

· 基础医学 ·

文章编号: 1002-0217( 2017) 01-0001-04

## 脓毒症性 ARDS 大鼠肺泡表面活性物质结合蛋白的变化及乌司他丁的干预效果

张冬青<sup>1,2</sup>, 王胜云<sup>1</sup>, 刘梅<sup>2</sup>, 孙克玉<sup>2</sup>, 李文放<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学附属长征医院 急救科, 上海 200003; 2. 上海市闵行区中心医院 急诊科, 上海 201199)

**【摘要】**目的: 观察乌司他丁注射液干预前后盲肠结扎穿孔法( CLP) 致脓毒症性急性呼吸窘迫综合征( ARDS) 大鼠肺泡表面活性物质的改变, 探讨表面活性物质在 CLP 致 ARDS 发生中的作用以及乌司他丁对其影响。方法: 健康成年 SD 大鼠 90 只, 体重 200~240 g, 随机分为 3 组: 假手术对照组( Sham 组  $n=30$ )、脓毒症组( CLP 组  $n=30$ ) 和乌司他丁组( UST 组  $n=30$ )。利用 CLP 法建立大鼠脓毒症模型。测定各组大鼠造模后 6、12、24、48 h 四个时间点肺湿/干质量比( 肺水肿指数); 使用苏木精-伊红( HE) 染色方法和透射电镜对肺组织进行病理观察及急性肺损伤病理评分; 通过实时荧光定量核酸扩增技术( RT-PCR) 和免疫印迹试验( WB) 分别检测肺泡表面活性物质结合蛋白 B( SP-B) 和肺泡表面活性物质结合蛋白 C( SP-C) 在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达情况。结果: 与对照组相比, 肺水肿指数和肺损伤病理评分显示乌司他丁组大鼠肺损伤明显减轻(  $P<0.05$ ); 乌司他丁组大鼠肺组织中 SP-B 和 SP-C 在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达都较 CLP 组明显升高(  $P<0.01$ )。结论: 乌司他丁可以提高脓毒症性 ARDS 大鼠肺泡表面活性物质结合蛋白含量, 有效减轻肺损伤。

**【关键词】**急性呼吸窘迫综合征; 乌司他丁; 肺泡表面活性物质结合蛋白 B; 肺泡表面活性物质结合蛋白 C

**【中图分类号】**R 459.7 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.01.001

## Changes of pulmonary surfactant protein and protective effects of ulinastatin on septic ARDS in rats

ZHANG Dongqing, WANG Shengyun, LIU Mei, SUN Keyu, LI Wenfang

Department of Emergency Medicine, Affiliated Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the changes of pulmonary surfactant protein as well as protective effects and mechanisms of ulinastatin in rats with septic acute respiratory distress syndrome( ARDS) induced by cecum ligation and puncture( CLP). **Methods:** Ninety healthy adult SD rats( weighing 200-240 g) were randomized into sham operation group ( Sham group,  $n=30$ ), sepsis group ( CLP group,  $n=30$ ) and ulinastatin treatment group ( UTI group  $n=30$ ). Septic rat models were prepared by conventional CLP technique. Rats in each group were sacrificed at 6, 12, 24 and 48 h after successful model development, and lung tissues were taken and weighed to calculate the wet/dry( W/D) index. Hematoxylin & eosin( HE) staining was performed and transmission electron microscope was used to observe the pathological changes of the lung and rate the degree of acute injury. The RT-PCR and Western blot were performed to respectively quantify the surfactant protein B( SP-B) and surfactant protein C( SP-C) mRNA expression and protein level. **Results:** As compared with CLP group, the survival rate of rats in UTI group was significantly increased(  $P<0.01$ ), with lower pulmonary edema index and pathological scores representing lung injury(  $P<0.05$ ). The mRNA and protein levels of SP-B and SP-C were dramatically increased in rats in the UTI group. **Conclusion:** Ulinastatin injection may efficiently reduce lung injury as well as improve the survival rate of rats with septic ARDS and up-regulate the SP-B and SP-C expression.

**【Key words】** acute respiratory distress syndrome; Ulinastatin; SP-B; SP-C

急性呼吸窘迫综合征( acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是指心源性以外的各种肺内外致病因素导致的急性、进行性缺氧呼吸衰竭<sup>[1-2]</sup>, 发病机制尚未完全阐明<sup>[3]</sup>。肺表面活性物质( pulmonary surfactant, PS) 是由肺泡 II 型细胞和气道 Clara 细胞

合成的脂蛋白混合物, 是维持肺泡形态和功能的重要物质<sup>[4-5]</sup>, 而肺表面活性物质结合蛋白( surfactant protein, SP) 约占 PS 总量的 10%<sup>[6]</sup>。乌司他丁( ulinastatin, UST) 是从人尿中提取的一种尿胰蛋白酶抑制剂( urinary trypsin inhibitor, UTI), 近年来研究显

基金项目: 国家自然科学基金项目( 81171844)

收稿日期: 2016-10-03

作者简介: 张冬青( 1982-), 男, 主治医师, 在职硕士研究生, ( 电话) 13816910479, ( 电子信箱) zhangdq2001@sina.com;

李文放, 男, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, ( 电子信箱) chzhedlwf@163.com 通信作者。

示其在脓毒症、ARDS 中具有肺保护作用<sup>[7-11]</sup>,但具体作用机制尚不明晰。为探究乌司他丁注射液对脓毒症大鼠肺损伤的治疗作用及其分子机制,本研究构建了盲肠结扎穿孔诱导的大鼠脓毒症模型,在此基础上进行了一系列实验。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 90 只,体质量 200~240 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.2 主要试剂 分析纯大肠杆菌内毒素(LPS)购自美国 Sigma 公司。乌司他丁注射液购自广东天普生化医药股份有限公司。小鼠 EnVision III 加强型试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公司。RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 脓毒症大鼠建模 采用经典的盲肠结扎穿孔法(cecum ligation and puncture,CLP),空腹下 3%戊巴比妥(0.1 mL/100g)腹腔注射麻醉。

1.4 实验分组与方法 将 90 只大鼠随机分为 3 组,假手术对照组(Sham 组, n=30):只开腹关腹与复苏,不进行盲肠结扎穿孔术;脓毒症组(CLP 组, n=30):常规进行盲肠结扎穿孔手术;乌司他丁组(UST 组, n=30):在盲肠结扎穿孔术后腹腔注射乌司他丁(10 万 U/kg)。观察 3 组大鼠至 6、12、24、48 h 时各随机处死 5 只,留取肺组织器官标本。

1.5 肺组织湿/干质量比测定 无菌术取每个时间点留取的处死大鼠的右肺上叶,用滤纸吸干表面水分并称湿质量,再置于 70℃烤箱内 48 h,烘干至恒重后称干质量,根据公式计算肺组织湿/干质量比,湿/干质量比=[湿质量/干质量]×100%,即肺水肿指数。

1.6 肺组织病理学检查与肺损伤病理评分 取右肺下叶组织,用 10%中性福尔马林溶液固定 48 h,肺组织用常规石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色。组织学评分依据雷文章等<sup>[10]</sup>的方法,①水肿:0 分,无水肿;1 分,轻度肺泡壁水肿;2 分,中度肺泡壁水肿;3 分,肺泡和间质广泛水肿。②肺泡组织中中性粒细胞(PMN)、肺间质单核细胞(M)浸润:0 分,无 PMN、M 浸润;1 分,间质少量 PMN、M 浸润;2 分,间质及部分肺泡腔内有较多的 PMN 及中等量 M 浸润;3 分,大部分肺泡和间质有 PMN 聚集成团,显著的 M 浸润。③组织出血:0 分,未见明显出血;1 分,间质及肺泡腔少量出血范围≤25%;2 分,毛细血管淤血,出血范围 25%~50%;3 分,肺泡腔出血范围 50%~70%。

1.7 肺组织透射电镜观察 取电镜标本以 3%戊二

醛和 1%锇酸双重固定, Epon 包埋剂包埋,超薄切片,并用醋酸铀和柠檬酸铅电子染色,透射电镜观察切片。

1.8 RT-PCR 法测定肺泡表面活性物质结合蛋白 B (surfactant protein B, SP-B)、肺泡表面活性物质结合蛋白 C (surfactant protein C, SP-C) 在 mRNA 水平的表达 ①根据文献[12],利用 primer primer6.0 软件设计引物:β-actin 上游引物 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',下游引物 5'-TTTAATGTCACG-CACGATTTTC-3'; SP-B 上游引物 5'-AGCCTGGAG-CAAGCGATAC-3',下游引物 5'-AAGCGTCTTCCTTG-GTCATC-3'; SP-C 上游引物 5'-GCATCCCTAGTCTT-GAGGCTTTG-3',下游引物 5'-GAATCAGAATCG-GATCCAGCAC-3'。②采用异硫氰胍一步法快速提取 50 mg 肺组织总 RNA。③根据宝生物公司 RT-PCR 试剂盒说明书操作逆转录 cDNA:依次加入试剂及 4 μg 总 RNA,反应体积 40 μL,反应条件为 42℃延伸 40 min,95℃ 5 min 灭活 AMV 逆转录酶。④按试剂盒要求加入试剂、上下游引物及 cDNA 5 μL,反应体积 25 μL 进行 PCR 扩增,反应条件:94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 40 个循环,最后 72℃延伸 6 min。⑤取各扩增产物 10 μL 加载样液 2 μL 混匀,琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像分析系统及灰度分析软件测平均灰度值,以 β-actin 为内参照。

1.9 Western Blot 法检测 SP-B、SP-C 在蛋白质水平的表达 裂解肺组织细胞提取总蛋白,凝胶成像分析系统进行扫描,采用 Image J 图像分析软件对 SP-B、SP-C 蛋白表达进行分析,以目的条带吸光度与 β-actin 条带吸光度比值作为各目的条带的相对表达水平。

1.10 统计方法 采用 SPSS 18.0 统计软件包进行数据处理。计量指标用均数±标准差表示,组间均数比较用完全随机设计的方差分析,多组间两两比较用 SNK 法。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 肺组织水肿指数及病理学评分 由表 1 可知,Sham 组肺水肿指数相对平稳,CLP 组和乌司他丁组大鼠肺水肿指数都明显升高(P<0.01),CLP 组比乌司他丁组的肺水肿指数高(P<0.05)。HE 染色后,对各组各时间点大鼠肺组织进行形态观察(图 1)及病理学评分,由表 2 可知,相对于 Sham 组,其他两组的病理学评分都明显提高(P<0.01),CLP 组的评分最高。

表 1 不同分组大鼠肺水肿指数(  $n=30 \bar{x} \pm s$  )

	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham 组	3.9±0.2	3.9±0.2 <sup>a</sup>	3.8±0.6 <sup>a</sup>	3.8±0.6 <sup>a</sup>
CLP 组	4.0±0.3	5.8±0.3 <sup>b</sup>	6.0±0.8 <sup>b</sup>	8.0±0.9 <sup>b</sup>
UST 组	3.9±0.2	4.9±0.1 <sup>c</sup>	5.4±0.9 <sup>c</sup>	6.8±0.6 <sup>c</sup>
F 值	1.765	580.714	64.309	275.294
P 值	0.177	0.000	0.000	0.000

注: 多组间两两比较 符号不同表示  $P<0.05$ 。

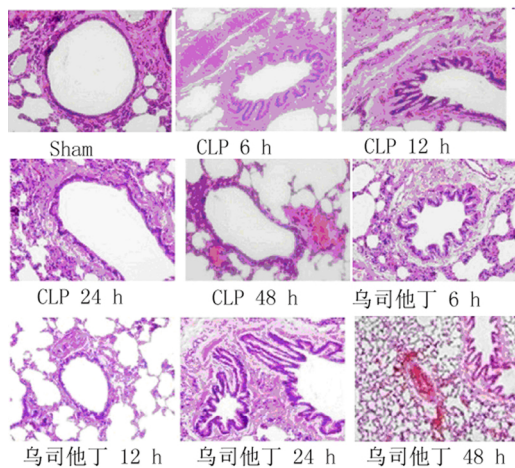


图 1 不同分组大鼠肺组织 HE 染色比较( HE×400)

表 2 不同分组大鼠病理学评分(  $n=30 \bar{x} \pm s$  )

	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham 组	3.7±0.2	3.6±0.3 <sup>a</sup>	3.9±0.5 <sup>a</sup>	3.9±0.4 <sup>a</sup>
CLP 组	3.8±0.5	5.8±0.4 <sup>b</sup>	6.4±0.7 <sup>b</sup>	7.2±0.5 <sup>b</sup>
UST 组	3.6±0.4	4.6±0.3 <sup>c</sup>	5.2±0.6 <sup>c</sup>	6.1±0.8 <sup>c</sup>
F 值	2.000	321.176	127.909	242.000
P 值	0.142	0.000	0.000	0.000

注: 多组间两两比较 符号不同表示  $P<0.05$ 。

表 3 不同分组大鼠 SP-B、SP-C 在 mRNA 水平上的表达(  $n=30 \bar{x} \pm s$  )

	SP-B				SP-C			
	6 h	12 h	24 h	48 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham 组	2.5±0.6 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	6.0±0.5 <sup>a</sup>	3.8±0.9 <sup>a</sup>	1.8±0.6 <sup>a</sup>	3.2±0.6 <sup>a</sup>	5.0±0.4 <sup>a</sup>	3.0±0.6 <sup>a</sup>
CLP 组	1.8±0.1 <sup>b</sup>	1.2±0.3 <sup>b</sup>	1.8±0.4 <sup>b</sup>	0.7±0.3 <sup>b</sup>	1.6±0.2 <sup>b</sup>	1.6±0.3 <sup>b</sup>	1.8±0.4 <sup>b</sup>	1.5±0.3 <sup>b</sup>
UST 组	1.8±0.2 <sup>b</sup>	1.3±0.3 <sup>b</sup>	1.9±0.6 <sup>b</sup>	0.7±0.5 <sup>b</sup>	1.8±0.1 <sup>b</sup>	1.8±0.5 <sup>b</sup>	2.0±0.4 <sup>b</sup>	1.7±0.6 <sup>b</sup>
F 值	35.854	629.791	671.299	250.696	2.927	97.714	602.500	73.704
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000

注: 多组间两两比较 符号不同表示  $P<0.05$ 。

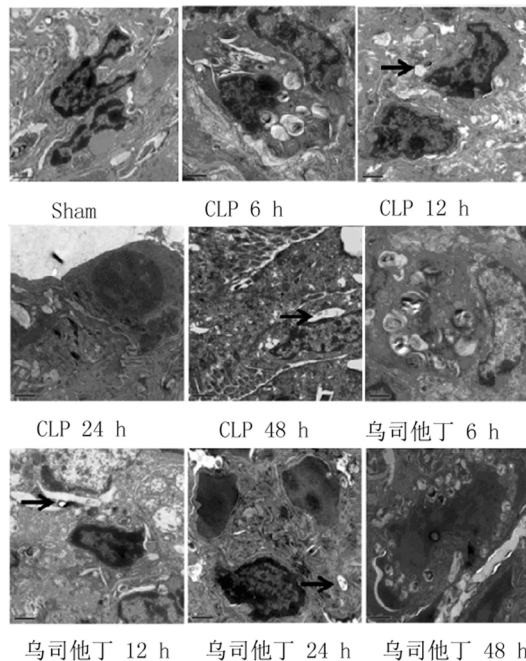
2.4 肺组织中 SP-B、SP-C 在蛋白质水平的表达情况 SP-B、SP-C 在蛋白水平的相对表达量由表 4 可

表 4 不同分组大鼠 SP-B、SP-C 在蛋白质水平上表达的 Western 印迹分析(  $n=30 \bar{x} \pm s$  )

	SP-B				SP-C			
	6 h	12 h	24 h	48 h	6 h	12 h	24 h	48 h
Sham 组	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.4±0.09 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	0.9±0.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.07 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>
CLP 组	0.5±0.1 <sup>b</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>	0.3±0.03 <sup>b</sup>	0.4±0.1 <sup>b</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	0.2±0.03 <sup>b</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>
UST 组	0.7±0.1 <sup>c</sup>	0.6±0.1 <sup>c</sup>	0.5±0.02 <sup>c</sup>	0.6±0.1 <sup>c</sup>	0.7±0.1 <sup>c</sup>	0.5±0.1 <sup>c</sup>	0.4±0.04 <sup>c</sup>	0.4±0.1 <sup>c</sup>
F 值	280.000	520.000	4244.681	520.000	70.000	670.000	2108.108	570.000
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 多组间两两比较 符号不同表示  $P<0.05$ 。

2.2 肺组织透射电镜观察 电镜结果说明乌司他丁组和 CLP 组均有不同程度的肺损伤且有加重的趋势,CLP 组细胞器的损伤程度更甚,见图 2。



注: 箭头所示为细胞内空泡。

图 2 不同分组大鼠肺组织电镜图( ×9000)

2.3 肺组织中 SP-B、SP-C 在 mRNA 水平的表达情况 由表 3 可知,在 mRNA 水平的表达量上,CLP 组相对于 Sham 组 SP-B、SP-C 的表达量要低,但乌司他丁组的表达水平接近于 Sham 组。

知,CLP 组低于乌司他丁组,且均低于 Sham 组。

### 3 讨论

脓毒症是发病率和病死率极高的临床综合征, 严重脓毒症和脓毒症休克时往往会发生多器官功能障碍综合征<sup>[12]</sup>。目前尚无较好的药物或技术来治疗 ARDS。近年来, 一种提取自人类尿液的尿胰蛋白酶抑制剂乌司他丁广泛应用于临床<sup>[13]</sup>, 一些研究发现, 对 SIRS 患者静脉注射乌司他丁与常规治疗相比较, 静脉血清 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  水平明显下降, 差异有统计学意义<sup>[14-15]</sup>, 表明乌司他丁具有抗炎、抗氧化、稳定溶酶体膜等作用。

本研究显示: 相对于 Sham 组, 其他两组大鼠的肺水肿指数、肺损伤病理评分等在术后 12、24、48 h 时间点更高(  $P < 0.01$  )。结合各组大鼠肺组织切片的电镜观察结果, 可看出乌司他丁注射液在保护脓毒症大鼠肺损伤中发挥了重要作用。本研究在前人的基础上进一步细化了时间点, 采用术后 4 个时间点, 分别探究大鼠肺水肿指数等指标, 结合 HE 染色、电子透射实验等从多方面进一步验证了乌司他丁注射液对大鼠肺损伤的保护作用。电镜结果进一步表明, CLP 组均有不同程度的肺损伤且有加重的趋势, 乌司他丁组细胞器的损伤程度明显降低。

PS 是覆盖于肺泡上皮内侧的脂质-蛋白-糖类混合物, 能够降低肺泡气液界面的表面张力, 维持肺泡的正常形态, 对于机体呼吸作用的正常进行有很大影响<sup>[3]</sup>。PS 中的蛋白为肺表面活性物质结合蛋白, 包括 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D, 这些蛋白对于维持 PS 的正常功能意义重大。SP-B、SP-C 由肺泡 II 型细胞合成和分泌, 在 ARDS 过程中, 累积的炎症因子、炎症介质、自由基等的作用破坏和损伤了肺泡 II 型细胞, 必定会引起 SP-B、SP-C 合成和分泌数量的下降, 这也是 CLP 组和乌司他丁组大鼠肺组织中 SP-B、SP-C mRNA 和蛋白均比 Sham 组低的原因; 综合 SP-B、SP-C mRNA 和蛋白的表达数据, 发现 mRNA 和蛋白的表达水平变化趋势不一致, 我们推测其原因可能有: 转录和翻译的不一致性, 由于 mRNA 的不稳定性和转录到翻译过程的不可知性, 基因的 mRNA 表达水平不能精确地反映蛋白表达水平; 另外一个原因可能是由于细胞内细胞器的损伤, 有的细胞可以转录出 mRNA, 但是由于线粒体等细胞器的损伤, 这些从细胞核中转录出来的 mRNA 不能够翻译成蛋白, 由电镜观察发现线粒体等细胞器的损伤和丢失可以知道这种情况也是可能发生的。

综上所述, 本研究表明乌司他丁对肺损伤有一定保护作用, 这种保护作用影响了 SP-B 和 SP-C 等

蛋白的表达, 其可能机制是通过抑制炎症反应, 避免脓毒症的过度炎症反应造成的 SP-B、SP-C 表达量下降, 减轻脓毒症引起的肺上皮细胞通透性的升高。该影响是由于乌司他丁的直接作用或其通过抑制炎症反应而间接影响并不十分清楚, 相关具体机制还有待进一步探究。

### 【参考文献】

[1] DELLINGER R P, LEVY M M, CARLET J M, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 [J]. Intensive Care Med, 2008, 34( 1): 17-60.

[2] OSTERBUR K. Multiple organ dysfunction syndrome in humans and animals [J]. J Vet Intern Med, 2014, 28( 4): 1141-1151.

[3] RAMIREZ M. Multiple organ dysfunction syndrome [J]. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2013, 43( 10): 273-237.

[4] DOMBROVSKIY VY, MARTIN AA, SUNDERRAM JM, *et al.* Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003 [J]. Crit Care Med, 2007, 35( 5): 1244-1250.

[5] MARTIN GS, MANNINO DM, EATON S, *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 [J]. N Engl J Med, 2003, 348( 16): 1546-1554.

[6] FEIN AM, CALALANG-COLUCCI MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock [J]. Crit Care Clin, 2000, 16( 2): 289-317.

[7] FORCEVILLE X, VITOUX D, GAUZIT R, *et al.* Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients [J]. Crit Care Med, 1998, 26( 9): 1536-1544.

[8] FIALKOW L, VIEIRA S, FERNANDES A, *et al.* Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria [J]. Intensive Care Med, 2002, 28( 11): 1644-1648.

[9] AYVAZ S. Effects of methylene blue in acute lung injury induced by blunt chest trauma [J]. Hippokratia, 2014, 18( 1): 50-56.

[10] CARVALHO NC, DAVIS CC, MELLENCAMP MA, *et al.* Higher Levels of Spontaneous Breathing Reduce Lung Injury in Experimental Moderate Acute Respiratory Distress Syndrome [J]. Crit Care Med, 2014, 42( 11): e702-e715.

[11] KAROLI R. Acute lung injury after platelet transfusion in a patient with dengue fever [J]. Asian J Transfus Sci, 2014, 8( 2): 131-134.

[12] MORITA K. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96( 2): 511-5116.

[13] CHEN X. Ulinastatin reduces urinary sepsis-related inflammation by upregulating IL10 and downregulating TNF $\alpha$  levels [J]. Mol Med Rep, 2013, 8( 1): 29-34.

[14] GAO C, R LI S, WANG. Ulinastatin protects pulmonary tissues from lipopolysaccharide-induced injury as an immunomodulator [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 72( 1): 169-176.

[15] 白春学. 急性肺损伤/呼吸窘迫综合征进展 [J]. 上海医学, 2007, 30( 9): 645-648.