

乌司他丁对百草枯中毒大鼠肺纤维化的影响及其机制研究

孙明莉 李海峰 袁媛 刘晓亮

【关键词】 乌司他丁； 中毒，百草枯； 肺纤维化； 转化生长因子-β1； 免疫组化

百草枯是一种速效触杀型除草剂，百草枯中毒病死率高，预后极差。肺为百草枯中毒的主要靶器官，百草枯吸收后肺中含量甚高，许多患者早期死于急性肺损伤(ALI)所致的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)，晚期死于肺间质纤维化所致的呼吸衰竭，但中毒机制目前尚未完全阐明，缺乏有效的治疗手段。乌司他丁(UTI)是一种蛋白酶抑制剂，具有防御组织破坏、抑制炎症介质释放、稳定细胞膜的作用^[1]。本课题组在临床上曾尝试应用UTI治疗百草枯中毒患者，初步显示有较好的疗效，但对其作用机制尚不清楚。本研究中从细胞因子角度出发，观察UTI对百草枯中毒大鼠的肺纤维化是否具有保护作用。

1 材料与方

1.1 实验动物、药品及主要试剂：清洁级纯系SD大鼠，雌雄各半，体重180~210g，由吉林大学动物实验中心提供，动物合格证号：SCXK(吉)2007-0003。UTI注射液为广东天普生化医药股份有限公司产品。兔抗人、鼠转化生长因子-β1(TGF-β1)多克隆抗体、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒和即用型链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 动物分组及模型建立：按随机数字表法将60只大鼠均分为3组。对照组：用1ml生理盐水灌胃；模型组：百草枯液40mg/kg(稀释至1ml)一次性灌胃染毒，制作中毒模型，每日一次性腹腔注射等量生理盐水；UTI治疗组：百草枯灌胃染毒后腹腔注射UTI 20kU/kg，每日2次。各组分别于7、14、21、28d处死

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2011.03.019

基金项目：吉林省科技发展计划项目(200705172)

作者单位：130031 长春，吉林大学第一医院二部急救医学科

通信作者：刘晓亮，Email: xiaoliangliu2005@163.com

表1 各组百草枯中毒大鼠28d肺炎及肺纤维化程度分级结果比较

组别	动物数	肺炎(只)				R值	肺纤维化(只)				R值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
对照组	30	30	0	0	0	0.000	30	0	0	0	0.000
模型组	24	0	19	5	0	0.508 ^a	0	7	8	9	0.516 ^a
UTI组	28	20	6	2	0	0.163 ^b	8	19	1	0	0.089 ^b

注：UTI：乌司他丁；与对照组比较，^aP<0.05；与模型组比较，^bP<0.05

5只大鼠，取右肺用10%中性甲醛溶液固定，制备石蜡切片备检。

1.3 肺组织形态学观察：观察动物一般情况，如体重、饮食、毛发、活动状况等。实验结束时腹主动脉取血，处死动物取肺脏，肉眼观察肺部病变情况。光镜下观察28d时苏木素-伊红(HE)染色的病理改变。参照文献^[1]将肺炎或肺纤维化程度分级：①无肺炎或无纤维化(-)；②轻度肺炎或纤维化(+)，受累面积<20%；③中度肺炎或纤维化(++)，受累面积20%~50%；④重度肺炎或纤维化(+++)，受累面积>50%。

1.4 免疫组化法测定TGF-β1表达：免疫组化应用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP法)。计算每张切片阳性细胞染色程度，以细胞质中呈清晰棕黄色为阳性细胞。用图像分析系统采集预计计数视野图片。高倍镜(×400)下随机取5个不重叠视野观察，40倍物镜下测定标准测量光栏中阳性区域百分比、平均灰度值和积分吸光度(A)值。灰度值表示图像透光率，与免疫组化阳性染色程度呈负相关(灰度值越大则阳性表达越弱)；A值与免疫组化染色程度呈正相关。

1.5 统计学处理：用SPSS 13.0统计软件，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用单因素方差分析，组间差异用q检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况：对照组大鼠皮毛光滑润泽，身体健康，饮食、活动、体重增长正常，至实验结束时无动物死亡。模型组大鼠皮毛干枯，精神不振，反应迟钝，身体消瘦，进食、排便、活动均减少，喘鸣明显，呼吸急促，死亡6只，体重较制模前

略有增长，个别体重下降。UTI组大鼠皮毛尚可，精神不振，饮食、活动、体重较制模前略有增长，死亡2只。

2.2 肺组织形态学观察：大体观察，对照组肺无明显异常，呈粉红色，表面光滑。模型组两肺呈暗红色，部分肺叶呈灰白色，弹性明显降低，可见散在大小不等的点片状灰白色斑块，大部分动物肺脏体积缩小，硬度增加；7d时可见肺脏明显肿胀，颜色晦暗，散在点片状瘀斑、出血点；14d时肺脏呈灰白色，肿胀基本消退，有斑点或斑片状实变灶形成；21d、28d双肺苍白，肺弹性差、硬度增加。UTI组两肺外观病变更好于模型组，颜色略暗红，肿胀减轻，21d、28d双肺略苍白，肺弹性、硬度较模型组增加。

2.3 肺组织病理观察(彩色插页图1)：28d HE染色显示，对照组肺组织形态正常，肺泡隔较薄，由肺泡上皮和肺泡壁毛细血管构成；模型组炎症较21d减轻，肺泡隔增厚；UTI组炎症更为减轻，肺泡形态良好。

2.4 肺组织纤维化程度(表1)：光镜下观察，模型组28d肺泡大量萎陷、破坏，大量胶原沉积在新生的毛细血管周围，肺纤维化程度要远远高于对照组和UTI组(均P<0.05)。

2.5 肺组织TGF-β1的分布及表达(彩色插页图2；表2)：镜下观察，TGF-β1蛋白阳性表达呈棕黄色细颗粒状或丝网状。对照组肺泡巨噬细胞、肺间质纤维组织、血管内皮及平滑肌细胞可见少许TGF-β1阳性表达。模型组以上部位TGF-β1蛋白表达明显增多，在支气管上皮细胞也出现明显的棕黄色反应产物，阳性面积百分比及A值均高于对照组，灰度值低于对照组(均P<0.05)；

表 2 各组百草枯中毒大鼠 28 d 肺组织中细胞因子 TGF-β1 表达比较(̄x±s)

组别	动物数	阳性面积百分比(%)	A 值	灰度值
对照组	30	36.05± 6.89	72.36±32.11	151.24±15.86
模型组	24	69.98±11.16 ^a	152.04±38.16 ^a	91.03± 8.56 ^a
UTI 组	28	50.17±10.28 ^{ab}	119.45±23.16 ^{ab}	126.09±13.21 ^{ab}

注: TGF-β1, 转化生长因子-β1; UTI, 乌司他丁; 与对照组比较, ^aP<0.05; 与模型组比较, ^bP<0.05

7 d、14 d 可见水肿, 炎症较重, 肺泡隔上皮、血管、支气管上皮均为强阳性表达; 21 d、28 d 炎症逐渐减轻, 肺泡隔增厚略有恢复, 但肺泡隔上皮、血管、支气管上皮仍为强阳性表达。UTI 组 TGF-β1 蛋白阳性表达较对照组和模型组明显减少, 阳性面积百分比与 A 值亦均低于模型组, 灰度值高于模型组(均 P<0.05); 7 d 可见水肿和炎症, 肺泡隔上皮、支气管上皮均为阳性表达; 14、21、28 d 水肿和炎症减轻, 肺泡隔上皮表达为阳性, 但弱于模型组。

3 讨论

百草枯吸入血后约有 50% 集中分布于肺组织, 故百草枯中毒以肺损伤表现最为突出, 为弥漫性肺泡损伤。在 ALI 早期, 纤维增生过程就已开始, 构成了炎症反应和修复过程同时存在的不均一性特征^[2]。I 型肺泡上皮细胞和气管的 Clara 细胞能主动摄取百草枯而大量累积。此外, 百草枯可大量消耗还原型辅酶 I (NADPH), 使肺内许多需 NADPH 参与的生化反应无法进行^[3-4]。

UTI 为广谱蛋白水解酶抑制剂, 有稳定溶酶体膜、抑制炎症介质过度释放及清除氧自由基等功能^[5]。研究表明, UTI 抑制 ALI 时炎性细胞释放肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-8(IL-8) 等炎症介质^[6-7], 并能提升肺泡巨噬细胞、T 细胞合成、分泌 IL-10^[8-9], 从而起到保护和治疗 ALI 的作用。

TGF-β 是关键的致纤维化细胞因子之一, 是纤维化形成与发展的启动枢纽^[10]。在 TGF-β 家族中参与纤维化的主要是 TGF-β1。TGF-β1 一方面上调基质成分基因的转录、翻译等, 如加强胶原和纤维黏连蛋白的合成, 促进细胞外基质

(ECM) 的沉积; 另一方面通过减少基质降解蛋白酶的合成和分泌, 使得胶原蛋白持续沉积, 形成组织器官纤维化^[11]。本实验结果表明, 在 TGF-β1 免疫组化染色中, 模型组呈强阳性反应, 灰度值明显低于对照组, 提示百草枯中毒后肺组织 TGF-β1 大量表达, 存在明显的肺纤维化。说明百草枯的毒性作用可刺激肺组织中 TGF-β1 的产生, 从而引起各种 ECM 成分的合成和沉积。UTI 组肺组织炎症及纤维化程度明显降低, TGF-β1 A 值明显低于模型组, 说明 UTI 能抑制肺组织 TGF-β1 的表达, 这可能是 UTI 缓解百草枯中毒所致肺纤维化的重要作用机制之一。

在本实验中, 光镜下观察 28 d 模型组肺纤维化程度要远远高于对照组和 UTI 组, 大量肺泡结构萎陷、破坏, 大量胶原沉积在新生的毛细血管周围。UTI 对百草枯中毒后肺的保护机制可能为: ①抑制过度的炎症反应, 对单核/巨噬细胞、中性粒细胞过度释放的炎症介质有抑制作用^[12], 从而抑制 TGF-β1 过度释放, 抑制肺纤维化; ②有效抑制弹性蛋白酶释放, 清除百草枯中毒后释放的自由基^[8]; ③UTI 分子中具有与细胞膜受体识别和结合的位点, 加上第 10 位丝氨酸上带负电荷的硫酸软骨素糖链, 可稳定细胞膜和溶酶体膜的生理功能^[13], 从而保护细胞膜及毛细血管内皮细胞。

综上, UTI 可能通过阻断炎症细胞因子与氧自由基间的恶性循环, 减少炎性细胞黏附、聚集, 减轻内皮细胞损伤, 改善微循环, 抑制多种蛋白酶活性来发挥对百草枯中毒大鼠肺组织的保护作用。

参考文献

[1] 景炳文. 乌司他丁在急危重症临床应用

的进展. 中国危重病急救医学, 2006, 18:117-120.

[2] 孔庆福, 张华, 王丽, 等. 急性百草枯中毒早期器官损害与细胞因子的变化. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17:159-162.

[3] 王英, 邱泽武, 彭瑞云, 等. 血必净注射液联合地塞米松防治大鼠百草枯中毒慢性肺损伤的作用研究. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15:282-285.

[4] 于淼森, 吴伟, 姜黄素与地塞米松对百草枯中毒大鼠肺组织损伤治疗作用的对比研究. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16:299-301.

[5] 赵晓琴, 吴英林, 邝晓璐. 乌司他丁对大鼠急性肺损伤保护作用的实验研究. 中国危重病急救医学, 2008, 20:369-370.

[6] 陈安宝, 梁道明, 袁勇, 等. 乌司他丁对急性百草枯中毒大鼠炎症因子的影响. 中国危重病急救医学, 2009, 21:371-372.

[7] 李秀江, 藏秀贤, 杜玉君, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征大鼠肺脏的保护作用. 中国危重病急救医学, 2006, 18:646.

[8] Ito K, Mizutani A, Kira S, et al. Effect of Ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes. *Injury*, 2005, 36:387-394.

[9] 邵义明, 张良清, 邓烈华, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征的治疗作用. 中国危重病急救医学, 2005, 17:228-230.

[10] 胡晓骅, 张会英, 葛艳玲, 等. 乌司他丁对严重烧伤后多脏器功能的保护作用. 中华医学杂志, 2005, 85:2889-2894.

[11] Tsujino T, Komatsu Y, Isayama H, et al. Ulinastatin for pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a randomized, controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005, 3:376-383.

[12] Barrueto F, Lee C, Pajoumand M, et al. Use of sirolimus in a case of severe paraquat poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*, 2008, 46:778-779.

[13] Yeh ST, Guo HR, Su YS, et al. Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells. *Toxicology*, 2006, 223:181-190.

(收稿日期: 2010-10-15)

(本文编辑: 李银平)

《中国中西医结合急救杂志》入编《中文核心期刊要目总览》

排在《中文核心期刊要目总览》2008 年版(第 5 版)之中国医学类第 19 位

感染性休克犬血管内皮细胞生长因子与缺氧程度的相关性研究

(正文见 185 页)

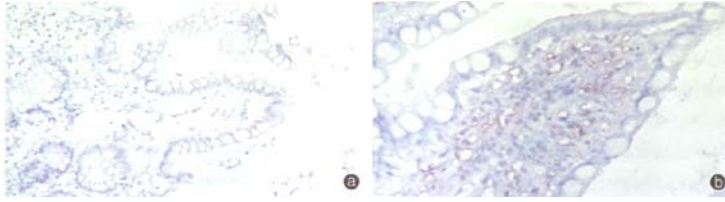


图1 光镜下观察感染性休克犬休克前后回肠组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达 休克前(a)正常回肠组织 VEGF 表达极少, 休克后(b) VEGF 的表达增多, 在核周胞质及细胞间质有特异性片状或颗粒状棕黄色着色 免疫组化 $\times 600$

乌司他丁对百草枯中毒大鼠肺纤维化的影响及其机制研究

(正文见 187 页)

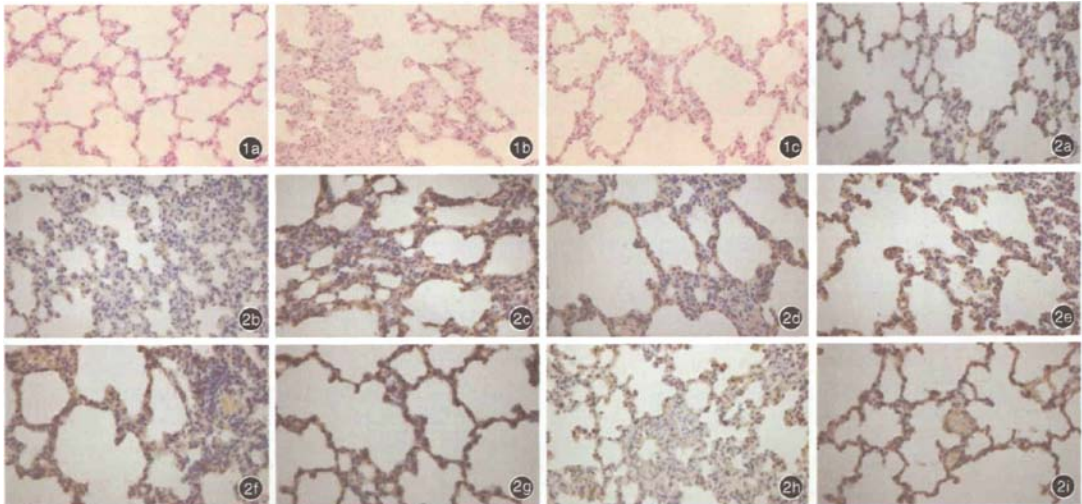


图1 光镜下观察各组百草枯中毒大鼠术后 28 d 肺组织病理改变 对照组(a)肺组织形态正常, 肺泡隔较薄, 由肺泡上皮和肺泡壁毛细血管构成, 未见纤维化; 模型组(b)肺组织有炎细胞浸润, 肺泡隔增厚相互融合; 乌司他丁组(c)肺组织有少量炎细胞浸润, 肺泡形态良好 HE $\times 20$ 图2 光镜下观察各组百草枯中毒大鼠术后不同时间点肺组织转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的分布及表达 TGF- $\beta 1$ 蛋白阳性表达呈棕黄色细颗粒状, 或呈棕黄色丝网状; 对照组(a)21 d 肺组织单核/巨噬细胞、肺间质结缔组织、血管内皮及平滑肌细胞可见少许 TGF- $\beta 1$ 蛋白阳性表达, 肺泡上皮及血管、支气管上皮 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达均为阴性。模型组 7 d (b) 肺组织水肿、炎症较重, 肺泡隔上皮、血管、支气管上皮 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达呈强阳性; 14 d (c) 肺组织水肿、炎症仍较重, 但较 7 d 时有所减轻, 肺泡隔上皮、血管、支气管上皮 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达均为强阳性; 21 d (d)、28 d (e) 肺组织炎症逐渐减轻, 肺泡隔增厚较前恢复, 肺泡隔上皮、血管、支气管上皮 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达均为强阳性; 乌司他丁组 7 d (f) 肺组织水肿、炎症较重, 肺泡隔上皮、支气管上皮 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达均为阳性; 14 d (g)、21 d (h)、28 d (i) 肺组织水肿、炎症减轻, 肺泡隔上皮 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达为阳性, 但弱于模型组 免疫组化 $\times 10$

叔丁基对苯二酚对早期糖尿病小鼠肾脏氧化应激损伤影响的实验研究

(正文见 191 页)

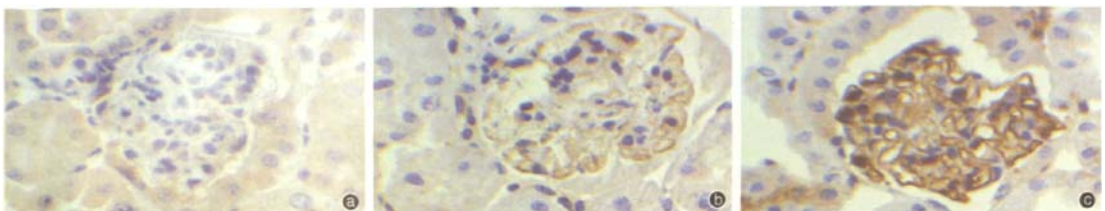


图2 光镜下观察各组小鼠肾小球 NF-E2 相关因子(Nrf2)的蛋白表达 Nrf2 蛋白的阳性表达定位于肾小球固有细胞的胞质和胞核, 呈棕黄色颗粒, 对照组(a)肾小球细胞胞质及胞核内可见少量 Nrf2 基础表达; 模型组(b)胞质及胞核内 Nrf2 蛋白表达较对照组(a)明显增强; 叔丁基对苯二酚(tBHQ)组(c) Nrf2 蛋白表达较模型组(b)明显增强 免疫组化 $\times 400$

作者: 孙明莉, 李海峰, 袁媛, 刘晓亮
作者单位: 吉林大学第一医院二部急救医学科, 长春, 130031
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2011, 23 (3)

参考文献(13条)

1. 景炳文. [乌司他丁在急危重症临床应用的进展](#) 2006(2)
2. 孔庆福, 张华, 王丽, 高荣惠, 戚雯雯, 菅向东. [急性百草枯中毒早期器官损害与细胞因子的变化](#) 2010(3)
3. 王英, 邱泽武, 彭瑞云, 高亚兵, 王水明, 李扬. [血必净注射液联合地塞米松防治大鼠百草枯中毒慢性肺损伤的作用研究](#) 2008(5)
4. 于淼淼, 吴伟, 姜黄素与地塞米松对百草枯中毒大鼠肺组织损伤治疗作用的对比研究 2009(5)
5. 赵晓琴, 吴英林, 邝晓聪. [乌司他丁对大鼠急性肺损伤保护作用的实验研究](#) 2008(6)
6. 陈安宝, 梁道明, 袁勇, 王刚, 胡强, 赵群远, 杨春燕, 陈嘉勇. [乌司他丁对急性百草枯中毒大鼠炎症因子的影响](#) 2009(6)
7. 李秀江, 藏秀贤, 杜玉君, 董均树. [乌司他丁对全身炎症反应综合征大鼠肺脏的保护作用](#) 2006(11)
8. Ito K, Mizutani A, Kira S. [Effect of Ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes](#) 2005
9. 邵义明, 张良清, 邓烈华, 姚华国. [乌司他丁对全身炎症反应综合征的治疗作用](#) 2005(4)
10. 胡晓骅, 张会英, 葛艳玲, 陈忠, 覃凤均, 蒋海燕, 陈大福, 孙永华. [乌司他丁对严重烧伤后多脏器功能的保护作用](#) 2005(41)
11. Tsujino T, Komatsu Y, Isayama H. [Ulinastatin for pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a randomized, controlled trial](#) 2005
12. Barrueto F, Lee C, Pajoumand M. [Use of sirolimus in a case of severe paraquat poisoning](#) 2008
13. Yeh ST, Guo HR, Su YS. [Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells](#) 2006

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyx201103019.aspx