cf-DNA/NETs 水平及肺组织 H2AX、NE 蛋白表达[TNF- α (ng/L): 83.2 $\pm$ 7.6 比 133.0 $\pm$ 14.1, H2AX(ng/L): 435.0 $\pm$ 39.0 比 545.5 $\pm$ 40.0, NE(μ g/L): 4.26 $\pm$ 0.17 比 6.48 $\pm$ 0.12, cf-DNA/NETs(μ g/L): 606.5 $\pm$ 73.9 比 846.3 $\pm$ 137.5, H2AX 蛋白(灰度值): 0.91 $\pm$ 0.03 比 1.14 $\pm$ 0.09, NE 蛋白(灰度值): 0.42 $\pm$ 0.03 比 0.56 $\pm$ 0.03, 均 $P < 0.05$], 而对血清 IL-6 水平无明显影响(ng/L: 3 919.9 $\pm$ 166.6 比 3 911.2 $\pm$ 189.2, $P > 0.05$)。**结论** 肝素预处理能降低脓毒症小鼠血清及肺组织中 NETs 水平, 可能是对脓毒症发挥器官保护作用的潜在机制。

【关键词】 脓毒症; 中性粒细胞胞外诱捕网; 肝素; 组蛋白 2AX; 中性粒细胞弹性蛋白酶

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2014021078)

Effect of heparin pretreatment on the level of neutrophil extracellular traps of serum and lung tissue in septic mice Jiang Jing, Mu Shengtian, Zhang Fangxiao, Qiao Yanting, Wu Yongran, Zhang Zhidan, Ma Xiaochun
Department of Critical Care Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China
Corresponding author: Zhang Zhidan, Email: 13998318999@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of heparin pretreatment on serum and lung tissue level of neutrophil extracellular traps (NETs) in septic mice model and its molecular mechanism. **Methods** Ninety male C57BL/6J mice were randomly divided into control group ($n = 30$), lipopolysaccharides (LPS) group ($n = 30$, 30 mg/kg LPS in 100 μ L normal saline was intraperitoneally injected) and LPS+heparin group ($n = 30$, 8 U of heparin in 20 μ L normal saline was subcutaneously injected 30 minutes before the injection of LPS). Six hours later of LPS injection, blood was collected and lung tissue was harvested. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess the concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and histones 2AX (H2AX), neutrophil elastase (NE), which reflected NETs concentration. PicoGreen fluorescent dyes was used to detect serum circulating free DNA (cf-DNA/NETs) concentration. The protein expression levels of H2AX and NE in lung tissue were examined by Western Blot. **Results** The serum concentrations of TNF- α , IL-6, H2AX, NE, cf-DNA/NETs, and the protein expression levels of H2AX and NE in lung tissue of septic mice were significantly higher than those of control group [TNF- α (ng/L): 133.0 $\pm$ 14.1 vs. 2.7 $\pm$ 1.0, IL-6 (ng/L): 3 911.2 $\pm$ 189.2 vs. 298.9 $\pm$ 52.5, H2AX (ng/L): 545.5 $\pm$ 40.0 vs. 21.9 $\pm$ 8.3, NE (μ g/L): 6.48 $\pm$ 0.12 vs. 0.47 $\pm$ 0.15, cf-DNA/NETs (μ g/L): 846.3 $\pm$ 137.5 vs. 152.7 $\pm$ 36.4, H2AX protein (gray value): 1.14 $\pm$ 0.09 vs. 0.68 $\pm$ 0.04, NE protein (gray value): 0.56 $\pm$ 0.03 vs. 0.32 $\pm$ 0.04, all $P < 0.05$]. After heparin pretreatment, levels of serum TNF- α , H2AX, NE, cf-DNA/NETs, and protein expression levels of H2AX and NE in lung tissue were significantly reduced [TNF- α (ng/L): 83.2 $\pm$ 7.6 vs. 133.0 $\pm$ 14.1, H2AX (ng/L): 435.0 $\pm$ 39.0 vs. 545.5 $\pm$ 40.0, NE (μ g/L): 4.26 $\pm$ 0.17 vs. 6.48 $\pm$ 0.12, cf-DNA/NETs (μ g/L): 606.5 $\pm$ 73.9 vs. 846.3 $\pm$ 137.5, H2AX protein (gray value): 0.91 $\pm$ 0.03 vs. 1.14 $\pm$ 0.09, NE protein (gray value): 0.42 $\pm$ 0.03 vs. 0.56 $\pm$ 0.03, all $P < 0.05$], but no significant change was found in IL-6 (ng/L: 3 919.9 $\pm$ 166.6 vs. 3 911.2 $\pm$ 189.2, $P > 0.05$). **Conclusion** Heparin pretreatment could significantly decrease the level of NETs in serum and lung tissue, and can be the potential mechanism of its organ protection in sepsis.

【Key words】 Sepsis; Neutrophil extracellular traps; Heparin; Histones 2AX; Neutrophil elastase

Fund program: National Natural Sciences Foundation of Liaoning (2014021078)

脓毒症发病率呈逐年上升趋势,尽管综合治疗手段逐步提高,但脓毒症及感染性休克的病死率未明显下降^[1]。曾文美等^[2]研究发现,脓毒症时凝血功能障碍,炎症因子水平增加,造成炎症与抗炎失衡,引起多器官功能障碍。作为机体的第一道防线,中性粒细胞在感染的防御中起着重要作用^[3-5]。研究表明,中性粒细胞释放的由染色体和组蛋白等构成的中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)能够捕获并杀灭病原微生物,是中性粒细胞发挥抗感染作用的一种新途径^[6]。但是过量的 NETs 也能通过不同途径参与机体炎症反应,激活凝血系统,并诱导内皮细胞损伤,在脓毒症发病机制中可能占有重要地位^[7-8]。最近研究显示,脓毒症患者血清 NETs 水平明显增高^[9],但组织中 NETs 水平的变化尚不得而知。

肝素是多聚阴离子,能够阻止带正电荷的组胺与血小板之间相互作用,抑制凝血酶和 Xa 因子的活性;肝素亦可与 NETs 中带正电荷的组蛋白相结合,降低 NETs 的活性,从而减弱 NETs 介导的促凝效应^[4]。已有研究证实肝素对脓毒症具有器官保护作用,并可降低脓毒症患者的病死率^[10-11],但其对脓毒症患者血清及组织中 NETs 水平的影响尚不清楚。本研究采用脂多糖(LPS)致脓毒症小鼠模型,观察其血清及肺组织中 NETs 水平的变化,并评价肝素对 NETs 的影响,探讨肝素能否通过调节 NETs 水平从而发挥对脓毒症的器官保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 90 只雄性 C57BL/6J 小鼠,8~10 周龄,体重 20~25 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,许可证号:SCXK(辽)2010-0001。按随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组及肝素干预组,每组 30 只。

1.2 脓毒症动物模型制备及处理: 皮下注射 20 μ L 生理盐水后 30 min,腹腔注射 LPS 30 mg/kg(溶于 100 μ L 生理盐水中)建立脓毒症动物模型;对照组仅皮下注射生理盐水。肝素干预组于制模前 30 min 皮下注射普通肝素 8 U(溶于 20 μ L 生理盐水中)。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法: 制模后 6 h,腹腔注射 3.5% 水合氯醛麻醉小鼠后固定,暴露心脏,取右心室血约 300 μ L,离心 15 min 取血清,于 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存

备检。随后于右心室注射 5 mL 生理盐水冲净肺组织血液,取肺组织于 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存备检。

1.3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中炎症因子、NETs 水平: 将血清标本逐步复温后各取 100 μ L,用 ELISA 检测炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6(IL-6)以及反映 NETs 水平的组蛋白 2AX(H2AX)和中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)的吸光度(A),绘制标准曲线,计算 TNF- α 、IL-6、H2AX 及 NE 的含量。

1.3.2 荧光染色法检测血清中游离 DNA(cf-DNA/NETs)水平: 血清标本复温后各取 100 μ L,加入 PicoGreen 荧光染料 100 μ L,避光孵育 5 min 后应用荧光酶标仪检测样品荧光值,根据标准曲线计算 cf-DNA/NETs 水平。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织 H2AX 及 NE 蛋白表达: 采用含蛋白酶抑制剂 Cocktail 和苯甲基磺酰氟化物(PMSF)的 RIPA 裂解液及超声裂解肺组织,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,加入含阴离子变性去污剂十二烷基硫酸钠(SDS)的上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。10% 分离胶和 5% 浓缩胶灌制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,取 30 μ g 总蛋白 60 V 恒压电泳,待溴酚蓝到达凝胶底部。200 mA 恒流转膜 60 min,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1.5 h,4 $^{\circ}$ C 孵育 H2AX(1:200)和 NE(1:500)过夜;含 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗膜,加入 1:5 000 稀释二抗,室温孵育 1 h;PBST 洗膜,采用免疫化学发光(ECL)并采集图像进行处理,应用 Quantity One 软件分析图像,以目的蛋白与内参 β -肌动蛋白(β -actin)的灰度值比值表示。

1.4 统计学分析: 使用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用非参数秩和检验;*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清炎症因子、NETs 水平(表 1): 模型组血清 TNF- α 、IL-6、H2AX、NE 水平均明显高于对照组(均 *P* < 0.05),提示注射 LPS 后能引起小鼠体内炎症

反应。肝素预处理能够明显降低脓毒症小鼠血清 TNF- α 、H2AX 和 NE 水平(均 $P < 0.05$),而对 IL-6 无明显影响。

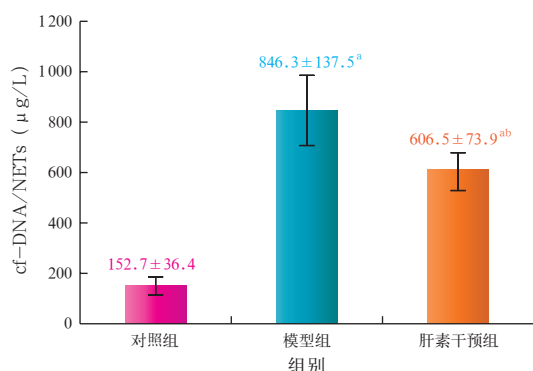
表 1 肝素预处理对脓毒症小鼠血清炎症因子、NETs 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组	30	2.7 $\pm$ 1.0	298.9 $\pm$ 52.5
模型组	30	133.0 $\pm$ 14.1 ^a	3 911.2 $\pm$ 189.2 ^a
肝素干预组	30	83.2 $\pm$ 7.6 ^{ab}	3 919.9 $\pm$ 166.6 ^a

组别	动物数(只)	H2AX (ng/L)	NE (μ g/L)
对照组	30	21.9 $\pm$ 8.3	0.47 $\pm$ 0.15
模型组	30	545.5 $\pm$ 40.0 ^a	6.48 $\pm$ 0.12 ^a
肝素干预组	30	435.0 $\pm$ 39.0 ^{ab}	4.26 $\pm$ 0.17 ^{ab}

注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-6 为白细胞介素-6,H2AX 为组蛋白 2AX,NE 为中性粒细胞弹性蛋白酶;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

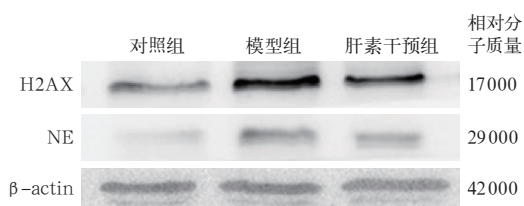
2.2 血清 cf-DNA/NETs 水平(图 1):模型组血清 cf-DNA/NETs 水平明显高于对照组($P < 0.05$);肝素预处理能明显降低脓毒症小鼠血清 cf-DNA/NETs 水平($P < 0.05$)。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

图 1 肝素预处理对脓毒症小鼠血清游离 DNA (cf-DNA/NETs) 水平的影响

2.3 肺组织 NETs 蛋白表达(图 2;表 2):Western Blot 结果显示,模型组肺组织 H2AX 和 NE 蛋白表达均明显高于对照组(均 $P < 0.05$);肝素预处理能明显降低脓毒症小鼠肺组织 H2AX 和 NE 蛋白表达(均 $P < 0.05$)。



H2AX 为组蛋白 2AX,NE 为中性粒细胞弹性蛋白酶,
β-actin 为 β-肌动蛋白

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠肺组织中 H2AX、NE 蛋白表达

表 2 肝素预处理对脓毒症小鼠肺组织中 NETs 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	H2AX 蛋白(灰度值)	NE 蛋白(灰度值)
对照组	30	0.68 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.04
模型组	30	1.14 $\pm$ 0.09 ^a	0.56 $\pm$ 0.03 ^a
肝素干预组	30	0.91 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.42 $\pm$ 0.03 ^{ab}

注:NETs 为中性粒细胞外诱捕网,H2AX 为组蛋白 2AX,NE 为中性粒细胞弹性蛋白酶,β-actin 为 β-肌动蛋白;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

中性粒细胞是人体天然免疫系统的重要效应细胞,在抗感染早期免疫应答阶段发挥主力军作用。传统观点认为,中性粒细胞杀灭病原微生物主要依赖吞噬和脱颗粒作用两种机制^[12]。2004 年德国科学家 Brinkmann 等^[6]发现活化的中性粒细胞会释放一种由 DNA 和组蛋白等构成的网状结构,即 NETs。NETs 能够限制多种病原微生物的扩散,同时捕获并杀灭病原微生物,成为中性粒细胞杀菌作用的另一种新途径^[13]。

在形态学上,NETs 为球状颗粒串在丝状纤维并相互缠绕而形成的网状陷阱样结构。球状颗粒由中性粒细胞胞质内的颗粒蛋白构成,主要包括组织蛋白酶 G、弹性蛋白酶等,丝状纤维则主要由非浓缩染色质纤维构成。简而言之,NETs 的结构即 DNA 纤维骨架包被了抗微生物肽和具有降解作用的酶。在扫描电镜下观察到 NETs 包括一段直径在 15 ~ 17 nm 的光滑纤维和直径在 25 nm 的球形区。通过核酸内切酶对 NETs 结构的破坏,以及 NETs 可以与组蛋白抗体相互作用的现象可以得出,NETs 的主要结构为 DNA、组蛋白(H1、H2A、H2B、H3 及 H4)、抗菌肽和蛋白酶。由于组蛋白带正电荷,因此 NETs 可以与一些带负电荷的大分子如肝素相结合从而发挥其生物学作用^[4]。

虽然 NETs 具有捕获并杀灭病原微生物发挥抗感染的作用,但过量的 NETs 也能够诱导内皮细胞损伤、凝血功能障碍及炎症反应的发生,对机体有害^[14]。目前对 NETs 的检测已有较成熟的方法^[15]。由于 NETs 的主要成分为游离 DNA、组蛋白及弹性蛋白酶,所以本研究中分别检测脓毒症小鼠血清及肺组织中 cf-DNA/NETs、H2AX 及 NE 的水平,来整体反映 NETs 的变化。结果显示,脓毒症小鼠血清 cf-DNA/NETs、NE、H2AX 水平及肺组织 NE、H2AX 蛋白表达均较对照组明显升高,提示 NETs 在脓毒症小鼠血清及肺组织内均有高水平表达,进一步证

明 NETs 可能参与了脓毒症及相关器官损伤的发生发展过程。研究证实,应用 LPS 刺激中性粒细胞可使 NETs 生成增加^[16],同时也可诱导 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎性介质释放。本研究也显示,脓毒症小鼠血清 TNF- α 、IL-6、H2AX、NE 水平明显升高。Clark 等^[7]研究显示,脓毒症患者血清 NETs 水平明显增高,提示 NETs 可能是脓毒症发病机制中的重要环节。

多项研究已经证实肝素对脓毒症具有器官保护作用,如张艳芳等^[17]研究显示,小剂量肝素可通过降低血黏度、减少血小板聚集、降低纤维蛋白原,从而改善肺心病患者的肺循环;谢明剑^[18]研究显示,低分子肝素通过抗凝、抗血栓作用,从而改善脑梗死患者的疗效;尹晓晗等^[19]认为,普通肝素通过上调血红素氧合酶-1 表达从而对脓毒症肠损伤小鼠肠黏膜发挥保护作用;董萌^[20]研究显示,辛伐他汀、氯吡格雷联合低分子肝素治疗可明显提高不稳定型心绞痛患者的疗效,对心肌起到保护作用;任宏生等^[21]研究发现阿托伐他汀联合低分子肝素对脓毒症大鼠炎症反应及肺脏产生保护作用。但肝素能否通过降低血清及组织中 NETs 水平从而发挥器官保护作用尚不清楚。本研究于 LPS 致脓毒症模型前给予肝素预处理,结果显示,脓毒症小鼠血清 cf-DNA/NETs、NE、H2AX 水平及肺组织 NE、H2AX 蛋白表达均明显降低,提示肝素降低血清及肺组织 NETs 水平是发挥脓毒症器官保护作用的潜在机制。

本研究的局限性在于仅测定了制模后 6 h 的 NETs 表达水平,对于 NETs 在脓毒症发病机制中的持续作用尚有待进一步研究证实。

综上所述,脓毒症小鼠血清及肺组织 NETs 水平明显升高,提示 NETs 可能参与了脓毒症的发病机制;而肝素能够降低脓毒症小鼠血清及肺组织 NETs 水平,可能是肝素对脓毒症发挥保护作用的潜在机制。

参考文献

- [1] Hicks P, Cooper DJ, Webb S, et al. The Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. An assessment by the Australian and New Zealand intensive care society [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2008, 36 (2): 149-151.
- [2] 曾文美,毛璞,黄勇波,等.脓毒症预后影响因素分析及预后价值评估[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22 (2): 118-123. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.003.
- [3] Ermert D, Zychlinsky A, Urban C. Fungal and bacterial killing by neutrophils [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 470 : 293-312. DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5_21.
- [4] Gardiner EE, Andrews RK. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction [J]. *Blood Rev*, 2012, 26 (6): 255-259. DOI: 10.1016/j.blre.2012.09.001.
- [5] Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? [J]. *Blood*, 2013, 122 (16): 2784-2794. DOI: 10.1182/blood-2013-04-457671.
- [6] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
- [7] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (4): 463-469. DOI: 10.1038/nm1565.
- [8] Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis [J]. *Nat Med*, 2009, 15 (11): 1318-1321. DOI: 10.1038/nm.2053.
- [9] Yang S, Qi H, Kan K, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis [J]. *Shock*, 2017, 47 (2): 132-139. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000741.
- [10] Wildhagen KC, de Frutos P G, Reutelingsperger CP, et al. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis [J]. *Blood*, 2014, 123 (7): 1098-1101. DOI: 10.1182/blood-2013-07-514984.
- [11] 邓秋明,陈爱和尚东,等.小剂量肝素对脓毒症患者脏器功能及预后的影响[J].*大连医科大学学报*, 2015, 37 (3): 261-264. DOI: 10.11724/jdmu.2015.03.13.
- [12] Deng QM, Chen AH, Shang D, et al. Effects of low-dose heparin on organ function and prognosis in patients with sepsis [J]. *J Dalian Med Univ*, 2015, 37 (3): 261-264. DOI: 10.11724/jdmu.2015.03.13.
- [13] 关云艳,徐小东.中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的研究进展[J].*免疫学杂志*, 2014, 30 (5): 461-464.
- [14] Guan YY, Xu XD. Advance in neutrophil extracellular traps (NETs) [J]. *Immunol J*, 2014, 30 (5): 461-464.
- [15] 宋明明,王旭,孙炳伟.脓毒症时中性粒细胞胞外诱捕网的研究进展[J].*中华危重病急救医学*, 2015, 27 (2): 152-154. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.016.
- [16] Song MM, Wan X, Sun BW. Advance in research of extracellular trapping net neutrophil in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (2): 152-154. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.016.
- [17] 李旭,马晓春.脓毒症内皮细胞损伤和凝血功能障碍相关的生物标记物[J].*中华危重病急救医学*, 2011, 23 (2): 117-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.02.019.
- [18] Li X, Ma XC. Biomarkers of endothelial cell injury and coagulopathy in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2011, 23 (2): 117-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.02.019.
- [19] 张玥,韩俊燕,李国力,等.小鼠脓毒症模型外周血和肺组织原位中性粒细胞胞外诱捕网的检测[J].*中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2015, 9 (4): 551-554. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.029.
- [20] Zhang Y, Han JY, Li GL, et al. Detection of neutrophil extracellular trap in sepsis mouse model [J]. *Chin J Exp Clin Infect Dis (Electron Ed)*, 2015, 9 (4): 551-554. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.029.
- [21] 宋明明,王旭,秦魏婷,等.外源性一氧化碳释放分子 2 体外干预对毒素/脂多糖刺激中性粒细胞胞外诱捕网形成的作用及其机制[J].*中华烧伤杂志*, 2016, 32 (2): 82-88. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.02.006.
- [12] Song MM, Wang X, Qin WT, et al. Effects of exogenous carbon monoxide-releasing molecule 2 intervention in vitro on formation of human neutrophil extracellular traps stimulated by endotoxin/lipopolysaccharide and its mechanism [J]. *Chin J Burns*, 2016, 32 (2): 82-88. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.02.006.
- [17] 张艳芳,杨庆福,张艳丽.小剂量肝素在肺心病急性加重期中的作用[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2000, 7 (6): 346. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2000.06.006.
- [18] Zhang YF, Yang QF, Zhang YL. Effect of low-dose heparin therapy for acute exacerbation of pulmonary heart disease [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2000, 7 (6): 346. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2000.06.006.
- [18] 谢明剑.补阳还五汤与低分子肝素钙治疗急性脑梗死临床疗效比较[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14 (3): 189-190. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2007.03.022.
- Xie MJ. Clinical observation of Buyang Huanwu decoction and low-

- dose heparin therapy in the treatment of acute cerebral infarction [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2007, 14 (3): 189-190. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2007.03.022.
- [19] 尹晓晗, 陈松, 胡紫薇, 等. 普通肝素对脓毒症肠损伤小鼠肠黏膜血红素加氧酶-1 表达的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (5): 423-426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.009.
- Yin XH, Chen S, Hu ZW, et al. Effect of unfractionated heparin on the expression of heme oxygenase-1 in intestinal mucosa of mice with sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (5): 423-426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.009.
- [20] 董萌. 辛伐他汀联合氯吡格雷和低分子肝素治疗不稳定型心绞痛疗效观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 215-218. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.015.
- Dong M. Therapeutic effect of co-administration of simvastatin, clopidogrel and low molecular weight heparin on patients with unstable angina pectoris [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2014, 21 (3): 215-218. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.015.
- [21] 任宏生, 丁敏, 马海红, 等. 阿托伐他汀联合低分子肝素对脓毒症大鼠炎症反应及肺脏的保护作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (5): 427-432. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.010.
- Ren HS, Ding M, Ma HH, et al. Protective effects of combined use of atorvastatin and low molecular weight heparin on the inflammatory reaction and pulmonary functions in rats with sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (5): 427-432. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.010.
- (收稿日期: 2016-12-22)

• 科研新闻速递 •

合并类风湿关节炎脓毒症患者的近期和远期病死率

类风湿关节炎(RA)患者常合并严重感染和脓毒症,其发病率和死亡风险增高。为确定 RA 是否为重症加强治疗病房(ICU)脓毒症患者入院后近期和远期死亡的独立危险因素,有学者进行了一项回顾性队列研究。该研究基于 SEPSIS-ISR 注册表的数据,研究者收集了 2002 年至 2012 年 7 家大型医院 ICU 诊断为脓毒症的所有患者的数据资料,主要终点指标为 30 d 及 3 年生存率。该研究共纳入 124 例 RA 患者和 248 例非 RA 患者(平均年龄为 71 岁,女性占 64.5%),两组患者感染的主要部位及病原菌分布相似。RA 组和非 RA 组患者严重脓毒症发生率分别为 92% 和 84% ($P=0.03$),感染性休克发生率分别为 50% 和 39% ($P=0.06$)。两组间 30 d 生存率差异无统计学意义,但 RA 组 30 d 幸存者的 3 年生存率较非 RA 组显著降低(34.9% 比 55.7%, $P=0.01$)。多变量 Cox 比例风险回归分析显示,RA 是 30 d 存活患者 3 年死亡的独立危险因素[风险比(HR)=1.63, 95% 可信区间($95\%CI$)=1.03 ~ 1.63, $P=0.04$]。研究者认为,从该研究可以看出,合并 RA 是脓毒症患者 3 年死亡的独立危险因素,但不是近期死亡的独立危险因素。

喻文, 罗红敏, 编译自《Rheumatol Int》, 2017-03-12(电子版)

SOFA、SIRS 和 qSOFA 评分预测 ICU 疑似感染成人患者住院病死率的准确性

第三次国际脓毒症会议更新了脓毒症定义(Sepsis-3),强调推荐序贯器官衰竭评分(SOFA)中 2 个或以上变量组成快速序贯器官衰竭评分(qSOFA),并在脓毒症定义标准中去除了全身炎症反应综合征(SIRS)。近期有学者进行了一项回顾性队列研究,旨在评估 SOFA、SIRS 及 qSOFA 评分对疑似感染重症患者预后的预测能力。该研究纳入 2000 年至 2015 年澳大利亚和新西兰 182 个重症加强治疗病房(ICU)收治的以感染为主要入院诊断的 184 875 例重症患者,记录入 ICU 24 h 内的 SOFA、SIRS 和 qSOFA 评分相关变量指标。主要终点指标为院内病死率;综合次要结局为院内病死率或 ICU 住院时间 ≥ 3 d。结果显示,184 875 例患者平均年龄(62.9 ± 17.4)岁;女性 82 540 例(占 44.6%);最常见的诊断为细菌性肺炎(32 634 例,占 17.7%);34 578 例患者(18.7%)于院内死亡,102 976 例患者(55.7%)院内死亡或 ICU 住院时间 ≥ 3 d。分别有 90.1% 的患者 SOFA 评分 ≥ 2 分,86.7% 的患者满足 SIRS 标准 ≥ 2 项,54.4% 的患者 qSOFA 评分 ≥ 2 分。SOFA 评分较 SIRS 标准和 qSOFA 评分更能预测患者院内病死率,三者的受试者工作特征曲线下面积(AUC)分别为 0.753 [99% 可信区间($99\%CI$)=0.750 ~ 0.757]、0.589 ($99\%CI$ = 0.585 ~ 0.593) 和 0.607 ($99\%CI$ = 0.603 ~ 0.611);预测效能增量分别为:SOFA 评分比 SIRS 标准为 0.164 ($99\%CI$ =0.159 ~ 0.169),SOFA 评分比 qSOFA 评分为 0.146 ($99\%CI$ =0.142 ~ 0.151),均 $P<0.001$ 。SOFA 评分对综合次要终点指标的预测效能($AUC=0.736$, $99\%CI=0.733 \sim 0.739$) 优于 SIRS 标准($AUC=0.609$, $99\%CI=0.606 \sim 0.612$) 和 qSOFA 评分($AUC=0.606$, $99\%CI=0.602 \sim 0.609$);预测效能增量分别为:SOFA 评分比 SIRS 标准为 0.127 ($99\%CI=0.123 \sim 0.131$),SOFA 评分比 qSOFA 评分为 0.131 ($99\%CI=0.127 \sim 0.134$),均 $P<0.001$ 。以上结果在多个敏感性分析后是一致的。研究者据此得出结论,疑似感染的成人患者收入 ICU,其 SOFA 评分 ≥ 2 分时预测院内病死率的准确性比 SIRS 标准或 qSOFA 评分更高,表明 SIRS 标准和 qSOFA 评分对 ICU 患者死亡的预测价值有限。

喻文, 罗红敏, 编译自《JAMA》, 2017, 317 (3): 290-300