sulin resistance in hepatocytes[J]. Diabetes, 2002, 51(12): 3391 -3399.
[4] Renstrom F, Buren J, Svensson M, *et al*. Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes[J]. Metabolism, 2007, 56(2): 190 -198.
[5] Chen X, Huang Z, Chen D, *et al*. Role of NYGGF4 in insulin resistance[J]. Mol Biol Rep, 2011, [Epub ahead of print].
[6] Nicastro H, Zanchi N E, da-Luz C R, *et al*. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats[J]. Nutrition, 2011, [Epub ahead of print].
[7] Rafacho A, Abrantes J L, Ribeiro D L, *et al*. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats[J]. Horm Metab Res, 2011, 43(4): 275 -281.
[8] Tatarczyk T, Ciardi C, Niederwanger A, *et al*. Postprandial triglyceride-rich lipoproteins induce hepatic insulin resistance in HepG2 cells independently of their receptor-mediated cellular uptake[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 343(1/2): 71 -78.
[9] Yamashita R, Saito T, Satoh S, *et al*. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2[J]. Endocr J, 2005, 52(6): 727 -733.
[10] Thirone A C, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17(2): 72 -78.

(**收稿**:2011-10-08;**修回**:2011-12-16)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2012)07-0673-03

短篇论著

参附注射液对实验心源性休克犬血浆 NO、iNOS 及心肌 iNOS mRNA 的影响

李桂琼,陈庆伟,柯大智 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院老年病科)

[**摘要**] **目的** 观察参附注射液对心源性休克犬血浆 NO、iNOS 含量及心肌 iNOS mRNA 的影响。**方法** 选择健康成年家犬 15 只,体质量(14.0 ±2.7)kg,雌雄不拘。完全随机分为参附组、模型组,并设假手术组(n =5),在结扎前,休克时,给药后 30、60、120、180 min 抽血,用比色法测血浆 NO、iNOS 的含量,180 min 时取心肌组织,用 RT-PCR 法测心肌 iNOS mRNA 的表达,同时监测犬的心功能指标。**结果** 参附注射液能降低心源性休克时升高的 NO[(66.54 ±2.42)μmol/L *vs* (45.31 ±3.39)μmol/L]、iNOS[(6.60 ±0.23)U/ml *vs*(5.13 ±0.23)U/ml]水平(P <0.01),并下调心肌 iNOS mRNA 的基因表达。参附注射液给药可显著增加心源性休克犬的 CO 和 CI,明显降低动物的 TPVR。**结论** 参附注射液可以降低血浆中 NO 和 iNOS 的水平,抑制心肌 iNOS mRNA 的表达。

[**关键词**] 参附注射液;心源性休克;NO;iNOS;心肌 iNOS mRNA
[**中图法分类号**] R285.6; R289.5; R541.64 [**文献标志码**] A

心源性休克是急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的严重并发症,它往往会引起患者的死亡[1-2]。NO 是重要的炎症介质,过高浓度的 NO 可能降低心输出量,减少冠脉血流,而加重休克的发展[3-4]。参附注射液是根据古方参附汤研制的一种抗休克药物,现在临床参附汤常用于预防和治疗各种休克[5]。为进一步探讨参附注射液抗心源性休克的作用机制,我们观察了参附注射液对心源性休克犬血浆 NO、iNOS 变化及心肌 iNOS mRNA 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年家犬 15 只,体质量(14.0 ±2.7)kg,雌雄不拘,完全随机分为参附组、模型组及假手术组(n =5),购于重庆医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK200220001。

1.1.2 主要试剂与仪器 参附注射液(雅安三九药业有限公司,批号:20071013);多巴胺(广州明兴制药有限公司);RNA 抽提试剂(Trizol,上海生工生物工程公司);RT-PCR 试剂盒(上海生工生物工程公司);iNOS 上游引物 5′-TCAAAAACTGGGGCAATGGC-3′,下游引物:5′-GCTTGGTGGCGAAGATGAGC-3′;内参 β-actin 上游引物:5′-GGCCGTCTTCCCCTCCATC-3′,下游引物:5′-GCCACGCTCCGTGAGGAT-3′;MPS-2000 型多导生物信号分析系统(上海振科科贸有限公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 实验前禁食 12 h,禁水 8 h。采用冠状动脉结扎法制作心源性休克犬的动物模型:以文献[6]方法建立缺血性心源性休克模型。观察平均动脉压下降至 70% 以下,同时出现心肌梗死的心电图图形为心源性休克指标。模型稳定血压 10 min 内不恢复为造模成功。模型成功即刻,分别静脉滴注给药治疗。参照公式[7]给予参附注射组参附注射液 1.9 ml/kg 加入 5% 葡萄糖液 5.5 ml/kg;模型组给予 5% 葡萄糖液 5.5 ml/kg;假手术组只穿线不结扎冠状动脉,5% 葡萄糖液 5.5 ml/kg。

1.2.2 指标检测

1.2.2.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)样品制备 在结扎前,休克时,给药后 30、60、120、180 min 各个时刻点取股静脉血于含有 10% EDTA 的离心管内,在室温下静置 15 min,在 4 ℃,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液于 EP 管中,置于 -20 ℃的冰

[**基金项目**] 重庆市卫生局中医药科研项目(2003_B_30)
[**通信作者**] 陈庆伟,E-mail:lgqwg@ yahoo. com. cn

箱保存待测。最后取动物心脏,用预冷的生理盐水洗净血液,选取缺血区心肌组织放于液氮中速冻,然后将其保存于-70 ℃冰箱,以备做RT-PCR。

1.2.2.2 血浆NO含量及iNOS活性的测定 样本置于室温复融后,采用比色法按试剂盒说明测定。

1.2.2.3 心肌iNOS mRNA的表达 用Trizol法提取总RNA,逆转录合成cDNA,进行PCR扩增,PCR反应体系为25 μl,其中10×逆转录缓冲液5 μl;25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μl;10 mmol/L dNTP 1 μl;10 pmol/μl上下游引物5 μl;*Taq*酶0.5 μl;cDNA 2.5 μl;补水至总体积25 μl。β-actin反应参数(扩增片段508 bp):94 ℃预变性5 min;94 ℃变性45 s,55 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,共30个循环,72 ℃后延伸6 min,iNOS反应参数扩增片段(308 bp):94 ℃预变性5 min;94 ℃变性50 s,56 ℃退火50 s,72 ℃延伸50 s,共40个循环,72 ℃后延伸6 min;产物进行凝胶电泳,结束后将凝胶置于Bio-Rad自动凝胶成像分析系统中,采集图像,用系统配套的Quantity One 4.4检测电泳条带信号灰度。iNOS mRNA的相对含量用iNOS mRNA条带灰度与内参条带灰度之比表示。

1.2.2.4 心源性休克犬心功能指标的监测 观测给药前后心脏指数(CI)、心输出量(CO)、总外周阻力(TPVR)等功能性指标的变化。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两均数比较用 t 检验,经SPSS 11.0软件处理。

2 结果

2.1 参附注射液对心源性休克犬NO、iNOS的影响

心源性休克后,模型组血浆NO及iNOS水平上升,分别从结扎前的(66.99±1.42)μmol/L和(6.54±0.15)U/ml上升至结扎后的(133.63±2.76)μmol/L和(11.81±0.94)U/ml($P<0.01$)。参附注射液能降低心源性休克犬血浆NO及iNOS水平,给药前血浆NO水平:(66.54±2.42)μmol/L,给药后30、60、120 min和180 min,参附组血浆NO分别为(66.09±1.73)、(60.41±1.23)、(43.38±2.02)、(45.31±3.39)μmol/L;给药血浆iNOS水平:(6.60±0.23)U/ml,给药后参附组血浆iNOS分别为:(6.43±0.09)、(5.90±0.11)、(5.05±0.39)、(5.13±0.23)U/ml,与用药前及模型组比较均有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 心肌iNOS mRNA的表达

iNOS mRNA表达见图1,心源性休克犬给药后模型组、参附组和假手术组的心肌iNOS mRNA光密度值分别为(1.79±0.70)、(0.46±0.07)和(0.40±0.54)。由结果可知,心源性休克时,心肌iNOS mRNA的表达显著增加。参附注射液组可下调心源性休克犬心肌iNOS mRNA过度表达,与模型组比较有显著性差异($P<0.01$);模型组iNOS mRNA的表达明显调高,iNOS/β-actin比值与假手术组比较差异显著($P<0.01$)。

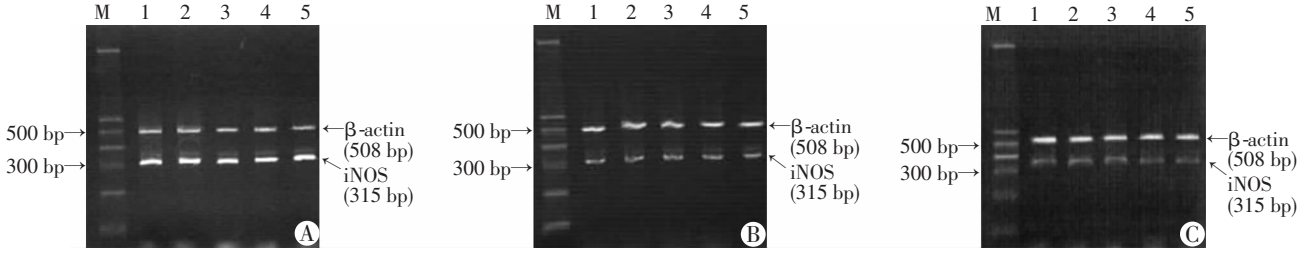
2.3 参附注射液对心源性休克犬CO、CI和TPVR的影响

心源性休克后,犬CO减小,模型组和参附组分别从结扎前的(1.08±0.21)和(1.15±0.19)L/min下降至结扎后的(0.35±0.07)和(0.36±0.05)L/min;CI下降,模型组和参附组分别从结扎前的(1.77±0.43)和(1.98±0.32)L/(min·m^2)下降至结扎后的(0.53±0.23)和(0.56±0.08)L/(min·m^2);TPVR增加,模型组和参附组分别从结扎前的(874±208)和(853±204)kPa·s/L升高至结扎后的(2 189±387)和(1 744±452)kPa·s/L。参附注射液给药可显著增加心源性休克犬的CO和CI,明显降低动物的TPVR:给药后30、60、120 min和180 min,参附组的CO分别为(0.34±0.05)、(0.56±0.04)、(0.60±0.06)和(0.54±0.07)L/min;CI分别为(0.99±0.11)、(1.07±0.09)、(0.93±0.21)和(0.90±0.10)L/(min·m^2);而TPVR分别为(1 646±487)、(1 487±267)、(1 453±218)和(1 420±380)kPa·s/L。

3 讨论

研究表明,心源性休克的发生与许多促炎和抗炎的细胞体液因子有关[8-12]。本研究发现,心源性休克时血浆NO含量、iNOS活性增加,心肌iNOS mRNA表达增加,说明NO,iNOS在心源性休克中发挥重要的作用。用参附注射液治疗心源性休克犬,血浆NO、iNOS水平降低,同时能下调心肌iNOS mRNA过度表达。参附注射液也对心源性休克犬的心功能指标有一定影响。它可显著增加心源性休克犬的CO和CI,明显降低动物的TPVR,与模型组相比有显著性差别。

参附注射液可能通过抑制心肌iNOS mRNA的基因表达,防止NO过度产生,增加心肌血流,减轻心脏损害,从而通过细胞保护来改善心源性休克时血流动力学变化,而改善心源性休克的预后[13-15]。本研究对参附注射液在临床上用于心源性休克的治疗提供了新的理论依据和临床指导。



A:模型组;B:参附组;C:假手术组;M:标准;1-5:实验重复5次

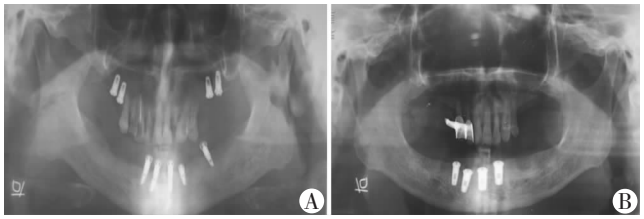
图1 RT-PCR检测心源性休克犬心肌iNOS mRNA表达

参考文献：

[1] Hochman J S. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm [J]. Circulation, 2003, 107(24): 2998-3002.
[2] Menon V, Fincke R. Cardiogenic shock: a summary of the randomized SHOCK trial [J]. Congest Heart Fail, 2003, 9(1): 35-39.
[3] Ducas J, Grech E D. ABC of interventional cardiology. Percutaneous coronary intervention: cardiogenic shock [J]. BMJ, 2003, 326(7404): 1450-1452.
[4] Hochman J S, Buller C E, Sleeper L A, *et al*. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction—etiologies, management and outcome: a report from the SHOCK Trial Registry. Should we emergently revascularize Occluded Coronaries for cardiogenic shock? [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(3 Suppl A): 1063-1070.
[5] 柴跃龙，龚建平，涂兵. 参附注射液改善大鼠肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞的激活[J]. 第三军医大学学报，2011，33(12)：1216-1219.
[6] Creamer J E, Edwards J D, Nightingale P. Mechanism of shock associated with right ventricular infarction[J]. Br Heart J, 1991, 65(2): 63-67.
[7] 马建秀，李秀娟，臧凯宏，等. 人工合成胸腺素 α1 静脉注射后在小鼠和大鼠体内的分布与代谢[J]. 第三军医大学学报，2011，33(17)：1843-1846.
[8] Brunkhorst F M, Clark A L, Forycki Z F, *et al*. Pyrexia, procalcitonin, immune activation and survival in cardiogenic shock: the potential importance of bacterial translocation[J]. Int J Cardiol, 1999, 72(1): 3-10.
[9] 黄雄，曹雪滨，江明宏，等. 单支开放前降支闭塞并休克的介入治疗1例及循证证据[J]. 第三军医大学学报，2011，33(14)：1501，1505.
[10] Zhang C, Xu X, Potter B J, *et al*. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(3): 475-480.
[11] 张莹，石承先，别平，等. 重症急性胰腺炎大鼠肺脏 iNOS mRNA 表达及丹参的干预效应[J]. 第三军医大学学报，2005，27(15)：1569-1572.
[12] Webb J G, Sleeper L A, Buller C E, *et al*. Implications of the timing of onset of cardiogenic shock after acute myocardial infarction: a report from the SHOCK Trial Registry. Should we emergently revascularize Occluded coronaries for cardiogenic shock? [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(3 Suppl A): 1084-1090.
[13] 代友平，于世龙，蒋树芝，等. 人参皂甙对缺血再灌注损伤后犬心肌的保护作用[J]. 同济医科大学学报，1996，25(3)：210-212，218.
[14] 侯明晓，敖定椿. 人参总皂甙抗心肌缺血-再灌注损伤的作用机制[J]. 中国胸心血管外科临床杂志，2000，7(4)：256-259.
[15] 陈玉培，牟崇明，季道如，等. 参附注射液对大鼠缺血再灌注心肌 Bcl-2、Bax 与 c-fos 基因蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(19)：1939-1941.

（收稿：2011-11-15；修回：2012-01-04）
（编辑 栾 嘉）

（上接657页）



A：球帽装精密附着体；B：磁性附着体

图1 球帽状精密附着体种植体与磁性附着体种植体曲面断层片观察

2.2 固位力及咀嚼效能测定

结果显示，10例球帽状精密附着体的固位力为(3 012.15±131.8)g，咀嚼效能为(0.863±0.071)g，而磁性附着体的固位力为(3 103.06±108.17)g，咀嚼效能为(0.881±0.076)g。2组数据差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

一直以来，传统修复对于下颌牙列长时间缺失的病例，总面临固位力及咀嚼效率差的难题。随着种植技术及附着体等新技术的临床推广运用，使这一问题取得了较好的解决。球帽状精密附着体钢托义齿的舌腭侧环靠臂可以防止义齿摆动、旋转，构造精密，套帽的损坏可个别更换，临床维修易，附着体的金属球和尼龙帽套之间的弹性结台产生缓冲作用，保护种植体。种植体上无金属卡环显露，种植体与人工牙之间无明显倒凹，可预防食物欠塞，具有美观卫生特点。但是其治疗过程较为复杂，取膜次数较多，制作技术要求高。磁性附着体利用的磁体和衔铁之间具有磁性吸引力来产生固位效果。磁体和衔铁间呈平板样接触，接触面可有轻微的移位，当侧向力过大时，可磁性附着体可脱位，产生应力中断效应。本试验结果显示磁性附着体与球帽状精密附着体在下颌全口义齿修复中都具有较强的固位力与较高的咀嚼效率，二者无明显差异，与文献[4]报道一致。患者无论在舒适度、适应时间、固位、稳定等方面都感到满意。在磁性附着体组有2例出现种植周围炎症可能与基托缓冲不够有关。从临床操作方面磁性附着体较球帽状附着体而言，简单，易掌握、患者摘戴方便，但价格相对昂贵。磁性附着体长时间使用磁铁生锈、消磁，需更换磁铁等问题。另外，它所产生的磁性对牙龈、牙槽骨组织的影响有待于进一步研究。本组病例种植体均位于前牙槽嵴区，负荷全口颌力，从力学分布上也不尽合理。而长时间应是否影响种植体稳固等方面有待于继续研究。

参考文献：

[1] 赵依民，欧阳官，高元，等. 磁性固位覆盖总义齿固位特性和咀嚼效率的定量研究[J]. 中华口腔医学杂志，1994，29(3)：140-142.
[2] 宋兆峻，叶秀芬，宁丽，等. 用吸光度法测定咀嚼效能的研究[J]. 口腔医学，1988，8(2)：70-72.
[3] 李敬东，梁锐英，吴文慧. 太极扣和磁性附着体覆盖义齿修复下牙列缺失疗效比较[J]. 军医进修学院学报，2009，30(2)：145-147.
[4] 沈倍勇，郑苍尚，周琦. 磁性附着体在全口覆盖义齿的临床应用[J]. 中国现代医学杂志，2005，15(12)：1857-1859.

（收稿：2011-12-06；修回：2012-01-28）
（编辑 张 维）