

乌司他丁对感染性脑水肿的干预作用及相关机制研究

刘济滔, 周 凯, 胡 沥(泸州医学院附属医院急诊科, 四川泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨乌司他丁对感染性脑水肿的治疗作用以及对星形胶质细胞在感染性脑水肿中的保护作用。**方法** 55 只按照颈内动脉注射脂多糖(150 μg , 0.15 mL)的方法建立感染性脑水肿模型的大鼠, 随机分为 3 组: 乌司他丁处理组(U 组, $n=45$); 生理盐水对照组(S 组, $n=5$); 空白对照组(C 组, $n=5$)。乌司他丁处理组又按照乌司他丁处理后 6、12、24 h 分为 3 个亚组($n=15$)。采用 HE 染色观察脑组织病理改变; 干湿重法检测脑组织含水量; 流式细胞术检测星形胶质细胞凋亡情况; 胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化技术观察星形胶质细胞活化情况。**结果** 所有实验组大鼠 HE 染色可见脑组织弥漫性水肿; U 组大鼠细胞含水量明显低于 S 组以及 C 组, 差异有统计学意义($P<0.05$), C 组与 S 组间差异无统计学意义($P>0.05$); 各实验组星形胶质细胞均出现凋亡, 在实验 24 h 最为明显, U 组与 C 组、S 组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 各亚组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫组化染色可见 U 组、C 组和 S 组均出现 GFAP 阳性表达细胞; U 组与 C 组、S 组比较, GFAP 表达增强。**结论** 乌司他丁在感染性脑水肿中具有明显的脑保护作用, 该作用与乌司他丁抑制星形胶质细胞异常活化以及凋亡有关。

【关键词】 乌司他丁; 感染性脑水肿; 治疗; 机制

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.15.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)15-1855-03

The treatment effects and possible mechanism of ulinastatin on infectious brain edema LIU Ji-tao, ZHOU Kai, HU Li
(Department of Emergence, Luzhou Medical University, Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the treatment effects of ulinastatin on infectious brain edema and the protective effects of ulinastatin on astrocytes in infectious brain edema rats. **Methods** 55 infectious brain edema rats induced by lipid polysaccharide(150 μg , 0.15 mL) carotid artery injection were randomly divided into 3 groups: ulinastatin group(U group, $n=45$); saline group(S group, $n=5$); control group(C group, $n=5$). U group were divided into 3 subgroups according to different time points after ulinastatin injecting, 6, 12, 24 h($n=15$). HE staining, wet and dry weight method, flow cytometry and Gelatinous fiber acidic protein GFAP immunohistochemistry methods were used respectively to measure the pathological morphology and moisture content of brain tissue, the apoptosis of astrocytes and the activation of astrocytes. **Results** HE staining showed diffuse edema in all experimental rats; moisture content of brain tissue of group U was lower than that in S group and C group, the difference was statistically significant($P<0.05$), there was no significant difference in C group and S group($P>0.05$), all experimental groups showed astrocytes apoptosis which were most significant at 24 h, U group were significantly lower than C groups and S group, the difference was statistically significant($P<0.05$). And there exists difference between each subgroups($P<0.05$). Immunohistochemical staining of three groups showed positive expression of GFAP cell, U group showed enhanced expression of GFAP than C group and S group. **Conclusion** Ulinastatin showed obvious protective effect of brain in infectious brain edema, the possible mechanism may be connected with ulinastatin suppresses astrocyte activation and inhibition of astrocyte apoptosis.

【Key words】 ulinastatin; infectious brain edema; treatment; mechanism

感染性脑水肿是急诊科常见重症, 患者死亡率高。近年来, 星形胶质细胞在感染性脑水肿发生、发展中的作用得到广泛的关注, 认为星形胶质细胞的活化和凋亡在感染性脑水肿中起着重要的作用。乌司他丁(Ulinastatin)是从人尿中提取精制的一种糖蛋白水解酶抑制剂, 又称尿胰蛋白抑制剂。国内外报道认为其可应用于目前急性胰腺炎, 改善微循环; 应用于全身炎症反应综合症, 有效制止炎症介质瀑布级放大; 应用于肿瘤可抑制肿瘤细胞的浸润、转移; 最近研究认为其有强大的脑保护功能^[1-4]。因此, 本实验拟着眼于急诊科常见重症——感染性脑水肿, 探讨乌司他丁在感染性脑水肿中的应用以及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物选取与模型建立 健康清洁级成年雌性 4~8 周龄 SD 大鼠 55 只, 体质量 200~220 g, 购自重庆医科大学动物中心。实验大鼠术前 12 h 禁食, 10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定。取颈正中切口, 依次分离出左颈

总动脉、左颈外动脉、左颈内动脉。先结扎左颈外动脉, 而后用微动脉钳夹闭左颈总动脉近心端, 在左颈总动脉远心端穿刺。向颈内动脉注入脂多糖[LPS(150 μg , 0.15 mL)]建立感染性脑水肿模型。

1.2 实验分组以及处理 将 55 只大鼠依次编号, 按照完全随机的方法将大鼠编入乌司他丁处理组(U 组, $n=45$), 尾静脉注射乌司他丁(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 mL); 生理盐水处理组(S 组, $n=5$), 尾静脉注射生理盐水(0.5 mL); 空白对照组(C 组, $n=5$), 仅行尾静脉穿刺。乌司他丁处理组又按照乌司他丁处理后 6、12、24 h 分为 U 6、U 12、U 24 组 3 个亚组($n=15$)。

1.3 HE 染色检测脑组织损伤程度 选各处理组大鼠 1 只, 取脑组织, 取出的脑组织经 4%多聚甲醛固定。石蜡包块切片后, HE 染色, 光镜下观察脑组织损伤情况。

1.4 干湿重法检测脑组织含水量 取大鼠脑组织后用电子天平测湿重, 测重后将脑组织放入(100 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$ 烤箱内烘 24 h。电

子天平再次称量干重。计算公式为:脑组织含水量=[(脑组织湿重-脑组织干重)/脑组织湿重]×100%。

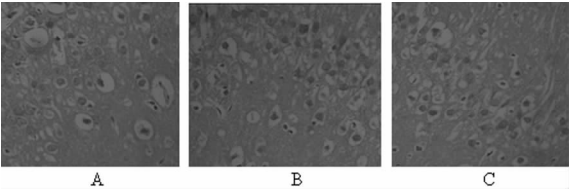
1.5 流式细胞术检测星形胶质细胞凋亡情况 取大鼠脑皮质,收集细胞悬液;磷酸缓冲液(PBS)离心洗涤 2 次,加入胶质纤维酸性蛋白(GFAP)一抗(北京博奥森生物技术公司),4℃孵育过夜;PBS 离心洗涤 2 次。加入 FITC 二抗(北京中杉),室温避光孵育 60 min;PBS 离心洗涤 2 次,加入 PI,4℃冰箱避光放置 30 min 后行流式细胞仪检测。双标细胞即为凋亡的星形胶质细胞,通过与 FITC 单标细胞比较,得出星形胶质细胞的凋亡百分数。

1.6 GFAP 免疫组化染色 免疫组化采用 SP 法,每个蜡块取 4 mm 厚连续切片做免疫组化染色,具体染色方法按试剂盒说明书进行。兔抗鼠 GFAP 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术公司,SP 免疫组化试剂盒和抗体稀释液购自北京中杉公司。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病理学改变 光镜下 U 组、C 组、S 组 3 组大鼠脑组织均存在弥散性水肿区;锥体细胞排列紊乱,胶质细胞肿胀,神经元固缩、变性、坏死;血管扩张,血管周围间隙增宽,炎细胞浸润等病理学改变(图 1)。其中 U 组病理学改变较轻,C 组及 S 组病理学改变明显。



注:A 为 U 组;B 为 C 组;C 为 S 组。

图 1 脑组织切片图(HE×200)

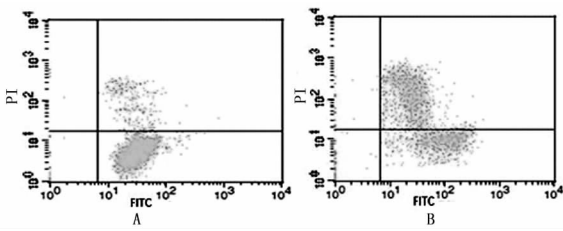
2.2 脑组织含水量 与 C 组和 S 组比较,U 组大鼠脑组织含水量明显降低($P < 0.05$)。S 组及 C 组大鼠脑组织含水量在 12 h 到达高峰,以后逐渐回落。U 组亚组间比较,脑组织含水量在 24 h 到达高峰,但明显低于 C 组及 S 组高峰值(24 h 脑组织含水量)。显示乌司他丁能够有效延缓脑水肿的发生同时可明显降低脑水肿程度。C 组与 S 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);C 组与 U12 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);S 组与 U12 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。U 组亚组间未行统计学比较,见表 1。

表 1 各组脑组织含水量表

组别	数量(个)	含水量($\bar{x} \pm s, \%$)
C 组	5	83.46±0.38
S 组	5	82.27±0.43
U6 组	15	78.42±0.19
U12 组	15	78.26±0.63
U48 组	15	79.16±0.47

2.3 星形胶质细胞凋亡情况 本实验采用双标流式细胞术检测星形胶质细胞凋亡情况,利用 GFAP-FITC 标记星形胶质细胞,再利用 PI 标记凋亡的星形胶质细胞。双标的细胞即为凋亡的星形胶质细胞。根据双标流式结果,U12 组星形胶质细胞凋亡率明显低于 C 组以及 S 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。U 组亚组间比较星形胶质细胞凋亡率在各时

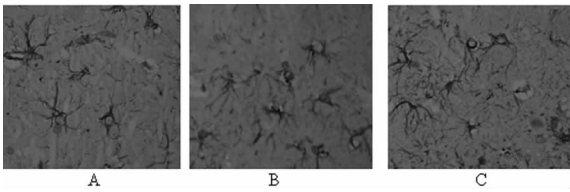
间点差异无统计意义($P > 0.05$)。



注:A 为 U12 组;B 为 S 组。

图 2 星形胶质细胞凋亡率双标流式图

2.4 星形胶质细胞活化情况 GFAP 是星形胶质细胞的特异性蛋白。星形胶质细胞异常活化的一个重要表现就是 GFAP 表达增强。因此,本实验采用免疫组化技术检测 GFAP 的表达量,以反应星形胶质细胞的活化情况(图 3)。褐色或者棕黄色染色的细胞即为活化的星形胶质细胞,可见在 S 组以及 C 组活化的星形胶质细胞明显多于 U12 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为 U12 组;B 为 C 组;C 为 S 组。

图 3 GFAP 免疫组化图(×400)

3 讨 论

本研究利用脂多糖建立感染性脑水肿模型,同时利用尿胰蛋白酶抑制剂乌司他丁(Ulinastatin)尾静脉注射,观察乌司他丁对感染性脑水肿大鼠的神经保护作用,并利用流式细胞术、免疫组化技术等检测脑组织内星形胶质细胞的凋亡情况以及异常活化情况,进一步探讨乌司他丁脑保护作用的相关机制。以期乌司他丁应用于感染性脑水肿提供实验依据与应用基础。

感染性脑水肿是一种感染引起的急性弥散性混合性脑水肿,其具有脑细胞水肿、血脑屏障破坏等病理学特征^[5]。现代研究认为星形胶质细胞参与了感染性脑水肿的发生及发展,星形胶质细胞是神经元功能活动重要的终生伙伴,在应激损伤情况下,星形胶质细胞的功能状态对神经元功能和生存转归起十分重要的作用。但是星形胶质细胞对于神经元的作用具有双面性,一方面在神经组织损伤是星形胶质细胞可通过分泌大量细胞因子对神经组织的再生起着支持、保护作用^[6-7],另一方面星形胶质细胞的异常活化又能够分泌炎症因子等引起神经组织的损伤^[8]。进一步研究发现在感染性脑水肿模型中星形胶质细胞反应性增生,胞体肿胀肥大、突起增多延长^[9]。提示在感染性脑水肿中受星形胶质细胞可异常活化,造成神经组织损害。因此如何抑制星形胶质细胞的凋亡,以及如何抑制星形胶质细胞的异常活化,成为治疗感染性脑水肿面临的难题。

乌司他丁是从男性尿中提取的一种高效广谱的酶抑制剂,不仅能抑制胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、弹力蛋白酶和透明质酸酶,其尚能稳定溶酶体膜、抑制溶酶体酶的释放,具有较强的抗炎作用^[10]。目前的研究认为,乌司他丁在急性肺损伤中可以下调促炎性细胞因子及黏附分子的表达,并通过抑制多种炎性介质影响中性白细胞的趋化、聚集和激活;在炎性介质引起肺损伤的研究中,乌司他丁能够以浓度依赖方式对抗炎性反应对 ENaC β 表达的抑制作用;能够有效地降低心肺复苏后大鼠的

脑组织含水量;同时,乌司他丁在大鼠的脑组织缺血再灌注模型中还能够有效地减少星形胶质细胞的凋亡^[11-14]。

本研究在感染性脑水肿模型中发现,乌司他丁能够有效减少感染性脑水肿鼠脑组织含水量;能够有效抑制地星形胶质细胞的凋亡,同时还能够抑制星形胶质细胞的异常增生。国内王珊珊等^[15]在研究乌司他丁对大鼠缺血再灌注大鼠模型时认为,乌司他丁可以通过抑制血脑屏障通透性从而减轻心肺复苏后的血管源性脑水肿,但对早期的细胞毒性脑水肿无明显效用。但是在本研究中,在应用乌司他丁后 6、12 h 脑组织含水量较低,但是在 24 h 鼠脑组织含水量升高。该现象可能是由于感染性脑水肿是一种混合型脑水肿有关。同时,也提示乌司他丁抑制脑水肿的机制值得进一步探讨。

总之,乌司他丁在感染性脑水肿模型中具有一定的脑保护作用。乌司他丁的脑保护作用可能与乌司他丁能够有效地降低脑组织含水量,抑制星形胶质细胞凋亡及异常增生有关。

参考文献

- [1] 张弘,许可银,周国雄,等.趋化因子 Fractalkine 在大鼠重症急性胰腺炎中的作用及乌司他丁的干预效应[J].中国病理生理杂志,2011,27(11):2180-2184.
- [2] 施荣,熊旭东,李淑芳.乌司他丁调控脓毒症 TNF- α 与 IL-6 及 IL-10 水平的研究[J].抗感染药学,2009,6(1):16-19.
- [3] 钟彪,孙治君,付裕,等.乌司他丁和泰索帝对人原代乳腺癌细胞增殖、侵袭、凋亡的影响及其机制[J].中国生物制品学杂志,2011,24(10):1197-1202.
- [4] 周晓峰,王晶,赵妍,等.乌司他丁对心肺复苏后大鼠脑组织含水量及 ICAM-1 的影响[J].中国医疗前沿,2008,3(18):15-16.
- [5] 胡佳,高进,陈萍.水通道蛋白 4 在脂多糖致大鼠感染性脑水肿模型中的表达变化[J].激光杂志,2011,32(1):90-91.

- [6] Li Y, Bao Y, Jiang B, et al. Catalpol protects primary cultured astrocytes from in vitro isehemia-induced damage [J]. Int J Dev Neurosci, 2008, 26(3/4): 309-317.
- [7] 刘慧,王小军,胡荣,等.星形胶质细胞[J].生理科学进展,2004,35(1):86-91.
- [8] Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements; the revolution continues[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(8): 626-640.
- [9] 胡佳,高进,陈萍.脂多糖致感染性脑水肿大鼠星形胶质细胞的活化和凋亡[J].世界科学研究所,2011,33(4):664-666.
- [10] 江莲,戎小平.参麦、乌司他丁对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].河北医科大学学报,2005,23(3):144-146.
- [11] 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, 36(3): 387-394.
- [12] 邓嘉,李长毅,王导新.乌司他丁对 TNF- α 作用的 A549 细胞 EnaC- β mRNA 和蛋白表达的影响[J].第三军医大学学报,2010,32(9):900-903.
- [13] 王晶,路毅,赵妍.乌司他丁和地塞米松对心肺脑复苏早期大鼠脑组织含水量及 L-1 β 水平等的影响[J].中国脑血管病杂志,2007,4(7):306-309.
- [14] 孙鹏,韩继媛,张清,等.乌司他丁对缺血/再灌注诱导小鼠星形胶质细胞凋亡的影响[J].中国急救医学,2008,28(9):816-819.
- [15] 王姗姗,陈寿权,李章平,等.乌司他丁对心肺复苏后大鼠脑水肿和血脑屏障的作用[J].中国急诊医学杂志,2006,4(7):306-309.

(收稿日期:2012-02-09)

(上接第 1854 页)

其中,对人类有条件致病性与生殖道感染相关的主要有 Mh 和 Uu^[1]。支原体在自然界中分布很广,约有 6%~75% 的成人存在无症状支原体定植,而在孕妇可达 80%^[2]。支原体可与宿主共同存在而不表现感染征象,但在一定条件下可作为病原体引起感染。妊娠期妇女雌激素增高,阴道内 pH 值降低,有利于 Uu 生长,同时孕激素的增加抑制了细胞免疫,机体抵抗力下降,易感性增强。本研究选择的对象为剖宫产产妇,在分娩前均有不同程度产程受阻,阴道检查概率增多,混合感染概率增加。另一方面,产程延长直接影响产妇的休息及进食,加上体力消耗和过度换气,可致产妇精神疲惫、全身乏力,严重者引起水及电解质紊乱等机体内环境改变,剖宫产术引起的组织损伤、产后出血等因素均不同程度引起产妇免疫力下降而致病。本研究结果表明,Uu 阳性组剖宫产后发热大于 3 d 发生率为 57.4%,阴性组持续低热的发生率为 25.6%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示 Uu 感染与剖宫产后持续低热密切相关。

3.2 Uu 感染剖宫产后抗菌药物使用的临床经验 由于支原体无细胞壁,故对青霉素类等作用于细胞壁的抗菌药物不敏感,对影响支原体胞浆蛋白质合成的大环内酯类(如红霉素)和四环素类敏感。本研究结果显示,Uu 感染阳性组剖宫产后

单纯使用青霉素类等抗菌药物治疗无效。临床表现为术后用药期间低热持续时间长,化验白细胞计数及分类轻度增高,如果根据药敏结果经联合选用敏感药物治疗 Uu 感染,体温及白细胞计数能恢复正常,治疗有效。建议产褥期感染经一般抗炎治疗无效时,应考虑生殖道支原体感染的存在,应给予取宫颈分泌物送支原体培养。有研究表明,近年由于支原体耐药菌株的产生,给临床治疗带来困难^[3],临床医生应根据实验室药敏结果,合理选择抗菌药物治疗,避免经验用药和滥用抗菌药物,高度警惕抗菌药物的附加损害。

参考文献

- [1] 杨慧霞.妊娠合并生殖道沙眼衣原体感染和支原体感染[J].中国实用妇科与产科杂志,2003,19(12):709-711.
- [2] 王肖平.支原体感染与妊娠结局[J].实用妇产科杂志,1998,14(1):9.
- [3] 朱国兴,陆春,刘毅,等.解脲支原体基因型之间耐药性差异的初步探讨[J].临床皮肤科杂志,2004,33(12):724-726.

(收稿日期:2012-04-17)