

## 蛋白酶抑制剂对内毒素致大鼠肾功能损害的保护作用

汪波 陈旭岩 熊辉 李秀清 田亚男 高雨松 刘新民

**【摘要】 目的** 探讨蛋白酶抑制剂对内毒素所致大鼠肾功能损伤的作用及其可能机制。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 32 只,随机分为对照组( $n=6$ ),内毒素(LPS)组( $n=10$ ,静脉注射 LPS 5 mg/kg),大剂量乌司他丁(UT)干预组( $n=8$ ,腹腔注射 UT 100 kU/kg 和 LPS 5 mg/kg),小剂量 UT 干预组( $n=8$ ,腹腔注射 UT 50 kU/kg 和 LPS 5 mg/kg)。给予 LPS 2 h 后用乌拉坦麻醉大鼠,测定动脉血气、血浆内皮素-1(ET-1)、乳酸、肌酐(Cr)水平;行肾组织病理学检查;穿刺膀胱取尿,测定 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)。**结果** LPS 组动脉血 pH 值、动脉血氧分压( $PaO_2$ )、动脉血二氧化碳分压( $PaCO_2$ )、剩余碱(BE)均明显低于对照组( $P$  均 $<0.01$ );两个 UT 干预组动脉血 pH 值、 $PaO_2$ 、 $PaCO_2$  和 BE 均明显高于 LPS 组( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。LPS 组血浆 ET-1 水平明显高于对照组( $P<0.01$ ),两个 UT 干预组均明显低于 LPS 组( $P$  均 $<0.01$ ),两个 UT 干预组之间差异无显著性( $P>0.05$ )。LPS 组乳酸水平明显高于对照组( $P<0.001$ );两个 UT 干预组均明显低于 LPS 组( $P$  均 $<0.01$ );两个 UT 干预组间比较差异无显著性( $P>0.05$ )。LPS 组血浆 Cr 及尿 NAG 均较对照组明显升高( $P$  均 $<0.01$ );两个 UT 干预组血浆 Cr 及尿 NAG 水平均较 LPS 组明显降低( $P$  均 $<0.01$ ),两个 UT 干预组间比较差异均无显著性( $P$  均 $>0.05$ )。肾脏病理检查可见 LPS 组肾小球大致正常,而肾小管上皮细胞空泡变性,部分上皮细胞崩解、脱落,管腔扩张,两个 UT 干预组肾小管病理变化均较 LPS 组减轻,不同剂量组间形态差异无显著性。**结论** 蛋白酶抑制剂 UT 能够减轻 LPS 所致的大鼠肾脏损伤。

**【关键词】** 内毒素; 乌司他丁; 蛋白酶抑制剂

**Protective effect of protease inhibitor on renal function of rat challenged by lipopolysaccharide** WANG Bo, CHEN Xu-yan, XIONG Hui, LI Xiu-qing, TIAN Ya-nan, GAO Yu-song, LIU Xin-min. Department of Emergency, First Affiliated Hospital, Peking University, Beijing 100034, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effects of protease inhibitor on lipopolysaccharide (LPS)-induced kidney injury in rats and its possible mechanism. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were divided into four groups randomly; normal control ( $n=6$ ); LPS group ( $n=10$ ), receiving intravenous endotoxin (LPS, O55: B5, 5 mg/kg); low-dose ulinastatin (UT) intervention group ( $n=8$ ), receiving intraperitoneal UT 50 000 U/kg and LPS 5 mg/kg as above; high-dose UT intervention group ( $n=8$ ), UT 100 000 U/kg and LPS 5 mg/kg. The following examinations were carried out; blood gas analysis, kidney pathological changes, plasma endothelin-1, plasma lactic acid, N-acetylglucosaminidase (NAG) in urine, and plasma creatinine (Cr) level. **Results** Blood gas analysis showed that pH, partial pressure of oxygen in artery ( $PaO_2$ ) and base excess (BE) lowered significantly (all  $P<0.01$ ) in LPS group compared with normal control group, and elevated in low-dose and large dose UT intervention groups compared with LPS group, the differences were statistically significant ( $P<0.01$ ). The plasma endothelin-1 increased significantly ( $P<0.01$ ) in LPS group compared with normal control group and intervention groups. Plasma lactate increased significantly in LPS group compared with normal control group ( $P<0.001$ ), decreased significantly in intervention groups compared with LPS group ( $P<0.01$ ). No significant difference was found between two intervention groups ( $P>0.05$ ). Plasma Cr and urine NAG level increased in LPS groups, and the difference was significant compared with normal control groups and intervention groups ( $P<0.01$ ). Pathohistologic examination revealed normal glomeruli but vacuolar degeneration of tubular epithelial cells, and part of them disrupted and desquamated, and also tubular dilatation. Only mild pathological changes were seen in the intervention groups. There was no obvious difference in morphology between two intervention groups. **Conclusion** The protease inhibitor, UT, may alleviate LPS-induced inflammatory reaction and damage to kidney in rats

**【Key words】** lipopolysaccharide; ulinastatin; protease inhibitor

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471915)

作者单位:100034 北京大学第一医院急诊科

通讯作者:刘新民,教授,主任医师

作者简介:汪波(1964-),男(汉族),山东省人,医学博士,副主任医师,主要从事急诊医学的临床和基础研究,曾获国家教委一等奖 (Email:bjwbdoctor@hotmail.com)。

感染、创伤等可致多器官功能损害,以肺组织最易受损,其次为肾脏、肝脏和心脏等器官组织。针对内毒素血症中的急性肺损伤,其治疗主要是控制脓毒症、改变机械通气策略及加强营养支持等,其病死率仍高达 40%~60%<sup>[1,2]</sup>。目前临床尚缺乏针对发

病机制方面如中性粒细胞聚集和激活、炎性介质过度释放等的有效治疗措施。我们在应用蛋白酶抑制剂干预内毒素血症大鼠肺损伤过程中进行了肾功能的检测,旨在了解蛋白酶抑制剂对内毒素血症大鼠的肾脏是否具有保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及处理:**雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重 240~270 g,由北京大学医学部动物实验中心提供。动物随机分为 4 组:对照组( $n=6$ )、内毒素(lipopolysaccharide, LPS)模型组( $n=10$ )、大剂量乌司他丁(UT)干预组( $n=8$ )和小剂量 UT 干预组( $n=8$ )。LPS 模型大鼠称重后,尾静脉注射大肠杆菌 LPS(O55:B5, Sigma, USA) 5 mg/kg。并设对照组(按公斤体重尾静脉注入生理盐水),大剂量和小剂量 UT 干预组注入 LPS 的方法同 LPS 组,在注入 LPS 的同时分别经腹腔内注射 UT 100 kU/kg 和 50 kU/kg, 2 h 后用乌拉坦 1.2 g/kg 腹腔内注射麻醉,采集标本。

**1.2 检测指标:**①取腹主动脉血,用 STAT Profile III 型血气自动分析仪(美国美中互利公司生产)检测动脉血气。②血浆内皮素-1(ET-1):ET-1 放射免疫试剂盒由北京福瑞生物工程公司提供。严格按照说明书操作,用  $\gamma$ -计数仪测定,单位以 ng/L 表示。③血浆乳酸:用酶学方法按试剂盒操作步骤进行。试剂购自 Randox Laboratories Ltd, Ardmore, United Kingdom, 用日立 7170 自动生化分析仪测定。④血浆肌酐(Cr)和尿 N-乙酰葡萄糖胺酶(NAG):Cr 由我院自动生化仪常规测定,尿 NAG 用合成色原底物法测定。⑤病理学观察:取肾组织少许,迅速切成 1~2 mm 厚薄片,置于体积分数为 5% 的戊二醛中

固定保存,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,普通光镜观察肾组织形态学变化。

**1.3 统计学处理:**采用 Prism3.0 软件进行处理,实验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。多组间资料采用 One - Way ANOVA 方差分析和组间  $q$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血气分析(表 1):**LPS 组动脉血 pH 值、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)和剩余碱(BE)均明显低于对照组( $P$  均  $<0.01$ );两个 UT 干预组均高于 LPS 组( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),但均低于对照组( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );各 UT 干预组间动脉血气指标差异均不明显( $P$  均  $>0.05$ )。

**2.2 血浆 ET-1 水平(表 2):**LPS 组明显高于对照组( $P<0.01$ );两个 UT 干预组均明显低于 LPS 组( $P$  均  $<0.01$ );两个 UT 干预组之间差异无显著性( $P>0.05$ )。

**2.3 血浆乳酸水平(表 2):**LPS 组明显高于对照组( $P<0.001$ );两个 UT 干预组均明显低于 LPS 组( $P$  均  $<0.01$ ),但高于对照组( $P$  均  $<0.01$ );两个 UT 干预组间比较差异无显著性( $P>0.05$ )。

**2.4 血浆 Cr 及尿 NAG 水平(表 2):**LPS 组血浆 Cr 及尿 NAG 均较对照组明显升高( $P$  均  $<0.01$ );两个 UT 干预组血浆 Cr 水平较 LPS 组均明显降低( $P$  均  $<0.01$ ),但与对照组比较差异均无显著性( $P$  均  $>0.05$ );两个 UT 干预组间比较差异无显著性( $P>0.05$ );两个 UT 干预组尿 NAG 水平均较 LPS 组明显降低( $P$  均  $<0.01$ ),与对照组比较差异均有显著性( $P$  均  $<0.01$ )。

**2.5 肾脏病理学变化(彩色插页图 1~4):**对照组

表 1 各组动脉血气的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of blood gas among the groups( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	pH	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	PaCO <sub>2</sub> (mm Hg)	BE(mmol/L)
对照组	6	7.38 $\pm$ 0.03	146.7 $\pm$ 6.17	34.95 $\pm$ 6.29	-1.50 $\pm$ 0.53
LPS 组	10	7.20 $\pm$ 0.04**	82.8 $\pm$ 4.03**	19.97 $\pm$ 2.92**	-7.25 $\pm$ 0.21**
大剂量 UT 干预组	8	7.32 $\pm$ 0.03* $\Delta\Delta$	112.8 $\pm$ 6.50* $\Delta\Delta$	23.28 $\pm$ 1.04* $\Delta\Delta$	-2.85 $\pm$ 0.72* $\Delta\Delta$
小剂量 UT 干预组	8	7.30 $\pm$ 0.05* $\Delta$	108.5 $\pm$ 6.80* $\Delta\Delta$	26.93 $\pm$ 1.71* $\Delta\Delta$	-3.92 $\pm$ 0.69* $\Delta\Delta$

注:与对照组比较:\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 LPS 组比较: $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$ ;1 mm Hg=0.133 kPa

表 2 各组血浆 ET-1、乳酸、Cr 和尿 NAG 水平的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of plasma ET-1, lactic acid, Cr and uric NAG among the groups( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	ET-1(ng/L)	乳酸(mmol/L)	Cr( $\mu$ mol/L)	尿 NAG(U/L)
对照组	6	729.38 $\pm$ 88.64	3.33 $\pm$ 0.31	51.67 $\pm$ 3.32	18.33 $\pm$ 7.17
LPS 组	10	948.23 $\pm$ 103.45**	5.90 $\pm$ 0.14***	115.67 $\pm$ 5.95**	337.67 $\pm$ 16.52**
大剂量 UT 干预组	8	633.27 $\pm$ 93.27 $\Delta\Delta$	4.03 $\pm$ 0.11* $\Delta\Delta$	56.21 $\pm$ 4.77 $\Delta\Delta$	122.56 $\pm$ 14.33* $\Delta\Delta$
小剂量 UT 干预组	8	671.87 $\pm$ 105.45 $\Delta\Delta$	4.02 $\pm$ 0.26* $\Delta\Delta$	49.76 $\pm$ 5.34 $\Delta\Delta$	115.84 $\pm$ 13.42* $\Delta\Delta$

注:与对照组比较:\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与 LPS 组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

肾小球及肾小管结构未见异常。LPS 组肾小球大致正常,而肾小管上皮细胞肿胀和空泡变性,部分上皮细胞坏死、核浓缩、核破碎及溶解,肾小管上皮细胞崩解、脱落,管腔扩张。两个 UT 干预组肾小管形态无明显改变,不同剂量组间形态无明显差别。

### 3 讨论

UT 是一种蛋白酶抑制剂,能有效抑制多种蛋白酶的活性。现在临床上应用的 UT 是从尿液中分离纯化的含有 143 个氨基酸的糖蛋白,分子质量约 67 ku,是一种典型的 Kuniz 型蛋白酶抑制剂,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,所以能够同时抑制胰蛋白酶、磷脂酶 A<sub>2</sub>、透明质酸酶、弹性蛋白酶等多种水解酶的活性;另外,UT 分解形成低分子质量成分也具有很强的抑制水解酶作用。

既往对蛋白酶抑制剂的研究主要围绕在治疗急性胰腺炎,在体外循环手术中对机体的保护,减轻大手术对器官的损伤,减轻缺血-再灌注损伤,减轻肺损伤,治疗休克和辅助治疗肿瘤等方面。近来用抗菌药物联合 UT 治疗脓毒症时发现,UT 对感染性休克、酸中毒、多器官功能障碍综合征(MODS)也具有很好的作用<sup>[3]</sup>。

本研究中发现,LPS 组大鼠的肾功能受损害,肾脏病理提示肾小管空泡变性、管腔扩张等,提示肾脏损伤以肾小管损害为主,而且血浆 Cr、ET-1 和乳酸水平均明显升高。大鼠腹腔内注射 UT 后,血浆 Cr、乳酸、ET-1、尿 NAG 水平均降低,血气分析提示酸中毒情况减轻,缺氧状态改善,肾脏组织病理学损害减轻,这些均提示蛋白酶抑制剂能改善机体的不良状态,改善肾损害的不利因素,显示其对肾脏功能具有保护作用。

比较 UT 与抑肽酶在体外循环过程中对肾功能的影响,发现 UT 保护肾功能及排除乳酸的作用较为满意<sup>[4]</sup>。还有研究显示,体外循环心脏手术患者术后尿 NAG 和血浆 Cr 明显升高,而应用 UT 治疗的患者则没有明显变化。

NAG 是一种溶酶体酶,存在于肾、肝、脾、脑等脏器中,在肾小球的溶酶体中含量最高。由于肾小管上皮细胞的新陈代谢,健康人尿中也有一定量的 NAG 排泄,因此肾小管功能障碍时,NAG 反应灵敏,会逸出细胞外,排泄到尿中。应用 UT 后,患者尿中 NAG 排泄受到抑制,提示 UT 有利于保护肾小管功能<sup>[5,6]</sup>。此外,由于 UT 有稳定溶酶体膜的作用,可以防止术后急性肾功能衰竭,还能抑制体外循环

对肾功能不全患者造成的肾功能进一步损伤<sup>[7,8]</sup>。多项研究表明,UT 对由于体外循环介入而导致的各种蛋白酶及炎性介质对机体损伤有明显抑制作用<sup>[9,10]</sup>。应用 UT 的患者维生素 E 水平没有明显变化,而对照组则明显降低,间接证明 UT 对清除自由基有较为明显的作用<sup>[11]</sup>。

ET 作为缩血管活性肽,在体内既发挥血管活性作用,还发挥炎症介质作用。给予蛋白酶抑制剂后,ET-1 水平下降,提示体内促炎因子活性下降,有利于减轻机体炎症反应,减少器官功能损害。文献<sup>[12]</sup>也报道 UT 对体内炎性介质具有抑制作用。

综上所述,本研究中内毒素血症造成肾脏功能损伤,给予蛋白酶抑制剂 UT 后,肾功能改善,其机制考虑为蛋白酶抑制剂减轻机体的炎症反应,抑制 ET 水平,稳定溶酶体膜,纠正体内酸性环境,改善缺氧状态。蛋白酶抑制剂对内毒素血症情况下器官功能的保护起一定积极作用,具体机制有待进一步的研究。

### 参考文献:

- Doyle R L, Szaflarski N, Modin G W, et al. Identification of patients with acute lung injury: predictors of mortality[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(6pt1): 1818-1824.
- Milberg J A, Davis D R, Steinberg K P, et al. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. JAMA, 1995, 273: 306-309.
- 李景荣, 卢中秋, 赵初环, 等. 抗菌药物联合乌司他丁治疗致病性弧菌感染性脓毒症[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16, 373-374.
- Oshima N, Yamada T, Nakahara H, et al. Effect of ulinastatin (UL) on renal function and lactic acidosis during open-heart surgery: comparison with aprotin-in [J]. Thorac Surg, 1990, 43: 357-363.
- Ueki M, Yokono S, Nogaya J, et al. Effect of ulinastatin on postoperative renal function after cardiopulmonary bypass [J]. Masui, 1995, 44: 691-697.
- Tonoko S, Ueki M, Nakayo M, et al. Urinary excretion of ulinastatin and NAG after cardiopulmonary bypass [J]. Masui, 1997, 46: 388-392.
- Ueki M, Yokono S, Komatsu H, et al. The support of postoperative renal function by ulinastatin in patients with preoperative renal dysfunction [J]. Masui, 1995, 44: 570-573.
- 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: 104-111.
- Miura M, Sugiura T, Aimi Y. Effects of ulinastatin on PMNL and vascular endothelial injury in patients undergoing open heart surgery with CPB [J]. Masui, 1998, 47: 29-35.
- Hiyama A, Takeda J, Kotate Y, et al. A human urinary protease inhibitor (ulinastatin) inhibits neutrophil extracellular release of elastase during cardiopulmonary bypass [J]. J Cardiothorac Vasc Anaesth, 1997, 11: 580-585.
- Abe H, Kumagai K, Matsuda T, et al. Effect of ulinastatin on the free radical during cardiopulmonary bypass [J]. Masui, 1995, 44: 1005-1009.
- 邵义明, 张良清, 邓烈华, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征的治疗作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 228-230.

(收稿日期: 2005-06-17 修回日期: 2005-09-06)

(本文编辑: 郭方)

## 蛋白酶抑制剂对内毒素致大鼠肾功能损害的保护作用

(正文见603页)

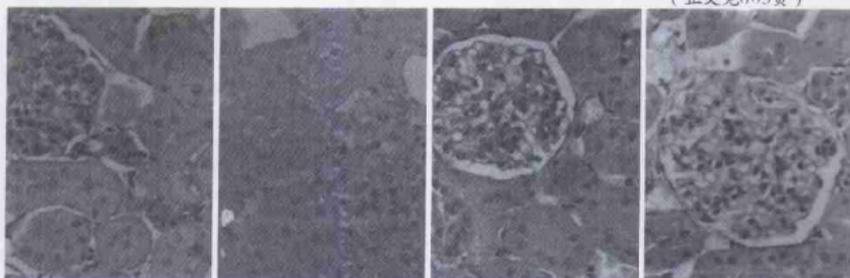


图1 正常对照组大鼠肾组织病理学变化(HE, ×100)  
Figure 1 Pathological changes of renal tissue in normal control group(HE, ×100)

图2 LPS组大鼠肾组织病理学变化(HE, ×100)  
Figure 2 Pathological changes of renal tissue in LPS group(HE, ×100)

图3 大剂量UT干预组大鼠肾组织病理学变化(HE, ×100)  
Figure 3 Pathological changes of renal tissue in large dosage of UT intervention group(HE, ×100)

图4 小剂量UT干预组大鼠肾组织病理学变化(HE, ×100)  
Figure 4 Pathological changes of renal tissue in small dosage of UT intervention group(HE, ×100)

## PPAR $\gamma$ 和 $\alpha$ -SMA在单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中的表达及其意义

(正文见611页)

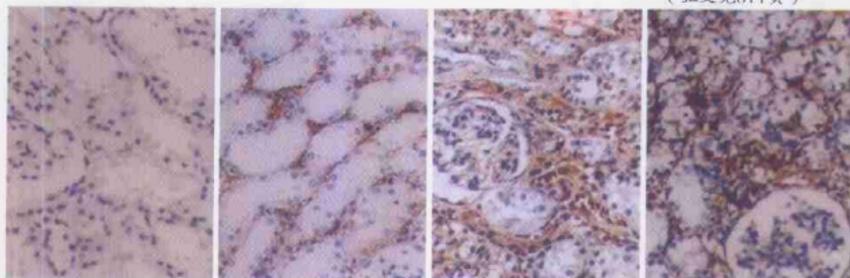


图1 假手术组PPAR $\gamma$ 的表达(免疫组化, ×200)  
Figure 1 Expression of PPAR $\gamma$  protein in sham-operated group (immunohistochemistry, ×200)

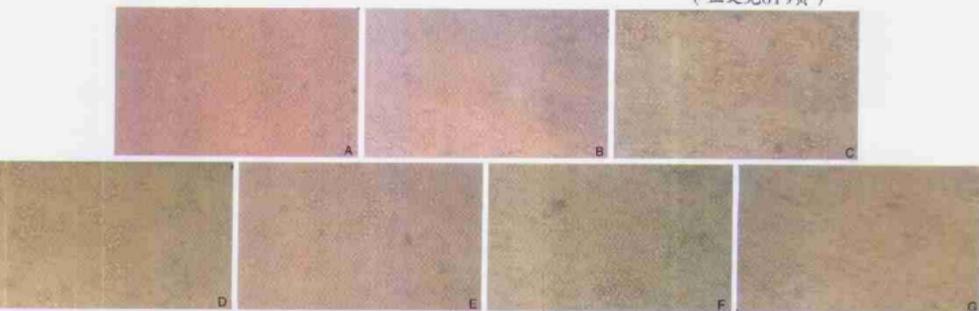
图2 模型组术后3 d PPAR $\gamma$ 的表达(免疫组化, ×200)  
Figure 2 Expression of PPAR $\gamma$  protein in UUO 3 days group (immunohistochemistry, ×200)

图3 模型组术后14 d PPAR $\gamma$ 的表达(免疫组化, ×200)  
Figure 3 Expression of PPAR $\gamma$  protein in UUO 14 days group (immunohistochemistry, ×200)

图4 模型组术后28 d PPAR $\gamma$ 的表达(免疫组化, ×200)  
Figure 4 Expression of PPAR $\gamma$  protein in UUO 28 days group (immunohistochemistry, ×200)

## 人近曲肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型的建立

(正文见619页)



注: A为正常对照, B为H4h, C为H12h, D为H24h, E为H/R4h, F为H/R12h, G为H/R24h

图1 各组HK-2细胞H/R过程中形态学变化(×100)

Figure 1 Changes of morphology of HK-2 cells during H/R in each group (×100)