· 基础研究 ·

缬沙坦对脓毒症大鼠心肌损伤保护的实验研究

庄海舟 沈璐华 段美丽 李昂 张淑文

【摘要】 目的 本研究旨在观察大鼠盲肠结扎穿孔(CLP)脓毒症模型中心肌损伤的发生情况，应用血管紧张素1受体(AT_1R)拮抗剂缬沙坦进行干预，观察其对心肌肾素-血管紧张素系统(RAS)〔包括血浆、心肌血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)和心肌组织 AT_1R/AT_2R mRNA表达〕的影响及对脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用。方法 73只Wistar大鼠制成CLP模型，随机分为手术组和手术+缬沙坦组，每组3，24，72 h 3个时间点，另8只为假手术对照组，观察心肌损伤指标、RAS和一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)等指标，观察各组各个时间点检测指标的变化。结果 CLP术后，手术组血浆肌钙蛋白T(TnT)、脑钠素(BNP)、血浆和组织AngⅡ和NO、MDA浓度在3，24，72 h 3个时间点均明显升高，而缬沙坦组上述指标较手术未干预组明显好转。结论 大鼠发生脓毒症后可出现明显的心肌损伤，表现为TnT和BNP升高。缬沙坦可通过拮抗 AT_1R 抑制RAS过度激活及抑制NO、自由基介导的组织损伤而改善脓毒症心肌损伤。

【关键词】 脓毒症；血管紧张素Ⅱ；血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂

Protective effects of valsartan against myocardial injury in rats with sepsis

ZHUANG Haizhou, SHEN Luhua, DUAN Meili, et al

Affiliated Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, 100050 *Beijing, China*

【**Abstract**】 **Objective** To observe the myocardial injury in rats with sepsis, the protective effect of intervention with AT_1 receptor antagonist valsartan against the injury and the change of myocardial RAS system, including angiotensin Ⅱ in plasma and myocardium and the expression of AT_1/ AT_2 receptor mRNA in myocardium, after using valsartan. **Methods** Seventy-three Wistar rats were divided into surgery group and surgery + valsartan group after cecam ligation and perforation (CLP). Each group was further divided into three time point (3h, 24h and 72h) subgroups. Other 8 rats were used as the sham operation control group. The changes of indexes of myocardial injury, i. e. RAS system, NO and MDA, were observed. **Results** After CLP, troponin T(TnT), brain natriuretic peptide (BNP) and AgⅡ in plasma and myocardium, NO and MDA concentrations ascended significantly, while these indexes in valsartan group were improved significantly. **Conclusions** There is obvious myocardial injury in rats with sepsis, including ascent of TnT and BNP. Valsartan can improve the septic myocardial injury by inhibiting the over-activation of RAS system (by antagonizing the AT_1 receptor), NO and free radicals.

【**Key words**】 sepsis; angiotensin Ⅱ; angiotensin Ⅱ receptor antagonist

脓毒症(scpsis)心肌损伤是脓毒症及脓毒性休克时常见的临床并发症，发生率很高。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的异常激活可能是其发生的重要原因之一。本研究旨在观察大鼠盲肠结扎穿孔(cecal ligation perforation, CLP)脓毒症模型中心肌损伤的发生情况，并观察心肌RAS在脓毒症后不同时间点的动态变化，应用血管紧张素1受体(angiotensin 1 receptor, AT_1R)拮抗剂缬沙坦进行干预，观察 AT_1R 拮抗剂类药物对心肌可能的保护作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 Wistar大鼠，由首都医科大学实

收稿日期：2006-07-18

作者单位：100050 北京市，首都医科大学附属北京友谊医院 ICU(庄海舟、段美丽、李昂)，心脏中心(沈璐华)，感染内科(张淑文)

作者简介：庄海舟，男，1973年1月生，上海市人，医学博士，主治医师

通讯作者：沈璐华，Tel：010-63133269

万方数据

验动物中心提供，均为雄性，质量为250g左右，为二级动物。

1.2 大鼠CLP脓毒症模型制备 脓毒症模型由CLP方法进行制备[1]，它是研究脓毒症的理想模型，与临床上腹膜炎引起的脓毒症很相似，与静脉注入脂多糖模型相比，更符合实际的病理生理过程。

1.3 动物分组及给药 将实验大鼠随机分为3组：A组：假手术对照组；B组：CLP模型组；C组：CLP＋缬沙坦组；A组除不结扎盲肠外，其余手术步骤同其他组。B组和C组每组分为3，24，72 h 3个时间点，每个时间点8只大鼠。缬沙坦（商品名 Diovan）：诺华制药公司 批号：S0008B，药物用生理盐水配成4g/L浓度药物混悬液。C组大鼠术前48h开始药物灌胃，给予缬沙坦10mg/(kg·d)，A、B组不喂药，给予等量生理盐水灌胃。每日8:00～9:00AM用大鼠灌胃针进行灌胃。直至到达各组观察时间点时处死大鼠为止，每次喂药前称质量以调节药物用量。

1.4 检测指标 (1)血浆肌钙蛋白T(troponin T，TnT)放免法测定(试剂盒由北京北方生物技术研究所生产)。(2)血浆脑钠素(brain natriuretic peptide，BNP) 酶免法测定 (BPB Biomedicals，Inc USA)。(3)血浆和心肌组织血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ，AngⅡ)放免法测定(北京北方生物技术研究所)。(4)血浆一氧化氮(nitric oxide，NO)(北京北方生物技术研究所)。(5)血浆丙二醛(malondialdehyde，MDA)测定 (北京北方生物技术研究所)。(6)心肌组织 AT_1R/AT_2R mRNA(RT-PCR法)测定RT-PCR试剂盒及引物购于北京鼎国生物技术公司。

AT_1R 引物：上游 5' GAGTCTCGGAATTCGACGCTC3'，下游 5' CATGGCAGTGTCCACGATGT3'。AT_2R 引物：上游5'GCTGGCTTCCCTTCCATGT3'，下游5'CCTCCAAACCATTGCTAGGCT3'。GAPDH 引物：上游：5'CAGGA TGCAG A AGGA GATCA3'，下游：5' TCCTG CTTGC TGATC CACAT 3'。AT_1R 和 AT_2R 的扩增产物分别为300bp和336bp；GAPDH的扩增产物为150bp。使用GelPr3.0软件分析结果，得到目的基因/GAPDH的灰度值比值。每个样品分别取其GAPDH扩增产物6μl、目的基因扩增产物10μl，加样于同一电泳体系中电泳，电泳条带用分子生物学图像分析系统(One-Dsan2.03软件)进行灰度对比半定量分析。AT_1R/GAPDH 和 AT_2R/GAPDH 灰度比值分别表示 AT_1R 和 AT_2R mRNA的表达水平。

1.5 统计学方法 应用SPSS 12.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，计量资料组间差异用One-Way ANOVA检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠一般情况 各组大鼠术后死亡率：本研究中共用大鼠81只，实验过程中共死亡25只，术后总死亡率为31%，其中B组死亡17只(21%)，C组死亡8只(10%)。

2.2 各组大鼠心肌损伤指标TnT和BNP水平测定结果 见表1。

表1 各组大鼠TnT和BNP水平测定结果($n=8$)

组 别	TnT (μg/L)	BNP (μg/L)
A组	0.06±0.03	0.89±0.21
B-3组	0.13±0.06*	0.81±0.32
B-24组	0.69±0.29#	1.78±0.39*
B-72组	0.65±0.14#	2.48±0.44#
C-3组	0.19±0.08*	0.93±0.27
C-24组	0.21±0.09*☆	1.66±0.26*
C-72组	0.26±0.13*☆	1.72±0.36*△

注：B、C组与A组相比，*$P<0.05$，#$P<0.01$；C组与B组相比，△$P<0.05$，☆$P<0.01$

2.3 各组大鼠血浆和心肌组织AngⅡ和血浆NO、MDA水平测定结果 见表2。

表2 各组大鼠血浆和心肌组织AngⅡ和血浆NO、MDA水平测定结果($n=8$)

组 别	AngⅡ (ng/L)	AgⅡ (ng/g)	NO (mmol/L)	MDA (μmol/L)
A组	936±244	116±16	0.05±0.05	8.62±0.81
B-3组	1402±384*	132±23	0.05±0.05*	11.24±0.89*
B-24组	2197±479#	152±25	0.08±0.01#	14.85±0.78#
B-72组	2104±443#	147±29	0.07±0.01#	13.72±0.91#
C-3组	1496±352*	147±35	0.05±0.04	12.35±1.02*
C-24组	2634±691#△	194±47#	0.07±0.01#☆	11.28±0.97*△
C-72组	2352±507#	163±33#	0.06±0.01*△	11.67±0.73*

注：B、C组与A组相比，*$P<0.05$，#$P<0.01$；C组与B组相比，△$P<0.05$，☆$P<0.01$

万方数据

2.4 各组大鼠心肌组织 AT_1R 和 AT_2R mRNA 表达情况及电泳图像 见表 3，图 1～6。表 3 结果表明，与 A 组相比，B、C 组 AT_1R mRNA 表达均下降（$P<0.05$），C 组 AT_1R mRNA 表达下降更明显；与 A 组相比，B、C 组 AT_2R mRNA 表达均有上升（$P<0.05$），C 组 AT_2R mRNA 表达上升较明显。

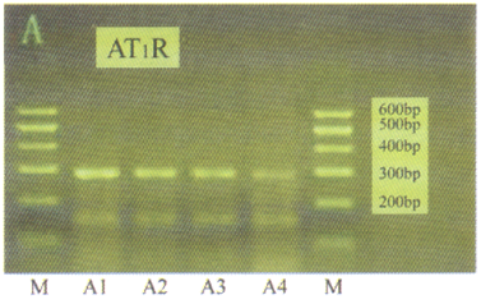
3 结 论

大鼠发生脓毒症后可出现明显的心肌损伤，表现为 TnT 和 BNP 的升高。缬沙坦可通过对 AT_1R 的拮抗抑制 RAS 的过度激活及抑制 NO 和自由基介导的组织损伤而改善脓毒症心肌损伤和心肌功能障碍。

表 3 各组大鼠心肌组织 AT_1R/AT_2RmRNA 表达情况（$n=4$）

组 别	AT_1R mRNA	AT_2R mRNA
A 组	3.18±0.40	2.49±0.51
B3 组	3.01±0.64*	2.93±0.80*
B24 组	2.15±0.46*	2.99±0.68*
B72 组	2.79±0.62*	3.20±0.74*
C3 组	2.31±0.99*	3.73±0.85*
C24 组	1.88±0.68*	3.45±1.34*
C72 组	1.80±1.19*	4.19±1.23*

注：B、C 组与 A 组相比，* $P<0.05$



M 为 Marker，分子量见右侧标示，余照片同

图 1 A 组 AT_1R mRNA 表达电泳图像

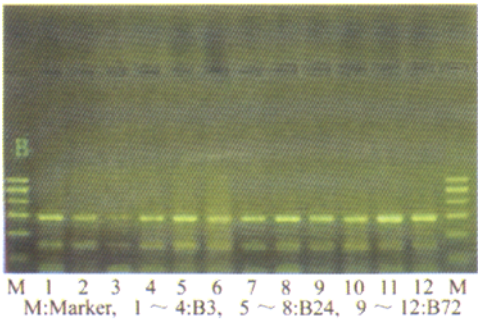


图 2 B 组 AT_1R mRNA 表达电泳图像

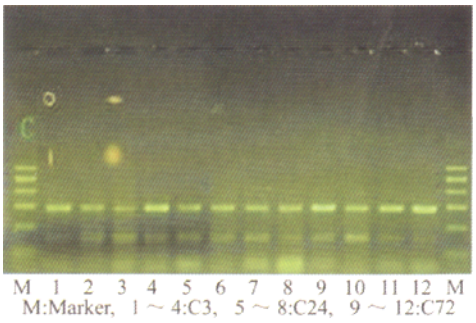


图 3 C 组 AT_1R mRNA 表达的电泳图像

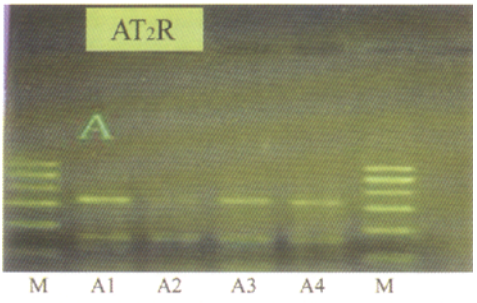


图 4 A 组 AT_2R mRNA 表达电泳图像

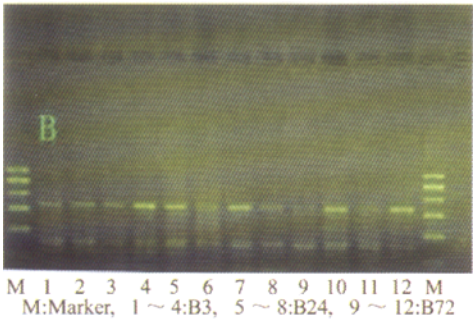


图 5 B 组 AT_2R mRNA 表达电泳图像

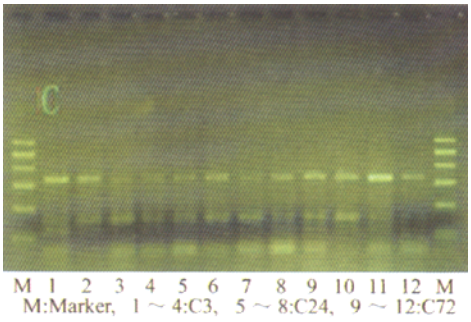


图 6 C 组 AT_2R mRNA 表达电泳图像

4 讨 论

脓毒症指由感染引起的全身炎症反应综合征（systemic inflammatory response syndrome，

万方数据

SIRS)，是各种损伤、创(烧)伤、休克、外科大手术后常见的并发症，进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能不全综合征，是危重患者死亡的重要原因之一[1]。它可造成多器官功能损害，心脏也是其重要靶器官。已有临床研究证实，脓毒症早期就已存在心肌器质性损伤，且发生率很高，这些患者易伴有低血压、心力衰竭和心律失常[2,3]。脓毒症心肌损伤和心肌功能障碍的发生机制尚未完全明确，目前认为可能有炎症细胞因子、NO、自由基损伤、钙超载和能量代谢异常等机制参与。新近的研究表明，脓毒症时神经-内分泌系统的过度反应，特别是心肌局部RAS的异常激活可能是引起心肌损伤和心肌功能障碍出现的重要原因之一。正是基于以上对脓毒症心肌损伤机制的研究，该研究应用血管紧张素受体阻滞剂(angiotensin receptor blocker，ARB)类药物缬沙坦抑制过度激活的RAS，证实对脓毒症心肌损伤确实可产生一定的保护作用。本研究参照Wichterman等的方法[4]及林毅红等的改良方法[5]复制CLP脓毒症模型。研究证实，该模型造模成功后均可达到脓毒症诊断标准。

该研究应用TnT和BNP作为评价心肌损伤和心肌功能障碍的指标。TnT是心肌坏死敏感而特异的指标，可以反映心肌损伤严重程度，并对预后有一定的评估价值，广泛应用于心肌损伤的检测。该研究结果显示，脓毒症后出现了明显的心肌损伤和心肌细胞坏死，且TnT与脓毒症时心肌损伤的严重程度高度相关。BNP是近年来发现的一种神经和内心室分泌的激素，具有利钠、利尿、扩张血管等作用，血浆中存在较稳定。研究显示，BNP基线浓度的升高，对老年脓毒症患者并发心功能异常具有预测价值，且更为灵敏、可靠，对脓毒症患者出现心功能异常的预测价值优于心房钠尿肽的结果[6]。有研究[7~9]显示，BNP可用于检测脓毒症时的心肌功能障碍，同时与患者的预后密切相关。该研究结果也提示，在脓毒症时，BNP可能是一个可以用于评价脓毒症时心肌功能障碍严重程度的参考指标。而C组24h和72h组的TnT，C组72h组的BNP，与B组相比有明显下降，说明缬沙坦可以减轻脓毒症后心肌功能障碍的程度。

在分析缬沙坦心肌保护的可能机制方面，该研究选用了NO和MDA等指标进行评价。NO是一种信使物质，生理浓度的NO执行正常的生理功能，而在脓毒症时，iNOS的合成过度，但内皮依赖性NO释放受到抑制，这种由iNOS生成的过量的NO参与可逆性休克中血管扩张和心肌收缩受抑，激活核因子-κB和细胞因子，同时还介导器官血流的再分布。虽然高浓度的NO也可能对攻击入侵的微生物有害，但也会损伤细胞而造成心肌细胞死亡[10]。该研究中NO检测结果显示，NO在脓毒症时出现过度分泌，而缬沙坦可以降低脓毒症时过度分泌的NO水平，减轻了由过量NO介导的细胞和组织损伤，这也可能是其发挥心肌保护的作用机制之一。血浆MDA是机体脂质过氧化代谢的毒性产物，是判断自由基损伤程度的重要指标。许多研究表明，自由基是导致心肌损伤的原因之一。清除脓毒症时所产生的过多的自由基，可以有心肌保护作用。该研究发现CLP术后，手术组大鼠血浆MDA值在各时间段都有所升高，C组与B组相比，在术后24h明显降低。说明缬沙坦可以改善自由基对组织的损伤程度。

RAS是机体的重要应激激素反应系统之一，而AngⅡ是RAS的主要活性肽，它是通过与AT受体结合发挥作用。AngⅡ受体有AT_1、AT_2、AT_3和AT_4四种亚型，主要为AT_1、AT_2两种亚型。目前认为AngⅡ的经典生物学作用由AT_1R介导，其效应主要有包括血管收缩、钠的重吸收、细胞增殖、胞外间质形成、炎症反应及氧化应激等。而AT_2R可能和酪氨酸激酶相偶联，对抗AT_1R的作用。心肌RAS的过度激活参与缺血及缺血再灌注损伤等病理过程。Kabour等[11]发现，AngⅡ对心肌有直接损伤作用，在心肌缺血的情况下损伤作用更明显。该研究结果显示，缬沙坦可使AT_1R mRNA表达下降，而使AT_2R mRNA表达有所上升，而结果中C组AngⅡ升高更明显，可能与抑制AT_1R后引起的负反馈机制有关，同时也有研究显示，ARB类药物可阻断AngⅡ在AT_1R水平的最终通路，但其阻断作用与组织内AngⅡ合成无关[12]。

综上所述，越来越多的研究认为，RAS在脓毒症心肌损害中起重要的作用。AngⅡ对心肌的直接毒害作用，目前已为大多数人所接受。AngⅡ的心脏毒性作用主要是通过AT_1R介导，当AngⅡ与AT_1R结合后，可以激活蛋白激酶C酪氨酸激酶，进而激活磷脂酶C，使磷脂酰肌醇生成三磷酸肌醇(IP3)和甘油二酰(DG)，IP3可以促使细胞内贮存钙的释放，提高缺血/再灌注心肌的易损性。DG可以激活蛋白激酶C，使钙通道蛋白磷酸化，通道开放，导致大量细胞外钙内流，从而引起细胞内钙超载而对心肌细胞造成损伤[13]。而AT_1R拮抗剂可以

万方数据

阻滞这种作用。缬沙坦可通过对 AT_1R 的拮抗抑制 RAS 的过度激活及抑制 NO 和自由基介导的组织损伤而改善脓毒症心肌损伤。加用缬沙坦可以明显减轻脓毒症时心肌损伤的程度，可能机制包括：抑制 AT_1R 功能，同时激活 AT_2R；降低脓毒症时过度升高的 NO 和 MDA 水平，当然，后二者也可能是对 RAS 调节后的继发结果，故 ARB 类药物作为脓毒症时心肌保护时的应用，具有一定的临床前景，相关机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. Nat Med, 2003, 9: 517-524.

[2] Guest TM, Ramanathan JH, Tuteur PG, et al. Myocardial injury in critically ill patients. JAMA, 1995, 273: 1945.

[3] Turner A, Tsamitros M, Bellomo R, et al. Myocardial cell injury in septic shock. Crit Care Med, 1999, 27: 2035-2036.

[4] Wichterman KA, Bauce AE, Chaudry IH, et al. Sepsis and septic shock: a review of laboratory model and a proposal. Surg Res, 1980, 29: 1892.

[5] 林毅红，梁仲培，刘金保. 盲肠结扎穿刺致大鼠败血症的改良模型. 广州医药，1998，29：39-40.

[6] 许强，吴海云，王士雯. 血浆心钠素及脑钠素检测对预测老年重度脓毒症并发心功能异常及预后的价值. 中国综合临床，2005，21：385-388.

[7] Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, et al. Brain natriuretic peptide: a marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. Crit Care Med, 2004, 32: 660-665.

[8] Brueckmann M, Huhle G, Lang S, et al. Prognostic value of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with severe sepsis. Circulation, 2005, 112: 527-534.

[9] Brueckmann M, Bertsch T. Increased plasma levels of NT-proANP and NT-proBNP as markers of cardiac dysfunction in septic patients. Clin Lab, 2005, 51: 373-379.

[10] Titheredge MA. Nitric oxide in septic shock. Biochim Biophys Acta, 1999, 1411: 437-455.

[11] Kabour A, Henegar JR, Janicki JS. Angiotensin Ⅱ (A Ⅱ)-induced myocyte necrosis: role of the A Ⅱ receptor. J Cardiovasc Pharmacol, 1994, 23: 547- 553.

[12] Meredith PA. Optimal dosing characteristics of the angiotensin Ⅱ receptor antaginist telmisartan. Am J Cardiol, 1999, 84(2A): 7K-12K.

[13] Frolkis I, Gurevitch J, Yuhas Y, et al. Interaction between paracrine tumor necrosis factor-alpha and paracrine angiotensin Ⅱ during myocardial ischemias. J Am Coll Cardiol, 2001, 37: 316.

（上接第 341 页）

参考文献

[1] Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolones studies. Clin Infect Dis, 2001, 33(Suppl): S147-S156.

[2] Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother, 2003, 52: 11-17.

[3] 崔俊昌，刘又宁，王睿，等. 4 种氟喹诺酮类药物对金黄色葡萄球菌的防耐药变异浓度. 中华医学杂志，2004，84：1863-1866.

[4] 崔俊昌，刘又宁，王睿，等. 左氧氟沙星对兔组织笼金黄色葡萄球菌感染的疗效研究. 中国临床药理学与治疗学，2007，12：291-294.

[5] 童卫杭，柴栋，崔俊昌，等. 兔感染性模型组织液中左氧氟沙星浓度的 HPLC 测定. 中国抗生素杂志，2005，30：759-761.

[6] Croisier D, Etienne M, Bergoin E, et al. Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental *pneumococcal pneumonia* in a rabbit model of human therapy. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 1699-1707.

[7] Croisier D, Etienne M, Piroth L, et al. In vivo pharmacodynamic efficacy of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an experimental model of pneumonia: impact of the low levels of fluoroquinolone resistance on the enrichment of resistant mutants. J Antimicrob Chemother, 2004, 54: 640-647.

[8] Etienne M, Croisier D, Charles PE, et al. Effect of low-level resistance on subsequent enrichment of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. J Infec Dis, 2004, 190: 1472-1475.

万方数据