

· 论著 ·

乌司他丁对兔急性百草枯中毒心肌的保护作用

狄敏 李莉 兰超 孙昌华 张瑞 高艳霞

【摘要】 目的 探讨乌司他丁(UTI)对急性百草枯中毒致心肌损伤的保护作用及机制。**方法** 将 24 只健康日本大耳白兔按随机数字表法均分为对照组、模型组(腹腔注射百草枯 37 mg/kg 1 次)及 UTI 低、高剂量组(染毒前 1 周开始分别静脉注射 UTI 25 kU·kg⁻¹·d⁻¹、50 kU·kg⁻¹·d⁻¹, 共 9 d)4 组。于末次给药后 24 h 称重并处死动物,取左心室组织,测定羟脯氨酸(HYP)含量;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、金属蛋白酶组织抑制剂 2(TIMP-2)转录水平;行免疫组化染色观察心肌形态学及 MMP-2 免疫组化评分。**结果** 与对照组相比,模型组心肌 HYP 含量(mg/g)明显增高(3.85 ± 0.36 比 2.52 ± 0.29, $P < 0.05$);心肌组织 MMP-2 mRNA 表达及免疫组化评分(分)明显增高(mRNA: 2.07 ± 0.57 比 1.00 ± 0.35;免疫组化评分: 2.24 ± 0.82 比 1.40 ± 0.62, 均 $P < 0.05$),同时 TIMP-2 mRNA 表达呈下降趋势(0.78 ± 0.24 比 1.00 ± 0.17, $P > 0.05$);组织形态学显示心肌排列紊乱。与模型组相比,UTI 低、高剂量组心肌 HYP 含量降低(3.40 ± 0.48、3.12 ± 0.43 比 3.85 ± 0.36, $P > 0.05$ 和 $P < 0.05$);MMP-2 mRNA 表达和免疫组化评分明显降低(mRNA: 1.86 ± 0.44、1.58 ± 0.46 比 2.07 ± 0.57, $P > 0.05$ 和 $P < 0.05$;免疫组化评分: 1.93 ± 0.86、1.75 ± 0.67 比 2.24 ± 0.82, 均 $P < 0.05$);TIMP-2 mRNA 表达虽升高,但差异无统计学意义(0.82 ± 0.35、0.94 ± 0.33 比 0.78 ± 0.24, 均 $P > 0.05$);且心肌纤维排列紊乱程度减轻。**结论** UTI 具有改善急性百草枯中毒致心肌功能障碍及心肌间质纤维化的作用,这一作用可能与其下调组织 MMP-2 水平有关,且这种下调作用呈剂量依赖性。

【关键词】 中毒,急性; 百草枯; 乌司他丁; 心肌; 基质金属蛋白酶

Effects of ulinastatin on myocardial injury induced by acute paraquat poisoning DI Min, LI Li, LAN Chao, SUN Chang-hua, ZHANG Rui, GAO Yan-xia. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, the Key-Disciplines Laboratory Clinical-Medicine, Zhengzhou 450052, Henan, China
Corresponding author: LI Li, Email: lili_zzu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ulinastatin (UTI) on myocardial injury induced by acute paraquat poisoning. **Methods** Twenty-four Japan white rabbits were divided into control group, model group (37 mg/kg paraquat intraperitoneally once), UTI low dosage group and high dosage group (25 kU·kg⁻¹·d⁻¹ and 50 kU·kg⁻¹·d⁻¹ UTI was intravenously injected respectively for 9 days beginning from 1 week before poisoning) through random number table. Rabbits were sacrificed 24 hours after the last UTI administration. Left ventricle of hearts were harvest, and tissue hydroxyproline (HYP) contents were determined. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) transcriptional levels were assayed respectively with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression levels of MMP-2 in tissue of left ventricle were quantified with immunohistochemistry. **Results** Compared with normal myocardium, acute paraquat poisoning induced elevated HYP (mg/g) content significantly (3.85 ± 0.36 vs. 2.52 ± 0.29, $P < 0.05$); with RT-PCR and immunohistochemistry, it was shown that both mRNA expression levels and immunohistochemistry score of MMP-2 were much higher (mRNA: 2.07 ± 0.57 vs. 1.00 ± 0.35; immunohistochemistry score: 2.24 ± 0.82 vs. 1.40 ± 0.62, both $P < 0.05$). TIMP-2 appeared to be down-regulated in mRNA expression level (0.78 ± 0.24 vs. 1.00 ± 0.17, $P > 0.05$). Disorganized cardiocytes were observed. Compared with paraquat poisoning model, low and high UTI administration produced depression of tissue HYP contents (3.40 ± 0.48, 3.12 ± 0.43 vs. 3.85 ± 0.36, $P > 0.05$ and $P < 0.05$). With low or high dosage of UTI reduced mRNA expression levels and immunohistochemical scores of MMP-2 in left ventricle were observed (mRNA: 1.86 ± 0.44, 1.58 ± 0.46 vs. 2.07 ± 0.57, $P > 0.05$ and $P < 0.05$; immunohistochemical score: 1.93 ± 0.86, 1.75 ± 0.67 vs. 2.24 ± 0.82, both $P < 0.05$), and TIMP-2 mRNA level was increased slightly, though there was no significant differences (0.82 ± 0.35, 0.94 ± 0.33 vs. 0.78 ± 0.24, both $P > 0.05$). Improvements in disordered myocardium were demonstrated. **Conclusions** UTI significantly attenuated myocardial injury induced by acute paraquat poisoning. Its mechanism might be related to a reduction of expression level of MMP-2 in tissue, with a dose-dependent manner.

【Key words】 Poisoning, acute; Paraquat; Ulinastatin; Myocardium; Matrix metalloproteinase

百草枯中毒在农药中毒中较为常见,在体内于线粒体中反复与氧结合产生超氧游离基活性氧簇(ROS),形成氧化应激,引起多器官损伤^[1-2],目前尚无特效药物,病死率高达 30%~70%^[3]。百草枯中毒致死患者血清 IV 型胶原含量、丙氨酸转氨酶、肌酐及总胆红素等指标亦明显增高,表明急性百草枯中毒可致多器官损伤^[4-5]。心肌富含线粒体,快速的能量代谢使其对百草枯所致 ROS 损伤更加敏感^[6]。乌司他丁(UTI)是一种具有抑制多种蛋白、糖和脂类水解酶活性的酸性糖蛋白,可显著减轻射线、缺血/再灌注等引起的 ROS 致肺组织氧化损伤^[7-8]。最近研究表明,UTI 预处理可明显减轻脓毒症晚期大鼠心脏损害,具有心脏保护作用^[9]。本研究中通过监测不同剂量 UTI 对急性百草枯中毒兔模型心脏组织中基质金属蛋白酶 2(MMP-2)表达水平的影响,探讨 UTI 对急性百草枯中毒致心肌损伤的作用及机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型复制:24 只成年雄性日本大耳白兔[SPF 级,由郑州大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(豫)2011-0001],体重 1.98~2.60 kg。按随机数字表法将动物分为对照组、模型组及 UTI 低、高剂量干预组 4 组,每组 6 只。腹腔注射百草枯(美国 Sigma-Aldrich 公司,856177)37 mg/kg 1 次复制百草枯中毒模型^[10]。UTI 低、高剂量组分别于染毒前 1 周开始静脉注射 UTI 25 kU·kg⁻¹·d⁻¹、50 kU·kg⁻¹·d⁻¹,共 9 d;对照组和模型组注射等量生理盐水。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法:于末次给药 24 h 后,用 10%水合氯醛麻醉动物,心脏采血后摘除心脏,将部分心肌储存于 -80 ℃冰箱用于组织羟脯氨酸(HYP)含量测定及核酸提取,部分左心室用 4%甲醛溶液固定用于 MMP-2 免疫组化染色。

1.2.1 心肌组织 HYP 含量测定:应用碱水解法检测心肌组织内 HYP 含量^[11],以测定管组织匀浆吸光度(A)值/标准品 A 值×标准品含量/组织重量的方

法计算心肌 HYP 含量。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试验检测 MMP-2 和金属蛋白酶组织抑制剂 2(TIMP-2)的 mRNA 表达:采用 TRIzol 提取心肌组织总 RNA。通过特异性引物(表 1),应用 PCR 反应试剂盒(美国 Fermentas 公司),在 PCR 仪器(美国应用生物系统公司)上以相应的退火温度扩增目的基因,并在 1%琼脂糖凝胶电泳后用自动凝胶成像系统显影、拍照。用 Quantity One 4.4 软件(美国 Bio-Rad 公司)获得各样本的目的基因及内参条带灰度值。结果以 β-肌动蛋白(β-actin)条带矫正的相对于对照组的含量表示。

表 1 用于 RT-PCR 各基因引物序列

基因	序列号	引物序列	产物大退火温 小(bp)度(℃)
MMP-2	NM_001082209.1	正义链:5'-GTGGGACAAGAATCAGATCACA-3' 反义链:5'-TACTTCACACGGACCACTTGAC-3'	321 55
TIMP-2	XM_002723776.1	正义链:5'-TTGAACGGAGCTCTGGTGGT-3' 反义链:5'-GCTCTTCTTCTGCGTGTG-3'	326 59
β-actin	NM_001101683.1	正义链:5'-AGACCACCTTCAACTCGATCAT-3' 反义链:5'-ACTGCTCATACTCTGCTTGCT-3'	267 56

注:RT-PCR:逆转录-聚合酶链反应,MMP-2:基质金属蛋白酶 2,TIMP-2:金属蛋白酶组织抑制剂 2,β-actin:β-肌动蛋白

1.2.3 免疫组化分析:通过鼠 MMP-2 单克隆一抗及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠二抗,采用间接酶标两步法进行左心室 MMP-2 免疫组化染色。应用照相系统在 400 倍镜下观察 MMP-2 表达,并以染色范围及深浅度进行评分:0 分为未染色;1 分为浅染面积<50%;2 分为浅染面积>50%或深染<50%;3 分为深染>50%^[12]。

1.3 数据处理:采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素 ANOVA 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况(表 2):染毒 3 d 后,动物饮食均减少,并出现腹泻、脱毛现象,但均无死亡,体重与对照组比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

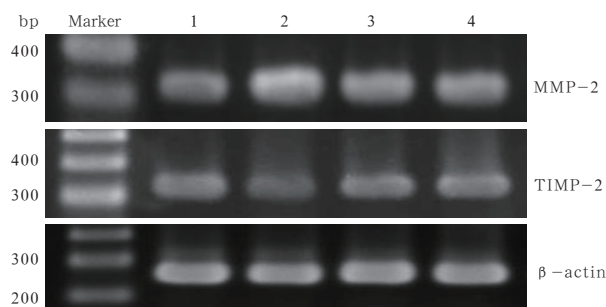
表 2 UTI 对急性百草枯中毒兔体重、心肌 HYP 含量、MMP-2 和 TIMP-2 mRNA 表达及 MMP-2 免疫组化评分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	体重(kg)	心肌 HYP 含量(mg/g)	MMP-2 mRNA	TIMP-2 mRNA	MMP-2 免疫组化评分(分)
对照组	6	2.15 ± 0.37	2.52 ± 0.29	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.17	1.40 ± 0.62
模型组	6	2.02 ± 0.43	3.85 ± 0.36 ^a	2.07 ± 0.57 ^a	0.78 ± 0.24	2.24 ± 0.82 ^a
UTI 低剂量组	6	2.13 ± 0.43	3.40 ± 0.48	1.86 ± 0.44	0.82 ± 0.35	1.93 ± 0.86 ^b
UTI 高剂量组	6	2.08 ± 0.29	3.12 ± 0.43 ^b	1.58 ± 0.46 ^b	0.94 ± 0.33	1.75 ± 0.67 ^b

注:UTI:乌司他丁,HYP:羟脯氨酸,MMP-2:基质金属蛋白酶 2,TIMP-2:金属蛋白酶组织抑制剂 2;与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

2.2 心肌 HYP 含量(表 2):模型组心肌 HYP 含量较对照组显著增高($P<0.05$)。应用不同剂量 UTI 干预后心肌 HYP 含量较模型组呈现降低趋势,UTI 高剂量组 HYP 含量明显低于模型组($P<0.05$)。

2.3 RT-PCR 检测结果(表 2;图 1):与对照组相比,模型组心肌组织 MMP-2 mRNA 表达水平明显增高($P<0.05$),TIMP-2 mRNA 表达呈现下降趋势($P>0.05$)。UTI 干预后 MMP-2 mRNA 表达水平下降,其中 UTI 高剂量组表达水平显著低于模型组($P<0.05$);但不同剂量 UTI 干预组 TIMP-2 mRNA 表达水平较模型组无显著上升(均 $P>0.05$)。



RT-PCR:逆转录-聚合酶链反应,UTI:乌司他丁, MMP-2:基质金属蛋白酶 2, TIMP-2:金属蛋白酶组织抑制剂 2, β -actin: β -肌动蛋白;1~4 分别为对照组、模型组及 UTI 低、高剂量组

图 1 RT-PCR 试验检测 UTI 对急性百草枯中毒兔心肌组织 MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 表达的影响

2.4 免疫组化结果(表 2;图 2):模型组心肌纤维排列紊乱, MMP-2 免疫组化评分显著高于对照组($P<0.05$)。UTI 干预两组心肌组织中 MMP-2 免疫组化评分均明显低于模型组(均 $P<0.05$);且与对照组相比差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

3 讨论

百草枯进入线粒体内形成 ROS,由 ROS 介导损伤心肌功能,激活氧化酶、羟化酶等产生大量胶原,导致间质重构^[13-15],细胞间质重构、组织纤维化程度与胶原含量呈正相关。本研究中急性百草枯中毒动

物心肌组织中代表结缔组织胶原含量的 HYP 水平显著增高,心肌间质重构、组织纤维化。

MMPs 是一类具有水解细胞外基质活性的酶类,在细胞迁移、增殖、凋亡及组织重构过程中起作用^[16]。MMP-2 在构成心脏所有细胞中均有表达,除对心肌间质发挥水解作用外,在心肌细胞内与肌节结合发挥作用,可消化心肌细胞骨架结构组分 α -actin^[17],其水平受功能性活化蛋白-1(AP-1)组分 FosB、JunB 在转录过程调控,同时其活性受 TIMP-2 的调节。在缺血/再灌注等急性心肌病变中,功能性 AP-1 活性和 MMP-2 含量增加,在心泵功能损伤中起核心作用^[18]。本研究结果显示,急性百草枯中毒导致心肌 MMP-2 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高,但具有特异性抑制 MMP-2 活性的 TIMP-2 转录水平并未上升,最终导致心肌排列紊乱及心肌 HYP 含量升高,出现急性心肌功能障碍及心肌间质纤维化。

UTI 具有抑制多种蛋白、糖和脂类水解酶活性的作用,大剂量 UTI 可有效减轻射线等氧化应激因素致肺组织肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β 及白细胞介素-6 等炎症因子损伤,改善肺泡细胞功能,减少组织内 HYP 含量,预防肺纤维化发生^[8,19];且 UTI 可有效促进急性心肌梗死合并心源性休克患者心功能恢复,降低病死率^[6]。本研究结果表明,大剂量 UTI 可下调 MMP-2,减轻心肌间质 HYP 生成和心肌间质损伤,具有预防心脏重构的作用。心肌细胞内 MMP-2 下调抑制了其其对肌节、心肌细胞骨架的损伤作用^[5],还可显著改善心肌纤维紊乱排列,减轻急性心肌功能障碍。

综上所述,UTI 具有改善急性百草枯中毒致心肌功能障碍及心肌间质纤维化的作用,且这一作用与其下调 MMP-2 水平有关。由于 UTI 来源于健康成人尿液,将其应用于急性百草枯中毒患者的治疗安全性高。

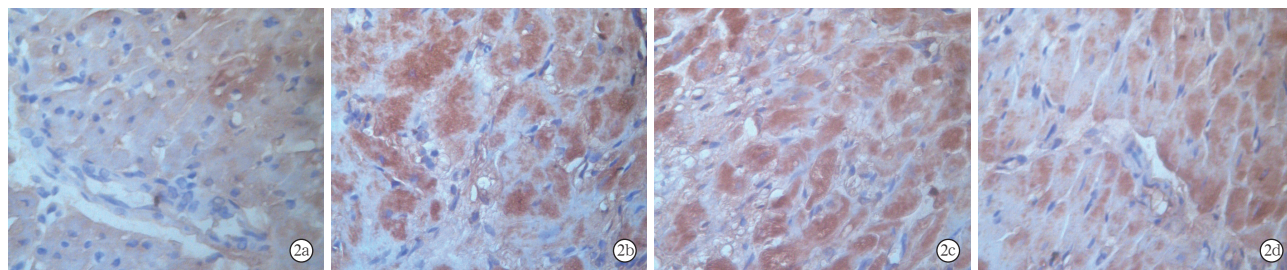


图 2 光镜下观察乌司他丁(UTI)对急性百草枯中毒兔心肌组织基质金属蛋白酶 2(MMP-2)表达的影响 对照组(a)左室心肌纤维及间质 MMP-2 表达弱阳性;模型组(b)左室心肌水肿、心肌纤维排列紊乱伴间质内炎性细胞浸润, MMP-2 表达强阳性;UTI 低剂量组(c)及高剂量组(d)左室心肌水肿程度、炎性细胞浸润及 MMP-2 表达均较模型组(b)改善,以高剂量组显著 免疫组化 高倍放大

参考文献

- [1] Yu Q, Wang T, Zhou X, et al. Wld (S) reduces paraquat-induced cytotoxicity via SIRT1 in non-neuronal cells by attenuating the depletion of NAD. *PLoS One*, 2011, 6: e21770.
- [2] 王煜, 赵敏. 血必净注射液对急性百草枯中毒患者的多器官保护作用. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18: 296-298.
- [3] Lee HL, Lin HJ, Yeh ST, et al. Presentations of patients of poisoning and predictors of poisoning-related fatality: findings from a hospital-based prospective study. *BMC Public Health*, 2008, 8: 7.
- [4] Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, et al. Changes in concentrations of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with paraquat poisoning. *J Appl Toxicol*, 2001, 21: 445-447.
- [5] 孔庆福, 张华, 王丽, 等. 急性百草枯中毒早期器官损害与细胞因子的变化. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 159-162.
- [6] 王宇, 马朋林. 乌司他丁对急性心肌梗死合并心源性休克患者循环功能恢复的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 562-563.
- [7] Xu M, Wen XH, Chen SP, et al. Addition of ulinastatin to preservation solution promotes protection against ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124: 2179-2183.
- [8] Bao P, Gao W, Li S, et al. Effect of pretreatment with high-dose ulinastatin in preventing radiation-induced pulmonary injury in rats. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603: 114-119.
- [9] 林建东, 蔡毅, 肖雄箭, 等. 乌司他丁对脓毒症大鼠心脏组织基因表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 688-692.
- [10] Ge W, Zhang Y, Han X, et al. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates paraquat-induced myocardial geometric and contractile alteration; role of ER stress. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49: 2068-2077.
- [11] Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem*, 1996, 29: 225-229.
- [12] Qin F, Simeone M, Patel R. Inhibition of NADPH oxidase reduces myocardial oxidative stress and apoptosis and improves cardiac function in heart failure after myocardial infarction. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43: 271-281.
- [13] Cochemé HM, Murphy MP. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem*, 2008, 283: 1786-1798.
- [14] Chan YC, Chang SC, Hsuan SL, et al. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21: 595-603.
- [15] Edwards MG, Sarkar D, Klopp R, et al. Age-related impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the mouse heart. *Physiol Genomics*, 2003, 13: 119-127.
- [16] Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*, 2007, 87: 1285-1342.
- [17] Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, et al. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77: 826-834.
- [18] Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*, 2010, 85: 413-423.
- [19] 孙明莉, 李海峰, 袁媛, 等. 乌司他丁对百草枯中毒大鼠肺纤维化的影响及其机制研究. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 187-188.

(收稿日期: 2012-03-14)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

枳子提取物二氢杨梅素治疗乙醇中毒

长期过量饮酒能导致机体对乙醇的依赖,并逐渐发展为乙醇使用障碍(AUDs),而且目前尚无有效治疗 AUDs 的药物。二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DHM)是中药枳子的提取物。加利福尼亚大学的研究人员最近研究发现,腹腔注射 DHM(1 mg/kg)能有效治疗大鼠乙醇中毒及戒断综合征,包括耐受、焦虑、抽搐等症状;同时 DHM 还能减少大鼠对乙醇的依赖。 γ -氨基丁酸 A (GABAA)受体是乙醇作用于大脑的主要靶点,而研究人员进一步体内外研究发现, DHM 能对抗乙醇引起的 GABAA 受体介导的抑制性通路活动;而应用苯二氮草类拮抗药氟马西尼后, DHM 的作用完全消失,这提示 DHM 的作用机制是通过阻断乙醇作用于 GABAA 受体来实现的。该研究初步阐明了 DHM 治疗 AUDs 的药理作用机制,为 AUDs 的治疗提供了新方法及理论依据。

罗红敏, 编译自《J Neurosci》, 2012, 32: 390-401; 胡森, 审校

体外生命支持系统可提高严重药物中毒患者的生存率

体外生命支持系统(ECLS)治疗中毒引起的心血管损伤的疗效尚不清楚,为此,法国研究人员进行了一项回顾性调查,对比研究了使用或未使用 ECLS 对药物中毒疗效的影响。研究对象为 2 家法国西北部医院过去 10 年中收治的 62 例药物中毒引起心搏骤停或严重休克患者,其中 14 例患者接受 ECLS 治疗,48 例患者均接受常规治疗,两组患者的用药史、简化急性生理学评分 II (SAP II)、序贯器官衰竭评分(SOFA)、格拉斯哥昏迷评分(GCS)等非实验因素比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结果发现,62 例患者中最终有 35 例患者(56%)幸存,其中 ECLS 治疗者 12 例(86%),非 ECLS 治疗者 23 例(48%),两组比较差异有统计学意义($P = 0.02$)。因此,研究人员认为, ECLS 可提高药物中毒引起心搏骤停或严重休克患者的生存率。

杜明华, 编译自《Resuscitation》, 2012-03-30(电子版); 胡森, 审校