论著

文章编号:1000-5404(2007)02-0094-03

生脉注射液对大鼠烧伤后心肌细胞凋亡的影响

张西联,黄跃生,党永明,张家平,郑 霁,房亚东,周军利,张 琼 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨生脉注射液对大鼠烧伤后心肌细胞凋亡的影响。**方法** SD(Sprague-Dawley)大鼠72只,随机分成单纯烫伤组(B组,$n=36$)和烫伤并应用生脉注射液治疗组(S组,$n=36$),制成30% TBSA Ⅲ度烫伤模型,伤后B组按Parkland公式补液,S组在B组的基础上伤后即刻按4 ml/kg给予生脉注射液,并相应减少补液量,两组均于不同时相点,取左室心肌组织切片,做病理形态学观察,并采用DNA切口末端标记法(TUNEL)和心肌组织caspase-3活性双指标联合检测细胞凋亡。**结果** 病理切片显示S组较B组心肌组织损伤有所减轻;两组心肌细胞TUNEL显示烫伤后6 h呈阳性,伤后12 h达高峰;caspase-3活性变化早于凋亡形态学变化,于伤后3、6 h达峰值;S组较B组在伤后6、12、24 h心肌细胞凋亡指数显著降低($P<0.01$),左心室心肌组织caspase-3活性在伤后3、6、12 h也显著降低($P<0.05$)。**结论** 烧伤后早期心肌细胞凋亡参与了烧伤病理损伤过程。早期应用生脉注射液治疗可以有效地减少心肌细胞的凋亡,进而减轻心肌的损伤,起到保护心肌的作用。

关键词:烧伤;心肌;细胞凋亡;生脉注射液

中图法分类号:R289.5;R322.11;R644.02 **文献标识码**:A

Effect of Shengmai injection on cell apoptosis in rat myocardium after burn

ZHANG Xi-lian, HUANG Yue-sheng, DANG Yong-ming, ZHANG Jia-ping, ZHENG Ji, FANG Ya-dong, ZHOU Jun-li, ZHANG Qiong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Shengmai injection on cell apoptosis in rat myocardium after burn. **Methods** Totally 60 adult Sprague-Dawley rats were subject to 30% TBSA full thickenss scald and were randomly divided into two groups: scald group (sodium lactate ringer's injection was injected after scald according to the formula of Parkland) and Shengmai group (Shengmai injection was applied immediately at dose of 4 ml/kg, and sodium lactate ringer's injection was reduced correspondingly). Another 12 rats served as control for each group. Left ventricle tissue was prepared before scald and at 1, 3, 6, 12, 24 h after scald for pathologic examination. The cell apoptosis was determined by terminal deoxynucleotibyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and detecting caspase-3 activity. **Results** The damage of rat myocardium in Shengmai group was lessened than scald group. The positive staining by TUNEL in rat myocardial cells of the two groups was observed at 6^{th} hour after scald and reached the top level at 12^{th} hour. The change of caspase-3 activity started earlier than apoptosis and reached the peak value at 3^{rd} and 6^{th} hour after scald. However, the apoptosis index of myocardium in Shengmai group was more significantly decreased than that of scald group at 6^{th}, 12^{th} and 24^{th} hour ($P<0.01$), so did the change of caspase-3 activity at 3^{rd}, 6^{th} and 12^{th} hour after scald ($P<0.05$). **Conclusion** The myocardial apoptosis took part in postburn myocardial injury. The postburn myocardial injury could be lessened effectively by early apply of Shengmai injection.

Key words: burns; myocardium; cell apoptosis; Shengmai injection

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522601),国家杰出青年科学基金(30125040)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522601) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040)

作者简介:张西联(1969-),男,陕西省武功县人,硕士研究生,主治医师,主要从事烧伤早期脏器损害方面的研究。现在青海省西宁市解放军第325医院烧伤整形科。电话:(0971)6305497,E-mail: zxl_6917@hotmail.com

通讯作者:黄跃生,电话:(023)68754173, E-mail: yshuang@public.cta.cq.cn

收稿日期:2006-06-22;**修回日期**:2006-10-15

细胞凋亡亦称细胞程序性死亡，它是有核真核细胞主动的、固有的程序化现象。近年来研究已证实严重烧伤早期由于休克缺血缺氧等原因可以造成心肌器质性损害[1]，出现不同程度的细胞凋亡，从而导致心功能减退，并诱发烧伤休克或使组织器官缺血缺氧加重[2]。然而，针对烧伤后心肌损害的防治目前尚缺乏有效的细胞保护药物。由于心肌细胞属终末分化的永久性细胞，出生后基本丧失分裂、增殖能力，所以发生凋亡后基本不可能再生。为此，本实验拟观察生脉注射液对烧伤后心肌细胞凋亡的影响，从而探讨有效的心肌细胞保护药物。

1　材料与方法

1.1　主要材料、试剂及仪器

健康 SD（Sprague-Dawley）大鼠 72 只（第三军医大学实验动物中心提供），雌雄不拘，体质量 200～250 g；生脉注射液（吉林省集安益盛药业股份有限公司，批准文号：国药准字 Z22026097，10 ml/支，药品批号：05051515 4，每升含红参 100 g、麦冬 312 g、五味子 156 g）；TUNEL 检测试剂盒（美国 Roche 公司）；caspase-3 荧光检测试剂盒（美国 Clontech 公司）；日立 F3010 型荧光分光光度仪（日本 Hitachi 公司）；DU-7 紫外分光光度计（美国 Beckman 公司）。

1.2　实验分组及处理方法

72 只大鼠随机分为 2 组：单纯烫伤对照组（B 组，$n=36$）和烫伤应用生脉注射液组（S 组，$n=36$），各组又分为烫伤前、烫伤后 1、3、6、12、24 h 等 6 个时相点，每个时相点 6 只动物。B 组按本所常规方法制备模型[3]：实验前大鼠禁食 12 h，30 g/L 异戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔麻醉，以大鼠体质量计算其 30% 体表面积，背部脱毛，置于 92 ℃水浴中烫伤 18 s，造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤（病理切片证实）。烫伤后按 Parkland 公式（4 ml · kg^{-1} · 1% $TBSA^{-1}$）腹腔注射乳酸林格氏液抗休克补液，于伤后即刻和伤后 4 h 注入 24 h 总量的一半，伤后 8、12、16、20 h 注入另一半。烫伤后动物分笼饲养，自由饮水、进食；S 组模型制备同前，于烫伤后即刻给予 4 ml/kg 生脉注射液，相应减少补液的量，以确保液体抗休克的一致性。

1.3　标本采集与处理

上述 2 组均于各时相点采集大鼠腹主动脉血，抗凝、离心分离血浆于 -20 ℃冻存待测。采血后处死动物，无菌留取心肌组织（左室壁），分 2 份，1 份放入液氮冻存用以制备组织匀浆待检；另 1 份放入 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，用于 HE 染色做病理检查及 TUNEL 细胞凋亡检测。

1.4　心肌组织的常规病理形态学观察

常规石蜡包埋心肌组织，于心肌中部沿心脏轴线每隔 1 mm连续切取 3 张 5 μm 的切片，常规 HE 染色，光学显微放大镜下观察。

1.5　心肌细胞凋亡的原位标记检测与半定量分析

石蜡包埋的心肌组织及切片同上，细胞凋亡的原位标记检测是每一标本取 3 个不同部位的切片各 1 张，脱蜡，再梯度水合后采用末端脱氧核苷酸转移酶（TdT 酶）介导的 dUTP 缺口末端标记法（TUNEL）检测，具体步骤按试剂盒说明书进行。步骤中不加 TdT 酶者作为阴性对照，将正常心肌组织以 DNase Ⅰ（10 μg/ml）消化以诱导 DNA 链断裂，然后重复 TUNEL 法步骤者作为阳性对照，每张切片拍摄 6 个视野计数细胞数，每视野计数 100 个心肌细胞中的阳性细胞数，以凋亡阳性细胞数所占百分比的平均值作为凋亡指数（AI）。

1.6　荧光分析法检测 caspase-3 活性

将上述液氮冻存的心肌组织制备组织匀浆，按说明书操作，略加修改。①绘制 7-氨基-4-三氟甲基香豆素（7-amino-4-trifluoromethyl coumarin，AFC）标准曲线，计算斜率 S（△FU/△μmol/L AFC）；②取 50 μl 心肌组织匀浆上清液，加入 50 μl 反应缓冲液和 5 μl 酶作用底物 DEVD-AFC（1 mmol/L），37 ℃水浴1 h。荧光分光光度计激发光波长 400 nm，发射光波长 505 nm，测定样品孵育前后△FU/h；③计算 caspase-3 活性：caspase 活性 =（△FU/h）× 20/（S · 样品蛋白浓度）$^{-1}$，单位：μmol/L AFC · h^{-1} · mg^{-1}。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　大鼠严重烫伤后不同时相点心肌组织病理观察

B 组：伤后 1 h，心肌组织开始出现损伤性病变，表现为心肌细胞肿胀，肌丝排列紊乱，细胞界限不清、消失，心肌毛细血管充血、红细胞渗出等，伤后 3、6 h 病变进一步加重，严重者出现点片状溶解灶，12、24 h 后病变减轻，主要表现为细胞肿胀和横纹模糊。S 组：伤后 1 h 心肌组织细胞结构基本正常，伤后 3 h见部分心肌细胞肿胀、横纹模糊，伤后 6 h 毛细血管内稍有充血，12、24 h 心肌组织病变逐渐减轻，血管充血消失，心肌病变与同时相点 B 组相比均明显减轻。

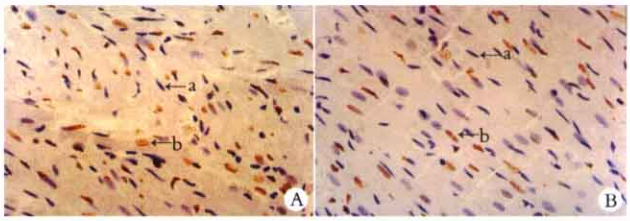
2.2　大鼠严重烫伤后左室心肌细胞凋亡原位标记检测

TUNEL 检测心肌细胞凋亡，正常细胞核呈淡蓝色，凋亡阳性细胞核呈深棕黄或棕褐色，形态较清晰、完整。两组大鼠烫伤前心肌未见凋亡细胞，伤后 3 h 可检测到少量心肌细胞凋亡，伤后 6、12 h 凋亡细胞数明显增多，并持续至 24 h 仍较明显。S 组较 B 组在伤后 3、6、12、24 h 阳性细胞数均有所减少，6 h 减少明显（图 1），并持续至 12、24 h。两组凋亡指数在伤后 6、12、24 h有非常显著差异（$P<0.01$），而在伤后 3 h 无显著差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　大鼠严重烫伤后不同时相点心肌细胞凋亡指数的变化[（$\bar{x} \pm s$）%]

组别	n	烫伤前	烫伤后时间（t/h）			
			3	6	12	24
B 组	6	0	2.13 ± 0.28	4.47 ± 0.53	5.88 ± 0.56	4.23 ± 0.46
S 组	6	0	1.68 ± 0.29	2.58 ± 0.36[a]	4.17 ± 0.47[a]	2.83 ± 0.34[a]

a：$P<0.01$，与 B 组比较



a：正常的心肌细胞，核呈淡蓝色；b：凋亡心肌细胞，核呈深棕黄或棕褐色，形态较清晰、完整

A：单纯烫伤对照组；B：烫伤应用生脉注射液组

图1 大鼠严重烫伤后6 h左室心肌细胞凋亡情况

（TUNEL×400）

2.3 严重烫伤大鼠左室心肌组织caspase-3活性测定

caspase-3活性于伤后3、6 h达峰值；S组较B组左室心肌组织caspase-3活性在伤后3、6、12 h显著降低（$P<0.05$）（表2）。

表2 大鼠严重烫伤后左室心肌组织caspase-3活性的变化

（$n=6$，μmol/L AFC·h^{-1}·mg^{-1}）

组别	烫伤前	烫伤后时间（t/h）				
		1	3	6	12	24
B组	2.25±0.56	2.87±0.71	4.20±0.42	4.12±0.32	3.62±0.33	1.80±0.28
S组	2.13±0.71	2.73±0.55	3.25±0.40[a]	3.42±0.33[a]	3.03±0.35[a]	1.62±0.33

a：$P<0.05$，与B组比较

3 讨论

细胞凋亡在心血管疾病中的作用已使人们对许多心血管疾病有了新的认识。除细胞变性坏死途径外，凋亡可能是心肌缺血性损害机制的重要环节。在缺血性心肌损害中，心肌细胞凋亡可直接导致心脏泵动力来源减少，凋亡细胞局部纤维化可诱发心律失常、心肌组织重塑等[4,5]。在心功能障碍、衰竭发展过程中，凋亡导致的心肌细胞不断丢失很可能是促使心功能从代偿向失代偿转变的重要原因之一。近年来研究表明，动物及人心肌缺血/再灌注过程中均可诱导心肌细胞凋亡[6]。

严重烧伤后，烧伤低血容量性休克可引起心肌的缺血缺氧性损害[2]。究其原因，一方面是大量液体从血管内渗出或吸入性损伤引起呼吸功能障碍，直接引起器官的缺血缺氧损害；另一方面是应激反应、缺血再灌注损伤、失控性炎症反应等致血管内皮细胞和中性粒细胞结构和功能改变，进一步引起微循环障碍，并使心肌细胞合成和释放细胞因子增多，由此加重心肌的缺血缺氧和心肌损害[7]。针对严重烧伤早期心肌器质性损害的发病机制，对于严重烧伤患者心肌缺血缺氧和心肌损害的保护，目前主要采用的是快速复苏补液，而在保护心肌方面，仍然缺乏减轻心肌细胞损伤的有效药物，笔者观察了生脉注射液对大鼠严重烧伤后心肌细胞凋亡的影响，旨在探讨有效的细胞保护药物。

生脉注射液是中药复方制剂，其主要成分为红参、麦冬、五味子[8]。其活性成分中，人参皂苷，具有强心、调节血压、改善循环、促进物质代谢和蛋白质合成等功效；麦冬皂苷，具有改善心肌收缩力、心脏泵功能，抗心律失常，耐缺氧等功效；五味子素，具有增强肝脏解毒功能，促进肝脏蛋白质和糖原的生物合成等功效。生脉注射液的功效是由这3种药物相互作用，相互协调而共同体现出来[9]。目前广泛应用在心脑血管病的治疗中，而在烧伤治疗中的应用尚不多见。

检测细胞凋亡的指标采用caspase-3活性和TUNEL原位凋亡双指标检测。caspase-3处于caspase级联的终末阶段，属执行caspase，caspase-3活化是凋亡发生的标志性生化反应。caspase-3活性和TUNEL原位凋亡双指标检测联合应用，可减少单一指标造成的假阳性/阴性，提高凋亡检测的特异性和可靠性。本实验结果提示：两组心肌细胞TUNEL染色显示烫伤后6 h呈阳性，伤后12 h达高峰。caspase-3活性变化早于凋亡形态学变化，于伤后3、6 h达峰值；S组较B组在伤后6、12、24 h心肌细胞凋亡指数显著降低（$P<0.01$），左心室心肌组织caspase-3活性在伤后3、6、12 h也显著降低（$P<0.05$）；病理形态学也显示S组较B组心肌组织损伤有所减轻。这些结果说明严重烧伤后早期应用生脉注射液治疗可以有效地减少心肌细胞的凋亡，从而减轻了心肌的损伤，起到了保护心肌的作用。

参考文献：

[1] Huang Y S, Yang Z C, Yan B G, *et al*. Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns[J]. J Trauma, 1999, 46(3): 428-432.

[2] 黄跃生. 烧伤科特色治疗技术[M]. 北京：科学技术文献出版社，2004：99-117.

[3] 陈发明. 烧(烫)伤动物模型的研制[M]//黎 鳌，杨宗城，肖光夏，等. 实验烧伤外科学. 重庆：重庆大学出版社，1997：28.

[4] Feuerstein G Z, Young P R. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 560-569.

[5] Feuerstein G Z. Apoptosis in cardiac diseases—new opportunities for novel therapeutics for heart diseases[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1999, 13(4): 289-294.

[6] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79(5): 949-956.

[7] 黄跃生. 重视缺血缺氧与细胞因子在"休克心"发生机制中的作用[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(5)：261-262.

[8] 廖名龙，郁 杰，黄成斌，等. 生脉注射液临床应用新进展[J]. 华西药学杂志，2002，17(2)：152-154.

[9] 樊亚萱，袁 铭，王婧雯. 生脉注射液不良反应及原因分析[J]. 第四军医大学学报，2002，23(23)：2188.

（编辑 陈聪连）