

• 论著 •

1,6-二磷酸果糖和地塞米松对家兔失血性休克缺血-再灌注损伤的影响

陈永权 金孝岷 汤荣华 黄文斌 陶青松 王邦安

【摘要】 目的 在家兔失血性休克模型上,探讨心肌缺血-再灌注损伤机制,比较 1,6-二磷酸果糖(FDP)和地塞米松(DXM)对心肌缺血-再灌注的保护作用。**方法** 按照 Wiggers 改良法制作兔失血性休克模型。48 只家兔随机分成 3 组:Ⅰ组为对照组;Ⅱ组为休克前给药组(又分为 FDP Ⅰ、DXM Ⅰ及 FDP Ⅰ+DXM Ⅰ3 组);Ⅲ组为再灌注时给药组(又分为 FDP Ⅱ和 DXM Ⅱ2 组)。观察血浆肌酸激酶(CK)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)含量及心肌细胞凋亡情况。**结果** 各组 CK、cTnI 基础值均无统计学差异;与对照组相比,Ⅱ组 CK、cTnI 及心肌细胞凋亡指数下降或明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Ⅲ组在休克时间点均无统计学意义,而再灌注时间点有下降或下降趋势,有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 FDP Ⅱ和 DXM Ⅱ组相比,FDP Ⅰ和 DXM Ⅰ组的 CK 和 cTnI 上升幅度均有减慢趋势,以 FDP 组减慢趋势更加明显;休克给药组间比较,FDP Ⅰ+DXM Ⅰ组的 CK 和 cTnI 上升幅度均减慢。**结论** FDP 和 DXM 对失血性休克引起的缺血-再灌注损伤均有保护作用,但 FDP 仅在缺血开始给药才能充分发挥其效应,二者联合用药对心肌保护有更好的效果。

【关键词】 休克,失血性; 缺血-再灌注,心肌; 1,6-二磷酸果糖; 地塞米松; 家兔

中图分类号:R605.971;R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-0603(2004)01-0029-04

Effect of fructose-1,6-diphosphate and dexamethasone on ischemia/reperfusion injury after hemorrhagic shock in rabbits CHEN Yong-quan*, JIN Xiao-ju, TANG Rong-hua, HUANG Wen-bin, TAO Qing-song, WANG Bang-an. * Yijishan Hospital, College of Wannan Medical, Wuhu 241001, Anhui, China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of myocardial ischemia/reperfusion injury and the protective effect of fructose-1,6-diphosphagic(FDP) and dexamethasone(DXM) in hemorrhagic shock in rabbits. **Methods** Using a hemorrhagic shock model of Wiggers, 48 rabbits were randomly divided into 6 groups. Group I control group; Group II with drugs given before ischemia phase (divided into 3 groups: FDP I, DXM I and FDP I + DXM I); Group III with drugs given in reperfusion phase (divided into 2 groups: FDP II and DXM II). The levels of creatine kinase(CK) and troponin I(cTnI) in plasma were measured, and myocyte apoptosis index was assessed. **Results** Baseline levels of CK and cTnI were similar in three groups;CK and cTnI and apoptosis index were lower or with a lower tendency in group II and in group III ($P<0.05$ or $P<0.01$); CK and cTnI showed a lower tendency in rise in FDP I and DXM I than in FDP II and even slower in FDP group than in DXM group; CK and cTnI levels rose slower in FDP I+DXM I than in FDP I and DXM I. **Conclusion** FDP given during ischemia and DXM could effectively protect the myocardium from reperfusion injury following hemorrhagic shock.

【Key words】 hemorrhagic shock; ischemia/reperfusion injury; fructose-1,6-diphosphate; dexamethasone; rabbit

CLC number:R605.971;R965

Document code:A

Article ID:1003-0603(2004)01-0029-04

研究采用家兔失血性休克模型,检测血浆中肌酸激酶(CK)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的含量及标记心肌细胞凋亡,观察 1,6-二磷酸果糖(FDP)和地塞米松(DXM)对心肌代谢和细胞凋亡的影响,并分析其作用机制及给药时机,探讨 FDP 和 DXM 在失血性休克对心肌缺血-再灌注损伤中的保护作用。

基金项目:安徽省高等学校青年教师科研计划项目(2002jq161)

作者单位:241001 芜湖,皖南医学院弋矶山医院(陈永权,金孝岷,汤荣华,陶青松);皖南医学院(黄文斌,王邦安)

作者简介:陈永权(1967-),男(汉族),安徽省芜湖市人,麻醉学硕士,主治医师。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:健康大耳白兔 48 只,雌雄兼有,体质量 2.0~3.0 kg,由皖南医学院动物中心提供。全组均建立失血性休克模型,随机分为:①假手术对照组;②休克前给药组:从兔颈总动脉放血开始前分别静脉注入 FDP 500 mg/kg(FDP Ⅰ组)和 DXM 4 mg/kg(DXM Ⅰ组)及 FDP 500 mg/kg+DXM 4 mg/kg(FDP Ⅰ+DXM Ⅰ组);③再灌注给药组:回输兔自体肝素化血时,分别给予 FDP 500 mg/kg(FDP Ⅱ组)和 DXM 4 mg/kg(DXM Ⅱ组)。

1.2 模型建立:戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,

分离左颈总动脉和右颈外静脉,并插管接三通管。全身肝素化(3 mg/kg)后,从颈总动脉放血,使平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg,达到休克状态并持续 60 min。再灌注时各组回输自体肝素化血,并适当补液逐渐维持 MAP 在原基础水平。

1.3 标本采集与指标检测:各组均于休克前、休克 60 min 及再灌注后 30、60 和 120 min 经颈总动脉取血 2 ml,离心分离血浆,测定 CK 及 cTnI;再灌注后 4 h 处死动物,取心脏常规制作切片,用 DNA 缺口末端标记法(TUNEL)标记凋亡细胞,测定心肌细胞凋亡指数(AI)。计算方法:每张切片随机在 40 倍物镜下取 5 个视野,每组共 40 个视野,目镜方格测微尺方格面积为 0.09 m²,每个视野取一个方格为测试格,分别计数各组在测试格内的凋亡指数。

本研究采用的 1,6-二磷酸果糖为山东新华股份有限公司制药厂制造;血浆 cTnI 测定采用天津九鼎生物制品研究所提供的试剂盒,应用半定量分析测定;血浆 CK 测定采用上海申能-德赛诊断技术有限公司提供的试剂盒,应用比色法测定;心肌细胞凋亡免疫组织化学染色采用武汉博士德生物工程有限公司提供的试剂盒。

1.4 统计学处理:试验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据用 SPSS10 软件包处理,组间比较用

方差分析,组内比较用配对 *t* 检验,*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 FDP和DXM对失血性休克动物CK和cTn I 的影响:各组 CK、CTnI 的基础值比较均无统计学差异。从表 1 可以看出,随着再灌注后时间的延长,除 FDP I +DXM I 组变化不明显外,其它各组的 CK、CTnI 均逐渐升高(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。与对照组相比,各休克给药组的 CK 和 CTnI 有统计学意义(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),而再灌注给药组在休克时间点虽无统计学差异(*P* 均 > 0.05),在再灌注各时间点却有统计学意义(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);FDP I 和 DXM I 组分别与 FDP II 和 DXM II 组比较,CK 和 CTnI 上升幅度均有减慢趋势,但 FDP 组减慢趋势更加明显;休克给药组间比较,FDP I + DXM I 的 CK 和 CTnI 的上升幅度均减慢。

2.2 凋亡心肌细胞检测:TUNEL 结果显示,胞核呈深棕色反应的阳性凋亡心肌细胞,核固缩,染色质聚边,胞浆不显色,休克前联合给予 FDP 和 DXM 减轻细胞凋亡的程度较单用 FDP 和 DXM 为显著(见图 1~6)。从表 2 结果也可以看出,实验组各组与对照组细胞凋亡指数相比有下降趋势,其中联用 FDP 和 DXM 组下降更为显著(*P* < 0.01)。

表 1 各组 CK 及 cTn I 浓度变化($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Changes of CK and cTn I in every group rabbits($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	基础值	失血性休克时	再灌注后(min)		
				30	60	120
CK(U/L)	对照组	465± 92	625±134	1 185±325★★	1 407±364★★	1 587±317★★
	FDP I	443±218	455±138	555±206#	792±273*	700±240*##
	FDP II	421±160	623±257	1 198±366*△	1 057±348*△	887±234*###
	DXM I	476±140	494±137#	564±130#	808±241*###	760±170*##
	DXM II	439± 87	535±165	678±156*###	773±114*###	786±125*###
	FDP I +DXM I	466±178	469±95#	537±179#	672±208#★	585±128#
	FDP I +DXM II	466±178	469±95#	537±179#	672±208#★	585±128#
cTnI(μg/L)	对照组	1.71±0.62	3.52±0.84★★	7.87±1.50★★	14.21±2.16★★	14.86±2.13★★
	FDP I	1.47±0.36	2.36±1.03	3.12±1.08*★	2.94±0.73*###	1.94±0.67#
	FDP II	1.88±0.90	3.97±1.09*△	4.40±1.75*	3.05±1.05*##	2.84±0.85#
	DXM I	1.64±0.88	2.19±0.98#	2.87±0.58*###	3.21±0.94*####	2.98±0.70*####
	DXM II	1.72±0.85	3.01±0.98*▲	3.93±0.75*#	5.03±1.48*▲#	3.61±0.90*###
	FDP I +DXM I	1.62±0.10	1.65±0.31#	1.65±0.36#	1.80±0.42#	1.64±0.55#
	FDP I +DXM II	1.62±0.10	1.65±0.31#	1.65±0.36#	1.80±0.42#	1.64±0.55#

注:与本组基础值比较:**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 FDP I 组比较:△*P* < 0.05;与 DXM I 组比较:▲*P* < 0.05;与对照组比较:
#*P* < 0.05,##*P* < 0.01;与 FDP I +DXM I 组比较:★*P* < 0.05,★★*P* < 0.01

表 2 6 组心肌细胞凋亡指数的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Change of apoptosis index in six group's myocardium($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	FDP I	FDP II	DXM I	DXM II	FDP I +DXM I
视野数	40	40	40	40	40	40
AI	2.82±0.27	2.05±0.17	2.17±0.22	2.27±0.12	2.30±0.17	1.30±0.20**

注:与对照组比较:***P* < 0.01

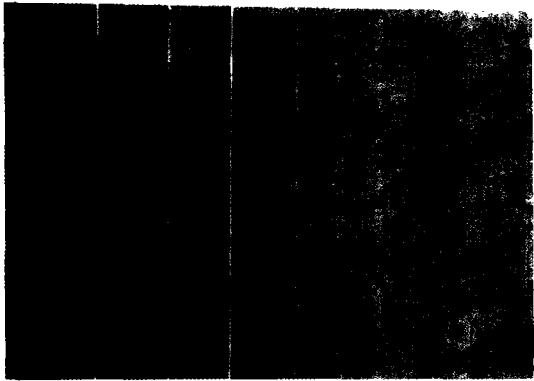


图 1 对照组凋亡心肌细胞(↑,TUNEL 法,×400)

Fig. 1 Control myocardium, arrow show apoptotic cardiocyte

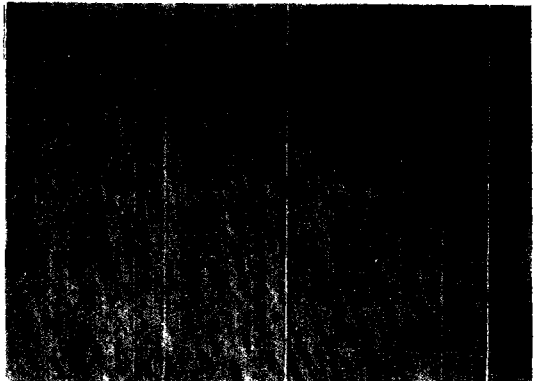


图 2 休克前 FDP 组凋亡心肌细胞(↑,TUNEL 法,×400)

Fig. 2 FDP I myocardium, arrow show apoptotic cardiocyte

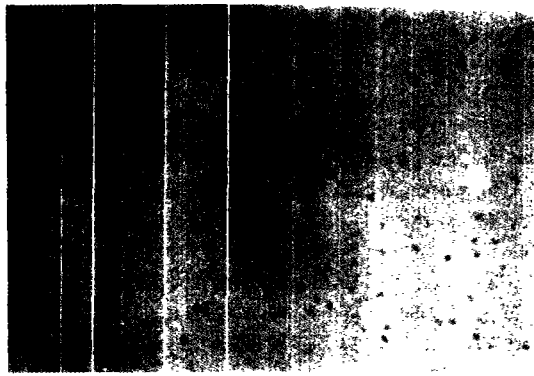


图 3 休克前 DXM 组凋亡心肌细胞(↑,TUNEL 法,×400)

Fig. 3 DXM I myocardium, arrow show apoptotic cardiocyte

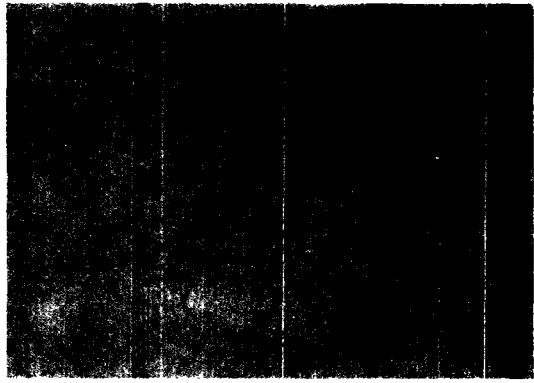


图 4 休克前 FDP+DXM 组凋亡心肌细胞(↑,TUNEL 法,×400)

Fig. 4 FDP I + DXM I myocardium, arrow show apoptotic cardiocyte

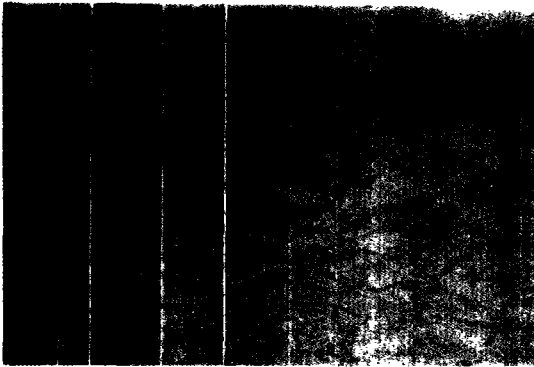


图 5 再灌注时 FDP 组凋亡心肌细胞(↑,TUNEL 法,×400)

Fig. 5 FDP II myocardium, arrow show apoptotic cardiocyte

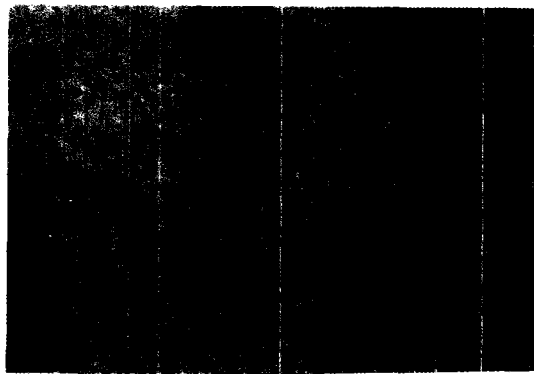


图 6 再灌注时 DXM 组凋亡心肌细胞(↑,TUNEL 法,×400)

Fig. 6 DXM II myocardium, arrow show apoptotic cardiocyte

3 讨论

心肌缺血-再灌注损伤的形成是一个多因素、多步骤的复杂过程,其发生机制包括细胞能量不足或缺乏、生物膜损害、细胞内 Ca^{2+} 超载、溶酶体酶释放、氧自由基(OFR)产生增加等^[1],以上诸因素引起细胞功能紊乱,膜完整性和通透性发生改变,细胞破坏,使细胞内大分子物质(CK、cTnI)逸出释放入血,此时表现为血浆 CK、cTnI 值增高。为了解 FDP 在休克过程中对心肌的保护作用,研究设置了休克前

给药组(FDP I)和再灌注时给药组(FDP II),结果显示:FDP I 与 FDP II 相比,除基础值外,其它时间点 CK、cTnI 值均显著下降或有下降趋势。可以认为,FDP 对心肌的保护效果与用药时间关系很大,在缺氧开始时 FDP 能显示明显的心肌保护作用,而一旦心肌细胞产生了缺氧性损害,再灌注期间给药对心肌保护效应就受到限制。这可能是因为 FDP 为细胞内糖代谢的重要中间产物,对许多代谢通路起调节作用,能激活磷酸果糖激酶(PFK)和丙酮酸激

酶,增强糖酵解过程,同时又是高能底物,绕过被酸中毒抑制的 PFK 直接参与糖酵解代谢,促进糖类利用和缺血心肌 ATP 的生成和循环,减少分解,从而减少 OFR 产生^[2,3],起到保护心肌的作用。

失血性休克作为一种创伤性炎症,同样存在急性期反应。失血性休克早期糖皮质激素受体减少,糖皮质激素对白介素-1(IL-1)分泌的抑制作用减弱,在一定程度上造成 IL-1 活性升高。而 DXM 是人工合成的糖皮质激素,是一氧化氮合酶(NOS)抑制剂,能有效抑制体内 IL-1、肿瘤坏死因子(TNF)等诱导的 NOS 生成^[4],从而降低 NO 水平,减轻组织损伤。另外,DXM 可降低毛细血管通透性,抑制白细胞渗出和激活,减少白三烯、血小板激活因子等炎症反应的释放及血浆型纤维蛋白的消耗,使 OFR 产生和释放减少^[5],从而降低机体的脂质过氧化反应而减轻组织损伤。由于在失血性休克早期心肌损伤主要是缺血、缺氧、能量供应下降所致,而 DXM 在缺氧期间不能提供心肌能量,因此在本研究中 DXM 对心肌保护效果在两个不同时间给药组之间差别没有 FDP 明显。

细胞凋亡(apoptosis)即程序性细胞坏死,是不同于细胞坏死的另一种死亡概念。心肌缺血-再灌注损伤中产生的 OFR、IL-1 等是促进细胞凋亡的诱发因素。这些因素并不能直接引起细胞凋亡,而是通过一定的信号传递方法激活生成或死亡相关基因,然后将信号传递到核内切酶,而执行死亡的功能,心肌细胞凋亡是造成急性心肌缺血-再灌注损伤的形式之一^[6,7]。随着分子心血管病学的研究发展,现已证实了细胞凋亡现象存在于心血管系统的许多生理和病理变化中,并已明确了细胞凋亡在心肌缺血-再

灌注损伤中所起的作用^[8]。本研究结果表明,在休克前给 FDP 500 mg/kg+DXM 4 mg/kg 组比其它各组细胞凋亡数明显减少,说明二者联合用药能较好地保护缺血-再灌注损伤的心肌细胞。

综上,失血性休克家兔再灌注后可出现心肌缺血-再灌注损伤,FDP 和 DXM 减少心肌损伤的作用机制不同,早期联合应用对心肌的保护作用更好。

参考文献:

- 1 Gurevitch J, Barak J, Hochhauser E, *et al.* Apoptin improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion: effects of the drug on isolated rat hearts[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994, 108:109-118.
- 2 Tavazzi R A, Starnes J W, Lazzarino G, *et al.* Exogenous fructose-1,6-diphosphate is a metabolizable substrate for the isolated normoxic rat heart[J]. Basic Res Cardio, 1992, 87:280.
- 3 Tavazzi B, Cerroni L, Pierro D, *et al.* Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose-1,6-diphosphate[J]. Free Rad Res Commun, 1990, 10:167.
- 4 林丽娜, 王万铁, 徐正祚, 等. 地塞米松对家兔失血性休克-再灌注损伤的防治作用[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(6):362-364.
- 5 方玉荣, 王立金, 张梅芳, 等. 地塞米松在大鼠创伤性休克中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 1996, 12(2):146-148.
- 6 Chen S J, Bradley M E, Lee T C, *et al.* Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases[J]. Mol Cell Biochem, 1998, 178(1-2):141-149.
- 7 Greenlund L J, Deekwerth E M, Johnson J R. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death[J]. Neuron, 1995, 14:303-315.
- 8 James T N. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias[J]. Circulation, 1994, 90(1):556-573.

(收稿日期:2003-07-12 修回日期:2003-12-05)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

中华医学会关于召开“全国内科危重病医学学术交流会”的征文通知 (暨全国内科危重病医学新进展高级学习班的报名通知)

中华医学会继续教育部决定于 2004 年 4 月 23 日在厦门召开“全国内科危重病医学学术交流会”,该交流会为[2004]医学会继教备字, I 类继续医学教育学分。征文内容与要求:呼吸、心血管、消化、神经、内分泌、血液、肾脏、传染性疾病、急诊及 ICU 等各专科的危重病基础研究、诊断治疗、感染控制、监测及支持等。请寄 3 000 字左右全文及 500 字左右摘要各 1 份。来稿请寄:100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“内科危重病会议”梁鸿收。来稿时寄审稿费 20 元/篇至收稿人。来稿截止日期:2004 年 3 月 26 日(当地时间)。

会议同时举办学习班将邀请胡大一、王辰、陈德昌、景炳文、沈洪、王爱霞等专家进行学术报告,主要内容有:急性呼吸窘迫综合征(ARDS)进展,危重病与机械通气,心肺复苏 2000 治疗指南解析,各型高血压治疗原则及合并症的控制标准,不同疾病抗生素的最佳选择,危重病监测与治疗,脓毒症、休克与多器官功能障碍综合征(MODS)的有关问题研究进展,器官功能支持,中毒诊疗进展,有关心脑血管、呼吸、消化、内分泌系统等危重病的焦点热点课题。欢迎报名参加。学习班报名截止日期:2004 年 4 月 5 日(当地时间),欢迎使用 Email:cbcmc@public3.bta.net.cn 投稿或报名,请注明会议名称。联系电话:010-68233919(带传真),88285962 杨桂芳;010-65249989 转 1701 梁鸿。

(中华医学会继续教育部)