· 研究报告 ·

乌司他丁对大鼠急性肺损伤保护作用的实验研究

赵晓琴 吴英林 邝晓聪

【关键词】 乌司他丁； 肺损伤，急性； 肿瘤坏死因子-α； 白细胞介素-10； 白细胞介素-18

乌司他丁作为一个具有广泛抑制各种细胞因子产生的药物，在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)方面的治疗作用日益受到重视，本研究拟探讨其保护作用机制，报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备：SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 30 只(由广西医科大学实验动物中心提供)，体重(200±50)g，按随机数字表法分为正常对照组、ALI 组和乌司他丁组 3 组，每组 10 只。每 12 h 用质量分数为 20%酵母混悬液 5 ml/kg 腹腔注射 1 次的方法制备 ALI 动物模型；正常对照组注射等量生理盐水。乌司他丁组在注射第一次酵母悬液后 30 min 向腹腔内注射 100 U/g 乌司他丁，ALI 组及正常对照组则注射等量生理盐水。

1.2 检测指标及方法：用药 12 h 后，经腹腔注射体积分数为 10%的水合氯醛 30 mg/kg 麻醉动物，从腹主动脉取血 0.5～1.0 ml，采用全自动血气分析仪测定动脉血氧分压(PaO_2)。行气管插管，以 10 ml 磷酸盐缓冲液分次灌洗全肺，重复洗 3 次，收集支气管肺泡灌洗液(BALF)，待做细胞因子的检测。腹主动脉放血处死动物，收集血清，置-20 ℃保存待测细胞因子。开胸取肺称重，按照肺重/体重比值计算肺系数。取右肺尖叶，用体积分数为 4%的多聚甲醛水溶液固定，石蜡包埋、切片，苏木素-伊红(HE)染色，光镜下观察组织病理学改变。用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 BALF 及血清细胞因子含量，严格按试剂盒操作说明书进行，选择 450 nm 波长进行检测，确定标准品和空白对照区域，由酶标检测仪自动检测计算并绘制标准曲线，计算检测结果。

1.3 统计学处理：采用 SPSS 11.5 统计软件分析，所有实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各组大鼠肺系数和动脉血气分析比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	肺系数(g/kg)	PaO_2(mm Hg)	PaO_2/FiO_2(mm Hg)
正常对照组	10	5.92±0.39	93.27± 7.89	443.24± 47.48
ALI 组	10	6.98±1.32[a]	60.59±13.11[a]	288.52± 62.45[a]
乌司他丁组	10	6.72±0.67[a]	84.23±23.68[b]	401.28±112.40[b]

注：与正常对照组比较，[a]$P<0.05$；与 ALI 组比较，[b]$P<0.05$；1 mm Hg=0.133 kPa

2 结 果

2.1 肺系数及动脉血气分析(表 1)：ALI 组大鼠肺系数显著高于正常对照组，PaO_2 及氧合指数(PaO_2/FiO_2)则明显降低(P 均<0.05)。乌司他丁组肺系数虽较 ALI 组降低，但差异无统计学意义($P>0.05$)；动脉血气较 ALI 组显著升高(P 均<0.05)。

2.2 细胞因子(表 2)：ALI 组 BALF 和血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-10(IL-10)、IL-18 均较正常对照组显著升高(P 均<0.05)；乌司他丁组上述因子含量较 ALI 组明显下降，但仍显著高于正常对照组，差异均有统计学意义(P 均<0.05)。

2.3 光镜下肺组织病理学改变(彩色插页图 1)：正常对照组肺组织结构清晰，间质血管无扩张、无炎性浸润，肺泡壁薄、腔洁净，支气管黏膜上皮完整；ALI 组肺组织内可见较多肺泡萎陷，弥漫性毛细血管扩张，伴灶性肺泡内出血，肺间质内可见大量中性粒细胞滞留、肺间质水肿、肺泡间隔不同程度增宽，伴中性粒细胞浸润；乌司他丁组肺组织病变轻于 ALI 组，肺泡内出血和肺间质水肿程度减轻。

3 讨 论

在 ALI/ARDS 的发病机制中，炎症反应起关键性作用。Bhatia 等[1]认为：炎症介质持续或过多的释放可引起全身多种炎症反应、细胞活化及凝血系统和免疫系统的激活，这种失控的炎症反应可以损伤血管内皮和远隔器官。在参与全身炎症反应综合征(SIRS)的众多炎症介质中，TNF-α 和 ILs 与 ALI/ARDS 的发病及死亡关系最为密切。黄杨等[2]研究发现：在体外用内毒素脂多糖(LPS)刺激肺泡巨噬细胞后，核转录因子-κB(NF-κB)活性明显增高，细胞培养上清液中的 TNF-α 含量也随之升高，提示在 LPS 刺激后 NF-κB 活化并引发 TNF-α 大量释放是导致 ALI 的关键环节之一。本实验结果表明：ALI 大鼠 BALF 及血清中 TNF-α 含量均较正常对照组显著升高，说明 TNF-α 在 ALI/ARDS 病理生理过程中起重要作用。而乌司他丁组 TNF-α 含量较 ALI 组明显降低，说明乌司他丁能够抑制 TNF-α 的表达，减轻 TNF-α 所致的肺损伤作用。

1995 年 Hyogo 医学院细胞学系 Nakamura 等[3]从内毒素休克小鼠肝脏内克隆出一种能诱导高水平 γ-干扰素(IFN-γ)产生的蛋白因子，命名为干扰素 γ 诱导因子(IGIF)，即 IL-18。在 ILs 家族中，IL-18 与 IL-1 在结构、合成和信号转导途径上一致，其免疫和介导细胞毒功能则与 IL-12 相似。朱永红等[4]发现：IL-18 与靶细胞膜上的受体结合后，活化激活蛋白-1(AP-1)和 NF-κB 使 TNF-α、IL-1β、IL-8、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及 IL-2 等基因转录、翻译。可认为 IL-18 在 LPS 致 ALI 中起双刃剑作用：一方面，IL-18 诱导 IFN-γ 产生抗炎作用；另一方面，它又能增加促炎因子 TNF-α、IL-1β、IL-8、GM-CSF 和 IL-2 的产生，并抑制 IL-4、IL-10 的产生，从而起到促炎作用[5]。在本实验中，ALI组IL-18增强，说明肺巨噬细胞中

基金项目：广西壮族自治区卫生厅科技研究计划课题(桂科自 0447055)

作者单位：530021 广西医科大学第一附属医院危重症监护中心(赵晓琴，吴英林)；广西医科大学病理生理教研室(邝晓聪)

作者简介：赵晓琴(1955－)，女(汉族)，广西壮族自治区人，教授，硕士生导师，Email：xiaoqin62@sohu.com。

万方数据

表 2　各组大鼠 BALF 及血清中 TNF-α、IL-10、IL-18 表达比较($\bar{x}\pm s$)　ng/L

组别	动物数	BALF			血清		
		TNF-α	IL-10	IL-18	TNF-α	IL-10	IL-18
正常对照组	10	21.22±11.03	12.40±39.16	36.52±12.66	30.42± 6.18	16.80±25.23	31.56±15.05
ALI 组	10	264.19±48.31[a]	66.71±10.38[a]	180.52±41.31[a]	638.16±59.46[a]	68.34± 8.43[a]	168.37±26.49[a]
乌司他丁组	10	162.35±28.56[ab]	58.35±12.01[ab]	119.52±26.91[ab]	426.82±52.79[ab]	46.51±11.32[ab]	104.62±38.70[ab]

注：与正常对照组比较，[a]$P<0.05$；与 ALI 组比较，[b]$P<0.05$

IL-18 分泌增多，可能是机体的一种保护机制，也可能是通过增加 IL-18 来强化促炎作用。乌司他丁组 IL-18 较 ALI 组明显降低，说明乌司他丁具有抑制 IL-18 分泌的作用，这可能也是其发挥肺保护作用的机制之一。

IL-10 主要由辅助性 T 细胞(Th2)产生，是体内主要的抗炎性 ILs，能抑制多种炎症介质的合成，对炎症介质和抗炎介质也具有双重作用[1]。一项临床研究结果显示，IL-10 可减轻 LPS 所致发热，降低 TNF、IL-6、IL-8 的水平，抑制肺内中性粒细胞聚集及脱颗粒[6]。邱海波等[7]研究发现，机体在受到感染、创伤刺激下均可自身合成 IL-10，但其在释放时相上迟于 TNF-α，不能及时有效地阻断炎症介质的释放，导致促炎与抗炎反应失衡、炎症反应失控。本实验结果也观察到在 ALI 组 IL-10 水平较正常对照组升高，这可能是机体的一种保护作用，也可能是 ALI 的一个病理基础。在 ALI 中，抗炎细胞因子的高表达亦可能促进炎症的放大而不是起保护作用。而乌司他丁组 IL-10 较 ALI 组明显降低，提示乌司他丁可能通过抑制抗炎因子的高表达，重建促炎/抗炎平衡，从而起到肺保护的作用。

乌司他丁具有抑制多种蛋白、糖和脂类水解酶的活性，稳定溶酶体膜、白细胞膜等膜结构，抑制炎症介质的过度释放，改善微循环，保护血管内皮细胞的作用。Isobe 等[8]研究发现，乌司他丁在体外实验中能抑制由内毒素活化的单核细胞产生 TNF-α。应斌宇等[9]观察到，乌司他丁能显著抑制创伤弧菌脓毒症大鼠 TNF-α、IL-1、IL-6 水平，增高 IL-10 水平。本实验表明，乌司他丁能抑制促炎细胞因子 TNF-α、IL-18 的产生，从而减轻肺组织炎症反应的程度。表现为 ALI 大鼠肺组织病理学改变减轻，PaO_2 提高，但并未发现其具有升高抗炎介质 IL-10 水平的作用，而表现为对促炎/抗炎因子的全面抑制作用。这可能是乌司他丁直接抑制了细胞因子转导通路的某些环节，同时降低促炎/抗炎活性；也可能是乌司他丁通过抑制蛋白水解酶、抗氧化、改善微循环等多方面的作用，减轻机体炎症反应程度，使炎症介质的表达下调，同时抗炎介质的表达也相应下调。

参考文献

〔1〕 Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome〔J〕. J Pathol, 2004, 202(2): 145-156.

〔2〕 黄杨，梁继河，贾斌，等. 白介素-10 和一氧化氮对内毒素诱导肺泡巨噬细胞核因子 κB 活化及肿瘤坏死因子释放的调节〔J〕. 中国危重病急救医学，2001，13(5)：284-286.

〔3〕 Nakamura K, Okamura H, Wada M, et al. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production〔J〕. Infect Immun, 1989, 57(2): 590-595.

〔4〕 朱永红，邹全明. 白介素 18 受体及其介导的信号转导〔J〕. 细胞与分子免疫学杂志，2001，12(1)：98-100.

〔5〕 Sugama S, Kim Y, Baker H, et al. Tissue specific expression of rat IL-18 gene and response to adrenocorticotropic hormone treatment〔J〕. J Immunol, 2000, 165(11): 6287-6292.

〔6〕 Pajkre D, Camoglio L, Tiel-van Buul M C, et al. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration〔J〕. J Immunol, 1997, 158(8): 3971-3977.

〔7〕 邱海波，周韶霞，陈德昌. 白介素-10 对肺泡巨噬细胞致炎效应的调节作用〔J〕. 中国危重病急救医学，2000，12(6)：353-355.

〔8〕 Isobe H, Okajima K, Uchiba M, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-α production by urinary trypsin inhibitor〔J〕. International Congress Series, 2003(1225): 69-74.

〔9〕 应斌宇，孙来芳，程碧环，等. 乌司他丁对创伤弧菌脓毒血症实验大鼠细胞因子的影响和意义〔J〕. 实用医学杂志，2004，20(4)：362-364.

(收稿日期：2008-01-20)
(本文编辑：李银平)

· 科研新闻速递 ·

核转录因子-κB 抑制剂姜黄阻断脓毒症诱导的肌蛋白水解

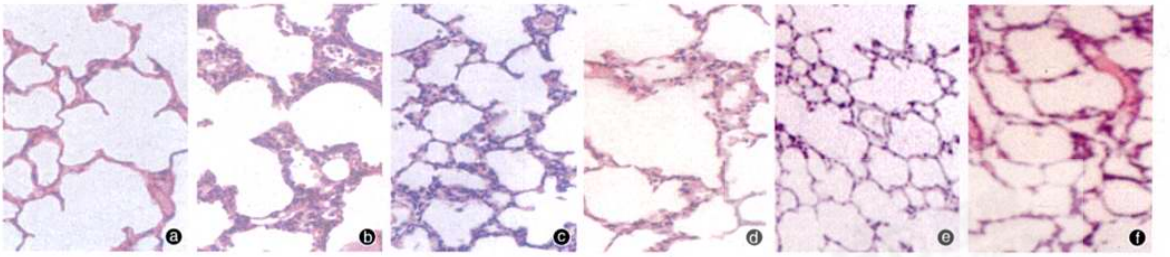
美国学者经过实验证实姜黄可防止大鼠脓毒症诱导的肌蛋白水解，此外，他们还发现了姜黄对脓毒症诱导不同肌蛋白水解途径的影响(即：泛素-蛋白酶体途径、钙蛋白酶途径、组织蛋白酶 L 依赖性蛋白水解途径)以及核转录因子-κB(NF-κB)和 p38/MAP 激酶失活在姜黄阻断肌蛋白水解中的作用。通过将大鼠盲肠结扎穿孔制备脓毒症模型，向大鼠腹腔注射姜黄(600 mg/kg)或等量溶剂。实验发现，脓毒症大鼠趾长伸肌释放酪氨酸，而腹腔注射姜黄可防止脓毒症诱导的肌蛋白水解，泛素合成酶 atrogin-1 和 MuRF1 表达上调并不受姜黄的影响。对脓毒症大鼠肌肉体外实验研究结果显示，给予姜黄后蛋白酶体途径、钙蛋白酶途径、组织蛋白酶 L 依赖性蛋白途径水解率均下降，NF-κB/p65 的表达和活性以及磷酸化的 p38 减少。研究者认为，姜黄能阻断脓毒症诱导的肌蛋白水解，这种作用可能是由于姜黄抑制了 NF-κB/p65 和 p38 的活性，但蛋白水解率的变化与 atrogin-1 和 MuRF1 表达的变化并非绝对相关。

包呈梅，编译自《Mediators Inflamm》，2008；2008：317851；胡森，审校

万方数据

胰岛素样生长因子结合蛋白-2与足月及早产新生大鼠高氧肺损伤的关系

（正文见331页）

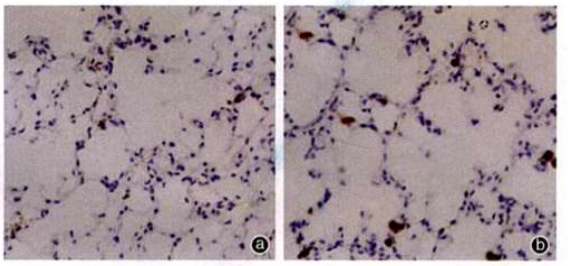


ⓐ:空气组1 d；ⓑ:高氧组4 d；ⓒ:空气组7 d；ⓓ:高氧组7 d；ⓔ:空气组21 d；ⓕ:高氧组21 d

图2　各组大鼠生后不同时间点肺组织病理学改变(HE，×200)

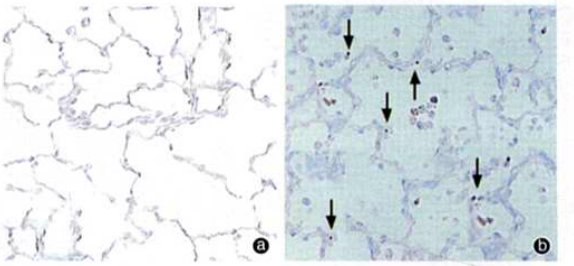
急性肺栓塞后线粒体前凋亡蛋白的表达及其促细胞凋亡机制研究

（正文见353页）



ⓐ:APE前；ⓑ:APE后48 h

图3　APE前后大鼠肺组织ARTS蛋白表达(免疫组化，×400)

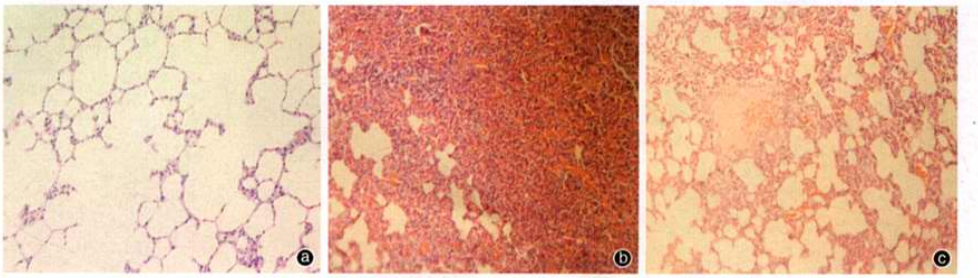


ⓐ:APE前；ⓑ:APE后48 h，箭头示凋亡细胞

图4　APE前后大鼠肺组织细胞凋亡情况(TUNEL，×400)

乌司他丁对大鼠急性肺损伤保护作用的实验研究

（正文见369页）

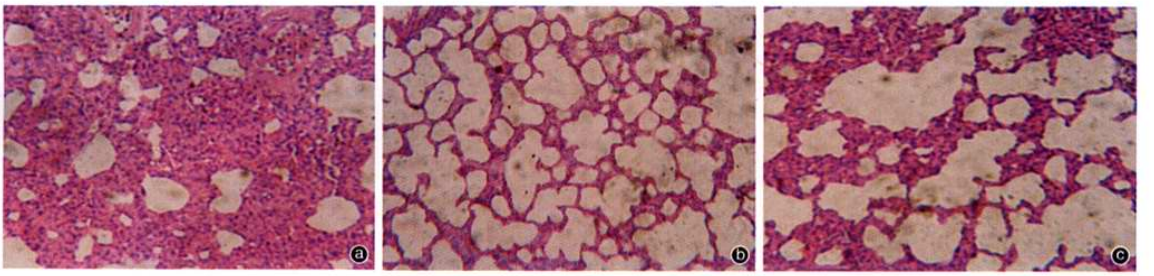


ⓐ:正常对照组；ⓑ:ALI组；ⓒ:乌司他丁组

图1　各组大鼠肺组织病理学观察(HE，×400)

乌司他丁对大鼠呼吸机相关性肺损伤的预防作用及机制研究

（正文见371页）



ⓐ:M组；ⓑ:C组；ⓒ:U组

图3　各组大鼠肺组织病理学改变(HE，×40)

万方数据