

伏立诺他对致死性烫伤大鼠生存率和心脏功能的影响及机制研究

孟祥熙¹, 郑金光², 温海玲¹, 吴忠隐³, 胡森⁴, 孙奎^{1*}

(1.承德医学院附属医院 烧伤整形科,河北 承德 067000;2.解放军总医院第四医学中心 烧伤整形医学部;
3.承德医学院附属医院 血管外科;4.解放军总医院医学创新研究部 创伤修复与组织再生研究中心)

摘要:目的:研究伏立诺他在无静脉补液条件下对致死性烫伤大鼠生存率和心脏功能的影响。方法:建立50% TBSA III° 烫伤大鼠模型,60只雄性SD大鼠随机分为假烫组($n=12$):37℃水浴浸泡;烫伤组($n=24$):伤后腹腔内注射0.25 mL生理盐水;SAHA组($n=24$):伤后腹腔内注射SAHA(7.5 mg/kg,溶于0.25 mL 0.9%生理盐水)。伤后观察6 h,各组取8只大鼠,取腹主动脉血测血浆CK-MB、TNF- α 水平,处死动物取心肌组织,采用伊文斯蓝(EB)染色法检测心脏组织血管通透性,caspase-3活性试剂盒测定心肌组织内caspase-3活性,Western blot测定心肌组织内HIF-1 α 、iNOS、BNIP3蛋白表达水平;各组剩余大鼠观察12 h生存率。结果:烫伤组伤后12 h内全部死亡,给予SAHA处理后12 h生存率为50%,大鼠存活时间明显延长,与烫伤组比较差异有统计学意义($P<0.05$);与假烫组比较,烫伤组伤后CK-MB水平、血管通透性、TNF- α 含量、caspase-3活性明显升高,HIF-1 α 及iNOS、BNIP3蛋白表达明显增加(均 $P<0.05$);而给予SAHA处理后,CK-MB水平、血管通透性、TNF- α 含量、caspase-3活性明显下降,HIF-1 α 及iNOS、BNIP3蛋白表达明显降低,比较差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论:在无液体复苏条件下,SAHA能延长致死性烫伤大鼠生存时间,保护心脏功能,降低心脏血管通透性,其作用机制可能与其减轻全身炎症反应、降低caspase-3活性,抑制HIF-1 α 及下游靶基因iNOS、BNIP3的表达有关。

关键词:烫伤;组蛋白去乙酰化酶抑制剂;心脏功能;肿瘤坏死因子- α ;缺氧诱导因子-1 α

中图分类号: R73.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)01-0039-04

严重烧伤早期,体液大量丢失、血容量锐减、全身炎症因子及烧伤毒素刺激心脏,引起心功能降低、心肌结构损伤、心肌细胞凋亡,进一步诱发或加重休克^[1],在无静脉补液条件下,早期给予抗休克维持药物,保护心脏功能,对提高伤员的生存时间和救治率至关重要。伏立诺他(SAHA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACIs),以往研究证实,在脓毒性休克、缺血/再灌注损伤的动物中,SAHA能提高生存率,保护重要脏器功能,但具体机制仍不明确^[2-4]。为此,本实验通过观察在无静脉补液条件下,伏立诺他对致死性烫伤大鼠生存时间、心肌酶学指标的影响,并探讨其保护心脏功能的相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠60只,购于军事医学科学院实验动物中心,体质量240~260 g,购进后,适应性饲养7d,室温22~25℃,实验前12 h禁食、自由饮水。

1.2 药品和试剂

辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、戊巴比妥钠(SIGMA公司),大鼠TNF- α ELISA检测试剂盒(美国BIO-SOURCE公司),Caspase-3 Assay Kit、Anti-iNOS antibody、Anti-BNIP3 antibody(Abcam公司),HIF-1 alpha Antibody(Novous公司)、小鼠抗大鼠三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 模型制备及分组

2.1.1 模型制备 采用腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉,麻醉满意后剪除背部、腹部毛发,浸泡在

收稿日期: 2021-10-14; 修回日期: 2021-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81471872);承德市科学技术研究与发展计划项目(201904A106)

作者简介: 孟祥熙(1986-),男,承德医学院附属医院烧伤整形科主治医师。

通讯作者: 孙奎,主任医师,E-mail:sunkui317@sohu.com 承德医学院附属医院烧伤整形科,067000

100℃沸水中,腹部8 s、背部15 s,造成50% TBSA III° 烫伤;假烫组采用37℃水浴浸泡。

2.1.2 实验分组与处理 指标检测组24只大鼠随机分为三组($n=8$):①假烫组:采用37℃水浴,浸泡后腹腔内注射0.25 mL NS;②烫伤组:伤后腹腔内注射0.25 mL NS;③SAHA组:伤后腹腔内注射SAHA(7.5 mg/kg,溶于0.25 mL 0.9% NS)。生存时间观察组随机分为假烫组($n=4$)、烫伤组($n=16$)、SAHA组($n=16$)处理方法同前。

2.2 指标检测

全自动生化分析仪测定血浆CK-MB水平;TNF- α 含量、caspase-3活性检测根据试剂盒具体步骤测定;采用伊文思兰(evans blue, EB)法检测大鼠心脏组织微血管通透性;Western Blot法测定心肌组织中HIF-1 α 、iNOS、BNIP3蛋白表达量:取心脏组织,提取样本蛋白,采用BCA法测定总蛋白浓度,上样后进行SDS-PAGE分析,将目标蛋白转移至PVDF膜,加入一抗HIF-1 α (1:2000)、iNOS(1:400)、BNIP3(1:100),4℃孵育过夜,加入相应的二抗,孵育1 h后,ECL发光后得到胶片。用图像分析软件Bio-Rad Quantity One software进行半定量分析。

3 统计学方法

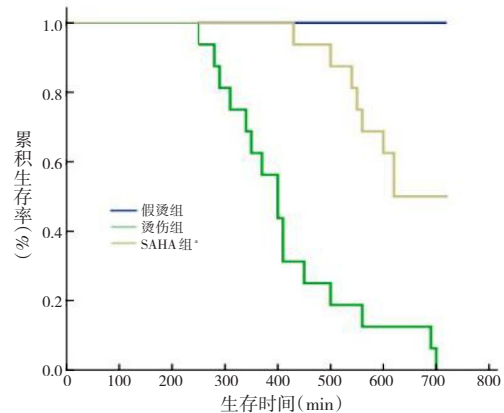
使用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,所有数据均显示为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),组间两两比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析检验;各组大鼠生存率采用时序检验,根据Kaplan-Meier生存分析绘制生存率。检验水准为

$\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

4 结果

4.1 SAHA对大鼠生存时间的影响(见图1)

烫伤组大鼠伤后平均死亡时间为(419.4 \pm 33.6)min,并且在12 h内全部死亡,而给予SAHA治疗后,12 h生存率能达到50%,较烫伤组明显提高($P < 0.05$)。



注:SAHA为伏立诺他;与烫伤组比较,^a $P < 0.05$

图1 Kaplan-Meier生存曲线

4.2 CK-MB、血管通透性、TNF- α 、caspase-3活性的变化(见表1)

与假烫组比较,烫伤组伤后CK-MB水平、血管通透性、TNF- α 水平及caspase-3活性明显升高(均 $P < 0.05$),而给予SAHA治疗后,CK-MB水平明显降低,血管通透性明显增加,TNF- α 水平及caspase-3活性明显下降,与烫伤组比较差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表1 伤后6 h各组CK-MB、血管通透性、TNF- α 变化($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CK-MB(U/L)	血管通透性($\mu\text{g/g}$)	TNF- α (pg/mL)	caspase-3活性($\mu\text{mol/mg}$)
假烫组	8	585.6 \pm 46.1	16.85 \pm 2.42	132.2 \pm 17.8	0.435 \pm 0.041
烫伤组	8	5418.7 \pm 292.9 ^a	27.37 \pm 2.58 ^a	792.6 \pm 34.6 ^a	0.912 \pm 0.063 ^a
SAHA组	8	3475.3 \pm 187.5 ^{ab}	21.56 \pm 1.98 ^{ab}	392.4 \pm 22.9 ^{ab}	0.535 \pm 0.034 ^{ab}
F		1969.91	15.31	1915.75	33.39
P		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

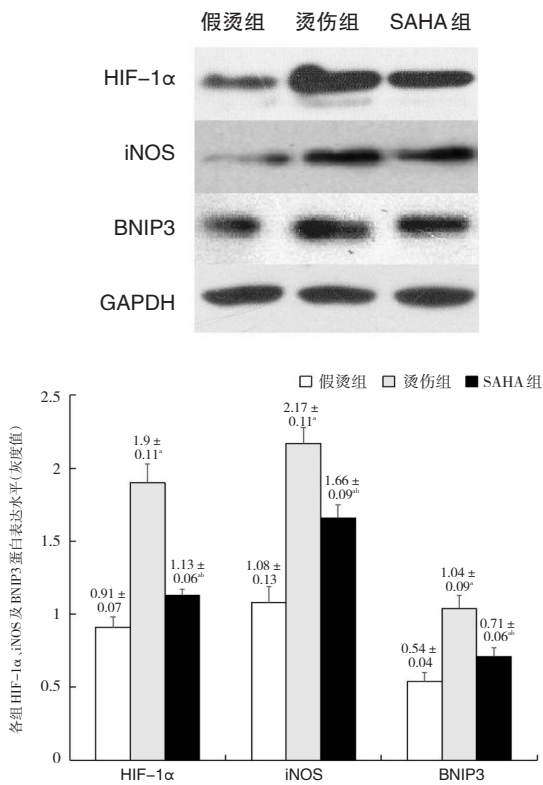
注:与假烫组比较:^a $P < 0.05$;与烫伤组比较:^b $P < 0.05$

4.3 心肌组织内HIF-1 α 、iNOS及BNIP3蛋白表达水平的变化(见图2)

烫伤组伤后HIF-1 α 、iNOS及BNIP3蛋白表达水平较假烫组明显升高(均 $P < 0.05$),而给予SAHA处理后,HIF-1 α 、iNOS及BNIP3蛋白表达水平显著低于烫伤组(均 $P < 0.05$)(见图2)。

5 讨论

大面积重度烧伤后,皮肤屏障受损,大量组织液外渗,有效循环血量锐减,心脏血液灌注减少,导致心肌缺血缺氧,烧伤早期即出现心肌细胞凋亡、结构损害和功能减退^[5,6]。同时伴有大量炎症因子



注:与假烫组比较:^a $P < 0.05$;与烫伤组比较:^b $P < 0.05$

图2 心肌组织内 HIF-1α, iNOS 及 BNIP3 蛋白表达水平变化

的释放、积聚,进一步损伤和抑制心脏功能,从而加重机体缺血缺氧性损害,损伤重要脏器功能,增加病死率和救治难度。因此,烧伤早期心脏功能的保护尤为重要。在灾难、现代战争及突发事件中,短时间出现大量严重烧伤伤员,由于条件受限,及时有效的静脉液体复苏难以实现,如果在伤后早期给予药物干预,提高伤员对烧伤休克的耐受能力,维持血流动力学稳定,保护心脏等重要脏器功能,对伤员后续救治、提高生存率有重大意义^[7]。

SAHA 是一种人工合成的异羟肟酸类 HDACIs,对多种亚型组蛋白去乙酰化酶有抑制作用,目前主要应用于抗肿瘤治疗^[8]。当机体在创伤、缺血、缺氧状态下,组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰化酶平衡被打破,HDACIs 对维持这种情况下乙酰化平衡、维持细胞正常功能有重要作用^[9-12]。本实验室前期研究证实,伏立诺他能保护严重烫伤大鼠重要脏器功能,改善脏器血流量,但具体机制仍不明确。通过建立 50%TBSA III° 烫伤大鼠模型,观察 SAHA 对致死性烫伤大鼠生存率及心脏功能的影响,并研究其具体机制。本实验中,伤后 12 h,烫伤组大鼠全部死亡,而 SAHA 组生存率能达到 50%,说明 SAHA 能延长致死性烫伤大鼠存活时间;烫伤组伤后 CK-

MB 水平、心脏组织血管通透性较假烫组明显升高,而给予 SAHA 治疗后,CK-MB 水平、心脏组织血管通透性较烫伤组明显降低,说明 SAHA 能保护致死性烫伤大鼠心脏功能,降低心脏血管通透性。

严重烧伤后由于创面坏死组织存留、刺激,大量炎症反应介质和细胞因子生成,其中 TNF-α 作为重要的促炎性因子,在严重炎症连锁反应中发挥重要的促进作用^[13],同时能抑制心肌收缩,诱导心肌细胞凋亡,损害心脏功能^[14]。本实验研究发现,烫伤组伤后血浆内 TNF-α 水平较假烫组明显升高,给予 SAHA 处理后,血浆内 TNF-α 水平明显降低,说明 SAHA 在致死性烫伤大鼠的救治中,能降低血浆内 TNF-α 水平,抑制炎症反应,保护心脏功能。

HIF-1α 是一种氧敏感的转录激活因子,诱导细胞或组织中由于低氧/缺氧导致的细胞增殖、血管生成、铁代谢、葡萄糖代谢等一系列基因转录^[15],在缺血缺氧情况下,HIF-1α 过度表达,心肌收缩功能减退,心肌细胞凋亡甚至坏死,心肌细胞能量代谢障碍,影响心脏功能^[16-18];iNOS、BNIP3 作为 HIF-1α 信号通路下游基因,在心脏或肺脏缺血再灌注损伤中,脏器组织中 HIF-1α 蛋白水平升高,同时伴有 iNOS、BNIP3 表达增加^[19,20];心肌缺血/再灌注损伤过程中,iNOS 表达增加,加重心肌损伤,损害心脏功能^[21]。BNIP3 作为一种促凋亡基因,它与 Bcl-2 和 Bcl-XL 相互作用诱导细胞凋亡,在心肌缺血缺氧过程中,诱导心肌细胞凋亡^[22]。caspase-3 是细胞凋亡的重要标志,caspase-3 活性升高反应细胞凋亡增加。本实验中,在大鼠发生 50%TBSA III° 烫伤时,心肌组织内 caspase-3 活性明显升高,HIF-1α 及其下游靶基因 iNOS、BNIP3 蛋白表达水平明显升高,经 SAHA 处理后 caspase-3 活性较烫伤组明显降低,HIF-1α、iNOS、BNIP3 蛋白表达水平明显下降,表明 SAHA 可能通过抑制 HIF-1α 及其下游靶基因 iNOS、BNIP3 蛋白表达水平,抑制心肌细胞凋亡,保护大鼠心脏功能,延长其存活时间。

综上所述,50%TBSA III° 烫伤大鼠伤后在无静脉补液条件下,伤后即刻给予 SAHA 处理,能延长其存活时间,保护心脏功能,降低心脏血管通透性,抑制心肌细胞凋亡,其作用机制可能是通过抑制全身炎症反应,减少 HIF-1α 及其下游靶基因 iNOS、BNIP3 蛋白表达有关。

参考文献

- [1]黄跃生.严重烧伤早期心肌损害机制及临床意义的再认识[J].中华烧伤杂志,2016;32(5):257-259

- [2]Yang J, He J, Ismail M, et al. HDAC inhibition induces autophagy and mitochondrial biogenesis to maintain mitochondrial homeostasis during cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2019; **130**(2): 36-48
- [3]Zhao T, Li Y, Liu B, et al. Novel pharmacological treatment attenuates septic shock and improves long-term survival[J]. Surgery, 2013; **154**(2): 206-213
- [4]Li W, Gao X, Liu W, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid alleviates acute lung injury induced by severe hemorrhagic shock and resuscitation in rats[J]. Shock, 2020; **54**(4): 474-481
- [5]黄跃生. 严重烧伤早期心肌损害机制及临床意义的再认识[J]. 中华烧伤杂志, 2016; **32**(5): 257-259
- [6]Guillory AN, Clayton RP, Herndon DN, et al. Cardiovascular dysfunction following burn injury: what we have learned from rat and mouse models[J]. Int J Mol Sci, 2016; **17**(1): 53
- [7]肖荣, 黄跃生, 林国安, 等. 心力扶持对大面积烧伤患者休克延迟复苏的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2018; **34**(1): 8-13
- [8]Li Y, Alam HB. Modulation of acetylation: creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype in lethal hemorrhagic and septic shock[J]. J Biomed Biotechnol, 2011; **20**(11): e523481
- [9]Williams AM, Denny IS, Bhatti UF, et al. Histone deacetylase inhibitors: a novel strategy in trauma and sepsis[J]. Shock, 2019; **52**(3): 300-306
- [10]孟祥熙, 温海玲, 郑金光, 等. 伏立诺他对严重烫伤大鼠心脏的保护作用[J]. 武警医学, 2021; **32**(02): 119-122
- [11]郑金光, 胡森, 李芳菲, 等. 伏立诺他对50% TBSA III度烫伤大鼠脏器功能及血流量的影响[J]. 感染、炎症、修复, 2014; **34**(4): 195-198
- [12]童斌, 白晓东, 王婧婧, 等. 伏立诺他对烫伤大鼠小肠屏障功能保护作用的研究[J]. 感染、炎症、修复, 2014; **15**(01): 23-26
- [13]Tsurumi A, Que YA, Ryan CM, et al. TNF- α /IL-10 ratio correlates with burn severity and may serve as a risk predictor of increased susceptibility to infections[J]. Front Public Health, 2016; **6**(4): 216
- [14]Liu L, Li X, Yang J, et al. Comparison of systemic inflammation response and vital organ damage induced by severe burns in different area[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015; **8**(6): 6367-6376
- [15]Zhang Z, Yao L, Yang J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) [J]. Mol Med Rep, 2018; **18**(4): 3547-3554
- [16]Wu L, Chen Y. Effect of HIF-1 α /miR-10b-5p/PTEN on hypoxia-Induced cardiomyocyte apoptosis[J]. J Am Heart Assoc, 2019; **8**(18): e011948
- [17]He C, Zhang W, Li S, et al. Edaravone improves septic cardiac function by inducing an HIF-1 α /HO-1 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018; **20**(18): e5216383
- [18]Warbrick I, Rabkin SW. Hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) as a factor mediating the relationship between obesity and heart failure with preserved ejection fraction[J]. Obes Rev, 2019; **20**(5): 701-712
- [19]Jin Y, Zhao X, Zhang H, et al. Modulatory effect of silymarin on pulmonary vascular dysfunction through HIF-1 α -iNOS following rat lung ischemia-reperfusion injury[J]. Exp Ther Med, 2016; **12**(2): 1135-1140
- [20]Zhu N, Li J, Li Y, et al. Berberine protects against simulated ischemia/reperfusion injury-induced H9C2 cardiomyocytes apoptosis in vitro and myocardial ischemia[J]. Front Pharmacol, 2020; **11**(5): 367
- [21]Yu X, Ge L, Niu L, et al. The dual role of inducible nitric oxide synthase in myocardial ischemia [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018; **20**(18): e8364848
- [22]Hong YD, Bin L, Yong FS, et al. MicroRNA-210 alleviates oxidative stress-associated cardiomyocyte apoptosis by regulating BNIP3 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017; **81**(9): 1712-1720

(上接第38页)

- [7]蔡俊, 卫菁, 纪立伟. 误用超大剂量甘精胰岛素注射液致低血糖[J]. 药物不良反应杂志, 2019; **05**(06): 461-462
- [8]殷悦轩, 刘子琦, 韩艳丽, 等. 华法林致肺、消化道出血1例[J]. 安徽医药, 2020; **24**(09): 1900-1904
- [9]罗太敏, 陈露露, 尹美慧, 等. 828例用药错误分析及防范策略[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020; **20**(06): 742-745
- [10]Tilyard M, Dovey S, Hall K. Avoiding and fixing medical errors in general practice: prevention strategies reported in the linnaeus collaboration's primary care international study of medical errors[J]. The New Zealand Medical Journal, 2005; **11**(8): 1208
- [11]Cinzia M, Laura M, Laura S. Building a safer health system[J]. Italian Journal of Public Health, 2004; **2**(06): 3-4
- [12]吴晓玲, 赵志刚, 于国超. 家庭药师服务标准与路径专家共识[J]. 临床药物治疗杂志, 2018; **16**(07): 1-6
- [13]郝丽宏, 郝耀梅, 任建业. 阳泉市居民用药行为风险KAP调查结果分析及对策[J]. 临床药物治疗杂志, 2019; **17**(05): 62-66