

早期脓毒症大鼠心脏变化特点及卡维地洛 预先干预作用的实验研究

陈军喜^{1,2}, 孙 坚¹, 管细红³, 贾宝辉¹, 夏芝辉¹, 闫智杰¹, 吴丽丽¹

摘要 目的 明确早期脓毒症大鼠心脏变化特点及卡维地洛的预先干预作用。方法 40 只 SD 大鼠随机分为脓毒症组(S 组)、脓毒症卡维地洛预先干预组(CS 组)、卡维地洛对照组(C 组)和生理盐水对照组(N 组),CS 组和 C 组给予卡维地洛 10 mg/(kg·d)灌胃,4 周后 S 组和 CS 组大鼠尾静脉注射脂多糖(LPS) 20 mg/kg 制备脓毒症模型,C 组和 N 组注射等容量生理盐水,24 h 后检测各组大鼠心率、血压、血清磷酸激酶(CK)、磷酸激酶同工酶(CK-MB)、N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)浓度,心肌中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和三磷酸腺苷(ATP)的含量,观察心肌形态学改变。结果 卡维地洛可使正常大鼠心率减慢,心肌 MDA 含量下降、SOD 含量升高。LPS 可使大鼠心率增快,血清 CK、CK-MB、NT-proBNP 浓度和心肌 MDA 含量升高,心肌 SOD 和 ATP 含量降低;卡维地洛预先干预可减轻 LPS 所致大鼠的这些变化。4 组大鼠血压和心肌形态学变化差异无统计学意义。结论 早期脓毒症大鼠心率增快,心肌氧化应激,心脏功能受损,心肌能量生成减少。卡维地洛可增强大鼠抗氧化应激能力,卡维地洛预先干预可改善脓毒症心肌能量代谢和心脏功能,可能与其抗氧化应激作用有关。

关键词 卡维地洛;脓毒症;氧化应激;心脏功能

中图分类号 R-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1430-04

脓毒症(sepsis)是感染与感染引起的全身炎症反应^[1],进一步发展可导致感染性休克和多器官功

能障碍综合征,是当前危重病患者死亡的主要原因之一。心脏是脓毒症易损的靶器官之一。现已知炎症反应和交感神经兴奋、氧化应激等参与了脓毒症的病理生理过程。心血管疾病的常用药物卡维地洛作为第 3 代的 β 受体阻滞剂,兼有 α 受体阻滞剂、抗氧化、抗心律失常、抑制中性粒细胞浸润等特性,经过临床观察,长期服用过卡维地洛的患者在发生脓毒症时,治疗效果多较其他未曾服用过此药物的患者好,目前关于卡维地洛对脓毒症心脏的影响研究也不多见,该研究旨在明确卡维地洛预先干预对早期脓毒症大鼠心脏的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 卡维地洛粉剂(美国 Sigma 公司);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(上海纪宁实业有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所);solar3000 多功能心电监护仪(美国 GE 公司);罗氏 2010 电化学发光仪(北京英博科贸有限公司);LG10-2.4A 离心机(北京医用离心机厂);低温高速离心机(D-37520,德国 Sigma 公司);紫外分光光度计(美国 HP 公司);电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司);液相色谱仪(郑州国达仪器设备有限公司);Olympus 光学显微镜(BX51,日本奥林巴斯公司);7170 全自动生化分析仪、JEM-1230 透射电镜(日本日立公司)。

1.2 动物分组及处理 40 只雄性 Wistar 大鼠(南昌大学医学院实验动物科学部提供),体重 250 ~ 300 g,随机分为脓毒症组(S 组)、脓毒症卡维地洛预先干预组(CS 组)、生理盐水对照组(N 组)和卡维地洛对照组(C 组),每组 10 只。① CS 组大鼠给予卡维地洛 10 mg/(kg·d)灌胃,1 次/d;4 周后尾

2015-04-30 接收

基金项目:江西省卫生厅科技计划课题(编号:20133083);南昌市级科技计划项目(编号:洪科发计字[2012]171 号第 15 项)

作者单位:¹南昌大学第四附属医院重症医学科,南昌 330003

²南昌大学医学院研究生院,南昌 330031

³江西省人民医院护理部,南昌 330006

作者简介:陈军喜,女,博士研究生,副主任医师;

孙 坚,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: cdsfysj@163.com

significant difference between the trial group and the control group. **Conclusion** Tree shrew prefers to stay in the dark box. The suitable voltage for foot-shock on tree shrew is 16 V. The fear conditioning memory can be evoked and erased by foot-shock.

Key words tree shrew; foot-shock; fear conditioning memory formation and erasing; light/dark box

静脉注射 LPS(20 mg/kg) 制备脓毒症模型; ② S 组大鼠给予卡维地洛等容量的生理盐水灌胃, 4 周后尾静脉注射 LPS(20 mg/kg) 制备脓毒症模型; ③ N 组大鼠给予与卡维地洛等容量的生理盐水灌胃, 尾静脉注射与 LPS 等容量的生理盐水; ④ C 组大鼠给予卡维地洛 10 mg/(kg·d) 灌胃, 1 次/d; 4 周后尾静脉注射与 LPS 等容量的生理盐水。

1.3 动脉血压、心率测定 以注射 LPS 为时间起点, 24 h 后各组实验大鼠于 10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉后, 行右股动脉插管、连接多功能心电监护仪测定动脉血压、心率。

1.4 心肌酶谱、血清 N 末端脑钠肽前体 (amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) 检测 测完血压心率后, 心脏穿刺取血 4 ml, 2 ml 用于全自动生化检测仪检测心肌酶谱磷酸肌酸激酶(creatine kinase, CK) 和磷酸肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB); 2 ml 用于电化学发光法测定大鼠血清 NT-proBNP。

1.5 心肌组织处理及心肌 SOD、MDA 和 ATP 检测 取血后立即开胸, 迅速取出大鼠全心室, 心尖处三分之一液氮冻存以备心肌三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP) 测定, 中间三分之一福尔马林固定以备病理检查, 心底三分之一组织匀浆后按试剂盒方法测定 SOD 和 MDA 含量。以反相高效液相色谱法测定 ATP 含量。

1.6 病理检查 光镜标本经 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡切片, HE 染色后光镜观察, 电镜标本经 3% 戊二醛溶液固定, 1% 锇酸后固定, 乙醇-丙酮溶液逐级脱水, EPON812 包埋, AO 恒低温切片机制片, 醋酸铀和枸橼酸双染色, 电镜观察。4 组标本处理、电镜观察条件等均相同。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠心率、血压、心功能比较 与 N 组比较, S 组大鼠心率明显增快, 而 C 组和 CS 组大鼠心率明显减慢, S 组和 CS 组大鼠血浆 CK、CK-MB 和 NT-proBNP 浓度均明显增高 ($P < 0.05$)。与 S 组比较, C 组和 CS 组大鼠血浆 CK、CK-MB 和 NT-proBNP 浓度均明显下降 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, CS 组血浆 CK、CK-MB 和 NT-proBNP 浓度均明显增高 ($P < 0.05$), 而心率差异不大。4 组中 S 组血压最低, 其次为 CS 组, 再次为 C 组, 但各组间血压差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠心肌 MDA、SOD 和 ATP 浓度比较 与 N 组比较, S 组心肌 MDA 浓度明显增加, SOD、ATP 浓度明显降低 ($P < 0.05$); CS 组心肌 ATP 明显下降 ($P < 0.05$), 但 MDA 和 SOD 浓度与 N 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组心肌 MDA 浓度明显下降, SOD 浓度明显上升 ($P < 0.05$), 而 ATP 浓度与 N 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 S 组比较, CS 组和 C 组心肌 MDA 明显下降, SOD、ATP 浓度上升 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, CS 组心肌 ATP 浓度明显下降 ($P < 0.05$), 而心肌 MDA 和 SOD 浓度差异两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠心肌病理改变 光镜下心肌病理改变: N 组和 C 组心肌细胞排列均匀整齐, 横纹清楚, 细胞大小均一, 心肌细胞间隙无变化。S 组心肌细胞略肥大, 心肌细胞排列稍紊乱, CS 组心肌变化介于两者之间。4 组间差异并不显著。

电镜下心肌线粒体改变: C 组与 N 组心肌细胞内线粒体结构完整, 形态正常, S 组心肌细胞内线粒体密度降低, 体积增大, 嵴数量减少, 嵴膜清晰度下降, 基质电子密度减低, 部分粗面内质网增生, 增生的粗面内质网常密集成片, 形成指纹状结构或围绕

表 1 各组大鼠心率、血压、心功能比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

项目	N 组	S 组	CS 组	C 组	F 值	P 值
心率(次/分)	412 ± 20	438 ± 24**	365 ± 16***	354 ± 13***	44.725	0.000
收缩压(kPa)	17.5 ± 1.2	16.4 ± 1.5	16.7 ± 1.3	17.3 ± 1.1	1.940	0.141
舒张压(kPa)	13.1 ± 0.7	11.5 ± 1.7	11.7 ± 1.3	12.1 ± 0.9	2.074	0.106
CK(U/L)	791.5 ± 181.8	1 516.5 ± 284.0**	1 033.4 ± 143.2***	779.4 ± 203.1 ^{##}	27.097	0.000
CK-MB(U/L)	428.2 ± 227.8	1 024.2 ± 260.8**	687.7 ± 283.9***	412.4 ± 215.3 ^{##}	13.328	0.000
NT-proBNP(pg/ml)	160.24 ± 29.5	425.7 ± 67.7**	342.3 ± 65.3***	150.8 ± 27.6 ^{##}	70.876	0.000

与 N 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 S 组比较: *** $P < 0.01$; 与 CS 组比较: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

表2 各组大鼠心肌MDA、SOD、ATP含量比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

项目	N组	S组	CS组	C组	F值	P值
MDA(nmol/gprot)	7.624 ± 1.812	12.471 ± 2.840**	6.290 ± 0.843##	4.973 ± 0.743***##	33.958	0.000
SOD(U/gprot)	0.399 ± 0.042	0.298 ± 0.085**	0.427 ± 0.063##	0.452 ± 0.035***##	9.664	0.000
ATP(μmol/g)	9.8 ± 1.8	4.8 ± 0.7**	5.9 ± 1.0*#	9.9 ± 1.7## ^Δ	43.274	0.000

与N组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与S组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01; 与CS组比较: ^Δ P < 0.05

变性的线粒体; CS组心肌细胞线粒体也表现为密度降低, 体积增大, 嵴数量减少, 基质电子密度降低, 但程度较S组减轻。

3 讨论

脓毒症患者中大约40%~50%会合并心脏功能不全(sepsis-induced myocardial dysfunction, SIMD), 其中出现严重心功能衰竭(心衰)者约7%^[2]。近30年来关于SIMD的研究没有取得实质性进展, 近年来有心肌保护作用的β受体阻滞剂在脓毒症中的应用逐渐受到重视^[3]。研究^[4]显示β受体阻滞剂可产生抗炎和心肌保护作用, 如果预先给予β受体阻滞剂可降低脓毒症大鼠的死亡率。

β受体阻滞剂可减慢心率、降低心肌耗氧、改善心肌供血。而快速心律失常作为脓毒症的临床特征, 一直被认为是对心脏充盈不良、肾上腺素能神经刺激、发热现象的反映。心率也常作为预测感染性休克患者存活率的重要因素^[5]。本研究显示预先给予β受体阻滞剂卡维地洛可明显减慢大鼠在脓毒症时的心率, 而对血压无明显不良影响。

研究^[6]显示, 脓毒症时心肌受抑制情况常常存在, 甚至进展到心功能不全。血清CK和CK-MB检测对心肌损伤的初步筛查具有一定的特异性。其中CK-MB主要存在于心肌细胞, 当心肌细胞受损时, CK-MB从心肌细胞内释放, 其升高程度与心肌损害程度呈正相关性。NT-proBNP是由心室释放的心脑神经激素, 可以更加敏感地反映心功能^[7], 本实验中大鼠在发生脓毒症24h时CK、CK-MB、NT-proBNP值均明显升高, 这个结果与临床上观察到的心肌受损后CK及CK-MB在6~24h内急剧升高现象相符。卡维地洛对正常大鼠CK、CK-MB、NT-proBNP并无影响, 但预先给予卡维地洛干预可降低脓毒症大鼠CK、CK-MB、NT-proBNP值, 不过这些心功能指标仍明显高于正常水平, 说明卡维地洛对早期脓毒症大鼠心脏功能有一定的改善作用。

氧化应激是导致衰老和疾病的一个重要因素。脓毒症时, 由于氧化应激, 自由基大量产生, 抗氧化

剂则相对减少或产生不足, 细胞氧化损伤不可避免^[8]。SOD是一种重要的抗氧化金属酶, 其活性可反映机体氧化应激水平、防御自由基损伤、保护生物膜免受自由基攻击伤害的能力^[9-10]。MDA是脂质过氧化的重要指标, 是具有损害作用的氧化应激产物。脓毒症大鼠心肌SOD含量明显下降, MDA含量明显增加, 提示脓毒症时, 脂质过氧化反应增强, 氧自由基生成大量增加, 超过机体的清除能力, 而卡维地洛能降低正常大鼠及脓毒症大鼠心肌MDA含量, 升高SOD含量, 说明卡维地洛可减弱心肌脂质过氧化, 增强心肌抗氧化能力。

机体各种生理活动最直接的供能物质—ATP合成于细胞线粒体内膜, 而线粒体是对各种损伤最为敏感的细胞器之一, 脓毒症时, 心肌线粒体合成的能量不能满足心脏需要, 或线粒体受损后能量合成不足, 则会出现心脏功能障碍, 甚至衰竭^[11]。本研究证实早期脓毒症心脏组织中的ATP含量就明显降低, 卡维地洛并不影响正常心肌ATP含量, 但预先给予卡维地洛可减轻脓毒症心肌ATP含量的下降。

理论上心功能受损时心肌细胞形态也会有改变。脓毒症时心肌ATP降低也应与线粒体功能受损密不可分。但本实验结果显示: 脓毒症心肌在光镜下无明显变化, 电镜下心肌线粒体虽有一定程度的肿胀、基质密度不均匀的降低, 但变化并不显著, 卡维地洛预先干预对早期脓毒症心肌形态的影响也不明显。可能观察的时机是脓毒症早期, 心肌受损的程度还不至于引起心肌细胞形态结构明显改变。

综上所述, 脓毒症早期表现为心率增快、心功能受损、心肌氧化应激、线粒体合成ATP减少可能是SIMD发生的一个病理生理机制; 卡维地洛可减慢正常大鼠心率, 提高抗氧化应激能力, 预先给予卡维地洛可减轻脓毒症时大鼠心肌ATP合成障碍, 改善心功能, 其机制可能与其抗氧化应激有关。但卡维地洛并不能完全纠正脓毒症时大鼠的心脏异常改变, 由此推测除氧化应激外还有其它机制参与了SIMD的发生。

参考文献

- [1] Dellinger R P, Levy M M, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012 [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(2): 580-637.
- [2] Court O, Kumar A, Parrillo J E, et al. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock [J]. *Crit Care*, 2002, 6(6): 500-8.
- [3] Fernandes C J Jr, de Assuncao M S. Myocardial dysfunction in sepsis: a large, unsolved puzzle [J]. *Crit Care Res Pract*, 2012, 2012: 896430.
- [4] Ackland G L, Yao S T, Rudiger A, et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of β -adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(2): 388-94.
- [5] Huston J M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(12): 2762-8.
- [6] Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, et al. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment [J]. *J Crit Care*, 2014, 29(4): 500-11.
- [7] 程寅, 冯媛媛. 老年维吾尔族慢性心力衰竭患者 N 末端脑钠肽前体变化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 828-30.
- [8] Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob S M, et al. Mitochondrial function in sepsis [J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(5): 532-42.
- [9] Bayir H, Kagan V E. Bench-to bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory [J]. *Crit Care*, 2008, 12(1): 206.
- [10] Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(12): 639-45.
- [11] 赵兰, 郑霞, 方强. 线粒体在脓毒症导致心力衰竭中的作用 [J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(1): 9-11.

Experimental research on the characteristics of early septic rats' hearts and the advanced intervention effects of carvedilol

Chen Junxi^{1,2}, Sun Jian¹, Guan Xihong³, et al

(¹Dept of Intensive Care Unit, The Forth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003;

²Graduate School of Medical College of Nanchang University, Nanchang 330031;

³Dept of Nursing, Jiangxi Province People's Hospital, Nanchang 330006)

Abstract Objective Trying to demonstrate the characteristics of early septic rats' hearts changes and the advanced intervention effects of carvedilol. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into 4 groups: sepsis group (S group), carvedilol-advanced-intervention sepsis group (CS group), carvedilol group (C group) and control group (N group). The S and CS groups were injected lipopolysaccharide (LPS) (20mg/kg) into caudal vein to induce sepsis, the C and N groups were injected with the same volume of normal saline. The carvedilol had been orally administered 10 mg/kg once a day for 4 weeks prior to the injection of LPS in C and CS groups. The S and N groups were administered normal saline instead. After 24 hours, the items including heart rate, blood pressure, and the concentrations of serum creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB), amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and adenosine triphosphate (ATP) in myocardium were detected and compared, and the morphological changes of myocardium were observed. **Results** Carvedilol could slow down heart rate, decrease myocardial MDA concentration and increase myocardial SOD concentration in normal rats. LPS could increase rats' heart rate and concentrations of serum CK, CK-MB, NT-proBNP and MDA in myocardium, and it also could decrease concentrations of SOD and ATP in myocardium. Carvedilol-advanced-intervention could reduce the effect of the LPS in the rats. **Conclusion** Sepsis in early stage could induce the rises of heart rate, oxidative stress, damages of cardiac function, and reduction of myocardial energy generation of the rats. However, carvedilol can enhance the ability of antioxidant of the rats. Carvedilol-advanced intervention of sepsis could ameliorate myocardial energy metabolism and cardiac function that may be related to the antioxidant property of carvedilol.

Key words carvedilol; sepsis; oxidative stress; cardiac function