

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.26.003

低剂量低分子肝素对内毒素诱发的急性肺损伤的影响*

刘玉¹,刘绍正¹,王先锋¹,王义桥²

(1. 皖北煤电集团总医院麻醉科,安徽宿州 234011;2. 安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230032)

[摘要] **目的** 探讨低剂量低分子肝素(LMWH)对内毒素(LPS)诱发的急性肺损伤(ALI)的影响。**方法** 选取 36 只雄性 SD 大鼠分为 3 组:正常对照组(A 组),LPS 组(B 组)和 LPS+LMWH 组(C 组),每组 12 只。B、C 组腹腔注射 6 mg/kg LPS 诱发 ALI。C 组腹腔注射低分子肝素 100 U/kg,B 组腹腔注入同等容积的生理盐水。6 h 后处死动物,光镜下观察各组大鼠肺组织病理改变,行动脉血气分析、检测肺湿质量/干质量(W/D)比值和支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白浓度;测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)水平;ELISA 法测定血浆中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)及白细胞介素-6(IL-6)水平。**结果** B、C 组 PaO₂、pH 值低于 A 组,C 组与 B 组相比明显升高($P<0.05$)。B、C 组大鼠肺 W/D、BALF 总蛋白及肺组织 MDA、MPO 水平明显高于 A 组($P<0.01$);C 组与 B 组相比,肺 W/D、BALF 中蛋白及肺组织 MDA、MPO 水平明显下降($P<0.05$)。B、C 组大鼠血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平较 A 组明显升高($P<0.01$),而 C 组较 B 组明显降低($P<0.01$)。**结论** LMWH 处理能够减轻 LPS 诱发的急性肺损伤。

[关键词] 肝素,低分子量;内毒素;急性肺损伤;肿瘤坏死因子 α **[中国法分类号]** R605.971**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)26-3608-03

Effects of low-dose low molecular weight heparin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury*

Liu Yu¹, Liu Shaozheng¹, Wang Xianfeng¹, Wang Yiqiao²

(1. Department of Anesthesiology, Wanbei Coal Electricity Group, Suzhou, Anhui 234011, China;

2. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of low-dose low molecular weight heparin(LMWH) on acute lung injury(ALI) induced by lipopolysaccharide(LPS). **Methods** Thirty-six male SD rats were divided into 3 groups:normal control group(A), LPS group(B) and LPS plus LMWH group(C), 12 cases in each group. ALI was induced by intraperitoneal injection of LPS 6 mg/kg in group B,C. The group C accepted intraperitoneal injection of LMWH 100 U/kg, the groups B accepted intraperitoneal injection of the same volume of normal saline. The animals were killed after 6 h, the pathological changes of the lung were observed under light microscope. Arterial blood gases, lung wet to dry ratio (W/D) and protein content in BALF were detected; the levels of MPO and MDA in lung tissue were determined. The levels of serum interleukin1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by ELISA method. **Results** The PaO₂ and pH values in the group B and C were significantly lower than those in the group A, and which in the group C were markedly increased compared with those in the group B($P<0.05$); the lung W/D ratio, protein content in BALF, MDA and MPO levels in the lung tissue in the group B and C were significantly higher than those in the group A($P<0.01$), while the lung W/D ratio, protein content in BALF, MDA and MPO levels in the lung tissue in the group C were significantly decreased compared with the group B ($P<0.05$). The levels of plasma TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the group B and C were markedly increased compared with the group A, while which in the group C were significantly decreased compared with those in the group B ($P<0.01$). **Conclusion** The LMWH treatment might attenuate LPS-induced acute lung injury.

[Key words] heparin, low-molecular-weight; lipopolysaccharide; acute lung injury; tumor necrosis factor- α

脓毒血症导致机体发生系统性炎症反应综合征(SIRS),随之造成低灌注和多器官衰竭,包括急性肺损伤(ALI),因此调节或减轻内毒素(LPS)造成的系统性炎症成为当前众多学科研究的重点。肝素是临床上常用的抗凝剂,几个动物实验和临床研究证实肝素能够减轻脓毒血症导致的肺、肠等损伤^[1-3]。离体研究也证实肝素能够直接抑制中性粒细胞激活,减少 LPS 诱发的白细胞介素 1 β (IL-1 β)和白细胞介素 6(IL-6)生成^[4-5]。脓毒血症时机体凝血系统变化快,而普通肝素抗凝活性较强,因此在脓毒血症时使用受到限制^[6]。离体研究证实,在不产生抗凝效应情况下的低剂量低分子肝素(LMWH)较大剂量低分

子肝素及普通肝素能更有效地抑制中性粒细胞活化^[7]。因此,本实验通过腹腔注射脂多糖制作脓毒血症模型来观察 LMWH 对 LPS 诱发的 ALI 及系统炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 健康清洁级雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 250~300 g,由徐州医科大学动物实验中心提供。所有大鼠均饲养在温度 25℃,湿度 50%,明暗交替各 12 h 的环境中,自由进食和饮水,实验前 12 h 禁食不禁饮。

1.2 方法

1.2.1 实验方案 36 只大鼠分为 3 组:正常对照组(A 组),

* 基金项目:安徽省卫生厅青年基金项目(09B125)。 作者简介:刘玉(1976—),副主任医师,硕士,主要从事危重症急救与脏器保护方面研究。

LPS 组(B 组)和 LPS+LMWH 组(C 组),每组 12 只。A 组在相同时间段腹腔注射等容积的生理盐水,B 组和 C 组腹腔注射 LPS(血清型 055:B5,Sigma 公司,美国)6 mg/kg 诱发 ALI,C 组腹腔注射低分子肝素(齐鲁制药有限公司,批号 6A0042C08)100 U/kg,B 组腹腔注射同容积的生理盐水。

1.2.2 取材及指标测定 造模后 6 h 处死所有大鼠。左心室采血 3 mL,1 mL 用作动脉血气分析,2 mL 分离血清用作 IL-1 β 、IL-6 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测。取部分右肺上叶组织制成 10% 肺组织匀浆,取右肺中叶肺尖组织留作测定肺 W/D[肺 W/D:取右肺中叶肺尖组织称质量为湿质量(W),置于烤箱中 60 $^{\circ}$ C 烘干至恒质量为干质量(D),W/D=湿质量/干质量]。左肺用 4 $^{\circ}$ C 无菌生理盐水行支气管肺泡灌洗,每次灌洗量为 3 mL,灌洗 3 次,记录回收量。收集的支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织匀浆液分别于 3 000 r/min 离心 15 min 后取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 冻存。考马斯亮蓝染色法测定 BALF 中蛋白浓度。分光光度计法测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)水平,ELISA 法检测血浆 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。取小部分右下肺组织,甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

1.3 统计学处理 使用 SPSS13.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动脉血气分析 B 组和 C 组氧分压(PaO₂)、pH 值低于 A 组,C 组与 B 组相比明显升高($P<0.05$);3 组间二氧化碳分压(PaCO₂)比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠动脉血气结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)	pH
A 组	12	98.07 \pm 5.21	40.58 \pm 3.31	7.39 \pm 0.03
B 组	12	61.10 \pm 4.18 ^a	42.91 \pm 3.77	7.24 \pm 0.02 ^a
C 组	12	66.21 \pm 4.35 ^{ab}	42.08 \pm 3.82	7.28 \pm 0.03 ^{ab}
F		227.74	1.26	93.52
P		0.00	0.29	0.00

^a: $P<0.01$,与 A 组比较;^b: $P<0.05$,与 B 组比较

2.2 肺 W/D、BALF 总蛋白及肺组织 MDA、MPO 水平的比较 B 和 C 组大鼠肺 W/D、BALF 中蛋白及肺组织 MDA、MPO 水平明显高于 A 组($P<0.01$);C 组与 B 组相比,肺 W/D、BALF 中蛋白及肺组织 MDA、MPO 水平明显下降($P<0.05$),见表 2。

表 2 3 组大鼠肺 W/D、BALF 总蛋白及肺组织 MDA、MPO 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺 W/D	BALF 总蛋白 (μ g/mL)	MDA (nmol/mg)	MPO 活性 (U/g)
A 组	12	3.80 \pm 0.26	65.14 \pm 10.45	1.28 \pm 0.17	0.32 \pm 0.08
B 组	12	5.47 \pm 0.54 ^a	356.62 \pm 45.05 ^a	2.51 \pm 0.41 ^a	0.83 \pm 0.19 ^a
C 组	12	4.81 \pm 0.43 ^{ab}	251.53 \pm 39.26 ^{ab}	2.12 \pm 0.33 ^{ab}	0.59 \pm 0.16 ^{ab}
F		46.90	213.06	44.66	31.86
P		0.00	0.00	0.00	0.00

^a: $P<0.01$,与 A 组比较;^b: $P<0.05$,与 B 组比较

2.3 3 组大鼠血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平 B、C 组大鼠

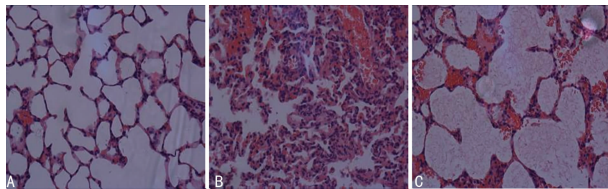
血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平较 A 组明显升高($P<0.01$),而 C 组较 B 组明显降低($P<0.01$),见表 3。

表 3 3 组血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
A 组	12	22.16 \pm 3.35	32.11 \pm 8.14	21.27 \pm 2.48
B 组	12	78.43 \pm 9.05 ^a	141.09 \pm 18.67 ^a	47.15 \pm 5.91 ^a
C 组	12	66.07 \pm 4.92 ^{ab}	80.28 \pm 15.39 ^{ab}	36.20 \pm 4.21 ^{ab}
F		261.15	172.53	103.35
P		0.00	0.00	0.00

^a: $P<0.01$,与 A 组比较;^b: $P<0.01$,与 B 组比较

2.4 肺组织 HE 染色结果 光镜下观察各组肺组织切片,A 组肺组织正常,未见明显充血和中性粒细胞浸润;B 组肺泡壁完整性破坏,肺泡腔内中性粒细胞大量浸润、肺间质弥漫性出血;C 组肺泡腔内中性粒细胞较 B 组明显减少,仍可见肺间质出血,但较 B 组明显减轻,见图 1。



A:A 组;B:B 组;C:C 组

图 1 光镜下肺组织病理结果(HE, $\times 400$)

3 讨 论

革兰阴性菌感染产生大量 LPS 诱发 SIRS 从而导致感染性休克甚至死亡。肺脏是 LPS 入侵形成脓毒症时最先累及的重要器官,一旦肺脏损坏,致死率明显增加^[8]。本研究采用腹腔注射 LPS 诱发 ALI,剂量参照文献^[9]并略作调整,结果显示在 LPS 注入 6 h 后 B 组与 A 组相比 PaO₂ 平均下降约 37 mm Hg,下降幅度大于基础值 30%,达到樊毫军等^[9]推荐的 ALI 标准;同时本研究肺组织病理切片也证实 LPS 组肺脏病理损害达到 ALI 标准,故认为本研究 ALI 模型成功。本研究结果显示,LMWH 处理的 C 组 PaO₂ 尽管远小于 A 组,但是与 B 组相比明显上升($P=0.026$),说明低分子肝素处理能够一定程度地改善 LPS 所致的低氧血症;同时,C 组的 pH 值较 B 组也有一定升高($P=0.001$),可能归因于氧合的改善。尽管 B、C 组 PaCO₂ 略高于 A 组,但差异无统计学意义,可能是因为 CO₂ 弥散速度远大于 O₂ 有关。

ALI 病理表现为炎性细胞大量渗透、蛋白渗出、肺间质乃至肺泡水肿。本研究病理结果显示 B 组病理损害严重符合 ALI 特征,而 C 组病理改变较 B 组明显减轻。同时,B 组肺 W/D 和 BALF 总蛋白较 A 组明显增加也从侧面印证了 LPS 注射诱发了 ALI 的形成;LMWH 处理的 C 组其肺 W/D 和 BALF 总蛋白及 MPO、MDA 水平较 B 组亦明显降低。这些结果说明 LMWH 能够削弱 LPS 导致的肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤、抑制中性粒细胞聚集、减轻肺水肿的程度。

促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 受到 LPS 刺激会迅速产生并且促进脓毒症发展,从而诱发 ALI,因此抑制炎性介质及相关的信号通路成为治疗脓毒症的一个潜在治疗手段^[10]。本研究在 LPS 注入 6 h 后 B 组和 C 组血清中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 较 A 组明显升高,而 C 组 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-

6 较 B 组有一定的降低 ($P < 0.01$), 说明低分子肝素处理能够通过减少这些促炎细胞因子的产生, 这与 Ning 等^[11]的研究结果一致。

总之, 在 LPS 诱发的 ALI 中早期应用低分子肝素能够抑制促炎细胞因子的释放、抑制中性粒细胞的激活、减轻肺毛细血管的通透从而改善机体的氧合。其具体的抗炎机制及对脓毒症时凝血状态的影响仍然需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Chen S, Zhang XJ, Sun Y, et al. Unfractionated heparin attenuates intestinal injury in mouse model of sepsis by inhibiting heparanase[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4903-4912.
- [2] Ding RY, Zhao DM, Guo RX, et al. Treatment with unfractionated heparin attenuates coagulation and inflammation in endotoxemic mice[J]. *Thromb Res*, 2011, 128(6): E160-165.
- [3] Ma JQ, Bai JH. Protective effects of heparin on endothelial cells in sepsis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5547-5552.
- [4] Brown RA, Leung E, Kankaanranta H, et al. Effects of heparin and related drugs on neutrophil function[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(2): 185-192.
- [5] 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.
- [6] Li Y, Sun JF, Cui XZ, et al. The effect of heparin administration in animal models of sepsis: a prospective study in Escherichia coli-challenged mice and a systematic review and metaregression analysis of published studies[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(5): 1104-1112.
- [7] Downing LJ, Strieter RM, Kadell AM, et al. Low-dose low-molecular-weight heparin is anti-inflammatory during venous thrombosis[J]. *J Vasc Surg*, 1998, 28(5): 848-854.
- [8] Desai S, Jones SL, Turner KL, et al. Nucleated red blood cells are associated with a higher mortality rate in patients with surgical sepsis[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2012, 13(6): 360-365.
- [9] 樊毫军, 刘书盈, 张建鹏, 等. 静脉注射内毒素致大鼠急性肺损伤模型的病理生理学指标评价[J]. *中华危重病急救医学*, 2006, 18(8): 485-487.
- [10] 肖南, 刘韧, 田昆仑. 一氧化氮对内毒素血症大鼠肠道损伤及细菌移位的影响[J]. *重庆医学*, 2001, 30(1): 4-6.
- [11] Ning FY, Wang XZ, Shang L, et al. Low molecular weight heparin may prevent acute lung injury induced by sepsis in rats[J]. *Gene*, 2015, 557(1): 88-91.

(收稿日期: 2017-02-18 修回日期: 2017-06-06)

(上接第 3607 页)

- [4] Filleur S, Nelius T, De Riese W, et al. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5): 769-775.
- [5] Wang YJ, Subramanian P, Shen DF, et al. Pigment epithelium-derived factor reduces apoptosis and pro-inflammatory cytokine gene expression in a murine model of focal retinal degeneration[J]. *ASN Neuro*, 2013, 5(5): e00126.
- [6] Subramanian P, Locatelli-Hoops S, Kenealey J, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents retinal cell death via PEDF Receptor (PEDF-R): identification of a functional ligand binding site[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(33): 23928-23942.
- [7] Zhang H, Wang Z, Feng SJ, et al. PEDF improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction via inhibiting vascular permeability and cardiomyocyte apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 5618-5634.
- [8] Gao X, Zhang H, Zhuang W, et al. PEDF and PEDF-derived peptide 44mer protect cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis and necroptosis via anti-oxidative effect[J]. *Cardiology*, 2014, 129(1): 41-42.
- [9] Wang X, Zhang Y, Lu P, et al. PEDF attenuates hypoxia-induced apoptosis and necrosis in H9c2 cells by inhibiting p53 mitochondrial translocation via PEDF-R[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(3): 394-401.
- [10] Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(1): 23-29.
- [11] Ono T, Isobe K, Nakada K, et al. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria[J]. *Nat Genet*, 2001, 28(3): 272-275.
- [12] Ugarte-Urbe B, Garcia-Saez AJ. Membranes in motion: mitochondrial dynamics and their role in apoptosis[J]. *Biol Chem*, 2014, 395(3): 297-311.
- [13] Ong SB, Hall AR, Hausenloy DJ. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(4): 400-414.
- [14] Mao CP, Zhang JJ, Lin SC, et al. MiRNA-30a inhibits AECs-II apoptosis by blocking mitochondrial fission dependent on Drp1[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(12): 2404-2416.
- [15] Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 799-845.
- [16] Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1062-1065.

(收稿日期: 2017-02-11 修回日期: 2017-06-03)