

乌司他丁对大鼠肺脏热缺血再灌注损伤的保护作用

苗锋 陈刚 陈志明[△] 庞烈文 马勤运 陈佶 朱勇俊

(复旦大学附属华山医院胸外科 上海 200040)

【摘要】 目的 探讨乌司他丁对大鼠肺脏热缺血再灌注损伤的保护作用并比较两种不同剂量的保护效果。**方法** 30只清洁级SD大鼠,随机分成3组,每组10只。单纯热缺血再灌注组(ischemia-reperfusion group, IR group)阻断左肺门1h后,开放左肺门再灌注2h,取左肺静脉血行血气分析后,处死大鼠。左肺上段测湿干比(Wet/Dry Ratio, W/D),中段做组织切片,下段检测MPO浓度;乌司他丁常规剂量组(ulinastatin conventional dose group, UC group)阻断左肺门前,阴茎背静脉注入乌司他丁10 000 IU/kg,其余程序同IR组;乌司他丁大剂量组(ulinastatin high-dose group, UH group)阻断左肺门前,阴茎背静脉注入乌司他丁20 000 IU/kg,其余程序同IR组。**结果** IR组与UH组比较,血气分析中肺静脉血的氧分压(PO_2)与W/D的差异均有统计学意义[(109.5 ± 18.3)mmHg vs. (128.5 ± 17.7)mmHg, (5.30 ± 0.13) vs. (5.08 ± 0.25), $P < 0.05$];MPO浓度检测结果,IR组、UC组与UH组每两组间的差异均存在统计学意义[(57.36 ± 10.51)ng/mL, (45.74 ± 8.13)ng/mL 与 (28.30 ± 6.28)ng/mL, $P < 0.05$];组织切片可见IR组较UC组和UH组炎性细胞浸润明显。**结论** 乌司他丁对大鼠肺脏的热缺血再灌注损伤有一定的保护作用,并且存在剂量相关性。

【关键词】 肺; 缺血再灌注损伤; 乌司他丁; 剂量相关性; 大鼠

【中图分类号】 R 655.3 **【文献标志码】** A

Protection effects of ulinastatin against lung warm ischemia-reperfusion injury in rats

MIAO Feng, CHEN Gang, CHEN Zhi-ming[△], PANG Lie-wen,
MA Qin-yun, CHEN Ji, ZHU Yong-jun

(Department of Thoracic Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of ulinastatin against lung ischemia-reperfusion injury in rats and to compare the contribution of two different doses. **Methods** Thirty Sprague Dawley rats were randomly divided into three groups, with 10 rats in each. In ischemia-reperfusion group (IR group), the hilum of left lung was blocked for 1 hour and was then reopened. After 2 hours of reperfusion, blood sample from the left pulmonary vein was taken and the oxygen partial pressure was measured before the rats were sacrificed. The upper part of left lungs was assayed for wet/dry weight ratio (W/D), the middle part was taken for microscopic study, the other parts were frozen in liquid nitrogen for detection of myeloperoxidase concentration (MPO); In ulinastatin conventional dose group (UC group) and ulinastatin high-dose group (UH group), the rats were intravenously administered 10 000 IU/kg and 20 000 IU/kg ulinastatin, respectively, before blocking the hilum of the left lungs. The other procedures were the same as in the IR group. **Results** Compared IR group with the UH group, there was statistically significant difference in PO_2 and W/D [(109.5 ± 18.3)mmHg vs. (128.5 ± 17.7)mmHg, 5.30 ± 0.13 vs. 5.08 ± 0.25, $P < 0.05$]. For the results of MPO concentration, among IR group, UC group and UH group, there was statistically significant difference between each two groups [(57.36 ± 10.51)ng/mL, (45.74 ± 8.13)ng/mL and (28.30 ± 6.28)ng/mL, $P < 0.05$]. Tissue slice (HE stain) showed inflammatory cells infiltration in IR group. **Conclusions** The present study demonstrates that ulinastatin has a protective effect on rat lung warm ischemia-reperfusion injury, which was dose-dependent.

[△]Corresponding author E-mail: chzm_md@yahoo.com.cn

【Key words】 lung; ischemia-reperfusion injury; ulinastatin; dose-dependent; rat

肺缺血再灌注损伤出现在许多手术中,如肺部肿瘤的袖式切除术、肺动脉栓塞取栓术后和肺移植等。特别是在肺移植手术中,缺血再灌注导致的肺损伤是肺移植后早期发病和死亡的首要原因^[1]。减轻肺的缺血再灌注损伤对肺部手术具有重要的意义。

研究表明,肺缺血再灌注损伤的机制主要有白细胞活化、促炎症反应介质的释放、转录因子激活、细胞膜分子的上调、基质金属蛋白酶的活化等^[2]。乌司他丁属于蛋白酶抑制剂,对包括中性粒细胞产生的弹性蛋白酶在内的多种蛋白酶、糖和脂水解酶均有抑制作用,可以减少白细胞的活化、稳定溶酶体膜和抑制炎症介质释放,起到减轻组织缺血再灌注损伤的作用^[3]。本实验主要观察乌司他丁对大鼠肺脏热缺血再灌注损伤的保护作用及是否存在剂量相关性。

材料和方法

实验动物和分组 清洁级 SD 大鼠 30 只(上海西普尔-必凯实验动物有限公司),体重(275 ± 35)g,随机分为 3 组,每组 10 只:单纯热缺血再灌注组(ischemia-reperfusion group, IR group)、乌司他丁常规剂量组(ulinastatin conventional dose group, UC group)、乌司他丁大剂量组(ulinastatin high-dose group, UH group)。

实验步骤 IR 组大鼠称重后,使用 10%水合氯醛按照 300 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。麻醉成功后,平卧位固定,气管插管,接呼吸机(Inspira Asv 动物呼吸机,美国 Harvard Apparatus 公司)吸入气体为空气,自带 Safe Range™ 软件按体重计算, Vt 约 6 mL/kg,频率 72~78 次/min, PEEP 2 cmH₂O。阴茎背静脉注射肝素钠生理盐水溶液 100 IU/kg 后,改右侧卧位,安尔碘消毒手术部位及器械后,取左侧第四肋间逐层进胸,使用眼睑撑开器撑开,暴露左侧胸腔,充分游离左肺韧带及肺门,清晰分出左主支气管、左肺动脉和肺静脉,绕左肺门置入 4-0 号慕斯线后,在肺脏半膨胀状态下^[4]结扎预置线,完全阻断左肺的支气管及血管。移去撑开器,使用湿润生理盐水纱布覆盖。1 h 后^[5],松开并剪断慕斯线,重新开放左肺门,可看到血管再灌注,肺充分张开,并随呼吸机运动,肺颜色由暗红色变为粉红色,继续生理盐水纱布覆盖。2 h 后,撑开胸部切口,左肺静脉取血测血气(GEM Premier3000 血气分析仪,美国 IL 公司),放血法处死大鼠。取出左肺,左肺上段称湿重后,放入 60 °C 烘箱干燥 48 h(隔水式电热恒温培养箱,型号 PYX-DHS50 × 65,上海跃进医疗器械厂),称干重后计算湿干比(Wet/Dry Ratio, W/D);左肺中段放入

4%多聚甲醛中固定后行组织学检查;左肺下段 0.3 g 立刻放入液氮瓶中保存,行 MPO 浓度检测(大鼠髓过氧化物酶(MPO)ELISA 试剂盒,上海麦约尔生物科技有限公司)。

UC 组大鼠:阴茎背静脉注射肝素液后,注入乌司他丁 10 000 IU/kg(广东天普生化医药股份有限公司);UH 组大鼠:阴茎背静脉注射肝素液后,注入乌司他丁 20 000 IU/kg,其余步骤同 IR 组。

检测指标和方法

肺静脉血气 抽左肺肺静脉血 0.3 mL,行血气分析,比较肺静脉血的氧分压结果即 PO₂ 值。

组织切片 苏木精-伊红染色后,光镜下观察位于肺门旁边肺泡的结构、中性粒细胞的浸润程度、肺泡水肿及渗出的程度等。

湿干重比测定 左上肺组织均使用电子天平(上海天平仪器厂)称重湿重后,60 °C 烘 48 h 后称干重,计算湿干比。

肺组织匀浆髓过氧化物酶(MPO)浓度测定 使用 ELISA 试剂盒进行检测后,用酶标仪(SpectraMax M5, Molecular Devices 公司)在 450 nm 处测吸光度 D,根据标准曲线测出 MPO 浓度。

数据处理和统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 15.0 统计软件,t 检验分析两组间数据差异。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

3 组的大鼠缺血再灌注后的肺静脉血血气分析中的 PO₂ 值、肺湿干比、肺组织匀浆 MPO 浓度测定结果见表 1。

各组组织切片显示,IR 组肺泡壁明显增厚,间质水肿,有大量中性粒细胞为主的炎症细胞浸润、肺泡腔内可见水肿液聚集;UC 组和 UH 组可见肺脏组织结构清晰,肺泡壁无明显增厚,间质轻度炎症细胞浸润,肺泡腔内无水肿液积聚(图 1)。

表 1 3 组 PO₂, W/D 和 MPO 浓度的比较

Group	PO ₂ (mmHg)	W/D	MPO (ng/mL)
IR	109.5 ± 18.3	5.30 ± 0.13	57.36 ± 10.51
UC	115.4 ± 20.1	5.15 ± 0.15	45.74 ± 8.13
UH	128.5 ± 17.7	5.08 ± 0.25	28.30 ± 6.28

IR group vs. UH group; PO₂, W/D and MPO concentration, P < 0.05; IR group vs. UC group, UC group vs. UH group; MPO concentration, P < 0.05; 1 mmHg = 0.133 kPa.

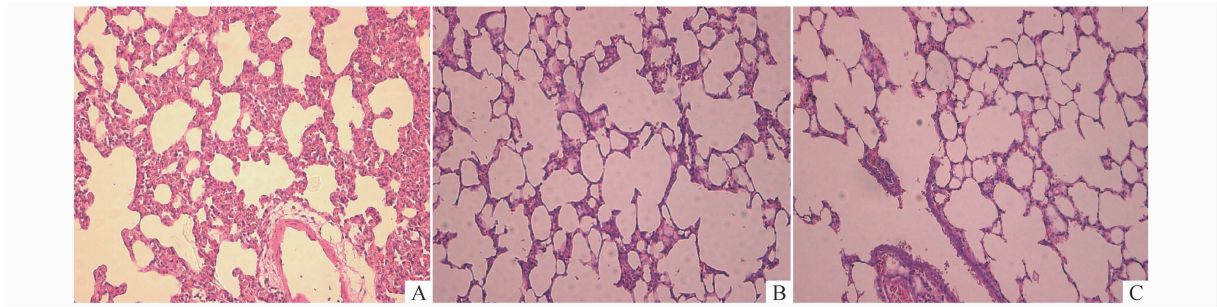


图 1 3组肺组织切片图(HE×200)

Fig 1 Lung tissue of the three groups (HE×200)

A: IR group; B: UC group; C: UH group.

讨 论

肺动脉栓塞的取栓或溶栓、肺部肿瘤的袖式切除术、心脏手术的体外循环停止以后和肺脏移植术后等^[6-7]都会出现肺缺血再灌注损伤现象。主要表现为术后呼吸困难、持续性低氧血症,甚至急性呼吸窘迫综合征等。

临床肺移植中,严重的缺血再灌注肺损伤不仅对急性期肺功能的恢复有明显的阻碍作用,而且增加了供肺以后发生阻塞性细支气管炎综合征的风险^[8]。目前,有许多研究减缓缺血再灌注损伤的方法,减少炎症反应在改善肺脏缺血再灌注损伤中被证明是成功的^[1,9]。

乌司他丁是一种从健康人的新鲜尿液中分离精制的糖蛋白,属蛋白酶抑制剂。能够抑制各种蛋白酶的活性、稳定溶酶体膜、抑制溶酶体酶的释放、减少炎症因子的释放、降低毛细血管的通透性、改善组织水肿,并对过氧化物有一定的中和作用。实验证明乌司他丁对肝脏、肾脏、小肠、心脏和脑组织等脏器的缺血再灌注损伤具有保护作用^[10-11]。

本实验结果显示,乌司他丁组较 IR 组的组织切片有明显改善;IR 组的肺静脉血 PO₂、肺脏 W/D 及 MPO 浓度同 UH 组比较均有统计学意义;IR 组、UC 组和 UH 组的 MPO 浓度的组间比较均有统计学意义,MPO 浓度同炎症反应程度呈正相关。

综上所述,乌司他丁对于大鼠肺脏的热缺血再灌注损伤有明显的改善作用,并且存在剂量相关性。有报道显示^[12],尿液中乌司他丁的浓度同肝脏移植后移植物的功能成正相关,但是否与移植肺的功能成正相关,可否将尿液中乌司他丁的浓度作为移植后肺功能的一种检测指标,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Granton J. Update of early respiratory failure in the lung transplant

recipient[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2006, 12(1): 19-24.

- [2] 孙加源,白春学. 肺移植后缺血再灌注损伤发病机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(2): 129-133.
- [3] Kim SJ, Yoo KY, Jeong CW, et al. Urinary Trypsin Inhibitors Afford Cardioprotective Effects through Activation of PI3K-Akt and ERK Signal Transduction and Inhibition of p38 MAPK and JNK[J]. *Cardiology*, 2009, 114(4): 264-270.
- [4] Kao SJ, Wang D, Yeh DYW, et al. Static inflation attenuates ischemia-reperfusion injury in an isolated rat lung *in situ*[J]. *Chest*, 2004, 126(2): 552-558.
- [5] van der Kaaij NP, Kluijn J, Haitsma JJ, et al. Surfactant pretreatment decreases long-term damage after ischemia reperfusion injury of the lung[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 35(2): 304-312; discussion 312.
- [6] Levinson RM, Shure D, Moser KM. Reperfusion pulmonary edema after pulmonary-artery thromboendarterectomy [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1986, 134(6): 1 241-1 245.
- [7] Ward BJ, Pearse DB. Reperfusion pulmonary edema after thrombolytic therapy of massive pulmonary embolism [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1988, 138(5): 1 308-1 311.
- [8] Fiser SM, Tribble CG, Long SM, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(4): 1 041-1 047.
- [9] de Perrot M, Liu MY, Waddell TK, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(4): 490-511.
- [10] Zhang XQ, Sun JL, Chen YJ, et al. Amelioration of ischemia-reperfusion injury of transplanted small intestine by ulinastatin: Effects on accumulation and adhesion of neutrophil [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(10): 4 464-4 466.
- [11] Taie S, Ueki M, Chujo K, et al. Urinary trypsin inhibitor ameliorates renal tissue oxygenation after ischemic reperfusion in rats[J]. *J Anesth*, 2008, 22(2): 149-154.
- [12] Watanabe T, Sato Y, Ichida T, et al. Comparison of urinary ulinastatin levels between donors and recipients immediately following adult living related donor liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(1): 76-77.

(收稿日期: 2009-12-21; 编辑: 王蔚)