基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0547-04

参附注射液对腹腔感染脓毒症小鼠心肌能量代谢的保护作用研究

刘 琼[1],周发春[1],徐 昉[1],曹友德[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院中心 ICU,重庆 400016;2. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察腹腔感染脓毒症小鼠心肌能量代谢情况,用参附注射液进行干预治疗,探讨参附注射液对其能量代谢的保护作用。方法:采用盲肠结扎穿孔法(Cecal ligation and puncture,CLP)复制腹腔感染脓毒症动物模型。83 只小鼠随机分为 CLP 组(感染组)、CLP 加参附注射液治疗组(治疗组)和假 CLP 组(对照组)。于造模后 6 h、12 h 及 24 h 分别采用电镜和形态计量学方法观察心肌线粒体形态、数量和膜磷脂定位;酶细胞化学法分析线粒体细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase,CCO)和琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase,SDH)活性,反相高效液相色谱法测定心肌组织 ATP、ADP 和 AMP 含量。结果:感染组小鼠心肌线粒体大量破坏,膜磷脂严重缺失、定位改变;CCO 和 SDH 活性降低,ATP、ADP 和 AMP 含量下降。各时间点治疗组上述各项指标均较感染组显著改善。结论:脓毒症小鼠心肌线粒体结构严重破坏、功能明显下降,参附注射液能有效保护脓毒症小鼠心肌线粒体结构和功能,改善心肌能量代谢。

【关键词】腹腔感染;脓毒症;心肌线粒体;能量代谢;参附注射液
【中国图书分类法分类号】R605.974 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-19

Protective effect of Shenfu injection on myocardial energy metabolism in septic mice

LIU Qiong, et al
(*Department of Central Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of myocardial energy production in septic mice after a cecal ligation and puncture, and to observe the intervention effects of Shenfu injection. *Methods*: Mice models of abdominal infection were established by a cecal ligation and puncture (CLP). Eighty-three mice were randomly divided into three groups: CLP group (infection group), CLP and treated with Shenfu injection group (treatment group) and pseudooperation control group. The morphology and membrane phospholipid of myocardial mitochondria were studied by using transmission electronmicroscope morphometry method. The activities of cytochrome oxidase (CCO) and succinate dehydrogenase (SDH) of myocardial mitochondria were also detected by enzyme cytochemical method. Reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze contents of myocardial ATP, ADP and AMP. *Results*: As compared to control group, a large number of mitochondria were damaged in infection group, the apparent mitochondrial membrane phospholipid deletion and localization change were observed, the activities of CCO and SDH in mitochondria declined obviously, and the contents of ATP, ADP as well as AMP declined notably. All of these were obviously improved in treatment group. *Conclusion*: The myocardial mitochondrial structure destroyed and its functions declined apparently in septic mice. Shenfu injection could protect the myocardial mitochondrial structure and function effectively, improve the myocardial energy metabolism in septic mice also.

【Key words】Abdominal infection; Sepsis; Myocardial mitochondria; Energy metabolism; Shenfu injection

心肌能量代谢障碍和心功能减退是脓毒症性心肌损伤重要的病理生理特征。有研究表明,脓毒症时的心脏功能改变与心肌细胞坏死心肌数量减少、心肌抑制因子增多、MMP/TIMP 基因表达失衡导致心肌抑制及离子泵功能障碍等多种因素有关。但迄今为止,国内尚未见对脓毒症性心肌能量代谢障碍发生机制及与心功能减退关系的研究。本研究通过动态观察腹腔感染脓毒症小鼠心肌线粒体结构和功能变化,探讨脓毒症性心肌能量代谢障碍发生机制,并用参附注射液(Shenfu injection,SF)进行干预治疗,旨在为进一步研究脓毒症性心肌损伤发病机制和综合救治提供一些新的启示。

作者介绍:刘 琼(1966-),女,副教授,硕士,
研究方向:危重症与急救。

基金项目:重庆市卫生局基金资助项目(2008-2-89)。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

实验动物和主要试剂。83 只健康昆明小鼠,雌性,体重

（23 ± 2）g（重庆医科大学实验动物中心提供）；SF[雅安三九药业有限公司生产，10 ml/ 支，批号 030702，每毫升含人参皂苷 Rb1（$C_{54}H_{92}O_{23}$）0.5 mg，乌头碱（$C_{34}H_{47}NO_{11}$）0.1 mg]。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和 CLP 模型的制备 83 只小鼠随机分为 CLP 组（感染组，小鼠 11 只）、CLP 加参附注射液治疗组（治疗组，小鼠 36 只）和假 CLP 组（对照组，小鼠 36 只）。参考文献[1]方法建立感染性休克脓毒症小鼠模型。治疗组于 CLP 前 24 h、12 h、6 h 3 个时相点以参附注射液（2.1 ml/kg）加入生理盐水稀释至 1.5 ml 腹腔注射，感染组和对照组则于造模前同样 3 个时相点分别腹腔注射等容量生理盐水。对照组仅做开腹、盲肠游离及关腹术，其余同感染组。感染组及治疗组均分设 CLP 后第 6 h、12 h 及 24 h 3 个时相点，每个时相点各 12 只小鼠，对照组只设 24 h 1 个时相点，用 11 只小鼠作总体对照。弃用实验过程中死亡小鼠。各时间点结束时处死存活小鼠，速取心肌组织，根据不同检测指标制作相应标本。

1.3 观察项目

1.3.1 心肌线粒体结构和立体定量 质量分数为 4%的戊二醛行心肌标本固定，常规电镜制片，H-600 型透射电镜观察。每个心肌标本均在 2×10^4 倍数下随机拍摄 20 张照片，采用计点法对线粒体进行立体计量[2]。计算线粒体面数密度（Numerical density on area，NA）、平均周长（Circumference，CM）、平均面积（Area，A）及体密度（Volume，V）。

1.3.2 心肌线粒体膜磷脂超微结构定位[3] 心肌标本（40 μm 厚）经质量分数为 2%的戊二醛固定 12 h，置三合固定液（0.1 mmol/L 硝酸铅和 0.1 mmol/L 铁氰化钾等比混合液）40 min（15℃），质量分数为 1%的锇酸固定 2 h（4℃）。超簿切片，不经铅铀染色，用 H-600 型透射电镜观察。固定 2×10^4 倍数，每个心肌标本随机拍摄 10 张，计数线粒体总数，并按线粒体内外膜及脊膜完全定位和大部分定位，或小部分定位和完全缺失两种情况分别计算相应线粒体所占百分比。

1.3.3 心肌线粒体细胞色素 C 氧化酶（Cytochrome oxidase，CCO）和琥珀酸脱氢酶（Succinate dehydrogenase，SDH）活性测定 分别采用 Seligman 法[4]和 Ogawa 法[5]对心肌线粒体 CCO 和 SDH 细胞化学染色。超簿切片不经铅染色，每个心肌标本在 2×10^4 放大倍数下随机拍摄 10 张。TECBLAS-6803 图像分析系统测定每张照片 CCO 和 SDH 反应产物的平均灰度。

1.3.4 心肌腺苷酸含量测定 用改良反相高效液相色谱法[6,7]，BioRad 高效液相色谱仪，ODSC18 反相柱，UV1 306 检测器，检测波长 254 nm。1:9 甲醇磷酸盐缓冲液（pH6.0，浓度 0.15 mol/L）为流动相，流速 1 ml/min。样品进样体积 20 μl。

1.4 统计学分析

SPSS10.0 软件进行统计分析。计数资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 t 检验；计数资料用百分比表示，采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 线粒体结构破坏

小鼠 CLP 造模后第 12 h，心肌线粒体多数轻.中度肿胀，少数固缩，无明显破坏、溶解。第 24 h 线粒体高度肿胀，大量破坏溶解，心肌内有散在脂滴聚积。感染组第 6 h、12 h 及 24 h 线粒体立体计量各参数与对照组比较差异均有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；第 12 h 及 24 h 参附液治疗组线粒体立体计量各参数与感染组比较差异均有统计学意义（P 均<0.05）。见表 1。

2.2 线粒体膜磷脂缺损

与对照组比较，6 h 时感染组线粒体膜磷脂定位无明显变化（$P\geq0.05$）；12 h 时部分线粒体膜磷脂失去嵴膜，线粒体基质呈散在分布或聚集呈团块，部分线粒体嵴模糊、磷脂减少；膜磷脂完全和大部分定位线粒体构成比下降；小部分定位和完全缺失构成比增加（$P<0.01$）。24 h 时与 12 h 时比较，线粒体膜磷脂定位无明显改善（$P\geq0.05$）。12 h 及 24 h 时 SF 治疗组均好于同时间点感染组（P 均<0.05）。见表 2。

2.3 线粒体酶活性下降

酶活性与反应产物平均灰度呈反比。感染组 6 h 时线粒体 CCO 及 SDH 反应产物平均灰度即明显升高，12 h 时进一步升高，24 h 时较 12 h 时降低，与对照组比较均差异显著（$P<0.01$）。SF 治疗组线粒体

表 1 心肌线粒体立体计量（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组 别	时间(h)	NA(μm²)	CM(μm)	A(μm²)	V(%)
对照组	24	0.71 ± 0.04	2.61 ± 0.37	0.51 ± 0.04	39.25 ± 4.33
	6	0.87 ± 0.05*	3.64 ± 0.37*	0.58 ± 0.09*	44.55 ± 6.75*
感染组	12	0.73 ± 0.09**	5.06 ± 0.24**	0.83 ± 0.04**	50.12 ± 5.61**
	24	0.65 ± 0.02**	4.09 ± 0.32**	0.64 ± 0.03**	39.86 ± 7.03
	6	0.88 ± 0.05	2.95 ± 0.51	0.68 ± 0.07	43.52 ± 4.42
治疗组	12	0.59 ± 0.03#	2.75 ± 0.22#	0.58 ± 0.04#	46.12 ± 3.81#
	24	0.52 ± 0.05#	2.01 ± 0.15#	0.40 ± 0.07#	40.36 ± 2.67

注：与对照组比较：* $P\leq0.05$，** $P\leq0.01$；与感染组比较：# $P\leq0.05$

CCO 及 SDH 反应产物平均灰度均低于同时间点感染组（$P\leqslant0.05$ 或 $P\leqslant0.01$）。见表 3。

2.4 心肌腺苷酸含量降低

感染组 ATP、ADP 和 AMP 含量 6 h 时无明显变化（$P>0.05$），12 h 及 24 h 时明显降低，24 h 时较 12 h 时降低更明显，与对照组比较差异显著（$P<0.01$）。12 h 及 24 h 时参附注射液治疗组均高于同时间点感染组（$P<0.01$）。见表 4。

3 讨 论

脓毒症是当前重症加强治疗病房患者主要的死亡原因，也是当代重症医学面临的主要焦点及难点。脓毒症患者中约有 40%~50%并发心功能不全或严重心功能衰竭，其发生机制目前尚无定论。细菌毒素、细胞因子等通过不同途径造成心肌灌注不足、心肌能量代谢障碍以及心肌细胞凋亡等皆被认为是脓毒症导致心脏损伤的重要机制，而心肌能量代谢障碍被认为是其关键机制[8,9]。

线粒体是心肌的能量产生中枢，占心肌细胞体积的 20%~40%。线粒体结构和功能异常是心肌能量代谢障碍的重要分子基础。线粒体内膜是合成 ATP 的关键场所，而磷脂是线粒体内膜的主要结构成分，参与了钠钾泵、钙镁泵、腺苷酸环化酶、葡萄糖-6-磷酸酶等多种酶的激活，对维持线粒体的氧化磷酸化功能起着重要作用。线粒体膜系统损伤将直接导致线粒体氧化磷酸化功能的丧失。同时，线粒体膜上多种功能蛋白质则参与了心肌细胞内外

表 2 心肌线粒体膜磷脂超微结构定位（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组 别	时间(h)	完全定位和大部分定位	小部分定位和完全缺失
对照组	24	0.921	0.070
感染组	6	0.903	0.122
	12	0.422**	0.568**
	24	0.573**	0.448**
治疗组	6	0.869	0.120
	12	0.599#	0.472#
	24	0.694#	0.386#

注：与对照组比较：** $P<0.01$；与感染组比较：# $P<0.05$

表 3 心肌线粒体 CCO 和 SDH 反应产物平均灰度（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	时间(h)	CCO	SDH
对照组	24	41.27 ± 4.45	29.25 ± 1.36
感染组	6	64.75 ± 4.23**	42.09 ± 2.53**
	12	118.44 ± 7.97**	87.49 ± 6.15**
	24	70.87 ± 4.57**	62.41 ± 3.99**
治疗组	6	54.56 ± 4.05#	33.47 ± 2.78#
	12	79.42 ± 3.29##	52.31 ± 3.36##
	24	64.15 ± 4.12#	49.96 ± 5.13#

注：与对照组比较：** $P<0.01$；与感染组比较：# $P<0.05$

表 4 心肌 ATP、ADP和 AMP含量（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	时间(h)	ATP	ADP	AMP
对照组	24	163.93 ± 23.45	120.01 ± 17.49	46.93 ± 16.24
感染组	6	159.85 ± 26.55	112.35 ± 16.48	46.53 ± 15.31
	12	96.74 ± 23.66**	64.53 ± 20.12**	23.85 ± 8.08**
	24	89.59 ± 16.32**	60.29 ± 17.93**	18.87 ± 7.64**
治疗组	6	161.47 ± 23.68	104.38 ± 23.44	46.96 ± 8.08
	12	102.03 ± 20.95##	81.37 ± 21.45##	40.95 ± 7.14##
	24	137.89 ± 24.69##	95.28 ± 26.31##	44.67 ± 9.11##

注：与对照组比较：** $P\leqslant0.01$；与感染组比较：## $P\leqslant0.01$

信号传递、Ca^{2+}浓度调节等生理过程,因此,心肌线粒体内膜上磷脂和功能蛋白的变化必然造成心肌能量代谢障碍、心肌细胞内外信号转导异常、心肌兴奋收缩耦联障碍。我们发现小鼠造模 6 h 后膜磷脂定位尚良好,心肌线粒体无明显破坏。24 h 后心肌线粒体明显肿胀、大量破坏,膜磷脂严重缺失、定位改变;24 h 与 6 h 时比较,线粒体肿胀破坏明显加重,且线粒体膜磷脂定位缺失亦进一步加重,提示脓毒症时心肌线粒体膜磷脂缺失和定位改变为不可逆性损伤。

细胞的能量主要来源于线粒体氧化磷酸化过程,氧化磷酸化过程需要多种酶的参与。CCO 是线粒体氧化磷酸化过程的标志酶,它是唯一将电子传递给氧分子的细胞色素,是线粒体呼吸代谢与氧的连接处,它与 SDH 同为线粒体呼吸酶系的关键酶,其活力下降将直接影响线粒体氧化磷酸化过程[7]。脓毒症时,大量中性粒细胞和巨噬细胞激活,促使循环和心肌局部的氧自由基增多,增多的氧自由基直接攻击心肌线粒体膜脂,引起心肌线粒体膜的脂质过氧化损伤,线粒体膜心磷脂显著减少,线粒体 CCO 和 SDH 活性下降[9,10]。本研究结果显示:小鼠被诱发脓毒症后心肌线粒体 CCO、SDH 活性下降早于线粒体结构明显改变;线粒体结构改变(肿胀、破坏、膜磷脂缺失与定位改变)又将导致 CCO、SDH 活性进一步降低,线粒体 CCO、SDH 活性降低将直接导致 ATP 生成减少,活性氧产生增多,能量代谢障碍,最终严重影响心肌收缩、舒张功能。

我们观察发现虽然脓毒症早期线粒体 CCO、SDH 活性即明显降低,但心肌腺苷酸含量却无明显变化,这可能与早期细胞内磷酸肌酸转化为 ATP 等代偿作用有关。但小鼠造模后 12 h 心肌腺苷酸含量明显降低,24 h 时降低更加明显,以上结果说明脓毒症小鼠心肌存在严重能量生成障碍。当能量生成低于细胞代谢所需最低阈值时,即可发生心肌"能量饥饿"。心肌"能量饥饿"又进一步促进或加重能量代谢障碍,继续发展终至心肌细胞坏死,心脏功能发生障碍。以上结果提示:予以改善心肌能量代谢的治疗措施不仅能减轻心肌细胞损伤,而且有利于改善心功能。

SF 由中医"回阳救逆"古方——参附汤分离提取灭菌制成,主要成分为人参皂苷、水溶性生物碱,既往研究发现其具有抗缺血、抗缺氧、清除氧自由基、抗脂质过氧化、增强心肌收缩力、维持血流动力学稳定等作用,临床上已广泛用于心衰、围手术期心肌保护、缺血-再灌注心肌损伤等治疗。文献[11]报道,SF 对心肌细胞膜系统,特别是线粒体膜具明显保护作用,从而维持线粒体结构和功能。本研究结果也证实 SF 能有效保护脓毒症小鼠心肌线粒体结构和功能。与感染组比较:治疗组线粒体肿胀减轻,破坏减少;膜磷脂定位改善;CCO、SDH 活性增强;心肌腺苷酸含量升高。SF 对脓毒症小鼠心肌能量代谢良好保护作用的机制可能与抑制 ATP 分解、提高 H^+-ATP 酶活性使 ATP 合成增加、提高心肌组织 cAMP/cGMP 比值、清除氧自由基、抑制心肌病理性钙通道形成防止"钙超载"等多种药理作用有关[11,12]。

参 考 文 献

[1] 金惠铭. 盲肠结扎穿孔后的大鼠败血症模型[J]. 中国病理生理杂社志,1990,6(2):126-127.

[2] 郑富强. 细胞形态立体计量学[M]. 北京:人民卫生出版社,1990.157-174.

[3] 邵英杰,陈念祖,马爱群,等. 磷脂在大鼠心肌线粒体上的超微结构定位方法[J]. 解剖学杂志,1992,15(1):36-37.

[4] Seligman A M, Karnovsky M J, Wasserkrug H L, et al. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB) [J]. J Cell Biol, 1968, 12(38): 1-13.

[5] Ogawa K, Saito T, Mayabara H. The site of femicyianide reduction by reductase with mitochondria as studied by electron microscopy [J]. J histochem Cytochem, 1968, 16(1): 49-54.

[6] 王洛四. 高效液相色谱法分析腺苷酸含量[J]. 军事医学科学院院刊,1988,13(3):203-205.

[7] 刘 琼,陈建斌,饶邦复,等. 大剂量维生素 C 对病毒性心肌炎心肌腺苷酸酶活性和钠钙代谢的影响[J]. 中国危重病急救医学,2002,14(10):612-614.

[8] Court O, Kumar A, Parrillo J E, et al. Clinical review -myocardial depression in sepsis and septic shock[J]. Crit Care, 2002, 6(6): 500-508.

[9] 陈昌勤,张召才,严 静. 脓毒症和心肌线粒体损伤[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(10):630-632.

[10] Court O, Kumar A, Parrillo J E, et al. Clinical review : myocardial depression in sepsis and septic shock[J]. Crit Care, 2002, 6(6): 500-508.

[11] 张晓鹰,郑世营,赵 军,等. 参附注射液对缺氧心肌细胞凋亡的抑制效应[J]. 江苏医药,2005,31(2):34-36.

[12] 张义彬,涂 兵,龚建平,等. 参附注射液对大鼠移植肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(4):428-431,445.

(责任编辑:冉明会)