

## 乌司他丁对宫内窘迫致胎鼠急性肺损伤的影响

戴 珩,蔡 孟,李有长\*

重庆市妇幼保健院手术麻醉科,重庆 401147

**[摘要]** **目的:**探讨乌司他丁对宫内窘迫致胎鼠急性肺损伤的影响,以期为临床上治疗宫内窘迫致新生儿呼吸窘迫综合征提供新的治疗方案。**方法:**健康孕20 d的SD大鼠16只,采用随机数字表法分为4组,每只孕大鼠取5只活胎鼠( $n=20$ ),分为对照组(C组)、乌司他丁对照组(S组)、宫内窘迫组(A组)、乌司他丁治疗组(U组)。C组与S组为假手术组,A组和U组建立宫内窘迫模型,S组和U组在手术前30 min经孕大鼠股静脉注射乌司他丁50 000 U/kg。取胎鼠收集外周血行血气分析,测定胎鼠肺湿/干质量比值(W/D),HE染色观察胎鼠肺组织病理改变;Western blot方法测定肺组织NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平;ELISA方法测定肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 及白细胞介素(interleukin, IL)-6含量。**结果:**C组与S组胎鼠血气分析、W/D值、肺组织形态、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平、TNF- $\alpha$ 及IL-6含量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );与C组相比,A组CO<sub>2</sub>分压(PCO<sub>2</sub>)、乳酸(Lac)含量明显增高,pH、氧分压(PO<sub>2</sub>)降低,W/D值增大,NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平增高,TNF- $\alpha$ 及IL-6含量增多( $P < 0.05$ ),肺组织明显水肿充血;与A组相比,U组PCO<sub>2</sub>、Lac含量明显降低,pH、PO<sub>2</sub>增高,W/D值、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平、TNF- $\alpha$ 及IL-6含量降低( $P < 0.05$ ),肺组织水肿充血情况明显好转。**结论:**乌司他丁可降低胎鼠肺组织中NF- $\kappa$ B的细胞信号转导,减少TNF- $\alpha$ 和IL-6等炎症因子的合成,抑制炎症反应,提高胎鼠血氧分压,减轻宫内窘迫造成的胎鼠急性肺损伤。

**[关键词]** 乌司他丁;宫内窘迫;胎鼠;急性肺损伤

**[中图分类号]** R714.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)11-1512-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20181105

## Influence of ulinastatin on acute lung injury in fetal rat induced by fetal distress

Dai Heng, Cai Meng, Li Youchang\*

Department of Anesthesiology, Chongqing Maternal and Child Health Hospital, Chongqing 401147, China

**[Abstract]** **Objective:** The goal of this study is to explore the effects of ulinastatin on acute lung injury in fetal rat induced by fetal distress, and provide support for developing a new treatment of respiratory distress syndrome. **Methods:** A total of 16 SD pregnant rats were randomly divided into four groups: the control group (group C), the ulinastatin control group (group S), the fetal distress group (group A), and the ulinastatin treatment group (group U). Group C and group S were sham operation groups. Fetal rat intrauterine distress model was set up in both group A and group U. Thirty minutes before the operations, the pregnant rats in group S and group U received injection of ulinastatin 50 000 U/kg through femoral vein. Five living fetal rats were removed in each pregnant rat. The blood gas analysis and the lung wet / dry weight ratio (W/D) of fetal rats were determined. The pathological changes in the lung tissue of fetal rats were observed by H & E staining, and the protein expression of NF- $\kappa$ B p65 were measured by Western blot. Furthermore, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the fetal lung were measured by ELISA. **Results:** All the results in group S had no significant difference with group C ( $P > 0.05$ ). The pH value and partial pressure of oxygen were significantly lower in group A than group C, and those in group U were obviously higher than group A ( $P < 0.05$ ). The partial pressure of carbon dioxide, lactic acid content, the lung W/D, and the protein expression of NF- $\kappa$ B p65, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 of fetal rats were all significantly increased in group A than group C ( $P < 0.05$ ), and those in group U were obviously lower than those in group A ( $P < 0.05$ ). The congestion and edema of the lung tissue in group U were obviously alleviated than that of group A. **Conclusion:** Ulinastatin can alleviate the degree of acute lung injury in fetal rat induced by fetal distress by decreasing the protein expression of NF- $\kappa$ B p65, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6, inhibiting the inflammatory response and increasing the partial pressure of oxygen.

**[Key words]** ulinastatin; fetal distress; fetal rat; acute lung injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(11): 1512-1516]

**[基金项目]** 重庆市卫生局科研资助项目(2013-2-138)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 1102690108@qq.com

宫内窘迫是引起胎儿宫内缺氧征象的一种综合症状,可致新生儿窒息、围产儿死亡,神经系统损害等后遗症<sup>[1]</sup>。当胎儿肺组织发生缺血缺氧时,胎儿肺泡上皮细胞损害,诱发胎儿急性肺损伤(acute lung injury, ALI)<sup>[2]</sup>,引发新生儿呼吸相关性疾病和严重低氧血症。如何改善宫内窘迫胎儿ALI,降低新生儿缺氧缺血性病变,提高新生儿预后,具有重要的临床意义。ALI是一种炎症综合征,是全身炎症反应综合征在肺部的表现,炎症介质调控失衡在其发生发展过程中起重要作用。乌司他丁(ulinastatin, UTI)是一种广谱蛋白酶抑制剂,能减少炎症介质的过度释放,改善微循环和组织灌注,发挥脏器保护作用。有研究表明UTI在大鼠ALI中具有保护作用<sup>[3]</sup>,可降低大鼠肺组织及血浆中炎症介质的表达<sup>[4]</sup>,减轻肺损伤<sup>[5]</sup>,同时临床研究也证实UTI可明显减轻肺损伤,保护和改善肺功能<sup>[6]</sup>。但UTI是否能通过母体给药途径,改善宫内窘迫胎儿ALI,提高新生儿存活率与治愈率尚未见报道。本研究采用孕大鼠宫内窘迫模型,通过母体给药途径,探讨UTI对宫内窘迫致胎鼠ALI的影响,以期为临床上治疗宫内窘迫致胎鼠ALI提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  ELISA 测定试剂盒(RD公司,美国),白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA 测定试剂盒(武汉博士德生物公司),NF- $\kappa$ B p65 鼠单克隆抗体(批号:sc-372, Santa Cruz公司,美国),二抗(武汉博士得生物公司),蛋白提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验动物与分组

健康孕20 d的SD大鼠16只,体重480~550 g,由第三军医大学实验动物中心提供,采用随机数字表法将其分为4组,对照组(C组)、UTI对照组(S组)、宫内窘迫组(A组)、UTI治疗组(U组),每只孕大鼠取5只活胎鼠。

#### 1.2.2 动物模型制备

参阅Magal等<sup>[7-8]</sup>方法制备模型,将孕20 d大鼠用3.5%水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定于实验手术板上,碘伏、酒精(75%)消毒,

取下腹正中切口,打开腹腔,于两侧下腹部可见球形胎鼠于子宫中,用微动脉夹钳夹母鼠通向两侧子宫和卵巢的动静脉20 min。钳夹过程中不断更换覆盖于子宫上的温生理盐水纱布,保持局部温度在37℃左右。松开微动脉夹,血流恢复40 min后剖宫取活胎鼠。C组仅对大鼠进行开腹关腹手术,不对胎鼠做任何操作;S组在手术前30 min经孕大鼠股静脉注射UTI 50 000 U/kg,不对胎鼠做处理;A组建立宫内窘迫模型;U组在建立宫内窘迫模型前30 min经孕大鼠股静脉注射UTI 50 000 U/kg。

#### 1.2.3 血气分析检测

取出胎鼠,收集外周血行血气分析,记录胎鼠血浆中的pH值、氧分压( $PO_2$ )、二氧化碳分压( $PCO_2$ )、乳酸(Lac)等指标。

#### 1.2.4 胎鼠肺湿/干质量比值(W/D)测定

胎鼠断头处死后提取肺标本,称取湿质量后放入60℃恒温干燥箱内,1周后称取其干质量,计算W/D值。

#### 1.2.5 HE染色观察肺组织形态学改变

取肺组织,置4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,BX5/TF显微镜下(Olympus公司,日本)观察肺组织病理学改变。

#### 1.2.6 Western blot法检测肺组织NF- $\kappa$ B p65蛋白表达

取肺组织,Western blot测定肺组织NF- $\kappa$ B蛋白水平。肺组织制成匀浆,用蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白,4℃离心,取上清液以BCA方法检测蛋白质浓度。10% SDS-PAGE电泳转膜,用5%脱脂奶粉溶液室温封闭4 h。洗膜后分别加入一抗NF- $\kappa$ B p65抗体(1:500稀释)及辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000稀释),ECL发光试剂显影,暗室内行X线胶片曝光,显影和定影。凝胶图像分析系统扫描成像,Quantity One 4.3进行分析,以NF- $\kappa$ B p65与 $\beta$ -actin灰度值的比值表示其表达相对水平。

#### 1.2.7 ELISA法检测肺组织TNF- $\alpha$ 及IL-6含量

取部分上述保存的肺组织制成匀浆,4℃离心,取上清液采用ELISA法进行测定,严格按照TNF- $\alpha$ 测定试剂盒、IL-6测定试剂盒操作,使用酶标仪于450 nm处测定吸光度值,参照标准曲线,计算TNF- $\alpha$ 、IL-6含量。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计学软件进行分析,计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UTI对胎鼠外周血气分析及肺W/D值的影响

C组与S组外周血气分析及W/D值无明显差异( $P > 0.05$ ,表1);A组PCO<sub>2</sub>、Lac含量较C组明显增高,pH、PO<sub>2</sub>降低,W/D值增大( $P < 0.05$ ,表1);U组PCO<sub>2</sub>、Lac含量较A组明显降低,pH、PO<sub>2</sub>增高,W/D

值减小( $P < 0.05$ ,表1)。

### 2.2 UTI对胎鼠肺组织形态学的影响

C组与S组肺组织结构清晰,肺泡结构正常;A组肺组织出现明显炎性改变,结构肿胀,肺泡间隔增宽,肺泡腔内大量红细胞浸润,毛细血管扩张充血;U组肺组织充血水肿较A组有明显好转(图1)。

表1 乌司他丁对胎鼠外周血气分析及肺W/D值的影响

Table 1 Effects of UTI on the blood gas analysis and the lung W/D of fetal rats

( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

组别	PO <sub>2</sub> (mmHg)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	pH	Lac含量(mmol/L)	W/D值
C组	39.14 ± 0.97	53.29 ± 1.36	7.33 ± 0.04	9.79 ± 0.88	3.61 ± 0.14
S组	38.74 ± 1.23	53.86 ± 1.07	7.32 ± 0.07	9.81 ± 0.93	3.55 ± 0.21
A组	22.47 ± 0.77*	68.38 ± 0.92*	7.03 ± 0.02*	22.31 ± 1.03*	4.66 ± 0.33*
U组	31.02 ± 1.43**	59.16 ± 1.19**	7.21 ± 0.41**	14.62 ± 1.48**	4.06 ± 0.78**
F值	970.746	743.667	6.716	570.621	26.981
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与C组比较,\* $P < 0.05$ ;与A组比较,\*\* $P < 0.05$ 。

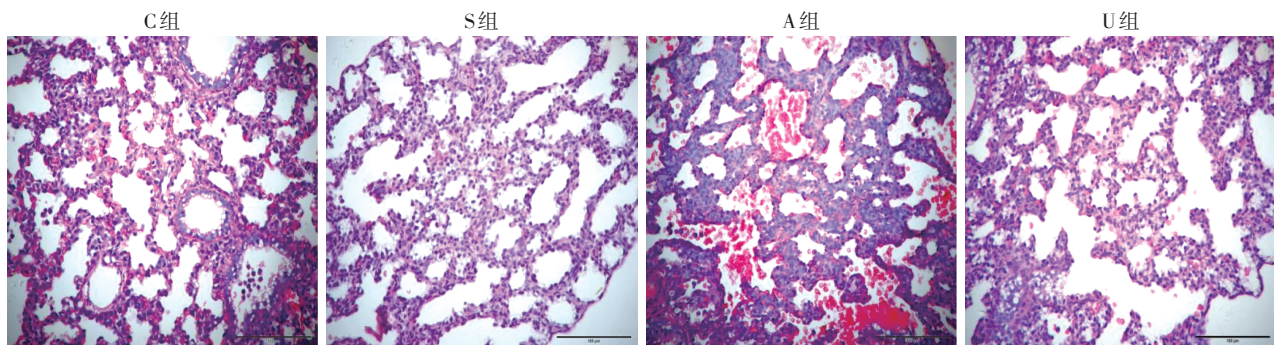


图1 UTI对胎鼠肺组织形态学的影响(×200)

Figure 1 Effects of UTI on pathological changes in the lung tissue of fetal rats (×200)

### 2.3 UTI对肺组织NF-κB p65蛋白表达水平的影响

C组与S组肺组织NF-κB p65蛋白表达水平无明显差异( $P > 0.05$ ,图2,表2),A组和U组肺组织NF-κB p65蛋白表达水平较C组显著提高( $P < 0.05$ ,图2,表2),同时U组肺组织NF-κB p65蛋白表达水平较A组显著降低( $P < 0.05$ ,图2,表2)。

### 2.4 UTI对肺组织TNF-α及IL-6含量的影响

与C组比较,S组肺组织TNF-α及IL-6含量无明显改变( $P > 0.05$ ,表3),A组和U组肺组织TNF-α及IL-6含量显著增加( $P < 0.05$ ,表3);与A组相比,U组肺组织TNF-α及IL-6含量明显降低( $P < 0.05$ ,表3)。

## 3 讨论

宫内窘迫是指胎儿在子宫内出现缺血缺氧,危



图2 UTI对胎鼠肺组织NF-κB p65蛋白表达水平的影响  
Figure 2 Effects of UTI on the protein expression of NF-κB p65 in the fetal lung

及胎儿生命安全的现象,是导致足月儿ALI的危险因素<sup>[9]</sup>。有学者研究显示宫内窘迫为新生儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndmme, RDS)的危险因素之一<sup>[10-11]</sup>,而RDS是引起新生儿呼吸衰竭和死亡的常见原因<sup>[12]</sup>。因此,探索有效改善宫内窘迫引发的胎儿缺血缺氧症状、治疗胎儿ALI的方法就具有重要临床意义。



表2 UTI对胎鼠肺组织NF-κB p65 蛋白表达水平的影响  
Table 2 Effects of UTI on the protein expression of NF-κB p65 in the fetal lung (n=20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	NF-κB p65
C组	0.361 ± 0.014
S组	0.367 ± 0.003
A组	0.853 ± 0.017*
U组	0.647 ± 0.042**
F值	2 136.83
P值	<0.001

与C组比较,\*P < 0.05;与A组比较,\*\*P < 0.05。

表3 乌司他丁对胎鼠肺组织TNF-α及IL-6含量的影响  
Table 3 Effects of UTI on the levels of TNF-α and IL-6 in the fetal lung (pg/mL, n=20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α	IL-6
C组	25.50 ± 1.03	5.26 ± 0.24
S组	27.63 ± 0.89	5.10 ± 0.18
A组	121.62 ± 1.66*	18.58 ± 0.06*
U组	61.70 ± 1.02**	9.12 ± 0.03**
F值	28.488	33.842
P值	<0.001	<0.001

与C组比较,\*P < 0.05;与A组比较,\*\*P < 0.05。

本研究参照 Magal 等<sup>[7-8]</sup>方法制备孕鼠宫内窘迫模型,宫内窘迫组(A组)的胎鼠血气分析显示,PCO<sub>2</sub>、Lac 含量较对照组(C组)明显增高,pH、PO<sub>2</sub>降低(P < 0.05),胎鼠缺血缺氧,出现酸中毒症状。肺W/D是常用而可靠的肺损伤指标,A组胎鼠肺组织W/D值显著增加;同时,HE染色显示A组肺组织损伤严重,肺泡间隔增宽,毛细血管扩张充血,肺泡腔大量渗出、出血。以上均提示胎鼠ALI造模成功。

有研究指出,肺内过度、失控的炎症反应是引发ALI的根本原因<sup>[13]</sup>。UTI是一种从人尿中分离纯化的蛋白酶抑制剂,在大鼠肺I/R实验<sup>[14]</sup>、脓毒症诱导的ALI实验<sup>[15]</sup>中,UTI能减少炎性细胞激活,减轻肺损伤,避免PO<sub>2</sub>出现明显下降。同时大量临床研究也证实,UTI有很好的脏器保护作用,可明显改善肺功能<sup>[6]</sup>。但UTI对宫内胎鼠ALI的影响尚未见报道。本研究采用孕大鼠宫内窘迫模型建立胎鼠ALI,UTI治疗组(U组)在术前于孕大鼠静脉注射UTI干预治疗,结果显示U组的动脉PO<sub>2</sub>明显高于A组,肺泡间隔厚度、间质水肿均有明显减轻,肺泡腔渗出、出血减少,肺W/D比值低于A组,提示UTI能有效减轻胎鼠肺组织损伤,改善PO<sub>2</sub>,对胎鼠有较好的肺保护作用。同时,为排除UTI本身对胎鼠的影

响,我们设立了UTI对照组(S组),结果表明S组与C组各项测定指标均无明显变化(P > 0.05),提示本研究剂量UTI本身并不会引起胎鼠肺损伤。

NF-κB是参与炎症反应的一个重要信号转导分子<sup>[16]</sup>。目前认为,NF-κB被激活导致炎症介质和细胞因子过度释放是ALI时炎症反应失控的关键<sup>[17]</sup>,也有研究表明,抑制NF-κB活性对ALI有保护作用<sup>[18]</sup>。TNF-α被认为是ALI中最早参与的细胞因子<sup>[19]</sup>,可直接损伤血管内皮细胞和肺泡上皮细胞,促进肺动脉血管内皮细胞凋亡,造成肺损伤<sup>[20]</sup>。IL-6又名B细胞刺激因子,具有广泛生物活性和免疫调节作用,可产生细胞损害,活化血管内皮细胞及淋巴细胞,诱导炎症反应进一步加剧。TNF-α和IL-6均是NF-κB介导产生的重要细胞因子及促炎因子,细胞因子的增多又可正反馈激活NF-κB细胞信号转导途径,通过级联放大效应,进一步造成肺损伤。本研究发现UTI可有效下调ALI胎鼠肺组织中NF-κB的表达,降低下游靶基因表达产物TNF-α、IL-6的含量,提示孕大鼠静脉注射UTI可有效抑制胎鼠肺组织NF-κB信号转导,降低TNF-α、IL-6等炎症因子的产生,减轻炎症反应,进而减少胎鼠ALI的发生。

综上所述,通过孕大鼠静脉注射UTI,可减轻宫内窘迫造成的胎鼠肺损伤,提高胎鼠动脉PO<sub>2</sub>,降低肺W/D值。该保护效应可能与UTI降低NF-κB信号转导,减少TNF-α和IL-6等炎症因子合成,抑制炎症反应有关。这或将为临床上妊娠期宫内窘迫造成的新生儿ALI及呼吸窘迫综合征提供另一有效治疗手段。

#### [参考文献]

- [1] 李 岩.影响足月儿发生呼吸窘迫综合征相关因素的Logistic回归分析[J].实用儿科临床杂志,2012,27(15):1150,1196
- [2] Cai Z, Liu J, Bian H, et al. Suppression of P2X7/NF-κB pathways by schisandrin B contributes to attenuation of lipopolysaccharide - induced inflammatory responses in acute lung injury [J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(4):499-507
- [3] 陈 达,张洪颖,贾 浩,等.乌司他丁保护百草枯中毒大鼠肺免受损伤的作用[J].中国病理生理杂志,2015,31(1):166-171
- [4] 黄文彬,申 捷,张 琳,等.乌司他丁对鼠急性肺损伤的保护作用及相关因子的表达[J].中华急诊医学杂志,2010,19(1):37-42
- [5] 肖 刚,赵文静,曾因明.乌司他丁对大鼠呼吸机相关性肺损伤的预防作用及机制研究[J].中国危重病急救

- 医学,2008,20(6):371-372,插1
- [6] 魏磊,刘标,梁永年,等. 乌司他丁在体外循环中肺保护机制的研究[J]. 中国体外循环杂志,2009,28(1):4-7
- [7] Magal E, Gddin E, Hare S, et al. Acute uteroplacental ischemic embryo: lactic acid accumulation and prostaglandin production in the fetal rat brain [J]. J Neurochem, 1988, 51(1):75-80
- [8] Tanaka M, Natori M, Ishimoto H, et al. Experimental growth-retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant sprague-dawley rats [J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 171(5):1231-1234
- [9] 闫静,丁玉红,刘倩. 足月儿呼吸窘迫综合征高危因素临床分析[J]. 儿科药学杂志,2015,21(11):19-21
- [10] Yang N, Liu J, He PP, et al. Correlation analysis of premature rupture of membranes and term neonates with respiratory distress syndrome [J]. J Appl Clin Pediatr, 2012, 27(8):604-606
- [11] 陈金梅. 190例足月新生儿急性呼吸窘迫高危因素分析[J]. 中国妇幼保健,2011,26(23):3670-3671
- [12] Liu J, Shi Y, Dong JY, et al. Clinical characteristics, diagnosis and management of respiratory distress syndrome in full-term neonates [J]. Chin Med J, 2010, 123(19):2640-2644
- [13] FeinAM, Calalangeolucci MG. Acutelung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock [J]. Crit Care Clin, 2000, 16(2):289-317
- [14] Okuhama Y, Shiraishi M, Higa T, et al. Protective effects of ulinastatin against ischemia-reperfusion injury [J]. J Surg Res, 1999, 82(1):34-42
- [15] Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, et al. Protective role of urinary trypsin inhibitor in acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2005, 230(4):281-287
- [16] 朱自路,熊俊,徐桦,等. 急性肺损伤小鼠NF- $\kappa$ B的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2004,24(1):49-51
- [17] Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB [J]. Crit Care Med, 2005, 33(12 Suppl):414-416
- [18] Chung IS, Kim JA, Kim JA, et al. Reactive oxygen species by isoflurane mediates inhibition of nuclear factor kappa B activation in lipopolysaccharide-induced acute inflammation of the lung [J]. Anesth Analg, 2013, 116(2):327-335
- [19] Bohuon C. Inflammatory cascade response to toxin release: therapeutic perspectives [J]. Ann Pharmaceu Françaises, 2001, 59(3):191
- [20] 许兵,刘少华,马可,等. 吸入一氧化碳对内毒素性急性肺损伤大鼠肺组织TNF- $\alpha$ 和IL-10表达的影响及意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2006,26(8):690-692,724

[收稿日期] 2017-09-24

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆  
<http://jnm. njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询  
稿件审理情况。