论著。

川芎嗪保护脓毒症大鼠心肌的抗氧化机制研究

杨广,黄丹虹,杨澄,李健,张敏州 (广东省中医院重症医学科,广东广州 510120)

【摘要】目的 探讨川芎嗪对脓毒症大鼠心肌的保护作用及其抗氧化机制。方法 将90 只大鼠按随机数字表法分为假手术组 (n=18)、模型组 (n=36)、川芎嗪组 (n=36),每组又分为 24、48、72 h 3 个时间点亚组,模型组与川芎嗪组每个时间点 12 只大鼠,假手术组 6 只大鼠。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 复制脓毒症大鼠模型。川芎嗪组于制模后皮下注射川芎嗪注射液 10 mg/kg,假手术组和模型组给予等量生理盐水,均每日 1 次。于术后 24、48 及 72 h 取大鼠腹主动脉血,测定血清心肌肌钙蛋白 I (cTnI),取心肌组织测定超氧化物歧化酶 (SOD) 及丙二醛 (MDA) 水平。结果 模型组及川芎嗪组术后各时间点 cTnI (ng/L)、MDA $(\mu mol/L)$ 水平均较假手术组同期明显升高,于 24 h 达峰值,48 h 后开始回落,而川芎嗪组升高程度低于模型组,24 h 、48 h 两组比较差异有统计学意义(24 h cTnI: 401.82 \pm 31.67 比 482.17 \pm 37.91,MDA:13.76 \pm 2.18 比 16.52 \pm 2.19; 48 h cTnI: 353.57 \pm 38.19 比 415.77 \pm 28.64,MDA:11.05 \pm 1.94 比 14.98 \pm 2.43,均 P < 0.05);SOD 活性(kU/L)较假手术组同期明显下降,于 24 h 达谷值,48 h 后开始回升,而川芎嗪组降低程度明显小于模型组,两组比较差异有统计学意义(24 h: 128.54 \pm 5.50 比 117.83 \pm 6.61,48 h: 134.42 \pm 4.98 比 125.86 \pm 5.49,72 h: 139.49 \pm 5.74 比 131.57 \pm 4.98,均 P < 0.05)。结论 川芎嗪可能通过清除氧自由基、抗氧化机制实现改善脓毒症时心肌损伤的作用。

【关键词】 脓毒症; 心肌保护; 川芎嗪

A research of protective effect of ligustrazine on myocardium in septic rats and its mechanism of anti-oxidation YANG Guang, HUANG Dan-hong, YANG Cheng, LI Jian, ZHANG Min-zhou. Department of Critical Care Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong, China

Corresponding author: YANG Guang, Email: yg_1918@163.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of ligustrazine on myocardium in septic rats and its possible mechanism of anti-oxidation. Methods Ninety male rats were randomly divided into sham operated group (n=18), model group (n=36), and ligustrazine treated group (n=36). Each group was subdivided into three subgroups according to the time point of sacrifice: 24,48 and 72 hours. There were 12 rats in model or ligustrazine subgroup at each time point, while in sham operated group, 6 rats in each subgroup. The rat models were subjected to sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). Rats in ligustrazine group were subcutaneously injected with ligustrazine injection 10 mg/kg, and those in model group and sham operated group were injected the same dosage of normal saline, once a day after modeling. The abdominal agrta blood of rats was taken out at 24,48 and 72 hours after operation, the levels of serum cardiac troponin I (cTnI) were measured, and the contents of superoxide dismutase (SOD) and malonaldehyde (MDA) in myocardium were detected at the same time points. Results Compared with sham operated group, the levels of cTnI (ng/L) and MDA (µmol/L) were increased significantly in rats of model group and ligustrazine group at each time point, they peaked at 24 hours and decreased after 48 hours. The degree of elevation of ligustrazine group was lower than that in model group, and there were statistical significant differences between the two groups (24 hours cTnI : 401.82 ± 31.67 vs. 482.17 ± 37.91 , MDA : 13.76 ± 2.18 vs. 16.52 ± 2.19 ; 48 hours cTnI : 353.57 ± 38.19 vs. 415.77 ± 28.64 , MDA : 11.05 ± 1.94 vs. 14.98 ± 2.43 , all P < 0.05). Compared with sham operated group, the activities of SOD (kU/L) were decreased significantly in rats of model group and ligustrazine group at the same time points, they reached their valley values at 24 hours and began to ascend after 48 hours. The degree of reduction of ligustrazine group was lower than that in model group, the differences being significant between the two groups (24 hours: 128.54 ± 5.50 vs. 117.83 ± 6.61 , 48 hours: 134.42 ± 4.98 vs. 125.86 ± 5.49 , 72 hours : 139.49 ± 5.74 vs. 131.57 ± 4.98 , all P < 0.05). Conclusions Ligustrazine can attenuate the sepsis myocardial injury. The protective effect of ligustrazine on myocardial damage in septic rats may be realized by the elimination of oxygen free radicals, a mechanism of anti-oxidation.

[Key words] Sepsis; Myocardial protection; Ligustrazine

脓毒症如果治疗不及时,会迅速发展为多器官功能障碍综合征(MODS),是重症监护病房(ICU)

通信作者:杨广, Email: yg_1918@163.com

内最主要的死亡原因之一。研究证实,心肌损伤可发生在脓毒症的早期,且发生率很高,除并发血流动力学紊乱、心力衰竭(心衰)和心律失常等心脏事件外,大约25%的脓毒症患者存在隐匿性心肌损伤[1-2]。川芎嗪是治疗心血管疾病的常用药,具有明

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.01.005

基金项目:广东省自然科学基金(S2012010010397);广州中医药大学科技创新基金项目(10CX048)

显改善心血管功能、抑制自由基产生、提高内源性超氧化物歧化酶(SOD)活性、抑制炎症反应等多种生物学作用^[3]。本研究中采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症模型,观察川芎嗪注射液对其的心肌保护作用,并探讨其抗氧化的作用机制,为中医药防治脓毒症心肌损伤的疗效提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备: 90 只 SPF 级雄性 SD 大 鼠,体质量(220±20)g,购自广东省医学实验动物 中心,动物合格证号:0044960。在标准饲养条件下 适应1周后,将大鼠按体重编号,按随机数字表法 分为假手术组(n=18)、模型组(n=36)、川芎嗪组 (n=36),每组又分为 24、48、72 h 3 个时间点亚组, 模型组与川芎嗪组每个时间点均为12只大鼠,假 手术组为6只大鼠。参照 Rittirsch 等[4]设计的方法 复制脓毒症模型,腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠,于 中下腹正中线切一长约3 cm 的切口,找到盲肠后 用手术线结扎盲肠中段,用针头在结扎部位与盲肠 末端的中段对穿两孔,挤出少量肠内容物后还纳盲 肠并逐层关腹。假手术组大鼠只开腹翻动盲肠,不 结扎穿孔。川芎嗪组于术后皮下注射川芎嗪注射 液 10 mg/kg, 假手术组和模型组皮下注射生理盐水 10 ml/kg,均每日1次。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 观察指标及方法

- 1.2.1 血清心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 检测:腹主动脉 采血 4~5 ml 离心 20 min, 分离血清, 放入 -20 ℃ 冰箱中保存。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清 cTnI 水平, 严格按抗大鼠试剂 盒 (上海恒远生物科技有限公司) 说明书进行操作。在酶标仪上测定吸光度 (A) 值 (测定波长 450 nm, 参考波长 550 nm)。
- 1.2.2 心肌组织 SOD 活性及丙二醛 (MDA)含量测定:处死大鼠,开胸剪下心脏,放人 4 ℃等渗磷酸盐缓冲液 (PBS) 中冲洗,冲洗干净后留取左心室组织0.2g,用超声粉碎机制备组织匀浆,放入 -20 ℃冰箱中保存。采用黄嘌呤氧化法测定心肌组织中 SOD活性。采用硫代巴比妥酸荧光 (TBA) 法测定心肌组织 MDA 含量。试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。
- **1.3** 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 \pm 标准差 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用成组 t 检验,方差不齐时采用 Mann-Whitney U 检验;组间比较采用 LSD-t 检验,3 组以

上的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),若方差不齐则用秩和检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

- **2.1** 一般情况:模型组制模 24、48、72 h 3 个亚组大鼠的死亡率分别是 33% (4/12)、50% (6/12)、58% (7/12),符合 Rittirsch 等^[4]设计的 CLP 制模标准,证明脓毒症模型制备成功。
- 2.2 各组血清 cTnI 比较 (表 1):与假手术组同期 比较,模型组血清 cTnI 明显增高,于 24 h 达峰值, 48 h 后开始回落,差异均有统计学意义 (均 P < 0.05)。与模型组同期比较,川芎嗪组 24 h 及 48 h cTnI 浓度均明显降低 (均 P < 0.05);但仍明显高于假手术组 (均 P < 0.05)。

表 1 各组大鼠不同时间点血清 cTnI 及心肌 SOD、MDA 含量比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	时间	动物 数	cTnI (ng/L)	SOD (kU/L)	MDA (µmol/L)	
假手术组	术后 24 h	6	228.53 ± 29.42	150.96 ± 5.20	10.94 ± 3.15	
	术后 48 h	6	195.25 ± 34.87	147.36 ± 5.06	11.82 ± 2.71	
	术后 72 h	6	206.62 ± 24.73	143.19 ± 5.88	10.51 ± 3.15	
模型组	术后 24 h	8	$482.17\pm37.91^{\text{ a}}$	$117.83\pm6.61^{\text{ a}}$	16.52 ± 2.19^{a}	
	术后 48 h	6	$415.77 \pm 28.64^{\rm \ a}$	$125.86\pm5.49^{\text{ a}}$	$14.98\pm2.43^{\text{ a}}$	
	术后 72 h	5	$356.83 \pm 31.13^{\rm \ a}$	131.57 ± 4.98^{a}	12.72 ± 3.42	
川芎嗪组	术后 24 h	10	$401.82 \pm 31.67^{\rm \ ab}$	$128.54 \pm 5.50^{\rm ab}$	13.76 ± 2.18^{ab}	
	术后 48 h	8	$353.57 \pm 38.19^{\rm \ ab}$	134.42 ± 4.98^{ab}	$11.05\pm1.94^{\rm \ b}$	
	术后 72 h	6	327.39 ± 37.78 a	$139.49 \pm 5.74^{\rm \ b}$	9.26 ± 2.34	
					,	

注:与假手术组同期比较,^aP<0.05;与模型组同期比较,^bP<0.05

- 2.3 各组心肌 SOD 活性比较 (表 1):与假手术组同期比较,模型组大鼠心肌 SOD 活性下降,于 24 h 达谷值,48 h 后又开始上升,差异均有统计学意义 (均P<0.05);与模型组同期比较,川芎嗪组各时间点 SOD 活性明显升高,差异均有统计学意义 (均P<0.05),72 h 时已恢复至假手术组水平。
- **2.4** 心肌 MDA 含量比较 (表 1):与假手术组同期比较,模型组大鼠心肌 MDA 水平明显升高,24 h、48 h 比较差异有统计学意义 (均 P<0.05);与模型组同期比较,川芎嗪组 MDA 水平明显降低,24 h、48 h 比较差异有统计学意义 (均 P<0.05)。

3 讨论

据 2012 年的文献统计,从 2003 年至 2007 年, 美国每年严重脓毒症的发生率增长了 71%,其医疗 费用高达 243 亿美元^[5]。虽然美国胸科医师协会/危 重病医学会(ACCP/SCCM)针对脓毒症制定出一整 套早期诊断和治疗的方案,但是病死率仍未得到很大的改善。

研究发现,临床上严重感染和感染性休克患者血浆中 N 末端 B 型利钠肽前体 (NT-proBNP)的水平普遍升高,常伴有 cTnI 升高及局部室壁运动 / 左室舒张期充盈的变化,且 NT-proBNP 及 cTnI 的水平与病情的严重程度及预后有相关性,其机制可能与感染相关性心肌抑制有关,而经过治疗,患者的心肌抑制得到好转后,病死率可明显下降^[6-7]。经过多年的研究,关于脓毒症时心肌损伤的许多机制已经阐明,如炎症因子的直接损害^[8]、能量代谢异常^[9]、交感 - 肾上腺素髓质系统的激活^[10]等,其中,氧自由基损伤^[11]是重要的机制之一。脓毒症时机体产生大量氧自由基可攻击膜脂、膜蛋白、核苷酸等大分子,破坏了膜的完整性和酶功能,直接导致细胞损伤或死亡。此外,氧自由基还影响到细胞的钙超载及心肌能量代谢,加重心肌的损伤。

近年来,西医对于改善脓毒症心肌损伤方面并无特效的药物,研究发现,经过积极的液体复苏后严重脓毒症患者的 NT-proBNP、cTnI 水平及心排血指数可明显改善,病死率下降^[12]。另有研究发现,乌司他丁联合大黄可减轻脓毒症的心肌损伤,改善心功能,缩短 ICU 住院时间,改善患者预后,其机制可能与减轻炎症反应相关^[13]。

而中医中药在通过抗氧化、清除氧自由基、减轻心肌损伤方面有着巨大的优势,研究发现益气活血复方制剂能通过改善脓毒症时心肌线粒体的代谢障碍,阻断氧化应激的恶性循环,清除氧自由基,以及减轻炎症反应,达到减轻心肌损伤的作用[14-16]。在单味药方面的研究却很少。川芎嗪长期应用于心血管领域,研究发现其具有提高内源性 SOD 活性、清除氧自由基等多种抗氧化作用[17-18]。本研究中通过 cTnI 来观察脓毒症大鼠的心肌损伤,结果发现川芎嗪组及模型组术后出现 cTnI 升高,与假手术组比较差异有统计学意义,且于 24 h 达到峰值,提示脓毒症的早期即发生了心肌损伤,而川芎嗪组 cTnI 升高程度较模型组低,提示川芎嗪对脓毒症大鼠有心肌保护作用。

本研究发现,与假手术组比较,模型组心肌组织中 MDA 浓度升高,同时 SOD 活性下降,证明氧自由基以及由其引起的氧化应激反应在脓毒症心肌损伤中起重要的作用。而与模型组比较,川芎嗪组大鼠心肌组织中的 MDA 含量较低而 SOD 的含量升高,说明川芎嗪可降低大鼠心肌组织中的 MDA 含量,

提高 SOD 活性,提示川芎嗪保护脓毒症心肌损伤的 机制与其抗氧化作用有关。

参考文献

- [1] Beck SR. Myocardial injury in critically ill patients. JAMA, 1995, 274 (21): 1672–1673.
- [2] 潘小进,孙华. 兔脓毒症早期心肌功能的变化. 中国危重病急救医学,2004,16(6):355-357.
- [3] 王丽, 吕圭源, 陈素红. 川芎嗪药理作用的研究进展. 医学信息 (上旬刊), 2011, 24(2): 1116-1118.
- [4] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc, 2009,4(1):31-36.
- [5] Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. Crit Care Med, 2012, 40 (3): 756-761.
- [6] 胡雪珍, 卢中秋, 李志涛, 等. 黄芪注射液对脓毒症患者心肌损伤干预作用的观察. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(6): 346-348.
- [7] 黄志俭,柯明耀,康丽娟,等.B型脑钠肽对脓毒症风险分层及 预后判断的初探.中国危重病急救医学,2011,23(8):495-496.
- [8] 尹海燕,韦建瑞,张锐,等.脓毒症大鼠心肌细胞 Toll 样受体 4 和炎症因子基因表达的变化及作用机制.中国危重病急救医学,2009,21(8):488-491.
- [9] 陈昌勤,张召才,严静.脓毒症和心肌线粒体损伤.中国危重病 急救医学,2007,19(10):630-632.
- [10] 王书鹏,李刚.β 肾上腺素能在脓毒症中调节作用的新进展. 中国危重病急救医学,2011,23(8):505-508.
- [11] Bonnemeier H, Weidtmann B. Mechanisms of myocardial depression in sepsis: association of L-type calcium current density and ventricular repolarization duration. Crit Care Med, 2010, 38(2):724-725.
- [12] 张新亮,秦延军,卞晓华,等.液体复苏对创伤致严重脓毒症和脓毒性休克患者心肌损伤的影响.中国危重病急救医学,2012.24(4):222-224.
- [13] 徐杰,宋樱花,马明远,等.乌司他丁联合大黄治疗对严重脓毒症心肌损伤的影响.中国中西医结合急救杂志,2012,19(3):
- [14] 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):
- [15] 邵婧,王国兴,金明,等.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.中国中西医结合急救杂志,2010,17(3):163-165.
- [16] 陈全福,张敏州,杨澄,等.益气活血中药对脓毒症心肌抑制的保护作用研究.中国中西医结合急救杂志,2011,18(3):163-166
- [17] 金可可,陈雷,王卫,等.缺血预处理加用川芎嗪抑制肠缺血/再灌注性心肺细胞凋亡.中国中西医结合急救杂志,2005, 12(6):351-354.
- [18] 鹿中华,王锦权.川芎嗪对脓毒症致肝损伤保护作用的研究进展.中国中西医结合急救杂志,2008,15(4):252-253.

(收稿日期:2012-11-20)(本文编辑:李银平)

•广告目次•

① 广东天普药业: 天普洛安	封二
② 天津红日药业: 血必净注射液	插页
③ 珠海健帆: 血液灌流器	插页
④ 天津生化制药: 琥珀氢可	封三
⑤ 江苏新晨: 艾贝宁 [®] 盐酸右美托咪定注射液	封四