

· 基础研究 ·

血必净注射液对心肺复苏后大鼠心肌肌钙蛋白 T、 心肌细胞 Ca^{2+} 水平的影响*

黄效模¹, 郭 军², 周厚荣^{1△}, 张 谦¹, 曾德珍¹, 刘海健¹

(1. 贵州省人民医院急诊科, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院第一附属医院急诊科 550001)

摘要:目的 探讨血必净注射液对大鼠心肺复苏后心肌肌钙蛋白 T(cTnT)、心肌细胞 Ca^{2+} 水平及心肌病理改变的影响。
方法 建立心肺复苏大鼠模型, 并将其随机分为 3 组, 假手术组(大鼠在麻醉后仅行气管切开插管、颈动脉血管穿刺, 而不进行窒息及心肺复苏试验, $n=6$)、模型组(大鼠在心肺复苏即刻通过尾静脉缓慢注射生理盐水 4 mL/kg, $n=6$)、血必净组(大鼠在心肺复苏即刻通过尾静脉缓慢注射血必净注射液 4 mL/kg, $n=6$)。检测心肺复苏前、后各组 cTnT 值、 Ca^{2+} 荧光强度平均值及心肌病理变化。**结果** 心肺复苏后 6 h, 模型组、血必净组大鼠心肌细胞 Ca^{2+} 荧光强度平均值高于假手术组($P<0.01$)。与心肺复苏前比较, 心肺复苏后 6 h 模型组、血必净组大鼠的 cTnT 值均明显升高($P<0.01$), 尤以模型组升高幅度最大。血必净组大鼠心肌损害较模型组轻。**结论** 血必净注射液可通过抑制心肌细胞钙超载, 下调 cTnT 水平而发挥保护心肌的作用。

关键词:心肺复苏术; 心肌再灌注损伤; 钙; 肌钙蛋白; 血必净注射液

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.09.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)09-0875-03

Effects of Xuebijing injection on levels of cardiac troponin T and Ca^{2+} in cardiac myocytes of rats after cardio-pulmonary resuscitation*

Huang Xiaomo¹, Guo Jun², Zhou Hourong^{1△}, Zhang Qian¹, Zeng Dezhen¹, Liu Haijian¹

(1. Department of Emergency Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Guiyang College of

Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Xuebijing injection on levels of cardiac troponin T(cTnT), Ca^{2+} and pathological changes in cardiocytes of rats after cardiopulmonary resuscitation. **Methods** Rat models of cardiopulmonary resuscitation were established and randomly divided into 3 groups: sham operation group(tracheostomy and carotid artery puncture were performed after anesthesia without asphyxia and cardiopulmonary resuscitation test, $n=6$), model group(physical saline 4 mL/kg was injected slowly into the tail vein at the time of cardiopulmonary resuscitation, $n=6$) and Xuebijing group(Xuebijing injection 4 mL/kg was injected slowly into the tail vein at the time of cardiopulmonary resuscitation, $n=6$). The value of cTnT, average of Ca^{2+} fluorescence intensity and pathological changes of cardiocytes in each group before and after cardiopulmonary resuscitation were detected. **Results** 6 hours after cardiopulmonary resuscitation, average of Ca^{2+} fluorescence intensity in cardiocytes of rats in model group and Xuebijing group were higher than those in sham operation group($P<0.01$). Compared with cardiopulmonary resuscitation before, cTnT values of rats in model group and Xuebijing group 6 hours after cardiopulmonary resuscitation were markedly increased ($P<0.01$), especially in model group increased the sharpest. Myocardial lesion of rats in Xuebijing group was slighter than that in model group. **Conclusion** Xuebijing injection plays the role of myocardial protection through inhibition of calcium overload and reduction of cTnT level in cardiocytes.

Key words: cardiopulmonary resuscitation; myocardial reperfusion injury; calcium; troponin; Xuebijing injection

心搏骤停是严重威胁人类生命的临床事件, 心肺复苏是心搏骤停最重要的综合治疗手段, 其本质是缺血/再灌注损伤过程, 主要涉及细胞内钙超载、氧自由基的大量产生、微血管损伤和白细胞的作用。心肺复苏时, 肌质网中存储的 Ca^{2+} 释放以及细胞外 Ca^{2+} 经破坏的细胞膜进入心肌细胞, 肌质 Ca^{2+} 浓度增加, 产生钙超载, 导致心肌损伤, 形成恶性循环, 加重心功能不全的发生^[1], 表现为心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT) 升高。本实验通过建立心肺复苏大鼠模型, 探讨血必净注射液对心肺复苏后心肌细胞 cTnT 及 Ca^{2+} 浓度的影响及其作用机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

18 只健康成年 SD(Sprague Dawley) 大鼠购

自第三军医大学大坪医院野战外科研究所医学实验动物中心, 生产许可证号: sCXK(渝)2007-0005, 雌雄不限, 体质量 310~450 g, 将其随机分为 3 组: 假手术组、模型组及血必净组, 每组 6 只。假手术组大鼠在麻醉后仅行气管切开插管、颈动脉血管穿刺, 而不进行窒息及心肺复苏试验; 模型组大鼠采用安慰剂、在心肺复苏即刻通过尾静脉缓慢注射生理盐水 4 mL/kg; 血必净组大鼠在心肺复苏即刻通过尾静脉缓慢注射血必净注射液 4 mL/kg(天津红日药业有限公司, 批号: 08121001)。

1.2 动物模型制备

实验大鼠术前晚上禁食, 允许自由饮水。维持体温在正常范围以避免其对实验结果的影响。采用改进后的窒息法建立大鼠窒息模型^[2], 将动物仰卧固定于手术台上, 乌拉坦(首剂 2 g/kg)腹腔注射麻醉, 行左颈动脉置管, 接

ASB-240U 生物信号采集分析系统(成都傲生科技公司),记录 II 导联心电图。气管切开置管,接 ALC-V9 动物呼吸机(上海奥尔特生物科技有限公司)。大鼠术后室温下稳定 10 min,于呼气末夹闭气管插管使其窒息,心搏骤停后(413.2±23.6)s 立即实施心肺复苏。胸外心脏按压频率为 160 次/min,按压深度为大鼠胸廓前后径的 1/3,并快速经尾静脉推注肾上腺素 0.01 mg/kg,呼吸机辅助通气;吸入氧体积分数(fraction of inspire O₂, FiO₂) 100%,呼吸频率 80 次/min,潮气量 6 mL/kg,持续监测并记录心电图及颈动脉血压。15 min 心肺复苏无效者放弃复苏。记录窒息导致心搏骤停的时间、心肺复苏时间、自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC)时间;ROSC 3 h 后逐步撤离呼吸机。实验结束时立即开胸取左心室心尖部游离心肌组织进行标本固定,苏木素-伊红染色行病理学检查。

1.3 心搏骤停标准 (1)心电图提示心电静止、心室颤动^[3];(2)心电机械分离;(3)心尖区心脏搏动消失;(4)动物皮肤、黏膜明显发绀。

1.4 ROSC 判断指标 (1)心电图出现正常的 QRS 波群(与夹闭气管前的心电图表现相近);(2)可触摸到明显的心尖搏动,收缩压不低于 60 mm Hg;(3)动物皮肤、黏膜发绀明显减轻。

1.5 心肌细胞 Ca²⁺ 荧光强度的检测 在细胞培养液保护下将心室肌剪成碎片,用吸管轻轻反复吹打,分离心室肌细胞,用 200 目滤网去除残渣,用 D-Hanks 液反复洗涤,将其制成细胞悬液,通过细胞计数器控制心肌细胞数为 1~2×10⁶ 个。用 Fluo-3AM 负载染色 45 min 后,采用 FACARIA 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测细胞内荧光强度的平均值,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm。

1.6 观察指标 检测窒息时间、心肺复苏时间、ROSC 时间,心肺复苏前后心率、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、心肌细胞 Ca²⁺ 荧光强度平均值及心肌 cTnT 水平。

1.7 统计学处理 应用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,如方差不齐,采用成组设计资料的 *t* 检验,两两比较用 SNK (Student Newman Keuls)法;如方差不齐,则采用随机区组设计的秩和检验(Wilcoxon 检验),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

模型组与血必净组大鼠体质量、窒息时间、心肺复苏时间、ROSC 时间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。模型组与血必净组大鼠心肺复苏前、后的心率、MAP 比较见表 2,血必净组大鼠心肺复苏后 6 h 的 MAP 与模型组同时间比较,模型组大鼠心肺复苏后 6 h 的 MAP 与同组心肺复苏前比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 模型组与血必净组大鼠体质量、窒息时间、心肺复苏时间及 ROSC 时间的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体质量 (g)	窒息时间 (s)	心肺复苏 时间(s)	ROSC 时间(s)
模型组	380.4±21.2	423.1±26.3	192.0±109.9	612.3±116.4
血必净组	379.7±19.4*	402.3±21.6*	172.8±46.3*	574.5±47.2*

*: $P > 0.05$,与模型组比较。

心肺复苏后 6 h 各组心肌细胞 Ca²⁺ 荧光强度平均值和 cTnT 值的变化见插 I 图 1、表 3。心肺复苏后 6 h,模型组、血必净组大鼠心肌细胞 Ca²⁺ 荧光强度平均值高于假手术组($P <$

0.01),组间两两比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。心肺复苏前各组 cTnT 值差异无统计学意义($P > 0.05$),与心肺复苏前比较,心肺复苏后 6 h 模型组、血必净组大鼠的 cTnT 值均明显升高($P < 0.01$),尤以模型组升高幅度最大。

表 2 模型组与血必净组大鼠心肺复苏前、后的心率、MAP 比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	心率(次/min)		MAP(mm Hg)	
	心肺复苏前	心肺复苏后 6 h	心肺复苏前	心肺复苏后 6 h
模型组	368.5±38.7	261.3±77.1	88.7±13.4	60.2±14.1*
血必净组	365.3±71.2	344.0±57.5	86.8±18.8	89.5±17.6△

*: $P < 0.01$,与同组心肺复苏前比较;△: $P < 0.05$,与模型组同时间比较。

表 3 各组大鼠心肺复苏后 6 h 心肌细胞 Ca²⁺ 荧光强度平均值和 cTnT 值的变化($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n=6$)

组别	心肺复苏前		心肺复苏后 6 h	
	cTnT	Ca ²⁺ 荧光 强度平均值	cTnT	Ca ²⁺ 荧光 强度平均值
假手术组	3.7±1.1	—	3.7±1.1	103.6±26.6
模型组	3.9±0.9	—	133.0±41.0*	1758.1±942.7#
血必净组	4.0±0.9	—	44.9±9.9*	699.3±280.0#△

*: $P < 0.01$,与同组心肺复苏前比较;#: $P < 0.01$,与假手术组同时间比较;△: $P < 0.01$,与模型组同时间比较;—:表示此项目无数据。

各组大鼠病理学改变见插 II 图 2,假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,肌膜完整;模型组大鼠心肌组织呈大面积粉染,心肌纤维结构紊乱,部分细胞核消失,并可见心肌细胞出现空泡变性,嗜酸性变,肌质溶解;血必净组大鼠的心肌细胞形态学改变较轻,与模型组比较有明显改善。

3 讨论

Ca²⁺ 在心肌细胞兴奋-收缩偶联过程中发挥重要作用,它是介导心肌细胞损伤和死亡过程的重要因子^[4]。cTnT 是心脏的特异性抗原,现已成为评价心肌损伤的特异性指标^[5]。Chu 等^[6]认为心肌细胞内 Ca²⁺ 浓度与心肌收缩力明显相关。唐万春和孙士杰^[7]研究认为心肺复苏后心肌细胞钙超载可能与激活 Na⁺-Ca²⁺ 交换、细胞膜通透性增加、线粒体功能障碍、肌质网膜及细胞膜钙泵功能障碍等因素有关;此外,钙超载可导致心律失常、心肌能量代谢障碍,心肌纤维损伤断裂^[8]。

临床上,许多心肺复苏成功的患者往往因随后的心肌损伤使心脏和循环功能不能维持而发生循环功能紊乱、组织缺氧和代谢障碍,导致患者不能存活^[9-10]。心搏骤停初期,心肺复苏成功的患者在 ROSC 后 0.5~4.0 h cTnI 逐渐升高^[11],24 h 达高峰,且在 ROSC 4 h 时的 cTnI 升高水平与患者病死率呈正相关,cTnI 水平可评估因非心源性心搏骤停、呼吸骤停患者心肺复苏后的预后^[12]。现已有多种药物用于心肺复苏早期及后期的高级生命支持^[13],但罕有中成药的相关报道。

血必净注射液是以多种活血化瘀药物,如赤芍、川芎、丹参、红花、当归等组成,现代药理学证明其具有强效抗内毒素作用,可拮抗内毒素诱导单核/巨噬细胞产生的内源性炎症介质失控性释放,改善弥散性血管内凝血(disseminated or diffuse intravascular coagulation, DIC)的凝血机制异常,减少细胞内钙超载,减少氧自由基的释放,减少急性炎症时毛细血管的通透性,减少炎症渗出,同时调节过高或过低的免疫反应,保护和修复应激状态下受损的脏器^[14]。活血化瘀类复方中药制剂通过多靶点对血管内皮细胞发挥保护效应,增强冠状动脉的血流灌

注,增加心肌收缩力和心输出量,改善心脏功能,防止心律失常的发生,从而提高心肺复苏的成功率^[15]。

本实验发现心肺复苏后大鼠心肌细胞 Ca^{2+} 荧光强度平均值升高,心肺复苏后 6 h 模型组、血必净组心肌细胞 Ca^{2+} 荧光强度平均值高于假手术组($P < 0.01$),这提示心肺复苏后心肌细胞存在钙超载;心肺复苏后 6 h 模型组心肌细胞 Ca^{2+} 荧光强度平均值高于血必净组($P < 0.01$),这说明血必净注射液可有效减轻钙超载;心肺复苏前各组大鼠 cTnT 值的差异无统计学意义($P > 0.05$),但心肺复苏后 6 h 模型组、血必净组均有不同程度升高,说明心肺复苏后存在急性心肌损伤及心肌细胞坏死;模型组 cTnT 升高幅度最大,血必净组大鼠心肌细胞的形态学改变程度较轻,与模型组比较有明显改善,提示血必净注射液可抑制 Ca^{2+} 内流,减轻心肌细胞钙超载,从而减轻心肺复苏后心肌的缺血/再灌注损伤。

综上所述,血必净注射液可抑制心肺复苏后心肌细胞的 Ca^{2+} 内流,减轻钙超载,减轻心肌损伤程度;经动脉持续有创监测也提示其具有稳定血流动力学,防止严重心律失常,稳定心肌收缩舒张功能的作用。

参考文献:

- [1] Zheng X, Lian D, Wong A, et al. Novel small interfering RNA-containing solution protecting donor organs in heart transplantation [J]. *Circulation*, 2009, 120 (12): 1099-1107.
- [2] 陈寿权,李章平,王姗姗,等. 窒息法致大鼠心脏骤停模型复苏的影响因素[J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, 14(10): 22-25.
- [3] Lurie KG, Yannopoulos D, Mcknite SH, et al. Comparison of a 10-breaths-per-minute versus a 2-breaths-per-minute strategy during cardiopulmonary resuscitation in a porcine model of cardiac arrest[J]. *Respir Care*, 2008, 53(7): 862-870.
- [4] El-Menyar AA. The resuscitation outcome: revisit the story of the stony heart[J]. *Chest*, 2005, 128(4): 2835-

2846.

- [5] 何明丰,张英俭,陈文元,等. 参附注射液对家兔缺氧型心搏骤停——心肺复苏模型血清心肌肌钙蛋白 T 的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2004, 13(9): 586-588.
- [6] Chu L, Takahashi R, Norota I, et al. Signal transduction and Ca^{2+} signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium[J]. *Circ Res*, 2003, 92(9): 1024-1032.
- [7] 唐万春,孙士杰. 心肺脑复苏及心脑血管急诊——从基础科学到临床实践[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2008: 47-48.
- [8] 殷显德,孙晓莉. 心脏复苏中心肌损伤机制[J]. *临床荟萃*, 2006, 21(1): 62-64.
- [9] 李春盛,樊寻梅. 聚焦 2005 年 ECC 及 CPR 治疗推荐国际会议[J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, 14(10): 79-80.
- [10] 沈洪,蒋健. 中国心肺复苏关注的问题——回顾国际《心肺复苏及心血管急救指南 2005》的修订[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(4): 193-194.
- [11] 刘琼,周发春,徐昉. 心肺骤停自主循环恢复患者心肌损伤的临床研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2006, 31(3): 430-431.
- [12] 李晓东,顾伟. 血清肌钙蛋白 I 评估心肺复苏患者预后价值[J]. *长春中医药大学学报*, 2006, 22(4): 58.
- [13] 晏平,陈寿权,李章平. 心肺复苏中心脏保护药物的研究进展[J]. *中华急诊医学杂志*, 2008, 17(1): 105-107.
- [14] 吴向东,张久之,万献尧,等. 血必净防治复苏后综合征的临床观察[J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2009(6): 381-383.
- [15] Wong TM, Shan J. Modulation of sympathetic actions on the heart by opioid receptor stimulation[J]. *J Biomed Sci*, 2005, 8(4): 299-306.

(收稿日期:2011-10-06 修回日期:2012-02-13)

(上接第 874 页)

- Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(21): 4818-4823.
- [6] Bashan N, Burdett E, Hundal HS, et al. Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O_2 in muscle cells in culture[J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(3 Pt 1): C682-690.
- [7] Katz A. Modulation of glucose transport in skeletal muscle by reactive oxygen species[J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(4): 1671-1676.
- [8] Stein I, Neeman M, Shweiki D, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(10): 5363-5368.
- [9] Ouiddir A, Planès C, Fernandes I, et al. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter

GLUT1 in alveolar epithelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(6): 710-718.

- [10] 刘勇,陈锋,朱涛,等. 单肺通气时小潮气量对血气和血流动力学的影响[J]. *鄞阳医学院学报*, 2006, 25(1): 34-35.
- [11] 游志坚,姚尚龙,梁华根. 不同时间单肺通气后兔两侧肺损伤程度比较[J]. *中国急救医学*, 2007, 27(2): 133-135.
- [12] 李军,安小玲,唐杰. 缺氧增加大鼠视网膜糖载体蛋白 glut-1 的表达[J]. *黑龙江医学*, 2004, 28(3): 191-192.
- [13] 黄斌,高钰琪,张国斌,等. 大鼠缺氧习服后骨骼肌葡萄糖摄取的特点[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(1): 5-7.
- [14] Lin Z, Weinberg JM, Malhotra R, et al. GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 278(5): E958-966.

(收稿日期:2011-11-21 修回日期:2012-01-08)