

· 论著 ·

乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用

王刚 陈婷婷 高长青

【摘要】 目的 探讨乌司他丁对肺缺血-再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法** 新西兰白兔 30 只,随机分为假手术对照组、创伤失血性休克组和乌司他丁治疗组。动物模型用经股动脉放血使平均动脉压降至 (40 ± 5) mm Hg ($1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$),维持 90 min 后回输全部失血及等量乳酸林格液进行复苏。复苏后 4 h 测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)、肺泡灌洗液中中性粒细胞弹性蛋白酶(BALF-NE)活性、肺叶湿/干重比及肺组织病理学改变。**结果** 休克组和乌司他丁治疗组 MPO 含量、BALF-NE 活性以及湿/干重比均较假手术对照组显著增高(P 均 <0.05),乌司他丁治疗组各指标均明显低于休克组(P 均 <0.05)。**结论** 蛋白酶抑制剂乌司他丁在创伤失血性休克时能够抑制肺 MPO 和 NE 活性,降低肺组织湿/干重比,减轻缺血-再灌注后的肺损伤。

【关键词】 乌司他丁; 肺损伤; 休克,创伤性; 休克,失血性; 兔

Protective effects of ulinastatin on ischemia/reperfusion injury in the rabbit lung in traumatic hemorrhagic shock WANG Gang, CHEN Ting-ting, GAO Chang-qing. Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of PLA, PLA Institute of Cardiac Surgery, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanisms of ulinastatin on activities of myeloperoxidase(MPO) in lung tissue and neutrophil elastase(NE) in bronchoalveolar lavage fluid and to evaluate the protective effects of ulinastatin on rabbit lung in traumatic hemorrhagic shock. **Methods** Thirty rabbits were randomly assigned to three groups: control group, traumatic hemorrhagic shock group and ulinastatin-treatment group. The traumatic hemorrhagic shock model was reproduced by producing femur fracture and femoral artery bleeding to reduce the mean artery pressure to (40 ± 5) mm Hg ($1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$). The hypotension was maintained 90 minutes before the shed blood and equivalent amount of Ringer's lactate was infused. Four hours after blood volume compensation, the activities of MPO in lung tissue and NE in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured, and the extravascular lung water volume was determined. **Results** Compared with control group, the activities of either MPO in lung tissue or NE in BALF appeared to be increased in the ulinastatin-treatment group (both $P < 0.05$), but their levels were significantly higher in traumatic hemorrhagic shock group (both $P < 0.05$). The extravascular lung water volume was increased significantly in the two experimental group (both $P < 0.05$), however it was more pronounced in traumatic hemorrhagic shock group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ulinastatin can inhibit the increase in the activities of MPO in lung tissue and NE in BALF, and possesses potential protective effects on the lung tissue in traumatic hemorrhagic shock.

【Key words】 ulinastatin; pulmonary injury; traumatic shock; hemorrhagic shock; rabbit

乌司他丁(ulinastatin)是一种典型的 Kuniz 型蛋白酶抑制剂,具有两个活性功能区,且不完全重叠,均有很广的抑酶谱,能够同时竞争性或非竞争性抑制多种水解酶活性及炎性介质的释放。本实验中通过测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)和肺泡灌洗液中中性粒细胞弹性蛋白酶(BALF-NE)的活性以及肺湿/干重比,并观察肺组织病理学改变,探讨乌司他丁对肺缺血-再灌注损伤的保护作用。

基金项目:全军“九五”医药卫生科研基金立项课题(96Q112);解放军总医院“十五”学科带头人培养基金资助项目

作者单位:100853 北京,全军心脏外科研究所,解放军总医院心血管外科麻醉研究室

作者简介:王刚(1964-),男(汉族),河北省保定市人,医学博士,教授,硕士研究生导师,主任医师,承担军队科研课题 2 项,获军队科技进步三等奖 3 项,发表论文 30 余篇。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及肺缺血-再灌注损伤模型制备: 3~6 月龄新西兰白兔 30 只,由解放军总医院动物实验中心提供,体重 2.0~2.5 kg,雌雄兼有。随机分为假手术对照组、创伤失血性休克组和乌司他丁治疗组 3 组,每组 10 只。动物在实验前禁食 12 h,禁水 8 h。质量分数为 3%的戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉成功后,行右侧股动脉和左侧股静脉插管术,动脉插管用于有创动脉压监测,静脉插管用于补液和采集血标本,局麻浸润后行气管切开插管,保留自主呼吸,必要时予呼吸支持。假手术对照组仅行上述操作;另两组用骨钳致一侧股骨中下 1/3 处粉碎性骨折,股动脉放血(约 10 min),使平均动脉压降至 (40 ± 5) mm Hg ($1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$)。治

疗组在休克末期静脉注射乌司他丁 50 kU/kg(溶于生理盐水);休克组则注射等量生理盐水。维持 90 min 后回输全部失血及等量乳酸林格液进行复苏(需 30 min),然后用平衡液 $2.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 持续静脉泵入。

1.2 检测方法

1.2.1 肺组织 MPO 和 BALF-NE 活性的测定:

①复苏后 4 h 用空气栓塞法处死动物,取右肺下叶, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,按 Sheridan 等^[1]的方法测定肺组织 MPO 活性。②于左肺上叶经气管插管缓慢向肺内注入预冷的生理盐水 10 ml,停留 30 s,再将液体吸出,反复 3 次,纱布过滤, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,记录回收量,取上清, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,测定 BALF-NE 活性。

1.2.2 肺组织湿/干重比测定:复苏后 4 h 空气栓塞法处死动物,取右肺上叶组织测定肺湿/干重比。

1.2.3 肺组织病理学检查:复苏后 4 h 空气栓塞法处死动物。取右肺下叶组织进行普通病理切片,在光学显微镜下观察;钼酸染色,在电镜下观察,记录镜下所见。

1.3 统计学方法:数据采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.0 软件包,各组数据之间采用单因素方差分析,率的比较用 χ^2 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肺组织 MPO 活性的变化(表 1):MPO 活性高低可定量反映中性粒细胞(PMN)扣押与聚集的程度。假手术对照组肺组织 MPO 活性很低,休克组 MPO 活性显著增高($P<0.05$),而乌司他丁治疗组 MPO 活性虽然较假手术对照组有显著增高,但显著低于休克组($P<0.05$)。

2.2 BALF-NE 活性变化(表 1):假手术对照组 BALF-NE 活性极低,休克组 BALF-NE 活性显著增高($P<0.05$),乌司他丁治疗组明显低于休克组($P<0.05$)。

2.3 右肺上叶湿/干重比(表 1):与假手术对照组相比,休克组湿/干重比明显增高($P<0.05$),而乌司他丁治疗组虽较假手术对照组升高,但仍明显低于休克组($P<0.05$)。

2.4 肺组织病理学检查结果(彩色插页图 1,图 2):

①光镜下观察:假手术对照组肺组织无明显病变;休克组肺充血,间质水肿、增宽,炎性细胞聚集;乌司他丁治疗组病变较轻。②电镜下观察:假手术对照组肺组织无明显病变;休克组肺内皮细胞肿胀、甚至崩解,吞饮小泡大量增多,溶酶体、线粒体肿胀呈空泡;乌司他丁治疗组内皮细胞肿胀,吞饮小泡增多,但细胞器病变较轻。

3 讨论

以往有研究证实^[2]:缺血-再灌注后肺组织损伤共有两个作用高峰,一个高峰是再灌注后 30 min,另一个高峰是再灌注后 4 h;PMN 缺乏对 4 h 后的肺损伤有缓解作用,但不能减轻再灌注后 30 min 的肺损伤;早期肺损伤是由于血细胞对肺微血管的阻塞或巨噬细胞的作用所致,而再灌注后 4 h 的组织损伤高峰主要是由于 PMN 所致。所以本实验选择复苏后 4 h 观察乌司他丁对 PMN 所产生的 MPO 和中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)的影响。

MPO 主要存在于 PMN 的嗜天青颗粒中,且每个细胞所含酶的量是恒定的,约占细胞干重的 5%,这是通过测定组织 MPO 活性来定量反映 PMN 数目的理论基础^[3]。由于该法较光镜下计数 PMN 等其他方法具有更高的灵敏度与准确性^[4],因此,自 Bradley 首次应用该法测定大鼠皮肤组织 PMN 浸润情况以来,目前其已成为一个被广泛用作测定各种组织内 PMN 聚集程度的指标。肺组织 MPO 活性高低可定量反映 PMN 扣押与聚集的程度。本实验结果显示,假手术对照组肺组织的 MPO 活性很低,休克组 MPO 的活性显著增高,表明休克时肺组织中有大量的 PMN 扣押与聚集。乌司他丁治疗组的 MPO 活性虽然较假手术对照组有明显增高,但比休克组显著降低。

NE 属中性丝氨酸蛋白酶,是 PMN 释放的蛋白酶中的主要成分。Carden 等^[5]通过动物实验发现,NE 能分解钙粘连素,从而造成肺纤维网状支架塌陷,肺毛细血管膜通透性增加,大量血浆蛋白和活性物质渗入肺间质和肺泡,引起非心源性肺水肿。此

表 1 各组 MPO、BALF-NE、BALF 回收率及肺湿/干重比结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of MPO, BALF-NE, retrieve rate of BALF and lung wet/dry weight ratio($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	肺组织 MPO(U/g)	BALF-NE ($\times 10^{-3}$ U/L)	左肺上叶 BALF 回收率(%)	右肺上叶湿/干重比
假手术对照组	10	0.193±0.066	0.446±0.212	61±12	4.979±0.146
休克组	10	19.233±5.486*	18.347±1.571*	75±16*	5.617±0.193*
乌司他丁组	10	7.736±3.477* [#]	11.173±2.379* [#]	65±21 [#]	5.165±0.317 [#]

注:与假手术对照组比较:* $P<0.05$,与休克组比较:[#] $P<0.05$

外,NE 还能通过破坏或分解表面活性蛋白,使表面活性物质密度降低,从而加重肺不张。另外,NE 还能分解补体,活化激肽、缓激肽、凝血和纤溶系统以及花生四烯酸,诱导细胞因子、生长因子及内皮素等,而这些物质又能激活和诱导 PMN 产生更多的 NE^[6,7]。这些多重效应构成了一个级联放大的网络,进一步加重恶性循环。

在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者的 BALF 中已测出 NE 的存在,提示 NE 对肺损伤起一定作用^[8,9]。Miura 和 Hiyama 等^[10,11]通过临床研究发现,乌司他丁不仅能明显抑制 NE,而且能间接抑制其他炎性介质的产生。NE 是导致组织破坏比较重要的酶,而且也是 ARDS 及多器官功能衰竭的最佳评价指标,与存活率有关。乌司他丁能有效抑制由 PMN 激活释放的 NE,且间接抑制 C3a 和白细胞介素-6(IL-6)的产生,由于大量 NE 会降低体外循环后肺脏气体交换的功能,因此提示乌司他丁有降低再灌注后肺损伤的作用。本研究结果显示,假手术对照组 BALF-NE 的活性极低,而休克组 NE 活性显著增高。经乌司他丁治疗后,缺血-再灌注后 NE 的活性能明显降低。

肺组织的湿/干重比可间接反映肺内漏出液体的多少,漏出的液体越多,肺湿/干重比越高,同时灌洗液的回收率也越高。本研究表明,创伤性休克兔在复苏后 4 h 湿/干重比及灌洗液的回收率较假手术对照组明显增高,结合 MPO、NE 及光镜和电镜下的肺组织病理学检查结果,可以发现创伤失血性休克兔在复苏后 4 h 由于 PMN 的激活,释放出大量的蛋白酶,破坏肺组织,造成非心源性肺水肿,导致肺充血、间质水肿、炎性细胞聚集及细胞器损伤。应用蛋白酶抑制剂乌司他丁后,在升高血压、改善灌流

的同时,可抑制 MPO 和 NE 活性,阻断细胞因子网络进一步失衡,减轻缺血-再灌注后的肺损伤,起到了良好的脏器保护作用。

参考文献:

- 1 Sheridan B C, Mcintyre R C Jr, Moore E E, et al. Neutrophils mediate pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin-induced acute lung injury[J]. J Trauma Injury Infection Crit Care, 1997, 42:391-397.
- 2 Eppinger M J, Lemmon G, Miller S, et al. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model[J]. Am J Surg, 1999, 178:147-150.
- 3 罗武生,郭兆贵. 用髓过氧化物酶法定量测定心肌组织中的中性粒细胞[J]. 中国药理学通报, 1990, 6:264-266.
- 4 Goldblum S E, Wu K M, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits[J]. J Appl Physiol, 1985, 59:1978-1985.
- 5 Carden D, Xiao F, Moak C, et al. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins[J]. Am J Physiol, 1998, 275:H385-H392.
- 6 Springer T A. Adhesion receptors of the immune system[J]. Nature, 1990, 346:425-434.
- 7 Strieter R M, Kunkel S L. Acute lung injury; the role of cytokines in the elicitation of neutrophils [J]. J Invest Med, 1994, 42:640-651.
- 8 Larson D F, Bowers M, Schechner H W, et al. Neutrophil activation during cardiopulmonary bypass in paediatric and adult patients[J]. Perfusion, 1996, 11:21-27.
- 9 萧正伦,黄海鹭,徐远达,等. 低剂量内毒素对低血容量性休克兔炎症细胞因子的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12:346-349.
- 10 Miura M, Sugiura T, Aimi Y. Effects of ulinastatin on PMNL and vascular endothelial injury in patients undergoing open heart surgery with CPB[J]. Masui, 1998, 47:29-35.
- 11 Hiyama A, Takeda J, Kotate Y, et al. A human urinary protease inhibitor (ulcinastatin) inhibits neutrophil extracellular release of elastase during cardiopulmonary bypass[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1997, 11:580-584.

(收稿日期:2004-09-09 修回日期:2004-12-16)

(本文编辑:李银平)

· 启事 ·

中华医学会“2005 急危重症论坛”学术大会征文通知

为进一步推动我国急危重症监护、治疗领域的发展,提高各级医院急危重症的诊疗水平,由中华医学会急诊分会、中华医学电子音像出版社共同举办的“2005 急危重症论坛”学术大会定于 2005 年 3 月在北京召开。届时国内该领域知名专家将作专题报告,并授予参会代表国家级继续教育学分。现将大会征文事宜通知如下:

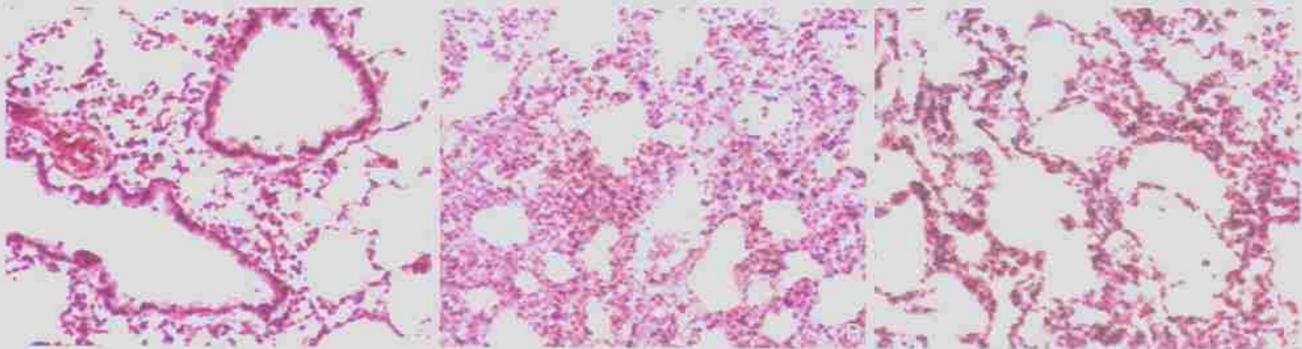
- 1 征文内容:①有关急危重症(涉及内、外、妇、儿科)诊断、鉴别诊断、治疗的经验与体会。②有关急危重症(涉及内、外、妇、儿科)治疗领域的新技术、新进展。③与急危重症有关的基础和临床研究进展等。
- 2 征文要求:①未公开发表的论文。②使用小 4 号字, A4 纸打印。③加盖单位公章。④将打印稿和含打印稿 word 文件的软盘于 2005 年 2 月 25 日以前寄北京东四西大街 42 号中华医学会 110 室 金琦 收(邮编:100710),每篇文章同时寄 20 元审稿费,联系电话:010-65244264,65249989 转 2100,传真:010-65244024,电子信箱:jijin791122@yahoo.com.cn。
- 3 文章被大会录用,将向作者发出参会通知;未录用稿件恕不退稿。入选会议的论文将由中华医学电子音像出版社结集出版在《中华急危重症论坛》正式刊物中,并颁发论文出版证书。本次大会的优秀论文也将被推荐到中华医学会系列杂志上发表。
- 4 没有论文的老师也可通过上述联系方式报名参加会议。

欢迎广大医生踊跃报名、投稿。

(中华医学会急诊分会 中华医学电子音像出版社)

乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用

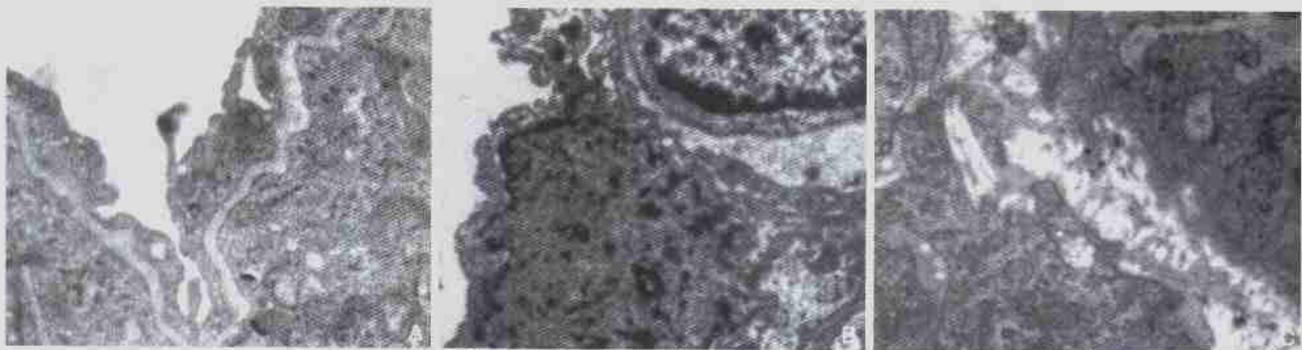
(正文见36页)



注：A为对照组正常肺组织；B为休克组肺组织，肺泡间隔明显增宽，有大量炎性细胞浸润，可见肺充血，间质水肿；C为乌司他丁组肺组织，肺泡间隔略有增宽，少量炎性细胞浸润，肺充血及间质水肿较休克组明显减轻。

图1 光镜下肺叶组织的病理学改变(HE, x200)

Figure 1 Examination of pulmonary tissue through light microscope (HE, x 200)



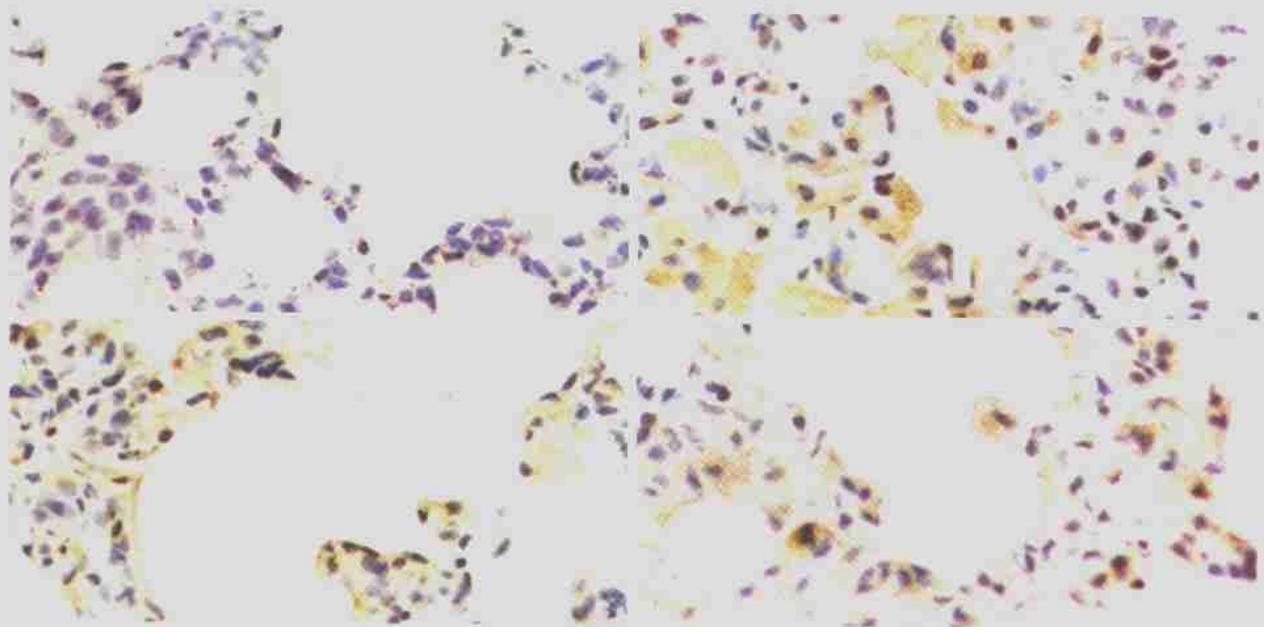
注：A为对照组正常肺组织；B为休克组肺组织，内皮细胞肿胀甚至崩溃，胞内大量吞饮小泡，细胞器肿胀，有的呈空泡状；C为乌司他丁组肺组织，内皮细胞略有肿胀，胞内较多吞饮小泡，细胞器肿胀，少数线粒体保留有完整的嵴

图2 电镜下肺叶组织的病理学改变(钨酸, x10 000)

Figure 2 Examination of pulmonary tissue through electric microscope (osmicate, x 10 000)

丙泊酚对大鼠肠缺血-再灌注后肺细胞间黏附分子-1蛋白表达的影响

(正文见53页)



注：A为对照组，B为I/R组，C为P1组，D为P2组

图5 各组肺组织ICAM-1蛋白表达(免疫组化, x300)

Figure 5 Expression of ICAM-1 protein in lung tissue in each group (immunohistochemical, x 300)