

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)03-0220-03

蛋白酶抑制剂乌司他丁对血管内源性活性物质的影响

陈婷婷, 王刚, 高长青 (解放军总医院心血管外科, 北京 100853)

Effects of Ulinastatin on plasma levels of lipid humoral factors in traumatic hemorrhagic shock in rabbits

CHEN Ting-Ting, WANG Gang, GAO Chang-Qing

Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 AIM: To evaluate the effects of Ulinastatin, a protease inhibitor, on the plasma levels of lipid humoral factors in traumatic hemorrhagic shock. **METHODS:** Twenty rabbits were randomly divided into two groups: Traumatic hemorrhagic shock group and ulinastatin-treated group. Blood was sampled at four time points: Pre-shock, post-shock, as well as 2 h and 4 h after blood volume compensation. The plasma levels of ET, ADM and TXA₂, PGI₂ were measured. **RESULTS:** In both two groups, the plasma levels of ET, ADM and TXA₂ were significantly higher at the other three observed points than those at pre-shock ($P < 0.05$), while the plasma levels of ET and TXA₂ in ulinastatin-treated group were significantly lower than those in traumatic shock group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Ulinastatin has beneficial effects in the treatment of traumatic hemorrhagic shock, possibly by reducing the release of ET and TXA₂.

【Keywords】 shock, hemorrhagic; ulinastatin; humoral factors

【摘要】目的:评价蛋白酶抑制剂乌司他丁对创伤失血性休克的治疗效果,并观察乌司他丁对内源性血管活性物质的影响。方法:新西兰白兔20只随机分为两组,创伤失血性休克组和创伤失血性休克乌司他丁治疗组,观察休克前后血浆血栓素A₂(TXA₂)和前列环素(PGI₂),内皮素(ET)和肾上腺髓质素(ADM)两组内源性血管活性物质的动态变化及乌司他丁对它们的影响。结果:创伤失血性休克组和创伤失血性休克乌司他丁治疗组休克后ET,ADM和TXA₂的血浆浓度分别在不同的时相点较休克前有显著增高($P < 0.05$),其中乌司他丁治疗组的TXA₂和ET血浆浓度的增高程度均显著低于休克组($P < 0.05$)。乌司他丁组的平均动脉压在复苏期较休

克组有显著性增高($P < 0.05$)。结论:内源性血管活性物质参与了创伤失血性休克的整个发展过程,并在休克过程中对血管舒缩及血液灌流起重要的调节作用,蛋白酶抑制剂乌司他丁能提高休克时的平均动脉压,并通过抑制TXA₂和ET的升高,改善灌流。

【关键词】 创伤, 出血性休克; 乌司他丁; 体液因子

【中图分类号】 R453 **【文献标识码】** A

0 引言

乌司他丁已广泛用于临床,用于休克的治疗时,能明显提高休克患者的血压,增加尿量,改善预后,但具体机制不详。我们通过复制兔创伤失血性休克及复苏模型,观察乌司他丁对于内源性血管活性物质的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰白兔20只由解放军总医院动物实验中心提供,3~6月龄,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不拘。随机等分为两组($n = 10$):创伤失血性休克组和创伤失血性休克乌司他丁治疗组。动物在实验前禁食12 h,禁水8 h。

1.2 方法 用30 g/L戊巴比妥钠溶液30 mg/kg经耳缘静脉麻醉成功后,行右侧股动脉、左侧股静脉插管术,动脉插管接换能器与多功能监护仪连接行有创动脉压监测,静脉插管用于补液和采集血标本,并在局麻浸润后行气管切开插管,保留自主呼吸,必要时予以呼吸支持。用骨钳致兔一侧股骨中下三分之一粉碎性骨折后,经股动脉放血(约10 min)使平均动脉压降至(5.32 ± 0.67) kPa。乌司他丁治疗组在休克末期静注乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司)5万 u/kg(溶于生理盐水),创伤失血性休克组静注等量生理盐水。维持90 min后回输全部失血及等量林格液进行复苏,复苏需30 min,以后平衡液2.5 mL/(kg·h)持续泵注。

各组均持续监测记录平均动脉压(MAP),并测定血浆血栓素A₂(TXA₂)和前列环素(PGI₂)的浓度。由于TXA₂和PGI₂生物半衰期短,极不稳定,难以直接测定,故国内外均以测定TXB₂(TXA₂的稳定代谢产物)和6-Keto-PGF_{1 α} (PGI₂的稳定代谢产物)作为

收稿日期:2004-06-07; 修回日期:2004-10-10

作者简介:陈婷婷(1975-)女(汉族),山东省莱芜市人,硕士生(导师王刚),主治医师, Tel: (010) 66937411 Email: chentt301@263.net

判断其浓度的指标。本实验亦采取该测量方法。在休克前、休克末、复苏后 2 h 和 4 h 各时相点静脉采血 2 mL 经肝素-消炎痛抗凝处理后用碘标记放免分析法测定 TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 的浓度分别代表 TXA₂ 和 PGI₂ 的血浓度(试剂盒由解放军总医院东亚放免研究所提供)。在休克前、休克末、复苏后 2 h 和 4 h 各时相点静脉采血 2 mL 注入含 100 g/L 依地酸二钠 (EDTA) 30 μL 和抑肽酶 40 μL 的试管中混匀 3000 r/min 离心 10 min, 分离血浆置 -20℃ 冷冻保存。试剂盒由解放军总医院东亚放免研究所提供, 采用 SN-682 型放射免疫 γ 计数器并严格按照使用说明书测定。

统计学处理: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.0 软件进行分析, 各项数据之间的比较用重复测量的方差分析, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

对休克组和乌司他丁治疗组数据分析的结果显示, 休克组和乌司他丁治疗组血压测量值存在显著性差异 ($P < 0.05$)。从 Tab 1 可以看出, 复苏后血压显著高于创伤性休克组。说明乌司他丁治疗组较休克组血压值高。多变量检验证明, 在不同时间点之间, $P < 0.05$, 说明在不同的时间点, 血压值存在差异。各组动物 MAP 在复苏末均能达到 9.3 kPa (70 mmHg) 以上。休克组在复苏后 2 h 血压即有进行性下降趋势, 乌司他丁治疗组复苏后 4 h 血压才有下降趋势。

表 1 各组 MAP 的变化

Tab 1 Changes of MAP in different groups ($\text{kPa}, n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Pre-shock	Post-shock	2 h after reperfusion	4 h after reperfusion
Shock	13.8 ± 0.9	5.2 ± 0.4	9.9 ± 0.7	7.4 ± 0.6
Ulinastatin	13.7 ± 0.8	5.3 ± 0.5	10.8 ± 0.6	9.8 ± 0.5

重复测量的方差分析表明, 对 6-Keto-PGF_{1α} 组内因素和组间因素效应的检验差异不显著 ($P > 0.05$), 因此认为休克模型在不同时间点 6-Keto-PGF_{1α} 无明显变化, 且乌司他丁对 6-Keto-PGF_{1α} 无影响。而对 TXB₂ 组内因素和组间因素效应的检验表明, 不同时间点 TXB₂ 逐渐增高, 休克末及复苏后较休克前 TXB₂ 明显升高 ($P < 0.05$)。组间因素差异更为显著 ($P < 0.05$) 是均值差异的主要来源, 即认为乌司他丁是两组 TXB₂ 差值的主要影响因素。从 Tab 2 可以看出乌司他丁对休克后 TXB₂ 的增高有抑制作用

($P < 0.05$, Tab 2)。

表 2 各组 TXA₂, PGI₂ 的变化

Tab 2 Changes of TXA₂, PGI₂ in different groups ($\mu\text{g/L}, n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Pre-shock	Post-shock	2 h after reperfusion	4 h after reperfusion
TXB ₂				
Shock	166 ± 17	215 ± 32	261 ± 32	311 ± 21
Ulinastatin	172 ± 20	210 ± 32	229 ± 20	246 ± 29
6-Keto-PGF _{1α}				
Shock	400 ± 77	384 ± 14	412 ± 97	308 ± 71
Ulinastatin	326 ± 27	316 ± 26	575 ± 37	376 ± 40

TXA₂: thromboxane A₂; PGI₂: prostaglandin I₂; TXB₂: thromboxane B₂; 6-Keto-PGF_{1α}: 6-Keto-prostaglandin F_{1α}.

对内皮素 (ET) 和肾上腺髓质素 (adrenomedullin, ADM) 进行重复测量的方差分析表明, ET 组内因素及组间因素差异显著 ($P < 0.05$, Tab 3), 而 ADM 组内因素差别显著但组间因素差别不显著。从统计学意义上认为, ET 和 ADM 在休克后有增高的趋势, 其中乌司他丁对 ET 的增高有显著抑制 ($P < 0.05$, Tab 3)。

表 3 各组 ET 和 ADM 的变化

Tab 3 Changes of ET and ADM in different groups ($\mu\text{g/L}, n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Pre-shock	Post-shock	2 h after reperfusion	4 h after reperfusion
ET				
Shock	429 ± 29	570 ± 24	553 ± 27	432 ± 17
Ulinastatin	432 ± 18	421 ± 12	496 ± 23	442 ± 19
ADM				
Shock	85 ± 14	92 ± 19	98 ± 15	112 ± 11
Ulinastatin	88 ± 15	91 ± 14	97 ± 26	114 ± 16

ET: endothelin; ADM: adrenomedullin.

复苏后 4 h 空气栓塞处死动物。取右下肺叶组织普通病理切片在光学显微镜下观察, 休克组的肺充血、间质水肿、增宽, 炎性细胞聚集, 但乌司他丁治疗组病变较轻。钼酸染色在电镜下观察, 休克组动物的肺内皮细胞肿胀甚至崩解, 吞饮小泡大量增多, 而乌司他丁治疗组病变较轻。

3 讨论

TXA₂/PGI₂ 系统在维持血管紧张性和血小板聚集方面具有重要意义, 两者具有相反的调节作用。正

常情况下两者的代谢消长处于动态平衡,从而使血管保持一定的紧张性并控制着血小板的聚集与血栓形成。失血性休克时,由于儿茶酚胺释放、组织缺氧、组胺释放及补体激活等因素使血小板产生和释放 TXA₂ 增多,而血管内皮细胞因缺氧、酸中毒而受损,PGI₂ 生成减少^[1]。本实验结果显示,休克末 TXB₂ 的浓度即较休克前有明显升高,复苏后有所回降,但仍显著高于休克前,但 6-Keto-PGF_{1α} 无明显变化。

TXA₂ 能引起冠状动脉、肠系膜动脉的收缩,以及血小板聚集和膜溶解,从而影响局部和全身微循环,使休克后期肠道细菌、内毒素移位形成的菌血症、内毒素血症进一步加重,从而导致全身炎症反应综合征的发生和发展。在内毒素动物模型中, TXB₂ 明显增加,且 TXA₂ 的拮抗剂能明显改善存活率,表明 TXA₂ 在脓毒症的发病及发展中有重要作用。Aibi 等^[2] 研究表明,在离体实验中,乌司他丁能抑制内毒素激活的巨噬细胞释放 TXB₂。本实验结果进一步证明,在创伤失血性休克动物模型中,治疗浓度的乌司他丁也能抑制 TXB₂ 的增加,从而减轻组织的缺血缺氧和再灌注损伤。TXA₂ 的合成共有四种合成酶即环磷脂酶 A₂(CPLA₂),前列腺素合成酶-1,-2(PHS-1,-2)和 TXA₂ 合成酶。内毒素正是通过诱导产生 CPLA₂ 和 PHS-2 使 TXA₂ 和前列腺素(PGS)类介质增加。乌司他丁的作用机制可能与其在 Kawasaki 病中的治疗机制相似,通过抑制蛋白激酶 C 的活性抑制 PHS-2 的诱导产生,从而抑制了创伤性休克期 TXB₂ 的增加而改善脏器灌注,有利于休克的好转^[3]。

ET 是目前所知作用最强、持续最久的内源性缩血管多肽,也是最强的气管平滑肌收缩物质。麻醉和手术操作本身可引起血浆 ET 升高,而且 ET 被认为是评价应激强度的重要指标^[4]。ET 在调节局部血流中起重要作用,同时对尿液的生成、循环激素和细胞因子的释放等均具有调节作用。缺血、缺氧和再灌注损伤可以明显促进 ET 的大量释放^[5-7];细胞因子如转移生长因子、肿瘤坏死因子等可促进 ET 的合成和释放。血栓素及内毒素是 ET 释放的强效刺激剂。研究结果表明,创伤失血性休克后,ET 呈升高状态,休克末及复苏后 2 h 较休克前显著增高。应用乌司他丁复苏后 2 h 对 ET 有显著性抑制。

ADM 是 1993 年从人的嗜铬细胞瘤中分离出的一种新的降压活性多肽,有多种生物学效应,最突出的作用是扩张血管、降低血压^[8]。血管内皮细胞是合成分泌 ADM 和 ET 的重要场所,其释放两者的速率相近,但两者作用相反。它们作为体内广泛存在的复

杂调节网络的一部分,以胞内分泌、自分泌、旁分泌和血液循环等方式协调着心血管系统的功能和代谢,在维持内环境稳定及局部组织器官的血流灌注上起着重要作用^[7]。研究结果显示,创伤失血性休克使 ADM 呈增高趋势,复苏后 4 h 较休克前有显著性增高,乌司他丁对 ADM 无明显抑制作用。乌司他丁对 ET/ADM 的不同作用,提示对该组内源性活性物质的调节也是乌司他丁治疗休克的机制之一。

综上所述,上述四种内源性血管活性物质参与了创伤失血性休克的发生发展,两组活性物质的动态平衡在休克和抗休克中具有重要作用。乌司他丁用于创伤失血性休克的治疗,可提高血压改善组织灌注。这种抗休克作用可能部分通过抑制血栓素和 ET 的增高,改变了两组内源性活性物质的比例而实现。

【参考文献】

- [1] Oborin AN, Chuklin SN, Kobria TM. The prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ content of the blood of dogs in the dynamic development of hemorrhagic shock [J]. *Can J Anaesth*, 2001; 48(9): 924 - 929.
- [2] Aibi KM, Cook JA. Ulinastatin, a human trypsin inhibitor, inhibits endotoxin-induced thromboxane B₂ production in human monocytes [J]. *Crit Care Med*, 1997; 25: 430 - 434.
- [3] Aihara T, Shiraishi M, Hiroyasu S, et al. Ulinastatin, a human trypsin inhibitor, attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury by downregulating TNF-α in the liver [J]. *Transplant Proc*, 1998; 30(1): 3731 - 3734.
- [4] Okumura H, Nagaya N, Itoh T, et al. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway [J]. *Circulation*, 2004; 109(2): 242 - 248.
- [5] Nicholls MG, Charles CJ, Lainchbury JG, et al. Adrenomedullin in heart failure [J]. *Hypertens Res*, 2003; 26: S135 - S140.
- [6] 王海燕, 贾国良, 郭文怡, 等. 比索洛尔对充血性心衰患者 CGRP 和 ET-1 浓度及心脏功能的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2003; 24(7): 658 - 660.
Wang HY, Jia GL, Guo WY, et al. Effects of bisoprolol on plasma calcitonin gene related peptide, endothelin and heart function in patients with chronic heart failure [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(7): 658 - 660.
- [7] 谢满江, 余志斌, 郭群, 等. 内皮素-1 促进去甲肾上腺素诱导的心肌细胞凋亡 [J]. 第四军医大学学报, 2002 23(1): 8 - 11.
Xie MJ, Yu ZB, Guo Q, et al. Endothelin-1 enhances norepinephrine-induced apoptosis in cardiac myocytes [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002 23(1): 8 - 11.
- [8] Merkely B, Kissó O, Vago H, et al. Arrhythmogenic action of endothelin-1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2000; 48(2): 357 - 358.