DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.019
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
448 2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0448-04

低温海水浸泡对失血性休克大鼠血流动力学的影响及机制研究

刘建仓,陆松敏,万志红,贾 后军,李 萍,陈惠孙 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 研究海水浸泡对失血性休克大鼠血流动力学的影响,并探讨其改变机制。方法 采用雄性Wistar大鼠,分为3组:正常对照组(n=8);平原休克组(n=8);海水浸泡失血性休克组(n=8)。测定血流动力学指标,血浆磷脂酶A_2(PLA_2)活性,心肌和心肌线粒体钙含量,心肌线粒体Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase活性变化,血浆和心肌MDA的变化。结果 海水浸泡失血性休克动物血流动力学明显低于平原失血性休克组。海水浸泡失血性休克组动物心肌钙超载显著重于平原休克组,心肌和心肌线粒体钙含量均高于平原休克组,心肌线粒体Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase活性显著低于平原休克组,心肌MDA显著高于平原休克组,血浆MDA和PLA_2显著高于平原休克组。结论 低温海水浸泡失血性休克动物心肌及其线粒体钙明显超载、脂质过氧化及PLA_2升高可能是血流动力学下降的重要原因。

关键词:失血性休克;海水浸泡;血流动力学;Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase;PLA_2
中图法分类号:R331.3;R605.971 文献标识码:A

Changes of hemodynamics and their mechanism during hemorrhagic shock and seawater immersion in rats

LIU Jian-chang, LU Song-min, WAN Zhi-hong, JIA Hou-jun, LI Ping, CHEN Hui-sun (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the changes of hemodynamics and their mechanism during hemorrhagic shock and seawater immersion in rats. **Methods** 24 male Wistar rats were equally randomized into the normal control, hemorrhagic shock and hemorrhagic shock+seawater immersion groups. The hemodynamic parameters, the activity of plasma PLA_2, the calcium content of myocardium and myocardial mitochondria, the activity of Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase of myocardial mitochondria and the plasma and myocardial content of MDA were determined. **Results** The hemodynamic parameters were significantly lower in the hemorrhagic shock+seawater immersion group than in the control and simple hemorrhagic shock groups ($P<0.05$). The MDA and calcium contents of the myocardium and myocardial mitochondria were significantly higher in the hemorrhagic shock+seawater immersion than in the control and simple hemorrhagic shock groups. The activity of H^+-ATPase and Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase was lower and that of plasma PLA_2 was higher in the hemorrhagic shock+seawater immersion group than in the control and simple hemorrhagic shock groups. **Conclusion** Overloading of calcium of the myocardium, peroxidation of lipids and the elevation of the activity of plasma PLA_2 possibly are the factors to result in the lowering of the hemodynamic parameters in cases of hemorrhagic shock accompanied with seawater immersion.

Key words: hemorrhagic shock; seawater immersion; hemodynamics; Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase; phospholipase A_2

在未来战争或海洋开发中,落水是伤员死亡的重要原因。但落水时伤员的损伤及机制的研究甚少。本研究旨在探索海水浸泡对实验性失血性休克动物血流动力学的影响,并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年Wistar雄性大鼠24只,实验前禁食过夜自由饮

作者简介:刘建仓(1966—),男,陕西省岐山县人,实验师,主要从事野战外科方面的研究。电话:(023)68757432

收稿日期:1999-07-20;修回日期:2000-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水, 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉, 行气管插管, 股动脉插管观察血压, 颈外静脉插管抽取血液标本, 右侧颈外动脉插管至左心室, 测定心肌力学的改变。动物分为 3 组: 正常对照组(n=8); 平原休克组(n=8); 海水浸泡失血性休克组(n=8)。对平原休克组动物快速放血至 6.57 kPa(50 mmHg), 维持低血压 30 min, 然后于室温(25°C)继续观察 1 h; 海水浸泡失血性休克组动物放血至 6.57 kPa(50 mmHg), 维持低血压 30 min, 然后将大鼠浸入海水池中(海盐浓度为 2.535%, 水温为 15°C, 相当于南海沿海水域冬季表层平均温度)1 h; 正常对照组不放血不放入海水中, 其它处理相同。观察测定血流动力学后, 迅速活杀大鼠, 取心室肌 6 g, 制备线粒体测定钙含量及 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性, 静脉取血测定磷脂酶 A_2(PLA_2)活性及 MDA 含量。

1.2　心肌细胞线粒体的制备

按差速离心法制备; Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性的测定采用蒋纬莹等[1]方法加以改进; 心肌和线粒体钙含量采用原子吸收法测定; MDA 采用国产试剂盒测定; 血浆 PLA_2 活性采用微量滴定法测定[2]。

1.3　统计学处理

采用 Windows Excell 5.0 程序进行 t 检验。

2　结果

2.1　一般情况

平原休克组动物观察 1 h, 动物 10/10 存活。而海水休克组动物浸泡海水中呼吸减弱、心率减慢, 1 h 后动物 8/10 存活。

2.2　血流动力学指标的变化

致伤终点各组动物血流动力学变化见表 1, 平原休克组动物在维持低血压并观察 1 h 后, 动物心率、平均动脉压(MAP)、左心室心肌收缩和舒张速度($\pm dp/dt_{max}$)、左心室收缩压(LVSP)均与伤前和对照组差别显著。海水浸泡失血性休克动物在海水浸泡条件下伤情随浸泡时间延长而加重, 心率减慢为平原休克组的 42%, 血压降为平原休克组的 70%, LVSP 为平原休克组的 22%, $+dp/dt_{max}$ 降为平原休克组的 21.9%, $-dp/dt_{max}$ 降为平原休克组的 20%, 在低温海水浸泡条件下失血性休克动物伤情明显加重, 血流动力学指标显著恶化。心肌收缩力、舒张力和收缩、舒张速度明显减慢, 心肌顺应下降。心率明显减慢, 心肌电传导和兴奋性下降。

表 1　血液动力学指标的变化(n=8)

Tab 1　Changes of hemodynamic indexes(n=8)

	Control	Hemorrhagic shock on plain	Hemorrhagic shock group in seawater
HR(min^{-1})	440±90	320±90 *	135±53 **##
MAP(p/kPa)	14.6± 3.3	8.8±3.8 *	6.2±2.4 **
LVSP(p/kPa)	39.9± 4.5	27.1±3.8 **	17.1±8.1 **#
$+dp/dt_{max}$(kPa/s)	29.2±10.5	20.2±7.4	4.4±3.6 **##
$-dp/dt_{max}$(kPa/s)	21.9± 6.7	11.7±7.4 *	2.4±1.7 **##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* hemorrhagic shock group on plain

2.3　心肌细胞线粒体 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性及心肌组织和线粒体钙含量的变化

失血性休克后心肌细胞线粒体 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性显著下降($P<0.01$), 为正常对照组的 63%; 海水浸泡失血性休克组心肌细胞线粒体 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性显著低于正常对照组, 与平原休克组差别不显著, 见表 2。

平原失血性休克组的心肌组织钙含量显著升高, 为正常对照组的 1.79 倍; 海水浸泡失血性休克组的心肌组织钙含量显著高于正常对照组和平原休克组($P<0.01$), 见表 2。

失血性休克后心肌线粒体钙含量显著升高, 为正常对照组的 3.10 倍; 海水浸泡失血性休克组的心肌线粒体钙含量显著低于平原休克组($P<0.01$), 见表 2。

表 2　心肌组织、线粒体钙含量及线粒体 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase 活性的变化(n=8)

Tab 2　Changes of calcium contents of myocardium and its mitochondria, and Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase of mitochondria(n=8)

	Calcium of myocardium (ω_B/μg·g^{-1})	Calcium of mitochondria (ω_B/μg·g^{-1})	Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase of mitochondria (λ_B/μmol·mg^{-1}·h^{-1})
Control	150.49±38.92	1.341±0.571	15.64±2.73
Hemorrhagic shock group on plain	256.13±52.81 *	4.160±1.431 *	9.75±1.59 **
Hemorrhagic shock group in seawater	385.74±142.92 **##	2.227±0.712 **##	9.93±0.81 **

**: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* hemorrhagic shock on plain group

2.4　心肌血浆 MDA 含量及血浆 PLA_2 活性的变化

失血性休克后血浆 MDA 显著升高, 为正常对照组的 4.12 倍; 海水浸泡 1 h 后血浆 MDA 含量显著高于平原休克组, 组织 MDA 含量却显著低于正常对照组, 见表 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

失血性休克后血浆 PLA_2 活性显著升高，为正常对照组的3.8倍，海水浸泡组活性为正常对照组的11.3倍，是平原休克组的3倍（$P<0.01$），见表3。

表3 心肌组织、血浆MDA含量及血浆 PLA_2 活性的变化（$n=8$）

Tab 3 Changes of MDA contents of myocardium and plasma, PLA_2 activity of plasma（$n=8$）

	Control	Hemorrhagic shock group on plain	Hemorrhagic shock group in seawater
Plasma MDA (mmol/ml)	3.476± 0.459	14.318± 8.928**	53.950±23.896**##
Myocardium MDA(nmol/mg)	365.281±40.279	98.795±38.920**	101.312±62.553**
Plasma PLA_2(U/ml)	2.501± 0.920	9.520± 4.340**	28.147±14.312**##

**：$P<0.01$ *vs* control；##：$P<0.01$ *vs* hemorrhagic shock group on plain

3 讨论

本研究说明失血性休克时血流动力学明显改变，心肌力学明显恶化，心率减慢，左心室压、左心室收缩力均显著下降，组织供血供氧严重不足。海水浸泡后其左心室压、心率、$\pm dp/dt_{max}$ 均显著低于平原休克组，对于低血压6.57 kPa（50 mmHg）30 min后入海水1.5 h时，大鼠50%死亡。动物死亡的重要原因乃是血流动力学严重障碍所致。

低温是海上遇难人员致命的因素，也是加重休克的重要原因[3,4]。国外在复苏、复温方面已有了初步研究，如射频复温[5]、温热空气吸入复温法等已有报道[3]。1990年国际军事医学会议报导了对落水冻僵者采用热液体腹腔灌流，以每小时4℃升温速度进行灌注提高心、体温度，收到良好疗效。在潜水医学中也报道对脑低灌流患者实行一次性大剂量皮质醇和吸氧治疗也取得疗效。我们在低温海水浸泡实验性失血性休克动物上运用复温和吸氧也取得良好疗效。

创伤性休克时心肌胞浆钙超载，心肌和线粒体钙均非常显著升高。胞浆内钙超载是心肌功能损害的重要原因。主要原因是 Ca^{2+} 内流增加，Ca^{2+} 通过“受体依赖性”通道进入细胞，同时细胞膜受损，使细胞外高浓度的 Ca^{2+} 大量涌入细胞内；另一方面，休克时ATP的缺乏，造成 Na^+-K^+ 泵运转障碍，Ca^{2+}/Na^+ 和 K^+/Ca^{2+} 交换增强，使 Ca^{2+} 内流增加。Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase活性下降使肌浆网 Ca^{2+} 摄取受阻，均是 Ca^{2+} 超载的重要原因。胞浆中 Ca^{2+} 浓度过高，可促使 Ca^{2+} 在线粒体内过度聚积，从而造成呼吸功能障碍，进一步加重不可逆损伤。

本研究发现低温海水浸泡组织MDA水平低于平原休克组；心肌线粒体 Ca^{2+} 含量也低于平原休克这可能与低温降低心肌代谢率和能量需求有关。可见低温海水浸泡在一定程度上对心肌也有保护作用。氧自由基可攻击心肌细胞膜上的不饱和脂肪酸，形成脂质过氧化物，造成心肌膜结构的损害，氧自由基可破坏线粒体，干扰氧化磷酸化功能，引起心肌能量供应障碍。引起钙超载的原因甚多，如体液因子、血管活性物质、氧自由基、内皮素、降钙基因相关肽。另一方面休克时膜损伤导致钙泵磷酸化减弱，去磷酸化加强，功能下降[5,6]。休克时线粒体功能障碍，ATP缺乏，Na^+-K^+ 泵功能下降，造成细胞和线粒体水肿，Ca^{2+} 通道开放，Ca^{2+}-Mg^{2+} 泵失灵造成细胞内钙升高，从而进一步损伤细胞膜，这可能就是海水浸泡造成心肌细胞损伤和血流动力学变化的原因[6,7]。

PLA_2 可能是导致心功能损害的又一重要因素[8]，PLA_2 是缺血缺氧再灌流的重要细胞因子，失血性休克时 PLA_2 升高，由 PLA_2 触发的脂介质、PGF、TXB_2、PAF、LTC_3 等均升高，从而造成冠状动脉收缩，心力衰竭。同时 PLA_2 激活，又进一步促进了膜磷脂水解，激发自由基及花生四烯酸瀑布，从而进一步加重心肌和线粒体损伤。同时钙与心肌收缩蛋白的解离速度减慢，造成肌原纤维挛缩甚至断裂。肌浆网摄取钙降低，将会减慢钙与肌钙蛋白的解离速度，引起心室肌舒张延缓，造成 $-dp/dt_{max}$ 下降，同时肌浆网释放钙量下降，又减少了下一个心动周期心肌收缩蛋白获得有效钙的量，从而导致心肌收缩功能受损[9]。本结果平原失血性休克组血浆 PLA_2 升高为对照组的3.8倍，海水浸泡组 PLA_2 为对照组的11.3倍，为平原休克组的3.0倍。由此可见海水浸泡失血性休克组 PLA_2 的过度激活是伤情恶化的原因，因此给予 PLA_2 抑制剂，可能会有效改善休克的状况。

总之，本研究说明海水浸泡失血性休克动物伤情显著重于平原休克组，血流动力学和心肌力学下降，心肌、线粒体严重钙超载，钙泵功能减弱，氧自由基损伤，心肌和线粒体及血浆MDA升高，PLA_2 的激活可能均是血流动力学下降的原因。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] 蒋纬莹. G6PD 缺乏患者红细胞膜 ATP 酶活性的研究[J]. 中国病理生理杂志, 1991, 7(5): 453—456.

[2] 杨义力, 陈思锋. 糖皮质激素对大鼠血清 PLA_2 能力的抑制[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10(1): 29—32.

[3] Herr R D, White G L. Hypothermia: Threat to military operations[J]. Mil Med, 1991, 156(3): 140—144.

[4] 张鸿祺 主编. 灾难医学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 711—749.

[5] Hesslink R L Jr, Pepper S, Olsen R G, *et al*. Radio frequency (13.56 MHz) energy enhances recovery from mild hypothermia[J]. J Appl Physiol, 1989, 67(3): 1 208—1 212.

[6] Liu M S, Wu L L. Heart sarcolemmal Ca^{2+} transport in endotoxin shock: Ⅱ. Mechanism of impairment in ATP-dependent Ca^{2+} transport[J]. Mol Cell Biochem, 1992, 112(2): 135—142.

[7] Liu M S, Xuan Y T. Mechanism of endotoxin-induced impairment in Na-Ca exchange in canine myocardium[J]. Am J Physiol, 1986, 251(6 Pt 2): R1 078—1 085.

[8] 陆松敏, 郭素清, 刘建仓, 等. 外科理论与实践[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996. 9—11.

[9] Kummar A, Tota W, Linda D, *et al*. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum[J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 949—958.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2000)05-0451-01

经验与短篇

苦参碱对 HepG$_2$ 细胞系增殖能力的影响

Effect of Matrine on the proliferation of HepG$_2$ cell line

司维柯[1], 张广运[2], 马立强[3], 康格非[4] (第三军医大学: [1] 医学检验系临床检验学教研室, [2] 核医学教研室, [3] 医学检验系 95 级本科生, 重庆 400038; [4] 重庆医科大学临床生物化学教研室, 重庆 400046)

苦参是传统中药, 广泛应用于临床各科, 特别是它的抗肿瘤活性, 近年来受到极大关注, 我们曾发现苦参提取液可诱导 K_{562} 细胞向红系和粒系分化[1,2]。研究发现苦参纯成份——苦参碱(Matrine)是抗肿瘤的活性成份[3]。我们以人肝癌细胞株 $HepG_2$ 作为细胞模型, 观察不同浓度苦参碱作用不同时间后, 对该细胞增殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

苦参碱注射液(商品名: 斯巴德康)10 g/L, 5 ml/支, 购自广州明兴制药厂, 批号 980304。RPMI-1640 培养基和胰酶均为 GIBCO 产品, MTT 为 Serva 产品。H^3-TdR 购自上海原子能研究所。

1.2 细胞株及其培养

$HepG_2$ 细胞株, 由重庆医科大学附二院肝炎研究所提供, 并在含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养中, 37℃, 5%CO_2 条件下培养。

1.3 MTT 试验

4.6×10^5 个/ml 的细胞悬液接种于 96 孔培养板中(100 μl/孔), 加入苦参碱注射液(10 g/L), 使终浓度为 0.5、1.5、2.0 g/L, 加 RPMI-1640 培养液, 补足体积为 200 μl。另设空白孔和对照孔, 每浓度均作 3 个平行孔, 混匀后放入 CO_2 孵箱中培养。分别于 1、2、3、4 d 各取出一板, 弃去上清液, 加培养液 100 μl, MTT 液(5 mg/ml PBS 液)10 μl, 于微量振荡器上振摇 2 min, 放入 CO_2 孵箱中培养 4 h, 弃上清液, 加二甲亚砜 100 μl/孔, 振摇 5 min, 于酶标仪上, 人为 600 nm 下, 空白调零, 测得 D_λ 值, 计算出细胞存活率%= $D_{实验}/D_{对照}\times 100\%$。

同上操作, 将$(0.5\sim 1)\times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液接种于 96 孔培养板中使苦参碱终浓度为 0.05~2.5 g/L, 培养 3 d, 测 D_λ 值, 计算出细胞存活率。

1.4 ^{3}H-TdR 掺入法

加样方法同上, 并使苦参碱终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L, 培养 2 d 后, 加入^{3}H-TdR(1.25 μCi/孔), 振荡混匀, 继续培养 24 h, 弃去上清液, 加 0.25%胰酶消化, 吸去胰酶, 加培养液 100 μl, 用微量吸管小心吹打并不时在倒置显微镜下检查, 至制成细胞悬液, 用多头细胞收集仪将细胞抽滤于 49 型纤维滤膜上, 37℃烘干, 加入固相闪烁液, 脉冲计数仪测定 Bq, 计算细胞 DNA 合成率(%)= $Bq_{实验}/Bq_{对照}\times 100\%$。

1.5 细胞计数

在培养瓶中加样, 加$(0.2\sim 1)\times 10^5$ 个/ml 细胞悬液 2 ml/瓶,

(下转 458 页)

作者简介: 司维柯(1958—), 女, 山西省晋城市人, 博士研究生, 讲师, 主要从事肿瘤细胞的发生、发展和消亡方面的研究, 发表论文 12 篇。电话: (023)68752310

收稿日期: 1999-07-09; 修回日期: 2000-01-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net