

· 基础研究 ·

乌司他丁对大鼠心肺复苏后细胞因子和心功能影响的实验研究*

杨秀林, 周厚荣[△], 刘海健, 杨娇荣, 周霞

(贵州省人民医院急诊科, 贵阳 550002)

摘要:目的 探讨乌司他丁对心搏骤停-心肺复苏大鼠心脏的保护效应及改善心功能不全的机制。方法 随机将 20 只 SD 大鼠分为 3 组:假手术组(不进行窒息及心肺复苏,仅进行麻醉和气管切开插管、血管穿刺;A 组 $n=8$);对照组(静脉注射生理盐水 $4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$;B 组 $n=6$);考察组(乌司他丁 $5\text{ 万 U}\cdot\text{kg}^{-1}$ +生理盐水 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,5 万 U 配制成 1 mL ;C 组 $n=6$);采用实验设计模型考察大鼠复苏前后实验设定时间段白细胞介素-12(IL-12)、心肌肌钙蛋白 T(cTNT)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、脑钠肽(BNP)、平均动脉压(MAP)、左室内压最大上升和下降速率($\pm\text{LVdp. dt-1max}$)及左室舒张末压(LVEDP)的变化。结果 与 A 组及复苏前比较,B、C 组复苏后 6 h IL-12、cTNT、TNF- α 、BNP、LVEDP 等均有不同程度升高($P<0.01$),而 $\pm\text{LVdp. dt-1max}$ 值降低($P<0.01$);与 B 组比较,C 组复苏后 6 h IL-12、cTNT、TNF- α 、BNP、LVEDP 值低于 B 组,而 $\pm\text{LVdp. dt-1max}$ 值高于 B 组($P<0.01$);B 组复苏后 6 h MAP 值低于复苏前、同时间 A 组和 C 组($P<0.01$)。结论 乌司他丁可抑制炎症介质释放,减轻心搏骤停-心肺复苏实验大鼠心肌损伤,从而改善心搏骤停-心肺复苏实验大鼠心脏功能不全。

关键词:乌司他丁;心肺复苏术;细胞因子类;心脏功能试验

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.29.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)29-3515-03

The effects of ulinastatin on the cells factor and cardiac function after cardiopulmonary resuscitation in rats*

Yang Xiulin, Zhou Hourong[△], Liu Haijian, Yang Jiaorong, Zhou Xia

(Department of Emergency, People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of ulinastatin on the hearts of rats with anoxia-induced cardiac arrest-cardiopulmonary resuscitation(CA-CPR) and the mechanism of improving cardiac dysfunction. **Methods** Twenty male Sprague Dawley(SD) rats were randomly divided into three experimental groups: sham operation group(group A, $n=8$, only anesthesia, tracheotomy tube and vascular puncture), control group(group B, $n=6$, normal saline $4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ injected via vein), Ulinastatin treatment group(group C, $n=6$ ulinastatin $50\ 000\text{ U/kg}$ +normal saline $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ injected via vein); Factors including mean arterial pressure(MAP), left ventricular end diastolic pressure(LVEDP), the maximum rising and falling rates of left ventricular deep pressure($\pm\text{LVdp. dt-1max}$), brain natriuretic peptide(BNP), cardiac troponin T(cTNT), IL-12 and TNF- α were observed at setting time before and after cardiopulmonary resuscitation in rats. **Results** Compared with those of the group A and before CA-CPR, the concentrations of IL-12, cTNT, TNF- α , BNP, and LVEDP increased($P<0.01$) while $\pm\text{LVdp. dt-1max}$ decreased($P<0.01$) at 6 h after CA-CPR in group B, C. Compared with those of group B, the concentrations of IL-12, CTNT, TNF- α , BNP and LVEDP of 6 h after CA-CPR in group C were lower and $\pm\text{LVdp. dt-1max}$ was higher($P<0.01$), The concentrations of MAP of 6 h after CA-CPR in group B was lower Compared with that of group A, C and before CA-CPR($P<0.01$). **Conclusion** Ulinastatin can improve cardiac dysfunction by depressing mediators of inflammation and reducing myocardial injury.

Key words: ulinastatin; cardiopulmonary resuscitation; cytokines; heart function tests

尽管心肺复苏后自主循环恢复(restoration of spontaneous circulation, ROSC)成功率有了极大提高,但 ROSC 后大约 75% 的患者死于进展性的复苏后多器官功能障碍综合征(post-resuscitation multiple organ dysfunction syndrome, PR-MODS),多项临床研究表明 PR-MODS 和全身炎症反应有关^[1]。乌司他丁(ulinastatin, UTI)是一种广谱的蛋白酶抑制剂,具有抑制水解酶,稳定溶酶体膜,抑制多种炎症介质及免疫调节作用。为此,推测乌司他丁可能减轻 ROSC 后的全身炎症反应,改善 PR-MODS。本研究特通过动物实验,考察 UTI 对心肺复苏后大鼠心功能、细胞因子的干预作用。

1 材料与方 法

1.1 材料和仪器 实验动物:健康成年 SD 大鼠(重庆大坪医

院野战外科研究所医学实验动物中心,生产许可证号:sCXK(渝)2007-0005)20 只,雌雄不限,体质量 $310\sim 450\text{ g}$ 。乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司,国药准字 H19990134,批号:03051203)。大鼠脑钠肽(BNP)、心肌肌钙蛋白 T(cTnT)、白介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供,酶链免疫吸附试验(ELISA)法由贵州省人民医院中心实验室专人操作。ASB-240U 生物信号采集分析系统(成都傲生科技公司)、ALC-V9 动物呼吸机(上海奥尔特生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 随机将 SD 大鼠分为 3 组:A 组(不进行窒息及心肺复苏,仅进行麻醉和气管切开插管、血管穿刺;

* 基金项目:贵州省科技攻关项目(黔科合 S 字[2007]1055);贵州省科技厅资助、贵州省省长基金资助课题(黔省专合字[2007]66 号)。

作者简介:杨秀林(1972~),副主任医师,主要从事院前临床心肺复苏及其基础研究。△ 通讯作者, Tel:13985136428; E-mail:zhr1974@163.com。

表 1 各组间复苏即刻、复苏后 6 h \pm LVdp, dt-1max、LVEDP、MAP 变化($\bar{x}\pm s$)

项目	复苏后	A 组(n=8)	B 组(n=6)	C 组(n=6)
+LVdp/dt max (mmHg/s $\times 10^3$)	0 h	7.98 \pm 1.32	8.10 \pm 1.73	7.81 \pm 1.30
	6 h	7.30 \pm 1.12	2.85 \pm 0.91 ^{ab}	5.48 \pm 1.44 ^{abc}
-LVdp/dt max(mmHg/s $\times 10^3$)	0 h	5.48 \pm 1.35	5.86 \pm 1.00	6.12 \pm 1.34
	6 h	5.19 \pm 1.43	1.83 \pm 0.91 ^{ab}	4.45 \pm 1.45 ^{abc}
LVEDP(mmHg)	0 h	3.50 \pm 2.11	3.04 \pm 1.48	3.36 \pm 1.17
	6 h	3.52 \pm 2.19	15.98 \pm 5.81 ^{ab}	9.23 \pm 4.94 ^{abc}
MAP(mmHg)	0 h	92.42 \pm 15.61	88.74 \pm 13.39	90.61 \pm 16.76
	6 h	94.52 \pm 13.80	60.18 \pm 14.10 ^{ab}	82.26 \pm 14.58 ^c

^a: $P<0.01$,与 A 组同时点比较;^b: $P<0.01$,与同组 0 h 比较;^c: $P<0.01$,与 B 组同时点比较。

表 2 各组间复苏即刻、复苏后 6 h BNP、cTnT、TNF- α 、IL-12 变化($\bar{x}\pm s$,pg \cdot mL⁻¹)

项目	复苏后	A 组(n=8)	B 组(n=6)	C 组(n=6)
BNP	0 h	167.61 \pm 49.32	181.13 \pm 56.21	165.54 \pm 65.28
	6 h	167.61 \pm 49.32	610.52 \pm 140.86 ^{ab}	405.62 \pm 100.33 ^{abc}
cTnT	0 h	3.72 \pm 1.13	3.92 \pm 0.90	4.01 \pm 1.12
	6 h	3.72 \pm 1.13	133.04 \pm 41.02 ^{ab}	63.38 \pm 8.65 ^{abc}
TNF- α	0 h	30.72 \pm 11.50	46.99 \pm 18.71	56.44 \pm 19.67
	6 h	30.72 \pm 11.50	242.27 \pm 61.56 ^{ab}	133.30 \pm 32.87 ^{abc}
IL-12	0 h	133.90 \pm 41.02	140.25 \pm 23.46	172.58 \pm 47.63
	6 h	133.90 \pm 41.02	672.70 \pm 83.94 ^{ab}	336.29 \pm 73.6 ^{abc}

^a: $P<0.01$,与 A 组同时点比较;^b: $P<0.01$,与同组 0 h 比较;^c: $P<0.01$,与 B 同时点比较。

$n=8$);B 组(静脉注射生理盐水 4 mL \cdot kg⁻¹,心搏骤停 4 min 后给药; $n=6$);C 组(乌司他丁 5 万 U \cdot kg⁻¹+生理盐水 3 mL \cdot kg⁻¹,5 万 U 配制成 1 mL,心搏骤停 4 min 后给药; $n=6$);其中 B 组和 C 组按时间又分为复苏后 0 和 6 h 2 小组;术前实验动物可自由饮水但禁食。B、C 组间体质量(380 \pm 21)g vs. (380 \pm 19)g、窒息导致 CA 时间(423 \pm 26)s vs. (402 \pm 22)s、心肺复苏(CPR)持续时间(192 \pm 110)s vs. (173 \pm 46)s、ROSC 时间(612 \pm 116)s vs. (575 \pm 47)s,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2.2 心肺复苏模型 依据 Hendrickx 等窒息法心肺复苏模型,并参照 Utstein 复苏实验研究模式设计动物实验模型:仰卧固定于手术台上的动物,采用腹腔注射麻醉(乌拉坦,首剂为 2 g \cdot kg⁻¹)后,气管切开置管接呼吸机;平均动脉压(MAP)、心率(HR),II 导 ECG 等数据由左颈动脉置管连接生物信号采集分析系统采集。术后稳定 10 min(室温),采用夹闭气管置管法,于呼气末持续夹闭气管置管致 CA 持续 240 s[CA 标准:(1)心电图示心电静止、室颤、心电机械分离;(2)心尖区心脏搏动消失;(3)动物皮肤黏膜明显发绀。]后,即胸外按压(频率为 200 次/分),静脉注射肾上腺素(0.02 mg \cdot kg⁻¹)并呼吸机辅助纯氧通气(80 次/分;潮气量 6 mL \cdot kg⁻¹)等方法进行动物心肺复苏(15 min 无效者放弃复苏),同时监测并记录颈动脉血压和心电图,ROSC 3 h 后逐步撤离呼吸机,实验结束(取血 6 mL 送检,处死实验动物)。时间数据收集:窒息导致 CA 的时间、心肺复苏时间和 ROSC 时间。

1.2.3 观察指标 复苏前、复苏后 0 h 及复苏后 6 h HR、MAP、左室内压最大上升与下降速率(\pm LVdp, dt-1max)、左室舒张末压(LVEDP)、脑钠肽(BNP)、IL-12、肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)、心肌钙蛋白(cTnT)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,同组不同时点采用成组设计资料的 t 检验,不同组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐采用成组设计方差分析,两两比较用 SNK 法,如方差不齐,采用 Wilcoxon 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组间复苏即刻、复苏后 6 h \pm LVdp, dt-1max、LVEDP 变化 与 A 组及同组复苏后 0 h 比较,B、C 组复苏后 6 h \pm LVdp, dt-1max 值均降低($P<0.01$),而复苏后 6 h LVEDP 值均升高($P<0.01$);B 组复苏后 6 h MAP 低于复苏前、A 组和 C 组($P<0.01$);与 B 组比较,C 组复苏后 6 h \pm LVdp, dt-1max、MAP 值均高于 B 组($P<0.01$),而 LVEDP 低于 B 组($P<0.01$)。见表 1。

2.2 各组间复苏即刻、复苏后 6 h BNP、cTnT、TNF- α 、IL-12 变化 与 A 组及同组复苏后 0 h 比较,B、C 组复苏后 6 h BNP、cTnT、IL-12、TNF- α 水平均升高($P<0.01$);与 B 组比较,C 组复苏后 6 h BNP、cTnT、IL-12、TNF- α 水平低于 B 组($P<0.01$)。见表 2。

3 讨 论

心脏骤停 CPR 后死亡者中心功能不全占 1/3 以上,最终死亡的主要危险因素之一是复苏术后高达 90.6% 全身炎症反应综合征(SIRS)发生^[2-3]。导致 SIRS 的炎症介质中,IL-12 能引起 NK 细胞和 T 淋巴细胞分泌 TNF- α ,后者又反过来激活巨噬细胞,诱导其分泌其他促炎因子,因此,IL-12 在 SIRS 和 MODS 的发生发展中起重要作用^[4]。而高度依赖于 IL-12 表达的 TNF- α 是触发缺血再灌注损伤时炎症瀑布效应的关键因

子^[5],对其表达的抑制,将使缺血再灌注损伤程度均明显减轻^[6-7]。对众多研究结果归纳显示炎症因子、心肌细胞凋亡、微血管损伤、钙离子超载、自由基等与复苏后心功能不全密切相关^[8]。本次实验显示,心肺复苏后大鼠体内 TNF- α 和 IL-12 表达较对照组明显升高,提示复苏后大鼠体内存在炎症细胞激活。

UTI 可竞争性抑制酶底物结合部位,同时独立抑制多种酶的活性^[9],具有拮抗心肺复苏后 TNF- α 及降低心肌再灌注损伤作用^[10-11],对 SIRS、MODS 等引起的组织或器官损伤具有保护作用^[12]。鉴于乌司他丁研究资料的结果与本实验具有较大的相关性,特选为本实验研究用药。

动物实验结果显示:与 A 组比较,B、C 组复苏后 6 h 土 LVdp、dt-1max 值均低于 A 组($P < 0.01$),而复苏后 6 h LV-EDP 值均高于 C 组($P < 0.01$);与同组 0 h 比较,B、C 组复苏后 6 h 土 LVdp、dt-1max 值均降低($P < 0.01$),而复苏后 6 h LV-EDP 值均升高($P < 0.01$),提示复苏后心功能不全普遍存在,结果也印证相关资料的报道^[1]。

对心肌损伤的标志物 cTnT^[13]和心脏负荷的标志物 BNP 的监测结果显示:心肺复苏前各组 cTnT 和 BNP 值差异无统计学意义($P > 0.05$),复苏成功后 6 h B、C 组均有不同程度升高,尤以 B 组升高幅度最大,推测复苏后存在一定程度的急性心肌损伤及心肌细胞坏死。然而 C 组升高幅度小于 B 组($P < 0.01$),从另外一个角度证实 UTI 具有减轻心肺复苏后心肌损伤的作用^[14]。

实验结果表明 UTI 可有效的调节 IL-12、TNF- α ,与 B 组及 A 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);同时,C 组 MAP、土 LVdp、dt-1max、LVEDP 数据优于 B 组,揭示 UTI 还具有改善了复苏后心功能不全的作用^[15]。

本研究表明:乌司他丁对心搏骤停-心肺复苏实验大鼠,具有拮抗炎症介质、减轻心肌损伤和改善了复苏后心功能不全的作用。乌司他丁使用方式对实验结果的影响评价后续实验将继续进行。

参考文献:

- [1] 胡春林,夏金明,魏红艳,等. 乌司他丁对心肺复苏后兔脑损伤和心功能的影响[J]. 中华急诊医学杂志,2012,21(1):12-17.
- [2] 唐万春,孙士杰. 心肺脑复苏及心脑血管急诊[M]. 北京:科学技术出版社,2008:397-399.
- [3] 周厚荣,张谦,杨秀林,等. 血必净对窒息大鼠心肺复苏后免疫因子及补体变化的实验研究[J]. 重庆医学,2010,39

(17):2248-2250.

- [4] 陈振娟,阮冰. 全身炎症反应综合征的分子发病机制及其治疗研究[J]. 国际流行病学及传染病学杂志,2007,34(6):402-405,414.
- [5] 朱宇麟,周荣胜,杨会,等. 乌司他丁对肝大部切除合并缺血再灌注损伤后肝再生及 TNF- α /IL-6/STAT-3 信号通路的影响[J]. 南方医科大学学报,2012,32(9):1301-1306.
- [6] 刘作金,严律南. Kupffer 细胞与肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(24):2741-2745.
- [7] Husted TL, Blanchard J, Schuster R, et al. Potential role for IL-23 in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Inflamm Res, 2006,55(5):177-178.
- [8] 刘海健,张谦,周厚荣,等. 心肺复苏后心功能不全研究进展[J]. 贵州医药,2010,34(1):87-89.
- [9] 周世方,陈寿权,李章平,等. 乌司他丁对大鼠心肺复苏后血清与海马 CA1 区 S100 β 蛋白变化的作用[J]. 中华急诊医学杂志,2009,18(2):170-174.
- [10] 严跃红,黄爱群,李显波,等. 乌司他丁对心肺复苏后兔肾损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(6):1138-1142.
- [11] Wada T, Kawai, Ihara K, et al. Construct validity of the Enneking score for measuring function in patients with malignant or aggressive benign tumours of the upper limb [J]. J Bone Joint Surg Br,2007,89(5):659-663.
- [12] 黄顺伟,管向东,陈娟,等. 乌司他丁联合胸腺肽 $\alpha 1$ 改善脓毒症患者免疫功能的作用机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(11):2168-2172.
- [13] 农天雷,林敏. 肌钙蛋白两个亚单位在急性心肌梗死诊断中的应用分析[J]. 海南医学院学报,2011,17(3):325-327.
- [14] 刘刚,王晶,赵研. 乌司他丁对心肺复苏大鼠心功能及心肌组织 CD11b、ICAM-1 的影响[J]. 海南医学院学报,2010,16(4):413-416.
- [15] 彭娜,向定成,罗国新,等. 乌司他丁对脓毒症休克大鼠心功能及 p38MAPK 活化的影响[J]. 南方医科大学学报,2012,32(11):1620-1622.

(收稿日期:2013-05-09 修回日期:2013-05-28)

(上接第 3514 页)

- [12] Nazarenko I, Rana S, Baumann A, et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation[J]. Cancer Res, 2010,70(4):1668-1678.
- [13] Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA * 008 that is shed by tumor cells in exosomes[J]. Cancer Res, 2010,70(2):481-489.

- [14] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010,107(14):6328-6333.
- [15] Henry GL, Anita MD, Sanjay P, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells [J]. J Immunol Methods, 2002, 270(2):211-226.

(收稿日期:2013-06-01 修回日期:2013-06-27)