

• 研究报告 •

乌司他丁对脓毒症大鼠小肠功能保护的机制研究

王春亭 孟玫 秦成勇 张怡婧 丁敏 蒋进皎 张继承 任宏生
曾娟 楚玉峰 孟冲 郝国强 于杰滨

【摘要】 目的 观察乌司他丁(UTI)对脓毒症大鼠小肠黏膜的保护作用,并探讨其作用途径。方法 健康雄性成年 Wistar 大鼠 85 只被随机分为模型组(35 只)、UTI 组(35 只)、假手术组(15 只)。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型,用乌司他丁每 6 h 腹腔给药 1 次($50 \text{ kU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)进行干预,连用 4 d 后处死大鼠,观察小肠物理屏障、免疫屏障、运动功能、肠道黏膜微循环、肥大细胞及炎症介质的改变。结果 UTI 可明显改善脓毒症大鼠的生存率(62.8%比 37.1%, $P < 0.01$)。与模型组比较,UTI 组肠黏膜评分明显升高,肠道组织损伤明显减轻,黏膜超微结构明显改善,细菌移位集落数明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);但 3 组间肠系膜淋巴结和脾脏淋巴结中细胞亚群及肠绒毛组织中 T 淋巴细胞亚群比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。与模型组比较,UTI 组小肠的收缩振幅和频率明显升高,小肠黏膜血流量显著增多,脱颗粒肥大细胞数量显著减少,肠道内肥大细胞蛋白酶 I (RMCP I)浓度、肠组织髓过氧化物酶(MPO)水平、血清和小肠组织中一氧化氮(NO)及小肠诱生型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 UTI 对小肠免疫屏障没有影响,但可减少脓毒症大鼠细菌移位的发生,提高生存率,保护小肠物理屏障,改善小肠运动和黏膜微循环,其作用机制可能是降低血液和小肠组织中 NO 水平,减少小肠组织中 MPO 活性和 iNOS mRNA 表达,抑制小肠黏膜肥大细胞的活化。

【关键词】 乌司他丁; 脓毒症; 小肠功能; 大鼠

乌司他丁(UTI)最初用于治疗急性胰腺炎(AP),但目前研究显示,UTI 对创伤、烧伤患者有器官保护作用^[1-2],临床应用的成功给予脓毒症治疗以极大的启发。本实验旨在通过建立脓毒症大鼠模型,观察 UTI 对小肠物理和免疫屏障功能,以及对小肠运动、黏膜微循环和肥大细胞的作用。

1 材料与方

1.1 动物分组及模型制备:选取健康雄性 Wistar 大鼠 85 只,体重(250.0 ± 12.7)g,由山东大学动物实验中心提供。用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型。按随机数字表法将大鼠分为假手术组 15 只,模型组 35 只,UTI 组 35 只。UTI 组术后每 6 h 腹腔给予 UTI 1 次($50 \text{ kU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),其他各组于同时间点给予等量生理盐水,均连用 4 d。

1.2 检测指标及方法:术后 4 d 活杀大鼠,心脏穿刺取血,离心取上清液。开腹

取肠系膜淋巴结、脾及距回盲部 5 cm 的小肠,保存待检。

1.2.1 小肠物理屏障的研究

1.2.1.1 镜下观察:①将小肠组织切片进行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察黏膜组织病理变化。每张切片任意选取 20 个视野,按 Ozkan 等^[3]的评分标准对小肠组织结构变化进行评分。②制备小肠电镜标本,透射电镜下观察肠黏膜上皮细胞超微结构及紧密连接。每张切片任意选取 50 个紧密连接进行观察,细胞间紧密连接 $> 20 \text{ nm}$ 即为紧密连接增大。用增大的紧密连接个数占 50 个紧密连接的百分比表示结果。

1.2.1.2 细菌移位:将肠系膜淋巴结用生理盐水匀浆,接种至血琼脂培养板,置于厌氧培养箱培养 24~48 h,计数细菌移位集落数,超过 100 cfu/g 即为阳性。

1.2.2 小肠免疫屏障的研究

1.2.2.1 T 淋巴细胞亚群测定:用流式细胞仪测定 T 淋巴细胞亚群比例,用免疫组化方法检测 CD4、CD8,用上皮细胞和固有层细胞计数法计数。在回肠绒毛固有层中任选 5 个图像计数,结果用每 10 000 μm^2 阳性细胞数表示;回肠绒毛上皮细胞中的阳性淋巴细胞用每 100 个上皮细胞中的阳性细胞数表示。

1.2.2.2 脾淋巴细胞增殖反应:分离、培养脾淋巴细胞,用四甲基偶氮唑盐

(MTT)比色法测定样本中的吸光度(A)值,以反映脾淋巴细胞增殖反应强度。增殖指数(PI)=实验组 A 值/阴性对照组 A 值。

1.2.2.3 淋巴细胞上清液中细胞因子测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定 γ -干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)水平。

1.2.3 小肠运动功能和肠道黏膜微循环的研究

1.2.3.1 小肠腔内压力变化的测定:在大鼠小肠中段插入一尖端带球囊的聚乙烯导管,导管连接到与放大器相连的压力转换器上,测定肠道内压力变化,每只动物记录 2 h,以肠道内压力变化反映小肠运动功能。

1.2.3.2 小肠黏膜微循环的测定:在大鼠小肠系膜缘对侧切口,将探头插入肠腔轻触肠黏膜,采用激光多普勒微循环血流计测定小肠黏膜微循环血流量,每隔 0.2 s 取 1 次信号,血流量单位以灌注单位(PU)表示,取连续测得 10 次的平均值作为微循环血流量值。

1.2.4 肥大细胞作用的研究

1.2.4.1 肥大细胞超微结构观察:制作超微切片,计算每个切片中脱颗粒肥大细胞个数占总观察细胞个数的百分比。

1.2.4.2 肠腔内鼠肥大细胞蛋白酶 I (RMCP I)浓度测定:取 10cm 长小肠

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.015

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2006C77);山东省医药卫生科研基金项目(2007HW09)

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院 ICU

通信作者:秦成勇, Email: chyongqin@yahoo.com.cn

表 1 UTI 对脓毒症模型大鼠小肠物理屏障和免疫屏障的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	肠黏膜评分(分)	上皮细胞增大的紧密连接(%)	细菌移位($\times 10^3$ cfu/g)	淋巴细胞 PI	IFN- γ (μ g/L)	IL-4(ng/L)
假手术组	1.14 \pm 0.36(15)	3.5 \pm 1.9(15)	0 (0)	11.6 \pm 2.6(15)	1.91 \pm 0.12(15)	52.8 \pm 11.1(15)
模型组	3.21 \pm 0.90(13) ^a	23.0 \pm 2.6(13) ^a	26.0 \pm 10.1(13) ^a	5.3 \pm 1.7(13) ^a	1.46 \pm 0.08(13) ^a	115.3 \pm 18.9(13) ^a
UTI 组	2.55 \pm 0.67(22) ^b	13.5 \pm 3.4(22) ^c	13.1 \pm 4.0(17) ^c	6.1 \pm 2.4(22)	1.56 \pm 0.15(22)	102.2 \pm 28.3(22)

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;括号内为动物数

的肠内容物,加到含有 Tris-HCl、NaCl 和 CaCl₂ 的缓冲液(pH 值 8.3)4 ml 中混匀,离心取上清液,测定小肠肠腔中 RMCP I 水平,按 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.5 炎症介质的测定:①用分光光度计测定小肠组织髓过氧化物酶(MPO)活性。②用硝酸盐/亚硝酸盐分光法,按试剂盒说明书步骤测定血清和肠组织中 NO 含量。③逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量法检测小肠诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达。将 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照,iNOS 作为目的基因,基因查阅相关文献及与 GeneBank 核对序列,采用 OLIGO 6.0 软件设计引物。取 10 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯 254 nm 波长处观察,DNA 存在处显示出肉眼可辨的桔红色荧光条带,根据 DNA 分子质量标准判断 PCR 产物目的条带的分子质量大小,用计算机凝胶图像分析系统分析,以 iNOS/ β -actin A 值比值作为 iNOS 的相对表达量。

1.3 统计学方法:采用 Kaplan-Meier 和 Log-Rank 方法比较各组动物的生存率;小肠组织病理学结果用 Kruskal Wallis 方法分析;其他结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据用单因素方差分析(one-way ANOVA)。用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生存率分析:假手术组无动物死亡;UTI 组生存率为 62.8%(22/35),显著高于模型组的 37.1%(13/35),差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 小肠物理屏障观察结果

2.2.1 小肠黏膜评分结果(表 1):模型组肠黏膜评分明显高于假手术组($P<0.01$);UTI 治疗可以显著改善肠道的组织损伤($P<0.05$)。

2.2.2 肠黏膜上皮细胞超微结构(表 1):假手术组大鼠小肠上皮细胞连接结构正常,仅有少量紧密连接增宽;模型组有很

表 2 各组大鼠脾淋巴结、肠系膜淋巴结中细胞亚群比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	CD4 ⁺ CD3 ⁺ (%)		CD8 ⁺ CD3 ⁺ (%)		CD4 ⁺ CD3 ⁺ /CD8 ⁺ CD3 ⁺ 比值	
		脾	肠系膜	脾	肠系膜	脾	肠系膜
假手术组	15	39.8 \pm 3.4	52.5 \pm 5.4	19.4 \pm 3.1	23.3 \pm 4.9	2.1 \pm 0.4	2.4 \pm 0.6
模型组	13	34.7 \pm 4.9	43.3 \pm 5.9	19.5 \pm 3.4	22.7 \pm 3.0	1.8 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3
UTI 组	22	36.3 \pm 4.5	45.7 \pm 4.8	18.2 \pm 3.3	23.7 \pm 3.8	2.1 \pm 0.5	2.0 \pm 0.7

表 3 各组大鼠肠绒毛组织中 T 淋巴细胞亚群结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	CD4 T 淋巴细胞		CD8 T 淋巴细胞	
		LPL($\times 10^{-4}/\mu$ m ²)	IEL(%)	LPL($\times 10^{-4}/\mu$ m ²)	IEL(%)
假手术组	15	32.1 \pm 7.5	1.5 \pm 0.6	6.2 \pm 1.9	23.7 \pm 6.3
模型组	13	23.2 \pm 5.3	1.8 \pm 0.8	9.3 \pm 2.2	34.1 \pm 10.2
UTI 组	22	25.2 \pm 6.2	2.4 \pm 1.6	9.8 \pm 3.3	31.2 \pm 8.3

注:LPL 为固有层淋巴细胞,IEL 为上皮淋巴细胞

表 4 各组大鼠小肠腔内压力(收缩振幅和频率)和肠道黏膜微循环血流量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	收缩振幅(mm Hg)	收缩频率(次/min)	黏膜血流量(CPU)
假手术组	15	11.2 \pm 3.7	1.6 \pm 0.7	269.9 \pm 4.3
模型组	13	4.6 \pm 2.3 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a	158.6 \pm 42.9 ^a
UTI 组	22	9.0 \pm 2.5 ^b	1.5 \pm 0.4 ^c	230.8 \pm 51.9 ^c

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

表 5 各组大鼠小肠肥大细胞数、RMCP I 浓度及炎症介质水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	脱颗粒肥大细胞数(%)	RMCP I (μ g/L)	肠 MPO (U/g)	NO 含量		iNOS mRNA
					血清(μ mol/L)	肠(nmol/g)	
假手术组	15	6.3 \pm 4.8	0.9 \pm 0.2	2.1 \pm 1.9	7.8 \pm 2.9	20.3 \pm 5.1	...
模型组	13	32.5 \pm 6.4 ^a	28.6 \pm 7.8 ^a	12.9 \pm 6.2 ^a	322.2 \pm 42.1 ^a	63.5 \pm 11.4 ^a	0.62 \pm 0.13 ^a
UTI 组	22	21.3 \pm 4.8 ^b	16.5 \pm 5.4 ^b	6.4 \pm 4.5 ^c	236.2 \pm 31.3 ^c	43.3 \pm 12.7 ^c	0.33 \pm 0.17 ^c

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;...代表未测到

多紧密连接增大;UTI 组黏膜超微结构较模型组明显改善,增大的紧密连接数量也较模型组显著减少($P<0.01$)。

2.2.3 细菌移位结果(表 1):假手术组没有观察到细菌移位;模型组 13 只动物细菌移位均为阳性;UTI 组 22 只中有 17 只动物细菌移位阳性。与模型组相比,UTI 组发现的细菌移位集落数明显减少($P<0.01$)。

2.3 小肠免疫屏障观察结果(表 1~3):流式细胞分析及免疫组化结果显示,3 组脾淋巴结、肠系膜淋巴结中 CD4⁺CD3⁺、CD8⁺CD3⁺、CD4⁺CD3⁺/CD8⁺CD3⁺ 比值以及肠绒毛组织中 CD4⁺、

CD8⁺T 淋巴细胞比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。模型组脾淋巴细胞 PI 较假手术组被显著抑制,差异显著($P<0.01$);UTI 组脾淋巴细胞增殖反应较模型组无显著改善($P>0.05$)。模型组淋巴结上清液中 IFN- γ 较假手术组显著降低,IL-4 则较假手术组显著升高(P 均 <0.01);UTI 组 IFN- γ 、IL-4 与模型组相比差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

2.4 小肠腔内压力和黏膜微循环结果(表 4):模型组小肠收缩振幅明显抑制,收缩频率明显减小,UTI 治疗后可显著改善小肠的收缩振幅和频率($P<0.05$)

或 $P < 0.01$ 。模型组小肠黏膜血流量较假手术组显著减少 ($P < 0.01$)；UTI 则可以明显改善小肠黏膜局部的血流量 ($P < 0.01$)。

2.5 肥大细胞的变化(表 5)：模型组脱颗粒肥大细胞数较假手术组显著增多 ($P < 0.01$)；UTI 组较模型组显著减少 ($P < 0.05$)。模型组肠腔内 RMCP I 浓度较假手术组显著增高 ($P < 0.01$)；UTI 组较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

2.6 炎症介质水平(表 5)：模型组小肠组织 MPO 较假手术组显著升高；UTI 组 MPO 较模型组显著降低 (P 均 < 0.01)。模型组血清及小肠组织 NO 浓度均较假手术组显著升高；UTI 可显著降低血清及小肠组织中 NO 浓度 (P 均 < 0.01)。假手术组未检测到 iNOS mRNA 表达，模型组 iNOS mRNA 表达较假手术组显著升高；UTI 治疗后可改善这种升高 (P 均 < 0.01)。

3 讨论

UTI 是一种典型的 Kunitz 型蛋白酶抑制剂，具有两个活性功能区，两个功能区不完全重叠且有多种酶的结合位点，故 UTI 有很广的抑酶谱，能够同时抑制胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶、粒细胞弹性蛋白酶、纤溶酶、羧基肽酶、硫基酶等多种酶活性^[4-5]。Ogawa 等^[4]及 Gando 和 Tedo^[5]在体外实验中发现，UTI 可以抑制中性粒细胞弹性蛋白酶的活性。Tani 等^[6]只是从心排血量、血压、乳酸和血糖这些临床指标来评价 UTI 对脓毒症患者的保护作用。另有研究表明，UTI 预处理可明显改善大鼠缺血/再灌注后心功能的下降，其机制主要通过降低线粒体膜受损程度，恢复线粒体产能作用^[7]。Inoue 等^[8]研究发现，腹腔注射脂多糖(LPS)制备脓毒症小鼠模型后，UTI 基因剔除小鼠肺部单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、肾脏 MCP-1 和角质化细胞化学引诱物(KC)、肝脏内巨噬细胞炎性蛋白 2(MIP-2)、IL-1 β 均较野生型小鼠升高，提示 UTI 能够降低致炎因子的生成，保护全身炎症反应综合征(SIRS)所引起的后续损伤脏器。

在本实验中，CLP 模型模拟临床急性肠穿孔和腹膜炎的发病过程，能很好地反映脓毒症的病理生理变化。UTI 可改善小肠的物理屏障，包括对小肠组织光学下结构和超微结构的保护，还可改

善小肠的运动和黏膜微循环；UTI 同样可抑制脓毒症肠组织中 iNOS、NO 和 MPO 的表达。Sato 等^[9]发现，UTI 对术后患者具有改善免疫抑制的作用。肠黏膜肥大细胞存在于肠道黏膜固有层，维持着肠道生理功能的正常发挥。最近，肥大细胞被认为可以调节多种器官的功能，特别是肠道功能，肥大细胞的异常活化会损害肠道屏障功能。实验证实，不仅是感染，而且慢性或急性应激反应、炎症和乙醇干预都可通过肥大细胞使胃肠道黏膜通透性升高^[10-11]。肠道肥大细胞与肠上皮细胞和神经末梢密切接触，调节着肠道的屏障功能。

在内毒素血症动物模型中发现，结肠黏膜细胞间的通透性和细菌移位增加是通过肥大细胞脱颗粒和释放到结肠肠腔中的 RMCP I 机制发生作用的^[12]。这些酶通过活化存在于上皮细胞顶端的蛋白水解酶受体 2(PAR-2)来增加肠道的通透性。有研究表明，PAR-2 在肠道细胞上高表达，并且表达在这些细胞的基底外侧膜和顶膜上^[13]。RMCP I 是大鼠黏膜肥大细胞所特有的丝氨酸蛋白酶，在肥大细胞活化时被大量释放入肠腔中^[9-11]。在本组实验中我们发现，肥大细胞活化后，小肠肠腔中 RMCP I 水平升高，这种升高对于肠道屏障功能的病理生理改变及介导小肠铁转运和通透性改变起到很大作用；UTI 组脱颗粒肥大细胞数量减少，小肠腔中 RMCP I 水平降低；同时还发现，小肠紧密连接的改变和细菌移位的发生与 RMCP I 水平的升高有关，但并未发现 UTI 对小肠免疫屏障的保护作用，却发现了 UTI 可通过抑制肠道肥大细胞的活化发挥其保护小肠的作用机制，所以推测 UTI 可能通过抑制脓毒症中肥大细胞的活化来保护小肠结构和功能的完整。

参考文献

[1] 翁伟建, 李晓峰, 姜海萍, 等. 大黄和乌司他丁联用治疗胸腹部创伤后急性肺损伤的临床研究. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 272-275.

[2] 徐盈斌, 祁少海, 谢学临, 等. 乌司他丁对严重烧伤患者的脏器保护作用. 中国危重病急救医学, 2006, 18(1): 39-41.

[3] Ozkan KU, Ozokutan BH, Inanc F, et al. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental

necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg, 2005, 40(3): 484-488.

[4] Ogawa M, Nishibe S, Mori T, et al. Effect of human urinary trypsin inhibitor on granulocyte elastase activity. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1987, 55(2): 271-274.

[5] Gando S, Tedo I. Increase neutrophil elastase release in patients with cardiopulmonary arrest, role of elastase inhibitor. Intensive Care Med, 1995, 21(8): 636-640.

[6] Tani T, Aoki H, Yoshioka T, et al. Treatment of septic shock with a protease inhibitor in a canine model; a prospective, randomized, controlled trial. Crit Care Med, 1993, 21(6): 925-930.

[7] Masuda T, Sato K, Noda C, et al. Protective effect of urinary trypsin inhibitor on myocardial mitochondria during hemorrhagic shock and reperfusion. Crit Care Med, 2003, 31(7): 1987-1992.

[8] Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide. Mol Pharmacol, 2005, 67(3): 673-680.

[9] Sato N, Endo S, Kimura Y, et al. Influence of a human protease inhibitor on surgical stress induced immunosuppression. Dig Surg, 2002, 19(4): 300-305.

[10] Ashkan F, Ali K, Louis D, et al. Heightened responses to stressors in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol, 2005, 100(8): 1796-1804.

[11] Santos J, Benjamin M, Yang PC, et al. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function; role of mast cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 278(6): G847-G854.

[12] Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, et al. Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. Shock, 2007, 28(1): 118-124.

[13] Jacob C, Yang PC, Darmoul D, et al. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine; role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. J Biol Chem, 2005, 280(36): 31936-31948.

(收稿日期: 2009-07-01)
(本文编辑: 李银平)