

脓毒症小鼠心肌损伤与中性粒细胞浸润的关系 *

陈蕊^{1,2} 姜巧¹ 熊日成¹ 肖飞¹ 俞宙¹ 孙杰¹ 郭振辉^{1,Δ}

(1 广州军区广州总医院 MICU 科 广东 广州 510010 2 南方医科大学研究生院 广东 广州 510515)

摘要 目的:探讨脓毒症小鼠心肌损伤与中性粒细胞浸润的关系。方法:复制脓毒症动物模型,分对照组、假手术组、造模组,并设不同的时间点(2h、4h、8h、12h)。采用双抗夹心酶联免疫法(ELISA)检测血清肌钙蛋白 I(cTnI),并测心肌组织髓过氧化物酶(MPO)活性。结果:正常组与假手术组各时间点血清 cTnI、心肌组织 MPO 活性均无显著性差异。造模组心肌组织 MPO 活性较正常组和假手术组均有明显升高($P<0.05$),且随着时间进展而增加。造模组血清 cTnI 浓度随着时间进展而增加,2 小时与正常组及假手术组无显著性差异($P>0.05$),4 小时后显著高于正常组和假手术组($P<0.05$);血清 cTnI 浓度与心肌组织 MPO 活性呈显著正相关($r=0.700$, $P=0.000$)。结论:脓毒症心肌损伤时,心肌组织存在中性粒细胞浸润,中性粒细胞浸润程度与心肌损伤显著正相关。

关键词 脓毒症;心肌损伤;肌钙蛋白 I;髓过氧化物酶

中图分类号:Q95-3 R631.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)10-1817-03

Relationship between Neutrophil Infiltration and Myocardial Injury in Septic Mice*

CHEN Rui^{1,2}, JIANG Qiao¹, XIONG Ri-cheng¹, XIAO Fei¹, YU Zhou¹, SUN Jie¹, GUO Zhen-hui^{1,Δ}

(1 Medical intensive care unit of Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou Guangdong, 510010, China; 2 Department of Postgraduate of Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510515, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between leukocyte recruitment and myocardial injury in septic mice.

Methods: Mice were randomly divided into three groups: control group, sham operation group and sepsis group. Cecal ligation and puncture (CLP) was used to establish the sepsis model. Blood sample and left ventricular myocardium was harvested after 2h, 4h, 8h and 12h of successful establishment of sepsis model. MPO was detected by kit while Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect serum cTnI. **Results:** Compared to control and sham operation group, the concentration of cTnI and the activity of MPO were significant changed in the other group ($P<0.05$). cTnI elevated in sepsis group at 4h, 8h and 12h. MPO activity elevated in sepsis group at each time ($P<0.05$). There was positive relation between serum cTnI concentration and myocardium MPO activity ($r=0.700$, $P=0.000$). **Conclusion:** Neutrophil infiltration can be found in myocardium of sepsis mice, which might contribute to myocardial injury.

Key words: Sepsis; Myocardial injury; Cardiac Troponin I (cTnI); Myeloperoxidase (MPO)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R631.2 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)10-1817-03

脓毒症(sepsis)是感染、创伤、休克等临床急危重症患者的严重并发症,也是诱发多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),进而导致患者死亡的最常见原因^[1],具有发病率、病死率、住院费用高的特点。心肌细胞损伤是脓毒症的常见并发症之一,并可致其他器官功能障碍,但其机制尚未十分明确。中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)是体内粒细胞最大的亚群,它们在抗感染防御机制中扮演了重要角色,在炎症的发生、发展和转归中起着至关重要的作用。研究发现中性粒细胞聚集参与脓毒症时急性肺损伤^[2]、肝损伤^[3]、肠屏障功能衰竭^[4]、肾衰竭^[5]等脏器损伤的病理生理过程,中性粒细胞聚集、活化、跨内皮迁移,引起血管内皮细胞功能紊乱和组织损伤。在本研究中,我们研究中性粒细胞聚集在小鼠脓毒症致心肌损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

ECKMAN-22R 冷冻离心机(美国 BECKMAN),Biocell 酶标仪(郑州博赛),OPTIZEN 2120UV 分光光度计(厦门欣锐)。

1.2 主要试剂

小鼠肌钙蛋白 I(cTnI)96 test ELISA Kit(美国 R&D 公司进口分装),髓过氧化物酶(MPO)测试试剂盒(南京建成)。

1.3 实验动物及分组处理

雌性 SPF 级昆明小鼠 72 只,体质量 20~25 g(购买于南方医科大学实验动物中心),完全随机分为正常对照组(N 组)($n=12$)、假手术组(S 组)($n=12$)和 CLP 组($n=48$)。CLP 组按时间点又分为术后 2、4、8、12h 组。

* 基金项目 广州市科技计划项目 (2010Y1-C451)

作者简介 陈蕊(1980-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:为危重症救治,

电话:02036653485 E-mail:Crui_rui@126.com

Δ 通讯作者 郭振辉 E-mail:gzhzhui@163.com

(收稿日期:2011-09-23 接受日期:2011-10-20)

1.4 盲肠结扎穿孔小鼠脓毒症模型的建立

参照文献^[6]的方法行小鼠 CLP,复制脓毒症模型。以 10% 水合氯醛(0.35ml/100g)腹腔注射麻醉后沿腹正中中线作 1 cm 切口,找到盲肠,在盲肠根部结扎盲肠。用 22 号针盲肠结扎部位远端刺 2 孔,并挤出少量盲肠内容物,将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口。术毕立即动物皮下注射林格液 0.5ml 抗休克。假手术组,麻醉动物后开腹并找到盲肠,然后回纳腹中,逐层缝合关腹。

1.5 ELISA 法检测血清肌钙蛋白 I (cTnI)

小鼠经眼眶采血,收集血液标本至无菌无致热源 1.5mlEP 管中,4℃静置过夜,3000rpm,15min 离心取上清,分装后 -70℃保存。按照酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒说明书进行操作,绘制标准曲线并计算各样本 cTnI 的浓度。

1.6 心肌组织 MPO 检测

取左室心肌组织置于 -70℃液氮中,用于组织 MPO 检测。MPO 检测试剂盒购于南京建成科技有限公司。每个中性粒细胞中含有恒定 MPO (约占细胞干质量 5%),MPO 能还原过氧化氢,因此利用 MPO 这个特性可分析酶活力,并定量测定中性粒细胞数目。将心肌组织匀浆后逐步加入预先配好 MPO 试剂,置于 37℃水浴 15 min 后取出,加入显色剂混匀,60℃水浴 10 min,取出后立即在分光光度计 460 nm 波长处,1 cm 光径下,蒸馏水调零,测定各管吸光度值。每克组织中 MPO 活性单位计算方法为: MPO 单位 / 克湿片 = (测定管 OD 值 - 对照组 OD 值) / (11.3 × 0.01g)。

1.7 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 13.0 行方差分析和均数间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症小鼠血清 cTnI 浓度

参照 cTnI 标准曲线得出小鼠血清中正常的 cTnI 浓度为 0.015 ± 0.004 ng/mL。CLP 后 2h、4h、8h、12h 测得的 cTnI 浓度分别为 0.017 ± 0.007 ng/mL、 0.106 ± 0.007 ng/mL、 0.528 ± 0.057 ng/mL、 2.959 ± 0.145 ng/mL。与对照组和假手术组相比,CLP 后 2h cTnI 浓度无显著升高 ($P > 0.05$),CLP4h 后 cTnI 浓度较对照组显著升高 ($P < 0.05$),且随着时间进展呈上升趋势 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 脓毒症小鼠心肌组织 MPO 活性

正常小鼠心肌组织 MPO 活性为 0.611 ± 0.061 U/g,假手术组与正常对照组无显著性差异,CLP 后 2h、4h、8h、12h 测得的心肌组织 MPO 活性分别为 1.260 ± 0.058 U/g、 1.520 ± 0.089 U/g、 1.696 ± 0.035 U/g、 1.758 ± 0.116 U/g;各时间点均显著高于对照组和假手术组 ($P < 0.05$),且随着时间的进展而增加,其中 CLP 后 8h 与 12h 组心肌组织 MPO 活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 小鼠心肌组织 MPO 活性及血清 cTnI 浓度的相关性

采用 Pearson 相关分析,小鼠血清 cTnI 浓度与心肌组织 MPO 活性的相关系数为 0.700 ($P = 0.000$),提示两者存在显著正相关关系。

表 1 各组小鼠心肌组织 MPO 活性及血清 cTnI 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Myocardial Myeloperoxidase (MPO) content and cTnI concentration of blood samples of each group

Group	cTnI concentration of blood samples	Myocardial Myeloperoxidase (MPO)
	(ng/mL)	content (U/g)
N	0.015 ± 0.004	0.611 ± 0.061
S	0.018 ± 0.006	0.630 ± 0.054
CLP2h	0.017 ± 0.007	$1.260 \pm 0.058^*$
CLP4h	$0.106 \pm 0.007^*$	$1.520 \pm 0.089^*$
CLP8h	$0.528 \pm 0.057^*$	$1.696 \pm 0.035^*$
CLP12h	$2.959 \pm 0.145^*$	$1.758 \pm 0.116^*$
F value	4026.595	583.905
P value	0.000	0.000

注:与对照组、假手术组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: * P value < 0.05 vs N group and S group.

3 讨论

脓毒症心肌损伤是脓症患者主要死亡原因之一,多种细胞因子和炎症介质,直接损伤心肌细胞,导致心肌细胞凋亡,使心肌舒缩功能抑制^[7-9]。其具体机制目前尚未十分明确。由于 cTnI 不受骨骼肌损伤、横纹肌溶解及肾功能衰竭等因素的影响,目前被认为是最具心脏特异性、最有价值的心肌损伤指标^[10]。本研究中,在造模 4 小时后,脓毒症造模组小鼠血清 cTnI

较正常组及假手术组显著升高,并随着时间进展而升高,提示脓毒症早期即已出现心肌细胞受损。

中性粒细胞作为机体防御系统的重要组成部分,是造成其过度性炎症反应的元凶,其介导的组织损害效应在全身炎症反应综合征(SIRS)和多脏器功能衰竭(MODS)发病中占据核心地位^[11]。中性粒细胞在心肌缺血再灌注损伤中起着重要作用。大量活化的中性粒细胞聚集在心肌微血管内并浸润到心肌组织中,通过释放炎性物质、氧自由基、蛋白酶等引起心肌损伤^[12]。

^[13]。在脓毒症的病理生理过程中,中性粒细胞跨内皮迁移、活化、迁移是引起多个脏器功能障碍的重要原因,同样,炎症促进中性粒细胞跨内皮迁移并活化循环中性粒细胞进入心肌间质,而中性粒细胞又放大大心内炎症,增加血管渗漏^[14]。MPO 是中性粒细胞的特异性酶,能催化产生多种活性氧化物质,导致氧化应激和氧化性组织损伤,其激活程度与中性粒细胞的浸润程度密切相关,其活性的测定可以反映中性粒细胞浸润情况^[15];本研究发现造模后心肌组织 MPO 水平明显增高,提示脓毒症早期心肌组织存在中性粒细胞的浸润,其浸润程度与心肌损伤程度呈正相关,提示中性粒细胞浸润可能参与脓毒症心肌损伤的发病。临床研究中也证实,左室功能受损的病人其循环 MPO 水平升高, MPO 水平与射血分数相关^[16]。均提示中性粒细胞聚集参与了脓毒症时心功能受损的过程。

总之,本研究证实脓毒症小鼠模型心肌组织存在中性粒细胞浸润,其与血清 cTnI 水平正相关,说明在脓毒症时中性粒细胞聚集参与了心肌损伤的发病,通过抑制中性粒细胞的聚集的方法而减轻脓毒症心肌损伤有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Carrillo-Esper R, Carrillo-Cordova J R, Carrillo-Cordova L D. Epidemiological study of sepsis in Mexican intensive care units[J]. *Cir Cir*, 2009, 77(4): 301-308
- [2] Asaduzzaman M, Rahman M, Jeppsson B, et al. P-selectin glycoprotein-ligand-1 regulates pulmonary recruitment of neutrophils in a platelet-independent manner in abdominal sepsis [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(2): 307-315
- [3] Laschke M W, Menger M D, Wang Y, et al. Sepsis-associated cholestasis is critically dependent on P-selectin-dependent leukocyte recruitment in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(5): G1396-G1402
- [4] Mangell P, Mihaescu A, Wang Y, et al. Critical role of P-selectin-dependent leukocyte recruitment in endotoxin-induced intestinal barrier dysfunction in mice [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(5): 189-194
- [5] Hayashi H, Imanishi N, Ohnishi M, et al. Sialyl Lewis X and anti-P-selectin antibody attenuate lipopolysaccharide-induced acute renal failure in rabbits[J]. *Nephron*, 2001, 87(4): 352-360
- [6] Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal[J]. *J Surg Res*, 1980, 29(2): 189-201
- [7] Mink S N, Jacobs H, Cheng Z Q, et al. Lysozyme, a mediator of sepsis that intrinsically generates hydrogen peroxide to cause cardiovascular dysfunction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297 (3): H930-H948
- [8] Brendt P, Frey U, Adamzik M, et al. Darbepoetin alpha, a long-acting erythropoietin derivate, does not alter LPS evoked myocardial depression and gene expression of Bax, Bcl-Xs, Bcl-XL, Bcl-2, and TNF-alpha[J]. *Shock*, 2009, 31(1): 50-54
- [9] Zanotti-Cavazzoni S L, Hollenberg S M. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2009, 15(5): 392-397
- [10] John J, Woodward D B, Wang Y, et al. Troponin-I as a prognosticator of mortality in severe sepsis patients[J]. *J Crit Care*, 2010, 25(2): 270-275
- [11] Fukatsu K, Hiraide H. Role of polymorphonuclear neutrophils and macrophages in the prevention of postoperative infections[J]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 2003, 104(7): 506-510
- [12] Lorigados C B, Soriano F G, Szabo C. Pathomechanisms of myocardial dysfunction in sepsis [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2010, 10(3): 274-284
- [13] Merx M W, Weber C. Sepsis and the heart[J]. *Circulation*, 2007, 116 (7): 793-802
- [14] Hunter J D, Doddi M. Sepsis and the heart[J]. *Br J Anaesth*, 2010, 104(1): 3-11
- [15] Sinning C, Schnabel R, Peacock W F, et al. Up-and-coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? [J]. *Congest Heart Fail*, 2008, 14(4 Suppl 1): 46-48
- [16] Rudolph V, Rudolph T K, Hennings J C, et al. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(8): 1189-1196
- [17] 刘晓俊, 官和立, 杨恂等. 糖皮质激素对支气管哮喘患者血清干细胞因子表达的影响[J]. *四川医学*, 2011, 32(8): 1200-1202
- [18] Yamauchi H. Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer *Anomala cuprea* purification amino acid sequences and antibacterial activity[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 32(1): 75-84
- [19] 徐妍, 张焕萍. 地塞米松对哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖及 ERK1/2 mRNA 表达水平的影响 [J]. *中国现代医生*, 2009, 47(15): 65-67
- [20] Li XM, Zhang TF, Sampson H, et al. The potential use of Chinese herbal medicines in treating allergic asthma [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2004, 93: S35-44
- [21] 张华, 程琳, 陶晓南, 等. 地塞米松对哮喘大鼠 Th2 细胞分化的影响[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2011, 5(2): 88-91

(上接第 1830 页)

Jin Xiao-qiu, Qu Shu-qiang. The study of interferon- γ treatment on IL-4 and IgE in asthmatic mice [J]. *Journal of Qiqihar University of Medicine*, 2008, 29(21): 2571-2572

- [17] 刘晓俊, 官和立, 杨恂等. 糖皮质激素对支气管哮喘患者血清干细胞因子表达的影响[J]. *四川医学*, 2011, 32(8): 1200-1202
- [18] Yamauchi H. Two novel insect defensins from larvae of the cupreous chafer *Anomala cuprea* purification amino acid sequences and antibacterial activity[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 32(1): 75-84
- [19] 徐妍, 张焕萍. 地塞米松对哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖及 ERK1/2 mRNA 表达水平的影响 [J]. *中国现代医生*, 2009, 47(15): 65-67

Xu Yan, Zhang Huan-ping. Effect of Dexamethasone on Airway Smooth Muscle Cells Proliferation and Expression of ERK1/2 mRNA in Asthmatic Rats[J]. *China Modern Doctor*, 2009, 47(15): 65-67

- [20] Li XM, Zhang TF, Sampson H, et al. The potential use of Chinese herbal medicines in treating allergic asthma [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2004, 93: S35-44
- [21] 张华, 程琳, 陶晓南, 等. 地塞米松对哮喘大鼠 Th2 细胞分化的影响[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2011, 5(2): 88-91

Zhang Hua, Cheng Lin, Tao Xiao-nan, et al. Effects of Dexamethasone on Differentiation of T Helper Type Cells in Rat Asthma Model [J]. *Chinese Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2011, 5 (2): 88-91