

脓毒性休克对恒河猴血流动力学、器官损伤及细胞因子释放的影响

杨德兴, 王 泉, 李雪娇, 夏 婧, 钱传云
(昆明医科大学第一附属医院急诊医学科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨在恒河猴脓毒性休克中的血流动力学、心肌损伤、肺损伤、细胞因子的变化. **方法** 监测 12 只健康成年恒河猴的血流动力学、心肌损伤、肺损伤、细胞因子的相关指标. 利用上述健康成年恒河猴制作脓毒性休克动物模型成功后再检测上述指标, 前后 2 组数据进行对比分析. **结果** 制模成功后恒河猴血流动力学参数: CVP、PAWP、CI、LVWI、RWI 较前均有明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SVR、PVR 较前有下降, 但结果无统计学差异 ($P > 0.05$); 心肌损伤: 制模成功后恒河猴心肌细胞结构出现不同程度损伤、Bmax、Kd 值较前均有明显变化, 结果有统计学差异 ($P < 0.05$); 细胞因子: TNF- α RNA、TNF- α 、TNF-1 β RNA、TNF-1 β 有统计学差异 ($P < 0.05$), 肺损伤: L-选择素、P-选择素有统计学差异 ($P < 0.05$). **结论** 脓毒性休克可以造成恒河猴的血流动力学不稳定、心肌损伤、肺损伤及细胞因子的释放.

[关键词] 脓毒性休克; 心肌损伤; 肺损伤; 细胞因子; 恒河猴

[中图分类号] R631 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 04 - 0017 - 04

The Effects of Septic Shock on Hemodynamics, Organ injury and Cytokines Release of Macaca Rhesus

YANG De-xing, WANG Xiao, LI Xue-jiao, XIA Jing, QIAN Chuan-yun
(Dept. of Emergency Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of the hemodynamics, myocardial injury, lung injury, cytokines of macaca rhesus with septic shock. **Methods** We measured and analyzed the related indexes of hemodynamics, myocardial injury, lung injury, cytokines of 12 adult healthy macaca rhesus, after establishing the animal model of septic shock. **Results** CVP, PAWP, CI, LVWI, RWI had statistic difference between two groups ($P < 0.05$), SVR, PVR, the two groups had no statistical difference ($P > 0.05$); myocardial injury: The damage of myocardial cell structure, Bmax, Kd had statistic difference between two groups ($P < 0.05$), cytokines: TNF- α RNA, TNF- α , TNF-1 β RNA, TNF-1 β had statistic difference between two groups ($P < 0.05$); lung injury: L-selection, P-selection had statistic difference between two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Septic shock can cause hemodynamic instability, myocardial injury, lung injury and release of cytokines on macaca rhesus.

[Key words] Septic shock; Myocardial injury; Lung injury; Cytokines; Macaca rhesus

脓毒症导致的脓毒性休克是由感染因素介导的全身性炎症反应综合征, 此病进展快, 死亡率高, 是导致危重症患者死亡的首要因素之一^[1-3], 脓毒性休克的发病机制中, 炎症细胞因子

TNF- α RNA、TNF- α 、TNF-1 β RNA、TNF-1 β 有重要作用^[4], 脓毒性休克会引起心脏功能异常^[5,6] 如 Ryanodine 受体 (RYR 受体) 的异常, 其观察指标为心肌细胞结构、其 Bmax、Kd 值等; 同时也会

[基金项目] 云南省科技厅内设研究机构基金资助项目 (2010NS023)

[作者简介] 杨德兴 (1988~), 男, 云南玉溪市人, 在读硕士研究生, 主要从事急诊危重症临床工作.

[通讯作者] 钱传云. E-mail: qianchuanyun@126.com

引起肺损伤, L-选择素, p-选择素是反应肺损伤的特异性指标^[7,8], 血流动力学是评价脓毒性休克的最主要指标, 是现在已经达成的共识, 但脓毒性休克血流动力学的诊断标准仍然存在很大争议, 本文应用恒河猴脓毒性休克的动物模型, 研究其血流动力学、心肌损伤、肺损伤、细胞因子的改变, 希望可以为脓毒性休克的诊治提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

成年雄性恒河猴 12 只, 由中国实验动物云南灵长类中心购入, 采用自身对照, 即先检测 12 只正常成年恒河猴的血流动力学 (CVP、PAWP、CI、LVWI、RWI、SVR、PVR) 心肌损伤 (心肌细胞结构损伤、RyR 受体的 Bmax、Kd 值), 肺损伤 (L-选择素、P-选择素)、细胞因子 (TNF- α RNA、TNF- α 、TNF-1 β RNA、TNF-1 β), 再把 12 只正常成年恒河猴进行脓毒性休克动物模型建立, 脓毒性休克动物模型成功后进行和正常组一样的 12 只脓毒性休克恒河猴的相关检测。

1.2 仪器与试剂

内毒素 (LPS) (Escherichia coli 0111:B4, 美国 Sigma), 人工呼吸机, 喉镜, 芬太尼, S-G 导管, γ 羟基丁酸钠、9%氯化钠, 美罗培南, 双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA), (购自奥地利 Bender MedSystems 公司), 伯乐 Model 1680 型, H-600 电子显微镜 (购自日本), 2.5%戊二醛溶液, 二甲苯脱蜡, 3, 3 二氨基联苯胺, H-Ryanodine (购于澳大利亚 New England Nuclear DuPont 公司)、Ryanodine (购于 Sigma 公司) Rnase 抑制剂、PCR 药盒 (购于 Progmea 公司)

1.3 实验动物麻醉和置管

实验动物在实验前晚禁食, 自由饮水。实验当日氯氨酮 14 mg/kg 体重肌注诱导后气管插管, 呼吸机辅助通气, 氧浓度为 45%, 潮气量为 12 mL/kg, 呼吸率为 20 次/min, 呼吸末正压为 5 cm H₂O 以维持呼吸末肺容量。麻醉后无菌条件下常规切开实验动物一侧股动脉, 插入生物能量转换器, 与心电监护仪连接进行实时监测动脉压和心率, 每小时 1 次, 连续 72 次。经股静脉行静脉置管用于给药和血样采集。用 γ 羟基丁酸钠和芬太尼静脉复合麻醉, 术中麻醉采用苯巴比妥钠 2 mg/kg 体重经股静脉插管给入, 之后每 20~45 min 小剂量注射 1 次, 维持外科轻度麻醉水平, 麻醉时间共

持续 6 h。

1.4 样品检测

1.4.1 内毒素的注入 麻醉后无菌条件下一次性经股静脉注入内毒素 (LPS) 3.0 mg/kg, 于 3 min 内注射完。

1.4.2 血流动力学检测 通过放置 Swan-Ganz 导管, 链接监测仪, 通过热稀释法检测血流动力学参数; 经皮朝腹主动脉做股动脉插管检测血压; 经股静脉行静脉插管用于输液。参考零点中胸水平, 呼气未测压, 观察的指标包括心率 (HR)、平均动脉压 (MAP)、心排血量 (CO)、心指数 (CI)、中心静脉压 (CVP)、肺动脉嵌压 (PAWP)、每搏量 (SV)、心搏指数 (SVI)、左室每搏功指数 (LVSWI)、右室每搏功指数 (RVSWI)、体循环血管阻力指数 (SVRI)、肺循环血管阻力指数 (PVR) 等相关指标。

1.4.3 心肌损伤检测 H-Ryanodine 结合力检测依照 Zucchi R 的方法完成。治疗 6 h 治疗和观察后处死所有动物, 迅取左心室, 用电子显微镜做超微检查。根据形态学变化, 可分为 4 级: (1) 正常心肌; (2) 心肌细胞内核正常; (3) 心胞核损伤, 但同意区域损伤的细胞不聚集; (4) 在同一区域有多个核损伤。

1.4.4 细胞因子检测 逆转录多聚酶联反应 106 个 PBMC 用 TrizolRNA 试剂盒提取总 RNA。用逆转录酶将 mRNA 逆转录为 cDNA。用人 TNF- α 、IL-1 β 和 β -action 引物, 用 PCR 法扩增 (40 周期)。TNF- α 、IL-1 β 和 β -action 扩增产物的长度分别是 702, 810, 225 bp。在对数期内计算 TNF- α 、IL-1 β mRNA 和相应的 β -action 的荧光强度比。血浆内细胞因子定量:用双抗体酶标药盒检测血浆 TNF- α 、IL-1 β , 检测依照药盒说明书操作。

1.4.5 肺损伤因子检测 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA), 操作按试剂盒 (购自奥地利 Bender MedSystems 公司) 说明进行, 酶联比色仪采用伯乐 Model 680 型。

1.5 统计学分析

采用 EXCEL 录入数据, SPSS 统计软件进行统计描述和假设检验, 统计描述均采用均数 \pm 标准差及相关图表表示, 假设检验采用均配对 *t* 检验、秩和检验等。

2 结果

2.1 动物模型建立情况

本实验用的大肠杆菌内毒素剂量为 3.0 mg/kg, 与 Hajek 报告的剂量相符^[5]. 恒河猴脓毒性休克动物模型建立成功标准: 恒河猴注入大肠杆菌后, 出现寒战、发热、心率加快、血压下降、血小板下降、凝血酶原减少、凝血酶原时间延长; 和内毒素休克或晚期内毒素休克恒河猴动物模型建立的标准^[6,7]相符, 12 只恒河猴均出现了恒河猴脓毒性休克动物模型建立成功标准的症状, 即 12 只恒河猴均建模成功.

2.2 数据测定与统计

采用配对 *t* 检验, CVP、PAWP、CI、LVWI、RWI 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 可以认为脓毒性休克可以引起恒河猴的 CVP、PAWP、CI、LVWI、RWI 的下降; SVR、PVR 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可以认为脓毒性休克不能引起恒河猴的 SVR、PVR 改变, 见表 1.

采用秩和检验: 有统计学差异 ($P < 0.01$), 可以认为脓毒性休克与恒河猴的心肌损伤, 见表 2.

采用配对 *t* 检验: 心肌损伤: RYR 受体 Bmax、Kd 值水平较制模前明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 可以认为脓毒性休克可以引起恒河猴的心肌损伤. 细胞因子: TNF- α RNA、TNF- α 、TNF-1 β RNA、TNF-1、L- 选择素、P- 选择素水平均有增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 可以认为脓毒性休克可以引起恒河猴的细胞因子释放. L- 选择素、P- 选择素释放可引起肺肺损伤, 可以认为脓毒性休克可以引起恒河猴的肺损伤, 见表 3.

3 讨论

TNF- α RNA、TNF- α 、TNF-1 β RNA、TNF-1 β

表 1 正常组和脓毒性休克组血流动力学比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The comparison of hemodynamics between normal group and the septic shock group ($\bar{x} \pm s$)

项 目	脓毒性休克组	正常组
CVP(mmHg)	16.58 \pm 1.36**	21.27 \pm 2.45
PAWP(mmHg)	6.34 \pm 0.41*	7.35 \pm 1.23
CI[m ² (kg.g)]	3.57 \pm 0.29**	5.53 \pm 1.67
SVRI(mmHg)	3.75 \pm 0.12	4.14 \pm 0.76
PVR(fmolo/mg)	2 493.82 \pm 329.55	2 914.5 \pm 393.57
LVWI(mmHg)	316.21 \pm 22.87**	412.03 \pm 31.23
RWI(mmHg)	5.51 \pm 0.33	6.42 \pm 1.58

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 正常组和脓毒性休克组心肌结构损伤的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The comparison of myocardial injury between normal group and the septic shock group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	等级			
	4 级	3 级	2 级	1 级
脓毒性休克组	2	1	2	1**
正常组	0	0	0	6

与正常组比较, ** $P < 0.01$.

表 3 实验组与对照组细胞因子、肺损伤因子、心肌酶损伤对比 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The comparison of cytokines, factor of lung injury and factor of myocardial enzymes between experimental group and the control group ($\bar{x} \pm s$)

项 目	脓毒性休克组	正常组
Bmax(fmolo/mg)	102.28 \pm 8.10**	78.82 \pm 5.07
Kd(nmol/L)	2.74 \pm 0.19*	1.91 \pm 0.07
TNF- α RNA (bp)	2.50 \pm 0.11**	1.46 \pm 0.17
TNF- α (mmol/L)	1214.86 \pm 167.06*	837.51 \pm 93.58
TNF-1 β RNA (bp)	1.06 \pm 0.19*	0.96 \pm 0.21
TNF-1 β (mmol/L)	107.42 \pm 12.60*	78.84 \pm 5.13
L- 选择素 (fmolo/mg)	0.31 \pm 0.06**	0.57 \pm 0.07
P- 选择素 (fmolo/mg)	10.12 \pm 1.76*	9.12 \pm 1.02

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

是休克过程中最早产生的细胞因子之一, 在鼠、兔、猴等模型中 TNF- α 在 30 min 出现, 60 ~ 120 min 在血浆中达峰值^[9], 在此次研究中脓毒性休克的恒河猴的 TNF- α RNA、TNF- α 、TNF-1 β RNA、TNF-1 β 比正常恒河猴均升高, 但此次研究只测量脓毒性休克成功时的细胞因子释放水平, 希望以后进一步研究制模成功后不同时间点 (6, 12, 24 h) 的脓毒性休克的细胞因子释放水平. 更加客观的说明脓毒症对恒河猴细胞因子释放的影响.

本研究中笔者发现脓毒性休克会引起恒河猴的血流动力学极不稳定, 心肌细胞及肺的损伤, 和其他的研究结果基本一致. 但笔者研究发现体循环血管阻力指数 (SVRI)、肺循环血管阻力指数 (PVR) 实验组和对照组并差异无统计学意义, 其他文献报道这 2 个指标有差异, 考虑可能由于此次测量 SVRI 和 PVR 时间过早, 还没有到引起 SVRI 和 PVR 的时间, 希望在下一步的研究中得以证明.

[参考文献]

[1] LEUY M M, FINK M P, MARSHALL J C, et al. 2011 SC-

- CM/ESICM/ACCP/ATS/SIS Internations conference [J]. Intensive Care Med, 2013, 29(13):530 – 538.
- [2] ANNANE D, AEGERTER P, GUIDER B, et al. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network [J]. Am Respir Crit Care Med, 2012, 168(12):165 – 172.
- [3] BERNARD G R, VINCENT J L, LATERRE P F, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis [J]. N Engl J Med, 2011, 344(21):699 – 709.
- [4] 俞娅芬, 陈德昌, 宋秀琴. 早期诊断严重脓毒症 脓毒性休克研究进展 [J]. 中国急救医学, 2007, 13(02):12 – 13.
- [5] PATEL D, DUKE K, LIGHT R B, et al. Impaired sarcoplasmic calcium release inhibits myocardial contraction in experimental sepsis [J]. Crit Care, 2000, 15(11):64 – 72.
- [6] DONG L W, WU L L, JI Y, et al. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis [J]. Shock 2001, 16(9):33 – 39.
- [7] COURT O, KUMAR A, PARRILLO E, et al. Myocardial depression in sepsis and septic shock [J]. Crit Care, 2002, 6(21):500 – 508.
- [8] TENHUMEN J J, MARTIKAINEN T, UUSARO A, et al. Dopexamine reverses colonic but not gastric mucosal perfusion defects in lethal endotoxin shock [J]. Br J Anaesth, 2003, 91(23):878 – 885.
- [9] 李健球, 赖剑波, 刘晨凤, 等. 乌司他丁对脓毒性休克患者肺损伤防治作用的临床研究 [J]. 现代医学, 2011, 7(23):50 – 51.

(2014-02-14 收稿)

(上接第 5 页)

正丁醇提取物活性较好, 自由基清除 IC₅₀ 分别为 0.39, 0.27, 0.40 mg/mL, 进一步研究该乙酸乙酯部分化学成分, 可能得到抗氧化活性较强的化合物。

笔者首次用 DPPH 自由基清除活性研究方法对该植物不同溶剂提取物抗氧化活性进行研究, 该研究为其研究开发和应用提供了科学依据。在此研究基础上, 笔者将进一步采用新的药理活性筛选方法跟踪, 分离得到新的活性成分, 从该植物中寻找新的天然抗氧化剂和新的活性化合物。

[参考文献]

- [1] JIANGSU NEW MEDICAL COLLEGE. Dictionary of chinese herb medicines [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technologic Press, 1986: 586 – 590.
- [2] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2001: 62 – 63.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 70.
- [4] 徐国均, 杭秉茜, 李满飞. 11 种石斛对豚鼠离体肠管和小鼠胃肠道蠕动的影 响 [J]. 中草药, 1988, 19(1): 21 – 23.
- [5] 林萍, 汤依群, 杨莉, 等. 束花石斛抗凝血作用的初步研究 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(1): 44 – 46.
- [6] LI YANG, LIN-HUA Q I N, SWANNIE BLIGH, et al. A new phenanthrene with a spiro lactone from dendrobium chrysanthum and its anti-inflammatory activities [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 14(10): 3 496 – 3 501.
- [7] 杨莉, 王云, 毕志明, 等. 束花石斛化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 280 – 282.
- [8] 叶庆华, 赵维民, 秦国伟. 黄草石斛化学成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 35(10): 1 101 – 1 103.
- [9] QING-HUA Y E, WEI-MIN ZHAO, GUO-WEI QIN. New fluorenone and phenanthrene derivatives from Dendrobium chrysanthum [J]. Natural Product Research, 2003, 17(3): 201 – 205.
- [10] LUNING B, LEANDER K. Studies on orchidaceae alkaloids III: the alkaloids in dendrobium primulinum lind and dendrobium chrysanthum wall [J]. Acta Chem Scand, 1965, 19(7): 1 607 – 1 611.
- [11] EKEVAGE U, ELANDER M, GAWELL L, et al. Studies on orchidaceae alkaloids XXXIII. two new alkaloids, n-cis and n-trans-cinnamoylnorcusk hygine from dendrobium chrysanthum wall [J]. Acta Chem Scand, 1973, 27(6): 1 982 – 1 986.
- [12] VEERRAJU P, RAO N S P, RAO L J, et al. Bibenzyls and phenantheroids of some species of orchidaceae [J]. Phytochemistry, 1989, 28(11): 3 031 – 3 034.
- [13] MIN Z D, TANAKA T, IINUMA M, et al. A new dihydros-tilbene in Dendrobium chrysanthum Wall [J]. J Nat Prod, 1987, 50(6): 1 189.

(2014-02-10 收稿)