

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.05.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210122.1426.016.html\(2021-01-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210122.1426.016.html(2021-01-25))

丙戊酸钠对 50% TBSA III 度烫伤大鼠心肌细胞凋亡的影响*

孟祥熙¹, 温海玲¹, 吴晓明¹, 胡森^{2△}

(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研究所休克与多器官障碍实验室, 北京 100048)

[摘要] **目的** 研究丙戊酸钠(VPA)对致死性烫伤大鼠心肌细胞凋亡的影响。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠分为 3 组, 假烫组: 采用 37 °C 水浴, 浸泡后腹腔内注射 0.25 mL 生理盐水, 烫伤组: 100 °C 水浴中背部浸泡 15 s, 腹部浸泡 8 s, 烫伤后腹腔内注射 0.25 mL 生理盐水; VPA 组: 烫伤后腹腔注射 VPA 治疗(300 mg/kg, 溶于 0.25 mL 生理盐水)。分别于伤后 3、6 h 两个时间点取腹主动脉血, 测定血浆肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平; 然后处死动物取心肌组织, TUNEL 方法检测心肌细胞凋亡率, Western blot 测定心肌组织内诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达, NO 检测试剂盒测定心肌内 NO 水平, caspase-3 活性试剂盒测定心肌内 caspase-3 活性。**结果** 与假烫组比较, 烫伤组伤后 3 h 和伤后 6 h 组 CK-MB 水平、心肌细胞凋亡率明显上升, caspase-3 活性明显增加, iNOS 表达水平、NO 水平明显增高(均 $P < 0.05$); VPA 组 CK-MB 水平、心肌细胞凋亡率与烫伤组比较明显下降, caspase-3 活性明显降低, iNOS 表达水平、NO 水平明显减少, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 在致死性烫伤大鼠治疗中, VPA 能降低 CK-MB 水平, 减少心肌细胞凋亡, 保护心脏功能, 可能与降低心肌组织内 caspase-3 活性、iNOS 表达水平、NO 水平有关。

[关键词] 烫伤; 丙戊酸; 肌细胞; 心脏; 细胞凋亡; 大鼠, Sprague-Dawley**[中图分类号]** R644**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)05-0732-05

The effect of valproic acid sodium on apoptosis of myocardial cells in rats with 50% TBSA III° scald injury*

MENG Xiangxi¹, WEN Hailing¹, WU Xiaoming¹, HU Sen^{2△}

(1. Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Chengde

Medical University, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Laboratory of Shock and Multiple Organ Disorders, Institute of Burns, Fourth Medical Center, PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of valproic acid sodium(VPA) on apoptosis of myocardial cells in rats with fatal scald. **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, the sham scald group (used 37 °C water bath, intraperitoneal injection of 0.25 mL of normal saline), the scald group (100 °C water bath soaked the back for 15 s, the abdomen soaked for 8 s, intraperitoneal injection of 0.25 mL normal of saline after scald), the VPA group[VPA treatment (300 mg/kg, dissolved in 0.25 mL of normal saline) after scald]. Abdominal aortic blood was taken at 3 and 6 h after injury, and the plasma creatine kinase isoenzyme (CK-MB) level was measured; then the animals were sacrificed to take myocardial tissue, and TUNEL method was used to detect the apoptosis rate of myocardial cells, the expression of iNOS protein in the myocardial tissue was measured by Western blot, the NO level in the myocardium was measured by the NO detection kit, and the caspase-3 activity in the myocardium was measured by the caspase-3 activity kit. **Results** Compared with the sham scald group, the CK-MB level and myocardial cell apoptosis rate in the scald group were significantly increased at 3 h and 6 h after the injury, the activity of caspase-3 was significantly increased, and the expression level of iNOS protein and NO level were significantly increased, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). While the CK-MB level and myocardial cell apoptosis rate in the VPA group were significantly lower than those in the scald group, caspase-3 activity was significantly reduced,

iNOS protein expression level and NO level were significantly reduced when compared with the scald group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** In the treatment of fatal scalded rats, VPA can reduce the level of CK-MB and the apoptosis of myocardial cells, and protect the heart function, which may be related to the reduce of caspase-3 activity, iNOS protein expression level and NO level in myocardial tissue.

[Key words] scald; valproic acid; myocytes, cardiac; apoptosis; rats, Sprague-dawley

严重烧伤后,有效循环血量减少,组织缺血缺氧,引起心肌损伤、心功能降低、循环功能降低,心肌损害程度与心肌细胞凋亡、炎症反应等密切相关,烧伤早期对心脏功能的保护、提高心肌细胞对缺血缺氧的耐受尤为重要,为后续治疗争取时间^[1-3]。以往研究显示丙戊酸钠(VPA)能保护失血性休克或致死性烫伤大鼠心肌功能,改善心肌能量代谢,提高生存率,但具体机制仍不明确^[4-7]。为此,本实验通过观察 VPA 对 50%体表总面积(TBSA)Ⅲ度烫伤大鼠心肌酶指标、心肌细胞凋亡情况及心肌组织内 caspase-3 活性、一氧化氮合酶(iNOS)表达水平、NO 水平的影响,为 VPA 在严重烧伤早期保护心脏功能研究方面提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠,60~70 d 龄,体重 240~260 g,购进后适应性饲养 1 周以上,室温维持在 22~25 °C,自由饮食。实验前 12 h 禁食、自由饮水。

1.2 药品和试剂

VPA、戊巴比妥钠、caspase-3 活性检测试剂盒(Assay Kit)购自美国 Sigma 公司;TUNEL 检测阳性对照制备试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程公司;iNOS 一抗购自美国 Abcam 公司;小鼠抗大鼠三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法

48 只雄性 SD 大鼠,戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉,剪除背部和腹部的毛发,将大鼠放置在预制模板的矩形开口,露出裸露皮肤,同时保护剩余皮肤。分为 3 组($n=16$), (1)假烫组:于 37 °C 水浴中背部浸泡 15 s,腹部浸泡 8 s,浸泡后腹腔内注射 0.25 mL 生理盐水; (2)烫伤组:于 100 °C 水浴中背部浸泡 15 s、腹部浸泡 8 s 烫伤后,腹腔内注射 0.25 mL 生理盐水; (3) VPA 组:烫伤后腹腔给予 VPA 治疗(300 mg/kg,溶于 0.25 mL 0.9%生理盐水)。

1.4 指标检测

烫伤后 3、6 h 行腹主动脉穿刺,取血标本;然后处死大鼠,胸正中线剖开取心肌组织。

1.4.1 磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平检测

血标本离心后取血浆,全自动生化分析仪测定血浆 CK-MB 水平。

1.4.2 心肌细胞凋亡率

TUNEL 方法检测凋亡心肌细胞,其原理为荧光素标记的脱氧尿嘧啶核苷酸三磷酸(dUTP)在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT Enzyme)的作用下,可以连接到凋亡细胞中断裂 DNA 的 3'-OH 末端,在荧光显微镜下荧光增强。随机选取心肌组织区域中 5 个非重叠 400 高倍镜视野,计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,心肌细胞凋亡率=凋亡心肌细胞数/心肌细胞总数 $\times 100\%$

1.4.3 caspase-3 活性检测

caspase-3 可以催化底物 DEVD-p-NA 产生黄色的 p-NA,从而可以通过测定吸光度来检测 caspase-3 的活性;按照试剂盒说明书进行操作,405 nm 处读取各管吸光度(A)值,观察 caspase-3 活性。

1.4.4 NO 水平检测

NO 化学性质活泼,遇氧和水生成硝酸盐(NO_3^-)和亚硝酸盐(NO_2^-),后两者遇显色剂生成淡红色偶氮化合物,通过比色可间接检测 NO 水平。按照试剂盒说明书进行操作混匀后,550 nm 处测各管 A 值,根据公式计算组织 NO 水平($\mu\text{mol/gprot}$)。

1.4.5 iNOS 表达水平

称取 100 mg 大鼠心肌组织,加入 1 mL RIPA 裂解液匀浆,于冰上静置 20 min 后 12 000 $\times g$ 离心 20 min,吸取上清液并用 BCA 法进行蛋白浓度测定。行常规十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜,5%脱脂奶粉封闭 60 min 后分别加入相应一抗:内参蛋白小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(1:5 000),兔抗大鼠 iNOS 抗体(1:400),4 °C 孵育过夜;TBST 洗 3 次,每次 15 min,然后分别加入相应二抗(1:5 000),室温孵育 30 min;TBST 洗 3 次,每天 15 min,用超敏 ECL 化学发光液发光、曝光、显影、定影,用 Image J 软件分析条带灰度。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多组间比较的方差分析及组间两两比较的 SNK 法进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CK-MB 水平

与假烫组比较,烫伤组伤后 3、6 h CK-MB 水平显著升高(均 $P < 0.05$),而 VPA 组 CK-MB 水平较烫伤

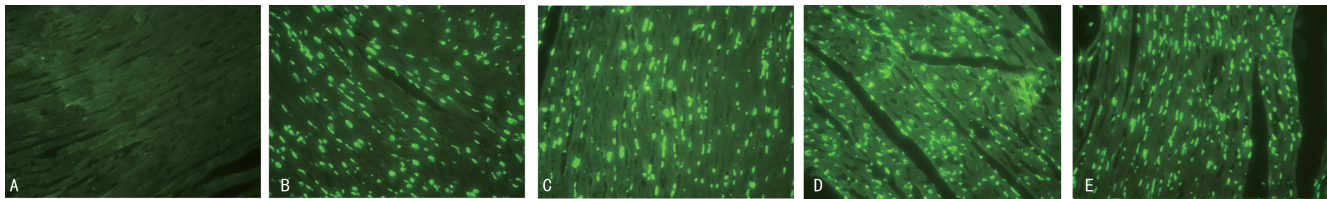
组显著降低(均 $P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组血浆中 CK-MB 水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 h	6 h
假烫组	582.3 ± 35.2	585.6 ± 46.1
烫伤组	2 552.9 ± 145.3 ^a	5 418.7 ± 292.9 ^a
VPA 组	2 042.4 ± 157.2 ^{ab}	3 984.4 ± 162.8 ^{ab}
F	1 505.584	2 128.814
P	0.000	0.000

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

2.2 TUNEL 染色结果及心肌细胞凋亡率



A:假烫组;B:烫伤组 3 h;C:VPA 组 3 h;D:烫伤组 6 h;E:VPA 组 6 h。

图 1 各组心肌组织 TUNEL 染色结果($\times 400$)

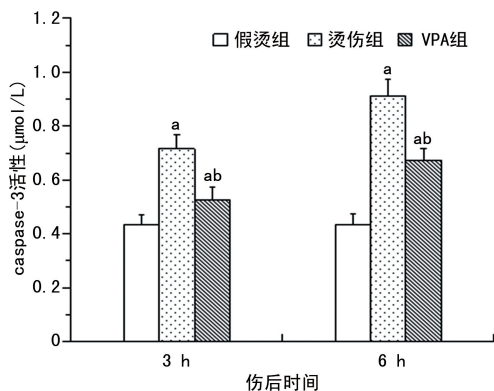
表 2 各组心肌细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, \%, n=8$)

组别	3 h	6 h
假烫组	0.50 ± 0.05	0.60 ± 0.08
烫伤组	16.10 ± 0.80 ^a	21.50 ± 1.20 ^a
VPA 组	14.30 ± 0.70 ^{ab}	18.80 ± 0.90 ^{ab}
F	2 035.855	1 942.721
P	0.000	0.000

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

2.3 心肌组织 caspase-3 活性

伤后 3、6 h,烫伤组 caspase-3 活性(0.716 ± 0.052、0.912 ± 0.063)显著高于假烫组(0.435 ± 0.034),组间比较差异有统计学意义($t = 15.167, P = 0.036; t = 23.734, P = 0.011$);而 VPA 组 caspase-3 活性(0.527 ± 0.046、0.672 ± 0.047)均显著低于烫伤组($t = -10.245, P = 0.036; t = -11.689, P = 0.032$)。见图 2。



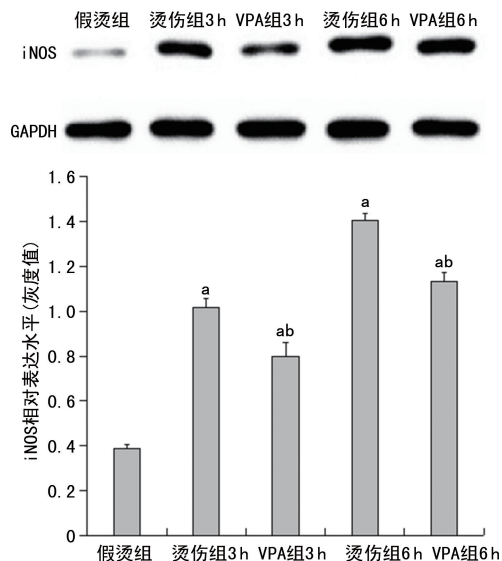
^a: $P < 0.05$,与假烫组比较; ^b: $P < 0.05$,与烫伤组比较。

图 2 各组心肌组织内 caspase-3 活性分析

烫伤组大鼠心肌细胞出现凋亡,肌间隙出现水肿、增宽,肌纤维排列紊乱、断裂,随时间增加心肌损伤逐渐加重;而 VPA 组的病理变化较烫伤组明显减轻,心肌细胞凋亡数量明显减少,肌纤维排列整齐,VPA 抑制了心肌细胞凋亡,保护了心肌结构及功能,见图 1。烫伤组伤后 3、6 h 心肌细胞凋亡率显著高于假烫组(均 $P < 0.05$),且伤后时间越长,心肌细胞凋亡率越高,而 VPA 处理后心肌细胞凋亡率较烫伤组各时间点明显降低(均 $P < 0.05$)。见表 2。

2.4 心肌组织 iNOS 相对表达水平

假烫组心肌内 iNOS 少量表达(0.38 ± 0.02),烫伤组伤后 3、6 h 心肌组织内 iNOS 相对表达水平明显增加(1.02 ± 0.05、1.41 ± 0.06),较假烫组显著升高($t = 45.255, P = 0.019; t = 55.906, P = 0.004$),组间比较差异有统计学意义;而 VPA 组 iNOS 相对表达水平显著降低(0.80 ± 0.07、1.13 ± 0.03),与烫伤组比较差异有统计学意义($t = -8.312, P = 0.001; t = -14.033, P = 0.024$)。见图 3。



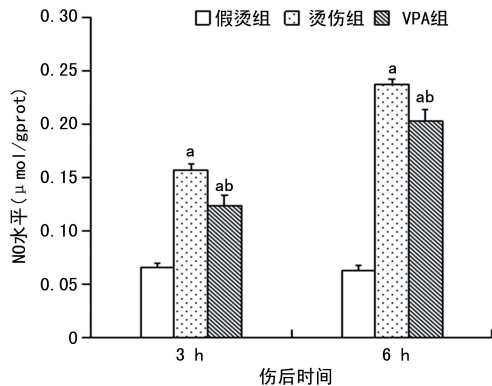
^a: $P < 0.05$,与假烫组比较; ^b: $P < 0.05$,与烫伤组对应时间点比较。

图 3 各组心肌组织内 iNOS 蛋白表达水平

2.5 心肌组织 NO 水平

与假烫组比较(0.065 ± 0.005),烫伤组伤后 3、6 h 心肌组织内 NO 水平(0.157 ± 0.005、0.237 ±

0.007)显著增加,组间比较差异有统计学意义($t = 43.718, P = 0.010; t = 71.070, P = 0.000$);而 VPA 治疗后 NO 水平($0.123 \pm 0.010; 0.203 \pm 0.005$)较烫伤组均显著降低($t = -9.874, P = 0.008; t = -13.410, P = 0.005$)。见图 4。



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

图 4 各组心肌组织内 NO 水平

3 讨 论

严重血容量丢失、烧/烫伤后,组织及各脏器灌注不足,极易引起心肌细胞的损伤或凋亡^[8-10],在伤员不能及时得到救治的情况下,如果给予抗休克维持药物提高伤员对休克的耐受能力,保护休克状态下的组织细胞,维持生命脏器的功能,就能为后继治疗争取时间,提高生存率。心脏功能的维持及保护,在休克救治过程中尤为重要,如何利用休克维持药物提高心肌细胞对缺血缺氧的耐受能力、抑制心肌细胞凋亡,成为近年来研究热点。

VPA 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,近年研究发现,组蛋白去乙酰化酶抑制剂具有细胞保护、抗氧化、抗炎等作用^[11-14]。LUO 等^[15]通过大鼠致死性烫伤模型,证实 VPA 能增加心脏和大脑中组蛋白 H3 乙酰化水平,抑制 caspase-3 活性,保护心脏和大脑功能,提高生存率^[15]。本实验通过建立 50% TBSA Ⅲ度烫伤大鼠模型,研究 VPA 对心肌细胞凋亡的影响。心脏是维持生命的重要器官,在严重烧伤中心脏功能最易受到影响,心肌细胞出现凋亡,心脏功能降低。本实验研究表明,在大鼠致死性烫伤后,血浆 CK-MB、心肌细胞凋亡率显著升高,VPA 治疗后,血浆 CK-MB 水平明显下降,心肌细胞凋亡率明显降低,证明 VPA 能保护致死性烫伤大鼠心脏功能,抑制心肌细胞凋亡。

严重烫伤后,心肌细胞缺血缺氧,早期心肌出现功能损伤,心肌不断丢失,严重烫伤早期心功能的损伤与心肌细胞的凋亡有关。caspase-3 是重要的促凋亡因子,参与心肌细胞凋亡,活化后发挥凋亡执行因子的作用,标志着细胞凋亡进入不可逆的阶段^[16],iN-

OS 在心肌细胞缺血缺氧时表达显著增加,促进 NO 合成增加,心肌组织内 NO 的高水平会通过激活 MAPK 通路、c-jun 通路等多种凋亡通路诱导心肌细胞凋亡、影响心脏功能^[17-18],对心肌组织中 caspase-3 活性、iNOS 的表达及 NO 水平的检测,能反映心肌细胞的凋亡情况。研究表明,在伤后心肌组织内 caspase-3 活性及 iNOS、NO 水平显著升高,给予 VPA 治疗后,caspase-3 活性水平及 iNOS、NO 水平显著降低,因此 VPA 能降低致死性烫伤大鼠心肌组织内 caspase-3 活性及 NO 水平,抑制心肌细胞凋亡,保护心脏功能。

综上所述,本实验通过 VPA 对 50% TBSA Ⅲ度烫伤大鼠心脏功能及心肌细胞凋亡影响的研究,证实 VPA 能保护致死性烫伤大鼠心脏功能,降低心肌细胞凋亡率,其作用机制可能是通过降低心肌组织内 caspase-3 活性、iNOS 表达及 NO 水平,从而抑制心肌细胞凋亡来实现的。

参考文献

- [1] BARROW R E, JESCHKE M G, HERNDON D N. Early fluid resuscitation improves outcomes in severely burned children[J]. Resuscitation, 2000, 45(2): 91-96.
- [2] 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.
- [3] 黄跃生. 血管和心脏因素在烧伤休克发生中的作用机制及休克防治[J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(2): 109-112.
- [4] 罗红敏, 胡森, 白慧颖, 等, 盛志勇. 丙戊酸钠对致死性烫伤大鼠心肌的保护作用及机制研究[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(8): 563-566.
- [5] WANG C, WANG Y, QIAO Z, et al. Valproic acid-mediated myocardial protection of acute hemorrhagic rat via the BCL-2 pathway[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2016, 80(5): 812-818.
- [6] KUAI Q, WANG C, WANG Y, et al. Energy metabolism regulated by HDAC inhibitor attenuates cardiac injury in hemorrhagic rat model[J]. Sci Rep, 2016, 6: 38219.
- [7] 白慧颖, 周国勇, 张立俭, 等. 丙戊酸钠对重症烫伤大鼠心肌保护作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(2): 130-132.
- [8] TERINGOVA E, TOUSEK P. Apoptosis in is-

- chemic heart disease[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1):87.
- [9] WILLIAMS F N, HERNDON D N, SUMAN O E, et al. Changes in cardiac physiology after severe burn injury[J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32: 269-274.
- [10] 谢锋, 柴家科, 胡泉, 等. 烧冲复合伤大鼠心肌损伤及钙蛋白酶的变化规律[J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(46):3652-3657.
- [11] WILLIAMS A M, BHATTI U F, BIESTERVELD B E, et al. Valproic acid improves survival and decreases resuscitation requirements in a swine model of prolonged damage control resuscitation[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2019, 87(2):393-401.
- [12] ROGER T, LUGRIN J, ROY D, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection[J]. *Blood*, 2011, 117(4):1205-1217.
- [13] TIAN S, LEI I, GAO W, et al. HDAC inhibitor valproic acid protects heart function through Foxm1 pathway after acute myocardial infarction[J]. *EBio Medicine*, 2019, 39:83-94.
- [14] 罗红敏, 胡森, 卞徽宁, 等. 丙戊酸钠对严重烫伤后肠屏障功能的保护作用及机制[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(3):221-228.
- [15] LUO H M, HU S, BAI H Y, et al. Valproic acid treatment attenuates caspase-3 activation and improves survival after lethal burn injury in a rodent model[J]. *J Burn Care Res*, 2014, 35(2):e93-98.
- [16] WEN X R, FU Y Y, LIU H Z, et al. Neuroprotection of sevoflurane against ischemia/reperfusion-induced brain injury through inhibiting JNK3/caspase-3 by enhancing Akt signaling pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(3):1661-1671.
- [17] BOYD C S, CADENAS E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis[J]. *Biol Chem*, 2002, 383(3/4):411-423.
- [18] GUO Y, YOU Y, LV D, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to insulin resistance and cardiac dysfunction after burn injury in mice[J]. *Life Sci*, 2019, 239:116912.

(收稿日期:2020-10-19 修回日期:2020-12-02)

(上接第 731 页)

- [11] ZHANG J, WANG C, TANG Y, et al. Serum immunoglobulin A/C3 ratio predicts progression of immunoglobulin A nephropathy[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2013, 18(2):125-131.
- [12] KOMATSU H, FUJIMOTO S, HARA S, et al. Relationship between serum IgA/C3 ratio and progression of IgA nephropathy[J]. *Intern Med*, 2004, 43(11):1023-1028.
- [13] MIZERSKA-WASIAK M, MAŁDYK J, TURCZYN A, et al. Predictors of progression in IgA nephropathy in childhood[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 955:65-73.
- [14] KARDAR G, ORAEI M, SHAHSAVANI M, et al. Reference intervals for serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM and complements C3 and C4 in iranian healthy children[J]. *Iran J Public Health*, 2012, 41(7):59-63.
- [15] GONG W Y, LIU M, LUO D, et al. High serum IgA/C3 ratio better predicts a diagnosis of IgA nephropathy among primary glomerular nephropathy patients with proteinuria ≤ 1 g/d: an observational cross-sectional study[J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1):150.
- [16] 南京柱, 李娟, 高静, 等. 生化及免疫指标在 IgA 肾病 Lee 氏分级中的应用价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(9):695-700.

(收稿日期:2020-10-11 修回日期:2020-12-15)