

基础研究

脓毒症大鼠通过降低肌浆网钙摄取和SERCA1表达损害膈肌舒张功能

张建友¹, 吴进², 李士通¹, 龚园²¹南京医科大学, 江苏 南京 210029; ²上海交通大学附属第一人民医院麻醉科, 上海 200080

摘要:目的 探讨脓毒症急性期大鼠膈肌舒张功能障碍的机制。方法 雄性清洁级SD大鼠36只。随机数字表法分为:假手术组(S组)12只、造模组(CLP组)24只。对造模组行盲肠结扎穿孔手术复制脓毒症模型,造模成功后随机分为脓毒症CLP-6 h组和脓毒症CLP-12 h组,各12只,分别于术后6 h和12 h测定单刺激肌颤搐(Pt)、最大强直收缩力(Po)、半舒张时间(1/2RT)、收缩时间(TPT)、最大收缩期上升速率(+dF/dt)和最大舒张期下降速率(-dF/dt);运用Fura-2法测定膈肌肌浆网钙最大摄取率和释放率,Western blotting法检测肌浆网SERCA1、SERCA2和RyR表达。结果 造模后6 h和12 h组大鼠较S组半舒张时间显著延长,-dF/dt显著下降($P<0.01$),而仅仅在12 h组大鼠膈肌+dF/dt、Pt、Po和肌浆网钙的峰值释放率较S组显著降低($P<0.01$),6 h组大鼠未见明显变化($P>0.05$);造模后12 h组大鼠膈肌SERCA1和RyR表达显著下降($P<0.01$),SERCA2和Ca²⁺-ATP酶活性无明显改变($P>0.05$)。结论 脓毒症大鼠急性期12 h内膈肌收缩和舒张功能显著受损,舒张功能障碍可能与肌浆网钙摄取功能下降及SERCA1低表达有关,肌浆网释放和摄取功能及RyR表达下降共同导致了收缩功能的下降。

关键词:脓毒症;急性期;膈肌;肌浆网钙摄取率;Ca²⁺-ATP酶

Lowered sarcoendoplasmic reticulum calcium uptake and diaphragmatic SERCA1 expression contribute to diaphragmatic contractile and relaxation dysfunction in septic rats

ZHANG Jianyou¹, WU Jin², LI Shitong¹, GONG Yuan²¹Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ²Department of Anesthesiology, Shanghai General Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Abstract: Objective The explore the mechanism responsible for diaphragmatic contractile and relaxation dysfunction in a rat model of sepsis. **Methods** Thirty-six adult male Sprague-Dawley rats were randomized equally into a sham-operated group and two model groups of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) for examination at 6 and 12 h following CLP (CLP-6 h and CLP-12 h groups). The parameters of diaphragm contractile and relaxation were measured, and the calcium uptake and release rates of the diaphragmatic sarcoendoplasmic reticulum (SR) and the protein expressions of SERCA1, SERCA2 and RyR in the diaphragmatic muscles were determined. **Results** The half-relaxation time of the diaphragm was extended in both the CLP-6 h and CLP-12 h groups with significantly reduced maximum tension declinerate and the peek uptake rate of SERCA ($P<0.01$). Diaphragmatic maximum twitch force development rate, the maximal twitch, tetanus tensions and the peek release rate of SR decreased only at 12h after CLP ($P<0.01$). The expression levels of SERCA1 protein decreased significantly in the diaphragmatic muscles at 12h following CLP ($P<0.01$) while SERCA2 expression level and SERCA activity showed no significant changes. **Conclusion** In the acute stage of sepsis, both the contractile and relaxation functions of the diaphragm are impaired. Diaphragmatic relaxation dysfunction may result from reduced calcium uptake in the SR and a decreased level of SERCA1 in the diaphragmatic muscles.

Keywords: sepsis; calium uptake; diaphragm; SERCA; sarcoendoplasmic reticulum; muscle relaxation

脓毒症是一种全身性的炎症综合症,可导致包括呼

吸功能损伤在内的多器官功能障碍。脓毒症膈肌损伤会加重呼吸功能障碍,延长机械通气时间^[1-2]。然而,脓毒症引起膈肌功能障碍的机制仍不十分明确。脓毒症不仅会引起的线粒体氧化应激损伤和能量代谢异常,同时会导致胞内钙稳态失衡^[3-4]。钙是骨骼肌收缩和舒张循环的重要介质,而肌浆网钙释放通道RyR和钙回摄通道SERCA为调节肌肉收缩和胞内钙水平的最重要的蛋

收稿日期:2016-08-21

基金项目:国家自然科学基金(81171845);上海自然科学基金(14ZR1438100)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81171845).

作者简介:张建友,博士,主治医师,E-mail: zjy_oracle@163.com

通信作者:李士通,教授,博士生导师,E-mail: yylshitong@163.com

白, SERCA下调会导致舒张功能障碍^[5]。研究表明脓毒症晚期RyR下降引起晚期的收缩功能异常, 而膈肌舒张功能障碍要早于收缩功能障碍的出现^[6-7], 但具体机制不清, 其舒张功能和肌浆网SERCA的改变需进一步研究, 因此设想脓毒症早期舒张功能异常可能由于SERCA的抑制导致胞内钙的持续高水平, 使肌钙蛋白不能变构复原, 引起骨骼肌早期舒张功能障碍, 进而引起收缩功能异常。本研究通过对脓毒症大鼠的膈肌功能、肌浆网钙摄取动力学和通道蛋白变化来探讨脓毒症早期膈肌功能障碍的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及设备

HEPES、Fura-2 pentapotassium salt、ATP- Na_2 和 AgNO_3 均购至 Sigma, SERCA1、SERCA2、RyR 一抗和二抗均购至 Abcam。手术器械(上海手术器械厂), 组织匀浆机(BIOSPEC), 低温离心机(Eppendorf), 凝胶成像系统(BIO-RAD), ALC-MPA2000m 型多导联生理监测仪(上海奥尔科特生物科技有限公司)等(由上海市第一人民医院实验中心提供)。

1.2 动物分组及模型制作

清洁级健康雄性SD大鼠36只, 体质量215~240 g, 由上海市第一人民医院动物实验中心提供(许可证号: SCXK(沪)2007-0005)。采用随机数字表法, 将其分为3组($n=12$): 假手术组(S组)、脓毒症6 h组(CLP-6 h组)、脓毒症12 h组(CLP-12 h组)。对待动物遵循动物伦理学标准。术前大鼠正常饲养自由饮食。采用盲肠结扎穿孔法(CLP)制作中等强度脓毒症模型^[8], CLP-6 h组和CLP-12 h组大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠50 mg/kg, 麻醉成功后, 消毒后取下腹部中线2 cm切口开腹, 游离盲肠。在距离回盲瓣远侧结扎盲肠, 用18 G的套管针穿透盲肠后, 从穿孔处挤出少许粪便, 后将盲肠回纳入腹腔, 3-0丝线分层缝合。S组在游离盲肠后回纳关腹。术毕背部皮下注射3 mL/100 g生理盐水, 观察大鼠情况, 为避免术后进食对实验干扰, 大鼠均禁食禁饮。

1.3 膈肌功能测定

取左侧膈肌(包含中心腱和肋骨, 去除膈神经), 修剪成约6 mm宽的肌条。取左侧膈肌条迅速置于预先饱和95% O_2 -5% CO_2 混合气的Krebs液中(mmol/L: 137 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 1 KH_2PO_4 , 12 NaHCO_3 , 和6.5 葡萄糖, pH值7.4)^[9], 修剪肌条, 去除脂肪。将肌条置于37℃恒温水浴系统的储液槽中(含12 mmol/L 筒箭毒碱)^[10], 膈肌中心腱一端用丝线固定后连接张力换能器, 另一端肋骨固定于L型支架上。平衡20 min后, 测定肌条的最适初长度(L_0), 然后采用ALC-MPA2000m型多导联生理监测仪测定肌肉功能。参数

如下: (1)单刺激肌颤搐(Pt刺激电压15 V, 刺激频率1 Hz, 波宽0.2 ms)、半舒张时间($1/2\text{RT}$), 收缩达峰时间(TTP), 最大收缩期上升速率($+dF/dt$)和最大舒张期下降速率($-dF/dt$); (2)最大强直收缩力(P_0): 给予肌条2次刺激电压15 V, 刺激频率120 Hz、刺激时间250 ms、串间隔670 ms的强直刺激, 取其平均值; (3)张力-频率曲线: 给予肌条从10、20、40、60、80、100和120 Hz的定时刺激, 刺激电压15 V, 刺激时间250 ms, 串间隔670 ms, 测定不同刺激频率下的膈肌张力, 绘制张力-频率曲线; (4)疲劳指数(FI): 给予肌条刺激频率40 Hz, 刺激电压15 V, 刺激时间330 ms, 串间隔670 ms的刺激, 共计300串刺激, 计算第120个肌颤搐与第1个肌颤搐的比值, 即为疲劳指数。每种刺激方式结束后肌条平衡15 min后再进行下一个模式的刺激。最后结束时将肌条用滤纸吸干称质量。所有力学参数采用肌条横截面积(CSV)进行校正^[9]。

1.4 骨骼肌SR匀浆提取

骨骼肌SR匀浆提取造模后完成后取右侧部分膈肌于液氮中保存留做蛋白测定, 其余膈肌吸干表面水分称重后置入10倍冰缓冲液中匀浆(mmol/L: 250 蔗糖, 20 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 0.2 苯甲基磺酰氟和0.2% 叠氮钠, pH 7.5)^[11], 转速15 000 r/min, 15 s×3个来回, 立即4℃1500 g离心15 min。取上清分装液氮速冻后-80℃保存, 测定肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶钙摄取释放和活性。

1.5 肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶活性测定用定磷法测定酶活性以每小时mmol/mg蛋白表示

1.6 肌浆网钙摄取释放功能测定参考

Ingalls CP等肌肉匀浆标准测定方法^[12], 采用Thermo多功能酶标仪微板读数法^[13]测定荧光。孵育缓冲液组成为(mmol/L: 100 KCl, 204-羟乙基哌嗪乙磺酸, 7.5焦磷酸钠, 和0.5 Mg^{2+} , pH 7.0), 测定时加入2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ca^{2+} 、1 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2五钾盐, ATP- Na_2 和 AgNO_3 。取10 μL 匀浆液与190 μL 孵育液于黑色多孔荧光测定板, 测定摄取时自动分液器加入10 μL 的20 mmol/L浓度的ATP- Na_2 持续震荡混匀, 监测4 min, 后自动分液器加入10 μL 的500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 AgNO_3 震荡混匀摄取开始, 监测4 min。完成后加入终浓度3.5 mmol/L的EGTA和5.0 mmol/L的 CaCl_2 测定零钙和饱和钙时候的荧光。连续测定激发波长340 nm和380 nm, 发射波长为500 nm时的荧光强度, 并扣除背景值。荧光比值法计算自由钙的浓度, 计算方程为 $[\text{Ca}^{2+}]f = K_d \times (\text{Sf2}/\text{Sb2}) \times (\text{R}-\text{Rmin})/(\text{Rmax}-\text{R})$, 式中 K_d 为Fura-2与 Ca^{2+} 结合的解离常数, 为224 nmol/L, Rmin 和 Rmax 为零钙和饱和钙时两激发波长的荧光比值, R 为测定的荧光比值, Sf2 和 Sb2 为零钙和饱和钙时测定的荧光值。肌浆网最大摄取率和释放率通过绘制 $[\text{Ca}^{2+}]f$ 变化与时间关

系曲线,分别计算曲线的最大斜率,用蛋白含量进行标准化来表示。

1.7 RyR和SERCA蛋白表达测定

RyR和SERCA表达蛋白电泳取右侧膈肌组织迅速转移至液氮速冻后至 -80°C 冰箱保存备用。(1)裂解(RIPA,碧云天公司);(2)配制12%聚丙烯酰胺凝胶;(3)蛋白上样;(4)电泳;(5)转膜;(6)封闭后洗膜3次,分别进行RyR, SERCA1和SERCA2一抗孵育,摇床 4°C 过夜;(7)洗膜和二抗孵育;(8)显影;用GAPDH做内参重复上述步骤,使用Image J进行各蛋白灰度分析。

1.8 统计学分析

所有数据均采用SPSS20.0统计软件进行处理。各组结果以均数 $\pm$ 标准差表示,采用单因素方差分析和Dunnnett t 检验比较组间差异,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

脓毒症造模术后6 h大鼠出现活动减少,竖毛和寒战。12 h大鼠呼吸急促,眼部出现分泌物增多,四肢湿冷。CLP组12 h内有1只大鼠死亡,退出本研究。

2.1 膈肌功能测定

Pt、Po、+dF/dt和-dF/dt在CLP术后12 h显著低于S组($P<0.01$),而6hCLP组大鼠-dF/dt即出现了显著下降($P<0.01$)。半舒张时间 $1/2\text{RT}$ 在造模后CLP-6 h和CLP-12 h组均较对照组延长($P<0.05$),而TTP在造模后12 h出现延长($P<0.01$),上述参数在两模型组间差异显著($P<0.01$,表1)。膈肌收缩力-频率曲线见图1,各频率下膈肌收缩力均使用CSV标定。结果显示CLP-6 h和S组大鼠各频率下膈肌条收缩力均高于CLP-12 h组大鼠($P<0.05$),CLP-6 h和S组间未见统计学差异。疲劳指数3组间无差异。

表1 各组大鼠膈肌收缩和舒张功能比较

Tab.1 Comparison of the contractile parameters of the diaphragm among the 3 groups ($n=12$, Mean $\pm$ SD)

Item	S	CLP-6 h	CLP-12 h
Po (mN/mm ²)	8.98 $\pm$ 1.87	8.87 $\pm$ 1.51	6.75 $\pm$ 1.54* Δ
Pt (mN/mm ²)	3.48 $\pm$ 0.56	3.39 $\pm$ 0.81	2.44 $\pm$ 0.65* Δ
1/2RT (ms)	8.41 $\pm$ 0.46	9.12 $\pm$ 0.74 [#]	10.05 $\pm$ 0.84* Δ
Time-to-Peak (ms)	18.15 $\pm$ 0.58	18.18 $\pm$ 0.76	22.49 $\pm$ 1.12* Δ
+dF/dt [mn/ $\cdot$ mm ² $\cdot$ s ⁻¹]	0.35 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.05* Δ
-dF/dt [mn/ $\cdot$ mm ² $\cdot$ s ⁻¹]	0.31 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.07 [#]	0.17 $\pm$ 0.04* Δ
FI (%)	83.1 $\pm$ 5.9	79.2 $\pm$ 9.2	81.7 $\pm$ 10.5

* $P<0.05$ and * $P<0.01$, vs S group; Δ $P<0.01$ vs CLP-6 h group; S: Sham group; CLP-6 h and CLP-12 h: Two sepsis groups examined at 6 and 12 h after CLP.

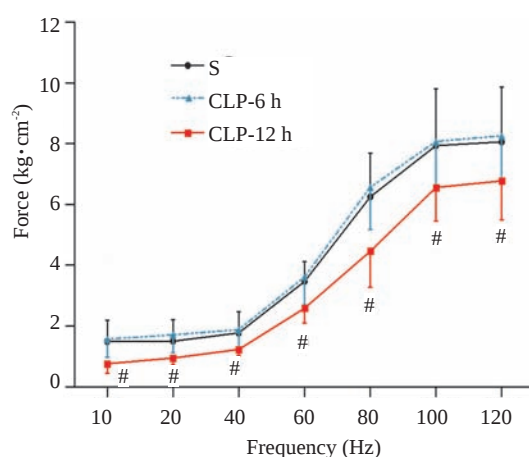


图1 各组大鼠膈肌收缩力-频率曲线比较

Fig.1 Force-frequency relationship of the diaphragm strips in the sham-operated (S), CLP-6 h and CLP-12 h groups. [#] $P<0.05$ vs group S.

2.2 肌浆网功能测定

如图2所示,典型的肌浆网钙摄取、释放快速项和慢速项的全过程图^[12](图2A),图2B显示为3组通过Fura-2测定的全过程拟合图比较。通过测定和计算,如图2C,CLP-6 h和CLP-12 h组大鼠膈肌肌浆网ATP诱导的钙摄取峰值率较S组显著下降($P<0.01$),而AgNO₃触发的钙释放峰值率方面,CLP-12 h组较CLP-6 h和S组降低显著($P<0.01$),S组和CLP-6 h组间差异不显著。各组大鼠Ca²⁺ATP酶活性在各组间未见差异($P>0.05$)。

2.3 Western blotting检测

钙释放和摄取通道蛋白表达结果见图3,在造模后6 h,各组大鼠膈肌SERCA1、SERCA2和RyR蛋白水平均未出现显著变化($P>0.05$);在CLP-12 h组大鼠膈肌表达SERCA1通道蛋白出现显著下降($P<0.01$),但是

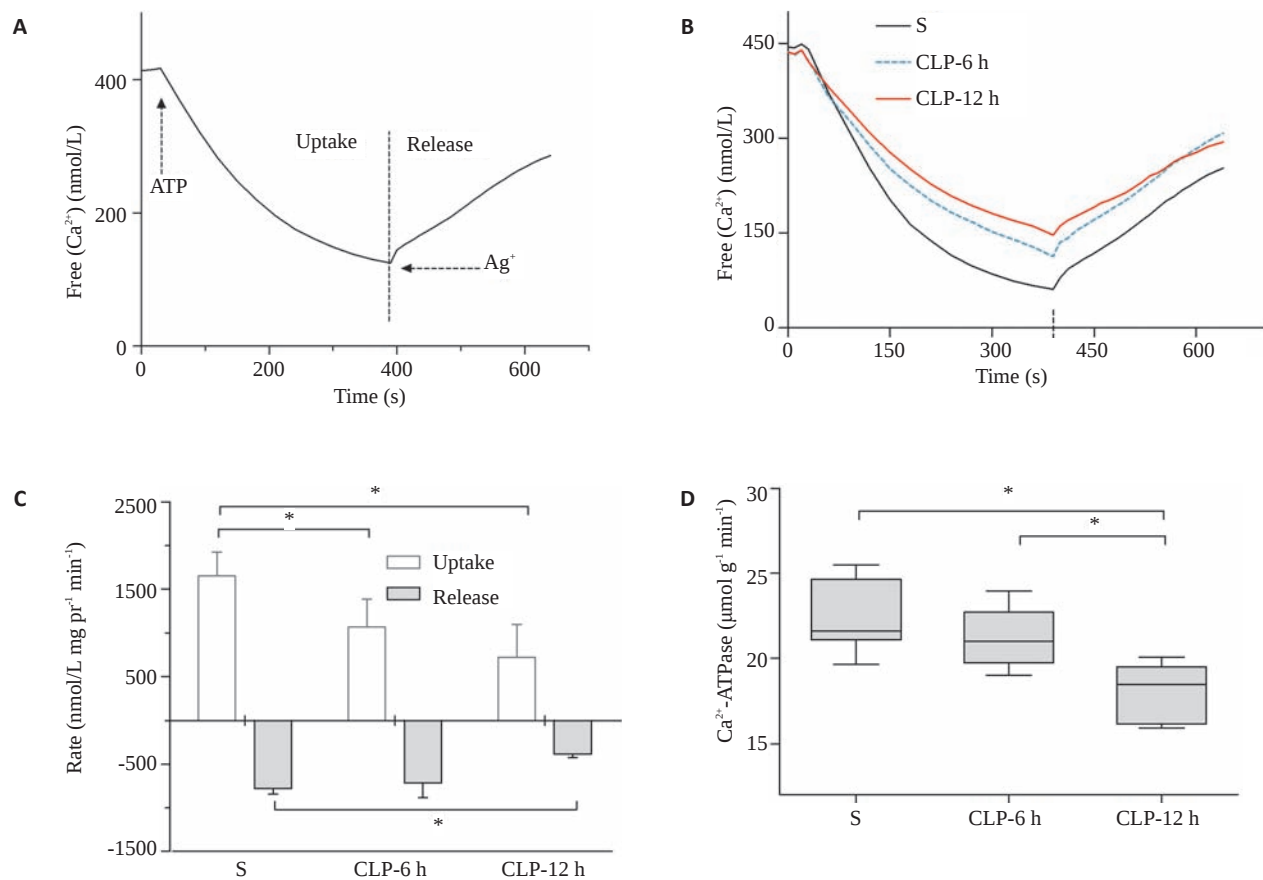


图2 膈肌肌浆网钙摄取和释放测定、峰值率和 Ca^{2+} -ATPase活性的比较

Fig.2 Measurement of the calcium kinetics in the SR of the diaphragm in different groups. A: Typical curve fitted by calcium level of crude muscle homogenate showing Ca^{2+} fluxes over time measured with Fura-2; B: Three fitted curves of the entire process; C: Peak rates of Ca^{2+} uptake activated by ATP and AgNO_3 -stimulated release in the diaphragmatic SR; D: SERCA activity measurement. * $P < 0.01$.

SERCA2与S组比较无差异($P > 0.05$)。钙释放通道无变化。
RyR蛋白在CLP后12 h出现下降($P < 0.01$), 6 h组表达

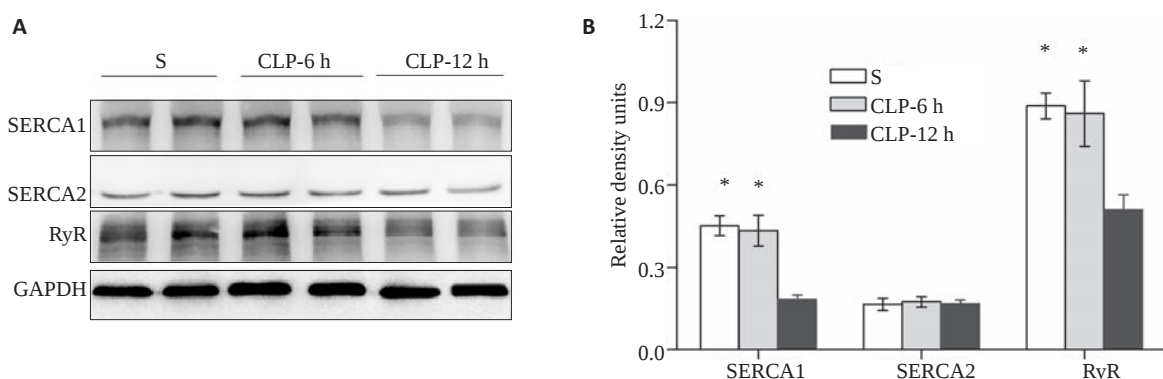


图3 各组大鼠SERCA1、SERCA2和RyR蛋白表达水平

Fig.3 Expression of proteins related to Ca^{2+} release and uptake in the diaphragm muscles. A: Representative blots for SERCA1, SERCA2, and RyR; B: Relative densitometric units for SERCA1, SERCA2 and RyR. * $P < 0.01$ vs CLP-12h group.

3 讨论

脓毒症是一种高致死率的全身炎症反应综合症,其

中危重病肌病(CIM)的发病率高达60%~80%,但是该疾病的早期诊断和治疗仍未能得到足够的重视。危

重病可影响全身肌肉系统,对呼吸系统的膈肌影响最为明显,易引起呼吸衰竭等严重并发症。因此,探讨危重病膈肌的早期病变发生机制,阻断肌病的恶性循环,对于预防和治疗危重病肌病都有显著的意义。

研究表明炎症反应、氧自由基和线粒体损伤均可以引起膈肌功能障碍^[14]。脓毒症 CLP 模型中,腹腔炎症能减低膈肌的最大收缩力。在造模后的 12 h 张力达峰时间和最大收缩期上升速率均显著下降,然而在 6 h 无明显改变。表明中等强度的脓毒症模型下,膈肌收缩力的下降要早于既往研究的 24 h。另外,在 6 h 和 12 h 两个时点,膈肌半舒张时间显著延长,最大舒张期下降速率显著下降。说明在脓毒症急性期膈肌舒张功能损害较早出现。

肌颤张力的变化可以反应肌细胞内钙摄取和释放功能,而且 SERCA 活性的高低也调节着肌肉松弛的时间,因此肌颤和最大舒张速率的下降以及舒张时间的延长可能与肌浆网钙摄取和释放的紊乱有关^[11]。然而,脓毒症下肌肉收缩和舒张至关重要的肌浆网钙释放和摄取功能还属未知。生理条件下肌浆网 SERCA 耗能方式回摄取钙进入肌浆网,引起肌肉松弛的同时为下一次收缩舒张循环做储备。因此,包括自由基、肌浆网钙水平、钙释放摄取过程和肌丝本身损伤均可以引起脓毒症膈肌功能障碍^[15]。本研究通过动态测定肌浆网的钙摄取和释放功能以及 SERCA 活性,发现脓毒症 6 h 和 12 h 肌浆网钙的最大摄取率显著下降,12 h 出现 SERCA 活性降低。同时脓毒症后 6 h 即出现了钙峰值摄取率的下降,而脓毒症模型心肌肌浆网 18 h 才出现钙摄取下降,可能由于肌肉类型和两者的全身及局部炎症状态不一致所致。因此,脓毒症早期 6 h 膈肌肌浆网钙摄取功能显著下降。

成年大鼠膈肌 II 型纤维和 I 型纤维比约为 67% 和 33%^[7]。成年哺乳动物的主要亚型 SERCA 1 型主要表达在 II 型纤维(快肌纤维),SERCA2 型主要表达在 I 型纤维(慢肌纤维)^[16]。成年大鼠 SERCA 水平可以通过两个亚型的测定来反应总体 SERCA 的水平^[17],同时 SERCA 低水平可以导致肌松弛功能下降^[18]。脓毒症 24 h 大鼠 SERCA1 和 SERCA2 在心肌和骨骼肌均出现显著低表达^[7, 19]。本研究发现脓毒症 12 h 即出现了 SERCA1 表达下降,而 SERCA2 型变化不显著。这种表达不一致可能由于快肌 II 型纤维对多种病理过程极为敏感导致^[20]。脓毒症进展后期 24 h 亦会出现 SERCA2 型的下降^[14]。脓毒症 12 h 膈肌舒张功能和肌浆网摄取率的下降可能与 SERCA1 的蛋白表达下降有关。然而,脓毒症 6 h 组并未出现 SERCA 蛋白表达的变化, SERCA 的调节蛋白磷酸化水平的改变可能导致了此时膈肌舒张功能下降^[21]。另外,肌浆网钙储库的钙释放功

能主要依赖肌浆网钙的回摄取,因此膈肌 SERCA 低表达导致的舒张功能障碍亦会导致膈肌收缩功能损害。

随着脓毒症的进展,RyR 受到抑制^[22],同时内毒素及自由基损害了膈肌收缩功能及肌浆网钙释放功能^[23-24],以至 12 h 后收缩功能出现障碍。作为肌浆网钙释放通道,RyR 的激活引起钙的大量释放产生肌肉收缩。RyR 主要有 3 种亚型,膈肌纤维主要表达 RyR 蛋白 1 型,RyR2 在骨骼肌系统缺如,同时脓毒症对含量 3% 亚型的 RyR3 影响极小^[24],因此 RyR 水平可以反应 RyR1 型的蛋白含量变化。研究发现脓毒症 12 h 后膈肌收缩力出现显著下降,而且肌浆网峰值释放率显著降低,RyR 蛋白表达水平显著下降,与本课题组前期研究一致^[6],因此,膈肌收缩力的下降及肌浆网钙释放率的下降可能与肌浆网 RyR 水平下降有关。

综上所述,脓毒症早期膈肌舒张功能障碍早于收缩功能障碍,舒张功能的下降与肌浆网钙摄取功能和 SERCA1 亚型表达的下降有关,同时和 RyR 低表达共同促成了膈肌收缩功能损害。本课题组在后期将对脓毒症早期大鼠膈肌 PLB 和 SLN 的表达及磷酸化水平进行研究,同时进行早期干预来进一步探讨脓毒症早期 SERCA 功能损伤的机制。

参考文献:

- [1] Maes K, Stamiris A, Thomas D, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on sepsis-induced diaphragm dysfunction in rats[J]. Crit Care Med, 2014, 42(12): e772-82.
- [2] Kress JP, Hall JB. ICU-acquired weakness and recovery from critical illness[J]. N Engl J Med, 2014, 370(17): 1626-35.
- [3] Griffiths RD, Hall JB. Intensive care unit-acquired weakness[J]. Crit Care Med, 2010, 38(3): 779-87.
- [4] Latronico N, Bolton CF. Critical illness polyneuropathy and myopathy: a major cause of muscle weakness and paralysis[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(10): 931-41.
- [5] Soller KJ, Yang J, Veglia G, et al. Reversal of phospholamban inhibition of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) using short, protein-interacting RNAs and oligonucleotide analogs[J]. J Biol Chem, 2016, 291(41): 21510-8.
- [6] Wu J, Zhang JY, Gong Y, et al. Slowed relaxation of diaphragm in septic rats is associated with reduced expression of sarco-endoplasmic reticulum $\text{CA}(2+)$ -ATPase genes SERCA1 and SERCA2[J]. Muscle Nerve, 2016, 54(6): 1108-13.
- [7] Qiu YW, Chen D, Xu MY, et al. Beneficial effects of dantrolene on sepsis-induced diaphragmatic dysfunction are associated with downregulation of high-mobility group box 1 and calpain-caspase-3 proteolytic pathway[J]. J Surg Res, 2016, 200(2): 637-47.
- [8] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-6.
- [9] 邱郁薇, 李士通, 徐美英. 丹曲林预先给药对脓毒症大鼠膈肌功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(3): 322-4.

- [10] Nishikawa K, Narimatsu E, Igarashi M, et al. Effects of sepsis on the neuromuscular blocking actions of d-tubocurarine on rat adductor and abductor laryngeal muscles[J]. *J Anesth*, 2009, 23(4): 520-5.
- [11] Nethery D, Dimarco A, Stofan D, et al. Sepsis increases contraction-related Generation of reactive Oxygen species in the diaphragm[J]. *J Appl Physiol* (1985), 1999, 87(4): 1279-86.
- [12] Russ DW, Grandy JS, Toma K, et al. Ageing, but not yet senescent, rats exhibit reduced muscle quality and sarcoplasmic reticulum function[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 201(3): 391-403.
- [13] Robinson JA, Jenkins NS, Holman NA, et al. Ratiometric and nonratiometric Ca^{2+} indicators for the assessment of intracellular free Ca^{2+} in a breast cancer cell line using a fluorescence microplate reader[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 58(3): 227-37.
- [14] 葛 敏, 马 丽, 方迎艳, 等. 肝硬化大鼠膈肌骨架蛋白和肌浆网钙泵基因表达的变化[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(12): 1796-800.
- [15] Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α : involvement of muscle myofilaments[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(4): 479-84.
- [16] Lambole CR, Murphy RM, McKenna MJ, et al. Endogenous and maximal sarcoplasmic reticulum Calcium content and calsequestrin expression in type I and type II human skeletal muscle fibres[J]. *J Physiol*, 2013, 591(23): 6053-68.
- [17] Shortt CM, Fredsted A, Bradford A, et al. Diaphragm muscle remodeling in a rat model of chronic intermittent hypoxia [J]. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(7): 487-99.
- [18] Guglielmi V, Vattemi G, Gualandi F, et al. SERCA1 protein expression in muscle of patients with Brody disease and Brody syndrome and in cultured human muscle fibers [J]. *Mol Genet Metab*, 2013, 110(1/2): 162-9.
- [19] Akasaki Y, Ouchi N, Izumiya Y, et al. Glycolytic fast-twitch muscle fiber restoration counters adverse age-related changes in body composition and metabolism[J]. *Aging Cell*, 2014, 13(1): 80-91.
- [20] Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(3): 243-50.
- [21] Pant M, Bal NC, Periasamy M. Sarcolipin: a key thermogenic and metabolic regulator in skeletal muscle [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(12): 881-92.
- [22] Friedrich O, Yi B, Edwards JN, et al. IL-1 α reversibly inhibits skeletal muscle ryanodine receptor: a novel mechanism for critical illness myopathy [J]? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(6): 1096-106.
- [23] Danjo W, Fujimura N, Ujike Y. Effect of pentoxifylline on diaphragmatic contractility in septic rats [J]. *Acta Med Okayama*, 2008, 62(2): 101-7.
- [24] Jiao GY, Hao LY, Gao CE, et al. Reduced DHPR α 1S and RyR1 expression levels are associated with diaphragm contractile dysfunction during sepsis[J]. *Muscle Nerve*, 2013, 48(5): 745-51.
- (编辑: 经 媛)