

• 论著 •

乌司他丁对失血性休克大鼠回肠黏膜细胞凋亡的影响

蒋龙元 杨炼红 钟娃 何志捷 常建星 黄子通

【摘要】 目的 探讨乌司他丁对失血性休克大鼠回肠黏膜细胞凋亡的影响。方法 采用前瞻对照动物研究,用改良 Chaudry 方法制备大鼠失血性休克模型,60 min 后回输血液和生理盐水进行复苏,部分加用乌司他丁治疗。检测不同时间点血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)含量和回肠黏膜细胞 Bax、Bcl-2、caspase 3 蛋白的表达水平。结果 大鼠失血性休克及复苏后血清 TNF- α 、MDA 含量以及回肠黏膜细胞 Bax、caspase 3 蛋白的表达较正常对照组均明显升高,Bcl-2 明显降低。复苏后血清 TNF- α 含量下降,MDA 含量升高;回肠黏膜细胞 Bax、caspase 3 蛋白的表达均明显下降,Bcl-2 蛋白明显升高;乌司他丁复苏组上述指标的恢复程度较生理盐水复苏组为好。结论 乌司他丁可抑制失血性休克大鼠回肠黏膜细胞的凋亡,对失血性休克大鼠起保护作用。

【关键词】 乌司他丁; 休克,失血性; 回肠黏膜; 凋亡; 大鼠

Effect of ulinastatin on apoptosis in ileal mucosa of rats with hemorrhagic shock JIANG Long-yuan*, YANG Lian-hong, ZHONG Wa, HE Zhi-jie, CHANG Jian-xing, HUANG Zi-tong. * Department of Emergency, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong, China

Corresponding author: HUANG Zi-tong

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of ulinastatin on apoptosis in ileal mucosa of rats with hemorrhagic shock. **Methods** A prospective, controlled animal study was performed. The rat model of hemorrhagic shock was replicated according to method described by Chaudry. After 60 minutes period of bleeding, rats were resuscitated by transfusion of shed blood and normal saline. A part of the animals were additionally treated with ulinastatin. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA) content in serum, and expression of Bax, Bcl-2, caspase 3 protein in ileal mucosa were determined at different time points after reperfusion. **Results** Compared with the normal saline group, the expression levels of TNF- α , MDA content in serum, Bax and caspase 3 protein in ileal mucosa during hemorrhagic shock after resuscitation were significantly increased, while Bcl-2 protein was markedly decreased. After fluid resuscitation, obvious increase in MDA, Bcl-2 protein, significant decrease in the level of TNF- α , the expression of Bax and caspase 3 protein in ileal mucosa were observed in the ulinastatin group compared with normal saline group. **Conclusion** Ulinastatin has protective effect on rats with hemorrhagic shock by suppressing the apoptosis in ileal mucosa.

【Key words】 ulinastatin; hemorrhagic shock; ileal mucosa; apoptosis; rat

失血性休克是一个复杂的病理生理过程,除缺血、缺氧导致代谢紊乱外,组织细胞受损甚至死亡。在失血性休克中因肠黏膜屏障功能损伤,可导致全身炎症反应综合征(SIRS)甚至多器官功能障碍综合征(MODS)。既往认为,失血性休克时缺血/再灌注损伤中,肠黏膜细胞死亡以坏死方式为主,但近年认为这种损伤可造成肠上皮细胞凋亡,甚至是休克

时肠黏膜通透性增高的主要原因^[1]。王刚等^[2]研究发现,乌司他丁(Ulinastatin)可减轻创伤失血性休克兔的缺血/再灌注肺损伤,起到良好的器官保护作用。本研究中观察了乌司他丁对失血性休克大鼠回肠黏膜细胞凋亡的影响及可能机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组:清洁级 Wistar 大鼠(广东医学动物实验中心提供,粤检字号:2004A022)70 只,雌雄各半,体重 200~250 g。按随机数字表法将大鼠分为正常对照组、休克组及复苏组 3 组,复苏组再分为复苏后 1、3、6 和 12 h 4 个时间点。正常对照组、休克组每组 7 只;复苏组各时间点 14 只,其中使用生理盐水(NS)复苏 7 只,使用乌司他丁(乌)复苏 7 只。

1.2 模型制备:采用 Chaudry 方法(略作改动)制备大鼠失血性休克模型^[3]。动物实验前一晚上禁食、

基金项目:广东省科技计划项目(2004B30601001)

作者单位:510120 广州,中山大学附属第二医院急诊科(蒋龙元,钟娃,何志捷,常建星,黄子通),神经内科(杨炼红)

通讯作者:黄子通,教授,主任医师,博士研究生导师

作者简介:蒋龙元(1964-),男(汉族),江苏常州人,医学硕士,副教授,硕士研究生导师,副主任医师,主要从事急危重症的研究与临床,发表论文 40 余篇,参编专著 8 部,获省科技进步三等奖 1 项,现任广东省急诊医学分会常委兼秘书、广州市急诊医学分会常委,《岭南急诊医学杂志》编辑部主任(Email: jly@china_em.com)。

自由饮水,腹腔注射无菌乌拉坦(1 200 mg/kg)麻醉。将大鼠仰卧固定,无菌剥离颈动脉和颈静脉,进行插管,颈动脉管经三通阀与血压换能器及 10 ml 注射器相连接,插管后立即注入 0.3 ml 肝素-NS(含肝素 300 U),通过 BL-410 生物机能实验系统连续描记血压、心率。经颈动脉放血至平均动脉压(MAP)为(40±3)mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),继续放血或回输部分血液维持其水平 60 min 后,7 只大鼠给予乌司他丁 25 kU/kg(2 ml NS 稀释)静脉推注(5 min 内),并回输放出的血液和等量 NS;另 7 只大鼠则给予 2 ml NS 静脉推注,并回输放出的血液和等量 NS,速度<2 ml/min,在 30 min 进行复苏,血压恢复稳定后,分别在不同实验时间点取颈动脉血约 3 ml 并活杀大鼠。正常对照组动物除不放血和输液外,其他处理与休克组相同。

1.3 观察指标及方法:①血液离心后留取血清,-20℃保存,留作测定肿瘤坏死因子-α(TNF-α,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法,试剂盒由深圳晶美股份有限公司提供)、丙二醛(MDA,采用化学反应法,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)的含量。②活杀大鼠后打开腹腔,距回肠末端 8 cm 取 1 cm 回肠,以体积分数为 10%的甲醛固定,常规制作石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织病理及进行回肠上皮损伤指数测定,并且取回肠切片进行免疫组化染色测定 Bcl-2、Bax、caspase 3 蛋白的表达。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 11.5 软件包处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示;正态分布变量多组间比较用方差分析,非正态分布变量用秩和检验;两组间比较,正态分布变量用 *t* 检验,非正态分布变量则先进行编秩,然后再用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 结果判断方法

1.5.1 染色定位:阳性反应物质主要分布在肠黏膜细胞的胞浆,显色为棕黄色。

1.5.2 染色结果的判断:以计分法半定量描述蛋白的表达。按阳性反应细胞所占比例分为 0 分(无阳性细胞)、1 分(阳性细胞≤10%)、2 分(阳性细胞占 11%~50%)、3 分(阳性细胞>50%)。

2 结果

2.1 乌司他丁对各组大鼠血清 TNF-α 和 MDA 含量的影响(表 1 和表 2):失血性休克大鼠经 NS 复苏及乌司他丁复苏后不同时间点血清 TNF-α 含量均明显高于正常对照组(P 均<0.01),但乌司他丁

复苏后血清 TNF-α 含量均明显低于 NS 复苏(P 均<0.01),表明乌司他丁能降低失血性休克与复苏中血清 TNF-α 含量。乌司他丁复苏后 1、3 和 6 h MDA 含量均高于正常对照组(P 均<0.01),但乌司他丁复苏后血清 MDA 含量在复苏 6 h 后明显低于 NS 复苏(P 均<0.01);提示失血性休克时氧自由基增加,乌司他丁能抑制失血性休克、复苏中脂质过氧化,抑制氧自由基的生成。

表 1 两组复苏后不同时间点血清 TNF-α 含量比较($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 1 Comparison of TNF-α content at different time points after resuscitation between two groups($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	复苏 1 h	复苏 3 h	复苏 6 h	复苏 12 h
NS 复苏组	109.2±14.4**	72.0±1.7**	56.6±4.4**	40.0±1.8**
乌复苏组	71.5±6.7***	51.5±2.4***	45.8±2.7***	32.0±1.9***

注:正常对照组值为(12.1±1.0)ng/L,休克组值为(60.7±1.6)ng/L;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与 NS 复苏组比较:*** $P<0.01$

表 2 两组复苏后不同时间点血清 MDA 含量比较($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 2 Comparison of MDA content at different time points after resuscitation between two groups($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	复苏 1 h	复苏 3 h	复苏 6 h	复苏 12 h
NS 复苏组	3.3±0.8**	6.1±2.0**	8.5±1.8**	6.3±2.3**
乌复苏组	2.7±0.4**	4.7±1.4**	5.0±1.8***	3.5±1.1**

注:正常对照组值为(2.0±0.2)μmol/L,休克组值为(2.4±0.4)μmol/L;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与 NS 复苏组比较:*** $P<0.01$

2.2 乌司他丁对缺血/再灌注后回肠黏膜组织中 caspase 3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响(表 3~6):失血性休克及 NS 和乌司他丁复苏后大鼠回肠黏膜细胞 caspase 3 蛋白表达均明显升高(P 均<0.01),但乌司他丁复苏组回肠黏膜细胞 caspase 3 蛋白表达少于 NS 复苏组,且乌司他丁复苏 3、6 和 12 h 时均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示乌司他丁能抑制 caspase 3 蛋白在回肠黏膜中的表达。失血性休克及 NS 和乌司他丁复苏后大鼠回肠黏膜 Bax 蛋白表达均明显高于正常对照组,而 Bcl-2 蛋白表达以及 Bcl-2/Bax 比值则均明显低于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);乌司他丁复苏后不同时间点 Bax 蛋白表达均明显减少,而 Bcl-2 蛋白表达则增高, Bcl-2/Bax 比值均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明乌司他丁能上调缺血/再灌注后肠黏膜组织 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,使 Bcl-2/Bax 比值增加。

表 3 两组复苏后不同时间点回肠组织 caspase 3 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Comparison of expression scores of caspase 3 protein in ileal mucosa at different time points after resuscitation between two groups($\bar{x} \pm s, n=7$) 分

组别	复苏 1 h	复苏 3 h	复苏 6 h	复苏 12 h
NS 复苏组	1.7±0.5**	2.7±0.5**	2.6±0.5**	2.4±0.5**
乌复苏组	1.6±0.5**	2.0±0.6**#	1.9±0.7**#	1.7±0.5**##

注:正常对照组值为(0.7±0.5)分,休克组值为(1.3±0.5)分;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与 NS 复苏组比较:## $P<0.05$,### $P<0.01$

表 4 两组复苏后不同时间点回肠组织 Bax 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 4 Comparison of expression scores of Bax protein in ileal mucosa at different time points after resuscitation between two groups($\bar{x} \pm s, n=7$) 分

组别	复苏 1 h	复苏 3 h	复苏 6 h	复苏 12 h
NS 复苏组	2.3±0.5**	2.4±0.5**	2.9±0.4**	2.4±0.5**
乌复苏组	1.4±0.5**##	1.6±0.5**##	1.7±0.5**##	1.6±0.5**##

注:正常对照组值为(1.0±0.0)分,休克组值为(1.6±0.5)分;与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 NS 复苏组比较:## $P<0.01$

表 5 两组复苏后不同时间点回肠组织 Bcl-2 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 5 Comparison of expression scores of Bcl-2 protein in ileal mucosa at different time points after resuscitation between two groups($\bar{x} \pm s, n=7$) 分

组别	复苏 1 h	复苏 3 h	复苏 6 h	复苏 12 h
NS 复苏组	1.1±0.4**	1.3±0.5**	1.6±0.5**	1.6±0.5**
乌复苏组	1.7±0.5**##	1.9±0.4**##	2.3±0.5**#	2.1±0.4**##

注:正常对照组值为(2.9±0.4)分,休克组值为(1.6±0.5)分;与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 NS 复苏组比较:## $P<0.05$

表 6 两组复苏后不同时间点回肠组织 Bcl-2/Bax 比值的比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 6 Comparison of Bcl-2/Bax in ileal mucosa at different time points after resuscitation between two groups($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	复苏 1 h	复苏 3 h	复苏 6 h	复苏 12 h
NS 复苏组	0.5±0.1**	0.6±0.2**	0.6±0.2**	0.7±0.3**
乌复苏组	1.3±0.5**##	1.3±0.5**##	1.4±0.5**##	1.5±0.5**##

注:正常对照组值为 2.9±0.4,休克组值为 1.1±0.6;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与 NS 复苏组比较:## $P<0.01$

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程,又称为程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD)。以往的研究认为,失血性休克所致缺血/再灌注损伤时肠黏膜细胞死亡以坏死方式为主,但近年来的研究表明,其亦可造成肠上皮细胞凋亡,并且细胞凋亡占相当大的比例。目前认为,细胞凋亡的机制可能为:

①氧化损伤:杨海贤等^[4]报道,在内毒素休克过程中,氧自由基增加,是对内皮细胞损伤的重要因素。有报道证实氧化应激损伤是细胞凋亡的机制之一,各种氧化剂可直接诱导细胞凋亡,使用抗氧化剂可以阻断具备氧化应激背景的各种凋亡诱导因素,如 TNF- α 、电离辐射等所引起的细胞凋亡。②钙稳态失衡。③线粒体损伤:线粒体跨膜电位下降,膜通透性增大,使细胞凋亡启动因子如细胞色素 C、凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)和凋亡诱导因子(AIF)等从线粒体内释放出来,激活凋亡相关酶,使细胞凋亡^[5,6]。

本研究结果亦显示,在失血性休克与复苏中,小肠黏膜细胞同时存在坏死和凋亡,乌司他丁复苏较 NS 复苏时凋亡要轻。乌司他丁是从健康成年男性尿液中分离纯化的尿胰蛋白酶抑制剂,具有同时抑制多种蛋白酶、糖和脂水解酶,稳定溶酶体膜,抑制炎症介质释放等多种特殊的药理性质^[6]。乌司他丁具有抗凋亡作用,其可能机制:①抗氧化损伤作用:乌司他丁能降低 MDA 的含量,抑制氧自由基的脂质过氧化损伤作用^[7]。②抑制凋亡相关因素:已证实 TNF- α 是凋亡诱导因素之一,可通过神经酰胺信号途径触发细胞凋亡。本研究提示,乌司他丁可抑制失血性休克大鼠细胞因子 TNF- α 释放。③干扰凋亡相关基因与凋亡相关蛋白酶的表达:目前公认的细胞凋亡过程包括凋亡信号转导、凋亡相关基因激活、细胞凋亡执行及凋亡细胞清除等方面。Bcl-2 基因能促进细胞周期和细胞增殖,其过度表达可特异性抑制细胞凋亡;亦有研究表明,Bcl-2 基因能抑制转基因大鼠肠上皮细胞缺血/再灌注损伤导致的凋亡^[8]。Bax 是强有力促凋亡分子,能与抑制凋亡的蛋白 Bcl-2、Bcl-X-1 形成异源二聚体,阻断它们抑制凋亡;caspase 3 是一种凋亡蛋白酶,能够水解蛋白质结构,导致细胞解体、形成凋亡小体。近年来的研究表明,Bcl-2 与 Bax 调节细胞凋亡不仅取决于其自身表达的高低,还与它们的比值(Bcl-2/Bax)有关,因 Bcl-2/Bax 能决定细胞对各种引起凋亡刺激的敏感性及细胞的生存与死亡^[9],当比值下降时,细胞趋向于凋亡。Cinel 等^[10]在肠缺血预处理对肠缺血/再灌注损伤作用的研究中发现,缺血预处理可上调 Bcl-2 基因表达,使回肠凋亡减少,逆转肠结构的严重破坏,避免多器官功能衰竭(MOF)。而 Masuko^[11]研究发现,用左旋谷氨酸能明显抑制大鼠缺血/再灌注中肠黏膜上皮细胞凋亡,并认为其机制与 Bcl-2 蛋白表达增加、Bax 蛋白表达减少、Bcl-2/Bax mRNA 比值增高有关。

综上所述,本研究中采用免疫组化法发现,失血性休克能上调回肠组织 Bax 蛋白和 caspase 3 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,Bcl-2/Bax 比值下降,促使回肠组织凋亡;与 NS 比较,乌司他丁能抑制 Bax 蛋白和 caspase 3 蛋白表达上调以及 Bcl-2 蛋白表达下调,从而使回肠组织细胞凋亡减少。提示乌司他丁可通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白和 caspase 3 蛋白表达来抑制组织细胞凋亡,从而对失血性休克起到保护作用。

参考文献:

- 1 Zhang C, Sheng Z Y, Hu S, et al. The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats[J]. Burns, 2002, 28: 731-737.
- 2 王刚, 陈婷婷, 高长青. 乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 36-38.
- 3 Chaudry I H. Rat and mouse models of hemorrhagic-traumatic shock[M]//Schlag G, Redl H (Ed). Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure. Berlin: Springer-Verlag, 1993: 371.
- 4 杨海贤, 赵刚, 于学宽, 等. 活血化痰中药对内毒素休克大鼠心脏

- 微血管损伤的防治作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10: 26-28.
 - 5 金惠铭. 病理生理学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 179-180.
 - 6 曾文红, 白国强. 乌司他丁研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7: 52-54.
 - 7 蒋龙元, 杨炼红, 钟娃, 等. 乌司他丁对失血性休克大鼠的保护作用及其机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21: 1701-1704.
 - 8 Coopersmith C M, O'Donnell D, Gordon J I. Bcl-2 inhibits ischemia-reperfusion-induced apoptosis in the intestinal epithelium of transgenic mice[J]. Am J Physiol, 1999, 276: G677-686.
 - 9 Oltvai Z N, Millman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74: 609-619.
 - 10 Cinel I, Avlan D, Cinel L, et al. Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats[J]. Shock, 2003, 19: 588-592.
 - 11 Masuko Y. Impact of stress response genes induced by L-glutamine on warm ischemia and reperfusion injury in the rat small intestine[J]. Hokkaido Igaku Zasshi, 2002, 77: 169-183.
- (收稿日期: 2005-11-30 修回日期: 2006-06-30)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

急诊患者输液过程中的不安全因素分析及对策

韩洁 周淑玲

【关键词】 急诊输液; 不安全因素; 护理对策

急诊科是医院抢救急危重症患者的第一线, 是医院的窗口。我院是一所综合性三级医院, 每日接收输液治疗者在 200~400 例次。我们根据急诊的特点, 抓住输液过程中的关键环节, 减少护理缺陷的发生, 提高了护理质量, 患者满意度也明显增高, 现将体会总结如下。

1 充分认识急诊输液过程中的不安全因素

急诊输液过程中的不安全因素有以下几种: ①不了解患者病情, 静脉液体速度未合理调节, 造成患者不适; ②急诊科患者较多时, 容易造成输液过程中核对患者姓名失误, 引起液体输错; ③患者自己调节输液速度而造成不适症状出现; ④患者输液过程中自己更换位置, 易引起液体漏输或错输; ⑤静脉输注青霉素类抗生素患者超过 48 h 不用, 而后又重

新使用未再次做皮试; ⑥曾做过乳腺根治术的患者未说明情况, 护士将液体输入患侧上肢可造成肢体肿胀和不适感; ⑦流感暴发期、夏季是输液量的高峰期, 急诊就诊患者大量增多, 会出现忙乱现象, 易引起护理差错; ⑧护士不很了解药物的药理作用及输液注意事项, 造成护理纠纷; ⑨液体输注完毕, 护士未执行穿刺点正规按压方法, 造成注射局部瘀血, 令患者不满意。

2 护理对策

2.1 尊重患者的知情权: 首先要了解患者的病情, 根据医嘱输液治疗时应向患者讲明输液目的及要求, 取得其配合。

2.2 严格执行查对制度: 分别放置不同液体, 实行输液、换液、拔针签名负责制。我们规定在输液瓶上要标明药物名称和 2 位护士的签名(配液者、操作者), 杜绝液体输错或漏输的发生。

2.3 加强对护士安全防范意识的教育, 做好人员调配和管理: 日常工作中做到

“警钟长鸣”, 常抓不懈, 强化查对制度, 认真做好实习护生的带教, 确保护理安全。流感暴发期、夏季出现输液高峰时, 护士长对人员的合理安排是非常重要的。应以满足患者的护理需要为原则, 合理安排班次和人员, 避免因患者多、排长队引起的忙乱现象, 以及护士处于疲劳状态造成工作中注意力松散、判断失误而出现护理缺陷。

2.4 增强技术能力: 要根据患者的病情和年龄, 不同药物的药理作用及不良反应调节输液速度。静脉输注青霉素类抗生素之前, 要严格检查皮试结果, 加强业务学习, 掌握各种药物的相关知识。

总之, 急诊护士在为患者输液治疗过程中, 必须严格执行操作规程和查对制度, 熟练掌握护理对策, 抓住关键环节及找出安全隐患, 才能确保护理安全, 提高护理质量。

(收稿日期: 2006-06-10)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 300050 天津市天和医院

作者简介: 韩洁(1959-), 女(汉族), 天津人, 主管护师。