

乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织损伤的保护作用

张 蕾, 李文澜, 贾一帆, 乔芊芊, 卜雪珊, 王 伟, 肖兴鹏*

武汉大学人民医院 麻醉科, 湖北 武汉 430061

摘 要: **目的** 研究乌司他丁预处理对失血性休克大鼠肺组织损伤的保护作用。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和乌司他丁 3、6 万 U/kg 组, 每组各 8 只。对照组、模型组通过尾静脉在 20 min 内微量泵注 5 mL 生理盐水, 乌司他丁组尾 iv 3、6 万 U/kg 乌司他丁溶液 5 mL。4 h 后, 按 30 mL/kg 经大鼠股动脉通道在 10 min 之内匀速抽取血液诱发失血性休克。维持休克状态 60 min 后, 抽取的血液和乳酸林格氏液 (30 mL/kg) 在 30 min 内通过尾静脉匀速输注到大鼠体内复苏。在复苏后 4 h 测定大鼠肺组织超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA); 采用 Western blotting 法检测 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 蛋白表达量; 测量支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中的蛋白质和白细胞 (WBC) 含量。进行肺组织学观察。**结果** 与模型组比较, 6 万 U/kg 乌司他丁预处理使肺组织 SOD 活性显著升高, MDA 下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 6 万 U/kg 乌司他丁预处理使肺组织 Bcl-2 表达显著上升, Bax 和 caspase-3 表达显著减弱 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 6 万 U/kg 乌司他丁预处理使肺组织 BAL 中蛋白、WBC 含量显著减少 ($P < 0.05$)。**结论** 6 万 U/kg 乌司他丁预处理对缺血再灌注大鼠肺损伤具有保护作用, 其作用机制是改善肺组织的抗氧化作用。

关键词: 乌司他丁; 失血性休克; 大鼠; 肺组织损伤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 蛋白表达; 白细胞

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)02-0276-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.02.002

Protection of ulinastatin on lung tissue injury in hemorrhagic shock rats

ZHANG Lei, LI Wen-lan, JIA Yi-fan, QIAO Qian-qian, BU Xue-shan, WANG Wei, XIAO Xing-peng

Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430061, China

Abstract: **Objective** To study protective effects of ulinastatin pretreatment on lung tissue injury in hemorrhagic shock rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, and ulinastatin (30 000 and 60 000 U/kg) group, and each group had 8 rats. Rats in control group and model group were infused with 5 mL normal saline by tail vein in 20 min. Rats in ulinastatin groups were tail vein iv 5 mL ulinastatin solution 30 000 and 60 000 U/kg, respectively. After 4 h, 30 mL/kg of blood was extracted at a uniform rate through the femoral artery of the rats within 10 min to induce hemorrhagic shock. After the shock state was maintained for 60 min, the blood and Lactated Ringer's solution (30 mL/kg) were injected into the rats at a uniform rate through the tail vein for resuscitation within 30 min. After 4 h of recovery, SOD and MDA were determined, and the protein expressions of Bcl-2, Bax, and caspase-3 were determined by Western blotting method. Protein and WBC in BAL were measured, and the histopathological changes of lung were observed. **Results** Compared with the model group, ulinastatin pretreatment at 60 000 U/kg could significantly increase SOD activity and decreased MDA concentration in lung tissues ($P < 0.05$). Compared with the model group, ulinastatin pretreatment at 60 000 U/kg could significantly increase the expression of Bcl-2 in lung tissues, and decreased the expression of Bax and caspase-3 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the protein and WBC content in lung tissues were significantly reduced by 60 000 U/kg ulinastatin pretreatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Ulinastatin pretreatment at 60 000 U/kg has a protective effect on lung injury in ischemia reperfusion rats, and the mechanism is to improve the antioxidant effect of lung tissue.

Key words: ulinastatin; hemorrhagic shock; lung injury; SOD; MDA; protein expression; WBC

失血性休克是一种常见的临床现象, 其主要病理生理机制是重要的组织器官得不到足够的血液和

氧气来维持基本的代谢活动, 随后的再灌注往往加重了损伤^[1]。近年来的研究表明, 肺是失血性休克

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (2014CFB733)

作者简介: 张 蕾 (1977—), 男, 主治医师, 医学博士, 主要从事急性肺损伤研究。Tel: (027)88041911 E-mail: zl21st@163.com

*通信作者 肖兴鹏, 男, 副主任医师, 研究方向为急性肺损伤及疼痛。E-mail: nezhe@163.com

的重要靶器官之一,而并发症如急性肺损伤及其严重形式急性呼吸窘迫综合征通常伴随着较高的死亡率。虽然对失血性休克导致急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征的病理生理进行了深入的研究,但目前尚未发现有效的预防和治疗方法,因此发病率和死亡率仍然较高^[2-3]。据报道缺血预处理可以通过预刺激措施来有效地预防失血性休克中重要组织器官的损伤。迄今为止,人们对其机制进行了广泛的研究,发现缺血预处理的保护效应可以通过许多药物更安全的模仿出来^[4]。乌司他丁在临床上常被用作器官保护剂,保护器官组织免受缺血再灌注损伤。最近研究人员发现乌司他丁能够模拟预处理效果,并显示出对肺损伤的保护作用^[5]。以此推断,乌司他丁可能对失血性休克导致的急性肺损伤具有保护作用。因此本实验采用大鼠失血性休克模型,研究乌司他丁预处理是否会产生对急性肺损伤的保护作用,同时观察乌司他丁预处理对抗氧化功能的影响,并对乌司他丁保护作用的机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

赛默飞 Multiskan Spectrum 酶标仪,柯达 X 射线处理器 102 (Eastman Kodak), Quantity One 软件 (Bio-Rad)。注射用乌司他丁 (广东天普生化医药股份有限公司生产,规格 10 万 U/支,产品批号 031807194); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程有限公司); BCA 试剂盒 (BestBio Co.); Supersignal 化学发光检测试剂盒 (Pierce); 一抗包括 caspase-3、Bcl-2、Bax (Santa Cruz Biotechnology)、 β -actin (Abcam) 和抗兔二抗 (Pierce) 均购自试剂公司。

雄性 SD 大鼠,体质量 250~300 g,使用合格证号 43004700018748,武汉大学实验动物中心提供。本实验经过武汉大学人民医院生物伦理学委员会审查,所有程序遵照实验动物指导方案进行。

1.2 分组和给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组和乌司他丁 3、6 万 U/kg 组,每组各 8 只。对照组、模型组尾静脉在 20 min 内微量泵注 5 mL 生理盐水;乌司他丁组尾 iv 3、6 万 U/kg 乌司他丁溶液 5 mL。4 h 后,按 30 mL/kg 经大鼠股动脉通道在 10 min 之内匀速抽取血液诱发失血性休克,并通过放血或输血使大鼠股动脉压维持在 (40 $\pm$ 5) mmHg (控压模型)^[6]。维持休克状态 60 min 后,抽取的血液和乳酸林格氏

液 (30 mL/kg) 在 30 min 内通过尾静脉匀速输注到大鼠体内复苏。复苏 4 h 后取材做检测。

1.3 观察指标

1.3.1 SOD 活性和 MDA 水平的测定 按照试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测肺组织中 SOD 活性和 MDA 水平。

1.3.2 Western blotting 检测 caspase-3、Bcl-2、Bax 的表达 采用 BCA 法测定肺组织匀浆上清液中蛋白水平。含有 50 μ g 蛋白质的上清液通过 SDS-PAGE 分离并转移到硝酸纤维素膜上。一抗包括 caspase-3、Bcl-2、Bax 和 β -actin。然后将膜与 HRP 缀合的抗兔二抗 (1:20 000) 温育 1 h,并使用 Supersignal 化学发光检测试剂盒使印迹显色。使用射线处理器使蛋白质印迹可视化,采用 Quantity One 软件分析。

1.3.3 蛋白质和白细胞 (WBC) 水平测定 复苏后 4 h,通过向左主支气管注射 5 mL 磷酸盐缓冲盐水进行左肺支气管肺泡灌洗 (BAL)。循环进行两次,回收的液体进行蛋白质和 WBC 计数处理,使用 BCA 试剂盒测量蛋白质水平。

1.3.4 组织学观察^[7] 使用标准 HE 程序对大鼠右肺组织进行染色。实验程序未知的组织病理学家评分为 HE 切片 (0=正常;1=轻度;2=中度;3=重度)。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 ANOVA 和 Student-Newman-Keuls (SNK) 进行统计分析,比较所有组中的测量数据。

2 结果

2.1 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响

与对照组比较,模型组肺组织 SOD 活性显著降低,MDA 含量显著增加 ($P<0.05$)。与模型组比较,6 万 U/kg 乌司他丁预处理使肺组织 SOD 活性显著升高,MDA 含量显著下降 ($P<0.05$),而 3 万 U/kg 乌司他丁预处理效果并不明显,见表 1。

2.2 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 Bcl-2 表达显著下降,Bax、caspase-3 表达显著上升 ($P<0.05$)。与模型组比较,6 万 U/kg 乌司他丁预处理使大鼠肺组织 Bcl-2 表达显著上升,Bax、caspase-3 表达显著减弱 ($P<0.05$),而 3 万 U/kg 乌司他丁预处理效果并不明显,见图 1、表 2。

表1 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 SOD 和 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Effect of urinastatin on SOD and MDA in lung tissue of hemorrhagic shock rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(万 U·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	14.62 ± 0.72	1.18 ± 0.24
模型	—	4.38 ± 0.47*	5.28 ± 0.32*
乌司	3	6.12 ± 0.46	3.98 ± 0.26
他丁	6	8.33 ± 0.55 [#]	2.83 ± 0.25 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

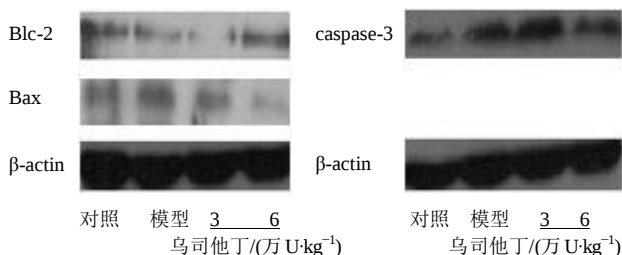


图1 失血性休克大鼠肺组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达
Fig. 1 Expressions of Bcl-2, Bax, and caspase-3 in lung of hemorrhagic shock rats

表2 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effect of urinastatin on Bcl-2, Bax and caspase-3 in lung of hemorrhagic shock rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(万 U·kg ⁻¹)	Bcl-2	Bax	caspase-3
对照	—	0.73 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.03
模型	—	0.31 ± 0.03*	0.71 ± 0.04*	0.69 ± 0.05*
乌司	3	0.42 ± 0.04	0.56 ± 0.03	0.52 ± 0.04
他丁	6	0.52 ± 0.04 [#]	0.45 ± 0.05 [#]	0.48 ± 0.04 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

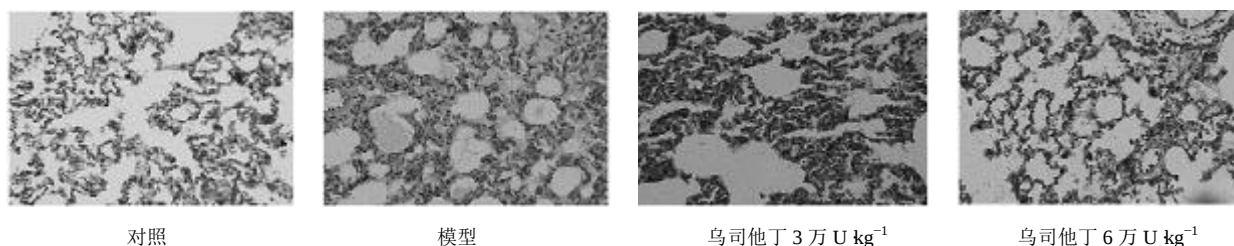


图2 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织组织学变化的影响 (HE 染色)

Fig. 2 Effect of ulinastatin on histological changes of lung tissue in hemorrhagic shock rats (HE staining)

2.3 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 BAL 中蛋白和 WBC 水平的影响

与对照组比较, 模型组 BAL 中蛋白、WBC 计数显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 6 万 U/kg 乌司他丁预处理使肺组织 BAL 中蛋白、WBC 含量显著减少 ($P < 0.05$), 而 3 万 U/kg 乌司他丁预处理效果并不明显, 见表 3。

表3 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 BAL 中蛋白和白细胞含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 3 Effect of urinastatin on protein and WBC in BAL in lung of hemorrhagic shock rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(万 U·kg ⁻¹)	蛋白/(mg·mg ⁻¹)	WBC 计数/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	—	0.41 ± 0.12	0.09 ± 0.04
模型	—	4.62 ± 0.48*	0.95 ± 0.15*
乌司	3	3.16 ± 0.45	0.62 ± 0.13
他丁	6	2.32 ± 0.47 [#]	0.40 ± 0.12 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

2.4 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织组织学变化的影响

模型组得分显著升高。6 万 U/kg 乌司他丁预处理对失血性休克后肺组织有保护作用, 而 3 万 U/kg 乌司他丁预处理效果并不明显, 见表 4、图 2。

表4 乌司他丁对失血性休克大鼠肺组织 HE 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4 Effect of urinastatin on HE scores in lung of hemorrhagic shock rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(万 U·kg ⁻¹)	HE 评分
模型	—	1.65 ± 0.12
乌司他丁	3	1.35 ± 0.13
	6	1.03 ± 0.11 [#]

与模型组比较: [#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs model group

3 讨论

据报道,氧化应激在缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[8]。与既往研究一致,本研究发现在失血性休克大鼠肺组织中氧化应激压力增加,其表现在MDA升高和SOD活性降低。MDA是氧自由基和脂质过氧化的降解产物,因此MDA的增加意味着损伤正常的膜结构和氧化损伤^[9]。然而,SOD被认为是具有多种生物学功能的重要细胞内抗氧化酶,可促使细胞清除氧自由基^[10-11]。以前的研究也报道了乌司他丁通过增加SOD和降低MDA来防止过氧化^[12]。本研究的结果也表明乌司他丁预处理有效增加缺血再灌注肺组织中SOD活性,降低MDA含量,提示乌司他丁预处理可以预防缺血再灌注肺组织的氧化损伤。

有证据表明氧化应激参与了缺血再灌注诱导的细胞死亡^[13]。本实验还发现肺组织中MDA含量和SOD活性与肺组织Bcl-2/Bax比值密切相关。Bcl-2和Bax均属于Bcl-2家族,已被确定为启动细胞死亡的关键因素之一。然而Bcl-2可能被认为是一种重要的细胞成分,不仅可以预防细胞死亡,还可以影响多种细胞事件。在近期的研究中发现Bcl-2能够阻止包括肺组织在内的一些器官的缺血再灌注损伤^[14-15]。相反,Bax则表现出促进细胞死亡效应,当Bax过度表达时,可能在线粒体膜上形成通道或孔隙,促进细胞色素c等因子的释放^[14]。因此Bcl-2/Bax蛋白比率可能是损伤后细胞存活的关键。本实验结果显示,乌司他丁增加Bcl-2的表达,降低Bax的表达,并导致Bcl-2/Bax比率增加。

caspase-3活化是细胞死亡级联反应的另一关键,Bcl-2/Bax比值是调节caspase-3蛋白表达的因素之一^[16]。研究表明,过度的氧化应激可能导致caspase-3活化,活化的caspase-3参与了染色质浓缩、DNA断裂和细胞骨架破坏等关键的下流细胞靶点,从而表达了细胞死亡的重要形态学变化。而且已经证实缺血再灌注是诱导caspase-3活化的途径之一^[17]。在本研究中,数据也显示在缺血再灌注肺组织中caspase-3蛋白表达的显著增加,与以前的研究一致。此外,实验还观察到乌司他丁预处理抑制了caspase-3蛋白表达。

细胞死亡被认为是缺血再灌注可能导致器官功能障碍或衰竭的机制之一。细胞死亡是组织器官功能损伤或衰竭的基本原因,其涉及Bcl-2/Bax的下调和caspase-3表达增加,通过激活不同的信号通

路,最终导致细胞受损并死亡^[18-19]。研究表明,缺血再灌注可引发细胞死亡级联反应,当细胞死亡被抑制时,器官功能得到显著改善^[18-19]。本实验中,还发现乌司他丁预处理减少了缺血再灌注后BAL中蛋白和白细胞的含量,降低了肺组织病理评分,提示乌司他丁预处理可明显改善缺血再灌注引起的肺损伤。

但是,这项研究有一些明显的局限性需要解决,包括采样时间点、简短的观察时间以及与肺损伤的临床测量值缺乏相关性。因此,相关研究需要在模型中进一步探讨。

在本实验中发现乌司他丁预处理显著减轻了失血性休克大鼠的肺损伤。6万U/kg乌司他丁预处理可降低肺组织MDA含量,提高SOD活性。6万U/kg乌司他丁预处理能增加Bcl-2/Bax比值,降低caspase-3的表达。6万U/kg乌司他丁预处理可以有效保护肺组织减少其组织病理学改变。数据显示6万U/kg乌司他丁预处理可以有效减少缺血再灌注引起的肺损伤,其保护作用可能与抗氧化有关。

参考文献

- [1] Butti A. Recent developments in the physiopathology of hemorrhagic shock and current possibilities of its treatment [J]. *Chir Patol Sper*, 1969, 17(5): 373-404.
- [2] Matthay M A, Zemans R L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment [J]. *Annu Rev pathol*, 2011(6): 147-163.
- [3] Ware L B, Matthay M A. The acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18): 1334-1349.
- [4] 李波, 韩园园, 王宴平, 等. 格列齐特对2型糖尿病大鼠心肌缺血预适应保护作用的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(7): 711-716.
- [5] 刘伟, 柴家科. 乌司他丁对烧伤复合伤大鼠急性肺损伤及凝血参数时相性变化的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2018, 34(1): 32-39.
- [6] 钟娃, 蒋龙元, 姜骏, 等. 乌司他丁对失血性休克大鼠血流动力学及多器官保护的研究 [J]. *中山大学学报*, 2006, 27(3S): 49-51.
- [7] 刘洪恩, 王海龙, 蒋志伟, 等. 腹膜淋巴回流途径在腹腔感染早期内毒素肺损伤中的作用 [J]. *广东医学*, 2015, 36(21): 3330-3333.
- [8] Oliva J. Proteasome and organs ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 19(1): E106.
- [9] Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366(1-2): 53-67.
- [10] Xiao J, Rui Q, Guo Y, et al. Prolonged manganese

- exposure induces severe deficits in lifespan, development and reproduction possibly by altering oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Environ Sci*, 2009, 21(6): 842-848.
- [11] Benov L, Batinic-Haberle I. A manganese porphyrin suppresses oxidative stress and extends the life span of streptozotocin-diabetic rats [J]. *Free Radic Res*, 2005, 39(1): 81-88.
- [12] 曹 玥, 陈 虎, 陈 凯, 等. 乌司他丁对糖尿病脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(2): 228-231.
- [13] 李 雪, 赵明智, 张安易, 等. 番茄红素对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(6): 637-641.
- [14] Yousefi H, Ahmadiasl N, Alihemmati A, *et al.* Effect of renal ischemia-reperfusion on lung injury and inflammatory responses in male rat [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(10): 802-807.
- [15] Zhang C, Guo Z, Liu H, *et al.* Influence of levosimendan postconditioning on apoptosis of rat lung cells in a model of ischemia-reperfusion injury [J]. *PloS One*, 2015, 10(1): e0114963.
- [16] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 1998, 82(11): 1111-1129.
- [17] 乔 霖, 赵 薇, 王新生, 等. 丙泊酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其 Caspase-3 表达干预机制的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(6): 629-632.
- [18] van Heerde W L, Robert-Offerman S, Dumont E, *et al.* Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(3): 549-559.
- [19] Veena V K, Popavath R N, Kennedy K, *et al.* In vitro antiproliferative, pro-apoptotic, antimetastatic and anti-inflammatory potential of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) by *Pseudomonas aeruginosa* strain FP10 [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(10): 1281-1295.