

中药 912 液对脓毒症大鼠心肌细胞线粒体 抗氧化防御体系酶的影响

邵 婧, 王国兴, 金 明, 张寒钰, 杨立沛, 谢苗荣
(首都医科大学附属北京友谊医院急诊科, 北京 100050)

【摘要】 目的 探讨中药 912 液对脓毒症大鼠心肌细胞线粒体抗氧化防御体系酶的影响。方法 将 32 只 Wistar 大鼠按随机数字表法均分为对照组、模型组、912 液组、地塞米松组。采用静脉注射脂多糖(LPS)的方法建立大鼠脓毒症模型。912 液组于制模前 1 h 灌胃 10 mg/kg 912 液 6 ml; 地塞米松组于注射 LPS 后即刻注射 0.5 mg/kg 地塞米松 1 ml。各组于制模后 6 h 处死大鼠取心肌组织制备匀浆, 用比色法测定心肌细胞线粒体总 ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量。结果 与对照组比较, 模型组心肌细胞线粒体总 ATP 酶、SOD、GSH-Px 酶活性均显著降低(均 $P < 0.01$), MDA 含量明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 912 液组线粒体总 ATP 酶、SOD、GSH-Px 活性明显增加(均 $P < 0.01$), MDA 含量明显减少($P < 0.05$); 地塞米松组仅总 ATP 酶、SOD 活性明显升高(均 $P < 0.05$), GSH-Px 活性及 MDA 含量差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论 脓毒症时大鼠心肌细胞线粒体出现能量代谢障碍; 中药 912 液可以减轻心肌细胞线粒体的氧化损伤。

【关键词】 脓毒症; 心肌损伤; 线粒体; 抗氧化防御体系酶; 中药 912 液

中图分类号: R285.6; R256.2 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.011

Effect of 912 solution on enzymes of myocardial mitochondrial antioxidant defense system in rats with sepsis
SHAO Jing, WANG Guo-xing, JIN Ming, ZHANG Han-yu, YANG Li-pei, XIE Miao-rong. Emergency Department, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China
Corresponding author: XIE Miao-rong, Email: xiemiao217@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 912 solution on enzymes of myocardial mitochondrial antioxidant defense system in rats with sepsis. **Methods** Thirty-two Wistar rats were randomly divided into four groups: control, model, 912 and dexamethasone groups. Intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS) was applied to establish the rat model of sepsis. One hour before the model establishment, 6 ml of 912 solution (10 mg/kg) was given intragastrically. Immediately after LPS injection, dexamethasone (0.5 mg/kg) 1 ml was injected in the dexamethasone group. Six hours after the model formation, the rats were sacrificed and their cardiac muscles were taken away to prepare homogenates from which myocardial mitochondria were picked up. The kits of colorimetric method were used to determine the activity of total-ATPase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malonaldehyde (MDA) in the myocardial mitochondria. **Results** Compared with control group, the activity of total-ATPase, SOD, GSH-Px of myocardial mitochondria were obviously decreased (all $P < 0.01$), and MDA was significantly increased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the activity of total-ATPase, SOD, GSH-Px of mitochondria were markedly increased (all $P < 0.01$), and MDA was obviously reduced in 912 group ($P < 0.05$); in the dexamethasone group, the activity of total-ATPase and SOD were remarkably increased (both $P < 0.05$), while the activity of GSH-Px and the MDA content had no significant differences (both $P > 0.05$). **Conclusion** In sepsis, the rat myocardial mitochondria appear impairment in energy metabolism. The Chinese medicine 912 solution can reduce the oxidative injury in myocardial mitochondria.

【Key words】 Sepsis; Myocardial injury; Mitochondria; Enzymes of antioxidant defense system; Chinese medicine 912 solution

脓毒症(sepsis)是感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),若原发疾病没有得到控制,则可进一步发展成严重脓毒症及脓毒性休克,甚至可导致多器官功能障碍综合征(MODS),是临床常见的危重病。心肌损伤是脓毒症常见的并发症之一,严重影响患者预后。有效预防和治疗脓毒症过程中出现的心肌损伤是脓毒症治疗的重要组成部分。线粒体是细胞活动的主要供能场所,其通过氧化磷酸化生成大

量 ATP,可供细胞内各种化学反应与功能的能量需要,对维护细胞的正常生理功能起着重要作用。研究表明,中药 912 液可通过抑制一氧化氮(NO)和自由基产生,改善脓毒症大鼠心肌损伤^[1]。本实验中通过观察脓毒症早期大鼠心肌细胞线粒体总 ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)的变化,探讨线粒体抗氧化防御体系酶在心肌细胞损伤机制中的重要作用及中药 912 液对心肌细胞线粒体的保护作用,现报告如下。

通信作者: 谢苗荣, Email: xiemiao217@126.com

作者简介: 邵 婧(1982-),女(汉族),河北省人,硕士研究生。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:32 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 200~260 g, 由中科院药物研究所实验动物部提供。按随机数字表法分为 4 组, 每组 8 只。模型组经大鼠阴茎静脉注射脂多糖(LPS)4 mg/kg 制作脓毒症模型^[2]; 对照组注射等量生理盐水; 912 液组于制模前 1 h 灌胃 912 液(10 mg/kg, 由黄芪、丹参、川芎等 6 味中药组成)6 ml; 地塞米松组注射 LPS 后立即注射 0.5 mg/kg 地塞米松 1 ml。给药后观察 6 h, 动物如达到 SIRS 标准^[3]则制模成功。处死动物制备心肌细胞线粒体悬液。

1.2 检测指标及方法:取左心室心肌制成组织匀浆, 采用比色法测定 GSH-Px、总 ATP 酶、SOD 活性和 MDA 含量。试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供, 严格按说明书操作。

1.3 统计学方法:使用 SPSS 11.5 统计软件, 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料比较采用单因素分析, 组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示, 与对照组比较, 模型组心肌细胞线粒体总 ATP 酶、SOD、GSH-Px 活性均明显下降(均 $P < 0.01$), MDA 含量明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 912 液组总 ATP 酶、SOD、GSH-Px 活性均明显升高, MDA 含量明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 地塞米松组总 ATP 酶、SOD 活性均明显升高(均 $P < 0.05$), GSH-Px、MDA 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

脓毒症是重症监护病房(ICU)患者的主要死亡原因。细菌毒素、细胞因子等通过不同的途径造成心肌灌注不足、心肌能量代谢障碍以及心肌细胞凋亡等被认为是脓毒症导致心脏损伤的重要机制, 心肌能量代谢障碍是其中的关键机制。心肌细胞线粒体是心肌能量代谢的主要场所, 在细胞受到内毒素攻击时, 首先受损的是线粒体。线粒体是细胞活动的主要供能场所, 是物质代谢和能量转化的中心站, 细胞

内 90% 以上的 ATP 在线粒体合成^[4]。线粒体通过氧化磷酸化生成大量 ATP, 供应细胞内各种化学反应与功能的能量需要。

3.1 脓毒症对抗氧化防御系统酶的影响:脂质过氧化反应广泛存在于心肌细胞、神经细胞、肝细胞中, 在氧化磷酸化的过程中可产生一定量的自由基^[3]。氧自由基可直接攻击心肌线粒体膜脂, 引起心肌细胞线粒体膜的脂质过氧化损伤, 使线粒体膜磷脂显著减少、线粒体细胞色素氧化酶活性下降; 氧自由基和脂质过氧化物的增多又可使膜磷脂分解代谢增强, 后者促进氧自由基和脂质过氧化物进一步增多, 使心肌细胞线粒体膜结构不断发生病理改变, 形成恶性循环, 最终导致心肌细胞线粒体内膜的完整性受到破坏, 引起线粒体功能失调和能量代谢障碍。

由于生物体内同时存在着抗氧化防御体系, 包括抗氧化酶和非酶性抗氧化剂。在生理状态下二者维持动态平衡, 从而保护线粒体不被损伤。如果这种平衡被破坏, 线粒体就会因脂质过氧化作用而受到损伤。SOD 可清除超氧阴离子自由基, 降低 MDA 等的产生, 保护细胞免受氧化损害; GSH-Px 主要作用是清除脂类氢过氧化物, 并在过氧化氢酶含量很少的情况下替代过氧化氢酶清除过氧化氢, 保护膜的结构完整^[5]。GSH 在拮抗氧化性毒物中的重要作用表现为^[6]: ①与毒物分子及其代谢产物发生反应, 降低毒物毒性; ②可通过氧化还原反应而降低毒物氧化的能力, 使含巯基酶免于被重金属和氧化剂激活或使已氧化的含巯基酶还原而使其恢复活性, 从而发挥抗氧化损伤的作用。

本实验中, 模型组 SOD、GSH-Px 活性均明显下降, 表明脓毒症时大鼠心肌细胞线粒体的抗氧化能力下降; MDA 含量升高, 说明脓毒症时心肌细胞发生了脂质过氧化反应。提示抗氧化酶的减少是脓毒症大鼠发生氧化损伤的原因之一。脓毒症时心肌能量障碍或衰竭可能是心功能障碍或心肌损伤的根本原因。线粒体结构和功能异常所引起的能量代谢障碍在内毒素所致心肌损伤中起重要作用。由于 ATP 的合成和分解是体内能量转移和利用的关键环节, 线粒体的能量代谢障碍与多种线粒体酶活性下降有关。ATP 酶与 ATP 的合成、呼吸链的功能、维持渗透压和细胞膜电位平衡、保持细胞体积和细胞液 pH 值密切相关。

3.2 中药 912 液对心肌细胞线

表 1 各组脓毒症大鼠心肌细胞线粒体酶比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	总 ATP 酶 (U/mg)	SOD (U/mg)	GSH-Px (U · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	MDA (nmol/mg)
对照组	8	9.08 ± 0.93	96.18 ± 25.34	92.95 ± 30.34	0.73 ± 0.16
模型组	8	4.82 ± 1.65 ^b	66.32 ± 6.44 ^b	49.48 ± 3.41 ^b	1.40 ± 0.94 ^a
912 液组	8	8.20 ± 1.90 ^d	87.42 ± 2.46 ^d	65.88 ± 2.10 ^d	0.87 ± 0.18 ^c
地塞米松组	8	7.00 ± 2.04 ^c	82.22 ± 4.88 ^c	56.17 ± 5.81	1.15 ± 0.30

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

粒体的保护作用:临床和动物实验研究证实:912 液在改善血流动力学和微循环、提高氧输送及细胞因子等方面发挥了重要作用^[1];可提高左室射血分数(LVEF),双向调节免疫功能,提高组织的氧摄取,在多个方面改善脓毒症的进程和预后;还可在 LPS 造成的急性炎症反应过程中起到拮抗内毒素、降低炎症细胞因子的作用^[7];此外,中药 912 液还具有抗氧化损伤作用^[8],推测其能稳定膜的氧化还原极性,中和正常代谢及还原生物合成时产生的氧化剂,减少内源性自由基的生成,从而减少脂质过氧化产物 MDA 的生成,保护线粒体膜结构和功能的完整性,从而恢复 H⁺-ATP 酶合成活性。本研究显示,中药 912 液治疗组 SOD、GSH-Px 较模型组升高,MDA 明显降低,说明 912 液抑制了氧化应激,降低了自由基对组织的损伤,对心肌细胞线粒体有一定的保护作用。

3.3 糖皮质激素的保护作用:糖皮质激素具有抗炎作用,在体内炎症调节机制中发挥重要作用。糖皮质激素对心血管作用的机制可能为^[9]:①抑制诱导型一氧化氮合酶和细胞色素 C 氧化酶的合成;②使心血管对内毒素及致炎细胞因子产生耐受状态;③恢复儿茶酚胺受体对儿茶酚胺的敏感性。本研究中还发现,与模型组比较,地塞米松组总 ATP 酶、SOD 活性升高,GSH-Px 活性及 MDA 含量无明显差异。考虑地塞米松通过抑制炎症介质的释放,从而减轻脂质过氧化损伤,具有心肌保护作用;而直接抑制氧化应激、降低自由基对心肌组织损伤的作用不明显。另有研究表明,地塞米松可明显降低脓毒症时的血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平及心脏指标,减轻内毒素对心肌的损伤^[10]。

4 结 论

脓毒症大鼠心肌细胞线粒体抗氧化酶遭到破

坏,出现细胞能量代谢障碍,表现为 SOD、GSH-Px 及总 ATP 酶活性下降,MDA 含量升高。中药 912 液可通过保护抗氧化酶,改善脓毒症时的心肌细胞能量代谢。糖皮质激素有类似中药 912 液对心肌细胞线粒体抗氧化酶的保护作用,但效果不甚明显。

总之,内毒素血症时,体内氧自由基生成大量增加,超过机体的清除能力,脂质过氧化反应增强,脂质过氧化产物攻击膜脂、膜蛋白造成心肌细胞的损伤。氧自由基的产生和清除机制失衡,致使心肌组织受到损伤。若能在脓毒症早期阻断氧化应激的恶性循环,恢复氧自由基代谢的平衡状态,可能会减轻心脏损伤,起到一定的治疗效果。

参考文献

- [1] 庄海舟,张淑文,李昂,等. 中药 912 液对脓毒症大鼠心肌损伤保护的实验研究. 中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):16-19.
- [2] Zorov DB. Mitochondrial damage as a source of diseases and aging; a strategy of how to fight these. Biochim Biophys Acta, 1996,1275(1-2):10-15.
- [3] 盛志勇,胡森. 多器官功能障碍综合征. 北京:科学出版社,1999:185-205.
- [4] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science, 1998,281(5381):1309-1312.
- [5] Rohn TT, Nelson LK, Waeg G, et al. U-101033E(2, 4-diaminopyrrolopyrimidine), a potent inhibitor of membrane lipid peroxidation as assessed by the production of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and 4-hydroxynonenal: protein adducts. Biochem Pharmacol,1998,56(10):1371-1379.
- [6] 胡森. MODS 的动物模型//盛志勇,胡森. 多器官功能障碍综合征. 北京:科学出版社,1999:185-205.
- [7] 刘乃慧,任世光,李红艺,等. “912”液防治呼吸窘迫综合征的实验研究. 中国危重病急救医学,1997,9(10):592-593.
- [8] 毕铭华,张淑文,王宝恩,等. 内毒素血症对大鼠肝细胞线粒体质子 ATP 酶的影响及中药 912 液的干预作用. 中国危重病急救医学,2001,13(9):533-535.
- [9] Saadia R, Schein M. Multiple organ failure, how valid is the “two hit” model? J Accid Emerg Med,1999,16(3):163-166.
- [10] 王国兴,沈路华,谢苗荣,等. 地塞米松对脓毒症大鼠心肌保护作用的研究. 中国危重病急救医学,2006,18(4):206-209.

(收稿日期:2009-12-30)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

中国科技信息研究所 2009 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版)
——临床医学类及中医学与中药学影响因子和总被引频次前 10 位排序表

临床医学类影响因子排序			临床医学类总被引频次排序			中医学与中药学影响因子排序		
期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	影响因子	排位
中华医院感染学杂志	1.402	1	中华医院感染学杂志	5 887	1	中西医结合学报	0.961	1
中国感染与化疗杂志	1.347	2	中国误诊学杂志	3 332	2	中国中西医结合杂志	0.829	2
中国危重病急救医学	1.088	3	实用医学杂志	2 633	3	中国中西医结合急救杂志	0.790	3
ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY	0.857	4	中华检验医学杂志	2 591	4	中国中药杂志	0.701	4
中华检验医学杂志	0.709	5	中国危重病急救医学	2 534	5	世界科学技术-中医药现代化	0.641	5
临床麻醉学杂志	0.680	6	中国全科杂志	2 228	6	吉林中医药	0.599	6
中华急诊医学杂志	0.667	7	中华麻醉学杂志	2 066	7	针刺研究	0.597	7
中国临床解剖学杂志	0.661	8	临床麻醉学杂志	1 850	8	中华中医药杂志	0.546	8
中国循证医学杂志	0.655	9	中华急诊医学杂志	1 740	9	中草药	0.529	9
中国输血杂志	0.613	10	中华皮肤科杂志	1 692	10	北京中医药大学学报	0.505	10