

黄芪注射液对感染性休克大鼠心肌损伤的影响

张成明^{1,2}, 于金玲¹, 王海霞¹, 胡京蛟¹, 马 骏¹, 曹焕军¹

(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261042; 2. 潍坊医学院附属医院)

【摘要】 目的: 探讨黄芪对感染性休克大鼠心肌损伤的保护作用及其机制。方法: 采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 复制感染性休克 SD 大鼠模型。手术开始时黄芪治疗组 (R) 静脉输注黄芪注射液 10 g/kg (每 1 ml 含生药 2 g), 假手术组 (C) 和休克组 (S) 均给予等量生理盐水。连续监测 3 组动物术后 0~20 h 的心率 (HR) 和平均动脉压 (MAP), 并于术后 6 h 和 20 h 处死各组动物, 测定心肌组织核转录因子- κ B (NF- κ B) 及丙二醛 (MDA) 含量。光镜及电镜观察心肌组织病理学改变。结果: 与 C 组比较, 6 h 时 S 组大鼠 MAP 明显下降, HR 增快 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 到 20 h 时 HR、MAP 均极度降低 (P 均 < 0.01); 而 R 组 MAP 于 12 h 后开始下降 ($P < 0.05$), HR 则无明显变化。C 组心肌组织基本无 NF- κ B 表达; S 组 6 h 阳性细胞显著增多, 平均积分吸光度值明显高于 C 组 ($P < 0.01$), 说明 NF- κ B 呈高表达, 20 h 表达明显降低 ($P < 0.01$); R 组 6 h 阳性细胞明显低于 S 组 ($P < 0.01$), 高于 C 组 ($P < 0.05$); 20 h 则无明显变化; 同 C 组比较, S 组 6 h MDA 含量显著增高 ($P < 0.01$), 20 h 进一步增高 ($P < 0.01$); R 组 6 h 仅轻度增高, 持续 20 h (P 均 < 0.05), 明显低于 S 组 (P 均 < 0.01)。光镜下: S 组 6 h 时出现心肌细胞水肿、白细胞浸润, 胞浆内颗粒变性及空泡变性, 20 h 心肌细胞呈大片节段性变性、坏死; R 组病变较轻, 于 20 h 才出现心肌细胞水肿、颗粒变性及空泡变性。电镜下: S 组于 6 h 部分心肌细胞线粒体肿胀嵴消失, 呈空泡变性; 20 h 心肌细胞线粒体嵴消失, 空泡变性坏死, 心肌纤维溶解断裂; R 组心肌细胞结构无明显改变。结论: 黄芪注射液能抑制感染性休克后心肌组织 NF- κ B 的活化, 从而起到抗炎作用, 并能抑制 MDA 的产生, 防止过度炎症反应和免疫抑制, 从而起到心肌保护的作用。

【关键词】 黄芪; 核转录因子- κ B; 丙二醛; 休克; 感染性

中图分类号: R285.5; R256.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)01-0047-04

Effects of radix astragali injection (黄芪注射液) on myocardial injury in septic shock rats ZHANG Cheng-ming^{1,2}, YU Jin-ling¹, WANG Hai-xia¹, HU Jing-jiao¹, MA Jun¹, CAO Huan-jun¹. 1. Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong, China; 2. Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects and mechanism of radix astragali injection (黄芪注射液) on myocardial injury in rats with septic shock. **Methods:** Septic shock model was replicated by cecal ligation and puncture (CLP). SD rats were randomly divided into three equal groups; sham operation group (group C), septic shock group (group S) and radix astragali group (group R). Group R received radix astragali injection 10 g/kg (containing drug 2 g/ml). Group C and S received the same volume of normal saline only. Heart rate (HR) and mean average pressure (MAP) of three groups were detected continuously 20 hours after operation. Rats were sacrificed at 6 and 20 hours after operation, and the distribution of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in myocardium and contents of malondialdehyde (MDA) were measured. The myocardial pathological changes of rat left ventricle were observed under an optical microscope and ultrastructural organization was detected under an electron microscope. **Results:** Compared with group C, the MAP gradually decreased and HR gradually increased at 6 hours after CLP ($P < 0.01$ and $P < 0.05$), and at 20 hours, both MAP and HR markedly decreased (both $P < 0.01$) in group S. However, MAP started decreasing at 12 hours ($P < 0.05$), and no obvious changes in HR in group R. There was almost no expression of NF- κ B in myocardium of group C. The positive cell number and average optical density (OD) value of NF- κ B protein was significantly higher in group S than those in group R and C at 6 hours (both $P < 0.01$). The positive cells were more in group R than those in group C ($P < 0.05$). The changes of NF- κ B protein expression were not obvious at 20 hours in group R. The content of MDA was significantly higher in group S than those in group R and C at each time points (all $P < 0.01$). Those of group R were slightly higher than those of group C (both $P < 0.05$). There were less myocardial injuries in group R than those in group S under optical microscope and electron microscope at the same stages. **Conclusion:** Administration of radix astragali injection is likely to protect myocardium of rats with septic shock through inhibiting the activity of NF- κ B and the release of MDA, preventing excessive inflammatory reaction and immune suppression.

【Key words】 radix astragali; nuclear factor- κ B; malondialdehyde; septic shock

感染性休克(septic shock)是以低血压、低氧血症、代谢性酸中毒、全身性炎症反应和多器官功能障碍为特征的复杂病理生理过程,是危重病患者死亡的主要原因。近几十年来虽然在液体复苏、抗生素治疗、生命体征监测和生命支持技术等方面均取得进展,但感染性休克的病死率仍居高不下。感染性休克以血流分布异常为主要特征,高心排血量,低外周血管阻力,组织细胞存在缺氧或氧利用障碍^[1],发生感染性休克时心功能常受损害,有报道,在新生儿合并多器官损害病例中,心功能损伤仅次于肺损伤,占第二位,其发病机制尚不十分清楚。以往的研究比较关注内毒素对心肌的直接损害作用,但近年来认为内毒素诱发炎症细胞释放大量炎症介质是导致心肌损伤的重要原因^[2],中西医结合治疗感染性休克有其较好的疗效^[3]。本研究拟通过动物实验探讨黄芪对感染性休克时心肌的作用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组和模型制备:健康成年雄性 SD 大鼠 48 只,体重 300~350 g,由潍坊医学院实验动物中心提供。按随机数字表法分为假手术组(C)、休克组(S)和黄芪治疗组(R),每组 16 只。采用改良的盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)复制大鼠感染性休克模型^[4],麻醉后开腹暴露盲肠根部结扎,用 20G 针头穿刺盲肠 3 次后关腹, C 组只进行开腹关腹。右股动、静脉插管,持续监测平均动脉压(MAP)及心率(HR),手术开始时 R 组输注黄芪注射液 10 g/kg(每 1 ml 中含生药 2 g),其余两组均给等量生理盐水。

1.2 标本采集及处理:各组于术后 6 h 和 20 h 分别经右股动脉快速放血处死大鼠,立即开胸取左心室心尖部心肌组织 1 mm³ 浸泡于体积分数为 2.5% 的戊二醛中,4 ℃ 保存备用;另取 200 mg 组织在冰浴下制成体积分数为 10% 的匀浆,低温 3 500 r/min (离心半径 9.2 cm)离心 10 min,取上清液-70 ℃ 保存以备作丙二醛(MDA)测定;其余组织用体积分数为 10% 的中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,透明后石蜡包埋备用。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 HR 和 MAP 监测:记录术后 20 h 内 C 组、S 组和 R 组的 HR 和 MAP。

作者简介:张成明(1974-),男(汉族),山东省人,医学硕士,讲师,主要从事感染及危重病医学的临床与实验研究,主持省自然科学基金项目 1 项,市级科研项目 5 项,发表论文近 20 篇(E-mail: zcm9318@163.com)。

1.3.2 心肌组织核转录因子- κ B(NF- κ B)阳性细胞测定:按 NF- κ B p65 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供,批号:2001024)说明书要求操作,以心肌组织切片上胞核或胞浆中出现棕黄色颗粒物,细胞核着色较深,细胞浆着色浅,且均匀分布,呈现出云雾状为阳性细胞。实验中以已知阳性切片作为阳性对照,用磷酸缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。用医学彩色图像分析系统测阳性反应物的平均积分吸光度值,每个时间点选 64 个视野(8 只动物每只各取 2 张切片,每张切片取 4 个视野)分别测量,然后计算平均积分吸光度值的均数作为此组的代表值。

1.3.3 心肌组织 MDA 含量检测:采用硫代巴比妥酸反应法,应用分光光度法进行 MDA 定量测定,根据公式计算 MDA 含量[MDA(μ mol/g)=(测定管吸光度值-空白管吸光度值)/(标准管吸光度值-空白管吸光度值) \times 标准品浓度/蛋白含量],按考马斯亮蓝法测定心肌组织匀浆蛋白含量。操作步骤按试剂盒说明书要求进行。

1.3.4 组织病理学观察:取各组左室心肌组织石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色后光镜下对比观察心肌组织病理特征性变化及程度。每组取 3 小块心肌组织,经 2.5% 的戊二醛及锇酸双重固定后,丙酮逐级脱水,树脂包埋, LKB 型切片仪进行超薄切片,切片厚度为 50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后, HITACHI H-600 型透射电镜检查并观察心肌细胞超微结构改变。

1.4 统计学分析:用 SAS8.2e 软件处理数据。所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各时间点 MAP 和 HR 与组内 0 时间点比较采用重复测量方差分析及 Dunnett-t 检验,其余进行单因素方差分析、q 检验及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组各时间点 HR 和 MAP 的变化(表 1): C 组 MAP、HR 在实验过程中较平稳。S 组于 CLP 后 6 h 出现 MAP 下降、HR 增快,与 C 组及本组 0 h 点比较差异均有显著性(P 均 < 0.01),至 20 h HR 和 MAP 均极度降低,呈衰竭状态(P 均 < 0.01)。R 组 12 h 较 2 h 血压略有下降($P < 0.05$),至 20 h 仍有下降($P < 0.01$);HR 一直较平稳(P 均 > 0.05)。

2.2 3 组心肌组织 NF- κ B 阳性细胞分布(表 2): C 组 NF- κ B 基本无阳性细胞出现, R 组有少量阳性细胞出现, S 组阳性细胞则显著增多。R 组 6 h 和 20 h NF- κ B 表达差异无显著性(P 均 > 0.05);而

表 1 CLP 后不同时间点 MAP 和 HR 的变化($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 1 Change of MAP and HR at different time points after CLP($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MAP(mm Hg)										
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h
C 组	103.2±8.0	104.3±8.3	99.7±7.4	96.6±9.5	96.7±8.6	96.7±8.4	96.7±8.6	96.4±9.6	96.4±8.4	98.3±10.0	98.6±6.2
S 组	104.3±8.3	104.5±9.1	92.4±9.5	85.3±8.6 [▲] *	75.7±8.6 [▲] *	65.4±8.7 [▲] *	60.8±7.2 [▲] *	52.5±8.3 [▲] *	43.6±9.5 [▲] *	38.5±10.8 [▲] *	28.7±9.0 [▲] *
R 组	104.4±7.4	104.7±8.5	98.9±9.6 [☆]	98.5±9.1 [×]	96.5±7.9 [×]	95.9±9.4 [×]	88.4±6.5 [△] ×	86.7±5.3 [△] ×	84.9±3.8 [△] ×	82.8±6.3 [△] ×	80.9±6.0 [△] ×

组别	HR(次/min)										
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h
C 组	366±13	368±14	378±12	370±12	364±13	370±12	364±11	373±15	367±11	373±13	375±14
S 组	368±13	371±11	377±12	396±13 [△] *	410±12 [▲] *	410±13 [▲] *	440±21 [▲] *	405±16 [▲] *	350±12 [▲] *	321±14 [▲] *	282±15 [▲] *
R 组	367±11	373±10	374±11	379±10	377±13 [☆]	376±15 [×]	379±14 [×]	378±12 [×]	382±14 [×]	376±12 [×]	378±11 [×]

注:与本组 0 h 比较:△ $P < 0.05$,▲ $P < 0.01$;与 C 组同时时间点比较:* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与 S 组同时时间点比较:☆ $P < 0.05$,× $P < 0.01$

S 组 6 h NF- κ B 呈高表达,至 20 h 表达明显降低($P < 0.01$)。

2.3 心肌组织 MDA 含量(表 2):与 C 组同时时间点比较,S 组 6 h MDA 含量显著增高($P < 0.01$),20 h 进一步增高($P < 0.01$);而 R 组 6 h MDA 含量仅轻度增高,并持续至 20 h(P 均 < 0.05),而且明显低于 S 组(P 均 < 0.01)。

表 2 心肌组织中 NF- κ B 蛋白表达和 MDA 含量($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Expression of NF- κ B protein and contents of MDA in myocardial tissues($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	NF- κ B 蛋白表达		MDA 含量(μ mol/g)	
	6 h	20 h	6 h	20 h
C 组	0.103±0.010	0.105±0.126	1 630±250	1 670±590
S 组	0.186±0.019 [#]	0.124±0.018 [▲] *	2 880±590 [#]	3 880±860 [▲] *
R 组	0.126±0.015 [☆] ×	0.117±0.013 [☆]	1 870±410 [☆] ×	2 440±520 [☆] ×

注:与本组 6 h 比较:△ $P < 0.05$,▲ $P < 0.01$;与 C 组同时时间点比较:* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与 S 组同时时间点比较:☆ $P < 0.05$,× $P < 0.01$

2.4 心肌组织光镜观察:6 h 时,C 组心肌细胞染色均匀,胞膜完整,胞核清晰;S 组出现心肌细胞浊肿、间质水肿、白细胞浸润,胞浆内可见颗粒变性及空泡变性;R 组与 C 组比较差异无显著性,仅偶见少量白细胞浸润。20 h 时,C 组未见明显变化;S 组心肌细胞呈大片节段性变性、坏死,部分心肌纤维断裂;R 组心肌细胞可见浊肿、颗粒变性及空泡变性。

2.5 心肌细胞超微结构的改变:透射电镜下,C 组心肌结构完整,肌原纤维排列整齐,肌小节长度均一,线粒体嵴排列致密。S 组于 6 h 可见部分心肌细胞线粒体肿胀,呈空泡变性;20 h 时心肌细胞大部分线粒体嵴消失,呈空泡变性,心肌纤维溶解断裂。R 组 6 h 心肌细胞结构无明显改变,仅到 20 h 时出现少量线粒体肿胀,空泡变性,但心肌纤维尚整齐。

3 讨论

黄芪味甘,性微温,具有补气升阳、益卫固表、托疮生肌等功效。黄芪多糖为其主要活性成分之一,能提高人体免疫功能,增强细胞生理代谢,提高巨噬细胞活性,是理想的免疫增强剂^[5]。研究表明,腹腔炎症时,肠黏膜损伤,通透性增强,导致内毒素、细菌、细胞碎片等刺激肠相关淋巴系统,使肠黏膜成为大量炎症细胞因子的早期释放器官^[6];随着肠黏膜通透性进一步增高,大量内毒素、细菌、细胞碎片进而进入肝脏,激活肝脏巨噬细胞系统,成为全身炎症反应综合征的主要原因^[7]。

本研究中采用了 CLP,使盲肠内容物污染腹腔造成弥漫性腹膜炎,诱发广泛的全身性自我破坏性炎症反应复制多重微生物感染性脓毒症(a model of polymicrobial sepsis)模型。CLP 术后 4 h 大鼠呈现进行性低血压,腹腔有脓液渗出,各器官充血、水肿,有淤点及淤斑,全身各系统器官均有不同程度的病理损害,与人类多器官功能障碍综合征(MODS)的临床表现相似,说明感染性休克模型复制是成功的。

静息状态下 NF- κ B 多以 p50 和 p65 二聚体的形式与其抑制蛋白(I κ B)相结合而存在于胞浆中,呈无活性状态。外源性刺激如脂多糖(LPS)、缺血/再灌注、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等通过一系列信号转导引起 I κ B 降解,导致 NF- κ B-I κ B 复合物解体,NF- κ B 活化进入细胞核,在核内与靶基因的特异序列结合并启动转录发挥其调控作用。许多基因的启动子/增强子都有功能性的 NF- κ B 接合位点,NF- κ B 活化后能调控一系列基因的表达,如白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、TNF- α 、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)以及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等^[8-11]。这些物质都能直接或间接地参与感染性休克及后续多器官功能损伤的发生发展。研究证实黄

芪能抑制感染性休克大鼠促炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 等的产生,从而拮抗过度的全身性炎症反应,而 NF- κ B 随病程进展到一定程度后活性逐渐降低,其原因是炎症因子的过度生成刺激产生大量抗炎因子(如 IL-6)抑制了 NF- κ B 活性^[11]。

本实验过程中 R 组 MAP 及 HR 一直较平稳。6 h R 组心肌组织学未见明显变化,20 h 仅心肌细胞浊肿、颗粒变性及少量空泡变性,比 S 组明显轻;电镜下,R 组较 S 组心肌细胞线粒体病变程度明显轻,仅 20 h 时出现少量线粒体肿胀,空泡变性,但心肌纤维整齐。R 组 6 h 时 NF- κ B 蛋白仅有少量表达,MDA 含量轻度增高,但均明显低于 S 组。提示黄芪注射液能维持血流动力学稳定,减轻病理损害,抑制感染性休克后心肌组织 NF- κ B 的活化,发挥免疫调节作用,使促炎/抗炎因子达到平衡,防止过度炎症反应和免疫抑制,从而起到保护心肌的作用。

综上所述,黄芪注射液治疗感染性休克及其器官损伤可在多途径、多环节、多靶点上发挥作用,它既可减轻内毒素毒性作用,又可显著增强机体免疫/解毒系统对内毒素的解毒功效^[12],但在人体用药过程中有过敏个案报道,其原因值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] 文亮,刘明华,尹昌林. 感染性休克患者血流动力学和氧合功能的变化[J]. 中国危重病急救医学,1999,11(12):739-741.
[2] 石德光,胡森,姜小国,等. 迷走神经兴奋对内毒素致大鼠心脏炎

- 症反应的影响[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(1):26-28.
[3] 曾锦旗. 中西医结合治疗休克的临床研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(3):182-184.
[4] 张宏,孙建洁,徐光延,等. 黄芪注射液对慢性重症疾病所致免疫功能低下防治作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2001,8(6):351-352.
[5] 朱愉,多秀瀛. 实验动物的疾病模型[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1997:382-383.
[6] Berg R D, Carlinton A W. Translocation of certain endogenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model[J]. Infect Immun,1979,23:403-404.
[7] Caplan M S, Miller-Catchpole R, Kaup S, et al. Bifidobacterial supplementation reduce the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rats model[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3): 557-583.
[8] Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, et al. Nuclear localization of I κ B promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 3): 369-378.
[9] 傅强,崔乃强,邵伟,等. 急性出血坏死性胰腺炎小鼠辅助性 T 细胞亚群 1/2 的变化规律及中药干预作用研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2006,13(4): 214-217.
[10] 赵春玲,李莉华,邹丽莎,等. 黄芪注射液对兔缺血/再灌注肾损伤时 IL-6 和 bFGF 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2001,8(4):225-227.
[11] 刘永琦,何建成. 心肌康对白介素-2 和 6 在病毒性心肌炎中的作用研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(5):290-293.
[12] 张成明,杨艇舰,于金玲,等. 黄芪对感染性休克大鼠保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2005,12(6):373-376.

(收稿日期:2006-11-21 修回日期:2007-01-04)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

告读者:《中国中西医结合急救杂志》英文摘要写作要求

投《中国中西医结合急救杂志》文章的作者写作英文摘要时请按照如下要求。

- 1 总体要求:中英文摘要一致,英文摘要可略详于中文摘要。英文摘要实词以 250 个左右为宜。
- 2 文题:①文题为短语形式,可以为疑问句,但不能是陈述句和否定句。②用词宜少,以 10~15 个词为宜。③少用或不用冠词。④尽量避免多个“of”连用。⑤句首字母大写,余小写,专用名词首字母大写。
- 3 作者姓名及单位:①用汉语拼音写出全部作者的姓名。②翻译全部作者的作者单位,按照科室,医院,单位所在市、邮编、所在省,China 的顺序书写。有通讯作者或责任作者时要以“Corresponding author:”开头,译出通讯作者或责任作者的姓名,单位,单位所在地、邮编、所在省,最后加 China。
- 4 正文:①采用报道性文摘,按照“Objective”、“Methods”、“Results”、“Conclusion”撰写英文摘要。其中,“Objective”要使用“To”开头的不定式短语形式,而“Methods”、“Results”和“Conclusion”均使用陈述句形式。尽量使用短句子。②不使用第一人称“I”、“we”等。③“Methods”、“Results”用过去时,“Conclusion”用一般现在时。④英文缩写第一次出现时要注明英文全称,其后括号内注明缩写,如 interleukin-8 (IL-8)。⑤中药的名称用英文,应采用《中国药典》的名称,既包括植物(或动物、矿石等)的名称,也包括其药用部分和必要的炮制手段。中成药、方剂名称,药名用汉语拼音,剂型用英文,并在英文后用括号加注中文,例如:Shenmai injection(参麦注射液)。⑥中医证型的英译文后以括号注明中文,例如:deficiency both of Yin and Yang(阴阳两虚)。⑦关于自拟处方,作者有对处方起名的权利,4 个字母以上首字母应大写。
- 5 关键词:①中英文一致,不能使用英文缩写。②所有单词小写,专有名词首字母大写。

(本刊编辑部)