

乌司他丁减轻老年大鼠髋部骨折后肺损伤程度的实验研究*

赵小丹, 刘浩[△], 李涛, 龚全, 张闻力

四川大学华西医院 骨科 (成都 610041)

【摘要】 目的 探讨乌司他丁减轻髋部骨折后肺损伤的作用及相关机制。**方法** 将24只10月龄SD大鼠随机分为对照组、实验组及干预组,每组8只,后2组制成左侧髋部骨折,其中干预组在造模前给予尾静脉注射乌司他丁50 000 U/kg。造模24 h后处死各组大鼠,检测各组实验动物血清中线粒体DNA(mtDNA)水平,肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平,肺组织中toll样受体-9(TLR9)、转录因子NF- κ B表达水平,肺组织干湿质量比(W/D)、病理评分情况。**结果** 实验组大鼠血清中mtDNA水平,肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6水平,肺组织中TLR9、NF- κ B表达水平,肺组织W/D、病理评分情况均高于对照组($P<0.05$);干预组大鼠血清中mtDNA水平,肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6水平,肺组织中TLR9、NF- κ B表达水平,肺组织W/D、病理评分情况均较实验组下降($P<0.05$),但均未恢复至对照组水平($P<0.05$)。**结论** 乌司他丁可能通过减少髋部骨折释放的mtDNA,进而降低肺组织中TLR9、NF- κ B表达及下游的炎症因子水平,最终达到保护肺功能的作用。

【关键词】 髋部骨折 肺损伤 线粒体DNA 炎症因子 TLR9 NF- κ B

Protective Effect and Its Possible Mechanism of Ulinastatin on Lung Injury Induced by Hip Fracture ZHAO Xiaodan, LIU Hao[△], LI Tao, GONG Quan, ZHANG Wen-li. Department of Orthopedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: liuhao6304@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and its possible mechanism of ulinastatin on lung injury caused by hip fracture. **Methods** Total 24 SD rats were randomly divided into control, hip fracture and hip fracture+ulinastatin groups ($n=8$). The rats of hip fracture and hip fracture+ulinastatin groups made the left hip fracture. The tail vein of rats of hip fracture+ulinastatin group were injected with 50 000 U/kg ustodin before made fracture model. Killed rats 24 h after mold building. Serum mtDNA, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6 in bronchoalveolar lavage fluid, Toll like receptor-9 (TLR9) and nuclear factor (NF)- κ B protein expression in lung tissue, wet/dry ratio and pathological scores of lung were detected in all three groups. **Results** Serum mtDNA, TNF- α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid, TLR9 and NF- κ B protein expressions in lung tissue, wet/dry ratio and pathological scores of lung in hip fracture group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). Ulinastatin significantly reduced the levels of serum mtDNA, TNF- α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid, TLR9 and NF- κ B protein expressions in lung tissue, as well as wet/dry ratio and pathological scores of lung ($P<0.05$). **Conclusion** Ulinastatin might could provide protection on lung injury in hip fracture, and mtDNA-TLR9-NF- κ B pathway may play the role of reducing inflammatory level in the process.

【Key words】 Hip fracture Lung injury Mitochondrial DNA Inflammatory mediators Toll like receptor-9 NF- κ B

老年髋部骨折指60岁以上人群发生在股骨头关节面和小粗隆以下5 cm之间的骨折,主要包括股骨颈骨折或股骨粗隆间骨折^[1-2]。随着医疗水平的提高及生活环境的改善,人类平均寿命不断延长,全球逐渐进入老龄化社会;加之老年人骨质退化、骨质疏松、髋部肌肉松弛等原因,轻微的能量过载也能导

致髋部骨折^[1],所以老年髋部骨折的发病率逐年增加。即使接受手术治疗,老年髋部骨折患者的预后也较差^[3-5],而髋部发生骨折后引起的肺部并发症是导致死亡的主要原因^[5]。但目前尚无治疗髋部骨折引起肺部并发症的有效手段。

最新的研究显示,髋部骨折后释放线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)刺激机体产生炎症反应可能是引起急性肺损伤的机制之一^[6]。乌司他丁是临床常用的抗炎药物之一,其具有稳定线粒体膜及

* 教育部博士点新教师类基因(No. 20110181120041)和四川省卫生厅科研项目(No. 080280)资助

[△] 通信作者, E-mail: liuhao6304@163.com

保护线粒体的作用^[7]。那么,乌司他丁是否能降低老年髋部骨折后 mtDNA 水平及炎症水平,从而减轻肺损伤程度?目前国内尚无乌司他丁治疗髋部骨折后肺损伤的研究,本研究将探讨乌司他丁治疗老年髋部骨折后肺损伤的作用以及可能相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立

24只10月龄清洁级雄性SD大鼠(平均体质量500g),统一由四川大学实验动物中心提供并饲养于带有空气过滤装置和置于层流柜内的塑料笼内。随机分成3组:正常对照组(8只);实验组(8只,建立髋部骨折模型);干预组(8只,建立髋部骨折模型前一次性给予尾静脉注射乌司他丁50 000 U/kg^[8])。

髋部骨折大鼠模型建立方法:10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,麻醉后将大鼠仰卧位置于自制骨折打击器底板,左下肢置于砧板上,采用钢板垫高下肢使其与水平面保持平行以使髋关节处于伸直位,C臂透视下使大鼠下肢外旋,让髋关节处于正位时固定,然后在C臂引导下使打击器尖端与大鼠粗隆间连线保持一致,使500g砝码从17cm高处自由落下,造成左侧髋部骨折^[6]。术后大鼠恢复苏醒后入笼继续常规饲养。

1.2 标本采集方法

造模24h后处死各组大鼠留取血液、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及肺组织样本。留取2mL血液,经高速(3 000 r/min)离心15min后取上清,存于-80℃冰箱中。BALF留取方法:处死动物后,暴露气管及肺部,结扎右主支气管,左肺插入套管针固定,以2mL生理盐水注入气管,轻轻按摩左肺,抽回灌洗液体,如此反复3次,得到4.5mL BALF。肺组织留取方法:取出右上肺置入体积分数4%多聚甲醛溶液中保存24h,常规石蜡包埋后切片(6μm),二甲苯脱蜡,用体积分数100%酒精、90%酒精、80%酒精依次浸泡2min后,再先后用苏木素染色10min和伊红染色2min。然后将切片依次用100%酒精、90%酒精、80%酒精再次浸泡3min,接着用二甲苯处理5min后,树胶封片,Olympus CAST系统拍照;同时取出右下肺冻存于-80℃超低温冰箱,一月内行Western blot检测。

1.3 血清 mtDNA 及 BALF 中炎症因子检测方法

使用DNA提取试剂盒(#69504, Qiagen,

USA)提取BALF中的DNA。按照秦超毅等^[9]建立的PCR体系检测BALF中mtDNA水平,mtDNA引物上游为:5'-CAATACCCACCCCTTATC-3',下游为:5'-GAGGCTCATCCCGATCATAG-3';利用十倍稀释梯度的携带mtDNA的质粒(SC101172, ORIGENE, USA)建立标准曲线,mtDNA的浓度使用标准转换系统转换成拷贝数(<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>),最后得出血单位体积内mtDNA的拷贝数代表循环mtDNA水平。

严格按照说明书操作,采用ELISA试剂盒(索莱宝,北京)检测BALF中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)等炎症因子水平。

1.4 Western blot 法检测肺组织中 toll 样受体-9 (TLR9)、转录因子 NF-κB 蛋白水平

将1mL裂解缓冲液加入冰冻肺组织(50mg),冰上匀浆,4℃下12 000 r/min离心10min,留取血清通过BCA试剂盒测定蛋白含量。取蛋白质样品40μg,使用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分别进行转膜、封闭,1:1 000 TLR9、NF-κB抗体(Abcam,美国)4℃孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育1h,曝光显影得到条带后进行分析。分别取TLR9、NF-κB与内参GAPDH灰度值的比值代表蛋白表达量。

1.5 肺组织干湿质量比(W/D)

处死动物后,取右肺中叶组织称质量,放入60℃恒温烤箱中72h至恒重后再次称质量,两次质量之比即为肺组织W/D。

1.6 肺组织损伤评分标准

将肺病理切片行HE染色,置于显微镜下观察,对肺泡、间质炎性改变、出血、肺不张和肺水肿等方面进行评分,正常为0分、轻度改变为1分、中度改变为2分、重度改变为3分,每张病理切片均由两位有经验的病理医师双盲评分,观察5个高倍视野,取平均值即得肺组织损伤评分^[10]。

1.7 统计学方法

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清中 mtDNA 水平

实验组BALF中mtDNA水平高于对照组[(818.74 ± 164.57) copies/μL vs. (113.61 ± 23.24) copies/μL, $P < 0.05$]和干预组[(521.43 ±

83.53) copies/ μ L, $P<0.05$]。

2.2 各组大鼠 BALF 中炎症因子水平

实验组大鼠 BALF 中 TNF- α 水平高于对照组 [(55.94 $\pm$ 9.23) pg/mL vs. (15.52 $\pm$ 2.68) pg/mL, $P<0.05$] 和干预组 [(36.27 $\pm$ 5.74) pg/mL, $P<0.05$]; 实验组大鼠 BALF 中 IL-6 水平高于对照组 [(155.23 $\pm$ 20.28) pg/mL vs. (14.29 $\pm$ 2.72) pg/mL, $P<0.05$] 和干预组 [(91.52 $\pm$ 15.74) pg/mL, $P<0.05$]。干预组上述因子均高于对照组 ($P<0.05$)。

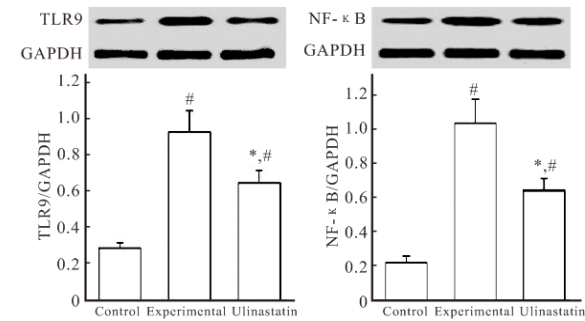


图 1 各组大鼠肺组织中 TLR9 及 NF- κ B 表达情况
Fig 1 The levels of TLR9 and NF- κ B protein expressions in lung tissues

$P<0.05$, vs. control group; * $P<0.05$, vs. experimental group

2.3 各组大鼠肺组织 TLR-9 及 NF- κ B 的表达

如图 1 所示,实验组肺组织中 TLR-9 和 NF- κ B 的表达水平高于对照组和干预组 ($P<0.05$); 干预组 TLR-9、NF- κ B 均较对照组高 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠肺组织损伤情况

如图 2 所示,实验组肺 W/D 及肺病理评分高于对照组和干预组 ($P<0.05$)。干预组 W/D 和肺病理评分均未恢复至对照组水平 ($P<0.05$)。如图 3 所示,实验组较对照组肺组织出现肺泡壁组织水肿、肺间质出血以及中性粒细胞浸润等典型肺损伤

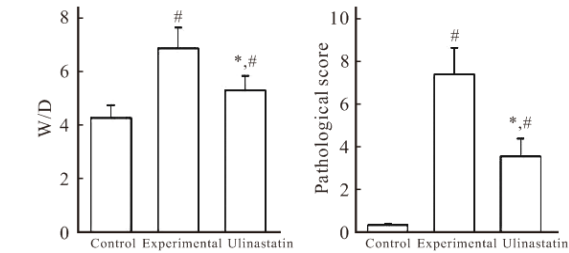


图 2 各组大鼠 W/D 及病理评分比较
Fig 2 W/D and pathological scores of lung tissues

$P<0.05$, vs. control group; * $P<0.05$, vs. experimental group

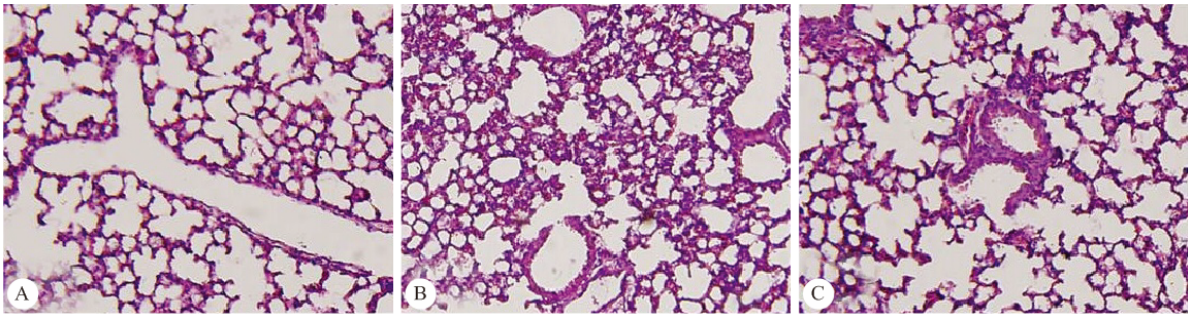


图 3 各组大鼠肺病理改变情况。HE $\times 40$
Fig 3 Pathological changes in lung tissues. HE $\times 40$
A: Control group; B: Experimental group; C: Ulinastatin group

的病理结构改变,干预组肺组织病理损伤程度较实验组显著改善。

3 讨论

线粒体是真核细胞中十分重要的细胞器之一,有学者认为其由真核祖细胞吞入细菌共生进化而来^[11],当细胞出现机械性损伤或者受到刺激后降解,线粒体中的遗传物质(mtDNA)可从细胞进入血液循环^[12]。本研究结果发现髋部骨折后大鼠循环

中 mtDNA 水平高于对照组,说明髋部骨折这一机械损伤过程可能导致骨折处细胞发生降解或破坏,细胞内线粒体稳定性变差,mtDNA 通过线粒体膜和细胞膜,最终导致 mtDNA 释放进入实验动物血液循环。由于 mtDNA 与细菌 DNA 同源,其具有与细菌 DNA 类似的大量未甲基化 CpG DNA 序列,可引起与细菌感染类似的炎症反应^[12]。ZHANG 等^[13]通过建立休克动物模型,发现休克可引起实验动物循环中 mtDNA 水平增加,继而激活

TLR9 等信号通路导致炎症反应。GAN 等^[6]研究也发现,髌部骨折后释放的 mtDNA 可能通过激活 TLR9 和 NF- κ B 继而引起炎症反应的产生。本研究结果显示,髌部骨折大鼠肺组织中 TLR9 及 NF- κ B 蛋白表达增加,BALF 中 TNF- α 及 IL-6 等炎症因子也高于对照组大鼠,说明髌部骨折大鼠体内升高的炎症反应水平、肺组织中表达升高的 TLR9 及 NF- κ B 可能与 mtDNA 释放有关。本研究结果还发现,髌部骨折大鼠肺 W/D、肺组织病理评分均较对照组高,这与既往研究结果类似^[6]。实验动物 BALF 中升高的炎症因子水平、肺组织中过表达的 TLR9 和 NF- κ B 都可能是肺出现病理性改变的原因。由此,我们认为髌部骨折释放 mtDNA 入血,mtDNA 刺激肺组织中 TLR9、NF- κ B 蛋白表达增加以及 BALF 中炎症因子水平升高,继而导致大鼠肺出现病理性改变。

乌司他丁是从尿液中分离出来的一种糖蛋白,具有广谱的酶抑制作用;与此同时,它还能稳定线粒体膜,并且抑制多种炎症细胞因子(包括 TNF- α 、IL-6)表达的上调^[8,14-15]。本研究结果显示,乌司他丁降低了老年髌部骨折大鼠血清中 mtDNA 表达水平,抑制了老年髌部骨折大鼠肺组织中 TLR9 及 NF- κ B 的表达水平,减少了 BALF 中 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达,最终减轻了老年髌部骨折大鼠肺的病理性损伤程度。这可能与乌司他丁具有保护线粒体膜功能,减少 mtDNA 释放,继而减少下游 TLR9-NF- κ B-炎症因子通路表达水平有关。

本研究首次发现乌司他丁可能通过减少 mtDNA 释放入血,对髌部骨折后肺损伤发挥保护作用。这为降低髌部骨折后肺损伤程度提供了一种新的治疗思路,但本研究亦发现乌司他丁的保护力度有限,且缺乏阻断 mtDNA 表达的设计和实验数据,有待进一步完善。

参 考 文 献

- [1] REEVE J, LOVERIDGE N. The fragile elderly hip: mechanisms associated with age-related loss of strength and toughness. *Bone*, 2014, 61: 138-148 [2014-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.12.034>.
- [2] 范卫民. 老年髌部骨折的再思考. *中华创伤骨科杂志*, 2015, 17(2):93-94.
- [3] ROCHE JJ, WENN RT, SAHOTA O, *et al.* Effect of comorbidities and postoperative complications on mortality after hip fracture in elderly people: prospective observational cohort study. *BMJ*, 2005, 331 (7529): 1374 [2005-12-10]. <https://doi.org/10.1136/bmj.38643.663843.55>.
- [4] LIN JC, LIANG WM. Mortality and complications after hip fracture among elderly patients undergoing hemodialysis. *BMC Nephrol*, 2015, 16: 100 [2015-06-07]. <http://bmcnephrol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12882-015-0099-0>. doi:10.1186/s12882-015-0099-0.
- [5] VESTERGAARD P, REJNMARK L, MOSEKILDE L. Increased mortality in patients with a hip fracture-effect of pre-morbid conditions and post-fracture complications. *Osteoporos Int*, 2007, 18(12):1583-1593.
- [6] GAN L, CHEN X, SUN T, *et al.* Significance of serum mtDNA concentration in lung injury induced by hip fracture. *Shock*, 2015, 44(1):52-57.
- [7] MASUDA T, SATO K, NODA C, *et al.* Protective effect of urinary trypsin inhibitor on myocardial mitochondria during hemorrhagic shock and reperfusion. *Crit Care Med*, 2003, 31(7):1987-1992.
- [8] CUI T, ZHU G. Ulinastatin attenuates brain edema after traumatic brain injury in rats. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2):595-600.
- [9] 秦超毅, 古 君, 钱 宏, 等. 体外循环围手术期血液中线粒体 DNA 浓度变化. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2015, 22(3):241-244.
- [10] DEREJ J, MARTINS J, DE CAMPOS T, *et al.* Pentoxifylline attenuates lung injury and modulates transcription factor activity in hemorrhagic shock. *J Surg Res*, 2007, 143(1):99-108.
- [11] FRIEDMAN JR, NUNNARI J. Mitochondrial form and function. *Nature*, 2014, 505(7483):335-343.
- [12] ZHANG Q, RAOOF M, CHEN Y, *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010, 464(7285):104-107.
- [13] ZHANG Q, ITAGAKI K, HAUSER CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock*, 2010, 34(1):55-59.
- [14] LENG YX, YANG SG, SONG YH, *et al.* Ulinastatin for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. *World J Crit Care Med*, 2014, 3(1):34-41.
- [15] 施贤清, 王宇辉, 李建权, 等. 不同剂量乌司他丁对体外循环术后肺保护的临床研究. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(5):752-755.

(2017-04-03 收稿, 2017-08-28 修回)

编辑 汤 洁