

· 基础研究 ·

乌司他丁对羊多脏器功能障碍综合征的防护作用

罗晓红¹, 万东君², 牛廷献^{3*}, 王春雨¹, 付学锋², 凡春玲², 陆璐³, 史智勇³(兰州军区兰州总医院: ¹内分泌科, ²干部病房, ³动物实验科, 兰州 730050)

【摘要】目的 探讨乌司他丁(UTI)对多脏器功能障碍综合征(MODS)的防治作用。**方法** 21只杜泊绵羊随机分为对照组、模型组、UTI治疗Ⅰ组和治疗Ⅱ组。模型组、治疗Ⅰ组和Ⅱ组静脉注射内毒素(6μg/kg), 治疗Ⅰ组静脉注射UTI(30 000U/kg), 1次/d, 连续3d, 治疗Ⅱ组静脉注射UTI(30 000U/kg), 2次/d, 连续3d。各组分别于0, 1, 2, 3, 6和12h时间点测定动脉氧分压; 于0, 3, 6, 12, 24, 48和72h测定脏器生化指标天门冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、肌酐(Cr)和血常规指标。结果 与模型组比较, UTI治疗组的氧分压下降幅度小; 治疗组AST、ALT、TBIL和Cr的升高明显低于模型组($P<0.05$), 治疗Ⅰ组和Ⅱ组之间各项指标改善无统计学差异; 模型组、治疗Ⅰ组和Ⅱ组绵羊的死亡率分别为66.6%、50.0%和33.3%。结论 预防性应用UTI能降低内毒素诱导的MODS模型绵羊的死亡率, 提高动脉氧分压, 减轻内毒素所致的肺、肝和肾等脏器的损伤, 具有保护作用。

【关键词】 乌司他丁; 多脏器功能障碍综合征; 内毒素

【中图分类号】 R59

【文献标识码】 A

【doi】 10.3724/SP.J.1264.2011.00039

Protective effects of ulinastain on multiple organ dysfunction syndrome in sheep models

LUO Xiaohong¹, WAN Dongjun², NIU Tingxian^{3*}, WANG Chunyu¹, FU Xuefeng², FAN Chunling², LU Lu³, SHI Zhiyong³(¹Department of Endocrinology, ²Cadre's Ward, ³Department of Animal Experiment, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

【Abstract】 Objective To determine the protective effect of ulinastain(UTI) on multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods** Sheep models of MODS were induced by lipopolysaccharide(LPS). The animals were randomly divided into four groups: normal control group, MODS group, UTI treatment group I and group II. The anaesthetized animals received intravenous infusion of LPS (6μg / kg) to induce MODS in MODS group and UTI treatment groups. The animals received intravenous injection of UTI (30000U/kg) for 3 days, once daily in UTI treatment group I and twice daily in group II. Arterial oxygen pressure(PaO₂) was measured at 0(basement), 1, 2, 3, 6 and 12h respectively. Blood samples were taken for determination of serum alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine(Cr), total bilirubin(TBIL) and blood routine at 0(basement), 3, 6, 12, 24, 48 and 72h respectively. **Results** PaO₂ decreased as early as at 1 hour after injection of LPS. Compared with MODS group, PaO₂ decreased less significantly in UTI treatment group. AST, ALT, TBIL and Cr in UTI treatment groups were significantly lower than those in MODS group($P<0.05$), but there was no obvious difference between UTI treatment group I and group II. The animal mortality was 66.6%, 50.0 % and 33.3% in MODS group, UTI treatment group I and group II respectively. **Conclusion** Prophylactic application of UTI could reduce the mortality of MODS animals induced by LPS. It has protective effects on lung, kidney and liver injuries in MODS animals.

【Key words】 ulinastain; multiple organ dysfunction syndrome; lipopolysaccharide

This work was supported by Gansu Province Nature Science Foundation(1010RJZA052)

多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是严重感染、休克或创伤后导致的严重并发症, 病死率高达60%~98%^[1]。尽管其发病机制尚未完全阐明, 但炎症应激

反应链参与了MODS调控的全过程^[2], 能否将病死率较高的MODS干预治疗推向早期的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)阶段, 尚有许多问题值得探索。乌司他丁

收稿日期: 2011-04-19; 修回日期: 2011-08-26

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1010RJZA052)。

通讯作者: 牛廷献, Tel: 0931-8994637, E-mail: niutx10000@163.com

(ulinastatin, UTI) 是肝脏分泌的一种糖蛋白^[3], 已广泛用于急性胰腺炎、急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 等治疗, 但其对 MODS 的预防及早期干预治疗的疗效、对多器官保护的程 度、时效及剂量效应的关系如何, 仍值得深入探讨。本研究利用内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 建立绵羊 MODS 模型, 对 UTI 防治 MODS 进行了前瞻性系列研究, 以进一步明确其干预效果及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

21 只 1 年龄杜泊绵羊[兰州军区兰州总医院动物实验科提供, 设施使用许可证号: SYXK (军) 2009-022], 雌雄各半, 体重 (20±1.5) kg, 全价饲料饲养。麻醉药物为速眠新 II 号[军事医学科学院军事兽医研究, 长春, 兽药试字 (2004) 005013], LPS (血清型 O127: B8, 批号 64H4010, 美国 Sigma 公司), 乌司他丁 (广东天普升华医药股份有限公司生产, 产品批号 031009081)。血气分析仪: Phox 系列 Novo, 生化分析仪: Beckman 公司, Coulter LX20。

1.2 模型建立与分组处理

制模方法参照文献[4], 21 只绵羊均用速眠新 II 号 (1.5ml/kg) 肌内注射麻醉后, 随机抽取 3 只作为对照组, 余 18 只绵羊经前肢桡静脉泵入 LPS (按 6 μg/kg 在 30min 内), 制作 MODS 模型, 随机分为模型组、治疗 I 组和治疗 II 组。待 LPS 静脉泵入完毕后, 治疗组绵羊静脉滴注 UTI (溶于 500ml 5%葡萄糖注射液, 每次 30 000 U/kg, 1~2 h 滴完), 治疗 I 组静脉注射 UTI, 1 次/d, 治疗 II 组, 2 次/d, 连续使用 3 d。对照组麻醉后给予等剂量 5%葡萄糖注射液静脉注射。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 血气分析 对照组、模型组、治疗 I 组和治疗 II 组绵羊分别于 0, 1, 2, 3, 6 和 12 h 经股动脉采血, 进行血气分析。

1.3.2 血常规和血清生化指标测定 分别于 0, 3, 6, 12, 24, 48 和 72 h 经颈静脉采血, 测定白细胞 (white blood cell, WBC) 数和生化指标, 包括谷草转氨酶

(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 和肌酐 (creatinine, Cr)。

1.4 MODS 的诊断标准

参照胡森等^[5]提出的动物发生 MODS 时各个器官功能障碍分期诊断标准和评分标准。在注射 LPS 后出现 2 个或 2 个以上器官或系统功能障碍判定为 MODS。

1.5 统计学处理

数据以均数±标准差表示, 利用 SPSS10.0 统计分析软件对数据进行处理, 两组之间比较采用 *t* 检验, 组内比较采用方差分析。

2 结果

2.1 体征表现及死亡率

模型组、治疗 I 组和治疗 II 组绵羊静脉泵入 LPS 2 h 后, 出现呼吸频率加快、心率增快、腹胀、尿频、发热; 苏醒后食欲显著减退、腹胀、精神萎靡、呼吸急促、四肢无力。两治疗组的临床表现与模型组相比, 症状体征明显减轻。24 h 后, 模型组 4 只、治疗 I 组 3 只和治疗 II 组 2 只绵羊死亡, 死亡率分别为 66.7%、50%和 33.3%, 对照组无 1 例死亡 (表 1)。

2.2 血气分析

静脉注射 LPS 后, 模型组及治疗组绵羊股动脉氧分压 (PaO₂) 均明显下降, 2 h 降至最低, 6 h 后逐渐恢复, 12 h 趋于正常 (表 2)。治疗 I 组和 II 组的 PaO₂ 值虽高于模型组, 但 3 组间相比无统计学差异 (*P*>0.05)。

2.3 血清生化指标的变化

如表 3 所示, 给予静脉注射 LPS 后, 与对照组相比, 模型组及治疗组 AST 和 ALT 分别于 6 h 和 12 h 开始升高, 48 h 达到高峰, 72 h 后下降; 与模型组相比, 治疗组的峰值明显较低 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)。治疗 II 组的水平虽较治疗 I 组略低, 但无统计学差异。TBIL 和 Cr 的水平变化趋势与 AST 和 ALT 基本相同。

表 1 各组绵羊 2 h 时体征表现及 24 h 后死亡率比较

组别	<i>n</i>	呼吸频率(次/min, $\bar{x} \pm s$)	心率(次/min, $\bar{x} \pm s$)	体温(°C, $\bar{x} \pm s$)	死亡率(%)
对照组	3	18.5±5.2	75.6±7.4	38.3±0.5	0
模型组	6	67.6±7.8**	172.8±12.5**	41.0±1.0	66.7
治疗 I 组	6	48.3±5.2** [#]	116.6±15.3** [#]	41.3±0.6	50
治疗 II 组	6	47.5±5.9** [#]	118.2±16.9** [#]	40.8±0.4	33.3 [#]

注: 与对照组比较, ***P*<0.01; 与模型组比较, [#]*P*<0.05

表 2 各组不同时点 PaO₂ 比较

(mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0h	1h	2h	3h	6h	12h
对照组	3	66.5±8.3	68.2±9.6	67.8±7.9	65.8±10.5	63.8±9.4	64.7±7.6
模型组	6	68.4±7.8	38.2±5.1*	28.2±4.3**	32.9±3.1**	35.8±6.7*	57.1±6.4
治疗Ⅰ组	6	64.2±6.4	35.8±6.5*	32.1±6.8**	36.9±4.7*	43.5±5.9	59.4±4.8
治疗Ⅱ组	6	67.6±4.3	41.3±6.2*	38.3±3.2**	39.1±5.3**	45.8±4.5	60.4±5.1

注: 1 mmHg=0.133 kPa。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 3 各组不同时点生化指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	指标	n	0h	6h	12h	24h	48h	72h
对照组	AST(IU/L)	3	95.3±36.1	93.7±31.4	96.8±35.8	96.7±32.8	97.4±34.5	95.8±35.7
模型组		6	97.7±32.5	155.2±27.4*	214.3±31.8**	337.5±42.1**	418.3±35.7**	382.1±37.2**
治疗Ⅰ组		6	92.7±24.2	141.9±28.3*	154.6±23.1*	214.3±32.1**##	186.2±27.4**#	175.4±38.9*#
治疗Ⅱ组		6	94.6±23.4	125.5±22.1	137.2±32.5*	148.2±37.4*#	138.9±38.1*##	128.3±37.9*##
对照组	ALT(IU/L)	3	16.7±4.3	14.8±3.7	15.1±4.2	16.4±3.8	16.2±3.9	14.9±3.6
模型组		6	15.8±3.2	14.3±2.6	21.2±3.8	48.4±5.2*	62.3±4.9**	58.1±4.3**
治疗Ⅰ组		6	14.3±3.2	15.7±2.5	25.1±2.8	39.8±3.3*	45.2±4.2*	27.3±5.8#
治疗Ⅱ组		6	16.7±2.5	17.3±3.2	22.8±3.6	38.1±3.4*	31.4±5.7*#	27.9±5.2#
对照组	TBIL(μmol/L)	3	3.2±1.2	3.5±1.4	3.7±1.7	3.5±1.1	3.8±1.5	3.4±1.2
模型组		6	3.5±0.8	5.6±1.2	11.6±1.3*	20.2±2.8**	28.1±6.5**	37.9±7.3**
治疗Ⅰ组		6	3.3±1.4	4.5±1.6	6.6±1.3	7.2±1.1*#	11.4±2.5*#	9.3±1.2*##
治疗Ⅱ组		6	3.6±1.8	4.7±1.2	5.4±1.7	7.8±1.9*#	10.6±3.5*#	8.3±2.6*##
对照组	CR(μmol/L)	3	53.2±3.6	55.1±2.4	53.6±2.5	51.4±2.3	54.6±2.8	55.3±2.2
模型组		6	54.6±2.8	78.2±4.2	93.8±3.2*	145.1±8.4**	92.5±5.7*	79.6±7.8
治疗Ⅰ组		6	52.7±2.9	64.1±4.3	77.5±8.4	94.6±7.5*#	88.4±7.2	72.8±7.6
治疗Ⅱ组		6	51.8±2.1	56.5±3.9	66.1±2.8	93.5±3.7*#	71.2±8.5	65.3±9.8

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

2.4 血常规的变化

静脉注射 LPS 后, 模型组、治疗Ⅰ组和治疗Ⅱ组的 WBC 数开始迅速下降, 4h 降至最低点, 与对照组相比有统计学差异 ($P<0.01$), 6h 时开始上升, 24h 后又明显升高, 48h 及 72h 时间点 WBC 数与对照组比较有统计学差异 ($P<0.05$, $P<0.01$), 但两治疗组 WBC 数升高趋势低于 MODS 模型组 (图 1)。

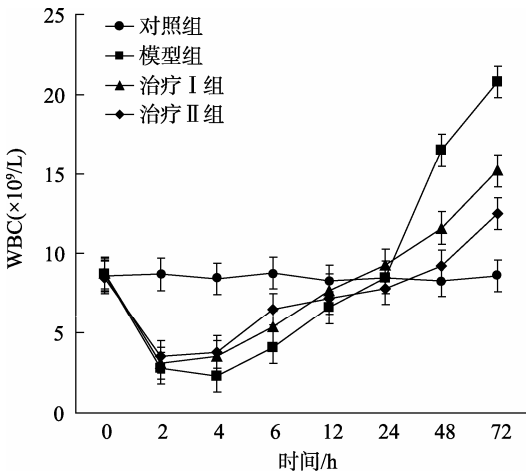


图 1 各组不同时点 WBC 的比较

3 讨论

严重感染、创伤、休克等诱发的 ARDS/MODS

是一个复杂的病理生理过程, 最终序惯性出现多器官功能障碍。内毒素介导的 MODS 模型具有致伤因素单一、造模方法便捷等优点。大鼠、兔、绵羊和犬等动物均可用于建立 MODS 模型^[6-9], 但不同动物对 LPS 的敏感性不同。作者以往的实验结果表明, 兔对 LPS 敏感性较高, 造模死亡率高, 犬对 LPS 不敏感, 大鼠等小动物动静脉采血量有限、不易动态观察; 因此绵羊是复制 MODS 模型较为理想的动物, 在小剂量 LPS 作用下就能形成 SIRS, 继而诱发 MODS^[10]; 另外, 绵羊为大型动物, 其病理生理变化与人相近^[11], 便于实验观察。在前期实验中, 我们以 3 μg/kg 和 6 μg/kg LPS 均能成功地建立 MODS 模型, 因 3 μg/kg LPS 的致死率较低, 影响结局的比较, 故采用 6 μg/kg LPS 建立 MODS 模型。

UTI 目前主要用于治疗急性胰腺炎、急性肺损伤、SIRS 以及减轻围术期脏器功能的损伤等^[12], 但其在 MODS 防治中的作用尚未有系统研究。本研究显示静脉注射 LPS 后, 首先出现肺损伤, 表现为呼吸急促, 2h 降至最低, 6h 后逐渐恢复; 而胃肠道、肝、肾功能的损伤出现相对较晚, 转氨酶 6h 和 12h 开始升高, 实验动物的胃肠胀气显著, 48h 达到高峰, 存活下来的动物 72h 逐渐改善; 由于未行血流动力学的监测, 心脏功能的减退发生时间尚不知,

据内毒素致小香猪 MODS 的研究显示^[6], 心脏功能下降发生于 5h。这种内毒素所致的 MODS 模型, 其脏器功能出现障碍的时序性原因目前尚不明确, 可能是肺脏对 LPS 损伤的敏感性高, 故出现反应早、变化快。

本研究显示, 早期给予 UTI 后可明显改善 LPS 所致的 MODS 绵羊的脏器指标, 降低死亡率。给予 LPS 后模型组、治疗组 2 h 内 PaO₂ 均明显下降, 与模型组相比较, 治疗组的 PaO₂ 下降幅度小, 恢复速度快。在不同时点这 3 组的 AST, ALT, TBIL 和 Cr 水平均明显高于其对应的对照组, 与模型组相比, 两治疗组各项指标明显降低。血常规变化趋势表明, 静脉注射 LPS 后, WBC 数呈“杓型”波动变化, 4h 降至最低点, 6h 时开始上升, 24h 后又明显升高, 与有关文献报道一致^[13,14], 这可能是 LPS 对 WBC 具有抑制杀伤作用, 使得 WBC 数在短时间内迅速下降, 之后继发的炎症反应又使得 WBC 数急剧升高; 两治疗组 WBC 数与模型组相比 48~72 h 明显下降, 可能是 UTI 通过抑制炎症反应的程度, 减少了应激性白细胞升高, 也进一步减轻了 LPS 造成的损害。以上结果表明, UTI 通过提高 PaO₂、明显改善肝、肾功能; 不同 UTI 剂量的治疗结果呈剂量依赖性趋势, 但无统计学差异; UTI 对 MODS 脏器功能的改善作用与 LPS 损伤发生的时序性相一致, 并未见到 UTI 对后发脏器损伤的预防效应。

本研究结果表明, UTI 能减轻内毒素所致的绵羊 MODS 的肺、肝、肾等脏器的损伤, 减轻内毒素继发的全身炎症反应, 早期应用有助于降低 MODS 的病死率, 但其剂量差异有待扩大样本量进一步研究。

【参考文献】

- [1] 王彦, 王宝恩. 感染相关的器官衰竭评分和多器官功能障碍评分对多器官功能障碍综合征预后判断比较[J]. 中国现代医药杂志, 2005, 7(2): 1-3.
- [2] 张世范, 罗晓红. 急性高原反应综合征与全身炎症反应综合征[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(4): 551-555.
- [3] 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.
- [4] 郭凤梅, 邱海波, 周韶霞, 等. 急性呼吸窘迫综合征绵羊模型的建立[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(2): 95-98.
- [5] 胡森, 盛志勇, 周宝桐, 等. 双相迟发多器官功能不全综合征(MODS)动物模型的研究[J]. 中华创伤杂志, 1996, 12(2): 102-106.
- [6] 段绍斌, 李学雄, 姚华, 等. 多器官功能障碍综合征时血管内皮细胞损伤的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(3): 271-274.
- [7] 卢媛媛, 尹文, 虎晓岷. 家兔失血性休克并内毒素诱发多器官功能障碍综合征模型制备[J]. 江苏医药, 2005, 31(6): 448-450.
- [8] 任添华, 牛驰, 任爱民, 等. MODS 动物模型组织氧代谢的变化特征[J]. 首都医科大学学报, 2008, 29(3): 308-310.
- [9] Nolan B, Collette H, Baker S, *et al.* Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NF kappaB dependent[J]. J Trauma, 2000, 48(4): 599-605.
- [10] 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504-507.
- [11] Mustered RA, Fisher J, Hayman S, *et al.* Cardiopulmonary response to pseudomonas septicemia in swine: an improved model of the adult respiratory distress syndrome[J]. Lab Animal Sci, 1989, 39(1): 37-43.
- [12] Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, *et al.* Antioxidative role of urinary trypsin inhibitor in acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Int J Mol Med, 2005, 16(6): 1029-1033.
- [13] 任添华, 姜悦, 任爱民, 等. 单相速发型多脏器功能障碍综合征动物模型的研究[J]. 首都医科大学学报, 2005, 26(4): 479-481.
- [14] 平易, 刘骏峰, 谢琼红, 等. 内毒素介导的多脏器功能障碍综合征动物模型的研究[J]. 中国临床医学, 2009, 16(2): 287-290.

(编辑: 任开环)