

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2006)20-1847-04

依达拉奉对脓毒性休克大鼠心肌细胞损伤的作用

霍小萍¹, 顾学兰¹, 刘良明², 刁有芳², 马春艳¹, 陈家慧¹, 李萍², 卢是¹, 刘建仓², 徐强³ (¹江苏先声药物研究有限公司, 江苏南京 210042 ²第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室, 重庆 400042 ³南京大学生命科学院, 江苏南京 210093)

Effect of edaravone on myocardial cell injury during septic shock in rats

HUO Xiaoping¹, GU Xuelan¹, LIU Liangming², DIAO Youfang², MA Chunyan¹, CHEN Jiahui¹, LI Ping², LU Shi Yue¹, LIU Jiancang², XU Qiang³

¹Jiangsu Simcere Pharmaceutical Research Company LTD Nanjing 210042 China ²Second Department of Research Institute of Field Surgery Daping Hospital Third Military Medical University Chongqing 400042 China ³Academy of Life Science Nanjing University Nanjing 210093 China

【Abstract】 **AM:** To investigate the effect of edaravone (ED), a novel free radical scavenger on cardiac function and myocardial cell injury in rats with septic shock. **METHODS** A fier treatment with three different doses (6.0, 3.0 and 1.5 mg/kg) of ED to rats 1 h after septic shock, changes of MAP, LVESP, LVEDP, $\pm dp/dt_{max}$ were determined in 4 different time phases. The activities of SOD, CAT, LDH and the concentrations of MDA, LD in myocardial tissue were measured. The pathologic change of myocardial tissue was observed by HE staining. **RESULTS** Compared with septic shock group, MAP, LVESP and $\pm dp/dt_{max}$ were increased remarkably in ED treatment groups. The activities of SOD and CAT and the concentration of MDA in ED groups were close to those in normal control group. Histological examination showed congestion, edema and inflammatory cell infiltration in myocardial tissue while ED treatment attenuated the above pathological changes of myocardium. **CONCLUSION** ED has a satisfying therapeutic effect on cardiac dysfunction in rats with septic shock, which may be related to attenuating myocardial injury.

【Keywords】 edaravone; Oxygen free radicals; shock; septic; Myocardial injury

【摘要】目的: 观察氧自由基清除剂依达拉奉(edaravone, ED)对脓毒性休克大鼠心脏功能和心肌损伤的作用。方法: 在大鼠脓毒性休克后 1 h 用 3 个剂量 ED (6.0, 3.0 和 1.5

mg/kg) 治疗, 测定休克后 4 个时相点平均血压 (MAP)、左室收缩末期压力 (LVESP)、左室舒张末期压力 (LVEDP)、左室压力上升及下降最大变化速率 ($\pm dp/dt_{max}$) 等心功能指标; 取心肌组织测超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和乳酸 (LD)、丙二醛 (MDA) 含量, 并观察形态学改变。结果: 与脓毒性休克组比较, ED 可显著升高 MAP, LVESP 和 $\pm dp/dt_{max}$, 并使 SOD, CAT 活性增强以及 MDA 浓度降低接近对照组; 组织学观察可见模型组心肌充血、水肿及炎性细胞浸润等, ED 可明显改善以上形态学变化。结论: ED 具有抗脓毒性休克心功能不全的作用, 其机制与减轻心肌损伤有关。

【关键词】 依达拉奉; 氧自由基; 休克; 脓毒性; 心肌损伤

【中图分类号】 R963 **【文献标识码】** A

0 引言

心功能不全和心肌细胞损伤是脓毒性休克的主要致命性并发症, 有 40% 的脓毒症患者出现左、右心功能不全^[1-2]。脓毒症时菌体膜产生的内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 入血可直接或间接通过细胞因子和自由基的作用引起心肌损伤和心功能不全^[3], 实验证实抗氧化剂谷胱甘肽加 N-乙酰半胱氨酸可明显减少脓毒症休克患者血液中活性氧浓度, 改善心功能指数^[4]。依达拉奉 [edaravone, ED, 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮 (MCH186)] 是新型强效的自由基清除剂, 是临床治疗缺血性脑卒中的有效药物^[5]。我们通过观察 ED 对脓毒性休克大鼠心功能、心肌氧自由基和心肌病理学变化的影响, 旨在为该药治疗脓毒性休克提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 (200±20) g (第三军医大学野战外科研究所实验动物中心); LPS (Sigma 公司, 来源: *Escherichia coli* O₁₁₁: B₄, 规格: 500 mg, 批号: 024K4077); ED 注射液 (商品名: 必存, 南京先声东元制药有限公司, 规格: 5 mL, 10 mg, 批号: 040283); 2002 年美国 FDA 批准的抗重症感染药 XigrisTM (又名 Drotrecogin alfa) (美国 Eli Lilly 公司, 规格: 20 mg 安瓿, 批号: 2H1552);

收稿日期: 2006-05-15 接受日期: 2006-08-18

基金项目: 江苏省博士后科研资助计划 (0401079B)

通讯作者: 霍小萍, 博士, 副教授, Tel: (025) 85477000 Ext: 395

Email: hxp8998@hotmail.com

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乳酸(LD)、乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物技术工程研究所); DU-7500分光光度仪(美国 Beckmen 公司); Powerlab 8 SP 多功能生理记录仪(澳大利亚 AD 公司); BX50 显微镜(日本 Olympus 公司); 江苏捷达 801 病理医学影像系统。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及病理模型复制 将大鼠分为 6 组, 每组 10 只。对照组: 仅作手术对照并给予生理盐水; 模型组: 尾静脉注射 LPS 8 mg/kg 致内毒素休克后单纯给予等体积生理盐水; 阳性药对照组: 以 Xigris™ 为阳性药对照, 根据临床剂量换算剂量为 19.34 mg/kg; ED 高、中、低剂量组: 给予 ED 的剂量分别为 1.6、0.8、0.4 mg/kg。在 LPS 复制脓毒性休克模型后 1 h 行药物治疗。戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉, 右颈总动脉插管至左心室, 左股动脉导管接血压计检测平均动脉压(MAP), 左股静脉导管用于给药和输液。

1.2.2 心功能检测指标 将左心室导管连接 8 道生理记录仪, 应用 Chart V4 1.2 信号处理软件记录左室收缩末期压力(LVESP), 左室舒张末期压力(LVEDP)和左室压力上升及下降最大变化速率($\pm \phi / dt_{\max}$)。记录 LPS 注射后 0、2、4、6 h 心功能指标。

1.2.3 心肌氧自由基测定 在 LPS 后 6 h 心功能指标测完后, 开胸取左心室两块 0.5 g 组织, 取其一用冰 PBS 冲洗干净, 在 PBS 烧杯中剪碎及冰浴下匀浆, 匀浆液在 4℃ 下 4000 r/min 离心 15 min 上清按试剂盒说明书应用分光光度仪检验 LD、LDH、CAT、MDA

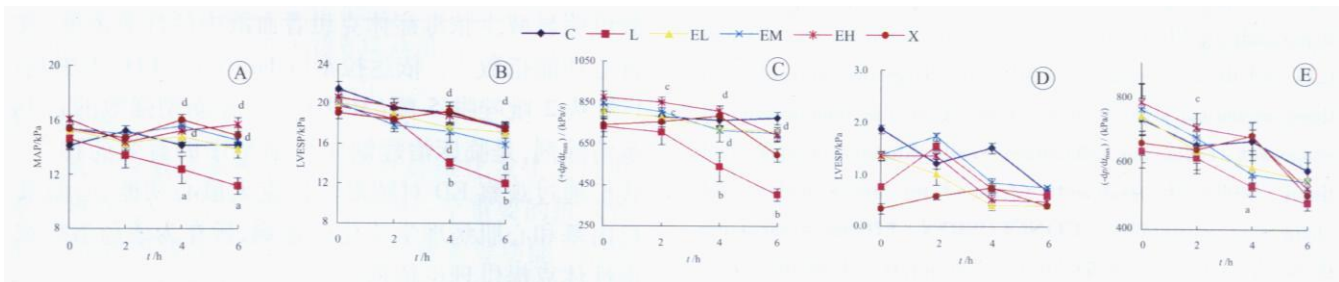
及 SOD 含量。

1.2.4 心肌病理学观察 取上步骤中另一块心肌经 100 mL/L 多聚甲醛固定, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续冠状切片, 切片厚度 4 μm, HE 染色, 显微镜下观察并留存图像。

统计学处理: 计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$, 用统计学软件 SPSS 11.0 的 ANOVA 法比较组间差异的统计学意义。

2 结果

2.1 ED 对脓毒性休克大鼠心功能的作用 模型组动物在休克 4 h 时平均动脉压(MAP)明显降低(图 1A, $P < 0.05$), 并呈继续下降趋势, ED 高、中、低剂量均可显著升高 MAP ($P < 0.01$), 休克 6 h 后 ED 升高 MAP 的效应随剂量增大而增强。脓毒性休克后大鼠心脏 LVESP 显著下降(图 1B), 4 h 后下降非常明显 ($P < 0.01$), 且呈进行性下降趋势, ED 高、中、低剂量使 LVESP 升高并接近对照组水平, 与脓毒性休克组比较升高非常显著 ($P < 0.01$)。脓毒性休克大鼠 $+\phi / dt_{\max}$ 也呈进行性下降(图 1C), 在 4 h 后下降非常显著 ($P < 0.01$), 休克后 2 h ED 中、低剂量组 $+\phi / dt_{\max}$ 即可明显增强 ($P < 0.05$), 休克 4 h 时 ED 各剂量组均使 $+\phi / dt_{\max}$ 显著升高 ($P < 0.01$) 并接近相同时相点正常水平。脓毒性休克时大鼠 LVEDP 和 $-\phi / dt_{\max}$ 无明显改变, 除 ED 低剂量组在 4 h 明显增强 $-\phi / dt_{\max}$ 外 ($P < 0.05$), 未见其他各剂量组对 $-\phi / dt_{\max}$ 有影响作用(图 1D、E)。



* $P < 0.05$ ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ ^d $P < 0.01$ vs 模型组。A: 平均血压(MAP); B: 左室收缩末期压力(LVESP); C: 左室压力上升最大变化速率($+\phi / dt_{\max}$); D: 左室舒张末期压力(LVEDP); E: 左室压力下降最大变化速率($-\phi / dt_{\max}$)。

图 1 依达拉奉(ED)对脓毒症休克大鼠心功能各项指标的影响

2.2 ED 对脓毒症休克大鼠心肌生化指标的影响 模型组大鼠心脏组织中 SOD、CAT 活性呈不同程度降低(表 1), SOD 活性明显低于对照组 ($P < 0.05$); ED 中、高剂量组 SOD 活性升高非常明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ED 各剂量组的 CAT 活性均明显高于模型

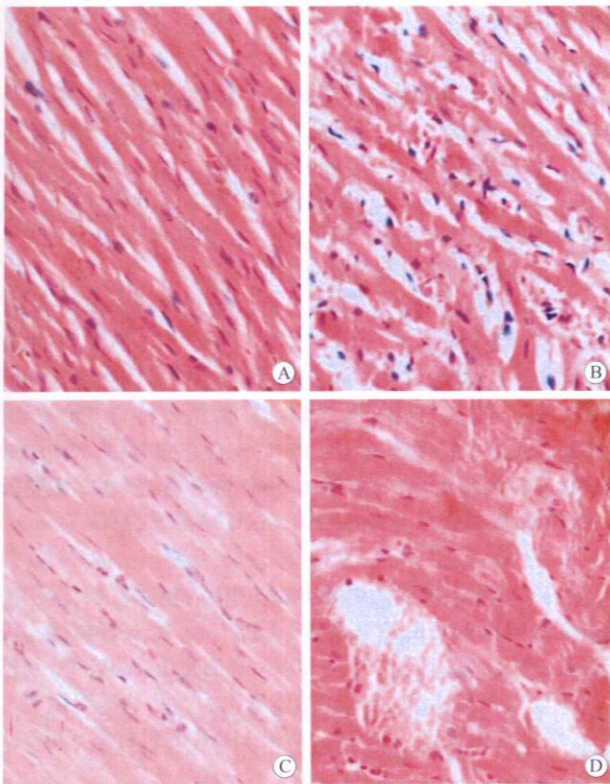
组 ($P < 0.01$); LDH 在脓毒症休克时升高, ED 各剂量组对 LDH 活性有降低作用, 但差异不明显。模型组 MDA、LD 升高, ED 高剂量组能显著降低 MDA ($P < 0.01$), 其他各治疗组也不同程度地降低 MDA、LD 水平, 但无统计学差异。

表 1 依达拉奉 (ED)对脓毒症休克大鼠心肌 SOD、MDA、CAT、LD、LDH 的影响 (n=10 $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(μ kat/g)	MDA(μ mol/g)	CAT(μ kat/g)	LD(mm ol/g)	LDH(μ kat/g)
对照	557 \pm 170	3.53 \pm 0.94	308.9 \pm 49.5	2.1 \pm 1.0	64.0 \pm 5.0
模型	289 \pm 95 ^a	4.02 \pm 0.30	123.9 \pm 1.8	3.2 \pm 1.5	71.7 \pm 6.2
ED 高剂量	770 \pm 116 ^d	1.51 \pm 0.84 ^c	566.6 \pm 92.7 ^c	1.7 \pm 0.6	64.2 \pm 10.3
ED 中剂量	585 \pm 24 ^c	2.68 \pm 0.97	523.8 \pm 98.9 ^c	1.8 \pm 0.8	69.8 \pm 6.4
ED 低剂量	538 \pm 20	2.70 \pm 0.23	387.2 \pm 43.7 ^c	2.9 \pm 0.9	70.4 \pm 14.5
阳性药对照	565 \pm 47	3.09 \pm 1.02	432.6 \pm 35.0 ^c	1.8 \pm 0.5	62.0 \pm 0.7

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 ^dP<0.01 vs 模型组. SOD: 超氧化物歧化酶; MDA: 丙二醛; CAT: 过氧化氢酶; LD: 乳酸; LDH: 乳酸脱氢酶.

2.3 ED对脓毒症休克大鼠心肌形态学的影响 光镜下观察到对照组大鼠心肌着色均匀完整,可见横纹和润盘,未见炎性细胞浸润.模型组间质充血、水肿,血管扩张,炎性细胞浸润.经ED治疗后心肌细胞结构完整,可见横纹和润盘,有少量炎性细胞浸润,未见明显细胞变性坏死. XigrisTM治疗后心肌细胞着色不均,有部分变性坏死,血管扩张,有灶性出血,炎症细胞浸润(图2).



A: 对照组; B: 模型组; C: ED组; D: 阳性药对照组.

图2 依达拉奉(ED)治疗脓毒症休克大鼠后心肌组织学改变 HE \times 400

3 讨论

ED是一种有效的羟自由基清除剂,通过清除氧自由基,抑制脂质过氧化,从而抑制细胞损伤,临床已

作为脑保护剂广泛用于急性脑梗死治疗^[6].研究发现ED可明显降低糖尿病大鼠心肌硫代巴比士酸物质,增加SOD活性并有效维持心肌细胞直径和线粒体结构^[7],也有资料表明ED能明显降低局部缺血再灌注心肌家兔血液中MDA浓度,有效抑制局灶性缺血再灌注损伤^[8].脓毒性休克时心肌损伤和心功能不全多种炎症介质共同参与的结果,其中氧自由基被认为是致病的重要原因.在脓毒症早期,自由基通过激活细胞核转录因子(NF- κ B或AP-1),诱导细胞因子合成而起促炎症作用,继而在自由基和细胞因子的协同作用下激活内皮细胞,促进炎症介质和黏附分子合成,中性粒细胞呼吸爆发(respiratory burst)产生活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)并释放溶酶体酶而发挥毒性作用,导致细胞功能丧失和坏死,最终使器官、系统功能失调^[9].因此脓毒症休克时防治ROS对心功能损伤具有重要意义.

LVESP和 $+\dot{\phi} dt_{max}$ 为检测左心功能的指标,我们是国内外首次将ED用于治疗脓毒症休克大鼠的研究单位,发现模型组动物MAP明显降低,LVESP和 $+\dot{\phi} dt_{max}$ 降低非常显著,说明模型组出现明显心功能不全的病理变化,ED治疗后各剂量可显著升高MAP,LVESP和 $+\dot{\phi} dt_{max}$,并随剂量增大而增强,表明ED有改善左心功能不全的作用.模型组的心脏组织中SOD、CAT活性明显降低,氧自由基代谢产物MDA升高,ED可使SOD、CAT活性增强,强度与剂量成正比,并显著降低MDA,表明该药可以增强心肌组织的抗氧化能力,清除氧自由基.模型组心肌组织水肿、出血及炎性细胞浸润,ED能明显减轻上述病理变化,证明该药通过ROS减少防治了LPS造成的心肌损伤.

XigrisTM的有效成分为重组活化蛋白C,是体内的自然蛋白,其作用可以平衡脓毒血症的凝结(血液凝结)和促进纤维蛋白溶解,该药降低了重度脓毒症患者近20%的死亡风险,但能引起出血等不良反应^[10].本资料提示该药可以部分改善心功能不全,

其机制可能与心肌细胞氧自由基代谢无关,但心肌有较重的出血变化。

由于脓毒症休克是临床危重患者的重要死亡原因之一,尚无有效的治疗药物,基于以上试验结果,我们认为 ED 具有明确的作用机制,对于脓毒症休克的治疗具有进一步研究的价值和一定的开发潜力。

致谢 感谢第二军医大学长征医院南京分院病理科刘玉龙主任对本题中病理学实验提供的技术指导 and 帮助!

参考文献

- [1] Tumer A, Tssanitos M, Belhmo R. Myocardial cell injury in septic shock [J]. *Crit Care Med* 1999 27(9): 1775.
- [2] Parrillo JE, Parker MM, Natanson G et al. Septic shock in humans: advances in the understanding of prognosis, cardiovascular dysfunction, and therapy [J]. *Ann Intern Med* 1990 113(3): 227-242.
- [3] Karim A R, Matsumoto S, Higashi H et al. The molecular pathogen-

- esis of endotoxic shock and organ failure [J]. *Mol Med Today* 1999 5(3): 123-132.
- [4] Peake SL, Moran JL, Leppard PI. N-acetylcysteine depresses cardiac performance in patients with septic shock [J]. *Crit Care Med* 1996 24(12): 1302-1310.
- [5] 阳清伟, 刘鸣, 张世波, 等. 依达拉奉治疗急性脑梗死的系统评价 [J]. *中国循证医学杂志*, 2006 6(1): 26-30.
- [6] Wang LF, Zhang HY. A theoretical investigation on DPPH radical scavenging mechanism of edaravone [J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2003 13(21): 3789-3792.
- [7] Hayashi T, Mori T, Sohmiya K et al. Efficacy of edaravone, a free radical scavenger, on left ventricular function and structure in diabetes mellitus [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003 41(6): 923-929.
- [8] Wu TW, Zeng IH, Wu J et al. Myocardial protection of MCF186 in rabbit ischemia reperfusion [J]. *Life Sci* 2002 27(19): 2249-2255.
- [9] CBSA D, Foldes Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response [J]. *JUBMB Life* 2004 56(4): 185-191.
- [10] 沈芊, 曾艳. 严重脓毒症治疗药物重组人活化蛋白 C [J]. *药学进展*, 2003 27(6): 382-383.

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号: 1000-2790(2006)20-1850-01

柔红霉素脂质体的制备

高琨¹, 冯安吉², 万明习¹, 王素品¹ (¹西安交通大学生命科学与技术学院生物医学工程系, 陕西 西安 710049; ²第四军医大学军事预防医学系毒理学教研室, 陕西 西安 710033)

【关键词】柔红霉素; 脂质体; 冰冻熔融法

【中图分类号】TQ465 【文献标识码】B

1 材料和方法

1.1 材料 ZFQ85A 旋转蒸发器(上海医械专机厂); SHZ 型循环水真空泵(河南巩义英峪仪器厂); 电热恒温水浴锅(江苏东台电器厂); 752-C 型可见紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂); AE240 电子天平(瑞士 METTLER); SB3200 水浴式超声仪(上海必能信超声有限公司); 柔红霉素(daunorubicin, DNR 意大利爱宝药厂); 注射用蛋黄卵磷脂(Phosphatidylcholine, PC 上海太伟药业有限公司); 胆固醇(Cholesterol, CH 美国 Sigma 公司); Sephadex G50(瑞典); 其余试剂均为分析纯。

1.2 方法 脂质体的制备: DNR 用 2 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS pH 7.4)溶解。应用改良冻融法^[1]制备柔红霉素脂质体(liposome encapsulated daunorubicin, LDNR); 取适量 PC 及 CH 溶于三氯甲烷后通过氮气冷风吹干成膜, 加入所需浓度的 DNR 溶液, 浸泡数小时后用超声粉碎机超声震荡 5 min 得到初制脂质体混悬液, 将上述混悬液分装于 5 mL 试管中置于 -15℃ 低温冰箱快速冷冻并维持 24 h 取出后室温下快速冻融并用螺旋混合器震荡 20 min 得最终所需脂质体混悬液。用

Sephadex G50 葡聚糖凝胶层析分离游离药物。测定 DNR 浓度, 用标准溶液制定标准曲线。计算包封率按公式: 包封率 = $(1 - C_f / C_t) \times 100\%$ (注: C_f 为游离药物浓度, C_t 为脂质体包裹的总药物浓度)。

2 结果 DNR 曲线吸收峰在波长 481 nm 为最高, 测定此波长 A 值, 并将结果回归。药物在此波长处的 A 值与药物浓度 C (mg/L) 的回归方程: $A = 0.036 + 0.049C$ ($r = 0.9996$), 线性范围: 2.52 ~ 15.17 mg/L。经前期单因素实验预试, 确定了正交实验的因素和水平数: 按 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行正交实验^[2-3], 以药物的包封率为评价指标。

影响药物包封率的各项因素的重要性依次递减为: 水合介质的种类(因素 D) > 冷冻温度(因素 C) > PC 与药物的比例(因素 A) > PC 与 CH 的比例(因素 B), 各因素的组合以 A3B2C1D3 为最佳, 即 PC 与药物的质量比为 30:1, PC 与 CH 的质量比为 5:1, 冷冻温度为 -15℃, 水合介质为 pH 7.4 PBS。可制得具有高包封率的脂质体。按优选处方, 制备 3 批脂质体, DNR 包封率分别为 78.84%, 76.31% 和 75.22%。

3 讨论 本实验采用高纯度 PC 和 CH 为包封材料, 采用冰冻熔融法制得 LDNR 方法简单, 可行^[1-3]。通过预试验和正交试验, 确定冰冻熔融法制得 LDNR 制备的最优组合 PC 与药物的质量比为 30:1, PC 与 CH 的质量比为 5:1, 冷冻温度为 -15℃, 水合介质为 pH 7.4 PBS 所得 LDNR 的包封率 > 70%。

【参考文献】

- [1] 吴明星, 利华明, 李绍珍, 等. 柔红霉素脂质体的制备及兔房水中柔红霉素及其脂质体浓度的测定 [J]. *眼科学报*, 1998 14(4): 232-235.
- [2] 吴骏, 朱家璧. 阿昔洛韦脂质体的制备和稳定性的初步考察 [J]. *药学报*, 2003 38(7): 552-554.
- [3] 陈荣义, 张新申, 谢君. 茶多酚脂质体制备的研究 [J]. *中草药*, 2005 36(6): 856-857.

收稿日期: 2005-10-27 接受日期: 2005-11-03

作者简介: 高琨, 讲师. Tel: (029)82668668 Email: gk70@sohu.com

编辑 甄志强