

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.021

艾司洛尔对脓毒症大鼠心肌细胞凋亡及心功能的影响

刘德红^{1,2}, 刘映峰^{1△}, 孟新科², 徐志伟²

(1. 南方医科大学珠江医院心血管内科, 广州 510282; 2. 广东省深圳市第二人民医院急诊科 518035)

摘要:目的 探讨艾司洛尔对脓毒症大鼠心肌细胞凋亡和心功能的影响。方法 将 96 只 SD 大鼠分为假手术组、脓毒症组(盲肠结扎穿孔法建模)、治疗组(建模基础上艾司洛尔静脉给药), 每组各 32 只, 于术后 3、6、12、24 h(每个时间点 8 只)开腹留取标本检测心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、caspase-3 活性、心肌细胞凋亡指数, 光镜下观察心肌组织。第 24 小时用超声仪测定心功能。结果 治疗组和脓毒症组各时间点 cTnI、caspase-3 活性和心肌细胞凋亡指数均较假手术组升高($P<0.05$)。治疗组在应用艾司洛尔后 cTnI 和心肌细胞凋亡指数各时间点均有不同程度下降, caspase-3 活性在 12 h 后明显下降($P<0.05$)。脓毒症组第 24 小时左室射血分数(LVEF)较治疗组下降更为显著($P<0.05$)。结论 艾司洛尔具有抑制大鼠脓毒症心肌细胞凋亡和减轻心脏收缩功能损害的作用, 其作用可能与抑制 caspase-3 活性有关。

关键词:脓毒症; 细胞凋亡; 艾司洛尔; 心功能
中图分类号: R541.9 文献标识码: A 文章编号: 1671-8348(2014)31-4181-04

Effect of esmolol on myocardial apoptosis and cardiac function in rats with sepsis

Liu Dehong^{1,2}, Liu Yingfeng^{1△}, Meng Xinke², Xu Zhiwei²

(1. Department of cardiovascular, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Department of Emergency, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518035, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of esmolol on myocardial apoptosis and cardiac function in rats with sepsis. **Methods** Ninety six SD rats were randomly divided into sham group ($n=32$, for sham operation), sepsis group ($n=32$, sepsis model) and treatment group ($n=32$, intravenous infusion with esmolol after sepsis modeling). At 3 h, 6 h, 12 h, 24 h after operation, samples were conserved to measure serum cardiac troponin I (cTnI), caspase-3, cardiomyocytes apoptosis index, and myocardial pathomorphology was observed by optical microscope. At 24 h after operation, echocardiography was performed. **Results** The serum cTnI, caspase-3, cardiomyocytes apoptosis index were increased significantly in sepsis group and treatment group compared with sham group (all $P<0.05$). After using esmolol, cTnI and cardiomyocytes apoptosis index were relatively decreased in treatment group compared with sepsis group at the four time-points (all $P<0.05$). Caspase-3 of treatment group decreased at 12 h after operation compared with sepsis group ($P<0.05$). Treatment group had a higher LVEF than sepsis group at 24 h ($P<0.05$). **Conclusion** Esmolol could inhibit myocardial apoptosis and mitigate the damage of cardiac function in rats with sepsis. The decrease in caspase-3 may be the mechanism of anti-apoptosis.

Key words: sepsis; apoptosis; esmolol; cardiac function

心脏是脓毒症早期受损的主要靶器官之一, 全身器官衰竭和心功能下降互为因果, 随后诱发的脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS)是临床医生所面临的困境^[1]。而此过程的中心环节是心肌细胞凋亡, 可以造成患者左室射血分数(LVEF)下降 30% 左右^[2]。无论是在心衰还是在围术期中的使用, β 受体阻滞剂对心脏的保护作用已得到人们的认可, 但有关短效 β 受体阻滞剂艾司洛尔对全身炎症反应中心功能改善的报道甚少。因此, 本研究旨在探讨艾司洛尔对脓毒症大鼠心肌细胞凋亡及心功能的保护作用和相关机制, 为临床早期治疗脓毒症, 挽救濒死心肌, 延缓病情发展和降低病死率提供实验依据和新的思路, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 96 只清洁级健康雄性 SD 大鼠, 体质量 (250 ± 20)g, 由南方医科大学实验动物中心提供。适应性饲养 7 d 后开始实验, 分为假手术组 32 只, 脓毒症组 32 只, 治疗组

32 只。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

采用盲肠结扎加穿孔法建立大鼠脓毒症模型^[3]。假手术组仅开腹探查盲肠, 不行盲肠结扎穿孔。手术完成后, 治疗组大鼠于尾静脉持续泵入艾司洛尔 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 至处死, 脓毒症组泵入等量生理盐水。脓毒症组和治疗组大鼠在建模 3 h 内出现反应变差, 活动减少, 叫声减弱, 在后期处死后腹腔可闻及恶臭, 结扎盲肠呈现深色, 肠黏膜充血水肿表示建模成功。3 组大鼠建模成功后 3、6、12、24 h 每个时间点各取 8 只大鼠麻醉开胸, 采集主动脉血 5 mL, 促凝后离心分离上清液测心肌肌钙蛋白 I(cTnI)水平; 摘取心脏, 取心尖部心肌组织分成 2 份, 1 份液氮冻存以制备组织匀浆测定 caspase-3 活性, 1 份甲醛固定石蜡包埋以测定心肌细胞凋亡指数。3 组大鼠在第 24 h 开胸前采用 GE VIVID7 超声仪测定左室舒张末内径(LVEDd)、左室收缩峰压(LVPP)、短轴缩短率(FS)和

作者简介: 刘德红(1973), 主任医师, 在读博士, 主要从事心肾血管疾病负症的基础和临床研究。 △ 通讯作者, Tel: (020)61643161; E-mail: liuyingfeng@126.com。

LVEF,探头频率为 5 MHz。

1.2.2 cTnI 测定 cTnI 测定采用南京基蛋生物科技有限公司提供的 cTnI 检测试剂盒,测定方法为干式免疫荧光定量法,所有试验操作严格按照有关说明书进行。

1.2.3 心肌细胞 caspase-3 活性测定 心肌组织匀浆后离心取上清液 50 μL,加入 1 μL 抑制剂和 50 μL 缓冲液(抑制剂和缓冲剂按照标准操作说明配取),37 ℃ 水浴 1 h 后再次加入 5 μL 缓冲液,混匀后加 5 μL 酶作用底物再次水浴 1 h,以配制的蛋白样品(1 mg/mL)为标准对照管,蒸馏水空白管,采用荧光分光光度仪测定第 2 次水浴前后的荧光值,使用曲线软件 curveexpert 进行分析计算 caspase-3 活性。

1.2.4 心肌病理标本制作和心肌细胞凋亡指数测定 标本在石蜡包埋固定后切片,常规 HE 染色,光学显微镜观察。常规甲醛固定石蜡包埋脱水后,用蛋白酶 K 室温孵育,3%过氧化氢室温下再次孵育以阻断过氧化物酶活性,加入 TUNEL 反应液,滴加转化剂,冲洗后滴加 DAB 底物溶液,苏木素染色后光学显微镜下观察,心肌细胞核发现棕黄色颗粒为凋亡细胞。随机选取 5 个 400 倍光镜视野,计算凋亡细胞所占比例,取平均值。

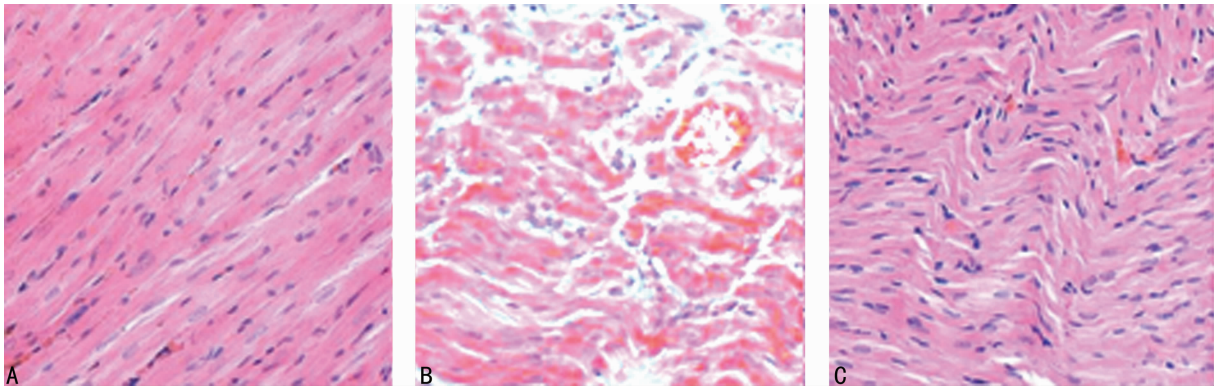
1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用百分比表示。3 组间计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,3 组内两两比较采用 LSD 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脓毒症模型制备结果和病理切片观察 假手术组各个时间点和脓毒症建模后 3、6 h 大鼠成活率为 100.0%。脓毒症组和治疗组 12 h 成活率分别为 87.5%和 100.0%,而 24 h 成活率分别为 75.0%和 87.5%。光镜下假手术组心肌细胞结构紧密,未见明显水肿,充血及细胞质渗出;脓毒症组可见大量坏死心肌细胞,且水肿明显,细胞核肿胀,心肌纤维断层改变,细胞间质血管充血扩张(为对比明显,选用心肌坏死较为明显的染色图片进行对比观察);治疗组心肌细胞水肿较轻,坏死灶不明显,可见少量心肌纤维断层改变,见图 1。

2.2 3 组大鼠血清 cTnI 水平和心肌细胞凋亡指数比较 假手术组血清 cTnI 水平无显著性变化($P > 0.05$)。脓毒症组和治疗组各时间点 cTnI 水平均较假手术组升高($P < 0.05$),其中脓毒症组在 12 h 达峰值,治疗组在 6 h 达峰值,6、12、24 h 脓毒症组较治疗组 cTnI 明显升高($P < 0.05$)。假手术组心肌凋亡细胞较少,脓毒症组和治疗组均出现不同程度的细胞凋亡,但治疗组凋亡的心肌细胞明显少于脓毒症组(图 2)。随着时间延长,脓毒症组心肌细胞凋亡指数逐渐升高,治疗组只在 24 h 升高,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。脓毒症组在 4 个时间点心肌细胞凋亡指数均高于治疗组($P < 0.05$),见表 1。

2.3 3 组大鼠心肌细胞 caspase-3 活性比较 脓毒症组和治疗组各时间点 caspase-3 活性均较假手术组升高($P < 0.05$);其中脓毒症组在 12 h 达峰值,治疗组在 6 h 达峰值,且脓毒症组 12 h 和 24 h caspase-3 活性都较治疗组显著升高($P < 0.05$),见表 2。



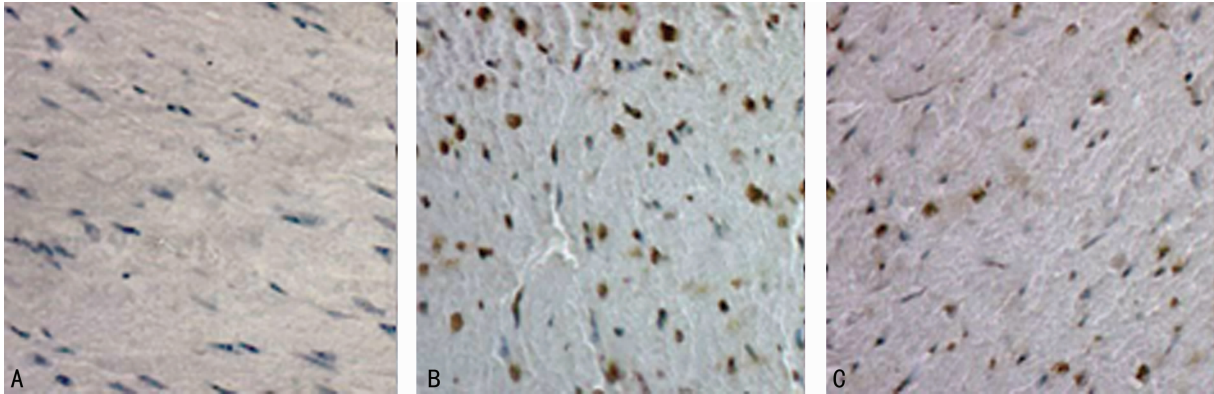
A:假手术组;B:脓毒症组;C:治疗组。

图 1 建模 24 h 心肌细胞 HE 染色(×200)

表 1 不同时相血清 cTnI 水平 (ng/mL) 和心肌细胞凋亡指数 (%) 变化 ($\bar{x} \pm s$)						
组别	3 h	6 h	12 h	24 h	F	P
假手术组						
cTnI	0.40±0.03	0.45±0.04	0.46±0.06	0.42±0.06	2.05	0.071
凋亡指数	1.50±0.35	2.64±0.89	2.87±0.43	2.73±0.31	2.84	0.075
脓毒症组						
cTnI	2.48±0.54*#	5.94±0.57*#△	6.96±0.47*#△	3.91±0.58*#△	111.08	<0.001
凋亡指数	23.84±5.19*#	42.51±7.24*#△	52.51±8.12*#△	55.48±8.44*#△	74.25	<0.001
治疗组						
cTnI	1.98±0.19*	3.19±0.84*△	3.18±1.01*△	1.99±0.45*	7.82	0.001
凋亡指数	17.54±3.51*	19.54±3.94*	20.63±4.33*	30.48±4.82*△	84.10	<0.001

*: $P < 0.05$, 与假手术组比较; #: $P < 0.05$, 与治疗组比较; △ $P < 0.05$, 与 3 h 比较。

2.4 3组大鼠第24小时心功能比较 脓毒症组和治疗组第24小时LVEF、LVPP和FS均较假手术组下降,LVEDd明显升高($P<0.05$),治疗组LVEF较脓毒症组明显升高($P<0.05$),而治疗组LVPP与脓毒症组没有差异($P>0.05$),见表3。



A:假手术组24 h;B:脓毒症组24 h;C:治疗组24 h。
图2 心肌细胞TUNEL染色(×400)

表2 不同时相心肌细胞caspase-3活性变化($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)						
组别	3 h	6 h	12 h	24 h	F	P
假手术组	7.01±1.81	7.52±2.58	8.01±2.34	6.80±1.56	1.55	>0.05
脓毒症组	12.86±3.59*	16.91±4.27*	20.95±4.57*#△	18.54±7.24*#	109.57	<0.001
治疗组	10.07±3.00*	14.27±3.66*△	11.27±2.95*	8.99±2.28*	18.25	<0.001
F	4.57	85.84	187.54	145.40		
P	0.005	<0.001	<0.001	<0.001		

*: $P<0.05$,与假手术组比较;#: $P<0.05$,与治疗组比较;△: $P<0.05$,与3 h比较。

表3 第24小时心功能指标的变化($\bar{x}\pm s$)				
组别	LVEDd(mm)	LVEF(%)	LVPP(mm Hg)	FS(%)
假手术组	4.62±0.41	78.81±12.64	137.54±15.27	56.19±4.80
脓毒症组	7.16±0.89*#	50.16±6.84*#	109.24±12.90*	21.43±3.18*#
治疗组	6.27±0.57*	63.86±7.06*	112.51±12.57*	39.62±3.94*
F	7.12	9.05	6.14	28.517
P	0.003	0.002	0.007	<0.001

*: $P<0.05$,与假手术组比较;#: $P<0.05$,与治疗组比较。

3 讨 论

肾上腺素能系统在脓毒症时被高度激活,大量的儿茶酚胺释放可以引起心肌损害,并损害心功能^[4-5]。目前,大鼠盲肠结扎加穿孔法是临床相关性最强的脓毒症模型,大鼠在其中表现出的早期高代谢和晚期低动力循环都表明,维持正常的心功能和血流动力学是成功救治脓毒症的关键^[6-7]。

徐秋林等^[8]研究发现,脓毒症大鼠不仅有血管内皮的损伤,还有肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)的升高,且三者存在一定相关性。2010年,Ackland等^[9]通过对大鼠的实验发现β受体阻断剂能抑制脓毒症过程中的全身炎症反应,并保护心脏,改善预后。我国学者也发现,美托洛尔可通过减轻炎症反应和抑制细胞因子生成来发挥抗细胞凋亡的作用^[10]。艾司洛尔是一种高选择性β1受体阻断剂,其半衰期短,不良反应小逐渐引起人们的关注^[11]。有报道称艾司洛尔在心肺复苏过程中有保护心脏,预防室颤的作用^[12]。本研究发现,脓毒症

发生过程中,心肌损伤特异性标志物cTnI升高明显,提示脓毒症状态下心肌损伤严重。而且,本研究中光镜下观察病理结果也证实了心肌细胞大量坏死。治疗组结果则表现出应用艾司洛尔可以抑制脓毒症对心肌的损伤。以往的观点认为,β1受体阻断剂对心肌收缩力及血压存在负性作用,本研究发现在应用艾司洛尔后大鼠的心率明显减慢,但心功能的损害反而得到改善,这也从另一方面说明脓毒症在很大程度上通过增加心率来代偿心输出量的减少。除减慢心率外,艾司洛尔可还能与其抑制肾上腺素能系统,减轻炎症反应,抑制心肌凋亡有关。因此,脓症患者应用短效β受体阻断剂可以改善心功能,而进一步获得相对稳定的血流动力学^[13]。

心肌细胞凋亡是由多种基因调控的主动死亡过程,一般认为与Bcl-2家族基因、Fas/FasL基因和caspase家族基因等有关^[14]。本研究中大鼠在脓毒症后3 h caspase-3大量表达,并于12 h达到峰值,艾司洛尔干预后caspase-3表达下降,峰值

提前。caspase-3 被认为在心肌细胞凋亡的级联反应中占据核心地位,它的大量表达可以激活限制性内切酶将 DNA 水解和片段化^[15]。 β 受体阻断剂可以明显抑制细胞内质网的应激状态,而 caspase-3 是内质网应激反应所具有的特异指标。本研究发现,caspase-3 活性增强与 cTnI 和心肌细胞凋亡指数变化趋势一致,提示艾司洛尔可能通过抑制 caspase-3 的活性从而降低心肌细胞凋亡的发生。

综上所述,早期使用艾司洛尔可以抑制脓毒症过程中的心肌细胞凋亡,减轻脓毒症带来的心功能损害,并获得相对稳定的血流动力学。但本研究存在观察例数少、干预时间短等不足,艾司洛尔在脓毒症患者中的应用有待进一步深入地研究。

参考文献:

- [1] Muriova K, Malaska J, Otevrel F, et al. Myocardial dysfunction in sepsis—definition and pathogenetic mechanisms[J]. Vnitr Lek, 2010, 56(3): 220-225.
- [2] Smeding L, Plotz FB, Groeneveld AB, et al. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock [J]. Shock, 2012, 37(5): 449-456.
- [3] 常瑞明,肖建强,杨涛,等.盲肠不同部位结扎穿孔致脓毒症模型的研究[J].岭南现代临床外科,2012,12(1):20-22.
- [4] An G, Namas RA, Vodovotz Y. Sepsis: from pattern to mechanism and back[J]. Crit Rev Biomed Eng, 2012, 40(4): 341-351.
- [5] 刘洁,于莺,史迪,等.脓毒症心功能障碍研究进展[J].中国急救医学,2011,31(9):847-850.
- [6] 郭海雷,卢才教,胡德林,等.脓毒症大鼠早期心肌损害与功能障碍的实验研究[J].中华急诊医学杂志,2012,21(7):725-727.

- [7] 向国艳,王玉中.128 例严重脓毒症患儿院内死亡预后评估方程的建立与评价[J].重庆医学,2012,41(7):663-665.
- [8] 徐秋林,刘静贤,郭晓华,等.血管内皮细胞损伤在脓毒症大鼠心肌损伤中的作用[J].中国动脉硬化杂志,2012,20(12):1064-1068.
- [9] Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats[J]. Crit Care Med, 2010, 38(2): 388-394.
- [10] 李志强,张印纲,程爱斌,等.美托洛尔对脓毒症大鼠心肌细胞凋亡的影响[J].实用医学杂志,2011,27(3):399-402.
- [11] Wiest DB, Haney JS. Clinical pharmacokinetics and therapeutic efficacy of esmolol[J]. Clin Pharmacokinet, 2012, 51(6): 347-356.
- [12] Jingjun L, Yan Z, Wei J, et al. Effect and mechanism of esmolol given during cardiopulmonary resuscitation in a porcine ventricular fibrillation model[J]. Resuscitation, 2009, 80(9): 1052-1059.
- [13] Rudiger A, Singer M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2013, 11(2): 187-195.
- [14] 李玉珍,刘秀华. PUMA 与心肌细胞凋亡的研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2012,39(11):1045-1049.
- [15] Li Z, Jo J, Jia JM, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization[J]. Cell, 2010, 141(5): 859-871.

(收稿日期:2014-03-18 修回日期:2014-06-02)

(上接第 4180 页)

综上所述,静脉留置针联合高压注射器行血管造影对比剂注射,应用于 CT 增强扫描时可提高实验效率,简化操作程序,减少高压注射对比剂外渗的同时可得到清晰的兔脑血栓模型的颈动脉图像,可有效达到评价目的,是兔脑血栓模型 CT 增强扫描评价中实用的实验方法。

参考文献:

- [1] 姜约莲. 高压注射器在螺旋 CT 增强扫描中的应用及护理[J]. 影像诊断与介入放射学, 2008, 17(1): 48-50.
- [2] 胡霄,王震,曾柏瑞,等. 静脉留置针在大鼠尾静脉注射中的方法和技巧[J]. 昆明医科大学学报, 2013(1): 8-10.
- [3] 李力红. 静脉留置针穿刺方法及护理的研究进展[J]. 中国实用护理杂志, 2011, 27(33): 68-69.
- [4] 庞富连,王玉珍,赵拥军. 影响静脉留置针留置时间的因素分析[J]. 中华临床医学研究杂志, 2007, 13(2): 223-224.

- [5] 张中华,王平方,毛小明,等. CT 增强扫描造影剂渗漏的预防和护理[J]. 广东医学, 2007, 28(8): 1366.
- [6] 黄艳. 高压注射器在螺旋 CT 增强扫描中的护理体会[J]. 全科护理, 2009, 7(6): 1453-1455.
- [7] Zhang Z, Berg M, Ikonen A, et al. Carotid stenosis degree in CT angiography as-ent based on luminal-versus luminal diameter measurements[J]. Eur Radiol, 2009, 15(5): 2359-2365.
- [8] 赵梅英,伟勤,丁同文. 螺旋 CT 增强扫描造影剂过敏反应的预防[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(19): 185-187.
- [9] 吴雪琴,岑玉坚,崔冰,等. 应用高压注射器进行 CT 血管造影时的护理[J]. 护士进修杂志, 2009, 19(12): 1114.
- [10] 吕微,宋葵. 静脉留置针留置时间及影响因素的研究进展[J]. 中国实用护理杂志, 2009, 25(10): 61-63.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-05-29)