

文章编号:1000-5404(2012)07-0671-03

短篇论著

地塞米松诱导的胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的建立及鉴定

董璿瑾¹, 晋玉章², 石磊³, 宋光明⁴ (300162 天津, 武警后勤学院: 学报编辑部¹, 机能实验中心², 附属医院药剂科³, 药理学教研室⁴)

[摘要] 目的 体外用地塞米松诱导培养法建立及鉴定肝胰岛素抵抗细胞模型。方法 将 HepG2 细胞置于含不同浓度地塞米松培养基中培养 24 h, 用含胰岛素的新鲜培养基刺激 24 h, 采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶 (glucose oxidase-peroxidase enzyme, GOD-POD) 法检测细胞对葡萄糖的消耗情况, 蒽酮法检测细胞内糖原含量, 利用 Western blot 检测细胞内胰岛素受体底物-2 表达的变化。结果 用地塞米松处理 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞对胰岛素的敏感性显著降低, 1.0、3.3、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松组葡萄糖消耗分别为 (0.637 ± 0.018) 、 (0.535 ± 0.018) 、 (0.471 ± 0.011) mmol/L ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 细胞内糖原含量分别为 (2.83 ± 0.13) 、 (2.42 ± 0.10) 、 (2.23 ± 0.06) $\mu\text{mol/mg}$ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 胰岛素受体底物-2 表达量均下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 体外地塞米松诱导培养法可以成功建立肝胰岛素抵抗细胞模型, 此细胞模型出现胰岛素抵抗的机制可能与 IRS-2 表达的下调有关。

[关键词] 胰岛素抵抗; 细胞模型; HepG2 细胞; 地塞米松

[中图分类号] R-332; R587

[文献标志码] A

糖尿病 90% 以上是以胰岛素抵抗为主要病理特征的 2 型糖尿病。胰岛素抵抗常常伴随葡萄糖耐量异常、肥胖、脂质代谢紊乱、高血压, 称为胰岛素抵抗综合征^[1]。建立胰岛素抵抗的细胞模型, 可广泛用于从细胞水平上探讨胰岛素抵抗形成的机制、葡萄糖代谢障碍的病理生理学环节, 而且便于观察干预因素对胰岛素抵抗的直接影响, 特别是用于筛选改善胰岛素抵抗的药物。目前体外建立肝胰岛素抵抗细胞模型的常用方法有高胰岛素、高浓度葡萄糖、游离脂肪酸、地塞米松诱导胰岛素抵抗模型, 其中地塞米松诱导胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞模型的方法也很成熟。但有关地塞米松诱导的胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型少见报道。动物实验结果表明地塞米松能引起胰岛素抵抗, 且肝脏的胰岛素抵抗在机体胰岛素抵抗中占有重要地位, 故地塞米松诱导的胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型对于解释其胰岛素抵抗的发生机制及药物筛选具有重要意义。

本实验选择 HepG2 细胞作为研究载体, 采用地塞米松诱导建立胰岛素抵抗细胞模型, 同时选择胰岛素受体底物-2 (insulin receptor substrate, IRS-2) 检测建模后蛋白表达的变化, 旨在从分子水平探讨胰岛素抵抗产生的机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

HepG2 细胞 (由中国典型培养物保藏中心提供); 胎牛血清 (四季青生物工程有限公司); 地塞米松磷酸钠注射液 (天津药业集团新郑股份有限公司, 批号: 1004151); 胰岛素注射液 (江苏万邦生化医药股份有限公司, 批号: 1003220), 葡萄糖试剂盒

由中生北控生物科技股份有限公司提供; CCK-8 细胞计数试剂盒 (日本同仁化学研究所); BCA 试剂盒、细胞裂解液 (碧云天生物技术研究所); IRS-2 抗体、辣根酶标记的山羊抗兔 IgG、 β -actin (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞在含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中培养, 培养环境为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100% 空气湿度的细胞培养箱中。

1.2.2 分组与处理 将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板, 并分为对照组和地塞米松组, 每组 6 孔, 除对照组外, 地塞米松组的终浓度分别为 1.0、3.3、10.0 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 24 h。然后每孔换上含 10 nmol/L 胰岛素的新鲜无血清培养基, 再继续培养 24 h。最后每孔取 10 μl 培养液, 以葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖浓度, 计算葡萄糖消耗量。然后每孔加入 5 μl CCK-8 试剂^[2], 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 在 450/650 nm 测定光密度值, 以此代表细胞活力。以 2 h 的细胞活力计算相对葡萄糖消耗量 (葡萄糖消耗量/细胞活力)。

1.2.3 细胞内糖原含量的测定 将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 48 孔板, 如上所述处理后, 用冰 PBS 洗涤细胞, 每孔加入 300 μl 200 g/L 的 KOH 裂解细胞, 取出 50 μl 细胞裂解液用 BCA 试剂盒测定蛋白含量, 剩余细胞裂解液以蒽酮法测定糖原含量。计算相对葡萄糖消耗量 (糖原含量/蛋白含量)。

1.2.4 Western blot 检测 HepG2 细胞中 IRS-2 蛋白表达 将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 24 孔板, 如上所述处理后收集 HepG2 细胞用细胞裂解液裂解后提取总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量的蛋白样品用样品缓冲液处理, 蛋白变性、SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白、电转移法使蛋白转移至 PDVF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h, 封膜后加入兔抗人 IRS-2 抗体为特异性第一抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜后以辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:3 000) 孵育, 室温下轻摇 2 h, TBST 洗膜后用 ECL 化学发光法曝光显影, 洗片后用 Bio-Rad 图像分析系统对 Western blot 的条带进行扫描, 用凝胶图像处理系统分析目标带的相对分子质量和净光密度值。

[基金项目] 武警医学院博士科研启动基金 (WBS200905)

[通信作者] 宋光明, E-mail: songgm212@163.com

1.3 统计学处理

运用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 地塞米松对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

由表 1 可知,1.0、3.3、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松可使 HepG2 细胞的相对葡萄糖消耗量明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),且有一定的浓度效应关系。10 $\mu\text{mol/L}$ 的地塞米松可使 HepG2 的细胞活力明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 地塞米松对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	细胞活力	相对葡萄糖消耗量 (mmol/L)
对照组		0.717 \pm 0.021	0.692 \pm 0.013	1.039 \pm 0.041
地塞米松组	1.0	0.637 \pm 0.018 ^a	0.712 \pm 0.020	0.896 \pm 0.022 ^a
	3.3	0.535 \pm 0.018 ^b	0.665 \pm 0.012	0.806 \pm 0.034 ^b
	10.0	0.471 \pm 0.011 ^b	0.618 \pm 0.020 ^a	0.764 \pm 0.034 ^b

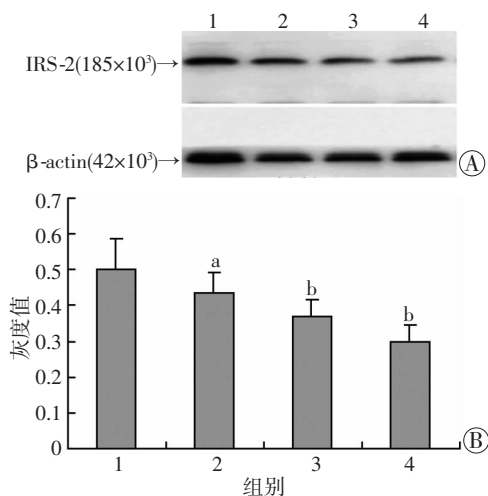
a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

2.2 地塞米松对 HepG2 细胞糖原合成的影响

在 HepG2 细胞中加入 3 个浓度的地塞米松培养 24 h 后,经 10 nmol/L 的胰岛素刺激后,地塞米松组 1.0、3.3、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞内糖原含量分别为 (2.83 \pm 0.13)、(2.42 \pm 0.10)、(2.23 \pm 0.06) $\mu\text{mol/mg}$,地塞米松组各浓度的细胞内糖原含量较对照组细胞内糖原量 (3.05 \pm 0.15) $\mu\text{mol/mg}$ 显著减少 ($P < 0.05, P < 0.01$),且有一定的浓度效应关系。

2.3 地塞米松对 HepG2 细胞中 IRS-2 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组比较,地塞米松组细胞的 IRS-2 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$),且有一定的浓度效应关系,见图 1。



1: 对照组; 2: 地塞米松组 1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 地塞米松组 3.3 $\mu\text{mol/L}$; 4: 地塞米松组 10 $\mu\text{mol/L}$

A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较

图 1 Western blot 检测 HepG2 细胞中 IRS-2 蛋白表达

3 讨论

目前的胰岛素抵抗研究中,往往是研究胰岛素抵

抗的发生机制及药物对机体胰岛素敏感性的影响,常需要使用胰岛素抵抗细胞模型。国内外已经成功复制数种胰岛素抵抗细胞模型,主要有高胰岛素诱导培养模型、游离脂肪酸诱导模型、肿瘤坏死因子诱导模型等^[3-5]。其中利用地塞米松诱导的模型应用较广,其相应的分子机制也有大量研究^[6-7]。诱导的细胞种类包括肌细胞 (L6)、人脂肪细胞 (3T3-L1) 等^[8-9]。HepG2 细胞株是从肝胚胎瘤细胞分离出来的肝肿瘤细胞株,具有类似于正常肝细胞的代谢功能,被作为正常人肝细胞的代替细胞,其表面表达高亲和力的胰岛素受体,可用于葡萄糖的摄取、糖原合成酶的活性、脂类生成等方面的研究。本课题以 HepG2 细胞为研究对象,采用地塞米松诱导培养法成功建立了胰岛素抵抗的肝细胞模型。肝细胞是胰岛素重要的效应细胞。口服葡萄糖后约 60% 由肝脏摄取,40% 进入周围循环,肝脏摄入的葡萄糖主要是促进糖原合成。本实验结果提示,应用地塞米松诱导培养法可使 HepG2 细胞胰岛素刺激的葡萄糖消耗量减少,糖原合成减少,即发生胰岛素抵抗。但值得注意的是,10 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松可使 HepG2 细胞的活力明显下降,因此地塞米松的浓度不宜过大。

胰岛素受体底物系胰岛素敏感组织中一组与各种胰岛素生物效应调节关系极为密切的信号蛋白。已知有 IRS-1, 2, 3, 4, 其中以与胰岛素生物效应关系较大的 IRS-1 和 IRS-2 的研究较多,且 IRS-2 在肝组织中高表达。胰岛素和胰岛素受体结合后诱导受体 β 亚基的磷酸化并激活酪氨酸蛋白激酶,受体 β 亚基被激活后进而激活 IRSs 内酪氨酸残基的磷酸化,从而能与各种信号蛋白的 SH2 区结合,其中如磷脂酰肌醇 3 激酶使之激活。已经证实,由 IRSs 介导的磷脂酰肌醇 3 激酶信号转导途径在胰岛素调节的许多代谢活动中起关键作用,包括葡萄糖转运蛋白的刺激、糖原合成酶的激活及糖异生中关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的抑制机制^[10]。本研究结果显示,地塞米松在 HepG2 细胞上的作用与抑制肝细胞 IRS-2 蛋白的表达有关,即削弱了肝细胞内的胰岛素信号传递,并诱导胰岛素抵抗。

综上所述,地塞米松诱导培养法可以复制出肝胰岛素抵抗细胞模型,此细胞模型出现胰岛素抵抗的机制可能与 IRS-2 表达的下调有关。

参考文献:

[1] Hsieh P S, Hsieh Y J. Impact of liver diseases on the development of type 2 diabetes mellitus[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(48): 5240 - 5245.

[2] Matsuoka M, Wispriyono B, Igisu H. Increased cytotoxicity of cadmium in fibroblasts lacking c-fos[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(12): 1573 - 1576.

[3] Senn J J, Klover P J, Nowak I A, et al. Interleukin-6 induces cellular in-

- sulin resistance in hepatocytes[J]. *Diabetes*, 2002, 51(12): 3391-3399.
- [4] Renstrom F, Buren J, Svensson M, et al. Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes [J]. *Metabolism*, 2007, 56(2): 190-198.
- [5] Chen X, Huang Z, Chen D, et al. Role of NYGGF4 in insulin resistance[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, [Epub ahead of print].
- [6] Nicastro H, Zanchi N E, da-Luz C R, et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats[J]. *Nutrition*, 2011, [Epub ahead of print].
- [7] Rafacho A, Abrantes J L, Ribeiro D L, et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats[J]. *Horm Metab Res*, 2011, 43(4): 275-281.
- [8] Tatarczyk T, Ciardi C, Niederwanger A, et al. Postprandial triglyceride-rich lipoproteins induce hepatic insulin resistance in HepG2 cells independently of their receptor-mediated cellular uptake[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 343(1/2): 71-78.
- [9] Yamashita R, Saito T, Satoh S, et al. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2[J]. *Endocr J*, 2005, 52(6): 727-733.
- [10] Thirone A C, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(2): 72-78.
- (收稿:2011-10-08;修回:2011-12-16)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2012)07-0673-03

短篇论著

参附注射液对实验心源性休克犬血浆 NO、iNOS 及心肌 iNOS mRNA 的影响

李桂琼,陈庆伟,柯大智 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院老年病科)

[摘要] 目的 观察参附注射液对心源性休克犬血浆 NO、iNOS 含量及心肌 iNOS mRNA 的影响。方法 选择健康成年家犬 15 只,体质量(14.0 ± 2.7)kg,雌雄不拘。完全随机分为参附组、模型组,并设假手术组(n=5),在结扎前,休克时,给药后 30、60、120、180 min 抽血,用比色法测血浆 NO、iNOS 的含量,180 min 时取心肌组织,用 RT-PCR 法测心肌 iNOS mRNA 的表达,同时监测犬的心功能指标。结果 参附注射液能降低心源性休克时升高的 NO[(66.54 ± 2.42) μmol/L vs (45.31 ± 3.39) μmol/L]、iNOS[(6.60 ± 0.23) U/ml vs (5.13 ± 0.23) U/ml]水平(P < 0.01),并下调心肌 iNOS mRNA 的基因表达。参附注射液给药可显著增加心源性休克犬的 CO 和 CI,明显降低动物的 TPVR。结论 参附注射液可以降低血浆中 NO 和 iNOS 的水平,抑制心肌 iNOS mRNA 的表达。

[关键词] 参附注射液;心源性休克;NO;iNOS;心肌 iNOS mRNA

[中图分类号] R285.6; R289.5; R541.64

[文献标志码] A

心源性休克是急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的严重并发症,它往往会引起患者的死亡^[1-2]。NO 是重要的炎症介质,过高浓度的 NO 可能降低心输出量,减少冠脉血流,而加重休克的发展^[3-4]。参附注射液是根据古方参附汤研制的一种抗休克药物,现在临床参附汤常用于预防和治疗各种休克^[5]。为进一步探讨参附注射液抗心源性休克的作用机制,我们观察了参附注射液对心源性休克犬血浆 NO、iNOS 变化及心肌 iNOS mRNA 的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 健康成年家犬 15 只,体质量(14.0 ± 2.7)kg,雌雄不拘,完全随机分为参附组、模型组及假手术组(n=5),购于重庆医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK200220001。

1.1.2 主要试剂与仪器 参附注射液(雅安三九药业有限公司,批号:20071013);多巴胺(广州明兴制药有限公司);RNA

抽提试剂(Trizol,上海生工生物工程公司);RT-PCR 试剂盒(上海生工生物工程公司);iNOS 上游引物 5'-TCAAAAACCTGGGGCAATGGC-3',下游引物:5'-GCTTGGTGGCGAAGATGAGC-3';内参 β-actin 上游引物:5'-GGCCGTCTCCCTCCAT-3',下游引物:5'-GCCACGCTCCGTGAGGAT-3';MPS-2000 型多导生物信号分析系统(上海振科科贸有限公司);PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立 实验前禁食 12 h,禁水 8 h。采用冠状动脉结扎法制作心源性休克犬的动物模型:以文献[6]方法建立缺血性心源性休克模型。观察平均动脉压下降至 70% 以下,同时出现心肌梗死的心电图图形为心源性休克指标。模型稳定血压 10 min 内不恢复为造模成功。模型成功即刻,分别静脉滴注给药治疗。参照公式^[7]给予参附注射液参附注射液 1.9 ml/kg 加入 5% 葡萄糖液 5.5 ml/kg;模型组给予 5% 葡萄糖液 5.5 ml/kg;假手术组只穿线不结扎冠状动脉,5% 葡萄糖液 5.5 ml/kg。

1.2.2 指标检测

1.2.2.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)样品制备 在结扎前,休克时,给药后 30、60、120、180 min 各个时刻点取股静脉血于含有 10% EDTA 的离心管内,在室温下静置 15 min,在 4 ℃,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液于 EP 管中,置于 -20 ℃ 的冰

[基金项目] 重庆市卫生局中医药科研项目(2003_B_30)

[通信作者] 陈庆伟,E-mail:lgqwq@yahoo.com.cn

箱保存待测。最后取动物心脏,用预冷的生理盐水洗净血液,选取缺血区心肌组织放于液氮中速冻,然后将其保存于 -70°C 冰箱,以备做 RT-PCR。

1.2.2.2 血浆 NO 含量及 iNOS 活性的测定 样本置于室温复融后,采用比色法按试剂盒说明测定。

1.2.2.3 心肌 iNOS mRNA 的表达 用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 $25\ \mu\text{l}$,其中 $10\times$ 逆转录缓冲液 $5\ \mu\text{l}$; $25\ \text{mmol/L}\ \text{MgCl}_2\ 2\ \mu\text{l}$; $10\ \text{mmol/L}\ \text{dNTP}\ 1\ \mu\text{l}$; $10\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ 上下游引物 $5\ \mu\text{l}$; *Taq* 酶 $0.5\ \mu\text{l}$; cDNA $2.5\ \mu\text{l}$; 补水至总体积 $25\ \mu\text{l}$ 。 β -actin 反应参数(扩增片段 508 bp): 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72°C 后延伸 6 min, iNOS 反应参数(扩增片段 315 bp): 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 50 s, 56°C 退火 50 s, 72°C 延伸 50 s, 共 40 个循环, 72°C 后延伸 6 min; 产物进行凝胶电泳,结束后将凝胶置于 Bio-Rad 自动凝胶成像分析系统中,采集图像,用系统配套的 Quantity One 4.4 检测电泳条带信号灰度。iNOS mRNA 的相对含量用 iNOS mRNA 条带灰度与内参条带灰度之比表示。

1.2.2.4 心源性休克犬心功能指标的监测 观测给药前后心脏指数(CI)、心输出量(CO)、总外周阻力(TPVR)等功能性指标的变化。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两均数比较用 *t* 检验,经 SPSS 11.0 软件处理。

2 结果

2.1 参附注射液对心源性休克犬 NO、iNOS 的影响

心源性休克后,模型组血浆 NO 及 iNOS 水平上升,分别从结扎前的 $(66.99\pm 1.42)\ \mu\text{mol/L}$ 和 $(6.54\pm 0.15)\ \text{U/ml}$ 上升至结扎后的 $(133.63\pm 2.76)\ \mu\text{mol/L}$ 和 $(11.81\pm 0.94)\ \text{U/ml}$ ($P<0.01$)。参附注射液能降低心源性休克犬血浆 NO 及 iNOS 水平,给药前血浆 NO 水平: $(66.54\pm 2.42)\ \mu\text{mol/L}$, 给药后 30、60、120 min 和 180 min, 参附组血浆 NO 分别为 (66.09 ± 1.73) 、 (60.41 ± 1.23) 、 (43.38 ± 2.02) 、 $(45.31\pm 3.39)\ \mu\text{mol/L}$; 给药血浆 iNOS 水平: $(6.60\pm 0.23)\ \text{U/ml}$, 给药后参附组血浆 iNOS 分别为: (6.43 ± 0.09) 、 (5.90 ± 0.11) 、 (5.05 ± 0.39) 、 $(5.13\pm 0.23)\ \text{U/ml}$, 与用药前及模型组比较均有显著性差异 ($P<0.01$)。

2.2 心肌 iNOS mRNA 的表达

iNOS mRNA 表达见图 1, 心源性休克犬给药后模型组、参附组和假手术组的心肌 iNOS mRNA 光密度值分别为 $(1.79\pm$

$0.70)$ 、 (0.46 ± 0.07) 和 (0.40 ± 0.54) 。由结果可知,心源性休克时,心肌 iNOS mRNA 的表达显著增加。参附注射液组可下调心源性休克犬心肌 iNOS mRNA 过度表达,与模型组比较有显著性差异 ($P<0.01$); 模型组 iNOS mRNA 的表达明显调高, iNOS/ β -actin 比值与假手术组比较差异显著 ($P<0.01$)。

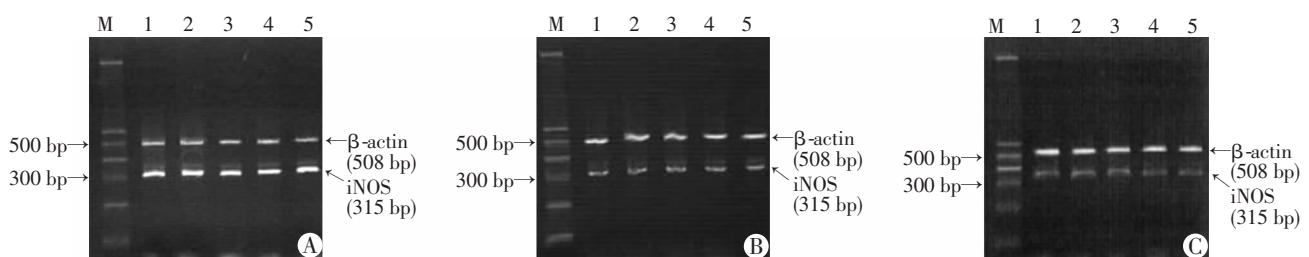
2.3 参附注射液对心源性休克犬 CO、CI 和 TPVR 的影响

心源性休克后,犬 CO 减小,模型组和参附组分别从结扎前的 (1.08 ± 0.21) 和 $(1.15\pm 0.19)\ \text{L/min}$ 下降至结扎后的 (0.35 ± 0.07) 和 $(0.36\pm 0.05)\ \text{L/min}$; CI 下降,模型组和参附组分别从结扎前的 (1.77 ± 0.43) 和 $(1.98\pm 0.32)\ \text{L}/(\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 下降至结扎后的 (0.53 ± 0.23) 和 $(0.56\pm 0.08)\ \text{L}/(\text{min}\cdot\text{m}^2)$; TPVR 增加,模型组和参附组分别从结扎前的 (874 ± 208) 和 $(853\pm 204)\ \text{kPa}\cdot\text{s/L}$ 升高至结扎后的 $(2\ 189\pm 387)$ 和 $(1\ 744\pm 452)\ \text{kPa}\cdot\text{s/L}$ 。参附注射液给药可显著增加心源性休克犬的 CO 和 CI, 明显降低动物的 TPVR; 给药后 30、60、120 min 和 180 min, 参附组的 CO 分别为 (0.34 ± 0.05) 、 (0.56 ± 0.04) 、 (0.60 ± 0.06) 和 $(0.54\pm 0.07)\ \text{L/min}$; CI 分别为 (0.99 ± 0.11) 、 (1.07 ± 0.09) 、 (0.93 ± 0.21) 和 $(0.90\pm 0.10)\ \text{L}/(\text{min}\cdot\text{m}^2)$; 而 TPVR 分别为 $(1\ 646\pm 487)$ 、 $(1\ 487\pm 267)$ 、 $(1\ 453\pm 218)$ 和 $(1\ 420\pm 380)\ \text{kPa}\cdot\text{s/L}$ 。

3 讨论

研究表明,心源性休克的发生与许多促炎和抗炎的细胞体液因子有关^[8-12]。本研究发现,心源性休克时血浆 NO 含量、iNOS 活性增加,心肌 iNOS mRNA 表达增加,说明 NO, iNOS 在心源性休克中发挥重要的作用。用参附注射液治疗心源性休克犬,血浆 NO、iNOS 水平降低,同时能下调心肌 iNOS mRNA 过度表达。参附注射液也对心源性休克犬的心功能指标有一定影响。它可显著增加心源性休克犬的 CO 和 CI, 明显降低动物的 TPVR, 与模型组相比有显著性差别。

参附注射液可能通过抑制心肌 iNOS mRNA 的基因表达,防止 NO 过度产生,增加心肌血流,减轻心脏损害,从而通过细胞保护来改善心源性休克时血流动力学变化,而改善心源性休克的预后^[13-15]。本研究对参附注射液在临床上用于心源性休克的治疗提供了新的理论依据和临床指导。



A: 模型组; B: 参附组; C: 假手术组; M: 标准; 1-5: 实验重复 5 次

图 1 RT-PCR 检测心源性休克犬心肌 iNOS mRNA 表达

参考文献:

[1] Hochman J S. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm [J]. *Circulation*, 2003, 107 (24): 2998 - 3002.

[2] Menon V, Fincke R. Cardiogenic shock: a summary of the randomized SHOCK trial [J]. *Congest Heart Fail*, 2003, 9(1): 35 - 39.

[3] Ducas J, Grech E D. ABC of interventional cardiology. Percutaneous coronary intervention: cardiogenic shock [J]. *BMJ*, 2003, 326 (7404): 1450 - 1452.

[4] Hochman J S, Buller C E, Sleeper L A, et al. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction—etiologies, management and outcome: a report from the SHOCK Trial Registry. Should we emergently revascularize Occluded Coronaries for cardiogenic shock? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(3 Suppl A): 1063 - 1070.

[5] 柴跃龙, 龚建平, 涂兵. 参附注射液改善大鼠肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞的激活[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(12): 1216 - 1219.

[6] Creamer J E, Edwards J D, Nightingale P. Mechanism of shock associated with right ventricular infarction[J]. *Br Heart J*, 1991, 65(2): 63 - 67.

[7] 马建秀, 李秀娟, 臧凯宏, 等. 人工合成胸腺素 α1 静脉注射后在小鼠和大鼠体内的分布与代谢[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(17): 1843 - 1846.

[8] Brunkhorst F M, Clark A L, Forycki Z F, et al. Pyrexia, procalcitonin, immune activation and survival in cardiogenic shock: the potential impor-

tance of bacterial translocation[J]. *Int J Cardiol*, 1999, 72(1): 3 - 10.

[9] 黄雄, 曹雪滨, 江明宏, 等. 单支开放前降支闭塞并休克的介入治疗1例及循证证据[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14): 1501, 1505.

[10] Zhang C, Xu X, Potter B J, et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(3): 475 - 480.

[11] 张莹, 石承先, 别平, 等. 重症急性胰腺炎大鼠肺脏 iNOS mRNA 表达及丹参的干预效应[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(15): 1569 - 1572.

[12] Webb J G, Sleeper L A, Buller C E, et al. Implications of the timing of onset of cardiogenic shock after acute myocardial infarction: a report from the SHOCK Trial Registry. Should we emergently revascularize Occluded coronaries for cardiogenic shock? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(3 Suppl A): 1084 - 1090.

[13] 代友平, 于世龙, 蒋树芝, 等. 人参皂甙对缺血再灌注损伤后犬心肌的保护作用[J]. 同济医科大学学报, 1996, 25(3): 210 - 212, 218.

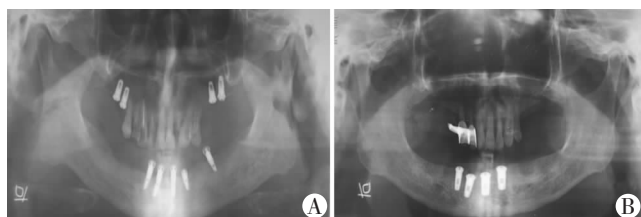
[14] 侯明晓, 敖定椿. 人参总皂甙抗心肌缺血-再灌注损伤的作用机制[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2000, 7(4): 256 - 259.

[15] 陈玉培, 牟崇明, 季道如, 等. 参附注射液对大鼠缺血再灌注心肌 Bcl-2, Bax 与 c-fos 基因蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19): 1939 - 1941.

(收稿:2011-11-15;修回:2012-01-04)

(编辑 梁 嘉)

(上接 657 页)



A:球帽装精密附着体;B:磁性附着体

图1 球帽状精密附着体种植体与磁性附着体种植体曲面断层片观察

2.2 固位力及咀嚼效能测定

结果显示,10例球帽状精密附着体的固位力为(3 012. 15 ± 131. 8)g,咀嚼效能为(0. 863 ± 0. 071)g,而磁性附着体的固位力为(3 103. 06 ± 108. 17)g,咀嚼效能为(0. 881 ± 0. 076)g。2组数据差异无统计学意义(P>0. 05)。

3 讨论

一直以来,传统修复对于下颌牙列长时间缺失的病例,总面临固位力及咀嚼效率差的难题。随着种植技术及附着体等新技术的临床推广运用,使这一问题取得了较好的解决。球帽状精密附着体钢托义齿的舌腭侧环靠臂可以防止义齿摆动、旋转,构造精密,套帽的损坏可个别更换,临床维修易,附着体的金属球和尼龙帽套之间的弹性结合产生缓冲作用,保护种植体。种植体上无金属卡环显露,种植体与人工牙之间无明显倒凹,可预防食物欠塞,具有美观卫生特点。但是其治疗过程较为复杂,取膜次数较多,制作技术要求高。磁性附着体利用的

磁体和衔铁之间具有磁性吸引力来产生固位效果。磁体和衔铁间呈平板样接触,接触面可有轻微的移位,当侧向力过大时,可磁性附着体可脱位,产生应力中断效应。本试验结果显示磁性附着体与球帽状精密附着体在下颌全口义齿修复中都具有较强的固位力与较高的咀嚼效率,二者无明显差异,与文献[4]报道一致。患者无论在舒适度、适应时间、固位、稳定等方面都感到满意。在磁性附着体组有2例出现种植周围炎症可能与基托缓冲不够有关。从临床操作方面磁性附着体较球帽状附着体而言,简单,易掌握、患者摘戴方便,但价格相对昂贵。磁性附着体长时间使用磁铁生锈、消磁,需更换磁铁等问题。另外,它所产生的磁性对牙龈、牙槽骨组织的影响有待于进一步研究。本组病例种植体均位于前牙槽嵴区,负荷全口颌力,从力学分布上也不尽合理。而长时间应是否影响种植体稳固等方面有待于继续研究。

参考文献:

[1] 赵依民, 欧阳官, 高元, 等. 磁性固位覆盖总义齿固位特性和咀嚼效率的定量研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 1994, 29(3): 140 - 142.

[2] 宋兆峻, 叶秀芬, 宁丽, 等. 用吸光度法测定咀嚼效能的研究[J]. *口腔医学*, 1988, 8(2): 70 - 72.

[3] 李敬东, 梁锐英, 吴文慧. 太极扣和磁性附着体覆盖义齿修复下牙列缺失疗效比较[J]. *军医进修学院学报*, 2009, 30(2): 145 - 147.

[4] 沈倍勇, 郑苍尚, 周琦. 磁性附着体在全口覆盖义齿的临床应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(12): 1857 - 1859.

(收稿:2011-12-06;修回:2012-01-28)

(编辑 张 维)