

文章编号:1005-6947(2005)01-0024-05

· 实验研究 ·

## 梗阻性黄疸对心肌的损伤及乌司他丁保护作用的研究

朱明德, 方驰华, 陈铁军

(第一军医大学珠江医院 普通外科, 广东 广州 510282)

**摘要:**目的 观察胆道梗阻后心肌损伤及乌司他丁(UTI)的保护作用。方法 动态观测胆道梗阻大鼠的心肌组织丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)、血清总胆红素(TBIL)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、内毒素(ET)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量;取左心室心肌行光电镜检查,并应用ABC免疫组化染色法,定位TNF- $\alpha$ 在心肌组织中的表达和分布。结果 胆道梗阻后,血清TBIL,ALP,CK-MB,ET,TNF- $\alpha$ 的水平逐渐升高;心肌组织MDA含量逐渐升高,SOD含量逐渐减少,心肌TNF $\alpha$ 表达升高;各UTI治疗组与同时相梗阻组比较,血清TBIL,ALP,CK-MB,ET,TNF- $\alpha$ 水平及心肌组织MDA含量减少,SOD含量升高,心肌TNF- $\alpha$ 表达下降;光电镜下可见随胆道梗阻时间延长,心肌损害加重,各UTI治疗组与同时相梗阻组比较,心肌损害减轻。结论 UTI通过对抗自由基损伤、内毒素血症、TNF- $\alpha$ 的综合作用,对胆道梗阻所致心肌损伤有明显保护作用。

**关键词:**胆汁郁积/并发症;心肌损伤/病因学;心肌/病理学;乌司他丁/治疗应用

中图分类号:R575;R541

文献标识码:A

### Experimental study on myocardial injury and protective effect of ulinastatin after bile duct obstruction

ZHU Ming-de, FANG Chi-hua, CHEN Tie-jun

(Department of General Surgery, Zhu Jiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

**Abstract; Objective** To investigate the myocardial injury induced by bile duct obstruction and the protective effects ulinastatin (UTI). **Methods** Dynamic observation of the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) of myocardial tissues, and the levels of serum TBil, alkaline phosphatase (ALP), MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB), endotoxin (ET), and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in bile duct obstruction (BLD) rats and UIT treatment rats. The left ventricles of the rats were obtained for light and electronic microscopic observation. Immunohistochemical staining method of ABC used was to locate the expression and distribution of TNF- $\alpha$  in myocardial tissues. **Results** After ligation of the common bile duct, serum TBIL, ALP, CK-MB, ET, TNF- $\alpha$  levels and myocardium MDA gradually increased, while SOD levels gradually decreased, and the expression of TNF- $\alpha$  in myocardium increased. As compared with BDL group at the same phase, in UIT group, serum TBIL, ALP, CK-MB, ET, TNF $\alpha$  levels and myocardium MDA in UIT-treated groups decreased, while myocardium SOD increased, and the expression of TNF- $\alpha$  in myocardium decreased. Myocardial injuries of bile duct obstruction were aggravated as time progressed, and there were less myocardial injuries in UIT-treated groups than in BDL groups at the same stage as shown with light and electronic microscopic observation. **Conclusions** UTI can effectively protect the myocardium from ET, TNF- $\alpha$  and free radical injury in bile duct obstruction rats.

**Key words:** CHOLESTASIS/compli; MYOCARDIAL INJURY/etiol; MYOCARDIUM/pathol; ULINASTATIN/ther use

CLC number: R575; R541

Document code: A

收稿日期:2004-09-10; 修订日期:2004-11-22。

作者简介:朱明德(1970-),男,湖北武汉人,第一军医大学珠江医院主治医师,主要从事肝胆疾病方面的研究。

通讯作者:朱明德 电话:13711195750(手机); E-mail:ZMD@hotmail.com。

万方数据

梗阻性黄疸可引起心肌损害,导致心脏功能受损。本研究采用大鼠胆道梗阻模型,经腹腔注入蛋白酶抑制剂乌司他丁(UTI),通过动态检测胆道梗阻前后不同时相心肌组织内丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量及血清总胆红素(TBIL)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、内毒素(ET)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,观察自由基损伤、内毒素血症、TNF- $\alpha$ 在胆道梗阻所致心肌损害过程中的作用,了解UTI对心肌损伤的保护作用,为临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物模型制备与分组

SD 雄性大鼠 50 只(第一军医大学实验动物中心提供),体重(220 $\pm$ 30)g,术前禁食 12h,3%戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射麻醉,自上腹正中切口入腹,分离、暴露胆总管,其中 40 只大鼠胆总管用 4 号丝线双重结扎,中间离断,逐层关腹,模型制备后,随机分为 4 组,每组 10 只:(1)BDL1 组(胆道梗阻 1 周组);(2)BDL2 组(胆道梗阻 2 周组);(3)UTI1 组(胆道梗阻 + UTI 治疗 1 周组);(4)UTI2 组(胆道梗阻 + UTI 治疗 2 周组)。另外 10 只设为假手术组(SO 组),SO 组入腹后除不结扎胆总管外,其它操作均相同。各 UTI 组术后腹腔注射乌司他丁 2.5 万 U/(kg $\cdot$ d)(配制成 2mL,广东天普制药公司生产),SO 组及各 BDL 组腹腔注射相同容积生理盐水。各组到梗阻时间后,心脏穿刺取血,迅速开胸取左室心肌。

### 1.2 检测项目及方法

1.2.1 心肌组织 MDA 含量 用硫代巴比妥酸反应法测定<sup>[1]</sup>(MDA 试剂盒,南京建成生物工程研究所)。

1.2.2 心肌组织 SOD 含量 用羟胺法测定<sup>[2]</sup>(SOD 试剂盒,南京建成生物工程研究所)。

1.2.3 血清 TBIL,ALP,CK-MB 含量 采用美国 BECKMAN 公司 CX7 全自动生化分析仪测定。

1.2.4 血清 ET 用偶氮显色法定量检测<sup>[3]</sup>(鲎试剂盒,上海伊华公司)。

1.2.5 血清 TNF- $\alpha$  用 ELISA 法测定(试剂盒由

第四军医大学免疫室提供),操作按试剂盒说明书进行。

1.2.6 心肌形态学观察 心肌组织光镜标本以 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋、HE 染色,切片以 Olympus 光镜观察;电镜标本以 3% 戊二醛-1% 锇酸双重固定,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅电子染色,切片行透射电镜观察。

1.2.7 心肌组织中 TNF- $\alpha$  的表达和分布 用 ABC 免疫组化染色法<sup>[4]</sup>(ABC 试剂盒,上海华美生物工程公司)。染色模式均为细胞膜/细胞浆,胞核无着色。(1)定性分析:根据染色强度分为阳性(棕黄色),弱阳性(浅黄色),阴性(不着色)。(2)定量分析:各组切片均采用 Tiger 图像分析系统对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析;具体操作为取切片在光学显微镜下以相同倍数(40 $\times$ 10)随机选用 5~10 个视野取平均值,利用 Tiger 图像分析系统选取阳性区域及空白区进行光密度定标,图像分析系统自动处理得出平均光密度值(average optical density, AOD),以 AOD 值大小代表阳性产物表达的多少。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件建立数据库,均数比较用完全随机设计资料的方差分析,组间两两比较用 SNK 法。 $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结 果

### 2.1 心肌组织 MDA, SOD 和血清 TBIL, ALP, CK-MB, ET, TNF- $\alpha$ 含量变化

各 BDL 组心肌组织内 MDA 含量及血清 TBIL, ALP, CK-MB, ET, TNF- $\alpha$  含量均较 SO 组明显升高,并随胆道梗阻时间的延长而加重(均  $P < 0.05$ );心肌 SOD 含量则下降,梗阻时间愈长, SOD 下降愈明显( $P < 0.05$ )。UTI1, 2 组与 SO 组比较,也有同样的趋势,但各项指标的变化程度相对较小, UTI1 组部分指标与 SO 组差异不显著。各 UTI 治疗组与同时相 BDL 组比较,心肌 MDA 含量及血清 TBIL, ALP, CK-MB, ET, TNF- $\alpha$  含量明显减少;心肌 SOD 含量增加(表 1, 2)。

表1 大鼠胆道梗阻后血清TBIL, ALP, CK-MB, ET, TNF-α含量变化(̄x±s)

组别	TBIL (μmol/L)	ALP (IU/L)	CK-MB (IU/L)	ET (ng/L)	TNF-α (ng/mL)
SO	2.86±0.32	22.17±9.75	209.15±24.54	1.54±0.62	1.06±0.15
BDL1	32.03±0.13 <sup>2)</sup>	147.42±5.45 <sup>2)</sup>	1032.15±52.48 <sup>2)</sup>	10.88±1.06 <sup>2)</sup>	1.42±0.21 <sup>1)</sup>
BDL2	68.13±4.11 <sup>2)</sup>	197.14±2.11 <sup>2)</sup>	1813.50±134.63 <sup>2)</sup>	18.29±6.24 <sup>2)</sup>	1.81±0.12 <sup>1)</sup>
UTI1	12.90±0.12 <sup>1),4)</sup>	70.84±11.32 <sup>2),3)</sup>	482.51±56.51 <sup>1),3)</sup>	3.18±0.61 <sup>4)</sup>	1.13±0.13 <sup>3)</sup>
UTI2	43.04±2.12 <sup>2),3)</sup>	97.12±12.31 <sup>2),4)</sup>	736.83±96.12 <sup>1),4)</sup>	8.63±0.71 <sup>2),4)</sup>	1.33±0.11 <sup>1),3)</sup>

注:与SO组比较, 1)P<0.05, 2)P<0.01; 与BDL组比较, 3)P<0.05, 4)P<0.01。

2.2 TNF-α在心肌组织中的表达和分布

2.2.1 定性分析结果 BDL1组为弱阳性, BDL2

组为阳性; UTI1组为阴性, UTI2组为弱阳性; SO组为阴性(图1~4)。

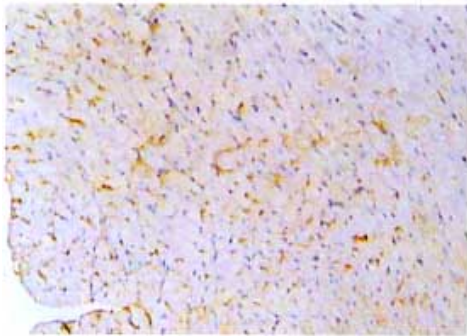


图1 BDL1组心肌TNF-α(x200)

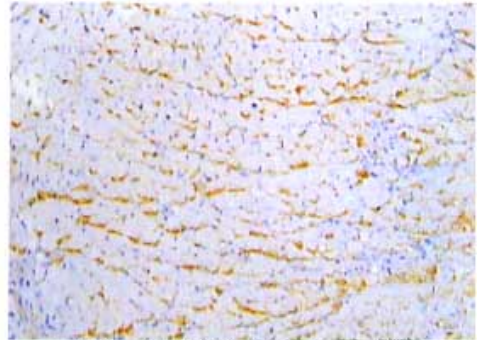


图2 BDL2组心肌TNF-α(x200)

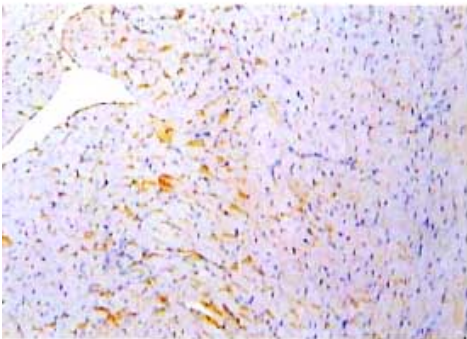


图3 UTI1组心肌TNF-α(x200)

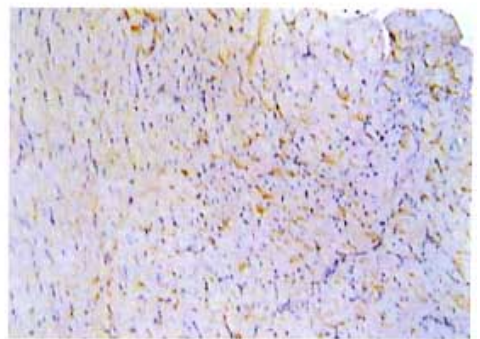


图4 UTI2组心肌TNF-α(x200)

2.2.2 定量分析结果 心肌TNF-α阳性物质的

表达在BDL1, 2组和UTI1, 2组都有随梗阻时间延长而增加的趋势。但UTI1组与SO组比较差异无统计学意义, 其余各组与SO组比较均有显著性差异。各UTI组与BDL组比较, 心肌TNF-α的表达明显下降(表2)。

表2 各组大鼠心肌组织MDA, SOD含量和TNF-α表达的定量分析结果(̄x±s)

组别	MDA (ng/ml)	SOD (Nu/mg Pr)	TNF-α (AOD值)
SO	19.63±0.88	8.49±0.66	0.0054±0.0065
BDL1	32.30±0.44 <sup>1)</sup>	3.43±1.22 <sup>2)</sup>	0.0836±0.0116 <sup>2)</sup>
BDL2	46.02±3.15 <sup>2)</sup>	2.73±0.25 <sup>2)</sup>	0.2065±0.0193 <sup>2)</sup>
UTI1	23.34±1.28 <sup>3)</sup>	7.02±2.12 <sup>3)</sup>	0.0154±0.0062 <sup>4)</sup>
UTI2	35.32±2.89 <sup>1),3)</sup>	6.14±0.23 <sup>1),3)</sup>	0.1108±0.0041 <sup>2),3)</sup>

注:与SO组比较, 1)P<0.05, 2)P<0.01; 与同时相的BDL组比较, 3)P<0.05, 4)P<0.01。

2.3 病理学改变

2.3.1 心肌组织光镜观察 BDL组胆道梗阻1周时心肌细胞浊肿, 白细胞浸润; 2周时心肌细胞浊肿加重, 间质血管扩张, 肌束结构稀疏, 排列紊乱, 有少许心内膜下心肌发生出血、坏死。UTI治疗组较同时相的BDL组白细胞浸润少, 同时细胞浊肿轻微, 间质充血较轻, 肌束排列尚有序, 未见有心肌细胞出血及坏死(图5~8)。

2.3.2 心肌组织电镜观察 电镜下见BDL1组线粒体肿胀、嵴模糊; BDL2组线粒体减少、变形、外膜不清, 核糖体脱颗粒, 嵴减少或消失, 排列紊乱, 肌丝结构稀疏断裂, 核膜破裂, 细胞基质稀少。UTI1组病变较同时相的BDL1组轻, UTI2组线粒体肿胀较轻, 膜尚完整, 嵴略稀疏, 部份线粒体破坏, 排列仍规则, 肌丝结构排列尚规则(图9~12)。

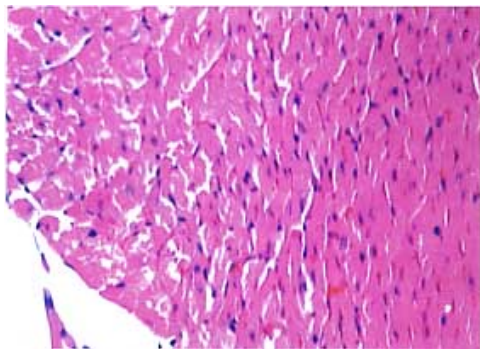


图5 BDL1组心肌光镜照片(×400)

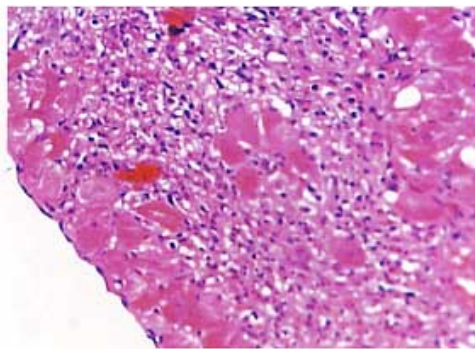


图6 BDL2组心肌光镜照片(×400)

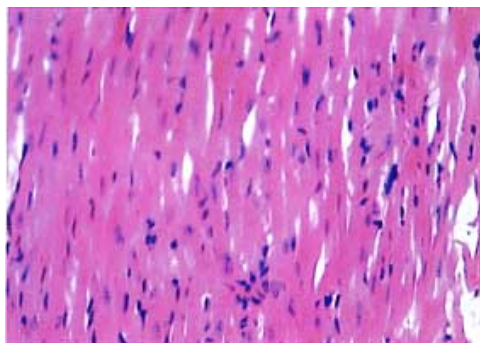


图7 UTI1组心肌光镜照片(×400)

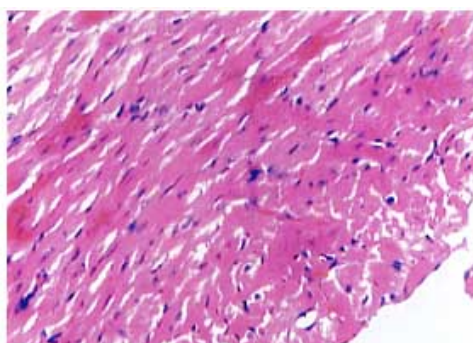


图8 UTI2组心肌光镜照片(×400)

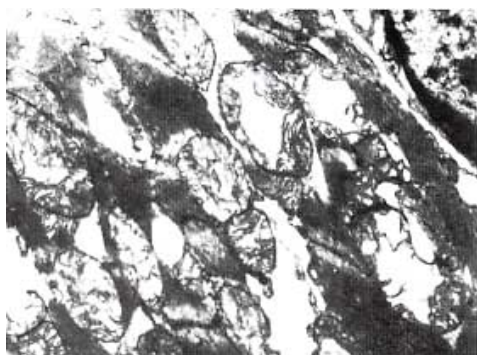


图9 BDL1组心肌电镜照片(×12 000)



图10 BDL2组心肌电镜照片(×10 000)

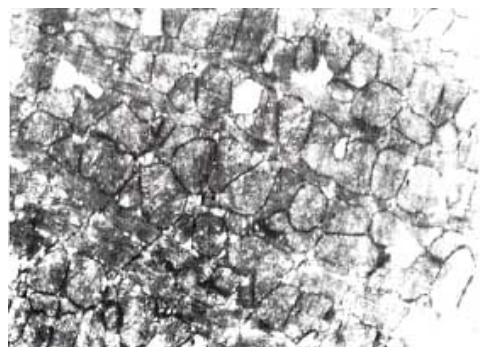


图11 UTI1组心肌电镜照片(×10 000)

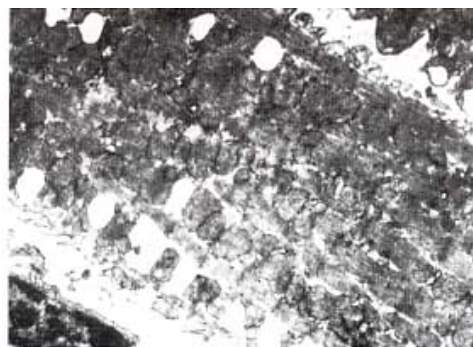


图12 UTI2组心肌电镜照片(×8 000)

### 3 讨论

梗阻性黄疸可影响患者心脏功能及血流动力学改变<sup>[5]</sup>,术中可发生心跳骤停且死亡率很高,梁全义<sup>[6]</sup>报道480例梗阻性黄疸患者术中9例发生心跳骤停,死亡4例,死亡率高达44.4%。心血管系统受损导致的血容量不足也是梗阻性黄疸患者围手术期易发生肾功能衰竭的重要原因之一<sup>[7]</sup>。因此应当高度重视梗阻性黄疸患者的心脏保护。

梗阻性黄疸造成心肌损伤主要机理是:(1)ET对心肌的损害。胆道梗阻后,由于肠黏膜屏障功能障碍和Kupffer细胞吞噬和清除功能的下降,血清中ET含量增高,可以直接或间接地损害心肌的线粒体、肌浆网、肌膜和收缩蛋白等,使心肌细胞膜受损,ATP的产生和利用异常而发生心肌坏死。ET也可使儿茶酚胺、5-羟色胺、心肌抑制因子(MDF)的释放增多,导致小动脉和小静脉痉挛性收缩,毛细血管扩张、淤血、通透性增高,致心肌受损,心肌收缩力下降,使血液动力学发生变化<sup>[8]</sup>。ET作用于单核巨噬细胞,诱导细胞产生活性自由基、以及释放溶酶体酶等方式使心肌细胞受损<sup>[9]</sup>。(2)胆红素的细胞毒性作用。胆红素能降低组织呼吸商,抑制(NADH)氧化作用,并通过分解线粒体破坏氧化磷酸化,损害细胞的线粒体结构和功能,使细胞内的ATP合成减少,使心肌细胞受损,从而损害心肌的正性肌力反应<sup>[10]</sup>。(3)氧自由基的损害。胆道梗阻后,胆红素血症及内毒素血症影响系统血液循环,从而影响到心肌的血液供应,心肌细胞由于缺血缺氧而致氧自由基生成增加,而机体主要的自由基清除剂SOD含量下降。(4)TNF- $\alpha$ 对心肌的损害。TNF- $\alpha$ 主要是通过氧自由基脂质过氧化造成胆道梗阻后的心肌损害<sup>[11]</sup>。

UTI是一种蛋白酶抑制剂,具有很广的抑酶谱和抑酶活性,能抑制胰蛋白酶、 $\alpha$ 糜蛋白酶、巯基酶、纤溶酶等多种蛋白酶;UTI也是一种溶酶体膜稳定剂,能抑制溶酶体酶的释放;此外,UTI还能抑制MDF的产生、清除自由基及抑制炎症介质的释放<sup>[12]</sup>。已有研究<sup>[13]</sup>表明,UTI对心脏手术体外循环时心肌的缺血再灌注损伤有明显的保护作用。本研究结果表明,UTI对胆道梗阻后的心肌损害也有明显的保护作用。UTI能使血浆中ET含量明显降低,胆红素量相对减少,从而减轻ET和胆红素对心肌的损害;UTI能够降低心肌组织内MDA生成,使SOD含量增加,说明UTI具有对抗氧自由基的作用。

### 万方数据

动物实验<sup>[14,15]</sup>也表明UTI有清除氧自由基的作用。UTI还能有效降低血清中TNF- $\alpha$ 的含量,从而防止心肌受损。Masuda等<sup>[16]</sup>的动物试验表明:失血性休克大鼠心肌线粒体氧化磷酸化受损、ATP含量下降,应用UTI后恢复较快,说明UTI能减轻线粒体功能障碍,促进心肌能量代谢的恢复,本实验中电镜下所见心肌超微结构改变也说明UTI能保护梗阻性黄疸对心肌线粒体的损害。在应用UTI的情况下,仍可见到这种趋势,可见防止心肌损害的有效方法是及时解除胆道梗阻。在胆道梗阻未解除的情况下,UTI对胆道梗阻大鼠心肌损害的保护作用是有限的,并不能使血清中TBIL,ALP,CK-MB等及心肌形态维持或恢复到正常状态,但能起到延缓损害的作用。

### 参考文献:

- [1] 汪谦. 现代医学实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1997. 833-839.
- [2] 王成莲. 羟胺法超氧化物歧化酶的测定[J]. 生物化学与生物物理学报,1989,16(6):473-475.
- [3] 白继文. 检验医学诊断技术[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2001. 460-461.
- [4] 朱立平. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000. 398-400.
- [5] 方驰华. 咪喹美辛对梗阻性黄疸患者血流动力学的调节作用[J]. 中国普通外科杂志,1997,6(5):275-278.
- [6] 梁全义. 阻塞性黄疸病人术中心跳骤停9例[J]. 肝胆外科杂志,1999,7(3):189.
- [7] 顾克非,甘胜红. 梗阻性黄疸术后发生急性肾衰竭的防治[J]. 中国普通外科杂志,2003,12(2):150-151.
- [8] Papakostas C, Bezirtzoglou E, Pitiakoudis M, et al. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice[J]. Clin Exp Med, 2003,3(2):124-128.
- [9] Scott - conner CE, Hall JJ. Serum and cellular factors in murine obstructive jaundice[J]. Surg, 1994,115(1):77-84.
- [10] Hansen TWR, Mathiesen SBW, Walaase SI. Bilirubin has wide spread inhibitory effects on protein phosphorylation[J]. Pediatr Res, 1996,39(6):1072-1077.
- [11] Beutler B, Krochin N, Milsark IW, et al. Control of cathepsin (tumor necrosis factor) synthesis; mechanisms of endotoxin resistance[J]. Science, 1986,232(4753):977-980.
- [12] 潘成,虞惠娥,罗月娥. 注射用乌司他丁[J]. 中国新药杂志,2000,9(2):123-124.
- [13] Ren TY, Yang XW, Ma Y, et al. Myocardial protective effect of ulinastatin against ischemia/reperfusion injury during open heart surgery with cardiopulmonary bypass[J]. Zhong Hua Yi Xue Za Zhi, 2003,83(16):1391-1393.
- [14] Hitwe T, Suzuki M, Ouchi K, et al. Effects of urinastatin and free radical scavengers on hepatic lipid peroxidation in endotoxemia[J]. J Surg Res, 1996,61(1):206-214.
- [15] 秦仁义,王春友,邹声泉. 乌司他丁治疗急性胰腺炎的实验和临床研究[J]. 中国普通外科杂志,2001,10(4):292-295.
- [16] Masuda T, Sato K, Noda C, et al. Protective effect of urinary trypsin inhibitor on myocardial mitochondria during hemorrhagic shock and reperfusion[J]. Crit Care Med, 2003,31(7):1987-1992.