

乌司他丁对梗阻性黄疸大鼠肺的保护作用

朱敏^{1△}, 黄美英^{2△}, 陈伟新³, 汤朝晖^{4*}, 杨立群¹, 俞卫锋¹

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438
2. 宁海力洋中心卫生院, 宁波 315602
3. 复旦大学附属中山医院青浦分院普通外科, 上海 201700
4. 上海交通大学医学院附属新华医院普通外科, 上海 200092

[摘要] **目的** 观察乌司他丁治疗后梗阻性黄疸大鼠肺的炎性浸润以及组织形态学改变, 探讨乌司他丁对梗阻性黄疸大鼠肺的保护作用及其机制。 **方法** 通过胆总管结扎来建立梗阻性黄疸大鼠模型。乌司他丁治疗组术后每天给予乌司他丁 10 万 U/kg 的剂量腹腔注射给药, 梗阻性黄疸对照组不进行治疗。分别在术后第 1、3、7、14 天取材, 检测大鼠的肝功能、肺组织病理, 计算干湿比及含水率, 并测定肺通透性指标(伊文思蓝含量)、肺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性以及丙二醛(MDA)含量, 免疫组化测定肺组织标本 TNF- α 和 IL-1 β 表达。 **结果** 乌司他丁治疗组血清胆红素含量、肺组织干湿比及含水率与梗阻性黄疸对照组相比, 差异无统计学意义。而乌司他丁治疗组 MPO、MDA 及伊文思蓝含量较梗阻性黄疸对照组下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。乌司他丁治疗组与梗阻性黄疸对照组比较, 肺间质水肿减轻, 炎性细胞浸润和肺泡内红细胞渗出减少。乌司他丁治疗组第 1 天和第 14 天的 TNF- α 和 IL-1 β 表达均低于同期梗阻性黄疸对照组。 **结论** 乌司他丁可抑制梗阻性黄疸大鼠致炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 在肺组织中的表达, 降低中性粒细胞浸润并减少氧自由基的产生, 改善肺泡毛细血管通透性, 降低肺内炎症反应。

[关键词] 乌司他丁; 梗阻性黄疸; 毛细血管通透性; 髓过氧化物酶; 丙二醛; 肺损伤

[中图分类号] R 657.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1208-05

Protective effect of ulinastatin against cholestasis-associated lung injury in rats

ZHU Min^{1△}, HUANG Mei-ying^{2△}, CHEN Wei-xin³, TANG Zhao-hui^{4*}, YANG Li-qun¹, YU Wei-feng¹

1. Department of Anesthesia & Intensive Care, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Liyang Health Centre of Ninghai, Ningbo 315602, Zhejiang, China
3. Department of General Surgery, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700, China
4. Department of General Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To observe the inflammatory infiltration and morphological changes of lung after treatment with ulinastatin in cholestatic rats, so as to study the protective effect of ulinastatin on the lung of cholestatic rats. **Methods** Rat obstructive jaundice models were established by bile duct ligation ($n = 48$). Ulinastatin (UTI, 100 000 U/kg) was injected intraperitoneally after operation. The lung tissues were collected at day 1, 3, 7, and 14 after operation. The hepatic function and pulmonary pathology were observed after treatment; dry/wet ratio and water content were calculated. The parameters for alveolar capillary permeability, content of myeloperoxidase (MPO), and activity of malondialdehyde (MDA) were also assessed. Expression of TNF- α and IL-1 β was examined by immunohistochemical method. **Results** The serum bilirubin, dry to wet ratio and water content of the lung tissues were not significantly different between UTI group and jaundice group ($P > 0.05$). The levels of evans blue dyes (EBD), MPO, and the activity of MDA in UTI group were significantly lower than that in the jaundice group and UTI groups at the same time points ($P < 0.05$). The pulmonary histology showed alleviated edema, less

[收稿日期] 2011-03-09 **[接受日期]** 2011-08-20

[基金项目] 上海市科技启明星计划(08QA14007), 2009 年度天普科研基金。Supported by Shanghai Rising Star Program (08QA14007) and 2009 Tian-pu Research Fund.

[作者简介] 朱敏, 硕士, 主治医师。E-mail: minzhu1977@163.com; 黄美英, 主治医师。E-mail: lqyang72721@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875235, E-mail: tzh1236@163.com

neutrophil infiltration and RBC in alveolar space in UTI group compared to jaundice group. The pulmonary expression of and IL-1 β and TNF- α was significantly lower in UTI group than that in jaundice group on day 1 and day 14 ($P < 0.01$). **Conclusion** Ulinastatin can inhibit pulmonary expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β and decrease MPO activity and MDA levels in bile duct-ligated rats, thus improving the permeability of the pulmonary capillary membrane in obstructive jaundice rats and decreasing the pulmonary inflammatory reactions.

[Key words] ulinastatin; obstructive jaundice; capillary permeability; myeloperoxidase; malondialdehyde; lung injuries

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11): 1208-1212]

梗阻性黄疸 (obstructive jaundice, OJ) 是常见的临床综合征, 不但引起肝脏损害, 还可对全身其他脏器造成严重损害, 形成全身多器官、多系统功能与形态学的改变, 影响治疗效果。尽管外科手术和重症监护手段在不断地提高, 其围术期并发症发生率和病死率仍居高不下^[1]。胆道梗阻后可造成肠道内毒素的“泛滥”入血, 内毒素又可作用于炎性细胞和内皮细胞, 刺激细胞释放 IL-1 和 TNF- α 等细胞因子, 引起一系列全身炎症反应, 包括出血、白细胞浸润、血管扩张、血管通透性增高和血浆蛋白渗出等^[2]。肺作为全身炎症反应的一个重要的效应器官, 在多器官功能障碍综合征 (MODS) 的发生发展中, 肺功能不全及衰竭出现得最早, 发生率约为 83%~100%。因此针对梗阻性黄疸所引起的机体损伤尤其是肺损伤的保护措施已成为亟待解决的重要问题^[3]。

乌司他丁 (ulinastatin, UTI) 是从男性尿中分离纯化的尿胰蛋白酶抑制剂, 为糖蛋白, 含有 143 个氨基酸, 相对分子质量约 67 000, 是一种典型的 Kuniz 型的蛋白酶抑制剂, 具有两个活性功能区^[4]。这两个活性功能区均有很广的抑酶谱, 且不完全重叠, 能够同时竞争性或非竞争性抑制胰蛋白酶、磷脂酶 A₂、透明质酸酶、弹性蛋白酶等多种水解酶的活性以及炎性介质的释放, 同时能稳定溶酶体膜和清除体内氧自由基, 临床上在急性胰腺炎、休克、体外循环手术中的应用已初见成效。乌司他丁对梗阻性黄疸相关肺损伤是否存在较强的保护作用, 国内外尚未见有相关报道。

本研究选取胆总管结扎的梗阻性黄疸 SD 大鼠模型, 应用乌司他丁进行干预治疗, 观察胆管阻塞后以及应用乌司他丁治疗后不同时期肝脏功能的变化和肺毛细血管通透性和病理形态学的变化, 同时采用免疫组化技术检测肺组织 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 观察梗阻性黄疸相关肺损伤的情况和乌司他丁在其中的治疗效果, 探讨乌司他丁的肺保护作用和

可能机制。

1 材料和方法

1.1 试剂 TNF- α 、IL-1 β 一抗购自美国 ADI 公司, 二抗均购自上海长岛抗体试剂诊断公司。伊文思蓝 (Evans blue dye, EBD, Fluka 公司); 甲酰胺 (上海生工生物工程技术有限公司); 髓过氧化物酶 (MPO) 及丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 大鼠胆总管结扎模型的制作及分组 雄性 SD 大鼠 144 只, 体质量 180~200 g, 购自第二军医大学实验动物中心。随机分成假手术组 (Sham) 和梗阻性黄疸对照组及乌司他丁治疗组, 每组 48 只。大鼠术前禁食但不禁水, 3% 戊巴比妥钠 30~40 mg/kg 剂量进行腹腔注射麻醉。取上腹部正中切口开腹, 沿肝十二指肠韧带找到胆总管, 结扎并离断胆总管, 制作梗阻性黄疸模型^[5]。假手术组仅进行胆总管游离但不结扎。分别于手术后第 1、3、7、14 天取材, 每个时间点取 12 只大鼠。其中 6 只大鼠抽静脉血, 并取肺组织; 另 6 只大鼠经尾静脉注射 0.5% EBD (20 mg/kg), 自由喂养 4 h 后放血处死取肺组织。乌司他丁组在胆总管结扎术后每天腹腔注射乌司他丁 10 万 U/kg, 梗阻性黄疸对照组不进行治疗。

1.3 肝功能的测定 开腹下腔静脉取血 3 ml, 静置后用离心机 1 200 \times g 离心 10 min, 取血清置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 日立牌肝功能全自动分析仪测定血中胆红素、转氨酶水平。

1.4 肺通透性指标 (1) 肺干湿比、含水率: 在相应时间点放血处死动物, 取右肺下叶, 准确称取湿质量后, 于 85 $^{\circ}$ C 干烤箱烘烤 24 h 后再次称量为干质量。干湿比 = 干质量/湿质量; 含水率 (%) = (湿质量 - 干质量)/湿质量 \times 100%。(2) EBD 含量的测定: 大鼠取样前 4 h 于尾静脉注射 0.5% 的 EBD (20 mg/kg), 自由喂养。放血处死大鼠后, 开胸取肺, 以滤纸吸干表面血迹, 剪去周围组织并剪碎。准确称

取肺组织 300 mg,按每 100 mg 待测肺组织加入 1 ml 甲酰胺的方法抽提 EBD。置 37℃ 水浴箱中水浴 24 h,取出组织离心后用 722 分光光度计于 620 nm 处进行比色,测定上清液的光密度。用标准品制作 EBD 标准曲线,根据标准曲线计算渗漏至肺组织中的 EBD 含量,以反映肺毛细血管膜通透性的变化。

1.5 肺组织 MPO 活性及 MDA 含量的测定 MPO 为中性粒细胞 (PMNs) 标志性酶, MPO 活性反映了中性粒细胞的数量; MDA 为肝细胞过氧化水平的指标。具体测定按试剂盒说明书进行。

1.6 肺组织病理检查及肺组织 TNF- α 、IL-1 β 免疫组化测定 大鼠处死后,取右肺上叶组织小块,10% 甲醛溶液固定,常规制备石蜡包埋切片, H-E 染色后,光镜下观察病理改变。常规免疫组化染色观察 TNF- α 和 IL-1 β 的表达。

1.7 统计学处理 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析,多个样本间的比较采用

可重复资料的方差分析。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况 本研究各组均无大鼠死亡。胆总管结扎 24 h 后,梗阻性黄疸对照组大鼠尿液颜色开始变黄。3~4 d 时全身肤色开始变黄,食欲减少较假手术组不明显。术后 1~2 周近肝脏胆总管残端呈囊状扩张,直径可达 0.8~1.2 cm;腹腔有少许液体渗出;肝脏弥漫性肿大,质地变硬呈深黄褐色。乌司他丁治疗组大鼠情况与梗阻性黄疸对照组相似,但程度较轻。肉眼观察各组大鼠肺部均未见组织液黄染和渗出。

2.2 血清胆红素含量的变化 梗阻性黄疸对照组血清胆红素含量与假手术组相比明显升高,两组在相同时间点差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组第 3 天时的血清胆红素含量均明显高于第 7 天和第 14 天,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。乌司他丁治疗组与梗阻性黄疸对照组变化基本一致。

表 1 各组大鼠血清总胆红素含量

Tab 1 Serum total bilirubin levels of rats in each group

($n=6, \bar{x} \pm s, c_B / [\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$)

Group	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14
Sham	1.90 ± 1.11	2.47 ± 1.34 Δ	1.37 ± 0.15	1.90 ± 0.81
Jaundice control	70.77 ± 7.35*	150.89 ± 40.01* Δ	92.07 ± 19.43*	93.55 ± 3.67*
Ulinastatin treatment	70.97 ± 8.69*	140.53 ± 23.03* Δ	95.00 ± 19.48*	90.25 ± 7.52*

* $P < 0.05$ vs Sham group

2.3 肺毛细血管通透性的变化 由表 2 可见,3 组动物各时间点肺组织的干湿比和含水率差异均无统计学意义。EBD 含量的测定结果显示,在第 7 天及

第 14 天乌司他丁治疗组与相应时间点的梗阻性黄疸对照组相比降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织干湿比、含水率及伊文思蓝含量

Tab 2 Alveolar capillary permeability and Evens-blue dye (EBD) content in each group

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	D/W	Water ratio (%)	EBD $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$
Sham	0.206 ± 0.004	79.37 ± 0.35	6.138 ± 0.151
Jaundice control			
Day 1	0.210 ± 0.007	78.98 ± 0.70	6.328 ± 0.257
Day 3	0.210 ± 0.004	78.97 ± 0.42	6.116 ± 0.213
Day 7	0.207 ± 0.008	79.26 ± 0.78	6.154 ± 0.582
Day 14	0.205 ± 0.004	79.52 ± 0.47	6.124 ± 0.247
Ulinastatin treatment			
Day 1	0.215 ± 0.003	78.55 ± 0.28	6.309 ± 0.365
Day 3	0.209 ± 0.004	79.10 ± 0.39	6.227 ± 0.254
Day 7	0.204 ± 0.004	79.57 ± 0.44	5.310 ± 0.310 * Δ
Day 14	0.196 ± 0.013	79.60 ± 0.55	5.450 ± 1.264 * Δ

D/W: Dry mass to wet mass ratio. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs the levels in jaundice groups at the same day

2.4 肺组织中 MPO 活性和 MDA 含量的变化 由表 3 可见, 乌司他丁治疗能有效降低黄疸大鼠肺组织 MPO 活性和 MDA 含量, 乌司他丁治疗组各时间点肺组织 MPO 活性和 MDA 含量均较梗阻性黄疸对照组下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠肺组织 MPO 活性及 MDA 含量
Tab 3 Pulmonary MPO content and MDA activity

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	MPO ($U \cdot g^{-1}$)	MDA $c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$
Sham	0.140 ± 0.009	5.75 ± 0.34
Jaundice control		
Day 1	0.199 ± 0.009	15.37 ± 3.56
Day 3	0.183 ± 0.014	7.80 ± 1.39
Day 7	0.172 ± 0.021	7.39 ± 1.43
Day 14	0.146 ± 0.015	10.36 ± 4.29
Ulinastatin treatment		
Day 1	0.174 ± 0.003 Δ	5.81 ± 5.70 Δ
Day 3	0.090 ± 0.022* Δ	1.52 ± 2.29* Δ
Day 7	0.117 ± 0.017* Δ	1.53 ± 3.40* Δ
Day 14	0.093 ± 0.006* Δ	2.82 ± 3.73* Δ

MPO: Myeloperoxidase; MDA: Malondialdehyde. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs the levels in jaundice groups at the same day

2.5 肺组织的病理变化 乌司他丁治疗组第 1 天和第 14 天肺间质轻度水肿, 肺泡腔伴有少量炎性细胞浸润、红细胞渗出, 较之相同时间的梗阻性黄

疸对照组大鼠肺组织炎性表现显著减轻, 渗出减少, 肺泡结构相对完整(图 1)。

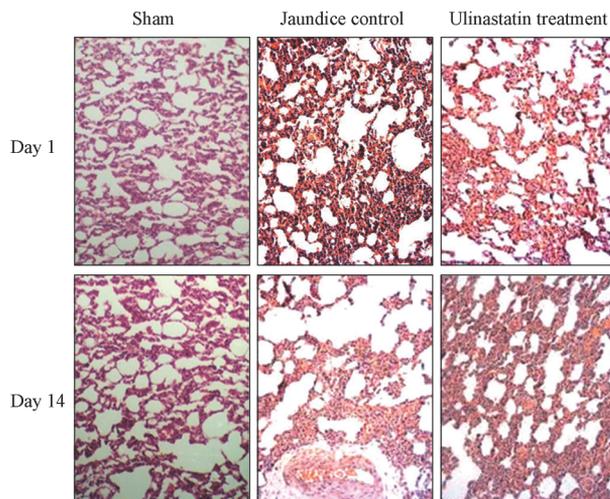


图 1 各组大鼠术后第 1 天和第 14 天肺组织病理学改变

Fig 1 Pathology of lung tissues 1 d and 14 d after ulinastatin treatment in each group

Original magnification: $\times 200$

2.6 肺组织标本的 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的表达 由图 2 可见, 无论在第 1 天还是第 14 天, 乌司他丁治疗组 $TNF-\alpha$ 的表达较梗阻性黄疸对照组下降, 与假手术组较接近。而乌司他丁治疗组第 1 天 $IL-1\beta$ 的表达较梗阻性黄疸对照组和假手术组都降低, 且其第 14 天 $IL-1\beta$ 的表达较梗阻性黄疸对照组也降低。

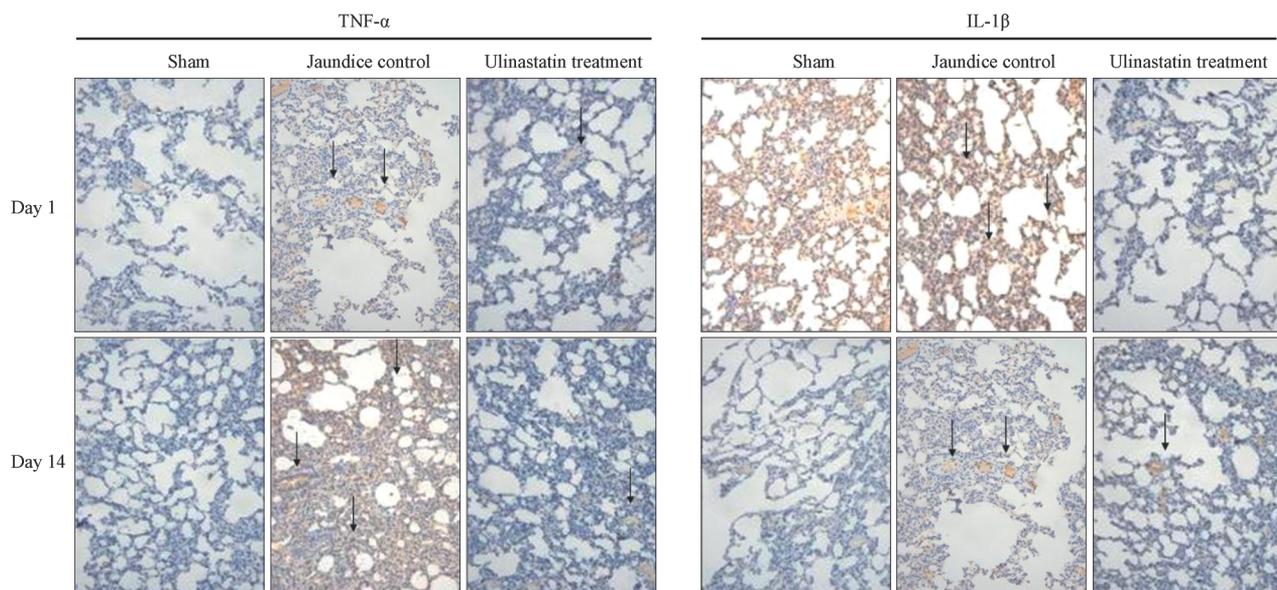


图 2 各组第 1 天和第 14 天肺组织 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 免疫组化染色

Fig 2 Immunohistology of $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ in lung tissues 1 d and 14 d after ulinastatin treatment in each group

Arrows showing the positive staining. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

梗阻性黄疸时机体内产生的内毒素增加从而导致机体炎症因子的大量释放可能是造成肺损伤的重要原因之一^[6]。此种肺部损伤在无其他重要脏器功能障碍和合并症时,并无明显的临床症状和体征,损伤主要表现在亚器官及以下水平。从我们的研究结果也可以看出,尽管梗阻性黄疸对照组大鼠肺组织前炎症因子和过氧化指标 MDA 的含量显著高于假手术组,但肺组织通透性指标变化并不明显,这一点也说明梗阻性黄疸的肺组织病理改变处于亚临床水平。但胆汁淤积的存在增加了肺部感染和肺功能障碍的发生率。相关研究证实梗阻性黄疸大鼠体内存在明显的内毒素血症^[7]。内毒素介导的炎症反应使得中性粒细胞在肺组织大量聚集,从而造成了相应的肺损伤。中性粒细胞是造成其过度性炎症反应的元凶,它在肺内和(或)循环血液中各种炎性刺激的作用下,黏附于内皮并被激活,然后游出肺毛细血管床并持续活化,释放一系列损伤介质,可引起弥漫性肺泡损害,最终导致急性肺损伤。活化的中性粒细胞经脱颗粒作用,释放弹性蛋白酶(NE)、基质金属蛋白酶(MMP)和 MPO 等多种蛋白酶,分解胞外纤维与基质,损伤肺组织^[8]。

乌司他丁是近年来研制成功并已广泛应用于临床的一种广谱蛋白酶抑制剂,能够稳定溶酶体膜,抑制炎症介质的过度释放和清除氧自由基等^[9],可通过抑制体内广泛分布的丝氨酸蛋白酶活性调节炎症细胞因子释放、抑制血细胞激活和白细胞跨内皮迁移、减少炎症细胞浸润及组织毒性物质释放等,表现为多层次的抗炎效应,对全身多个重要脏器均有保护作用^[10-14]。本研究发现经乌司他丁治疗的大鼠肺组织 MPO 活性明显降低,表明乌司他丁可能通过抑制中性粒细胞在肺组织中的渗出量,抑制中性粒细胞释放蛋白酶,减轻肺局部组织损伤,发挥其保护肺功能的作用。

本实验中肺的组织学改变以及肺组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量表达的变化结果表明乌司他丁可通过抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的产生,进而抑制中性粒细胞活化,阻止炎症反应,达到保护肺功能的目的。

虽然阻塞性黄疸肺组织通透性变化尚处于亚临床水平,但我们证实乌司他丁仍可降低黄疸大鼠肺组织通透性指标,更说明乌司他丁对梗阻性黄疸大鼠相关肺的损伤有一定的保护作用,值得深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘 海. 阻塞性黄疸肝脏损伤机理研究新进展[J]. 临床肝胆病杂志, 1996, 12: 125-127.
- [2] Sewnath M E, van der Poll T, van Noorden C J, ten Kate F J, Gouma D J. Cholestatic interleukin-6-deficient mice succumb to endotoxin-induced liver injury and pulmonary inflammation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169: 413-420.
- [3] Greve J W, Gouma D J, Soeters P B, Buurman W A. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats[J]. Gastroenterology, 1990, 98: 478-485.
- [4] Ito K, Mizutani A, Kira S, Mori M, Iwasaka H, Noguchi T. Effect of ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats *via* the inhibition of activated leukocytes[J]. Injury, 2005, 36: 387-394.
- [5] Cameron G R, Oakley C L. Ligation of the common bile duct [J]. J Pathol Bacteriol, 1932, 35: 769-798.
- [6] 黎乐群, 彭民浩. 肝切除术后应用乌司他丁对肝、肾功能的保护作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7: 249-251.
- [7] 大西治夫, 小雀浩司, 延原正弘. 蛋白分解酵素阻害 ulinastatin の药理作用[J]. 应用药理(日), 1986, 31: 663-675.
- [8] Okuhama Y, Shiraishi M, Higa T, Tomori H, Taira K, Mamadi T, et al. Protective effect of ulinastatin against ischemia-reperfusion injury [J]. Surg Res, 1999, 82: 34-42.
- [9] Xiaoqiao Z, Rong M, Zhigang Y, Yong D, Xihong F, Jingzhong S. Protective effect of ulinastatin against ischemia-reperfusion injury in rat small bowel transplantation[J]. Transplant Proc, 2004, 36: 1564-1566.
- [10] Quaedackers J S, Beuk R J, Bennet L, Charlton A, oude Egbrink M G, Gunn A J, et al. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel [J]. Transplant Proc, 2000, 32: 1307-1310.
- [11] 王晓琳, 张 宏, 刘 荣. 乌司他丁对肝缺血-再灌注后急性肺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 432-434.
- [12] 尹 勇, 高乃荣, 李兆丽. 乌司他丁对急性坏死型胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10: 558-561.
- [13] Aibiki M, Cook J A. Ulinastatin, a human trypsin inhibitor, inhibits endotoxin-induced thromboxane B2 production in human monocytes[J]. Crit Care Med, 1997, 25: 430-434.
- [14] 强 喆, 周丕均, 李玉兰, 李天成, 陈春红. 体外循环期间乌司他丁对肺功能的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2004, 24: 57-58.

[本文编辑] 徐 佳, 孙 岩