

氢化可的松对兔脓毒症早期心肌功能的影响

冯恩民 孙华 夏延贞

【摘要】 目的 探讨不同剂量氢化可的松(HC)对脓毒症早期心肌功能的影响。方法 将 24 只中国白兔随机均分为模型组、小剂量 HC 组(10 mg/kg)、大剂量 HC 组(100 mg/kg)3 组。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备兔脓毒症模型。于制模前、给药前(CLP 后 1 h)以及给药后 2、4 和 6 h 监测左室功能变化;取动脉血,检测血清中肌钙蛋白 I(cTnI)和一氧化氮(NO)含量;用免疫组化法观察心肌诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达。结果 给药前各组动物左室内压上升/下降最大速率($\pm dp/dt \max$)均较制模前明显下降,NO 明显升高(P 均 <0.05)。给药 6 h 小剂量 HC 组 $\pm dp/dt \max$ 水平均明显高于模型组和大剂量 HC 组,cTnI 水平明显低于模型组和大剂量 HC 组(P 均 <0.05);但两个剂量 HC 组 NO 水平均明显低于模型组(P 均 <0.05),心肌 iNOS 阳性细胞率亦较模型组低[模型组:(81.8 ± 15.8)%,小剂量 HC 组:(56.7 ± 21.2)%,大剂量 HC 组:(54.6 ± 16.1)%, P 均 <0.05]。结论 脓毒症状态下心肌功能可发生明显损伤,早期应用小剂量 HC 对心肌功能有一定的保护作用。

【关键词】 脓毒症; 心肌; 氢化可的松; 一氧化氮; 心肌功能; 肌钙蛋白; 兔

Effects of hydrocortisone on myocardial function in early stage of sepsis in rabbits FENG En-min, SUN Hua, XIA Yan-zhen. Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

Corresponding author: SUN Hua, Email: jsntsh@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of different dose of hydrocortisone (HC) on myocardial function in early stage of sepsis in rabbits. Methods Twenty-four male rabbits were randomly divided into three groups: model group ($n=8$), HC low dosage group (10 mg/kg, $n=8$), HC high dosage group (100 mg/kg, $n=8$). The model was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP). The function of the left ventricle was monitored and blood was drawn at 5 time points [before CLP, before treatment (1 hour after CLP) and 2, 4, 6 hours after the treatment] to determine concentrations of cardiac troponine I (cTnI) and nitric oxide (NO). The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) of myocytes was investigated. Results Compared to the basic levels, maximal positive and negative change in filling pressure versus time ($\pm dp/dt \max$) decreased significantly, while NO increased significantly before treatment in all groups (all $P<0.05$). At 6 hours after treatment, $\pm dp/dt \max$ in HC low dosage group was significantly higher than that in the other two groups, while cTnI was significantly lower in HC low dosage group than that in the other two groups (all $P<0.05$). NO content in two HC groups was significantly lower than that in model group (all $P<0.05$), and the iNOS expressions on myocardial cells was weaker than model group [model group: (81.8 ± 15.8)%, HC low dosage group: (56.7 ± 21.2)%, HC high dosage group: (54.6 ± 16.1)%, all $P<0.05$]. Conclusion Myocardial function is remarkably damaged in rabbits with sepsis. HC low dosage group exerts protective effect on myocardial cells in early stage of sepsis.

【Key words】 Sepsis; Myocardium; Hydrocortisone; Nitric oxide; Myocardial function; Cardiac troponine; Rabbit

随着人们对脓毒症和感染性休克研究的深入,脓毒性心肌抑制正逐渐被人们所关注。动物实验研究证实,诱生型一氧化氮合酶(iNOS)催生的一氧化氮(NO)在脓毒性心肌抑制中发挥重要作用,而糖皮质激素可以通过多种途径抑制 iNOS 表达^[1]。那么在脓毒症早期应用糖皮质激素会对心肌功能产生怎样的影响便成为人们关注的问题。为此,本研究采用

盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型,观察不同剂量氢化可的松(HC)对兔脓毒症早期心肌功能的影响,并分析可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备: 24 只健康雄性中国白兔,体重 2.7~3.0 kg,由南通大学实验动物中心提供。按照随机数字表法分为模型组、小剂量 HC 组(10 mg/kg)和大剂量 HC 组(100 mg/kg)3 组,每组 8 只。经耳缘静脉注射戊巴比妥 30 mg/kg 麻醉动物,右颈总动脉插管,监测左室内压上升/下降最大速率($\pm dp/dt \max$);右股动脉插管用于采血。采用

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.006

基金项目:江苏省南通市科技计划项目(S5022)

作者单位:226001 江苏,南通大学第二附属医院 ICU(冯恩民现在山东省寿光市人民医院 ICU 工作)

通信作者:孙华,Email:jsntsh@163.com

CLP 方法制备脓毒症模型^[2]。模型建立并稳定 1 h 后,分别经耳缘静脉注射不同剂量 HC(注射用氢化可的松琥珀酸钠购于天津生物化学制药有限公司,批号为国药准字 H12020493);模型组注射等量生理盐水。

1.2 观察指标及检测方法:于动物制模前、给药前(CLP 后 1 h)及给药后 2、4 和 6 h,用 BL-410 多功能生理记录仪监测各组动物 $\pm dp/dt \max$ 变化。同时时间点采集动脉血,离心取血清,置于 -20°C 冰箱保存,参照试剂盒说明书用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清肌钙蛋白 I(cTnI)和一氧化氮(NO)浓度(试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供,其中 cTnI 为进口分装,美国 ADL 公司生产)。

应用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP)进行免疫组化染色,光镜下观察心肌 iNOS 的表达,免疫组化试剂为抗兔单克隆抗体 NOS2(克隆号 N20,美国 SANTA CRUZ 生物技术公司,稀释度 1:100)。每张切片于 100 倍镜下随机选取 5 个视野,计算阳性细胞百分率(阳性率)。iNOS 阳性细胞为细胞质染色呈棕黄色,并可见棕黄色颗粒沉积。

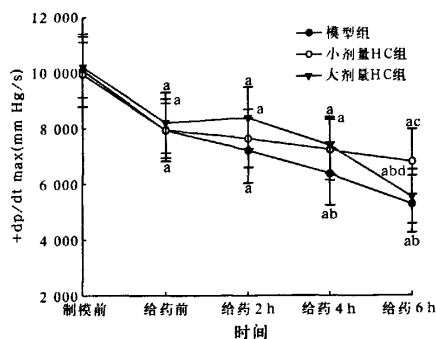
1.3 统计学分析:应用 SPSS 10.0 软件进行统计学

分析,所得数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行重复测量资料的方差分析,不满足方差齐性的资料采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

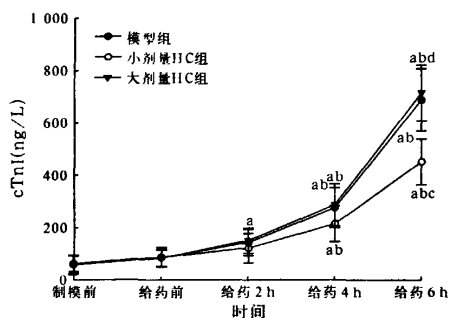
2.1 心肌功能变化(图 1):制模前各组 $\pm dp/dt \max$ 比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。给药前各组 $\pm dp/dt \max$ 均较制模前明显下降(P 均 <0.05),但各组间比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。与给药前相比,模型组和大剂量 HC 组 $\pm dp/dt \max$ 分别于给药 4 h 和 6 h 开始出现明显下降(P 均 <0.05);给药 6 h 小剂量 HC 组 $\pm dp/dt \max$ 水平均明显高于模型组和大剂量 HC 组,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.2 血清 cTnI 和 NO 变化(图 2):制模前各组血清 cTnI、NO 比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。给药前各组 NO 明显升高(P 均 <0.05),cTnI 变化不明显;组间各指标无明显差异(P 均 >0.05)。模型组随给药时间延长 cTnI、NO 呈上升趋势;6 h 时小剂量 HC 组 cTnI 明显低于模型组和大剂量 HC 组,4 h 和 6 h 时大剂量 HC 组和小剂量 HC 组 NO 明显低于模型组(P 均 <0.05)。



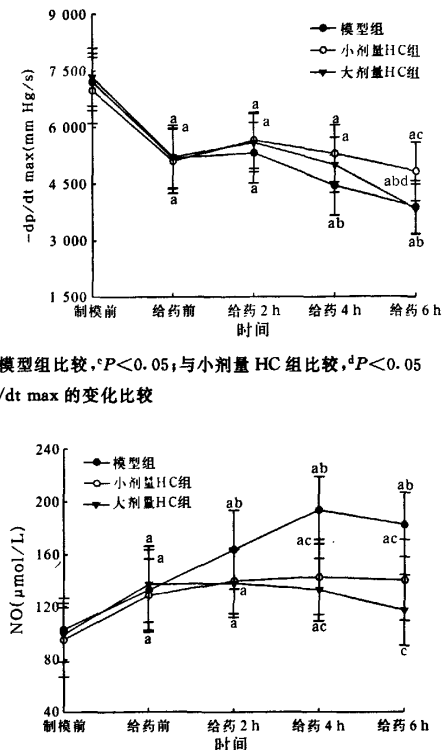
注:与本组制模前比较, $^aP<0.05$;与本组给药前比较, $^bP<0.05$;与模型组比较, $^cP<0.05$;与小剂量 HC 组比较, $^dP<0.05$

图 1 各组动物不同时间点 $\pm dp/dt \max$ 的变化比较



注:与本组制模前比较, $^aP<0.05$;与本组给药前比较, $^bP<0.05$;与模型组比较, $^cP<0.05$;与小剂量 HC 组比较, $^dP<0.05$

图 2 各组动物不同时间点血清 cTnI、NO 的变化比较



2.3 心肌组织 iNOS 阳性表达(彩色插页图 3):模型组 iNOS 阳性细胞内见均一、较大的棕黄色颗粒,且模型组阳性率 $[(81.8 \pm 15.8)\%]$ 明显高于小剂量 HC 组 $[(56.7 \pm 21.2)\%]$ 和大剂量 HC 组 $[(54.6 \pm 16.1)\%, P$ 均 $<0.05]$;小剂量 HC 组部分心肌细胞有均一、细密的棕黄色颗粒;大剂量 HC 组阳性率与小剂量 HC 组无明显差异。

3 讨论

近 20 年来脓毒症和感染性休克的发病率、致死率呈逐渐上升趋势^[3]。欧洲重症患者脓毒症事件(SOAP)研究报告有 37.4% 的重症监护病房(ICU)患者患有脓毒症,62.6% 的严重脓症患者并发循环衰竭^[4]。严重脓毒症和感染性休克的治疗仍是 ICU 所面临的棘手问题。有实验研究证实,地塞米松可明显减轻内毒素对心肌的损伤^[5]。而本研究中则是通过采用与临床患者发病极为相似的 CLP 制备脓毒症动物模型,观察不同剂量 HC 对兔脓毒症早期心肌功能的影响。

据研究报道,大鼠在 CLP 后 3 h 血浆中 cTnT 和 NO 开始出现明显升高^[6]。而本研究中发现,CLP 后 1 h 即出现 $\pm dp/dt \max$ 明显下降,同时伴有 NO 水平升高,免疫组化染色结果亦显示脓毒症动物模型中心肌细胞 iNOS 表达呈强阳性。据研究证实,脓毒症时的心肌功能障碍是多种机制共同作用的结果^[7],其中 iNOS 所催生的 NO 在多种机制中发挥了直接或间接的作用^[8],当脓毒症发展为感染性休克后,血中 NO 仍能呈进行性升高趋势^[9]。另有研究发现,给脓毒症大鼠应用过亚硝酸盐中和剂可改善其心脏功能障碍^[10]。

本研究中观察到,大剂量或小剂量 HC 均可明显抑制血中 NO 的升高,并抑制心肌中 iNOS 的表达,与文献报道的糖皮质激素可通过多种途径抑制 iNOS 表达的结果^[11]基本一致。在急性炎症初期,糖皮质激素能增加血管的紧张性,减轻充血,降低毛细血管通透性,同时抑制白细胞浸润及其吞噬作用,减少各种炎症介质的释放,阻断炎症的“瀑布样”连锁反应^[11],有效减少自身组织在机体扩大的应激反应中所受炎症介质“双刃剑”的损伤。但是本研究中发现,小剂量 HC 可明显延缓心肌功能下降和 cTnI 升高,而大剂量 HC 却并未显示出对兔脓毒症早期心肌的保护作用,原因考虑有以下几点:①大剂量糖皮质激素依赖的非基因效应在加强心肌收缩的同时,增加了心肌氧耗,加重了心肌缺氧性损伤;②大剂量糖皮质激素过度抑制了 NO 的表达,使白细胞与内

皮细胞间的黏附作用增强^[12],局部炎症反应加重;③大剂量糖皮质激素过度抑制了机体的免疫功能,造成感染扩散,导致心肌细胞受到严重损伤。但以上观点仍需要更大样本量的实验研究来证实。除此之外,是否存在其他机制亦尚待进一步探索。

综上所述,本结果显示,在兔脓毒症模型中早期应用小剂量 HC 可对心肌起到一定的保护作用,延缓心肌功能下降,而大剂量 HC 对心肌无明显保护作用。因目前尚无应用糖皮质激素治疗脓毒症的大规模临床研究,所以新的严重感染和感染性休克治疗指南中暂不推荐糖皮质激素应用于未出现休克的脓症患者^[13]。糖皮质激素在临床上治疗脓毒症的效果、指征、时机和剂量都还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chatterjee S, Premachandran S, Shukla J, et al. Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock. *J Surg Res*, 2007, 140(1):99-108.
- [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] Danai P, Martin GS. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep*, 2005, 7(5):329-334.
- [4] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 2006, 34(2):344-353.
- [5] 王国兴,沈潞华,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.
- [6] 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.
- [7] Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 2007, 35(6):1599-1608.
- [8] Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med*, 2006, 34(2):307-313.
- [9] 王丛华,孙华. 感染性休克与失血性休克早期内皮素和一氧化氮变化规律的比较. *中国危重病急救医学*, 2008, 20(8):495-496.
- [10] Lancel S, Tissier S, Mordon S, et al. Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(12):2348-2358.
- [11] Annane D, Cavaillon JM. Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? *Shock*, 2003, 20(3):197-207.
- [12] 倪俊,于宝军,顾海峰,等. 一氧化氮在中性粒细胞与激活的内皮细胞间黏附中介导的作用. *中国微循环*, 2006, 10(6):419-420.
- [13] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2008. *Intensive Care Med*, 2008, 34(1):17-60.

(收稿日期:2009-01-02)

(本文编辑:李银平)

氢化可的松对兔脓毒症早期心肌功能的影响

(正文见719页)

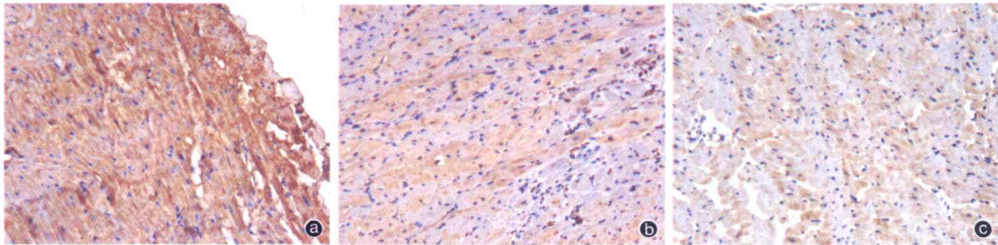


图2 光镜下观察各组动物心肌细胞iNOS表达 模型组(a)iNOS阳性细胞内见均一、较大的棕黄色颗粒;小剂量HC组(b)部分心肌细胞有均一、细密棕黄色颗粒;大剂量HC组(c)iNOS阳性表达与小剂量HC组无明显差异 SP×100

脓毒症大鼠脾脏淋巴细胞凋亡的实验研究

(正文见726页)

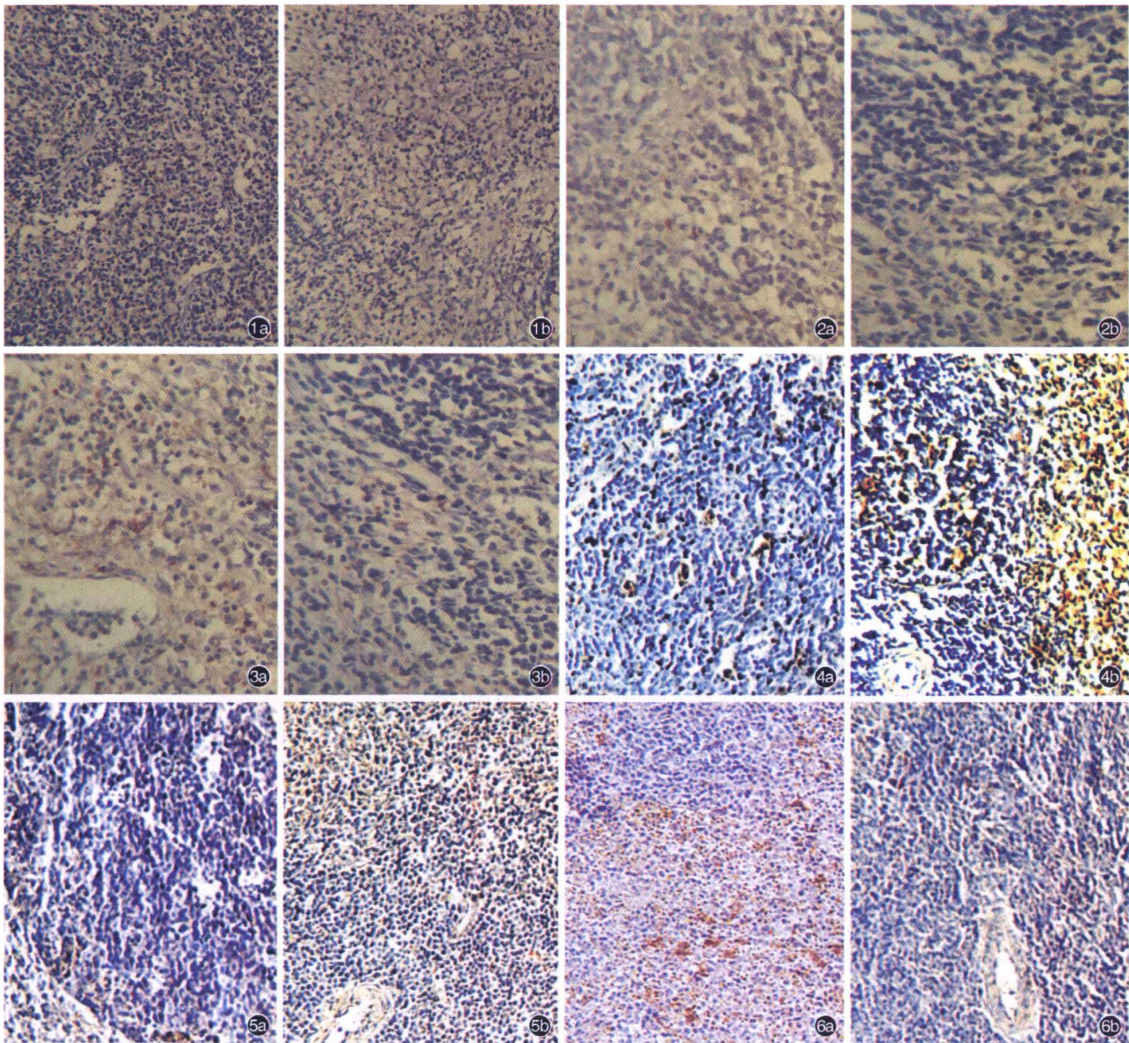


图1 光镜下观察各组大鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞阳性细胞膜呈棕黄色着色 假手术组(a)可见散在CD4⁺T淋巴细胞阳性表达,而模型组24h(b)时CD4⁺T淋巴细胞阳性表达微量 免疫组化×40 图2 光镜下观察各组大鼠脾脏CD8⁺T淋巴细胞阳性细胞膜呈棕黄色着色 假手术组(a)及模型组24h(b)时均可见少量CD8⁺T淋巴细胞阳性表达 免疫组化×40 图3 光镜下观察各组大鼠脾脏CD40⁺淋巴细胞膜呈棕黄色着色 假手术组(a)可见散在CD40⁺淋巴细胞阳性表达;而模型组24h(b)时CD40⁺淋巴细胞阳性表达微量 免疫组化×40 图4 光镜下观察各组大鼠脾脏凋亡细胞核呈棕褐色 假手术组(a)可见微量阳性细胞表达;而模型组24h(b)时可见大量阳性细胞表达 免疫组化×40 图5 光镜下观察各组大鼠脾脏Bax染色阳性细胞质呈棕黄色着色 假手术组(a)有极少量阳性细胞表达;而模型组24h(b)时可见大量阳性细胞表达 免疫组化×40 图6 光镜下观察各组大鼠脾脏Bcl-2染色阳性细胞质呈棕黄色着色 假手术组(a)有大量阳性细胞表达;而模型组24h(b)时阳性细胞表达微量 免疫组化×40