

• 论 著 •

乌司他丁对百草枯中毒大鼠肺泡上皮屏障功能的影响

张志坚¹, 彭礼波¹, 罗雅娟², 周从阳³

(1. 重庆市巴南区人民医院 ICU, 重庆 401320; 2. 新余钢铁集团公司中心医院急诊科, 江西 新余 338001; 3. 南昌大学第一附属医院急诊科, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 探讨乌司他丁 (ulinastatin, UTI) 对百草枯 (paraquat, PQ) 中毒急性肺损伤大鼠肺泡上皮屏障功能的影响及意义。方法 将 54 只 SD 大鼠随机分为对照组 (A 组)、PQ 组 (B 组) 和 UTI 组 (C 组), 每组各 18 只。B、C 组以生理盐水稀释 PQ 80 mg/kg 一次性灌胃; C 组灌胃后以 UTI 100 000 U/kg 腹腔注射, 每日 1 次; A 组等量生理盐水一次性灌胃。于不同处理后 24、48、72 h 测定肺泡上皮通透性 (AEP)、肺泡内液体清除率 (ALCR)、总肺水量 (TLW) 和肺血管外肺水量 (EVLW); 原位末端缺刻标记法 (TUNEL) 检测肺泡上皮细胞凋亡情况; 观察肺组织病理学改变; 并进行肺损伤半定量评分。结果 与 A 组比较, B 组大鼠中毒后 24、48、72 h ALCR 显著降低, TLW、EVLW 及 AEP 呈明显升高趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 B 组比较, C 组大鼠中毒后 24、48、72 h ALCR 均明显升高, TLW、EVLW 及 AEP 呈明显降低趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且肺组织的水肿、出血、炎症程度、局部出血及损伤学评分和肺湿/干重比均明显好转。结论 百草枯中毒并急性肺损伤大鼠存在严重的肺泡上皮屏障功能障碍; 乌司他丁通过抑制肺泡上皮细胞凋亡, 可改善肺泡上皮功能障碍, 减轻肺损伤程度。

关键词: 百草枯; 急性肺损伤; 肺泡上皮屏障; 乌司他丁; 细胞凋亡

中图分类号: R595.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2013)01-0003-04

Effect of ulinastatin on alveolar epithelial barrier of rats with acute paraquat poisoning

ZHANG Zhi-jian*, PENG Li-bo, LUO Ya-juan, ZHOU Cong-yang

(* . Department of ICU, Banan District People's Hospital, Chongqing 401320, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ulinastatin on alveolar epithelial barrier in rats with lung injury by acute paraquat poisoning. **Methods** 54 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three experimental groups: control group (group A), paraquat poisoning group (group B) and UTI treating group (group C), 18 in each group. Rats in group B and group C were administered intragastrically with 80 mg/kg PQ; rats in group C were additionally injected peritoneally with 100 000 U/kg ulinastatin immediately after PQ exposure, once a day; rats in group A were administered intragastrically with the same volume of saline only. The alveolar liquid clearance rate (ALCR), total lung water content (TLW), extravascular lung water content (EVLW) and alveolar epithelial permeability (AEP) were examined at 24, 48 and 72 h after poisoning respectively. Meantime, the alveolar epithelium apoptosis was detected by TUNEL and lung pathological changes was evaluated by Smith lung injury score as well. **Results** The results showed that there were continuous increase in levels of AEP, TLW and EVLW, while the level of ALCR was reduced in group B compared with group A at 24, 48, 72 h after poisoning, respectively. Compared with group B, there was continuous decrease of AEP, TLW and EVLW, while the level of ALCR presented raised trend in group C at 24, 48, 72 h after poisoning, additionally, the pathological changes in lung tissue of PQ poisoning such as congestion, edema, leukocytes infiltration and local hemorrhage, damage score and wet/dry ratio of lung tissue in group C were all significantly improved. **Conclusion** The results suggested that there is severe pulmonary alveolar barrier in acute lung injury rats by paraquat, UTI can significantly improve alveolar epithelial barrier function, reduce lung injury from PQ-ALI rats that may be by inhibiting the apoptosis of pulmonary epithelial cells.

Key words: paraquat; acute lung injury (ALI); alveolar epithelial barrier; ulinastatin; apoptosis

百草枯中毒 (paraquat poisoning, PQP) 是临床常见的中毒病症, 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征

(acute lung injury, ALI/acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是 PQ 中毒最常见的早期死亡原因^[1-3]。Matthay^[4]等研究认为肺泡上皮屏障功能在 ALI 发病机制中占中心地位, 肺泡上皮屏障损伤程度决定了 ALI 患者病情, 而上皮屏障功能恢复情况决定了患者预后。本实验使用乌司他丁 (UTI) 对 PQ 中毒大鼠的 ALI 进行干预, 通过监测肺泡上皮细胞形态和

收稿日期: 2012-06-26; 修回日期: 2012-10-17

作者简介: 张志坚 (1979—), 男, 急诊医学硕士研究生, 主要从事急性中毒及危重症的基础及临床研究。

通讯作者: 周从阳, 副教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为急性中毒及危重症的基础及临床研究, E-mail: zhoucongyang@sina.com。

功能的变化, 探讨 UTI 对肺泡上皮屏障功能的影响和意义。

1 材料和方法

1.1 实验仪器及试剂

全自动生化仪 (57600-010, 日本日立公司); Bayer 血气分析仪。牛磺胆酸钠购自美国 Sigma 公司; BCA 蛋白试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 细胞凋亡原位检测 (TUNEL) 试剂盒购自武汉博士德公司。20% 百草枯溶液产于上海先正达公司, 乌司他丁 (UTI) 购于天普生化医药有限公司。

1.2 实验动物分组及模型制作

54 只清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 (220 ± 40) g (南昌大学动物科学部提供), 随机分为对照组 (A 组)、染毒组 (B 组) 和 UTI 干预组 (C 组)。B 组和 C 组 PQ 一次性 (80 mg/kg) 灌胃建立百草枯中毒模型; A 组等量无菌生理盐水灌胃。染毒 30 min 后 C 组腹腔注射 UTI [100 000 U / (kg · d)]; A 组和 B 组每日等量生理盐水腹腔注射。于染毒后 24 h、48 h、72 h, 每组各 6 只大鼠, 3% 的戊巴比妥 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉后腹主动脉放血处死。

1.3 观察指标和方法

1.3.1 动脉血气 PaO₂、PaCO₂ 测定 处死大鼠前行腹主动脉取血 0.5 ml, 用 Bayer 血气分析仪测定动脉血 PaO₂、PaCO₂ 变化。

1.3.2 肺组织病理学观察、肺损伤评分以及湿/干质量比 (W/D) 测定 取右肺上叶和中叶用 10% 中性多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察肺组织病理学变化。肺损伤评分采用 Osman^[5] 等的标准计算。取右肺下叶, 滤纸擦干肺表面液体, 立即称湿重, 再置于 80 °C 烤箱中 72 h 至重量恒定即干重。

$$W/D = \frac{\text{肺湿质量} - \text{肺干质量}}{\text{肺干质量}} \times 100\%$$

1.3.3 肺泡内液体清除率 (ALCR) 采用 Rezaiguia^[6] 法。大鼠苯巴比妥钠麻醉后, 游离气管, 将直径为 1 mm 的导管插入气管。经导管注入 5% 白蛋白液 (内含 0.37 Kq¹²⁵I-白蛋白 3 ml/kg), 1 min 后抽取 0.1 ml 肺内液体作 γ 计数和蛋白浓度测定。1 h 后大鼠放血活杀。取肺泡内液体作 γ 计数和蛋白浓度测定, 并取肺组织作 γ 计数。

$$V_i = (V_d \times 5) / TP_i$$

$$V_f = (V_i \times TP_i \times Fr) / TP_f$$

$$ALCR (\mu l/h) = \frac{V_i \times F_{wi} - V_f \times F_{wf}}{V_i \times F_{wi}}$$

式中: V_i 和 V_f 分别代表起始和最终肺泡液体总量, F_{wi} 和 F_{wf} 分别代表起始和最终肺泡液体中的含水量, TP_i 和 TP_f 分别代表起始和最终肺泡液体中的蛋白浓度。

1.3.4 总肺水量 (TLW) 和肺血管外肺水量 (EVLW)

采用 Noble 法^[7] 并加以改进。大鼠放血活杀, 抽血分别测定血液血红蛋白 (Hb) 含量和干湿质量。取一小块肺组织制成 10% 匀浆液测血红蛋白含量。另取肺组织 1 块, 精确称湿重后, 80 °C 烘干 72 h 至恒重。

$$TLW (ml/g) = \frac{\text{肺湿质量} - \text{肺干质量}}{\text{肺干质量}}$$

$$\text{每克湿肺} = \frac{\text{匀浆液 Hb}}{\text{血液 Hb}} \times \text{匀浆总样本量} \times 1.055$$

$$\text{含残血量} = \frac{\text{匀浆肺质量}}{\text{匀浆肺质量}}$$

$$\text{湿肺含残血量} = \text{肺湿质量} \times \text{每克湿肺含残血量}$$

$$EVLW (ml/g) = \frac{\text{肺湿质量} - \text{肺干质量} - \text{湿肺含残血量}}{\text{肺干质量}}$$

1.3.5 肺泡上皮通透性 (AEP) 通过肺组织伊文兰 (EBD) 含量反映肺血管通透性大小。动物处死前 0.5 h 尾静脉注射伊文兰 20 mg/kg。处死前留取动脉血, 离心取上清液, 10 μl 血清加入 990 μl NS 中。处死后行左肺支气管肺泡灌洗, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF)。用分光光度计 (620 nm) 法测定 BALF 和血清的吸光度 (A 值), 以 A_{肺泡}/A_{血清} 比值反映肺泡上皮的通透性。

1.3.6 肺组织肺泡上皮细胞凋亡检测 用 TUNEL 法检测组织肺泡上皮细胞凋亡情况, 操作按说明书进行, 光镜下观察细胞核染色情况。每张切片随机观察 10 个视野, 计算阳性细胞数和细胞总数, 以 (阳性细胞数/细胞总数) × 100% 作为凋亡指数。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS13.0 统计软件分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 方差不齐则行秩和检验, 相关性检验采用 Pearson 相关分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠动脉 PaO₂、PaCO₂ 变化

B 组染毒后 24、48、72 h PaO₂ 较 A 组降低 (P < 0.05 或 P < 0.01), C 组染毒后 24、48、72 h PaO₂ 较 B 组升高 (P < 0.05 或 P < 0.01)。B 组染毒后 24、48、72 h PaCO₂ 较 A 组均升高 (P < 0.05 或 P < 0.01), 且随病程进展升高程度越明显, C 组染毒后 24、48、72 h PaCO₂ 较 B 组降低 (P < 0.05 或 P < 0.01), 见表 1。

表 1 三组大鼠动脉 PaO₂、PaCO₂ 变化 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

mm Hg

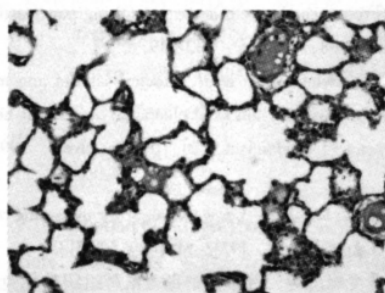
组别	PaO ₂			PaCO ₂		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A 组	95.02 ± 1.24	94.54 ± 2.12	93.85 ± 1.98	34.58 ± 3.24	35.01 ± 2.17	34.01 ± 1.98
B 组	64.13 ± 5.23 [#]	59.55 ± 5.15 [#]	52.23 ± 5.06 [#]	28.57 ± 2.27 [#]	49.47 ± 4.51 [#]	52.78 ± 3.07 [#]
C 组	82.85 ± 6.01 ^{#☆}	76.49 ± 7.32 ^{#☆}	63.03 ± 7.51 ^{#☆}	30.22 ± 5.26 ^{*△}	38.04 ± 4.27 ^{*☆}	42.28 ± 3.88 ^{#☆}

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与 B 组比较, △ $P < 0.05$, ☆ $P < 0.01$ 。

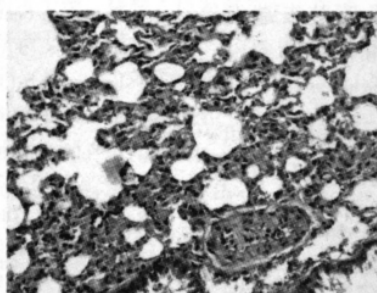
2.2 各组大鼠肺组织病理学改变

A 组肉眼见肺组织回缩良好, 呈均匀粉红色。光镜下肺泡结构清晰, 肺泡壁薄, 肺泡腔内无炎性细胞浸润。B 组肉眼见肺组织回缩不良, 体积明显增大, 色不均匀, 可见点片状淤斑、出血点, 呈暗红色。光

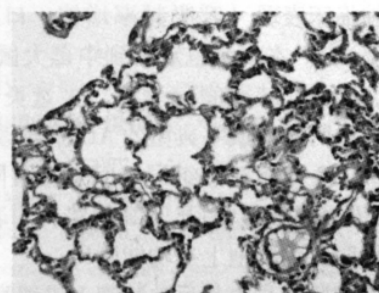
镜下见肺间质和肺泡水肿, 肺泡腔内充满粉染均质水肿液, 可见游离的中性粒细胞、巨噬细胞和少量纤维素, 伴弥漫性肺出血, 肺泡腔塌陷, 部分有透明膜形成, 组织内灶状、片状炎性细胞浸润。C 组皆较 B 组轻。见图 1。



对照组



PQ 组 48 h



UTI 组 48 h

图 1 各组肺组织病理学图 (HE, ×100)

2.3 各组大鼠肺损伤学评分和肺湿/干质量比

C 组 24、48、72 h 肺损伤评分 (0.36 ± 0.09)、(0.98 ± 0.24)、(2.45 ± 0.42), 均较 A 组同时间点 (0.17 ± 0.04)、(0.15 ± 0.04)、(0.16 ± 0.06) 显著增高 ($P < 0.01$); 但较 B 组各时间点明显降低 (0.79 ± 0.22)、(2.23 ± 0.58)、(5.59 ± 0.85) ($P < 0.01$)。

B、C 组各时间点肺湿干重比较 A 组明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 C 组较 B 组明显降低 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠肺内液体清除率的变化

B 组各时间点 ALCR 均较 A 组同时间点显著降低 ($P < 0.01$), C 组各时间点较 B 组明显升高 ($P <$

0.01), 见表 2。

2.5 各组大鼠总肺水量和肺血管外肺水量的变化

B 组各时间点 TLW 均较 A 组同时间点显著增加 ($P < 0.01$), C 组各时间点较 B 组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。B 组大鼠各时间点 EVLW 较 A 组升高, ($P < 0.01$)。C 组各时间点 EVLW 均较 B 组同时间点有所下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 2。

2.6 各组大鼠肺泡上皮通透性的变化

B 组各时间点 AEP 均较 A 组同时间点显著增加 ($P < 0.01$), C 组各时间点较 B 组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 2。

表 2 三组大鼠 ALCR、TLW、EVLW 和 AEP 的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	ALCR ($\mu\text{l/h}$)			TLW (ml/g)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A 组	310.33 ± 26.45	305.52 ± 28.14	307.29 ± 29.15	3.15 ± 0.14	3.17 ± 0.12	3.16 ± 0.15
B 组	265.25 ± 21.36 [#]	221.24 ± 18.27 [#]	198.25 ± 17.56 [#]	3.77 ± 0.16 [#]	4.12 ± 0.19 [#]	4.98 ± 0.26 [#]
C 组	285.46 ± 19.55 ^{#☆}	254.87 ± 19.46 ^{#☆}	236.55 ± 17.42 ^{#☆}	3.44 ± 0.16 ^{*☆}	3.72 ± 0.18 ^{#☆}	4.17 ± 0.22 ^{#☆}

组别	EVLW (ml/g)			AEP (%)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A 组	2.22 ± 0.12	2.26 ± 0.11	2.23 ± 0.13	5.78 ± 0.59	5.88 ± 0.56	5.86 ± 0.51
B 组	2.76 ± 0.16 [#]	3.12 ± 0.21 [#]	3.86 ± 0.54 [#]	12.07 ± 1.06 [#]	23.21 ± 2.18 [#]	32.58 ± 3.47 [#]
C 组	2.41 ± 0.15 ^{*☆}	2.85 ± 0.23 ^{#☆}	3.01 ± 0.26 ^{#☆}	8.98 ± 1.42 ^{*△}	15.89 ± 2.02 ^{#☆}	21.54 ± 4.05 ^{#☆}

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与 B 组比较, △ $P < 0.05$, ☆ $P < 0.01$ 。

2.7 肺脏细胞凋亡检测结果

A 组肺组织偶见凋亡肺泡上皮细胞。C 组各时间点肺泡上皮凋亡细胞 (11.44 ± 3.87)、(19.52 ± 5.63)、(27.77 ± 6.92) 较 B 组 (15.43 ± 4.14)、(32.52 ± 8.33)、(45.99 ± 7.65) 明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

肺脏是 PQ 中毒的主要靶器官,高通透性肺水肿是 ALI 重要的病理生理特征,其程度与 ALI/ARDS 预后呈正相关^[4]。在既往研究中已发现 PQ 中毒大鼠肺组织含水量在 12 h 后即可明显增多,大鼠同时有肺水肿临床表现(呼吸频率增快、口唇及四肢末端发绀等)^[8]。本实验也观察到中毒大鼠肺间质和肺泡水肿、出血,肺泡间隔增宽,大量炎性细胞渗出、浸润,透明膜形成等典型的 ALI 病理改变。同时各时间点 ALCR 均较对照组同时间点显著降低,TLW、EV-LW 及 AEP 则呈明显升高趋势,均表明 PQ 导致 ALI 大鼠明显的肺泡上皮功能障碍。

细胞凋亡也是反映肺泡上皮细胞屏障完整性的指标之一,过度的细胞凋亡将加重病理损伤,使肺泡上皮细胞清除肺泡内液体的能力下降,加重肺泡水肿^[9]。本研究发现,随着大鼠肺泡上皮凋亡细胞的增多,肺水肿程度也相应加重,提示 PQ 诱导的肺水肿与细胞凋亡密切相关。

乌司他丁具有抗氧化,抑制炎症介质释放,增加细胞膜、线粒体、内质网、溶酶体等细胞器膜稳定性等功能,可提高机体应激蛋白的表达,从而减轻多种原因引起的肺组织损伤的程度^[10~14]。本实验研究结果显示,应用 UTI 对 PQ 中毒大鼠干预后,肺组织的水肿、出血、炎症反应程度及肺组织损伤评分、肺湿/干重比及动脉血气分析等均明显好转,而且干预后各时间点 ALCR 均较 PQ 组同时间点显著升高,TLW、EVLW、WEP 及细胞凋亡则有明显降低趋势,提示 UTI 可明显改善肺泡上皮的通透性,减轻 PQ 中毒后肺水肿程度,其机制可能与改善肺泡上皮细胞屏障功能及减少细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] Bertolote J M, Fleischmann A, Eddleston M, *et al.* Deaths from pesticide poisoning: a global response [J]. *Br J Psychiatry*, 2006, 189 (10): 201-203.
- [2] 马增秀,王文生,卢青龙,等. 急性百草枯中毒 106 例临床分析 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2009, 27 (8): 493-494.
- [3] 张宝兰,姚朗,欧艺. 1991~2008 年我国百草枯中毒文献分析 [J]. *中国急救医学*, 2010, 30 (2): 139-141.
- [4] Matthay M A, Clerici C, Saumon G. Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93 (4): 1533-1541.
- [5] Osman M O, Kristensen J U, Jacobsen N O, *et al.* A monoclonal antiinterleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotizing pancreatitis in rabbits [J]. *Gut*, 1998, 43 (2): 232-239.
- [6] Rezaiguia S, Carat C, Deleaux C, *et al.* Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99 (2): 325-335.
- [7] Noble W H, Obdrzalek J, Kay J C. A new technique for measuring pulmonary edema [J]. *J Appl Physiol*, 1973, 34 (4): 508-512.
- [8] 周从阳,张志坚,龚少峰,等. 百草枯中毒大鼠肺组织热休克蛋白 70 表达及乌司他丁干预研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2010, 19 (9): 953-956.
- [9] Zhuang J J, Li X P, Uhal B D, *et al.* Apoptosis-dependent acute pulmonary injury after intratracheal instillation of angiotensin II [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2008, 60 (6): 715-722.
- [10] Ito K, Mizutani A, Kira S, *et al.* 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, 26 (3): 387-394.
- [11] Bao P, Gao W, Li S, *et al.* Effect of pretreatment with high-dose ulinastatin in preventing radiation-induced pulmonary injury in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603 (1/3): 114-119.
- [12] 周从阳,张志坚,罗雅娟,等. 乌司他丁对百草枯染毒大鼠肺组织热休克蛋白 70 和核转录因子- κ B 的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2011, 29 (4): 380-383.
- [13] 马晓辉,梁显泉,虞晓红,等. 乌司他丁对脓毒症大鼠肺脏的保护作用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2011, 20 (1): 52-55.
- [14] 孙明莉,李海峰,刘晓亮,等. 乌司他丁对百草枯中毒肺纤维化的影响及其机制研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23 (3): 187-188.

《福岛核灾公共卫生启示录》已出版发行

刘长安和陈肖华主编的《福岛核灾公共卫生启示录》一书,已于 2012 年 12 月由军事医学科学出版社正式出版。本书是对 2011 年日本东京电力公司福岛第一核电站特大事故中一些重要公共卫生问题的回顾与思考,旨在以邻为鉴,以史为鉴,从中汲取必要的经验教训,对我国核应急准备相关安排的不断完善或有裨益。

全书 166 千字,分为 11 章和 2 个附录。主要内容包括:福岛核事故中的撤离和隐蔽(上下篇);对稳定碘预防的再讨论;福岛核事故中的稳定碘预防;福岛核事故中的饮用水安全问题;福岛核事故中的食品安全问题;东日本复合灾害的精神卫生和社会心理影响及其应对;受福岛核事故影响居民的照射水平评估和健康管理调查;福岛第一核电站应急工作人员的职业照射管理和健康监测;核与辐射突发事件现场医学处置原则;核与辐射突发事件公众社会心理效应及防护对策等。本书可供核与辐射应急主管部门、公共卫生机构、辐射防护机构和医疗机构的辐射防护、公共卫生、应急医疗等相关专业技术人员和管理人员阅读。