

· 论 著 ·

乌司他丁对严重烧伤大鼠肠道损伤及炎症因子的影响*

孙 勇, 孙曙光, 王 静, 王良喜, 毛学飞, 邓向东, 潘晓峰, 吴杭庆

(中国人民解放军第 97 医院烧伤整形科, 江苏徐州 221004)

摘要:目的 观察乌司他丁对严重烧伤大鼠致肠黏膜损害和炎症因子的影响。方法 采用 30% 体表面积Ⅲ度烧伤大鼠模型, 随机分成烧伤对照组、乌司他丁组, 两组给予等氮、等热量、等体积的营养液。乌司他丁组于伤后每日静脉注射乌司他丁。观察烧伤前及烧伤后第 1、2、3、4、5、6、7 天大鼠的氮平衡变化, 同时检测烧伤后血浆 D-乳酸、二胺氧化酶(DAO)活性及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6(IL-6)的含量。结果 烧伤后两组大鼠的氮平衡、D-乳酸、DAO、TNF- α 及 IL-6 均显著高于烧伤前($P < 0.01$); 乌司他丁组的氮平衡、D-乳酸及 DAO 活性与烧伤对照组相似($P > 0.05$); 而 TNF- α 及 IL-6 含量显著低于烧伤对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 乌司他丁能有效降低血浆炎症因子水平, 而对肠黏膜屏障没有直接的保护作用。

关键词: 烧伤; 肠黏膜; 乌司他丁; 炎症因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)26-2601-02

Effects of ulinastatin on intestine damage and inflammatory factors in severely burned rats*

Sun Yong, Sun Shuguang, Wang Jing, Wang Liangxi, Mao Xuefei, Deng Xiangdong, Pan Xiaofeng, Wu Hangqing

(Department of Burn Surgery Plastic Surgery Center, the NO 97 hospital of PLA, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ulinastatin on intestine damage and inflammatory factors after severe burn injury. **Methods** 90 wistar rats were inflicted with 30% total body surface area full thickness burns and then randomly divided into burned control group and ulinastatin treatment group. Isonitrogenous and isocaloric nutrition supports were provided to both groups. Rats in ulinastatin treatment group were treated with ulinastatin 40 000 IU/kg via tail vein injection. And then we investigated the changes of the nitrogen balance before rats burned and seven days after burned. Nitrogen balance, D-lactate, diamine Oxidase(DAO), and the levels of plasma TNF, IL-6 were determined. **Results** After burn injury, the nitrogen balance, D-lactate, DAO activity, and levels of TNF, IL-6 significantly increased. Nitrogen balance, D-lactate and DAO activity in U group were similar to those in B group, while levels of TNF and IL-6 were significantly lower compared with B group. **Conclusion** Ulinastatin may lower the level of plasma inflammatory cytokines, while can not relieve intestine damage after severe burn injury.

Key words: burns; intestinal mucosal; ulinastatin; inflammatory factors

严重烧伤伴发的全身感染、全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrom, SIRS)乃至多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrom, MODS)是目前烧伤患者最重要的死亡原因。如何预防感染, 中断 SIRS 及 MODS 的发生、发展是目前烧伤救治中的重要问题。肠道作为烧(创)伤应激的中心器官之一, 可以引发肠源性感染, 进而发展为 SIRS、MODS。乌司他丁(ulinastatin)能有效地抑制由于严重烧伤引发的一系列酶以及炎症介质的释放, 可起到保护机体重要器官的作用^[1]。本文就乌司他丁对大鼠烧伤后肠黏膜屏障及相关炎症因子的影响研究总结如下。

1 材料与与方法

1.1 动物分组及时相设置 健康成年 Wistar 大鼠 90 只, 体重 205~245 g, 随机分为烧伤对照组($n=42$)和乌司他丁组($n=42$), 各大鼠实验分烧伤后 1、2、3、4、5、6、7 d 7 个时相点, 每个时相点 6 只大鼠; 另选 6 只大鼠检测烧伤前(0 d)正常值, 两组使用这共同的 6 只大鼠作为 0 d 时相点。

1.2 大鼠模型的制作 伤前禁食 12 h, 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 背部电推剃毛, 3% 固体汽油烧大鼠 18 s, 使 30% 体表面积Ⅲ度烧伤, 伤后立即腹腔注射 50 mL/kg 的复方乳酸钠抗休克。

1.3 给药方式 烧伤对照组和乌司他丁组均接受等热量等氮量肠内营养: 热量=780 KJ/kg, 采用糖和脂肪双能源 3: 2 比

例提供; 氮量=1.8 g/kg; 非蛋白热量: 氮量=434 KJ: 1 g。乌司他丁组于伤后即刻乌司他丁 4 万 U/kg, 尾静脉注射, 每日 1 次, 连续 7 d。

1.4 检测指标 在各时相点取肠组织, 沿肠管纵轴剪开, 等渗盐水漂洗后展平, 放大镜下观察肠黏膜损伤情况; 肠组织置 10% 甲醛溶液中固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 镜下观察。收集大鼠 24 h 尿液, 微量凯氏定氮法测出 24 h 尿液中氮量。氮平衡(g/kg)=[入氮(g)-出氮(g)]/体质量(kg)。入氮即营养液中氨基酸的含氮量, 出氮主要为 24 h 尿液中的氮量。门静脉血浆 D-乳酸含量检测按照 D-乳酸试剂盒说明书操作, 采用改良酶联紫外分光光度法检测。血清二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6) 含量检测采用 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.5 统计学处理 应用 SPSS15.0 软件进行统计学数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

烧伤后 1~7 d, TNF- α 在烧伤后均显著升高, 3~4 d 达峰值, 乌司他丁组在 2~7 d TNF- α 水平明显低于烧伤对照组。IL-6 在烧伤后也显著升高, 且有逐日增加的趋势, 乌司他丁组在 2~7 d IL-6 水平明显低于烧伤对照组。见表 1。

* 基金项目: 2007 年度南京军区医学科研课题资助项目(07m028)。

表 1 烧伤后各组大鼠氮平衡、D-乳酸、DAO、TNF 和 IL-6 的变化($\bar{x} \pm s, g/kg, n=6$)

分组	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
氮平衡	烧伤对照组	0	0.03±0.08	0.31±0.09	0.61±0.31	0.73±0.38	0.68±0.34	0.65±0.27	0.66±0.25
	乌司他丁组		0.05±0.09	0.37±0.15	0.71±0.32	0.76±0.37	0.75±0.37	0.69±0.26	0.68±0.26
D-乳酸	烧伤对照组	0.40±0.08	2.51±0.18	2.49±0.31	1.90±0.28	1.73±0.24	1.47±0.17	1.20±0.13	0.82±0.11
	乌司他丁组		2.41±0.19	2.45±0.32	1.88±0.26	1.70±0.23	1.44±0.16	1.19±0.14	0.80±0.10
DAO	烧伤对照组	0.21±0.13	2.98±0.75	2.73±0.71	1.98±0.69	1.56±0.50	1.44±0.45	1.49±0.51	1.41±0.48
	乌司他丁组		2.90±0.71	2.70±0.72	1.94±0.63	1.51±0.52	1.40±0.42	1.42±0.52	1.39±0.43
TNF-α	烧伤对照组	17.00±2.09	353.00±17.12	591.00±30.23	709.00±31.13	655.00±28.17	579.00±32.34	593.00±31.48	521.00±25.45
	乌司他丁组		270.00±16.35	308.00±21.76 ^{△△}	390.00±23.71 ^{△△}	269.00±18.27 ^{△△}	260.00±21.23 ^{△△}	253.00±31.48 ^{△△}	220.00±15.22 ^{△△}
IL-6	烧伤对照组	80.00±12.15	234.00±30.12	262.00±31.23	309.00±39.13	342.00±40.17	361.00±46.34	379.00±43.48	381.00±42.45
	乌司他丁组		203.00±31.83	231.00±31.36 [△]	270.00±32.57 [△]	289.00±35.28 ^{△△}	320.00±38.79 ^{△△}	337.00±40.40 ^{△△}	343.00±41.22 ^{△△}

△: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$, 与烧伤对照组比较。

3 讨 论

严重烧伤患者常常伴全身感染、SIRS 乃至 MODS。肠道血运丰富, 有利于营养物质的吸收, 同时也极易受到缺血缺氧的损害, 因此, 成为烧伤后最易受损的器官之一^[2]。烧伤后肠黏膜损伤, 肠道菌群易位, 内毒素入血, 巨噬细胞等免疫细胞被激活, 大量炎性介质释放, 引起 SIRS, 最终可导致 MODS 乃至死亡^[3-4]。因此, 维护肠黏膜的完整性, 减少炎症介质的释放, 是降低烧伤病死率的关键^[5-6]。乌司他丁是从尿中分离纯化出的一种糖蛋白, 它具有很强的水解酶抑制作用, 除对多种蛋白酶、糖和脂水解酶有抑制作用外, 还能减少心肌抑制因子产生, 稳定休克时的循环状态, 对溶酶体膜也有稳定作用, 有抑制炎症介质的释放等功能^[7-10]。

本研究发现, 烧伤对照组大鼠肠黏膜可出现明显的病理改变, 主要表现为胃黏膜糜烂和出血, 光镜下可以观察到典型的浅表性糜烂表现, 乌司他丁组与烧伤对照组类似, 说明乌司他丁对于肠黏膜没有直接的保护作用。本研究结果显示(表 1), 烧伤后各组的氮平衡均显著增加, 乌司他丁组氮平衡较烧伤对照组略有增加, 但无统计学意义。氮平衡是测定机体蛋白质需要量和评价蛋白质营养状况的指标^[11], 研究结果说明乌司他丁对机体合成代谢、蛋白质利用率没有影响, 不能改善负氮平衡。D-乳酸是大肠埃希菌、乳酸菌等肠道细菌的代谢终产物, 哺乳动物正常组织中不生成 D-乳酸, 而且哺乳动物没有 D-乳酸脱氢酶, 不能将 D-乳酸快速代谢; 另外, 肠黏膜发生缺血-再灌注损害时肠道细菌大量繁殖, D-乳酸含量明显增加, 肠绒毛缺血缺氧, 绒毛顶端上皮细胞坏死脱落, 这两方面作用使外周血中 D-乳酸升高, 监测血中 D-乳酸水平可以反映肠黏膜通透性增加, 间接反映肠黏膜损伤情况^[12]。本研究结果提示, 烧伤后 1~2 d D-乳酸即达峰值, 乌司他丁对于 D-乳酸似乎没有直接影响, 乌司他丁组与烧伤对照组无明显差异。DAO 则是肠黏膜细胞的标志酶, 仅存在于哺乳动物小肠黏膜绒毛上层。因此, 血浆 DAO 活性也是反映肠黏膜结构完整性的理想指标^[13]。本研究显示, DAO 伤后 1 d 即达峰值, 说明烧伤后肠黏膜损伤发生较早, 而乌司他丁对于 DAO 影响不大。

TNF-α、IL-6 是体内最重要的促炎性细胞因子, 在细胞因子网络中起着关键作用, 在全身性炎症的发生发展中起着主导作用, 不仅可以引起其他细胞因子的释放, 而且可以促进中性粒细胞和内皮细胞之间的黏附以及中性粒细胞的移行, 释放的炎症介质增加, 从而进一步加重组织脏器的损伤^[14-15]。结果提示, 大鼠伤后 3~5 d 炎症因子 TNF-α 达高峰, 略晚于肠道

损伤指标, 应用乌司他丁后炎症因子水平均显著降低。同样, 乌司他丁对于 IL-6 也有显著降低的作用。

乌司他丁对炎性介质具有显著的降低作用, 本研究通过尾静脉注射乌司他丁对大鼠肠黏膜屏障影响甚微, 其降低炎症介质的作用并不是通过维护肠黏膜的完整性、降低肠源性感染实现的。

参考文献:

- [1] Ren B, Wu H, Zhu J, et al. Ulinastatin attenuates lung ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting tumor necrosis factor alpha[J]. Transplant Proc, 2006, 38(9): 2777-2779.
- [2] 徐世伟, 汪仕良, 冯怀志, 等. 早期肠道营养减轻烧伤后内脏自由基损害的效应[J]. 肠外与肠内营养, 2005, 12(1): 22-36.
- [3] 孙勇, 孙曙光, 王良喜, 等. 谷氨酰胺强化的肠内营养减轻大鼠烧伤后肠道损伤的实验研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(18): 2342-2343.
- [4] 孙勇, 孙曙光, 王良喜, 等. 谷氨酰胺联合乌司他丁对严重烧伤大鼠肠黏膜屏障及炎症因子的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(10): 1389-1392.
- [5] Kumar V, Mohanty MK, Kanth S. Fatal burns in Manipal area; a 10 year study[J]. Forensic Leg Med, 2007, 14(1): 3-6.
- [6] Shinozawa Y. Fluid management and care for multiple organ dysfunction syndrome in patients with extensive burns[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 2005, 106(12): 736-739.
- [7] Bingyang J, Jinping L, Mingzheng L, et al. Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2007, 48(4): 497-503.
- [8] Bingyang J, Jinping L, Mingzheng L, et al. Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2007, 48(4): 497-503.
- [9] 孙勇, 孙曙光, 王良喜, 等. 谷氨酰胺联合乌司他丁对严重烧伤患者营养状况、免疫功能的影响[J]. 广东医学, 2010, 31(23): 3126-3128. (下转第 2605 页)

mRNA 含量的多寡,从而判断细胞基因的表达水平。本实验结果表明,术后第 2 周,反义核苷酸组和反义核苷酸加超声辐照 c-myc 基因表达与对照组比较,减少了 47% 和 74% ($P < 0.01$),说明反义 c-myc 寡核苷酸能有效抑制 c-myc 靶基因的表达,进而抑制细胞的增殖和内膜增厚。局部超声辐照能促进反义 c-myc 向细胞内转化,进一步加强对 c-myc 基因表达的抑制作用,加之超声本身对内膜增生的抑制作用使内膜增厚进一步减轻。本研究中观察到内膜厚度减轻了 55% ($P < 0.01$),说明局部应用反义 c-myc 与超声辐照的协同作用。

超声辐照促进外源基因转化的机制尚不清楚,可能与细胞膜的通透性改变有关。在合理控制超声辐照条件下,超声既能使膜通透性增加,又不致使细胞明显受损,而细胞膜通透性改变是基因转化的前提。Wybex 等^[7]报道,20 kHz,20 w/cm² 的超声辐照 30 s 使质粒转入酵母为对照的 20 倍。Miller 等^[8]应用超声 1 MHz,0.4 w/cm² 辐照 60 s 或 30 min,48 h 后显示,血管平滑肌细胞荧光素酶活力分别增加 7.5 倍和 2.4 倍。超声通过机械作用和空化效应也可影响细胞膜通透性。但主要源于空化效应,压力波作用于细胞,仍是通过引起惯性空化(inertial cavitation)而致细胞结构和(或)功能变化。Kim 等^[9]和 Bao 等^[10]证实,空化效应是影响细胞膜通透性的主要因素。用超声行基因转化和表达,学者们的报道结果不尽相同。如连续波和非连续波的转化率在不同报道中差异甚大。造成差异的原因除目的基因和受体细胞外,超声系统及辐照条件也是重要影响因素。由于声强表示方法和辐照剂量计量方法的多样性,以及辐照过程中采用的透声介质、溶液组成、有无增强空化的因素存在等,给检测结果比较带来困难。Bao 等^[10]报道,辐照过程中旋转试管与否转化结果差异大,认为旋转有利于产生空化。即使细胞膜的通透性增加以利基因导入,又不致因超声辐照而使细胞发生不可逆的损伤是达到满意转化率和表达率的前提。

本研究选择的超声参数源于细胞实验时探索的理想参数,与 Lawrie^[11]等和 Fitzgerald 等^[12]研究接近。但与 Arakawa 等^[13]相差较大。由于体内实验存在组织对超声能量的吸收,采用更高声强、其他频率和作用时间的超声是否对内膜增生抑制和基因转化更有利还不清楚,有待进一步探明。

参考文献:

[1] Bourassa MG. Fate of venous grafts: the past, the present and the future[J]. J Am coll cardiol, 1991, 17(5): 1081-1083.
 [2] Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous sapher-

nous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstruction [J]. J Vasc Surg, 1986, 3(1): 104-114.

- [3] 刘杨东,时德,彭真年,等. Cilostazol 对犬股动脉人工血管移植吻合处组织形态学影响的实验研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2011,33(4):99-103.
 [4] 马小干,时德. 丹参对自体静脉移植替代动脉后早、中期通畅率及增殖病变的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志,2002,9(4):232-234.
 [5] 张俊霞,黄晶,王新,等. 超声辐照对血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(50):636-639.
 [6] 刘杨东,赵渝,时德,等. 超声辐照对兔移植静脉内膜增生的影响[J]. 临床超声医学杂志,2011,13(4):217-219.
 [7] Wybex JA, Andrews J, D'Emanuele A. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells [J]. Pharm Res, 1997, 14(6): 750-756.
 [8] Miller MW, Milleo DL, Brayman AA. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective[J]. Ultrasound Med Biol, 1996, 22(9): 1131-1154.
 [9] Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, et al. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells [J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(11): 1339-1346.
 [10] Bao S, Thrall BD, Millex DL. Transfection of ureporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro [J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23(6): 953-959.
 [11] Lawrie A, Brisken AF, Francis SH, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro [J]. Circulation, 1999, 99(20): 2617-2620.
 [12] Fitzgerald PJ, Takagi A, Moore P, et al. Intravascular sonotherapy decrease neointimal hyperplasia after stent implantation in swine [J]. Circulation, 2001, 103(14): 1828-1831.
 [13] Arakawa K, Hagiwara K, Kusano H, et al. Sonodynamic therapy decrease de neointimal hyperplasia after stenting in the rabbit ilio artery [J]. Circulation, 2002, 105(2): 149-151.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-22)

(上接第 2602 页)

[10] 孙勇,孙曙光,王良喜,等. 谷氨酰胺联合乌司他丁对严重烧伤患者炎症因子的影响[J]. 山东医药,2011,51(8):71-71.
 [11] 王少龙,姜鹤群,何依群,等. 食管癌术后早期空肠管饲营养的临床评价[J]. 重庆医学,2007,36(16):1644-1645.
 [12] Sun Z, Wang X, Wallen R, et al. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats [J]. Scand J Gastroenterol, 1998, 33(4): 415-422.
 [13] 周莎,许春娣,陈舜年,等. 幼鼠结肠炎模型肠黏膜损伤与

DAO 的关系[J]. 中华儿科杂志,2006,42(2):93-95.

- [14] 吴彬,但伶. CD40/CD40L 与肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-10 在炎症中的作用 [J]. 重庆医学,2007, 36(17): 1771-1773.
 [15] 王和贤,杨军,姜波健,等. 严重多发伤患者血清 TNF α 、IL-6、IL-8 的变化及意义 [J]. 重庆医学,2004, 33(8): 1198-1199.

(收稿日期:2011-02-21 修回日期:2011-04-15)