论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1244-03

乌司他丁对严重烫伤大鼠早期心肌损害保护作用

谢　康,黄跃生,周军利,张家平　(第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提　要:目的　探讨乌司他丁(ulinastatin,UTI)对烧伤早期"休克心"的防治效果。**方法**　72 只 SD 大鼠随机等分为单纯烫伤组(B 组)和烫伤后乌司他丁治疗组(U 组),建立 30%体表面积Ⅲ度烫伤模型。检测烫伤前及伤后 1、3、6、12 h 和 24 h 血浆 cTnI 和 CK-MB 浓度,观察心肌组织病理学变化。**结果**　烫伤后 3、6、12、24 h 大鼠血浆 cTnI、CK-MB 均显著高于伤前($P<0.01$),U 组各时相点 cTnI、CK-MB 均显著低于 B 组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。伤后 3 h,光镜下可见心肌纤维肿胀,横纹紊乱,细胞界限不清、消失,胞浆破坏,细胞间质水肿,伤后 6~12 h 病变加重,可见心肌组织点片状溶解灶等。乌司他丁处理组病变显著减轻。**结论**　严重烧伤早期即发生明显的心肌损害,乌司他丁能够显著减轻严重烧伤时心肌损害的程度,对烧伤后"休克心"的防治具有显著作用和疗效。

关键词: 烧伤;心肌损害;乌司他丁
中图法分类号: R542.2; R644; R977.3　　**文献标识码**: A

Protective effects of ulinastatin on myocardial damage following early burn injury

XIE Kang, HUANG Yue-sheng, ZHOU Jun-li, ZHANG Jia-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective**　To investigate the preventive and therapeutic effects of ulinastatin (UTI) on myocardial damage following early burn injury. **Methods**　A total of 72 SD rats were randomly divided into simple burn group (B group) and UTI-treated group (U group) and were subjected to 30% total body surface area Ⅲ scald injury. Plasma cTnI and CK-MB concentrations were measured by enzyme linked immunosorbent assay and histologic changes in myocardium were examined before and at 1, 3, 6, 12 and 24 h after burn. **Results**　Serum cTnI and CK-MB levels at 3, 6, 12, 24 h after burn injury were significantly higher than before burn ($P<0.01$). Serum cTnI and CK-MB levels in U group were lower than in B group ($P<0.01$, $P<0.05$). At 3 h after burn, fiber engorgement, transverse striation derangement, cell boundary unsharpness, cytoplasm destruction, intercellular substance edema were observed. The pathomorphological changes were aggravated at 6 and 12 h after burn injury, and dissolvation, degeneration and necrosis occurred, which were mild as compared with that in B group. **Conclusion**　Severe myocardial damage occurred following early burn injury. Ulinastatin could alleviate myocardial damage.

Key words: burns; myocardial injury; ulinastatin

心肌损害是烧伤后常见的并发症之一,其损害不仅可引起心功能不全,还可造成或加重全身其它组织器官的缺血缺氧损害,且可能与休克互为因果[1]。因此,烧伤后心肌损害的防治有重要临床意义。

本实验以心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)及心肌组织病理切片等指标来判断烧伤后是否发生了心肌损害以及损害的程度。通过动物实验判断乌司他丁(Ulinastatin, UTI)是否能起到防治烧伤早期心肌损害的作用。

1　材料与方法

1.1　动物分组

健康 Sprague Dawley (SD)大鼠 72 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量(230 ± 20)g,雌

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040),全军"十五"计划指令性课题(01L066),教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000),全军首批临床高新技术重大项目(2002)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040), the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five - Year Plan" of PLA (01L066), the Fund for Teachers of High Education by State Education Ministry of China (2000) and the Major Program of Clinical High Sci & Tech of PLA (2002)

作者简介:谢　康(1969-),男,四川省简阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事烧伤"休克心"防治方面的研究。现在解放军 377 医院外科,电话:13108976900,E-mail:xiekangxj@sohu.com
通讯作者:黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail: yshuang@cta.cq.cn

收稿日期:2005-05-10;修回日期:2005-06-05

雄不拘，随机奇偶分组分为 2 组：单纯烧伤组（B 组，$n=36$）；乌司他丁（UTI）处理组（U 组，$n=36$）。

1.2　动物处理

单纯烧伤组（B 组）模型制备：烫伤模型复制按我研究所常规进行：40 mg/kg 戊巴比妥腹腔注射麻醉后，剪去背部自肩至髋 30%体表面积（TBSA）毛发，置 98 ℃沸水 18 s 造成Ⅲ度烫伤（病理切片证实）。伤后按 40 ml/kg 腹腔注入等渗盐水补液。

乌司他丁处理组（U 组）除同上法制成烧伤模型并复苏外，伤后即刻腹腔一次性注射乌司他丁 4 万 U/kg（药品由广东天普生化医药股份有限公司提供）。

1.3　标本采集与处理

分别于烫伤前及烫伤后 1、3、6、12 h 和 24 h 各个时相点处死 6 只大鼠采集腹主动脉血。抗凝分离血浆后于 -20 ℃冻存待测。

1.4　血浆 cTnI 定量检测

烫伤大鼠血浆 cTnI 的测定以 ELISA 法，试剂盒由美国 lifekey 公司提供。按试剂盒说明书其主要操作步骤如下：①分别加入 100 μl 标准品、血浆标本于 ELISA 测定板孔中。②每孔加入 100 μl 酶联物，轻轻混匀 30 s，室温孵育 90 min。③洗板：甩尽板内液体，用蒸馏水洗涤反应板，并在厚叠吸水纸上拍干，去除水滴；反复洗涤 5 次。④每孔加入 100 μl TMB 显色液，轻轻混匀 10 s，室温温育 20 min。⑤每孔加入 100 μl 终止液，轻轻混匀 30 s，确定蓝色变为黄色时，于 BIORAD 3 550 酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度值 $D(450)$。

采用 SPSS 10.0 统计软件，使用回归分析计算出标准品 $D(450)$ 值与浓度值之间的直线方程。将血浆样本的 $D(450)$ 值代入方程即可算出血浆样本的 cTnI 浓度值。

1.5　血浆 CK-MB 含量检测

采用全自动生化分析仪检测。

1.6　病理学检查

于各时相点活杀动物，迅速取出心脏，浸入 10%甲醛液中固定。常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色及封片后，在光学显微镜下观察。

1.7　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　大鼠血浆肌钙蛋白 I（cTnI）含量变化

与烫伤前比较，B 组（单纯烧伤组）cTnI 于烧伤后 3 h 即显著增高（$P<0.01$）；12 h 达高峰并持续在高水平，24 h 开始下降。UTI 治疗组 cTnI 于烧伤后 3 h 开始升高（$P<0.05$），6、12 和 24 h 仍高于伤前，但与 B 组比较其升高幅度明显降低（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。结果见表 1。

表 1　严重烧伤大鼠血浆 cTnI 含量变化（ng/ml，$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of plasm cTnI content in severely burned rats (ng/ml, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Before scald	Time after scald (h)				
		1	3	6	12	24
B	1.34±0.09	1.69±0.29	3.95±0.24**	6.23±0.24**	10.50±0.67**	7.47±0.72**
U	1.33±0.11	1.47±0.20	2.45±0.34**##	4.28±0.69**##	6.62±0.72**##	5.33±0.42**#

$F=242.352$，$P=0.000$．*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* before scald；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* B group

2.2　大鼠血浆 CK-MB 含量变化

与烫伤前比较，B 组（单纯烧伤组）CK-MB 含量于烧伤后 3 h 即显著增高（$P<0.01$）；12 h 到达高峰并持续在高水平至 24 h。UTI 治疗组血浆 CK-MB 含量于烧伤后 3、6、12 h 和 24 h 明显高于伤前（$P<0.01$），但各时相点均显著低于 B 组（$P<0.01$）。见表 2。

表 2　严重烧伤大鼠血浆 CK-MB 含量变化（U/L，$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Changes of plasm CK-MB content in severely burned rats (U/L, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Before scald	Time after scald (h)				
		1	3	6	12	24
B	66.00±9.72	108.00±22.75	203.50±13.55**	277.67±16.43**	322.00±19.90**	307.33±23.02**
U	70.33±9.67	87.00±6.54	187.50±22.79**	203.83±7.03**##	213.17±14.51**##	217.67±12.64**##

$F=242.352$，$P=0.000$．*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* before scald；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* B group

2.3　心肌病理学变化

烫伤后 3 h 心肌细胞肿胀、间质水肿、细胞界限不清以及毛细血管充血等炎症表现，伤后 12 h 进一步恶化，心肌组织可见心肌结构不清，肌纤维呈波浪状，肌浆凝聚红染（↑）；细胞核肿大破裂，染色质边集（↓）等，形态学上表明心肌细胞出现了变性坏死特征。乌司他丁处理组则在相应时相点显示病变程度要轻些。见图 1、2。

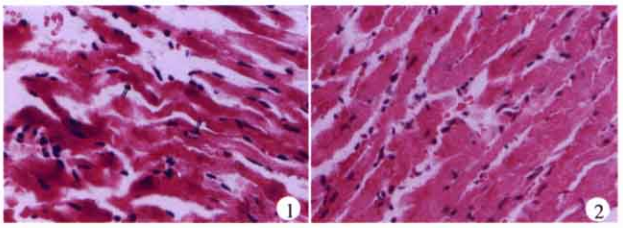


图1 烧伤后12 h心肌组织学观察 (HE×400)

Fig 1 Histological observation of myocardium at 12 h after burn injury (HE×400)

图2 乌司他丁治疗后12 h心肌组织学观察 (HE×400)

Fig 2 Histological observation of myocardium at 12 h after ulinastatin treatment (HE×400)

3 讨论

心肌损害是烧伤后最严重的并发症之一,及时准确诊断心肌有无损伤及其损伤程度,对指导临床保护心功能、防治心力衰竭有重要意义。近年来黄跃生[2]经过系列的临床研究及动物实验证实了严重烧伤早期即出现心肌器质性损害,并提出了"休克心"的概念。

心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)是近年来被逐渐认识的新的评价心肌损伤的指标,现已证明cTnI是一种理想的心肌细胞特异性标志。cTnI在心肌细胞膜完整的情况下,cTnI不能透出细胞膜进入血循环。当心肌细胞因缺血、缺氧等因素发生变性坏死时,cTnI通过破损细胞膜释放入血。由于cTnI分子量较小并持续从变性细胞内逸出,故心肌细胞损伤后,在血中出现较早,并持续相当长时间[3]。

近年来,肌酸磷酸激酶同功酶(CK-MB)作为反映心肌损害较敏感的指标,在临床上广泛应用,但如肌酸磷酸激酶(CK)一样,CK-MB也非心肌所特有,骨骼肌中也少量存在。而严重烧伤往往伴有潜在性骨骼肌损伤,故敏感性虽强,但特异性却差。

理论上,由于cTnI在正常人血循环中含量极少,主要存在于心肌细胞内,干质量为肌酸磷酸激酶同功酶(CK-MB)的13.3倍,心肌细胞损伤时血中cTnI变化幅度大,因而cTnI敏感性高[4]。

烧伤后导致的组织细胞缺血缺氧和失控性炎症反应是导致早期"休克心"的两大主要因素,如何减轻、遏止其介导的心肌损伤效应是防治"休克心"的关键。

乌司他丁(Ulinastatin, UTI)是一种从人尿中提取精制的蛋白酶抑制剂,能够同时抑制胰蛋白酶、磷脂酶A2、透明质酸酶、弹性蛋白酶等多种水解酶的活性;除对多种蛋白酶、糖和脂水解酶有抑制作用外,还能抑制心肌抑制因子(MDF)的产生,改善休克时的循环状态。基础实验研究证实UTI其有稳定溶酶体膜的作用,有利于保护肾小管功能,防止急性肾衰;还发现UTI能降低IL-6、IL-8的作用而有利于防止再灌注损伤[5~7]。表明乌司他丁在一定程度上起到保护多个重要脏器的作用。临床也已证实乌司他丁对各种休克、胰腺炎、肾衰竭、有确切的治疗作用[8~10]。

本实验中,两组大鼠烫伤后3 h,血浆cTnI、CK-MB浓度即显著高于伤前,在12 h到达高峰并持续在高水平至24 h才略有下降。表明严重烧伤早期确实存在心肌损害并且有逐渐加重趋势。结合病理检查,烫伤后12 h以后出现心肌结构不清,肌纤维呈波浪状,肌浆凝聚红染;细胞核肿大破裂,染色质边集等,表明心肌变性坏死的程度同血浆cTnI、CK-MB升高相一致,血浆cTnI水平与心肌损伤程度正相关。乌司他丁治疗组(U组)在烧伤后3 h cTnI含量即开始升高($P<0.05$),在6、12 h和24 h也明显高于伤前,但却都明显低于B组的相应时相点($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。病理检查心肌变性坏死的程度也轻于B组,乌司他丁的应用明显降低了心肌损害。表明乌司他丁对严重烧伤早期心肌有明显的保护作用。

参考文献:

[1] 黄跃生, 杨宗城, 迟路湘, 等. 烧伤后"休克心"的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(5): 275-278.

[2] 黄跃生. 烧伤后"休克心"与早期损害[J]. 中国医师杂志, 2002, 4(2):120-121.

[3] 朱玉胜,吕元. 心脏肌钙蛋白I:心肌损伤的敏感性和特异性指标[J].中国实验诊断学,1998, 2(2): 93-94, 79.

[4] Adams J E 3rd, Schechtman K B, Landt Y, *et al*. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I[J]. Clin Chem, 1994, 40(7 Pt 1): 1291-1295.

[5] Chen C C, Liu Z M, Wang H H, *et al*. Effects of ulinastatin on renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(10): 1334-1340.

[6] Sato Y, Ishikawa S, Otaki A, *et al*. Induction of acute-phase reactive substances during open-heart surgery and efficacy of ulinastatin. Inhibiting cytokines and postoperative organ injury[J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 48(7): 428-434.

[7] Nakakuki M, Yamasaki F, Shinkawa T. *et al*. Protective effect of human ulinastatin against gentamicin-induced acute renal failure in rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1996, 74(1): 104-111.

[8] 谢 康,黄跃生. 乌司他丁对严重烧伤大鼠血清中致炎因子的影响及意义[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(18): 1643-1645.

[9] Tsujino T, Komatsu Y, Isayama H, *et al*. Ulinastatin for pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a randomized, controlled trial[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005, 3(4): 376-383.

[10] Gomez Cambronero L G, Sabater L, Perada J, *et al*. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications[J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002, 1(4): 393-403.

(编辑 陈聪连)