

乌司他丁通过 SIRT1、PGC-1 α 调节氧化应激对失血性休克大鼠脑损伤的保护作用

赵天补, 田昌俊* (苏州大学附属第二医院急诊外科, 江苏 苏州 215004)

摘要: 目的 探讨乌司他丁对失血性休克大鼠脑损伤的影响及作用机制。方法 36 只♂ SD 大鼠随机分为对照组、模型组和观察组, 每组 12 只, 对照组给予假手术, 模型组造模后不予处理, 观察组造模后予以乌司他丁静脉输注。记录造模时采血开始、采血结束、回输开始以及回输结束时的平均动脉压(MAP)、pH、碱剩余(BE)以及乳酸浓度(La)。造模成功 24 h 后检测海马组织线粒体超氧化物歧化酶(SOD)活性以及丙二醛(MDA)含量, Western blotting 测定海马组织中沉默信息调节因子(SIRT1)与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)蛋白的表达情况。结果 采血开始时和回输结束时各组大鼠 MAP 无统计学差异; 模型组和观察组在采血结束和回输开始时 MAP 均明显低于对照组($P<0.05$)。采血开始时 3 组大鼠 pH 值、BE 值和 La 值无统计学差异; 与对照组比, 采血结束时、回输开始时模型组和观察组 pH 值降低、BE 值降低、La 值升高($P<0.05$); 回输结束时 3 组 pH 值无统计学差异, 与对照组比, 模型组和观察组 BE 值降低、La 值升高($P<0.05$)。海马组织线粒体 SOD 活性由高到低分别为对照组、观察组和模型组, 3 组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。3 组 MDA 含量由高到低分别为模型组、观察组和对照组, 3 组间的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Western blotting 结果显示, SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平由低到高均为对照组、模型组、观察组。结论 乌司他丁可通过促进 SIRT1、PGC-1 α 蛋白在海马组织中的表达, 达到抗氧化应激的作用, 发挥保护大鼠缺血再灌注脑损伤的效果。

关键词: 失血性休克; 缺血再灌注损伤; 乌司他丁; 氧化应激反应; 沉默信息调节因子; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2021)06-0692-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.010

引用本文: 赵天补, 田昌俊. 乌司他丁通过 SIRT1、PGC-1 α 调节氧化应激对失血性休克大鼠脑损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 692-696.

Ulinastatin Regulates Oxidative Stress Through SIRT1 and PGC-1 α to Protect Brain Injury in Rats with Hemorrhagic Shock

ZHAO Tianbu, TIAN Changjun* (Department of Emergency Surgery, The Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of ulinastatin on brain injury in rats with hemorrhagic shock.

METHODS Thirty-six ♂ SD rats were randomly divided into control group, model group and observation group, 12 rats in each group. The control group was given sham operation, the model group was not treated after modeling, and the observation group was given ulinastatin intravenous infusion after modeling. The mean arterial pressure(MAP), pH, base excess(BE) and lactic acid concentration(La) at the beginning of blood collection, the end of blood collection, the beginning of reinfusion and the end of reinfusion during modeling were recorded. The activity of superoxide dismutase(SOD) and the content of malondialdehyde(MDA) in hippocampus were measured 24 hours after the establishment of the model. The expression of SIRT1 and PGC-1 α in hippocampus were measured by Western blotting. **RESULTS** There was no significant difference in MAP between groups at the beginning of blood collection and at the end of reinfusion. At the end of blood collection and the beginning of reinfusion, the MAP in the model group and the observation group was significantly lower than the control group($P<0.05$). There was no statistical difference in pH, BE and La between the three groups at the beginning of blood collection. Compared with the control group, at the end of blood collection and the beginning of reinfusion, the pH, BE decreased, the La increased in the model group and observation group($P<0.05$). At the end of reinfusion, there was no statistical difference in pH among the three groups, compared with the control group, the BE decreased, the La increased in the model group and observation group($P<0.05$). The activity of SOD in the three groups from high to low were control group, observation group and model group, the difference was statistically significant($P<0.05$). The content of MDA in the three groups from high to low were model group, observation group and control group, the difference was statistically significant($P<0.05$). Western blotting showed that SIRT1 and PGC-1 α protein expression levels were from low to high in the control group, model group and observation group. **CONCLUSION** Ulinastatin can promote the expression of SIRT1 and PGC-1 α protein in hippocampus, achieve the effect of anti oxidative stress, and play the role of protecting the brain injury of ischemia-reperfusion rats.

KEYWORDS: hemorrhagic shock; ischemia-reperfusion injury; ulinastatin; oxidative stress response; SIRT1; PGC-1 α

作者简介: 赵天补, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (0512)67783414
E-mail: zhaotianbu@163.com

*通信作者: 田昌俊, 女, 硕士, 主

治医师 Tel: (0512)67784879 E-mail: changjunt_2008@163.com

失血性休克是临床常见的危急重症,主要是由于各种原因导致血容量短时间内急剧降低。严重的失血性休克可引起机体众多器官组织的循环障碍、缺血缺氧,诱发多器官功能的障碍。脑组织是人体中枢器官,最不耐受缺血缺氧的环境,若不能及时补充血容量、恢复组织的供血供氧,容易导致病情进一步恶化,进而死亡^[1]。临床上目前首选的治疗方法是补液扩容,但液体复苏在短时间内补充大量血容量,容易导致脑组织的再灌注损伤,引发二次损害。目前已开展大量相关研究探寻治疗失血性休克再灌注脑损伤的有效方案,但由于各种原因,能应用于临床上的案例较少^[2-4]。乌司他丁是一种蛋白酶抑制剂,具有多脏器保护作用,是常用的危急重症治疗药物。有研究显示,乌司他丁可改善缺血性损伤脑组织的能量代谢,减轻损伤程度,可能与氧化应激相关^[5],但其具体的作用机制尚不明确,有待进一步探究。沉默信息调节因子(SIRT1)与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)是2种与氧化应激密切相关的因子,这2种因子的表达上调能够改善线粒体功能,减轻氧化应激反应。本研究拟从氧化应激探讨乌司他丁对失血性休克大鼠脑损伤的保护作用以及对SIRT1、PGC-1 α 表达的影响,探讨乌司他丁保护脑损伤的机制,以期为临床治疗失血性休克脑缺血再灌注损伤的治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级健康成年♂SD大鼠36只,购自郑州大学实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2012-0003,体质量300~350 g,自由进食饮水,饲养环境温度20~25℃,湿度50%~55%,黑暗和光照各12 h。

1.2 试剂和仪器

乌司他丁注射液(国药准字H20040505,广东天普生化医药股份有限公司,批号:X200409;规格:1 mL);线粒体提取试剂盒(美国GENMED公司,批号:C3606-3);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定试剂盒(批号:BC0170)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号:20180803)、RIPA裂解液(批号:P0013B)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0011)均购自南京卡米洛生物工程有限公司; β -actin单抗(货号:

130565)、PGC-1 α 单抗(货号:2178S)均购自Proteintech公司;SIRT1单抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号:11748-MM02);ECL显影液(南京知凡生物技术有限公司,货号:R21313)。美国OPTI血气分析仪(北京冠远科技有限公司)。

1.3 方法

将36只大鼠随机分为对照组、模型组和观察组,每组12只,适应性喂养7 d后进行造模。造模前禁食8 h,称重,腹腔注射3%戊巴比妥钠50 mg·kg⁻¹,仰卧固定在试验手术台,予以经口气管插管自由呼吸。头颈部使用碘伏消毒,颈正中逐层切开,分离出右侧颈总动脉和左颈静脉,插入PE-50管,管端连接三通,一端用于血液的采集,另一端用于检测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)。采集大鼠总血容量的40%制作失血性休克模型,1 h后通过左侧颈静脉回输采集的全部血液,回输时间控制在30 min内,建立再灌注损伤模型。对照组进行假手术,在分离出血管后仅监测MAP和采血检测,不进行血液采集和回输,在1.5 h后缝合关闭颈部切口。观察组在回输血液的同时混入每千克1×10⁵单位的乌司他丁。

1.4 观察指标

1.4.1 动态MAP监测 监测记录造模时采血开始、采血结束、回输开始以及回输结束时的MAP。

1.4.2 动脉血气指标 在“1.4.1”项下监测MAP的4个时间点分别采集0.2 mL动脉血进行血气分析,观察pH、碱剩余(base excess, BE)以及乳酸浓度(lactic acid concentration, La)等指标,同时回输时增加0.8 mL生理盐水作为补充。

1.4.3 氧化应激标志物 造模完成24 h,每组随机选取6只大鼠,3%戊巴比妥钠50 mg·kg⁻¹腹腔麻醉,断头取脑,分离出海马组织,称重,剪碎,加入线粒体裂解液,在4℃、1 500×g离心15 min,取上层清液,10 000×g离心15 min后取沉淀物即为线粒体。BCA试剂盒测定线粒体蛋白浓度,按照SOD试剂盒说明书,测定线粒体样本SOD活性;其余每组6只大鼠断头取出海马组织,加入RIPA裂解液,充分研磨,4℃、13 200 r·min⁻¹下离心30 min,取上清,按照MDA试剂盒说明书进行操作,比色法测定MDA含量。

1.4.4 Western blotting检测SIRT1、PGC-1 α 的表达 取“1.4.3”项下各组剩余海马组织蛋白加入

缓冲液 100 ℃变性 10 min, 8% SDS-PAGE 电泳分离, 5%脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗涤, 加入 β -actin 单抗、SIRT1 单抗以及 PGC-1 α 单抗, 4 ℃孵育过夜。暗室行 ECL 显影, SIRT1、PGC-1 α 条带与 β -actin 条带进行比对, 灰度值比值反映目的蛋白的表达水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动态 MAP 比较

采血开始时和回输结束时各组大鼠 MAP 无统计学差异; 模型组和观察组在采血结束和回输开始时 MAP 均低于对照组($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.2 动态血气比较

采血开始时 3 组大鼠 pH 值、BE 值和 La 值无统计学差异; 与对照组相比, 采血结束时、回输开始时模型组和观察组 pH 值降低、BE 值降低、La 值升高($P < 0.05$); 回输结束时 3 组 pH 值无统计

学差异。回输结束时, 与对照组比较, 模型组 BE 值降低, 观察组和模型组的 La 值升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 2。

2.3 SOD 活性和 MDA 含量比较

3 组海马组织线粒体 SOD 活性由高到低分别为对照组、观察组和模型组, 各组间的差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。3 组 MDA 含量由高到低分别为模型组、观察组和对照组, 各组间的差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 3。

2.4 Western blotting 检测 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平

SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平由低到高均为对照组、模型组、观察组。结果见图 1。

表 1 动态 MAP 对比($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab. 1 Comparison of dynamic MAP($\bar{x} \pm s$, $n=12$) kPa

组别	采血开始	采血结束	回输开始	回输结束
对照组	13.92±0.82	13.56±0.82	13.66±0.87	13.89±0.82
模型组	13.96±0.77	4.33±0.62 ¹⁾	7.16±0.63 ¹⁾	13.91±0.88
观察组	14.01±0.83	4.47±0.68 ¹⁾	7.22±0.41 ¹⁾	14.01±0.75

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$.

表 2 动态血气指标对比($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab. 2 Comparison of dynamic blood gas indexes($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

项目	组别	采血开始	采血结束	回输开始	回输结束
pH	对照组	7.39±0.03	7.37±0.02	7.39±0.02	7.39±0.03
	模型组	7.38±0.03	7.21±0.03 ¹⁾	7.28±0.02 ¹⁾	7.39±0.04
	观察组	7.40±0.04	7.25±0.06 ¹⁾	7.30±0.01 ¹⁾	7.38±0.03
BE/mm $\cdot$ L ⁻¹	对照组	1.35±0.74	2.01±0.72	2.13±0.77	1.71±0.61
	模型组	1.32±0.53	-9.85±1.03 ¹⁾	-5.91±0.93 ¹⁾	1.06±0.66 ¹⁾
	观察组	1.39±0.85	-9.79±1.12 ¹⁾	-5.70±0.81 ¹⁾	1.55±0.92 ¹⁾
La/mm $\cdot$ L ⁻¹	对照组	1.62±0.27	1.56±0.17	1.45±0.22	1.69±0.44
	模型组	1.59±0.22	9.27±0.84 ¹⁾	5.57±0.72 ¹⁾	2.15±0.73 ¹⁾
	观察组	1.69±0.34	9.66±1.13 ¹⁾	5.54±0.66 ¹⁾	2.39±0.83 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$.

表 3 各组 SOD 活性和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 3 Comparison of SOD activity and MDA content of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	SOD/U $\cdot$ mg ⁻¹	MDA/ μ mol $\cdot$ g ⁻¹
对照组	108.62±6.85	0.43±0.13
模型组	50.26±3.07 ¹⁾	1.26±0.23 ¹⁾
观察组	68.67±7.10 ¹⁾²⁾	0.71±0.04 ¹⁾²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P < 0.05$.

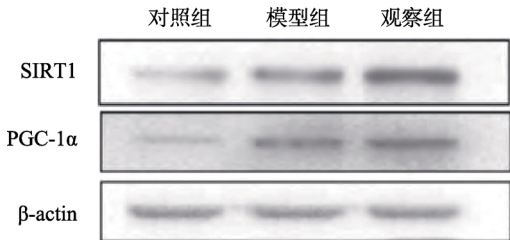


图 1 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达情况水平

Fig. 1 SIRT1 and PGC-1 α protein expression levels

3 讨论

大脑是人体中枢,最不耐缺氧环境,在失血性休克时容易出现损伤,休克后液体复苏时又容易出现再灌注损伤,因此在失血性休克时对脑组织的保护十分重要。在动物模型中已有多种脑损伤保护措施,但临床上尚无公认有效的治疗方法。乌司他丁是一种蛋白酶抑制剂,可通过抗炎、清除氧自由基来达到多脏器保护的功能,是一种强效的抗氧化剂,在临床危急重症患者中常用^[6-8]。本研究采用临床常用药物乌司他丁对失血性休克复苏的大鼠模型进行干预,观察其对脑损伤的影响,并探索其作用机制。

本研究采用失血性休克复苏的大鼠模型进行实验,通过动脉采血,静脉回输的方式进行造模,不仅能体现疾病本质,同时其可重复性好。结果显示,采血开始时和回输结束时各组大鼠 MAP 无统计学差异;模型组和观察组在采血结束和回输开始时 MAP 均低于对照组。此外,动态血气分析显示,采血开始时 3 组大鼠 pH 值、BE 值和 La 值无统计学差异;采血结束时、回输开始时,与对照组比较,模型组和观察组 pH 值降低、BE 值降低、La 值升高;回输结束时 3 组 pH 值无统计学差异,模型组和观察组较对照组 BE 值降低、La 值升高。MAP、pH 值、BE 值以及 La 值的动态变化符合失血性休克及复苏成功的表现,且各组大鼠均未出现死亡,说明此次造模成功,能够体现失血性休克复苏的主要病理特征。

脑组织的缺血再灌注损伤是一个复杂的病理过程,包括炎症反应、氧化应激反应、代谢产物增加、组织不良反应等等^[9-11]。MDA 和 SOD 是重要的氧化应激标志物,MDA 可反应氧化应激严重程度,而 SOD 是机体关键的抗氧化物质,能够反映机体抗氧化应激的能力^[12]。本研究结果显示,3 组 SOD 活性由高到低分别为对照组、观察组和模型组,3 组 MDA 含量由高到低分别为模型组、观察组和对照组。分析其原因,可能是大脑组织由于缺血缺氧导致活性氧蓄积,线粒体功能障碍,ATP 生成减少,因而模型组 MDA 最高,SOD 水平最低,说明氧化应激反应较为严重,而观察组大鼠 MDA 较模型组低且 SOD 水平较模型组高,提示乌司他丁通过提高机体抗氧化应激反应的能力,减轻氧化应激,从而达到保护脑组织的作用。

为进一步探讨其机制,本研究分析了各组大鼠海马组织中 SIRT1、PGC-1 α 蛋白的表达情况。SIRT1 是一种去乙酰化酶,可调控氧化应激、细胞凋亡以及神经元保护等过程,而 PGC-1 α 是 SIRT1 的底物之一,在维持线粒体功能方面具有重要作用^[13-14]。有研究表明^[15],SIRT1 的表达增加可激活 PGC-1 α ,从而调控线粒体功能,达到抗氧化、修复线粒体损伤的作用,进而提升机体或局部的抗氧化应激能力。本研究显示,SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平由低到高均为对照组、模型组、观察组。说明缺血再灌注导致了大鼠体内氧化应激反应,机体为抵抗氧化应激,海马组织线粒体内相关的抗氧化物质如 SIRT1、PGC-1 α 等蛋白表达上调。观察组乌司他丁可在机体抗氧化应激的基础上进一步提升 SIRT1、PGC-1 α 蛋白在海马组织中的表达水平,以增强脑组织抵抗氧化应激损伤的能力。

综上,乌司他丁可通过促进 SIRT1、PGC-1 α 蛋白在海马组织中的表达,达到抗氧化应激的作用,发挥保护大鼠缺血再灌注脑损伤的效果,值得进一步在临床试验中进一步探讨。

REFERENCES

- [1] EROĞLU O, DENİZ T, KISA Ü, et al. Effect of hypothermia on apoptosis in traumatic brain injury and hemorrhagic shock model[J]. *Injury*, 2017, 48(12): 2675-2682.
- [2] YANG G M, PENG X Y, ZHOU H J, et al. Roles of gap junctions and its connexins in vasopressin-induced vasoconstriction after hemorrhagic shock[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(1): 5-9.
- [3] 张世洪, 叶凯丽. 缺血性脑损伤神经保护剂应用现状与研究进展[J]. *内科理论与实践*, 2017, 12(2): 83-87.
- [4] LI L, HU H J, DIAO Y G. Protective effects of damage control resuscitation on global cerebral ischemia-reperfusion induced by hypothermia hemorrhagic shock in a rat model[J]. *Trauma Crit Care Med*(创伤与急危重病医学), 2019, 7(2): 82-84, 87.
- [5] YAO Y T, FANG N X, LIU D H, et al. Ulinastatin reduces postoperative bleeding and red blood cell transfusion in patients undergoing cardiac surgery: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(7): e19184. Doi: 10.1097/MD.00000000000019184.
- [6] LI X F, ZHANG X J, ZHANG C, et al. Ulinastatin protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin proteins in mice[J]. *Exp Neurol*, 2018(302): 68-74.
- [7] ZHAO C M, MENG L N, CHEN J L, et al. Effect of

- ulinastatin upon inflammation and TLR4/NF- κ B signaling pathway in ulcerative colitis rats model[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(3): 347-351.
- [8] LIU S Y, XU J F, GAO Y Z, et al. Multi-organ protection of ulinastatin in traumatic cardiac arrest model[J]. World J Emerg Surg, 2018(13): 51. Doi: 10.1186/s13017-018-0212-3.
- [9] HOSOO H, MARUSHIMA A, NAGASAKI Y, et al. Neurovascular unit protection from cerebral ischemia-reperfusion injury by radical-containing nanoparticles in mice[J]. Stroke, 2017, 48(8): 2238-2247.
- [10] ZOU S, ZHANG M X, FENG L M, et al. Protective effects of notoginsenoside R1 on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6): 6012-6016.
- [11] CHE N, MA Y J, XIN Y H. Protective role of fucoidan in cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway[J]. Biomol Ther, 2017, 25(3): 272-278.
- [12] ZHANG Q L, LI S Y, SUN Y, et al. Correlation between oxidative stress and neurological function scores, and neurological recovery in patients with ischemic stroke[J]. Mod Med J(现代医学), 2019, 47(3): 287-291.
- [13] YANG H, GU Z T, LI L, et al. SIRT1 plays a neuroprotective role in traumatic brain injury in rats via inhibiting the p38 MAPK pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(2): 168-181.
- [14] RAO S P, SHARMA N, KALIVENDI S V. Embelin averts MPTP-induced dysfunction in mitochondrial bioenergetics and biogenesis via activation of SIRT1[J]. Biochim et Biophys Acta BBA-Bioenerg, 2020, 1861(3): 148157. Doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148157.
- [15] DONG W G, QUO W, WANG F, et al. Electroacupuncture upregulates SIRT1-dependent PGC-1 α expression in SAMP8 mice[J]. Med Sci Monit, 2015(21): 3356-3362.
- 收稿日期: 2020-02-28
(本文责编: 沈倩)