

血管内皮细胞损伤在脓毒症大鼠心肌损伤中的作用

徐秋林¹, 刘静贤¹, 郭晓华², 刘志峰¹, 唐柚青¹, 刘云松¹, 苏磊¹

(1. 广州军区广州总医院重症医学科, 广东省广州市 510010; 2. 南方医科大学病理生理学教研室, 广东省广州市 510515)

[关键词] 血管内皮细胞损伤; 脓毒症; 心肌损伤; 乌司他丁

[摘要] **目的** 探讨血管内皮细胞损伤与脓毒症心肌损伤之间的关系。**方法** 将 30 只大鼠随机分为假手术组、脓毒症组和乌司他丁组, 分别用酶联免疫法吸附法检测血浆中血管性血友病因子(vWF)、血栓调节素(TM)浓度, 罗氏生化仪检测血浆肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平, 心导管检测心脏左心室压力(LVP)、左心室压力上升或下降最大速率($+dp/dt_{\max}$ 或 $-dp/dt_{\max}$)来评价心功能, 用免疫印迹法检测心肌脑利钠肽(BNP)水平来评价心肌损伤情况。**结果** 脓毒症组vWF、TM浓度较假手术组明显增加, 同时伴有以CK、CK-MB升高为标志的心肌损伤加重, 以及BNP表达增加和LVP、 $+dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 的降低为标志的心功能下降, 乌司他丁组内皮细胞损伤降低, 心肌损伤减轻以及心功能改善。**结论** 内皮细胞损伤可能是脓毒症引起心肌损伤的重要原因。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of Vascular Endothelial Cell Damage in Myocardial Injury in Septic Rats

XU Qiu-Lin¹, LIU Jing-Xian¹, GUO Xiao-Hua², LIU Zhi-Feng¹, TANG You-Qing¹, LIU Yun-Song¹, and SU Lei¹

(1. General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Cell Damage; Sepsis; Myocardial Injury; Ulinastatin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of endothelial damage related to septic myocardial injury. **Methods** 30 Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups: sham-operation group, sepsis group and ulinastatin group. Plasma von Willebrand factor (vWF) and thrombomodulin (TM) levels were detected with ELISA, plasma creatine kinase (CK) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB) levels with reflotron plus clinical chemistry analyser, left ventricular pressure (LVP), the maximum and minimum rates of LVP change ($+dp/dt_{\max}$ and $-dp/dt_{\max}$) by cardiac catheterization and brain natriuretic peptide (BNP) levels by Western blot. **Results** Plasma CK, CK-MB and cardiac BNP levels were elevated, LVP, $+dp/dt_{\max}$ and $-dp/dt_{\max}$ decreased as vWF and TM levels increased in sepsis group compared with those in sham-operation group. However, reduced myocardial injury and improved cardiac function were observed in ulinastatin group. **Conclusion** Endothelial damage in coronary probably contributes to sepsis induced myocardial injury.

脓毒症是临床危重症中常见疾病, 脓毒症引起多脏器功能不全是其最常见死亡原因。约有 50% 的脓毒症患者心肌受累, 表现为心功能不全^[1]。目前的研究发现, 脓毒症时冠状动脉舒张功能受损, 从而导致心肌缺血, 被认为是其心肌损伤的重要机制^[2]。然而, 脓毒症引起冠状动脉舒张功能受损的具体机制仍不清楚。

内皮细胞是覆盖在循环系统内部的单层细胞,

在人体内分布非常广泛, 其功能上介导了血管的舒张和收缩, 调节细胞和营养物质的转运, 保持血液的流动性, 维持局部促炎和抗炎介质的平衡, 参与新生血管的形成, 并可引起细胞凋亡^[3]。在感染、缺氧等严重应激情况下, 血浆中来源于血管内皮细胞的血管假性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)和血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)水平升高, 其升高程度可以反映血管内皮细胞损伤的程度,

[收稿日期] 2011-12-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(81071529); 广东省自然科学基金项目资助(9151001002000021. 2009.01-2012.12)

[作者简介] 徐秋林, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病及心功能衰竭方面的研究, E-mail 为 qiul1978@gmail.com。刘静贤, 硕士研究生, 医师, 主要从事中暑与内皮细胞之间的关系研究。通讯作者苏磊, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事脓毒症、中暑方面的研究。

因而通常被用作内皮细胞损伤的标志物^[4,5]。内皮细胞损害或失功可以引起血管的舒张和收缩功能失调,可引起高血压、冠心病等多种心血管疾病,内皮细胞损伤是否介导了脓毒症心肌损伤目前仍无相关报道。

乌司他丁是弹性蛋白酶抑制物,具有抗炎、减少细胞与组织损伤,改善微循环与内皮细胞通透性等作用,并维护血管正常舒缩功能及维护内皮细胞完整性,明显减轻血管内皮细胞损伤^[6]。因而本研究建立大鼠脓毒症模型,采用乌司他丁进行干预以减轻内皮细胞损伤,探索内皮细胞损伤与脓毒症心肌病之间的关系。

1 材料和方法

1.1 大鼠脓毒症模型的建立

Sprague Dawley 大鼠 30 只,体重 230~260 g,随机分为三组:假手术组、脓毒症组、乌司他丁组。大鼠脓毒症模型的制备参考文献^[7]。大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛麻醉(3.5 mL/kg),腹壁正中切开 2 cm,拉出盲肠后在盲肠总长度 50% 处结扎,用国产 25 号针头在结扎线下 5 mm 处贯穿盲肠 1 次,造成 2 个漏口,回纳盲肠后关腹。脓毒症组于术前 1 h 经腹腔注射生理盐水 0.2 mL。假手术组除不结扎和穿刺盲肠外,其余操作同脓毒症组。乌司他丁组在建立脓毒症模型前 1 h 腹腔内注射乌司他丁 1500 U/kg。

1.2 心脏功能的血流动力学监测

术后 12 h 监测心室功能^[8],大鼠麻醉(方法同前)后经右颈总动脉往左心室内置入 1.4F Millar 压力导管,连接 FDP21 型 HRV & BRS 分析系统(上海嘉龙教仪厂生产),使用 MFLab3.01 功能学科实验软件包监测左心室压力(LVP)及左心室压力上升/

下降最大速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.3 vWF、TM、肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 6 水平测定

采用酶联免疫吸附法测定,其中 vWF、TM 试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒购自美国 Biosource 公司,操作严格按说明书进行。

1.4 CK、CK-MB 活性测定

从大鼠颈内静脉取血,4℃ 放置 30 min 待血液凝固后 4℃、2500 r/min 离心 10 min,取血清 4℃ 冰箱保存,次日用美国强生 250 自动化分析仪测定 CK、CK-MB 活性。

1.5 心肌脑利钠肽检测

取总量约 50 μ g 从大鼠心肌中提取的蛋白于 12% SDS-PAGE 上进行分离,转膜后于 4℃ 与脑利钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 和 β -actin 多克隆抗体孵育过夜,用化学发光法 ECL 进行检测,用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行分析,各组之间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IL-6、TNF- α 水平比较

脓毒症组血清内皮细胞损伤标志物 IL-6、TNF- α 水平较假手术组明显升高,而使用内皮细胞保护剂乌司他丁治疗后血清 IL-6、TNF- α 水平明显减低 ($P < 0.05$; 图 1)。

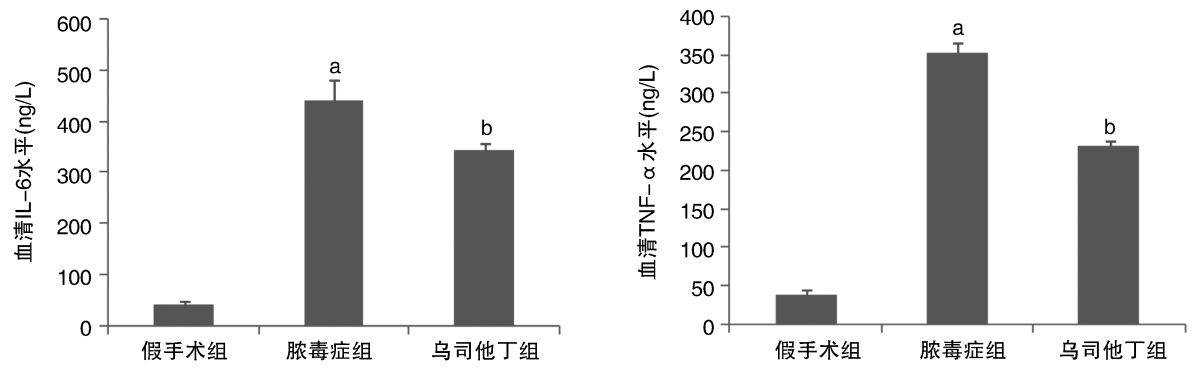


图 1. 三组大鼠血清 IL-6、TNF- α 水平比较 a 为 $P < 0.05$,与假手术组相比;b 为 $P < 0.05$,与脓毒症组相比。

Figure 1. Comparison of serum IL-6 and TNF- α levels in the three groups

2.2 血清 vWF、TM 水平比较

脓毒症组血清内皮细胞损伤标志物 vWF、TM 水平较假手术组明显升高,而使用内皮细胞保护剂乌司他丁治疗后血清 vWF、TM 水平明显减低($P < 0.05$;图 2)。

2.3 血清 CK、CK-MB 水平比较

脓毒症组心肌细胞损伤标志物 CK、CK-MB 水平较假手术组明显升高,使用内皮细胞保护剂乌司他丁治疗后 CK、CK-MB 水平明显降低($P < 0.05$;图 3)。

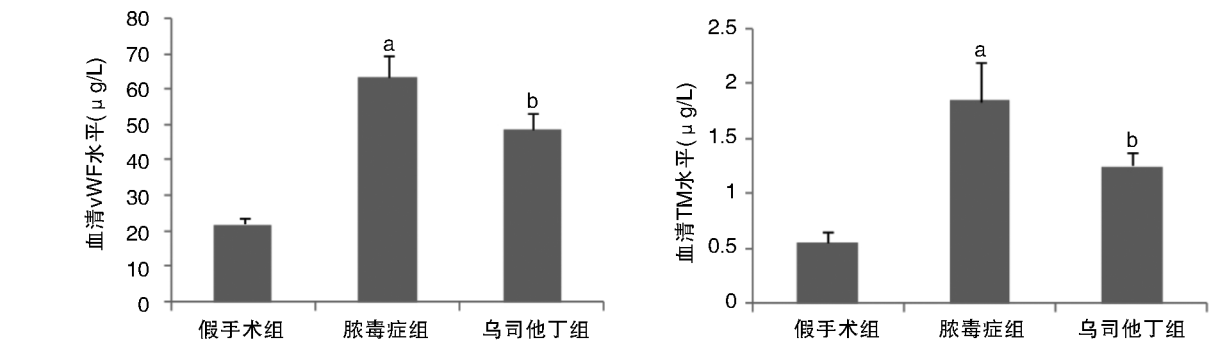


图 2. 三组大鼠血清 vWF、TM 浓度比较 a 为 $P < 0.05$,与假手术组相比;b 为 $P < 0.05$,与脓毒症组相比。

Figure 2. Comparison of serum vWF and TM levels in the three groups

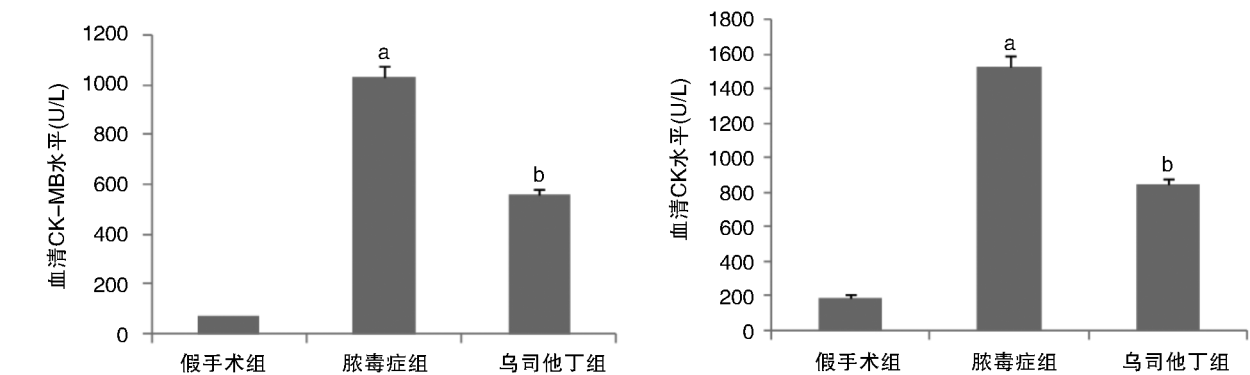


图 3. 三组大鼠血清 CK、CK-MB 浓度比较 a 为 $P < 0.05$,与假手术组相比;b 为 $P < 0.05$,与脓毒症组相比。

Figure 3. Comparison of serum CK and CK-MB levels in the three groups

2.4 心脏血流动力学比较

脓毒症组心脏血流动力学指标 LVP、+ dp/dt_{max}、

- dp/dt_{max} 较假手术组显著降低,而脓毒症大鼠使用乌司他丁干预后上述指标显著改善($P < 0.05$;图 4)。

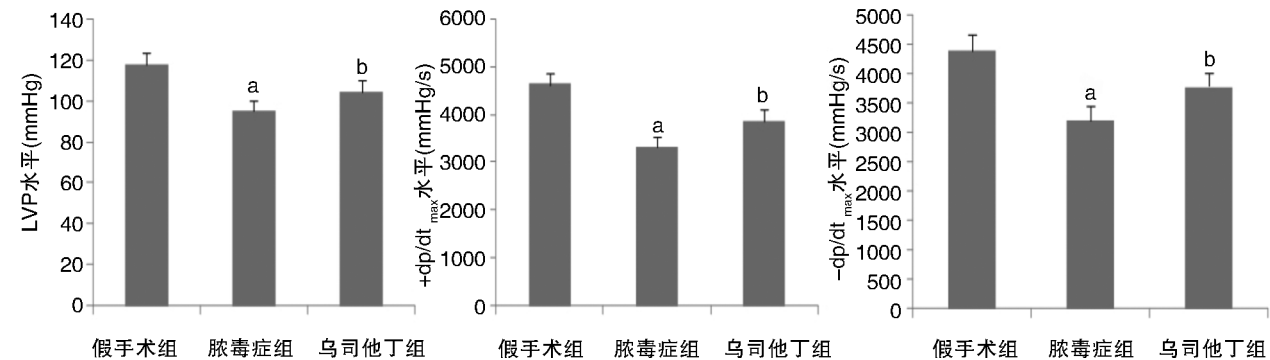


图 4. 三组大鼠血流动力学比较 a 为 $P < 0.05$,与假手术相比;b 为 $P < 0.05$,与脓毒症组相比。

Figure 4. Hemodynamic comparison in the three groups

2.5 心肌 BNP 水平比较

脓毒症组心肌 BNP 水平较假手术组显著升高,而使用乌司他丁干预后 BNP 水平显著降低($P < 0.05$;图 5)。

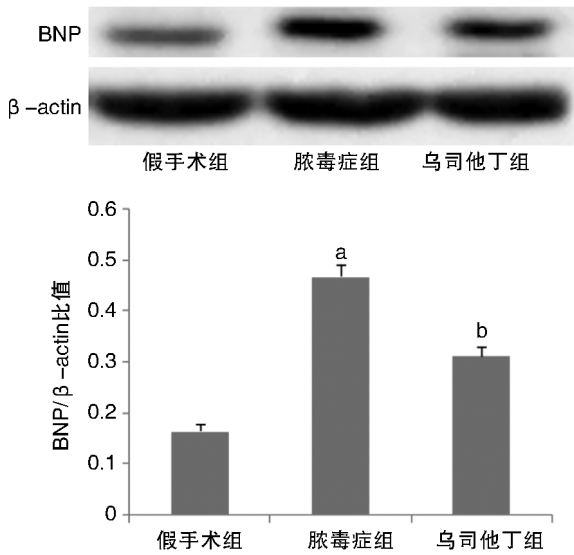


图 5. 三组大鼠心肌 BNP 水平比较 a 为 $P < 0.05$, 与假手术相比; b 为 $P < 0.05$, 与脓毒症组相比。

Figure 5. Comparison of cardiac BNP levels in the three groups

3 讨论

炎症的激活是脓毒症的重要病理生理特征,本研究中以盲肠穿孔法建立的脓毒症大鼠模型伴有促炎因子 IL-6 和 TNF- α 水平的显著升高,而乌司他丁可以显著降低升高的促炎因子水平,表明模型建立成功。研究发现,脓毒症大鼠血浆中内皮细胞损伤标志物 vWF、TM 水平显著升高,同时伴有心肌损伤标志物 CK、CK-MB 水平升高,以及 LVP、 $+dp/dt_{max}$ 、 $-dp/dt_{max}$ 下降和 BNP 水平升高,表明合并心脏损伤,并导致左心室收缩和舒张功能不全。而乌司他丁减轻内皮细胞损伤的同时,也使得心脏损伤减轻,左心室收缩和舒张功能改善,提示在脓毒症中内皮细胞损伤可能是导致脓毒症心肌损伤和心功能不全的重要因素。

目前的研究发现,内皮细胞损伤与多种心血管疾病相关。在高血压中,内皮细胞损伤被认为是高血压形成的重要机制。其机制是基于在高血压动物模型的研究中,血管对缩血管物质的反应性增强,而由剪切力或者乙酰胆碱类激动剂引起的内皮细胞依赖性血管舒张作用明显降低^[9-11]。另外,交

感神经元高活性是心血管疾病的普遍特征,也是患者病死率的重要预测因子^[12],而内皮损伤时 NO 和超氧阴离子自由基失衡引起的 NO 失活增强被认为是交感神经元高活性的重要原因之一^[13]。在心肌梗死患者中,采用血管紧张素转化酶抑制剂、AT₁ 受体抑制剂或盐皮质激素受体拮抗剂来抑制活化的肾素-血管紧张素-醛固酮系统时,也可以改善内皮细胞功能^[14,15]。本研究也发现,内皮细胞损伤可能是脓毒症导致心肌损伤和心功能不全的重要机制。

脓毒症的炎症反应激活可以引起内皮细胞损伤,进而影响内皮细胞的收缩和舒张功能,使心脏冠状动脉的舒张和收缩功能失调,从而导致心肌缺血^[3]。另外,内皮细胞损伤和失功也是炎症反应的参与者和始动因素,内皮细胞损伤可以引起 vWF、TF 释放,后者可以使凝血功能紊乱和炎症反应激活,从而引起心脏微血管的血栓形成,加重心肌微循环障碍,并可释放对心肌有抑制作用的炎症因子,进一步加重心肌损伤和心脏失功^[3,16]。因而,内皮细胞损伤或失功可能是脓毒症心肌损害的重要发病机制。

目前尚无特异性的药物用于减轻内皮细胞损伤和改善其功能,抗炎药物及他汀类药物目前被认为对内皮细胞具有保护作用,可以减轻内皮细胞损伤^[17]。乌司他丁是从人尿提取精制的糖蛋白,属蛋白酶抑制剂,具有抑制胰蛋白酶等各种胰酶活性的作用,常用于胰腺炎的治疗。目前的研究发现,乌司他丁对脓毒症、缺氧等各种刺激所引起的内皮细胞损伤具有保护作用。张莉等^[18]研究发现,在先天性心脏病婴儿的体外循环中,乌司他丁能维护血管正常舒缩功能及维护内皮细胞完整性,使得内皮细胞表达的细胞间黏附分子 1 和 CD11b 明显减少,减少白细胞与血管内皮细胞黏附,明显减轻血管内皮细胞损伤。本研究所的研究也发现,乌司他丁可以减轻中暑大鼠外周血循环内皮细胞数量,降低血清 vWF 和 TM^[19]。因而在本研究中,利用乌司他丁对内皮细胞的保护作用来观察内皮细胞损伤与脓毒症心肌损伤之间的关系。然而,乌司他丁对内皮细胞保护作用的具体分子机制仍不清楚。薛新等^[20]用脂多糖诱导急性肺损伤大鼠的血清刺激大鼠肺微血管内皮细胞,可以使其通透性增高与 F-肌动蛋白解聚,而乌司他丁可减轻 ALI 过程中炎症介质对内皮细胞骨架的影响,改善内皮细胞的通透性。Nakatani 等发现,乌司他丁可以使白细胞释放的弹力蛋白酶失活,从而减轻由白细胞介导的内皮细胞损伤。另外,在本研究中,乌司他丁可以降低脓毒症

大鼠 IL-6 和 TNF- α 水平,而后者可以引起内皮细胞损伤和失功^[21-23]。因而乌司他丁对内皮细胞的保护作用也可能部分是通过抑制 IL-6 和 TNF- α 来实现的。

[参考文献]

- [1] Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy[J]. *Ann Intern Med*, 1990, 113 (3): 227-242.
- [2] Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart[J]. *Circulation*, 2007, 116 (7): 793-802.
- [3] van Hinsbergh VW. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation[J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34 (1): 93-106.
- [4] Macko RF, Kittner SJ, Ivey FM, et al. Effects of vitamin therapy on plasma total homocysteine, endothelial injury markers, and fibrinolysis in stroke patients[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2002, 11 (1): 1-8.
- [5] Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: Microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells [J]. *J Am Soc Hypertens*, 2012, 6 (2): 85-99.
- [6] Masuda T, Sato K, Noda C, et al. Protective effect of urinary trypsin inhibitor on myocardial mitochondria during hemorrhagic shock and reperfusion[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (7): 1 987-992.
- [7] Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation[J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29 (10): 1 782-789.
- [8] Liao Y, Asakura M, Takashima S, et al. Benidipine, a long-acting calcium channel blocker, inhibits cardiac remodeling in pressure-overloaded mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65 (4): 879-888.
- [9] Konishi M, Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries[J]. *Hypertension*, 1983, 5 (6): 881-886.
- [10] Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension[J]. *Hypertension*, 1993, 21 (6 Pt 2): 929-933.
- [11] Xavier FE, Davel AP, Fukuda LE, et al. Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: The role of vascular mechanisms[J]. *J Hypertens*, 2009, 27 (6): 1 233-242.
- [12] Barretto AC, Santos AC, Munhoz R, et al. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients[J]. *Int J Cardiol*, 2009, 135 (3): 302-307.
- [13] Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, et al. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: Role of enhanced vascular superoxide production[J]. *Circulation*, 1999, 100 (3): 292-298.
- [14] Schafer A, Fraccarollo D, Tas P, et al. Endothelial dysfunction in congestive heart failure: Ace inhibition vs. Angiotensin ii antagonism[J]. *Eur J Heart Fail*, 2004, 6 (2): 151-159.
- [15] Sartorio CL, Fraccarollo D, Galuppo P, et al. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction[J]. *Hypertension*, 2007, 50 (5): 919-925.
- [16] Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, et al. Endothelial dysfunction: A comprehensive appraisal[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2006, 5: 4.
- [17] Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15 (8): 1 983-992.
- [18] 张莉,顾海涛,戚继荣,等. 乌司他丁对婴儿体外循环中细胞粘附分子变化的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008 (10): 1 305-308.
- [19] 童华生,陈怿,唐袖青,等. 乌司他丁对重症中暑患者血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *广东医学*, 2011 (12): 1 574-576.
- [20] 薛新,刘志勇. 内毒素诱导急性肺损伤大鼠血清对内皮细胞通透性的影响及乌司他丁的保护作用研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2011 (4): 594-597.
- [21] Esteve E, Castro A, Lopez-Bermejo A, et al. Serum interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30 (4): 939-945.
- [22] Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor[J]. *Circ Res*, 2004, 94 (4): 534-541.
- [23] Donato AJ, Henson GD, Morgan RG, et al. TNF-alpha impairs endothelial function in adipose tissue resistance arteries of mice with diet-induced obesity[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303 (6): H 672-679.

(此文编辑 文玉珊)