

《现代医院》杂志栏目

- | | |
|---------|-------|
| 现代化纵论 | 专业技术篇 |
| 学科进展 | 论著·论述 |
| 实验与应用研究 | 临床经验 |
| 传统医学 | 医技诊疗 |
| 临床药学 | 护理技术 |
| 心理医学 | 医改实践 |
| 质量管理 | 应急管理 |
| 文化建设 | 人力资源 |
| 后勤支持 | 信息服务 |
| 社区卫生服务 | 预防保健 |
| 医师手记 | 港澳台链接 |
| 科技新知 | 辞海查新 |
| 院刊集锦 | 医院采撷篇 |

杂志社服务电话

020—83310901
83310902

历年期刊

更多>>

- 2010年9月第10卷第9期
- 2010年8月第10卷第8期
- 2010年7月第10卷第7期
- 2010年6月第10卷第6期
- 2010年5月第10卷第5期
- 2010年04月第10卷第4期



文章检索

文章标题 所有栏目 关键字 搜索

乌司他丁预处理对兔全脑缺血-再灌注损伤血清S-100 β 蛋白表达的影响

[作者: 庄越] 来源: 本站原创 阅读数: 160

(广州医学院 广东 广州 510182);

金文香² (广州医学院第二附属医院 广东 广州510260)

摘要 目的 通过观察乌司他丁预处理对兔全脑缺血再灌注损伤时血清S-100B蛋白表达的影响,探讨乌司他丁对全脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法:健康新西兰大白兔24只,雌雄不拘;体重2.0—2.5kg;随机分成4组(n=6):正常对照组(C组);假手术组(S组);缺血再灌注组(IR组);乌司他丁组(UT组)。全脑缺血模型建立采用对“四血管闭塞法”(4VO)即Pulsinelli造模方法进行改良,建立兔全脑缺血模型。采用ELISA和免疫组化方法在缺血再灌注各时点:缺血前(T0)、再灌注即刻(T1)、再灌注2小时(T2)、再灌注4小时(T3)、再灌注8小时(T4)检测兔血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)、S-100B蛋白的表达的变化,并抽取颈静脉血测Sajv02。并于各时间段监测血流动力学状况(HR MAP)结果:①再灌注后各相对应的时间缺血-再灌注组(IR组)血浆TNF- α ; S-100B蛋白表达水平明显高于对照组和假手术组(P<0.01);乌司他丁组血浆TNF- α ; S-100B蛋白表达也较对照组和假手术组有所升高但升高幅度不及缺血-再灌注组;(P<0.05)。②乌司他丁组的颈静脉血氧饱和度(Sajv02)明显高于缺血再灌注组相对应时间点,且随着缺血再灌注时间延长,U组和IR组的Sajv02仍可维持于平稳水平(P Effect of ulinastatin injection precondition on expression of S-100B protein in serum on the global brain Injury of Ischemia-reperfusion in Rabbit

Zhuangyue¹ (Guangzhou Medical University; Guangzhou Guangdong 510182); jinwenxiang²(Department of Anesthesia, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University; Guangzhou Guangdong 510260)

Abstract: Objective To observe the effects of ulinastatin injection precondition on expression of S-100B protein in serum on the Ischemia-reperfusion injury of the global brain in Rabbits, we studied the protective effect of ulinastatin injection on the Ischemia-reperfusion injury of the global in Rabbit Methods Twenty-four healthy rabbits weighed 2.0—2.5kg were randomly divided into 4 groups (n=6): contrast group (group C); sham operation (group S)、Ischemia-reperfusion group (group IR)、ulinastatin group(group U).The Model of the global brain Ischemia was introduced by “four vascular occlusion (4VO)” just as the improved methods of modeling devised by Pulsinelli. The blood samples of carotid venous were obtained to measure jugular venous oxygen saturation (Sajv02). Before the time of the global brain ischemia and refusion in 0,2,4and 8 hours, expression of serum TNF- α and S-100B protein were determined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). We monitored the station of hemodynamics (HR MAP) at each time points. Results ①The expression level of TNF- α and S-100B protein at corresponding time sport in group IR was obviously higher than those in group C and group S (P<0.01)after reperfusion. The expression level of TNF- α ; S-100B protein in group U also was higher than group C and group S, but the amplitude was lowerer than group IR. ② The levels of Sjav02 at the corresponding time spots in group U was obviously higher than group IR. And with the time of Ischemia-reperfusion lasting, the levels of Sajv02 in group U and IR maintain the stable level. Conclusion Ulinastatin injection precondition could reduce the expression levels of TNF- α ; S-100B protein in serum during the global brain Injury of Ischemia-reperfusion in Rabbit. These demonstrated that Ulinastatin can decrease has the protective effect against the Ischemia-reperfusion injury of the global brain.

乌司他丁(ulinastatin, UTI)是从健康成人尿中提取精制的糖蛋白,具有较强的抑制炎症反应和器官保护作用,是一种广谱的酶抑制剂;可通过抑制肿瘤坏死因子的释放、调节血管内皮细胞的功能,改善微循环及减轻组织损伤【1】。目前,乌司他丁已广泛应用于临床用于抗休克、心肺复苏、治疗胰腺炎、肾脏、肺损伤的保护以及体外循环下重要器官的缺血-再灌注损伤的保护等。但关于乌司他丁对脑的保护作用研究和临床应用很少。本实验采用兔全脑缺血-再灌注损伤模型,把血清S-100B蛋白、TNF- α 表达水平作为减轻脑损伤的标记物,观察乌司他丁对脑缺血再灌注损伤的保护作用。进一步探讨乌司他丁对脑缺血-再灌注损伤保护作用途径及机制。为临床提供参考。

1 材料与与方法:

1.1 主要药品及试剂:

乌司他丁10万U/支(广东天普医药股份有限公司H19990133);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和S-100B蛋白ELISA试

剂盒 (R&D公司, 美国); 3%戊巴比妥钠(泗水希尔康制药有限公司产品)。

1.2 动物的选择及分组:

健康新西兰大白兔24只(由广州医学院动物实验中心提供), 体重2.0—2.5kg; 雌雄不拘; 随机分4组(n=6); 正常对照组(C组)假手术组(S组); 缺血再灌注组(IR组); 乌司他丁组(U组)。

1.3 麻醉方法及动物模型制备:

经耳缘静脉建立静脉通路, 3%戊巴比妥钠30mg/kg经静脉缓注。待麻醉后, 经口盲探插管(ID: 3.0—3.5mm), 接HX—300S动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)行机械通气: 潮气量15ml/kg, 频率30次/分。固定于实验台。缺血再灌注损伤模型采用对Pulsinelii [2]造模方法进行改良, 建立家兔全脑缺血模型, 颈部正中切口, 分离两侧颈总动脉约1cm挂线。枕部切口, 暴露第一颈椎板及横突板上的翼小孔, 用双极电凝针电凝双侧翼小孔内的椎动脉, 缝合切口后待动物完全苏醒, 将其移至笼内饲养, 夜间禁食, 此时动物行为正常, 没有明显的脑损伤。24h后在大鼠完全清醒的状态下, 用动脉夹同时夹闭双侧颈总动脉10min, 造成短暂的全脑缺血。并用红外线灯泡照身来维护动物的体温在37.0℃左右。大白兔在缺血开始后30~60s内昏迷, 翻正反射消失, 能自主呼吸, 双侧瞳孔放大, 痛觉反射消失, 这些症状持续于整个缺血过程中, 凡未出现以上症状或这些症状未能持续整个缺血过程中的兔子弃用【3】。

1.4 实验方法及标本制备检测:

各组均行颈静脉穿刺置管连接输液泵, 供输液用。经左颈总动脉穿刺置管, 连接换能器接电脑监测血流动力学情况。假手术组(S)只剥离双侧颈总动脉和椎动脉不结扎。经耳缘静脉输入0.9%生理盐水5ml/kg。缺血再灌注组(IR)暴露双侧颈总动脉, 用动脉夹夹闭10min后开放, 于夹闭前30min输入0.9%生理盐水5ml/kg, 乌司他丁组(U)方法同IR组, 于夹闭前30min静脉输入乌司他丁10万U/kg+0.9%生理盐水配成5ml/kg。各组分别于夹闭前(T0); 开放即刻(T1); 开放2h(T2); 开放4h(T3); 开放8h(T4)时间点抽取颈静脉血2ml, 置于干燥试管. 3000r/min, 离心15分钟, 取上清液置-70℃冰箱保存待测。采用酶联免疫法(ELISA)测定血浆TNF—α, S-100B蛋白浓度。并于各时间点监测血流动力学(HR MAP)。颈静脉血氧饱和度(Sjvo%)的检测: 各组动物于缺血前(T0)、再灌注即刻(T1)、再灌注2h(T2)、再灌注4h(T3)、再灌注8h(T4), 分别采取颈静脉球部血液2ml, 行血气分析测Sjvo2。

1.4.1 血浆TNF—α、S-100B的检测:

采用酶联免疫法(ELISA)、严格按试剂使用步骤测定血浆TNF—α, S-100B蛋白浓度。具体如下: 取出酶标板, 依次对应分别加入100ul的标准品于空白微板中。分别标记样品编号, 加入100ul样品于空白微空中, 在标准孔和样品孔中加入50ul的酶标记溶液, 37℃温育45分钟, 洗涤板机4次拍干, 加入亲和链霉素—HRP37℃温育30分钟, 重复洗涤板机4次拍干, 每孔加入底物A、各50ul 37℃温育5分钟。迅速每孔加入50ul 终止液立即测定结果。在450nm波长处测定各孔OD值。得出标准曲线回归方程式, 代入计算样品浓度。

1.5 统计学处理:

所有数据均以均数±标准差()表示。应用SPSS17.0统计软件进行统计分析, 组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析, 组内比较采用配对t检验, P<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果:

于S组比较IR组血浆TNF—α于再灌注后各监测点显著升高; S—100B蛋白含量与灌注后2h后明显升高(P<0.01); U组血浆TNF—α; S—100B蛋白含量也较C组和S组有所升高但升高幅度不及IR组(P<0.05); U组的Sjvo2高于IR组相对应时间点, 且随着缺血再灌注时间延长, U组和IR组的Sjvo2仍可维持于平稳水平(P表—1 各组不同时点血流动力学指标比较())

(HR: (次/min) MAP: (mmHg) Sjvo: %)

指标 组别 n To T1 T2 T3 T4

HR C组 6 209±12 201±15 203±15 198±21 197±17

S组 5 211±13 221±17 209±20 203±12 206±15

IR组 5 221±21 161±11 190±17 200±19 212±14

U组 6 219±18 186±21 192±21 199±13 211±12

MAP C组 6 94±11 89±17 87±19 83±13 81±14

S组 5 90±16 87±13 86±17 79±11 76±14

IR组 5 91±16 101±21 99±13 94±14 90±17

U组 6 90±12 99±17 92±17 91±12 90±13

Sjvo C组 6 0.95±0.02 0.91±0.08 0.94±0.03 0.92±0.06 0.94±0.03

S组 5 0.96±0.02 0.95±0.01 0.95±0.02 0.96±0.01 0.94±0.03

IR组 5 0.95±0.02 0.25±0.02* 0.35±0.09* 0.68±0.04 0.88±0.02

U组 6 0.93±0.05 0.61±0.07△ 0.70±0.03△ 0.80±0.03 0.92±0.01

与T0比较, IR组: *P<0.01; 与IR组比较; △ P<0.05;

表—2 各组不同时点TNF—α和S—100B蛋白的浓度()

(单位: ng/ml)

指标 组别 n T0 T1 T2 T3 T4

TNF—α C组 6 53.34±2.76 54.25±4.39 53.46±5.83 54.21±4.58 53.56±5.79

S组 5 54.36±5.71 55.34±3.46 54.86±4.97 56.13±3.56 55.53±6.01

IR组 5 56.34±5.23 158.89±6.75* 201.95±6.94* 231.12±8.85* 281.52±5.69*

U组 6 51.12±3.11 79.32±4.97△ 99.03±3.34△ 100.46±3.35△ 159.98±5.79△

S—100B C组 6 1.91±0.31 1.93±0.42 1.93±0.68 2.02±0.28 2.13±0.65

S组 5 1.94±0.75 2.03±0.68 2.37±0.32 3.31±0.75 5.13±0.25

IR组 5 2.23±0.48 12.64±0.39# 17.37±0.12# 19.21±0.25# 23.23±0.68#

U组 6 1.67±0.39 7.82±0.41※ 9.56±0.23※ 12.67±0.65※ 18.23±0.03※

与C组和S组比较, IR组和U组# ※P<0.05; 与T0比较# ※P<0.01。与IR组比较, ※P<0.05。

3 讨论:

本实验参照文献[2、3]建立兔全脑缺血—再灌注损伤模型, 并以乌司他丁作为药物干预, 观察其对脑损伤的

影响。采用监测颈静脉血氧饱和度来直观反应脑缺血缺氧程度，并于各时间点抽取颈静脉学来检测血清中大分子蛋白S—100蛋白和TNF— α 表达含量评估血脑屏障和中枢神经系统损伤程度。因为：TNF— α 是前炎性因子[4]；可促进其它炎性介质释放，是炎症发生的分子病理的始动因素；S—100蛋白分子量大，正常情况下很难通过血脑屏障，因此正常情况下血清中很难检测到。研究表明[5]脑损伤后20分钟后即可检测到血清中其浓度升高，2h后升高明显，提示脑损伤加重。它在中枢神经系统中含量远比其他组织丰富，呈浓度特异性地存在于中枢神经系统的胶质细胞，星形细胞中。缺血缺氧是诱导神经细胞内及血清S—100蛋白基因表达的重要因素，大量研究证明[6-8]：脑脊液和血清中S—100蛋白浓度升高可作为中枢神经系统损伤较为特异和灵敏的指标。

本实验于各时间点监测SjvO₂结果显示：缺血再灌注组于再灌注即刻（T1）达23%~27%明显低于40%表明脑缺血缺氧严重；再灌注2小时（T2）达26%~44%、于T0比较P<0.01。再灌注4小时和8小时各时间点监测显示SjvO₂逐渐趋于平稳的恢复；而乌司他丁组在相对应时间T1、T2，SjvO₂明显提高达到54%以上。两组组间比较P<0.05。说明乌司他丁能明显提高脑组织对缺氧缺血的耐受水平。

本研究结果显示缺血-再灌注损伤组血清 TNF— α 、S—100蛋白含量于再灌注2小时后各时间点检测与对照组和假手术组比较显著升高（P<0.01）。而乌司他丁组与对假手术组比较也升高但是升高幅度不大，与缺血-再灌注组组间比较能明显降低TNF— α 和S—100蛋白含量（P<0.05）；这与乌司他丁能够减轻炎症反应提高脑组织耐受缺血能力的特点相吻合。

乌司他丁组与缺血—再灌注组比较血清TNF— α 含量和S—100蛋白含量在再灌注相对应的时间明显降低，说明乌司他丁组能够降低脑缺血再灌注损伤标记物含量说明其能减轻脑组织由缺血再灌注所引起的损伤。其主要作用机制可能是直接抑制炎症反应最终阶段的蛋白酶，抑制炎症反应几乎全部环节如TNF— α 、ICAM—1、炎症因子IL—1、IL—6、IL—8，和iNOSmRNA的局部表达，抑制白细胞迁出及蛋白酶释放[9]。同时乌司他丁可通过降低内皮素、血栓烷B2和血管紧张素—2的浓度改善围缺血区血供[10]，阻止炎症因子与白细胞之间的联系，切断疾病的进展，改善脑组织微循环。

总之通过实验进一步说明乌司他丁能够提高脑对缺血缺氧及再灌注损伤的耐受能力，减少器官及组织损伤程度，从而达到保护作用。

【参考文献】

- [1] YANO T, ANRAKU S, NAKAYAMA R, et al. Neuroprotective Effect of urinary trypsin inhibitor against focal cerebral ischemia—reperfusion injury in rats[J]. Anesthesiology, 2003, 98: 465-473.
- [2] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion cerebral arteries and control of collateral circulation. Stroke, 1998, 19(7): 913
- [3] 吴忱, 贾建平. 脑缺血动物模型的制备及影响因素 [J]. 中国脑血管病杂志, 2007, 4(1): 42-46
- [4] 张海涛, 胡盛寿, 孙寒松, 等. 体外和非体外循环冠脉搭桥术炎性介质的比较. 中国体外循环杂志, 2006, 4: 23-25
- [5] 尚游, 袁世茨, 姚尚龙. 心跳骤停后脑损伤预后评价的指标—S—100蛋白, 中华急诊医学杂志, 2004, 13: 357-358.
- [6] Rothoerl RD, Brawanski A, Woertgen C. S100 protein serum levels after controlled cortical impact injury in the rat. Acta Neurochir (Wien) 2000, 142: 199—203.
- [7] 赵娟, 谭延国. 中枢神经系统疾患与S100蛋白的关系. 中国临床康复, 2006, 10: 149.
- [8] 陈峻严, 李永加, 周培萱, 等. 急性颅脑损伤后血清S100蛋白含量变化. 中国临床神经外科杂志, 2008, 13(5): 277—278.
- [9] 陈婷婷, 王刚, 高长青. 乌司他丁对创伤性失血性休克兔内源性血管活性物质的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2004, 24(4): 301—302.
- [10] INOUEK, TAKANO H, YANAGISAWA R, et al. Antioxidative role of urinary trypsin inhibitor in acute lung induced by lipopolysaccharide[J]. Int J Mol Med, 2005, 16(6): 1 029—1 033.

通讯作者：单位及联系方式：庄越 广州开发区医院麻醉科；电话：15902053827；020-82087088-30300

[关于我们](#) | [版权信息](#) | [免责声明](#) | [合作](#) | [招聘](#) | [友情链接](#) | [网站导航](#)

Copyright© 2010 《现代医院》杂志社 | 粤ICP05105826号
地址：广州市惠福西路进步里2号之一1楼 邮编 510180
电话：020-83310901 83310902 传真：020-83308884
E-mail : xxddy@163.com