DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.013
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1643-03

论著

乌司他丁对严重烧伤大鼠血清中致炎因子的影响及意义

谢 康,黄跃生 (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)对严重烧伤大鼠血清中炎症因子的影响及意义。方法 建立大鼠烧伤模型(30%TBSA Ⅲ度烧伤),S-D大鼠96只随机分为单纯烧伤组(B组)和UTI处理组(ulinastatin, UTI组)。在烧伤前及烧伤后1、3、6、12和24 h检测血清中IL-1β、IL-6和TNF-α3种细胞因子的含量。结果 B组烧伤后3 h IL-1β、IL-6和TNF-α开始明显升高,并分别于烧伤后6 h和12 h达到峰值。UTI组炎症因子升高幅度明显低于B组($P<0.05$),且于烧伤后24 h基本恢复正常。结论 UTI能明显减少烧伤大鼠血清中IL-1β、IL-6和TNF-α的含量,减轻了由细胞炎症因子介导的炎症反应。

关键词:乌司他丁;IL-1β;IL-6;TNF-α;烧伤
中图法分类号:R392.11;R644.02;R977.3 文献标识码:A

Effects of ulinastatin on inflammatory cytokines in blood serum of rats after severe burn and the significance

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

Abstract: **Objective** To study the effects of ulinastatin (UTI) on the inflammatory cytokines in the blood serum of rats after severe burn. **Methods** A total of 96 SD rats, inflicted with 30% TBSA full-thickness skin burn, were randomly divided into simple burn group (group B) and UTI-treated group (group UTI). The serum contents of IL-1β, IL-6, and TNF-α were determined at 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h before and after burn injury. **Results** In group B, the levels of serum IL-1β, IL-6, and TNF-α were significantly higher at 3 h and peaked at 6 and 12 h after burn. In group UTI, the levels of serum IL-1β, IL-6, and TNF-α were significantly lower than those in group B ($P<0.05$). **Conclusion** UTI can decrease the production of IL-1β, IL-6, and TNF-α in blood serum, retard the development and progression of burn injury, decrease the injury severity of inflammatory reaction by the cytokines.

Key words: ulinastatin; interleukin-1β; interleukin-6; tumor necrosis factor-α; burn

严重烧伤后发生失控性炎症反应,大量炎症介质的生成和释放在烧伤早期脏器损伤中扮演了重要角色[1]。炎性介质持续或过多地释放可引起全身多种炎性效应、细胞活化及凝血系统和补体系统激活,这种失控的炎症反应可以损伤血管内皮和远隔器官[2]。如何抑制过度炎症反应成为严重烧伤治疗的关键。乌司他丁(ulinastatin, UTI)作为一种广泛的酶活性抑制剂,已成功地应用于急性胰腺炎的治疗,但它在严重烧伤炎症反应中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨严重烧伤大鼠血清中致炎因子白介素-1β(IL-1β)、白介素-6 (IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量变化及UTI对上述致炎因子的调节作用,为治疗严重烧伤寻找有效途径。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康S-D大鼠96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,雌雄不拘,随机奇偶等分为:单纯烧伤组(B组,$n=48$),UTI处理组(UTI组,$n=48$)。

1.2 动物处理

B组模型制备:按文献[3]常规进行,40 mg/kg戊巴比妥腹

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202),国家杰出青年科学基金资助项目(30125040),全军"十五"指令性课题(01L066),教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000),军队首批临床高新技术重大项目(2002)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202), 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 Outstanding Teachers in Higher Educational Institutes of Educational Ministry of China (2000), and the Fund for the First Major Clinical High-tech Projects of PLA (2002)

作者简介:谢 康(1969-),男,新疆唯吾尔族自治区哈密市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤"休克心"防治方面的研究,现在中国人民解放军第377医院。电话:13193110992. E-mail: xiekangxj@sohu.com
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173, E-mail: yshuang@cta.cq.cn

收稿日期:2004-03-02;修回日期:2004-07-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

腔注射麻醉后，剪去背部自肩至髋 30％体表面积（total body surface area，TBSA）毛发，置 92 ℃沸水 18 s 造成Ⅲ度烫伤（病理切片证实）。伤后按 40 ml/kg 腹腔注入乳酸林格氏液补液。UTI 处理组（UTI 组）同法制成烧伤模型，烫伤后即刻腹腔注射 UTI 4×10^4 U/kg（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、24 h 5 个时相点处死大鼠采集腹主动脉血。分离血清后于－20 ℃冻存待测。

1.4 血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 定量检测

烫伤大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的测定采用 ELISA 法，试剂盒由 jinmei 公司提供。按试剂盒说明书操作：加入 100 μl 标准品或待测血清（复孔），室温孵育 2 h，洗板后依次加入生物素标记的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 抗体、抗生蛋白链菌素-过氧化物酶（streptavidin-peroxidase）和四甲基联苯胺底物液，置暗盒、室温 0.5 h 后终止反应，于 BIORAD 3550 酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度值，每次测定均设置标准曲线，根据标准曲线计算结果。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2 组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量分别见表 1～3。与烫伤前比较，单纯烧伤组组在烧伤后 3 h 即明显升高（$P<0.01$），分别在 6、12 h 达到高峰，并持续在高水平至 24 h 才开始下降。UTI 组在烧伤后各时点均明显高于正常组（$P<0.01$），但与单纯烧伤组组比较其升高幅度明显降低（$P<0.05$或 $P<0.01$）。并在 24 h IL-1β 和 TNF-α 基本恢复正常（$P>0.05$）。

表 1 大鼠严重烧伤后血清 IL-1β 含量变化（$n=8$，$\bar{x}\pm s$，ng/ml）

Tab 1 Changes of serum IL-1β content in severely burned rats（$n=8$，$\bar{x}\pm s$，ng/ml）

Group	Before scald	Timer after scald				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B	4.92±0.29	5.55±0.46	58.70±2.64**	97.87±4.13**	90.30±4.13**	64.97±1.53**
UTI	4.77±0.22	5.01？0.28	47.03±1.33**##	68.34±4.03**##	40.27±1.97**##	5.56±0.38##

**：$P<0.01$，*vs* before scald；##：$P<0.01$，*vs* B

表 2 大鼠严重烧伤后血清 IL-6 含量变化（$n=8$，$\bar{x}\pm s$，μg/ml）

Tab 2 Changes of serum IL-6 content in severely burned rats（$n=8$，$\bar{x}\pm s$，μg/ml）

Group	Before scald	Timer after scald				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B	0.24±0.06	1.32±0.09**	9.14±1.16**	12.49±1.14**	3.01±0.75**	1.41±0.28**
UTI	0.25±0.02	1.23±0.08**#	6.03±0.86**##	8.34±0.83**##	2.27±0.97**##	1.06±0.38**##

**：$P<0.01$，*vs* before scald；##：$P<0.01$，*vs* B

表 3 大鼠严重烧伤后血清 TNF-α 含量变化（$n=8$，$\bar{x}\pm s$，ng/ml）

Tab 3 Changes of serum TNF-α content in severely burned rats（$n=8$，$\bar{x}\pm s$，ng/ml）

Group	Before scald	Timer after scald				
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
B	4.13±0.26	7.77±0.56**	28.67±0.62**	54.68±1.82**	60.15±1.77**	45.46±0.87**
UTI	4.14±0.05	6.34±0.40**#	20.63±0.85**##	24.90±1.19**##	20.72±2.02**##	4.75±0.43##

**：$P<0.01$，*vs* before scald；##：$P<0.01$，*vs* B

3 讨论

严重创（烧）伤后中性粒细胞等炎症细胞活化，大量释放细胞因子等炎症介质与伤后全身性炎症反应（systemic inflammatory response syndrome，SIRS）的发生密切相关[4]。近年研究表明 SIRS 实际上是机体炎症反应和抗炎反应失衡的表现，多种细胞因子等炎症介质如 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 等出现失控性释放。炎性介质持续或过多地释放可引起全身多种炎性效应、细胞活化及凝血系统和补体系统激活，这种失控的炎症反应可以损伤血管内皮和远隔器官[2]，而 TNF-α、IL-6 和白介素 1β（IL-1β）协同作用，则放大了炎性介质的级联效应，引起器官损害。如果这种炎症反应继续失控恶化，最后不可避免的引起 MODS，最终导致 MOF。有文献[5] 报道 SIRS 时血浆 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等促炎细胞因子浓度明显上升，且升高程度和死亡相关。本研究所的临床研究也证实烧伤患者早期血浆中即可检测到高水平的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α，且在多器官功能障碍的发生发展过程中起重要作用[6,7]。因此 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 与 SIRS 和 MODS 关系密切。根据机体的免疫状态，调控炎症反应，即抑制或下调过渡的炎症反应可能是治疗成功的根本。

本组实验结果显示：与烫伤前对照比较，单纯烧伤组组在烧伤后 3 h IL-1β、IL-6 和 TNF-α 即明显升高（P

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

＜0.01), 分别在 6、12 h 达到高峰, 并持续在高水平至 24 h 才开始下降。UTI 组虽然 IL-1β、IL-6 和TNF-α在烧伤后各时相点均明显高于正常组(P＜0.01), 但与单纯烧伤组组比较其升高幅度明显降低(P＜0.01)。并在 24 h 基本恢复正常。证实了①烧伤早期血浆中即可检测到高水平的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α, ② UTI 对 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 等炎症介质有显著的抑制作用, 与文献[5] 报道基本相同。因此应用 UTI 治疗严重烧伤后发生失控性炎症反应是符合病理机制的。

UTI 是一种从人尿中提取精制的糖蛋白, 属典型的 kuniz 型的蛋白酶抑制剂, 具有两个活性功能区。由于两个活性功能区均有很广的抑酶谱, 且不完全重叠, 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; 另外, UTI 分解形成的低分子量成分也具有很强的抑制水解酶的作用。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; 而有研究报道 UTI 能降低 IL-6、IL-8 的作用而有利于防止再灌注损伤[6~8]。这些充分表明 UTI 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 UTI 对各种休克、胰腺炎、肾衰竭、有确切的治疗作用[9]。

参考文献:

[1] 杨宗城, 黎　鳌. 提高烧伤治疗水平的展望[J]. 解放军医学杂志, 1997, 22(1): 11－12.

[2] Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. J Pathol, 2004, 202(2): 145－156.

[3] Yuan J C, Xiao G X, Zhou L X, *et al*. Expression of TNF mRNA in the internal organs after severe burn injury in rats[J]. J Med Coll PLA, 1995, 10(1): 14－17.

[4] Fry D E. Sepsis syndrome[J]. Am Surg, 2000, 66(2): 126－132.

[5] Damas P, Canivet J L, Groote D, *et al*. Sepsis and serum cytokine concentrations[J]. Crit Care Med, 1997, 25(3): 405－412.

[6] Kawamura T, Inada K, Kimura O, *et al*. The inhibitory effects of ulinastatin on the increase of interleukin 8 and 6 during heart surgery[J]. Masui, 1994, 43(12): 1818－1823.

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

[8] 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.

[9] Kobayashi H, Hirashima Y, Terao T. Human myometrial cells in culture express specific binding sites for urinary trypsin inhibitor[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(8): 735－742.

（编辑　刘洪娥）

（上接 1642 页）

2　结果

本组病例均在术后 2～48 个月采用化学发光方法测定血中 CEA 的含量, 结果测出 CEA 的范围在 2.4～133.12 μg/L, 平均为 43.35 μg/L, (CEA 的正常范围在 0～5 μg/L), CEA＞5 μg/L 有 16 例, FDG PET 检查出复发及转移灶的有 14 例, CEA＜5 μg/L 有 4 例, FDG PET 检查出病灶的有 1 例, 比较上述结果, χ^2=6.663 差异有显著性(P＜0.01)。FDG PET 检查 20 例中 15 例是阳性, 5 例是阴性。CT 或 MRI 检查阳性有 8 例, 阴性 12 例。比较上述结果, χ^2=9.453 差异非常显著(P＜0.01), FDG PET 共发现 24 个病灶, 5 个复发病灶, 19 个转移病灶。

3　讨论

通常认为糖酵解增强是恶性肿瘤癌细胞生物特征之一, 肿瘤细胞摄取 FDG 的机制一般认为与以下几个因素有关: 肿瘤细胞内己糖激酶活性增高, 癌基因表达使肿瘤细胞对 FDG 的摄取和相对转运速率增快, 葡萄糖-6-磷酸酶的活性增强等。FDG 显像对瘤灶的检出主要取决于肿瘤摄取 FDG 的多少、肿瘤大小及信/噪比等因素, FDG 对肿瘤的探测依赖于肿瘤的代谢水平和周围组织放射性本底的 T/NT 之比的差异[1]。

^{18}F-FDG PET 显像在恶性肿瘤诊断分期方面有重要价值, 并对恶性肿瘤术后随访也有重要的意义。特别是在诊断较小原发灶和早期复发及转移灶方面有较大的优势[1]。孔令山等[2] 报道 22 例胃癌术后患者中 8 例未见高代谢灶, 14 例分别伴有肺、肝、胰、腹腔淋巴结的多处脏器转移。认为 FDG PET 显像是判断胃癌术前分期和术后随访的有效方法。管梁等[3] 报道 28 例良恶性消化道肿瘤 ^{18}F-FDG PET 显像结果在良恶性鉴别诊断有较高的准确性和特异性, 对恶性肿瘤治疗后随访确认或排除肿瘤残留和复发, 以及全身部位的转移等具有良好的临床价值。与本组结论有共同点。本组 ^{18}F-FDG PET 检查有 1 例假阳性, 可能与炎症和伪影有关。消化道恶性肿瘤术后随访中, 如 CEA＞5 μg/L, 再作 ^{18}F-FDG PET 显像, 对局部残留、早期复发、有否转移及多发转移灶检出有较高的敏感性、特异性、准确性。但 ^{18}F-FDG PET 属于功能和代谢显像对局部组织结构分辨能力或者解剖定位方面与 CT、MRI 相比没有较大差距且价格昂贵。故在临床诊断治疗中只有相互结合, 才能取得预期的效果。

关键词: 消化道恶性肿瘤; 体层摄影术, 发射型计算机; 脱氧葡萄糖

中图法分类号: R735　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 赵　军, 林祥通, 刘永昌, 等. ^{18}F-FDG PET 全身探索肿瘤原发灶中的应用[J]. 上海医学, 2000, 9(23): 518－521.

[2] 孔令山, 周颖奇, 潘文舟, 等. ^{18}F-FDG PET 显像在判断胃癌分期和术后随访中的价值[J]. 中华国际医学杂志, 2002, 5(2): 385－387.

[3] 管　梁, 吕中伟, 朱承谟, 等. ^{18}F-FDG PET 显像对消化道良恶性肿瘤和术后随访中的应用价值[J]. 上海医学影像, 2001, 1(10): 2－4.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net