

• 论著 •

氨基胍对失血性休克兔血流动力学和一氧化氮的影响

高治平 廖端芳 李波平 刘德平 刘建芝 唐朝克

【摘要】 目的 观察氨基胍(AG)在失血性休克复苏中的作用机制。方法 采用股动脉放血法复制家兔失血性休克模型,将 20 只家兔随机均分为生理盐水复苏对照组和 AG 复苏组;用 Pclab 生物信号采集系统分别记录休克前、休克 30 min、休克 150 min、复苏 30 min、复苏 180 min 的血流动力学参数,并用硝酸还原酶法测定相应时间点的血清一氧化氮(NO)水平。结果 两组复苏前动脉收缩压(SAP)、心率(HR)、平均动脉压(MAP)、左心室收缩压(LVSP)、心室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dt \max$)等血流动力学参数与血清 NO 含量比较差异均无统计学意义。与休克前比较,两组休克 30 min 和 150 min 血流动力学参数显著下降,NO 含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。复苏后,两组均能改善失血性休克家兔血流动力学参数,同时 AG 复苏能显著降低失血性休克家兔血清 NO 含量,而生理盐水复苏不能阻断血清 NO 升高;两组比较,AG 具有更持久、更有效的抗失血性休克作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 氨基胍能改善失血性休克家兔血流动力学参数,降低血清 NO 水平,从而起到抗失血性休克作用。

【关键词】 失血性休克; 氨基胍; 血流动力学; 诱生型一氧化氮合酶; 一氧化氮

Effect of aminoguanidine on hemodynamics and nitrogen monoxide in hemorrhagic shock in rabbit GAO Zhi-ping*, LIAO Duan-fang, LI Bo-ping, LIU De-ping, LIU Jian-zhi, TANG Chao-ke. * Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China
Corresponding author: TANG Chao-ke (Email: tchaoke@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of aminoguanidine (AG) on hemodynamics and nitric oxide (NO) in hemorrhagic shock in rabbit. **Methods** Shock was produced in twenty rabbits by femoral artery blood letting, and they were randomly divided into two groups with treatment with saline (control group) or AG (each $n = 10$). Pclab system and nitric acid reductase methods were performed to detect hemodynamics parameters and NO levels at preshock, postshock (30 minutes and 150 minutes) and 30 minutes and 180 minutes after resuscitation respectively. **Results** No significant differences were observed in hemodynamics parameters and NO levels between the two groups before resuscitation. Whereas after resuscitation, hemodynamics parameters such as systolic arterial pressure (SAP), heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), left ventricular systolic pressure (LVSP) and the max and minimum first derivative of left ventricular pressure ($\pm dp/dt \max$) were all improved greatly in the two groups. AG decreased serum NO level significantly, while saline did not have such effect, suggesting that AG had a longer and more efficient effect against hemorrhagic shock ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** AG can improve hemodynamics parameters and decrease NO level in hemorrhagic shock in rabbit.

【Key words】 hemorrhagic shock; aminoguanidine; haemodynamics; inducible nitric oxide synthase; nitric oxide

内皮源性舒张因子一氧化氮(NO)是机体多种病理生理过程的信使与效应分子。研究表明,失血性休克(HS)发生后,体内显著增加的内皮素(ET)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-8等激活一氧化氮合酶(NOS),特别是激活诱生型一氧化氮合酶(iNOS),合成大量 NO,引起血管平滑肌细胞(VSMC)超极化,降低血管反应能力,扩张血

管平滑肌;对心肌细胞的负性肌力作用等抑制心血管功能,降低心肌收缩性能,引起顽固性低血压、心功能衰竭,甚至多器官功能衰竭^[1-2]。可以推测,应用 NOS 抑制剂消除过量 NO 带来的副作用,有望得到纠正 HS 的治疗效果。然而,应用非选择性 NOS 抑制剂虽然能增加平均动脉压(MAP),升高血压,但此作用维持时间较短,可能在抑制 iNOS 的同时,也抑制了神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性,引起全身血管收缩,减少了重要脏器的血液供应,降低了心排血量,严重影响了休克的预后^[3]。故本研究选用毒性低、具有选择性抑制 iNOS 活性的氨基胍(AG),从整体水平观察其对 HS 家兔血流动力学的影响,试图选择性消除

基金项目:湖南省教育厅基金资助项目(04C539)

作者单位:421001 湖南衡阳,南华大学药物药理研究所(高治平,廖端芳,李波平),机能实验中心(刘德平,刘建芝);心血管病研究所(唐朝克)

通讯作者:唐朝克,Email:tchaoke@yahoo.com.cn

作者简介:高治平(1958-),女(汉族),湖南省人,高级实验师,Email:gaozp58@yahoo.com.cn.

NO 的细胞毒作用,为 AG 抗 HS 提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验仪器与试剂: Pclab 生物信号采集系统(北京微信斯达科技公司,型号:Hc15200), YH-4 型生理压力传感器(国防科工委航天医学工程研究所)等; AG(美国 Sigma 公司)、戊巴比妥(上海化学试剂公司), NO 检测试剂盒(南京建成生物工程公司), 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物分组及休克模型复制: 健康家兔 20 只, 雌雄不拘, 体重 2.1~3.0 kg, 由本校实验动物部提供。实验前动物同步饲养 1 周, 定量进食, 自由饮水。用质量分数为 3% 的戊巴比妥按 30 mg/kg 静脉注射麻醉家兔, 自主呼吸, 仰卧位固定, 行颈部正中切开、右股三角切口术, 以及左颈总动脉、右股动脉分离与插管术, 左颈总动脉插管缓慢推进, 于心室收缩期进入心室腔, 并连接压力传感器与 Pclab 生物信号采集系统, 用于记录血流动力学参数; 右股动脉插管, 连接带有三通的不菌 100 ml 注射器, 便于放血、采血样、输液复苏, 以及血液回推维持休克血压, 术后静脉注射肝素(500 U/kg)体内抗凝。记录休克前血流动力学参数后, 以 3 ml/min 从股动脉放血, 待血压降至 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)停止, 通过血液再注入或继续放血的方法, 使血压稳定于 40 mm Hg 左右, 维持 150 min, 复制家兔 HS 模型。

1.3 实验动物分组与血流动力学参数测定: 复制 HS 模型后将动物按随机数字表法分为生理盐水对照组和 AG 复苏组, 每组 10 只。选择 Pclab 生物信号采集系统的血流动力学模块, 分别记录休克前、休克 30 min 和 150 min、复苏 30 min 和 180 min 的动脉收缩压(SAP)、心率(HR)、MAP、左心室收缩压(LVSP)、心室内压最大上升速率(+dp/dt max)、心室内压最大下降速率(-dp/dt max)等血流动力学参数。对照组在回输血液基础上输入等量生理盐

水; AG 组在回输血液后, 在输入等量生理盐水的同时注入 AG 20 mg/kg。

1.4 血样采集与 NO 的测定: 分别于休克前、休克 30 min 和 150 min、复苏 30 min 和 180 min 经股动脉采血, 并制备血清, 4℃保存备用; NO 测定采用硝酸还原酶法, 于 550 nm 处测定各组血清中 NO 稳定代谢产物 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻ 含量, 间接反映 NO 的多少, 与标准品对照, 含量以 μmol/L 表示。

1.5 统计学处理: 使用 SPSS 12.0 统计学软件包, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AG 对血流动力学的影响(表 1): 两组休克前血流动力学参数组间比较差异无统计学意义; 与休克前比较, 两组复苏前(休克 30 min 和 150 min) SAP、HR、MAP、LVSP、±dp/dt max 均明显降低, 差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。与休克时比较, 生理盐水复苏后 SAP、HR、MAP、LVSP、±dp/dt max 均明显升高, 差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01), 随着复苏时间的延长其改善血流动力学参数的效应有降低趋势; AG 复苏后 SAP、HR、MAP、LVSP、±dp/dt max 均显著升高, 差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。比较两组复苏后的血流动力学参数, 发现 AG 比生理盐水具有更强、更好的纠正低血压、加快 HR、增强心肌收缩力的效应。

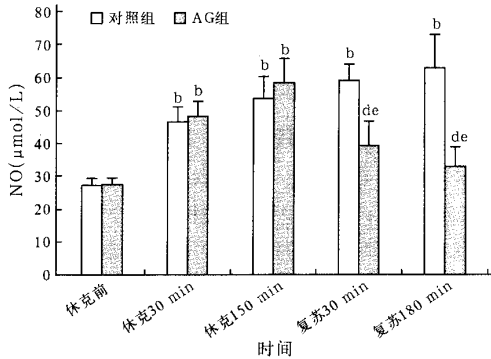
2.2 AG 对血清 NO 含量的影响(图 1): 两组动物在休克前、休克时 NO 含量比较差异无统计学意义; 休克 30 min 和 150 min NO 含量均较休克前显著增加(P 均<0.01)。对照组血清 NO 含量随着时间延长逐渐增加, 提示盐水复苏不能阻止休克家兔血清 NO 的增加。AG 组复苏 30 min 和 180 min 血清 NO 含量, 分别与休克 30 min 和 150 min 比较, 呈显著

表 1 AG 对 HS 家兔血流动力学的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	时间	SAP(mm Hg)	HR(次/min)	MAP(mm Hg)	LVSP(mm Hg)	+dp/dt max(mm Hg/s)	-dp/dt max(mm Hg/s)
对照组	休克前	110.08±11.56	302.82±18.57	77.51±7.86	122.89±12.11	6 335.88±604.32	4 945.36±812.12
	休克 30 min	40.22±0.61 ^b	194.54±7.91 ^b	30.57±0.67 ^b	53.95±3.87 ^b	3 729.72±414.56 ^b	2 216.64±206.45 ^a
	休克 150 min	41.62±0.56 ^b	175.63±11.32 ^b	31.05±0.86 ^b	55.43±1.69 ^b	2 798.77±212.68 ^b	1 898.24±189.32 ^b
	复苏 30 min	77.57±6.53 ^d	236.50±11.09 ^c	43.49±2.51 ^d	88.16±5.38 ^d	2 458.23±179.19 ^c	2 787.69±88.37 ^c
	复苏 180 min	69.24±4.27 ^d	221.75±15.20 ^d	39.42±1.96 ^d	86.51±2.30 ^d	2 234.99±347.49 ^c	2 198.46±128.10
AG 组	休克前	114.09±12.33	305.78±15.36	75.77±8.03	125.14±14.09	6 380.44±670.24	4 785.16±823.11
	休克 30 min	41.08±0.48 ^b	179.96±7.09 ^b	31.81±0.86 ^b	56.15±4.00 ^b	3 556.16±438.54 ^b	2 186.42±210.36 ^a
	休克 150 min	40.36±0.36 ^b	169.87±12.65 ^b	31.81±0.90 ^b	58.53±2.01 ^b	2 684.51±209.45 ^b	1 843.56±191.23 ^b
	复苏 30 min	102.05±12.81 ^{df}	257.25±18.62 ^c	56.41±4.64 ^{de}	101.92±3.02 ^{de}	4 429.74±113.76 ^{ef}	2 925.00±76.86 ^d
	复苏 180 min	93.06±3.21 ^{df}	266.75±9.91 ^{dc}	53.92±4.39 ^d	98.26±3.71 ^d	4 649.91±202.81 ^d	3 541.70±536.34 ^{ce}

注: 与本组休克前比较, ^aP<0.05, ^bP<0.01; 与本组休克 30 min 和 150 min 比较, ^cP<0.05, ^dP<0.01; 与对照组同期比较, ^eP<0.05, ^fP<0.01

降低趋势,并随着复苏时间延长进一步减少,差异有统计学意义(P 均 <0.01),提示AG复苏可明显逆转休克家兔血清NO含量急剧升高,并具有一定的时间依赖性效应。



注:与本组休克前比较,^b $P<0.01$;与本组休克30 min和150 min比较,^d $P<0.01$;与对照组同期比较,^c $P<0.01$

图1 AG对HS家兔血清NO含量的影响

3 讨论

有效循环血量不足引发血流动力学紊乱是HS的主要病理生理基础。HS发生后显著增加的ET、TNF- α 、IL-6、IL-8等炎症细胞因子主要激活的是iNOS^[4]。同时血流动力学异常造成的应切力改变可影响血管内皮、平滑肌细胞iNOS的表达^[5-6]。以适时补充血容量为基础,改善血管张力,增强心肌收缩能力是治疗HS的有效方法。Md等^[7]和Musser等^[8]研究显示,NO表达或iNOS活性增加均是HS平滑肌细胞反应性降低的关键因素之一。体内NOS有3种类型,生理条件下,仅有eNOS表达(而iNOS基本无表达),合成和释放的NO是调节血管张力的主要因素。但当机体发生创伤、休克、感染时,iNOS活性显著增加,合成大量的NO。过量产生的NO一方面刺激可溶性鸟苷酸环化酶增加环磷酸鸟苷(cGMP),同时激活钾通道引起VSMC的超极化,从而抑制电压依赖性钙通道的激活,减少细胞内钙浓度,降低VSMC收缩性能,使血压进一步下降,改变血流动力学状态^[9]。另一方面,过量的NO可以与能量代谢或抗氧化有关的酶失活,干扰能量代谢和DNA合成,与超氧阴离子反应,生成具有强氧化性的过氧化亚硝酸根(ONOO⁻),产生细胞毒性作用,损伤心肌细胞,影响心肌细胞收缩与舒张功能等。此外,在休克状态下eNOS活性受抑,使内皮依赖性NO释放减少,从而影响NO对正常生理功能的调节作用,加重了组织缺血。可见过量的NO是休

克后造成顽固性低血压的重要因素,应用NOS抑制剂消除NO对机体的损害,有望成为治疗HS的有效措施。杨梅梅等^[10]研究亦表明,抑制NOS活性、降低NO浓度,对HS和再灌注过程中的心肌损伤可能会起到一定的保护作用。

NOS抑制剂有对结构型一氧化氮合酶(cNOS,包括nNOS和eNOS)及iNOS均有抑制作用的L-硝基-精氨酸(L-NNA)和仅对iNOS具有抑制作用的AG等。有研究显示,在休克失代偿期,AG与血管紧张素II(Ang II)合用能减少NO毒性作用,显著增加失代偿期血管对Ang II的反应性^[11];AG抑制NO可能改善HS大鼠的病理生理学参数,增加成活率^[12]。本研究结果进一步表明,AG在明显降低HS家兔血清NO含量、有效消除NO细胞毒作用的同时,逆转HS引发的SAP、HR、MAP、LVSP、 $\pm dp/dt \max$ 等血流动力学参数改变,有较强的纠正低血压、加快HR、增强心肌收缩力效应。提示AG主要通过抑制iNOS活性、减少NO合成,以纠正HS的低血压来改善预后。

逆转血流动力学参数变化是判断药物对心血管功能和心肌收缩能力影响的全身性指标,对休克治疗与预后有着非常重要的指示作用^[13]。如能适时、适量、以适当速度补充血容量,纠正血流动力学紊乱,改善脏器灌注,是抗休克药物治疗发挥持久效应的基础与关键^[14]。本研究比较了休克发生150 min后单用生理溶液扩容与补液扩容同时加用AG的抗休克作用,由于生理盐水复苏仅有短暂的扩容作用,而加用iNOS抑制剂AG复苏,在一定程度上消除了NO带来的副作用,故其抗HS治疗作用更有效、作用时间更持久,具有一定的持续性与稳定性。

AG是一种选择性的iNOS抑制剂,而对cNOS仅有微弱的抑制作用;AG通过抑制NOS与L-精氨酸的结合以及抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原型辅酶II,NADPH)氧化酶活性,减少NO合成。因此,当HS发生后,iNOS表达显著增加,合成较多NO,产生血管扩张、心肌负性肌力作用等,导致心肌收缩力下降,可表现为SAP、MAP、LVSP、 $\pm dp/dt \max$ 的下降。而给予AG后选择性地抑制了iNOS活性,NO合成障碍,血管平滑肌细胞及心肌细胞收缩增强,心排量增加。且在减轻过量NO病理损害的同时,又未影响cNOS的活性,保证调节正常生理功能的NO合成,在一定程度上表现为SAP、MAP、LVSP、 $\pm dp/dt \max$ 等回升,更有利于纠正休克。

参考文献

- [1] 黄宗海,冯浩森,黄绪亮,等. 一氧化氮合酶抑制剂 L-精氨酸对创伤性休克大鼠存活率的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(1):45-48.
- [2] McDonald M, Abdelrahman M, Cuzzocrea S, et al. Tyrphostin reduces the organ injury in haemorrhagic shock: role of inducible nitric oxide synthase [J]. Resuscitation, 2003, 58(3):349-361.
- [3] Shirhan M, Moochhala S M, Siew Yang K L, et al. Preservation of neurological functions by nitric oxide synthase inhibitors in conscious rats following delayed hemorrhagic shock [J]. Life Sci, 2004, 76(6):661-670.
- [4] 李建国,胡正芳,杜朝晖,等. 胆碱能抗炎通路对失血性休克大鼠保护作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1):24-27.
- [5] Gosgnach W, Messika-Zeitoun D, Gonzalez W, et al. Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(6):C1880-C1888.
- [6] Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, et al. Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium [J]. Hypertens Res, 2004, 27(2):93-99.
- [7] Md S, Moochhala S M, Siew-Yang K L. The role of inducible nitric oxide synthase inhibitor on the arteriolar hyporesponsiveness in hemorrhagic-shocked rats [J]. Life Sci, 2003, 73(14):1825-1834.
- [8] Musser J B, Bentley T B, Griffith S, et al. Hemorrhagic shock in swine: nitric oxide and potassium sensitive adenosine triphosphate channel activation [J]. Anesthesiology, 2004, 101(2):399-408.
- [9] 刘良明,李萍,刁有芳,等. ICI174,864 对失血性休克大鼠全身及局部血管反应性变化的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1):16-19.
- [10] 杨红梅,王黎,陈洁,等. 失血性休克复苏时心肌损伤和一氧化氮的变化及灵芝多糖的干预作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(5):304-306.
- [11] Shirhan M, Moochhala S M, Kerwin S Y, et al. Influence of selective nitric oxide synthetase inhibitor for treatment of refractory haemorrhagic shock [J]. Resuscitation, 2004, 61(2):221-229.
- [12] Md S, Moochhala S M, Siew Yang K L, et al. The role of selective nitric oxide synthase inhibitor on nitric oxide and PGE₂ levels in refractory hemorrhagic-shocked rats [J]. J Surg Res, 2005, 123(2):206-214.
- [13] Martini L, Fini M, Giavaresi G, et al. Haemodynamic and volumetric monitoring during haemorrhagic shock in swine [J]. Resuscitation, 2001, 51(1):69-76.
- [14] Atan M S, Moochhala S M, Ng K C, et al. Effects of aminoguanidine and L-arginine methyl ester resuscitation following induction of fluid-percussion injury and severe controlled hemorrhagic shock in the rat brain [J]. J Neurosurg, 2004, 101(1):138-144.

(收稿日期:2007-11-29 修回日期:2008-02-18)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

第八次全国抗菌药物临床规范应用与新进展研讨会征文与报名通知

为了进一步规范抗菌药物的合理应用,降低不良反应,减少药源性疾病的发生,中华医学会继续教育部经研究决定于 2008 年 4 月中旬在云南昆明、6 月下旬在北京召开第八次全国抗菌药物临床规范应用与新进展研讨会。国家级继教项目编号:2008-13-01-038,10 学分。

1 昆明会议报到日期为 4 月 11 日;会议日期为 4 月 12—18 日;地点为齐宝大酒店(昆明市穿金路 156 号,准四星级);电话:0871-5628888 总机转。

北京会议报到日期为 6 月 27 日;会议日期为 6 月 28—30 日;地点为众品鑫大酒店(复兴路 26 号院,解放军总医院正门往东 150 m,四星级);电话:010-66854771(总台),66854029(总机)。

2 会议期间举办高级学习班,拟邀请专家有:复旦大学华山医院汪复、张婴元教授;北京协和医院王爱霞、徐英春教授;首都医科大学友谊医院王汝龙教授;北京大学临床药理研究所肖永红教授;北京医院张秀珍教授等。

3 授课主要内容:抗菌药物的临床药理学;抗菌药物用药原则、用药指征,用药品种剂量疗程及给药方案,预防用药;抗菌药物应用的分级管理;各类抗菌药物的临床应用进展;各类常见疾病的感染诊疗进展;抗菌药物的临床应用误区;特殊人群(妊娠与哺乳期、儿童、老年、免疫功能低下、肝肾功能不全)感染的抗菌药物合理应用;细菌耐药监测及难治性病原菌监测与抗菌药物选择方案;深部真菌感染诊治中的问题及用药策略;微生物实验室质控、微生物培养与耐药监测、药敏分析。

4 征文内容与要求:各类抗菌药物临床应用,临床各科微生物感染诊断与治疗,抗菌药物不良反应,微生物检测与药敏等内容。全文在 2 000 字左右论文 1 份,或只寄 600 字左右摘要 1 份,论文题目下注明省市、工作单位、科室、姓名及邮编。自留底稿,恕不退回。

5 来稿请寄:100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“昆明抗菌会议”或“北京抗菌会议”,梁鸿收,Email: jxjy@vip.163.com, Email 发稿时务必注明“昆明抗菌会议”或“北京抗菌会议”字样。征文截止日期:昆明会议邮局寄稿为 3 月 26 日前,Email 发稿为 4 月 1 日前;北京会议邮局寄稿为 6 月 6 日前,Email 发稿为 6 月 18 日前。

6 每位参会代表需交纳会务费 980 元,住宿费昆明会议每人每天 120 元左右,北京会议每人每天 130 元左右。

7 联系人及电话:杨桂芳 010-51798200(带传真),88820399;梁鸿:010-85158402。

(中华医学会继续教育部)