论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0782-04

低剂量内毒素诱导兔非显性弥散性血管内凝血

刘 宿[1,2],蒋耀光[1],王韶亮[2],王伍超[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]全军胸外科中心,[2]麻醉科,重庆 400042)

提 要:目的 用低剂量内毒素诱导兔非显性弥散性血管内凝血,观察凝血、纤溶变化及肝素抗凝治疗的效果。**方法** 12只雄性新西兰兔按完全随机设计方法分为内毒素组和内毒素加肝素治疗组,每组6只,采用内毒素10 μg/kg由颈内静脉注入,其中肝素组在注入内毒素同时加用肝素100 U/kg抗凝治疗。以实验前样本作自身对照,实验后1、2、3、6 h分别采取静脉血进行凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(aPTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fib)含量及D-二聚体含量测定、血栓弹力图(TEG)各参数变化以及肺、肾脏病理改变。**结果** 内毒素组PT、aPTT、TT均延长,Fib含量降低,D-二聚体含量明显增加,TEG示凝血因子消耗、血小板减少,肺、肾内有微血栓形成;肝素组凝血象变化不明显,D-二聚体含量有增加,TEG示轻微低凝状态,肺、肾内未见微血栓形成。**结论** 低剂量内毒素能诱导兔非显性弥散性血管内凝血,且抗凝治疗有效。

关键词:内毒素;非显性弥散性血管内凝血;兔
中图法分类号:R-332;R554.8 **文献标识码**:A

Low-dose endotoxin induces non-overt disseminated intravascular coagulation in rabbits

LIU Su[1,2], JIANG Yao-guang[1], WANG Shao-liang[2], WANG Wu-chao[2] ([1]Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, [2]Department of Anesthesiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the changes of coagulation and fibrinolysis in rabbit model of non-overt disseminated intravascular coagulation induced by low-dose endotoxin and therapeutic effects of anticoagulation by heparin. **Methods** Twelve male rabbits were randomly divided into 2 groups, one receiving endotoxin intravenously (10 μg/kg, $n=6$), one receiving endotoxin intravenously and 100 U/kg Heparin simultaneously ($n=6$). The blood sample obtained before experiment was used as control. Coagulation parameters including prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT), fibrinogen concentration, D-dimers, thrombelastography (TEG) were measured during 6 h after endotoxin induction. Tissue specimens of lungs and kidneys were examined. **Results** Parameters of coagulation deteriorated significantly in the endotoxin-induced rabbits, but was not altered in heparin-treated rabbits. TEG monitoring in the endotoxin-induced rabbits reflected consumption of clot factors and platelet dysfunction, and hypocoagulation status in heparin-treated rabbits. In endotoxin-induced group, fibrin deposition was found in lungs and kidneys. **Conclusion** Non-overt disseminated intravascular coagulation induced by low-dose endotoxin in rabbits is improved by heparin.

Key words: endotoxin; non-overt disseminated intravascular coagulation; rabbits

弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)是严重的出血综合征,临床上根据症状和常规实验室指标确诊时,病情往往已发展到中晚期,救治极为困难。因而在DIC病理过程已经启动,体内有凝血纤溶异常(非显性或前期DIC),而临床和常规实验室检查还未表现出典型特征时,及时作出准确的判断显得尤为重要。本实验是在经典DIC模型的基础上,拟用低剂量内毒素建立兔非显性DIC的模型,观察凝血、纤溶常用指标和分子标记物的变化,并结合血栓弹力图分析整个凝血状态,为早期诊断和预防DIC的实验研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性新西兰兔12只,体质量2.5~3.0 kg(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。按完全随机设计分为两组:内毒素组(LPS组,$n=6$),注入内毒素未给予药物干预;内毒素加肝素治疗组(肝素组,$n=6$),内毒素注入的同时注入肝素。采用实验前采血样本作为自身对照。

作者简介:刘 宿(1963-),女,江西省宜春市人,博士研究生,副教授,主要从事围手术期患者凝血纤溶功能变化及处理方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68757367,E-mail:liusu@tom.com
通讯作者:蒋耀光,电话:(023)68757261
收稿日期:2006-12-12;修回日期:2007-01-11

1.2　试剂与仪器

内毒素（Salmonella Minnesota Re 595）购于德国默克公司，肝素购于江苏万邦生化医药公司，凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血酶原时间（aPTT）、凝血酶时间（TT）、纤维蛋白原（Fib）含量及 D-二聚体含量测定试剂盒购于北京德国美创公司。德国 BE 四通道血凝分析仪、美国 Haemoscope 5000 血栓弹力图（TEG）分析仪。

1.3　动物模型的建立

速眠新Ⅱ号注射液 1.5 ml 稀释至 10 ml，按 1 ml/kg 体质量对兔行肌肉注射。麻醉后将兔仰卧固定于兔台上［保持室内温度（25.0 ± 2）℃］，于颈部正中做一切口，钝性分离出右侧颈内静脉，结扎静脉远心端，置入 20G 深静脉导管并固定，同时行气管切开。参照文献［1］，LPS 组和肝素组由颈内静脉注入内毒素 10 μg/kg（1 μg/ml，30 ml/h），肝素组同时自耳缘静脉注入肝素 100 U/kg[2]。

1.4　观察指标

在实验前（0 h）、注入内毒素后 1、2、3、6 h，分别采取静脉血标本，未抗凝全血标本用于 TEG 分析，抗凝血分离出血浆后测定 PT、aPTT、TT、Fib 值及 D-二聚体含量。6 h 后处死动物取肺、肾脏，用 10% 甲醛溶液固定、切片、苏木精伊红（HE）染色，在光镜下观察其病理变化。

TEG 参数包括 R、K、α 角、MA、CI。R（reaction time）为反应时间，代表凝血活酶生成时间，因凝血因子缺乏和抗凝剂影响而延长，血液高凝状态时缩短；K（clotting time）为形成一稳固的血凝块所需的时间，与血小板功能及纤维蛋白原水平有关；α 角（angle）代表血凝块逐渐形成的动力学特征，又与 K 密切相关；MA（maximum amplitude）为最大振幅，用以评估正在形成的血凝块最大强度或硬度，主要与血小板有关；CI（coagulation index）为凝血指数，反映血栓形成的速度和强度，对反映高凝状态最为灵敏。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　生命体征

LPS 组和肝素组动物注入内毒素后 1 h 左右出现呼吸浅快、有不同程度的呼吸道分泌物增加，心率增快。LPS 组动物有体温下降，同时口唇轻度发绀，而肝素组未见明显体温变化，也无口唇发绀表现。两组动物皮肤切口或穿刺部位均未见渗血。

2.2　凝血指标变化

LPS 组动物在注入内毒素后 1 h 凝血象变化无统计学差异（$P > 0.05$）；2、3 h 后 aPTT、TT 延长，纤维蛋白原降低，与 0 h 比较相差显著（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；6 h 时各指标变化与 0 h 比较无统计学差异（$P > 0.05$）。

肝素组动物在注入内毒素后 1、2、3、6 h 后 PT、aPTT、TT 稍有延长，纤维蛋白原稍有降低，但与 0 h 比较均无统计学差异（$P > 0.05$）；aPTT、TT 值在 2 h 与 LPS 组比较相差显著（$P < 0.05$）；TT 值在 3 h 与 LPS 组比较相差显著（$P < 0.05$）；6 h 时各指标与 LPS 组比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见表 1。

表 1　两组动物凝血指标及 TEG 指标的变化（$n = 6$，$\bar{x} \pm s$）

指标	实验前	注入内毒素后时间			
		1 h	2 h	3 h	6 h
PT(s)					
LPS 组	9.04 ± 0.37	8.90 ± 0.83	11.74 ± 2.31	11.08 ± 1.74	8.50 ± 1.68
肝素组	9.28 ± 0.37	9.08 ± 0.96	10.73 ± 1.34	10.48 ± 0.61	10.02 ± 1.17
aPTT(s)					
LPS 组	15.24 ± 1.27	16.40 ± 4.75	28.20 ± 2.98[b]	19.86 ± 3.08[b]	14.86 ± 2.19
肝素组	13.07 ± 1.48	16.58 ± 1.51	18.60 ± 2.10[e]	16.12 ± 1.11	16.59 ± 1.77
TT(s)					
LPS 组	23.82 ± 1.71	24.42 ± 4.08	26.96 ± 1.83[a]	27.76 ± 1.72[b]	24.00 ± 2.24
肝素组	20.31 ± 1.27	19.45 ± 1.08	20.12 ± 2.60[e]	20.54 ± 1.25[e]	19.66 ± 1.11
Fib(g/L)					
LPS 组	3.36 ± 0.74	1.82 ± 0.55[a]	1.67 ± 0.89[a]	2.79 ± 1.15	3.04 ± 1.23
肝素组	3.84 ± 2.71	2.06 ± 1.70	2.21 ± 2.40	2.51 ± 1.89	1.98 ± 1.01
D-二聚体(ng/ml)					
LPS 组	0.00 ± 0.00	311.0 ± 11.83[b]	506.0 ± 16.59[b]	531.0 ± 21.22[b]	481.0 ± 22.34[b]
肝素组	0.00 ± 0.00	78.0 ± 12.91[bc]	66.2 ± 13.03[bc]	118.0 ± 18.74[bc]	113.0 ± 22.35[bc]
R(min)					
LPS 组	5.70 ± 1.12	8.28 ± 1.40[a]	10.64 ± 1.51[a]	8.30 ± 0.94[a]	8.42 ± 2.07[a]
肝素组	7.10 ± 1.15	7.96 ± 2.68	9.13 ± 1.97	8.81 ± 1.85	7.28 ± 1.35
K(min)					
LPS 组	3.02 ± 1.26	1.96 ± 0.45[a]	2.34 ± 0.93	2.20 ± 0.58	3.18 ± 0.85
肝素组	2.45 ± 0.80	2.00 ± 0.38	2.84 ± 0.51	2.50 ± 0.43	2.59 ± 0.59
α 角(°)					
LPS 组	64.76 ± 2.34	57.40 ± 3.14	50.18 ± 5.04[a]	55.11 ± 5.08[a]	54.66 ± 4.36[a]
肝素组	63.44 ± 3.59	59.88 ± 2.88	53.72 ± 6.17[a]	60.14 ± 3.14	53.40 ± 6.73[a]
MA(mm)					
LPS 组	62.03 ± 4.40	59.84 ± 3.62	58.12 ± 2.98	57.98 ± 6.65	60.90 ± 2.85
肝素组	61.91 ± 2.54	58.49 ± 2.37	55.28 ± 2.52	59.23 ± 3.83	60.34 ± 4.21
CI					
LPS 组	1.62 ± 0.21	−1.90 ± 0.34	−4.76 ± 1.29[a]	−2.00 ± 0.83	−3.34 ± 1.84
肝素组	1.10 ± 0.33	−2.11 ± 0.82	−5.64 ± 1.25[a]	−3.03 ± 1.17	−2.34 ± 0.29

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与实验前比较；c：$P < 0.05$，d：$P < 0.01$，与 LPS 组比较

2.3　D-二聚体的变化

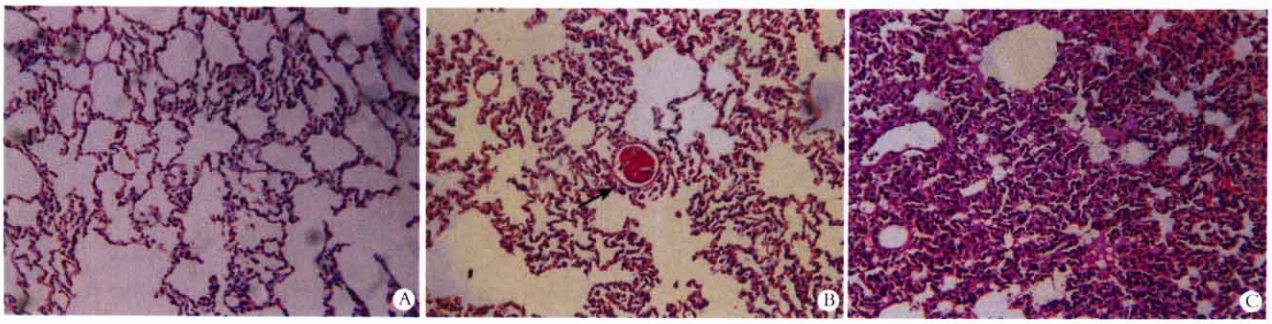
LPS 组动物在注入内毒素后 1、2、3、6 h D-二聚体均有不同程度的增高，与 0 h 比较相差非常显著（$P < 0.01$）。肝素组动物在注入内毒素后 1、2、3、6 h 后 D-二聚体也有增加，与 0 h 比较相差显著（$P < 0.01$）。两组动物之间在同一时间点比较相差显著（$P < 0.05$）。见表 1。

2.4　TEG 各参数的变化

两组 R 值在 1、2、3、6 h 均延长，但仅 LPS 组各时间点与0 h 相比相差显著（$P < 0.05$）；LPS 组 K 值在 1 h 时缩短，随后 2、3、6 h 又逐渐恢复至实验前水平，肝素组 K 值的变化无统计学意义（$P > 0.05$）；α 角和 MA 在两组均逐渐变小，LPS 组 α 角在 2、3、6 h 时与 0 h 比较相差显著（$P < 0.05$），肝素组在 2、6 h 时与 0 h 比较相差显著（$P < 0.05$）；两组的 CI 值在 2 h 时与 0 h 比较相差显著（$P < 0.05$），见表 1。

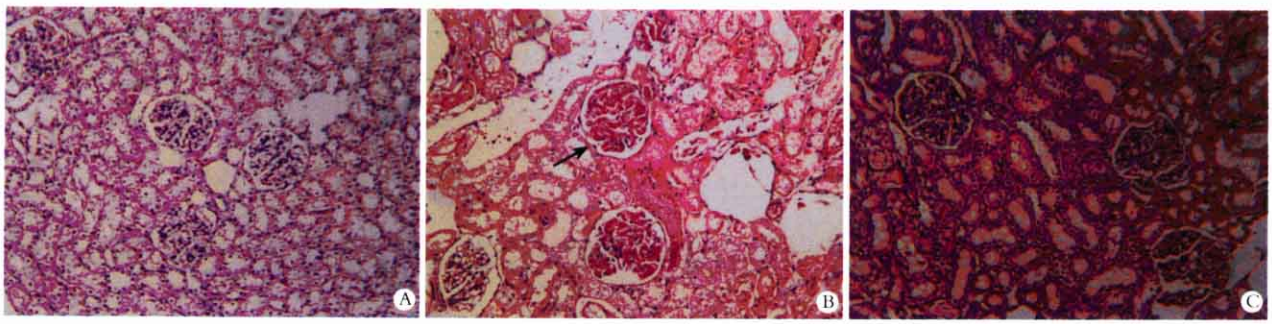
2.5　肺、肾脏的病理变化

LPS 组动物肺肉眼可见肺叶肿胀、肺边缘变钝，镜下可见散在微血栓，肺间质有炎症细胞浸润和水肿液渗出。肾脏肉眼未见明显变化，镜下可见约 1/4 肾小球内均质红染的微血栓形成。肝素治疗组镜下可见肺间质内仍有炎症细胞浸润，肾小管浊肿变性，均未见有微血栓形成。见图 1、2。



A：正常肺组织；B：内毒素组(6 h)(↑：微血管内微血栓形成，肺间质内有炎症细胞浸润)；C：内毒素加肝素治疗组(6 h)(肺间质内有炎症细胞浸润及水肿液渗出)

图1 肺组织病理变化 (HE×200)



A：正常肾组织；B：内毒素组(6 h)(↑：肾小球内均质红染的微血栓)；C：内毒素加肝素治疗组(6 h)(肾小管浊肿变性)

图2 肾组织病理变化 (HE×200)

3 讨论

感染、创伤等因素可引起凝血因子和血小板处于活化与轻度消耗状态，并存在纤溶受抑制，是初期凝血异常的短暂过程，易被忽视。非显性 DIC 没有 DIC 典型的出血症状，但凝血及纤溶的异常表现及所导致重要脏器可逆性的功能障碍的可成为主要的临床征象，如感染性休克出现的组织缺氧或酸中毒，即使无出血或栓塞表现也提示有非显性 DIC 的可能。有效的抗凝治疗可作为非显性 DIC 的佐证。

文献[3]报道，常规的 PT、aPTT、TT 以及鱼精蛋白副凝固(3P)试验等项目的检测并不能早期、完整地反映体内凝血状态，尤其是 3P 试验的敏感性和特异性均较差。在 DIC 早期或非显性 DIC 阶段的诊断主要依赖于分子标志物的检测，这些分子标志物是凝血系列反应过程中不同阶段所产生的特定物质，而且较 PT、aPTT、TT 等的异常出现得早[4]。其中 D-二聚体是交联纤维蛋白在纤溶酶作用下产生的一种特异性纤维蛋白降解产物，它既可以反应凝血酶的生成，又可反应纤溶酶的活性，故视其为 DIC 早期诊断首选的分子标志物[5,6]。本实验中凝血象的改变在 1 h 还不能确定体内的凝血状态，在 2 h 才表现出有低凝的倾向；而 D-二聚体在 1 h 就观察到从无到逐渐增加的变化过程，证明在接受内毒素的动物体内凝血、纤溶系统是呈激活状态，而 D-二聚体是出现变化最明显和最早的指标。

血栓弹力图(thrombelastogram，TEG)能动态地反应血凝块的形成及纤溶过程[7]，曹忠平等[8]的研究认为 TEG 和常规凝血功能改变呈正相关。本实验也证实 TEG 比常规凝血指标检查具有更高的敏感性及特异性，R 和 K 值在早期就出现了变化。

本实验通过测定 PT、aPTT、TT、Fib 及 D-二聚体含量的变化以及 TEG 的结果，可判断 LPS 组动物接受低剂量内毒素注入后早期就有凝血因子消耗、血小板数量减少，有内毒素所致的微循环障碍(体温下降、口唇轻度发绀)，虽未出现皮肤黏膜栓塞、灶性缺血性坏死等明显高凝状态现象，但处死后的动物肺、肾脏病理切片检查可见微血栓形成，因此仍可认为动物模型呈现一种非显性 DIC 表现[4]。

临床上常采用小剂量肝素治疗 DIC，对于非显性 DIC 在早期使用肝素抗凝也较为重要[9]。肝素通过抑制凝血酶的生产和灭活已生成的凝血酶而发挥抗凝作用。肝素还可降低血浆纤维蛋白原水平，减轻高凝状态。本实验接受肝素治疗组动物凝血指标的变化不明显，肺、肾脏未见微血栓形成，证明肝素对低剂量内毒素所致的非显性 DIC 有明显的抗凝作用。肝素组抗凝治疗有效也可从另一方面证明 LPS 组非显性 DIC

模型的成立。

近年来对DIC诊断研究的重点已从明显的或典型的DIC转向非显性或前期DIC。此模型的建立有助于对DIC的早期诊断指标和预防DIC药物的选择作进一步的实验研究。

参考文献：

[1] Brutzki T C, Kulczycky M J, Bardossy L, *et al*. Rapid *in vivo* induction of leukocyte tissue factor mRNA and protein synthesis following low dose endotoxin administration to rabbits[J]. Hematol J, 2001, 2(3): 188-195.
[2] 谢 燕，王兆钺，张 威. 弥散性血管内凝血不同抗凝治疗的实验研究[J]. 血栓与止血学，2005，11(2)：62-65.
[3] 程大卫，张 威，阮长耿. 快速弥散性血管内凝血(DIC)/DIC前期(Pre-DIC)的实验检测[J]. 血栓与止血学，2002，8(2)：63-64,75.
[4] Hoots W K. Non-overt disseminated intravascular coagulation: definition and pathophysiological implications[J]. Blood Rev, 2002, 16(Suppl 1): S3-S9.
[5] Wada H, Wakita Y, Nakase T, *et al*. Diagnosis of pre-disseminated intravascular coagulation stage with hemostatic molecular markers. The Mie DIC Study Group[J]. Pol J Pharmacol, 1996, 48(2): 225-228.
[6] 叶玲丽，张德亭，金 青，等. DIC常用实验室指标在临床诊断中的意义[J]. 中国医师进修杂志，2006，29(5C)：54-55.
[7] Spiel A O, Mayr F B, Firbas C, *et al*. Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans[J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(2): 411-416.
[8] 曹忠平，陶国才，刘怀琼. 15例肝移植患者术中凝血功能改变及常规凝血监测和血栓弹性图监测指标相关性研究[J]. 临床麻醉学杂志，2003，19(12)：713-714.
[9] Mammen E F. Disseminated intravascular coagulation (DIC)[J]. Clin Lab Sci, 2002, 13(4): 239-245.

（编辑 邓强庭）

文章编号：1000-5404(2007)09-0785-01

个案与短篇

2005年重庆市60 168例围产儿出生缺陷监测分析

辛晓莉[1]，张高东[2]（重庆市妇幼保健院：[1]儿科，[2]信息科，重庆 400013）

出生缺陷是指婴儿出生时存在的人类胚胎在结构和功能方面的异常，是导致胎儿早期流产、死胎、死产、儿童死亡和致残的重要原因之一。为了解我市现阶段出生缺陷儿的发生情况，为制定本地区的干预措施提供依据，本研究对2005年重庆市88家医院出生缺陷儿的监测资料进行了分析、总结，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 监测对象

以2005年重庆市88家市、区(县)级以及大型厂矿医院为监测点，收集在这些医院住院分娩的孕满28周到产后7 d的围产儿(包括活产、死胎、死产、治疗性引产)资料。

1.2 监测方法

由各监测医院根据《中国出生缺陷监测方案》，按照其中的23类出生缺陷的定义、特征及诊断标准进行监测，将有关的项目填入《出生缺陷儿登记卡》，将有关数据填入《围产儿数据季度报表》，直接上报至本院，由本院专职医师审核、汇总。对23类以外的畸形，具体写明或进行描述，作为出生缺陷统计。

1.3 质量控制

由本院定期对各监测点的监测人员进行培训，并对各监测点的监测情况进行质量抽查。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件行χ^2检验。

作者简介：辛晓莉(1964-)，女，重庆市人，副主任医师，主要从事儿科临床方面的研究。电话：(023)86162078，E-mail：xxl_6113@163.com

收稿日期：2006-09-12；修回日期：2006-12-08

2 结果

2.1 出生缺陷发生率

88家监测医院共监测围产儿60 168例，检出出生缺陷620例，出生缺陷发生率103.04/万，低于全国2004年128.38/万的发生率，其中单发畸形582例，占93.87%，多发畸形38例，占6.13%。

2.2 出生缺陷顺位及构成比

620例出生缺陷的顺位及构成比结果显示，位于前5位的缺陷为：外耳畸形(61例)、多指(趾)(52例)、唇裂合并腭裂(50例)、先天性脑积水(41例)、先天性心脏病(40例)。

2.3 出生缺陷各特征别发生情况

2.3.1 围产儿性别与出生缺陷发生的关系 60 168例围产儿中，男性31 731例，出生缺陷345例，发生率为108.73/万；女性28 430例，出生缺陷268例，发生率为94.27/万，性别不明7例。出生缺陷的发生，男女之间无显著性差异($P>0.05$)。

2.3.2 出生缺陷城乡发生情况 60 168例围产儿中，城镇围产儿数32 463例，出生缺陷339例，发生率为104.43/万；农村围产儿数27 705例，出生缺陷281例，发生率为101.43/万。出生缺陷的发生，城乡之间无显著性差异($P>0.05$)。

2.3.3 缺陷儿的转归 620例缺陷儿中，活产存活434例，占70%；死胎78例，占12.58%；死产6例，占0.97%；产前确诊后行治疗性引产76例，占12.26%；生后7 d内死亡26例，占4.19%。

2.3.4 出生缺陷的诊断情况 620例缺陷儿中，产前诊断137例，占22.10%；出生后7 d内诊断483例，占77.90%；诊断方法中，临床诊断446例，占71.94%；B超诊断152例，占24.52%；其他(染色体、X线、血生化、尸解等)22例，占3.55%。

(下转795页)