

· 基础研究 ·

# 乌司他丁联合甲基泼尼松龙对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用

郭亮<sup>1</sup>, 唐忠志<sup>1</sup>, 程青<sup>1</sup>, 邬明<sup>1</sup>, 曾匙枚<sup>1</sup>, 韩璇<sup>1</sup>, 杨李<sup>2</sup>  
(广州军区武汉总医院: 1. 急诊科; 2. 医学实验科, 湖北武汉 430070)

**摘要:**目的 探讨乌司他丁联合甲基泼尼松龙对大鼠肺缺血再灌注损伤时血清水通道蛋白-1(AQP 1)及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的影响。方法 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组( $n=8$ ):正常对照组、模型对照组、甲基泼尼松龙组(30 mg/kg)、乌司他丁组(50 000 U/kg)及联合治疗组[甲基泼尼松龙(30 mg/kg)联合乌司他丁(50 000 U/kg)]。采用 ELISA 法检测血清 AQP 1 和 TNF- $\alpha$  水平;考马斯亮蓝法检测肺泡灌洗液中蛋白质含量;检测肺湿/干质量并对肺进行形态学观察。结果 与模型对照组相比,乌司他丁组或甲基泼尼松龙组血清 AQP 1 质量浓度明显增加,而 TNF- $\alpha$  质量浓度明显降低,联合治疗组血清 AQP 1 与 TNF- $\alpha$  的改变更为明显( $P<0.01$ );乌司他丁组、甲基泼尼松龙组及联合治疗组的肺泡灌洗液中蛋白质含量及肺组织湿/干质量比值均明显降低( $P<0.01$ )。结论 乌司他丁联合甲基泼尼松龙对大鼠缺血再灌注急性肺损伤具有良好的治疗作用,其机制可能与提高血清 AQP 1 水平及降低 TNF- $\alpha$  水平有关。

**关键词:**再灌注损伤,肺;乌司他丁;甲基泼尼松龙;水通道蛋白;肿瘤坏死因子 $\alpha$

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.16.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)16-1616-03

## Protective effects of ulinastatin combined with methylprednisolone on pulmonary ischemia reperfusion injury in rats

Guo Liang<sup>1</sup>, Tang Zhongzhi<sup>1</sup>, Chen Qing<sup>1</sup>, Wu Ming<sup>1</sup>, Zeng Xianmei<sup>1</sup>, Han Xuan<sup>1</sup>, Yang Li<sup>2</sup>

(1. Department of Emergency; 2. Department of Medical Laboratory, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract: Objective** To explore the influence of ulinastatin combined with methylprednisolone on aquaporin 1 (AQP 1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in serum when ischemia reperfusion injury occurred in rats. **Methods** 40 Wistar rats were randomly divided into 5 groups ( $n=8$ ): normal control group, model control group, methylprednisolone group (30 mg/kg), ulinastatin group (50 000 U/kg) and combination group [ulinastatin (50 000 U/kg) combined with methylprednisolone (30 mg/kg)]. Levels of AQP 1 and TNF- $\alpha$  in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Protein contents in bronchoalveolar lavage fluid were assayed by Commassie blue staining; Wet and dry mass were measured by scale and pulmonary morphological changes were observed by optical microscope. **Results** Compared with model control group, serum concentration of AQP 1 was significantly increased and that of TNF- $\alpha$  decreased in ulinastatin group and methylprednisolone group, especially in combination group ( $P<0.01$ ); Protein contents in bronchoalveolar lavage fluid and wet/dry mass ratios were both markedly reduced in ulinastatin, methylprednisolone and combination groups ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Ulinastatin combined with methylprednisolone administration has better therapeutic effects on acute lung injury caused by ischemia reperfusion in rats, which mechanism probably correlated with increasing level of serum AQP 1 and decreasing that of TNF- $\alpha$ .

**Key words:** reperfusion injury, pulmonary; ulinastatin; methylprednisolone; aquaporin 1; tumor necrosis factor-alpha

肺缺血再灌注损伤是指肺移植、体外循环手术及创伤等导致机体大量失血,造成肺缺血,在重新灌注后,肺缺血引起的肺损伤不但没有减轻,反而加重的现象。临床上主要表现为肺水肿及急性呼吸衰竭。水通道蛋白(aquaporin, AQP)具有增加细胞膜对水的通透功能,提供快速液体转运途径。肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是缺血再灌注肺损伤时最早释放的介质,它不仅能介导内毒素的多种生物学作用,还诱导白介素(interleukin, IL)-6、IL-8等细胞因子的瀑布样释放。乌司他丁具有抑制多种炎症介质和蛋白酶释放的作用,甲基泼尼松龙作为抗炎药广泛用于临床,二者联用在急性肺损伤中是否具有协同抗炎作用,目前尚不清楚。本研究旨在探讨缺血再灌注诱导的急性肺损伤中,乌司他丁联合甲基泼尼松龙的保护作用。

### 1 材料与方

**1.1 主要试剂** 注射用乌司他丁为广东天普生化医药股份有限公司产品(批号:H19990134),甲基泼尼松龙由法玛西亚善强公司(比利时)生产(批号:H20060054),APQ 1 和 TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附测试(enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA)试剂盒购自 R&D 公司(美国)。

**1.2 动物分组与模型建立** 选择成年雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量 200~250 g,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物合格证号:SCXK(鄂)2008-0005。将 Wistar 大鼠随机分为 5 组:正常对照组、模型对照组、乌司他丁组、甲基泼尼松龙组及联合治疗组(乌司他丁联合甲基泼尼松龙),每组 8 只。正常对照组为假手术组,其余各组采用以下方法建立大鼠肺缺血再灌注模型:骨钳致鼠一侧股骨中下 1/3 粉碎性骨折,经股动脉放血(持续约 10 min)使平均动脉压降至(40±5)mm Hg,并维持 90 min,经大鼠颈静脉回输全部失血与等量复方氯化钠复苏,复苏 30 min 后给予复方乳酸钠 2.5 mL·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>持续泵注。药物治疗均通过颈静脉注射给药,乌司他丁组给予乌司他丁 50 000 U/kg,甲基泼尼松龙组给予甲基泼尼松龙 30 mg/kg,联合治疗组给予乌司他丁 50 000 U/kg 及甲基泼尼松龙 30 mg/kg;模型对照组不注射药物。

**1.3 血清 AQP 1 及 TNF- $\alpha$  水平的检测** 在放血前,再灌注 2、4 h 时分别采集大鼠静脉血 1 mL,严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 AQP 1 和 TNF- $\alpha$  水平。

**1.4 肺泡灌洗液蛋白质含量的检测及肺湿/干质量 (wet/dry mass, W/D) 比值的计算** 再灌注 4 h 后颈动脉处死大鼠, 取肺组织, 用 1 mL 生理盐水灌洗肺泡, 收集肺泡灌洗液, 采用考马斯亮蓝法检测肺泡灌洗液中蛋白质含量。用滤纸吸去右肺上叶血液, 天平称量肺叶的湿质量, 然后, 置烤箱中 (80 °C, 20 h) 烤至恒质量, 称量干质量, 计算肺 W/D 比值。

**1.5 形态学观察** 肉眼观察肺大体改变, 然后, 取右肺下叶用 10% (体积分数) 甲醛固定, 石蜡包埋、切片、苏木素伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 光镜下观察。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS15.0 统计软件进行统计分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间采用方差齐性检验, 两两比较采用独立样本 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组大鼠血清 AQP 1 和 TNF- $\alpha$  水平的比较** 与模型对照组对比, 乌司他丁组、甲基泼尼松龙组及联合治疗组血清 TNF- $\alpha$  的质量浓度明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 联合治疗组 TNF- $\alpha$  的质量浓度降低更明显, 与乌司他丁组及甲基泼尼松龙组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与模型对照组比较, 乌司他丁组、甲基泼尼松龙组及联合治疗组血清 AQP 1 的质量浓度明显增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 联合治疗组 AQP 1 的质量浓度增加更明显, 与乌司他丁组及甲基泼尼松龙组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1、2。

**表 1 各组大鼠放血前及再灌注 2、4 h 血清 AQP 1 的质量浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L,  $n = 8$ )**

组别	放血前	再灌注 2 h	再灌注 4 h
正常对照组	14.53 ± 2.36	15.33 ± 1.24	16.54 ± 2.27
模型对照组	4.43 ± 0.93*	5.52 ± 0.66*	5.71 ± 0.31*
乌司他丁组	6.57 ± 0.34 $\Delta$ ‡	8.29 ± 0.83 $\Delta$ ‡	9.88 ± 0.77 $\Delta$ ‡
甲基泼尼松龙组	7.22 ± 10.24 $\Delta$ ‡	8.53 ± 14.83 $\Delta$ ‡	9.22 ± 0.59 $\Delta$ ‡
联合治疗组	7.57 ± 1.01 $\Delta$	10.53 ± 0.96 $\Delta$	12.36 ± 1.12 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与同时时间点模型对照组比较; ‡:  $P < 0.01$ , 与同时时间点联合治疗组比较。

**表 2 各组大鼠放血前及再灌注 2、4 h 血清 TNF- $\alpha$  的质量浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L,  $n = 8$ )**

组别	放血前	再灌注 2 h	再灌注 4 h
正常对照组	47.33 ± 5.36	55.29 ± 6.24	63.39 ± 8.27
模型对照组	44.93 ± 6.93*	122.15 ± 10.16*	159.71 ± 12.79*
乌司他丁组	52.79 ± 10.10 $\Delta$ ‡	108.13 ± 11.27 $\Delta$ ‡	139.22 ± 12.46 $\Delta$ ‡
甲基泼尼松龙组	53.53 ± 9.38 $\Delta$ ‡	106.53 ± 14.83 $\Delta$ ‡	142.22 ± 10.33 $\Delta$ ‡
联合治疗组	51.15 ± 9.79 $\Delta$	100.53 ± 7.34 $\Delta$	130.22 ± 11.34 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与同时时间点模型对照组比较; ‡:  $P < 0.01$ , 与同时时间点联合治疗组比较。

**2.2 各组大鼠肺泡灌洗液中蛋白质含量和肺 W/D 比值的比较** 模型对照组肺泡灌洗液中蛋白质含量和肺 W/D 比值显著高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 与模型对照组比较, 乌司他丁组或甲基泼尼松龙组的肺泡灌洗液蛋白质含量与肺 W/D 比值显著降低 ( $P < 0.01$ ), 联合治疗组降低更为显著 ( $P < 0.01$ ), 接近正常对照组水平 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

**2.3 大鼠肺形态学的变化**

**2.3.1 大体改变** 正常对照组大鼠双侧肺叶色泽、形态正常, 表面无出血点, 胸腔内无渗出液; 模型对照组大鼠可见双侧肺

叶充血水肿, 色泽呈暗红色, 表面可见紫红色斑块, 且胸腔内渗出液呈淡红色; 乌司他丁组或甲基泼尼松龙组大鼠双侧肺叶轻度充血, 表面呈淡粉红色, 局部肺叶表面可见暗红色出血点, 肺叶弹性良好, 胸腔内可见少量淡黄色稀薄渗出液; 联合治疗组大鼠较上述改变更轻微。

**表 3 各组大鼠肺泡灌洗液蛋白质含量及肺 W/D 比值比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )**

组别	肺泡灌洗液蛋白质含量 (g/L)	肺 W/D 比值
正常对照组	92.23 ± 7.44	4.37 ± 0.18
模型对照组	233.84 ± 13.21*	6.92 ± 0.39*
乌司他丁组	127.81 ± 19.82 $\Delta$	4.19 ± 0.73 $\Delta$
甲基泼尼松龙组	121.41 ± 15.38 $\Delta$	4.26 ± 0.14 $\Delta$
联合治疗组	102.33 ± 18.69 $\Delta$	3.83 ± 0.47 $\Delta$

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.01$ , 与模型对照组比较。

**2.3.2 病理改变** 正常对照组大鼠肺组织未发现病理改变; 模型对照组大鼠可见明显肺水肿, 渗出液多, 腔内可见红细胞、毛细血管扩张、淤血, 炎症细胞浸润; 乌司他丁组或甲基泼尼松龙组大鼠肺泡壁毛细血管扩张、淤血程度较模型对照组轻, 部分肺间质及肺泡水肿, 肺泡腔内渗出物明显减少, 少量炎症细胞浸润。联合治疗组大鼠改变更轻微。

**3 讨 论**

在肺移植、人工心肺转流术、肺动脉栓塞栓子摘除术以及机体大量失血等可导致肺缺血及再灌注损伤, 其基本病理改变为肺毛细血管通透性增加, 继发肺水肿, 使肺血管阻力增加和气体交换障碍, 一旦处理不当, 可导致急性肺损伤, 甚至多器官功能障碍综合征, 危及生命。失血性休克早期积极干预治疗, 避免严重并发症的发生是当前研究的重要课题。肺缺血再灌注损伤的机制与细胞因子及其信号转导有密切关系。急性失血时, 产生大量的细胞因子、活性氧及蛋白水解酶, 再灌注后这些因子与活性物质通过体循环到达肺血管床, 激活肺毛细血管内皮细胞及中性粒细胞等, 导致肺组织炎症<sup>[1]</sup>。TNF- $\alpha$  是缺血再灌注肺损伤时最早释放的介质之一, 除了直接毒性外, 还可激活损伤的粒细胞、内皮细胞及血小板等释放自由基与溶酶体酶等介质对组织产生更广泛的损害效应<sup>[2]</sup>; 大量实验表明, 在急性肺损伤的发生发展过程中, 肺组织局部产生大量促炎性细胞因子 (IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$  等), 它们之间形成复杂细胞因子网络, 互相激活, 互相作用, 使炎症反应级联放大, 导致急性肺损伤的发生<sup>[3-5]</sup>。因此, TNF- $\alpha$  能更好地反映急性肺损伤炎症反应强弱及观测治疗效果。

AQPs 是调节进出细胞膜的水通道同源蛋白质家族的总称, 它不仅参与生理状态下液体的转运, 还可能与病理状态下液体的转运失衡有关。在哺乳动物体内已被确认的 AQPs 有 11 种, 分布于肺组织中的有 6 种 (AQP 1、AQP 3、AQP 4、AQP 5、AQP 8 及 AQP 9)<sup>[6-8]</sup>。其中 AQP 1 位于肺毛细血管内皮细胞, 只负责转运水, 不允许其他溶质和分子通过。与野生型相比, AQP 1 敲除的小鼠肺泡-毛细血管间水的通透性是野生型的 1/10, AQP 1 促进肺内因渗透压改变引起的水的快速转运<sup>[9]</sup>。

大量研究已经证实糖皮质激素通过糖皮质类固醇激素受体对多种信号通路发挥作用, 早期小剂量应用甲基泼尼松龙可缩短患者的缺氧和休克持续时间, 并缩短机械通气时间<sup>[10]</sup>。同时短期应用甲基泼尼松龙可减少糖皮质激素引起的不良反应, 如避免诱发或加重感染、防止消化道出血等。乌司他丁是

从人尿液中提取精制的糖蛋白,属蛋白酶抑制剂,能够同时抑制胰蛋白酶、透明质酸酶、弹性蛋白酶等多种水解酶的活性<sup>[11-13]</sup>;另外,乌司他丁还能稳定溶酶体膜,防止溶酶体内的水解酶外溢。因此,乌司他丁能够抑制炎症介质的释放,减少嗜中性粒细胞向肺聚集,并抑制弹性蛋白酶对肺血管内皮细胞的细胞间结缔组织的破坏,从而降低肺血管通透性和炎症反应,抑制肺损伤,改善肺功能。

本研究结果显示,乌司他丁和甲基泼尼松龙都能明显降低血清 TNF- $\alpha$  水平,提高 AQP 1 水平,联合应用的效果较单用乌司他丁或甲基泼尼松龙作用更强,且能减少甲基泼尼松龙的剂量。结果提示甲基泼尼松龙和乌司他丁联合用药可抑制炎症介质的过度释放,改善微循环、组织灌注等,通过调控全身炎症反应/C-反应蛋白来维持细胞内外水平衡,以保护受损肺组织,但其具体作用机制还需要进一步研究<sup>[14-16]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Sobue K, Asai K, Katsuya H. Aquaporin water channels in the brain and molecular mechanisms of brain edema [J]. *Nippon Rinsho*, 2006, 64(6): 1181-1189.
- [2] Wu XM, Wang HY, Li GF, et al. Dobutamine enhances alveolar fluid clearance in a rat model of acute lung injury [J]. *Lung*, 2009, 187(4): 225-231.
- [3] 蒋媛,俞晨杰,沈晓辉,等. 伴或不伴变应性鼻炎的鼻息肉组织中水通道蛋白-5 的表达及意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22(18): 842-845.
- [4] 陆卫华,曾魁枚,许喜咏,等. 乌司他丁对家兔急性肺损伤保护的实验研究[J]. *重庆医学*, 2009, 38(15): 1918-1920.
- [5] 程青,唐忠志,陈忠庆,等. 舒氧康对急性肺损伤家兔肺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  mRNA 表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(11): 1880-1882.
- [6] Tomassoni D, Bramanti V, Amenta F. Expression of aquaporins 1 and 4 in the brain of spontaneously hypertensive rats[J]. *Brain Res*, 2010, 1325: 155-163.

- [7] Ceccarelli M, Bani D, Cinci L, et al. Anti-inflammatory effects of low molecular weight heparin derivative in a rat model of carrageenan-induced pleurisy [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2704-2712.
- [8] 郭亮,唐忠志,张端莲,等. 乌司他丁对急性肺损伤组织中水通道蛋白及 Fas 表达的研究[J]. *重庆医学*, 2009, 38(22): 2873-2875.
- [9] 宋志芳,郭晓红,王树云,等. 糖皮质激素在急性呼吸窘迫综合征综合救治中的价值探讨[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(6): 349-353.
- [10] Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats [J]. *Chin Med J*, 2002, 115(7): 963-967.
- [11] 欧书钦,马渝,文玉明,等. 乌司他丁治疗急性呼吸窘迫综合征临床研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(12): 1336-1337.
- [12] 李志海,高起学. 水通道蛋白-5 在人鼻息肉组织中的表达[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19(4): 162-164.
- [13] Jablonski EM, Webb AN, McConnell NA, et al. Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(4): 975-985.
- [14] Jayalakshmi TK, Shah S, Lobo I, et al. Acute lung injury following exposure to nitric acid [J]. *Lung India*, 2009, 26(4): 149-151.
- [15] 陈荣琳,王晓川,曹枫,等. 乌司他丁联合地塞米松对创伤性肺损伤氧交换和超敏 C-反应蛋白的影响[J]. *重庆医学*, 2009, 38(12): 1525-1526.
- [16] Delbin MA, Antunes E, Zanesco A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response [J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2009, 24(4): 552-561.

(收稿日期:2010-11-25 修回日期:2011-01-20)

(上接第 1615 页)

- C, et al. Psychological and health-related quality of life factors associated with insomnia in a population-based sample [J]. *J Psychosom Res*, 2007, 63(2): 157-166.
- [4] 王琳,向静,付华斌,等. 慢性失眠患者不同负性生活事件后的睡眠质量分析[J]. *重庆医学*, 2009, 38(10): 1455-1457.
- [5] World Health Organization. Mental and behavioural disorders//International statistical classification of diseases and related health problems, 10th revision, version for 2007 [EB/OL]. [2011-03-02], <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>.
- [6] 美国精神病学学会. DSM-IV 美国精神疾病诊断标准 [EB/OL]. [2011-03-02]. <http://www.zgxl.net/xlzl/cjxlb/dsmiv.htm>.
- [7] Chokroverty S. Sleep disorder medicine [M]. 2nd ed. Woburn USA: Butterworth-Heinemann medical publications, 1999: 288-289.
- [8] 康颖,刘红光,谷依学. 临床技能教学改革的探索与实

践——以南华大学为例 [J]. *当代教育论坛学科教育研究*, 2009(9): 63-64.

- [9] 汪秀玲,刘长庚,胡春峰,等. 临床教师工作倦怠的干预 [J]. *西北医学教育*, 2009, 17(3): 526-527.
- [10] 张艳,徐明娟,惠宁. 本科生导师制在妇产科带教中的作用 [J]. *解放军医院管理杂志*, 2008, 15(4): 348.
- [11] 杨光富,张宏菊. 案例教学:从哈佛走向世界——案例教学发展历史研究 [J]. *外国中小学教育*, 2008(6): 1-5.
- [12] 金虹. 医疗执业环境不佳已成社会问题 [J]. *医院管理论坛*, 2007, 24(1): 28-30.
- [13] 杨慧艳. 论医患纠纷的现状成因及对策 [J]. *浙江临床医学*, 2008, 10(12): 1633-1634.
- [14] 董元坤,段长利. 浅论医患纠纷的成因与对策 [J]. *中国医学伦理学*, 2007, 20(1): 59-60.
- [15] 钟玉萍,史志兵. 浅谈新形势下的临床医学教育工作 [J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3(19): 199-200.

(收稿日期:2010-12-09 修回日期:2011-03-02)