

网络出版时间: 2016-8-1 14:07 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160801.1407.014.html

## 依那普利拉对严重烧伤大鼠心肌损伤的保护作用及其机制探讨

台运成, 余又新, 李登辉, 曹玉立, 王春华, 方林森, 胡德林

**摘要** 目的 探讨应用依那普利拉的早期干预对严重烧伤大鼠心肌损伤的保护作用, 并对其作用机制进行初步研究。方法 66只雌性清洁级SD大鼠, 随机将大鼠分为对照组6只、烧伤组30只、治疗组30只。烧伤组和治疗组分为伤后1、3、6、12、24 h 5个时相点, 每时相点6只大鼠。烧伤组与治疗组大鼠采用热水直接烫伤法制作严重烧伤模型, 伤后予以腹腔注射补液抗休克, 治疗组加用依那普利拉早期干预, 均在伤后各时相点行腹主动脉采血, 留取心脏组织, ELISA法检测血清心肌肌钙蛋白 I (cTn I)、白介素 1 (IL-1)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、血管紧张素 II (Ang II) 水平、心肌 Ang II 水平, 部分心肌组织应用 TUNEL 法检测细胞凋亡情况。结果 烧伤组与治疗组血清 cTnI 水平在伤后各时相点较对照组均有显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 治疗组各时相点血清 cTnI 水平升高幅度均低于烧伤组 ( $P < 0.05$ ); 烧伤组与治疗组血清 IL-1、TNF- $\alpha$  水平各时相点较对照组均有显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 治疗组各时相点血清 IL-1、TNF- $\alpha$  水平升高幅度均低于烧伤组 ( $P < 0.05$ ); 烧伤组心肌匀浆及血清中 Ang II 在伤后显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 治疗组各时相点血清及心肌匀浆中 Ang II 水平升高幅度均低于烧伤组, 其中伤后 1、12 h 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 烧伤后心肌细胞凋亡数量在各个时相点显著增加, 治疗组各个时相点凋亡数量显著少于烧伤组 ( $P < 0.05$ )。结论 严重烧伤大鼠早期即发生心肌损伤, 依那普利拉对烧伤大鼠心肌损伤起保护作用, 其保护作用机制可能与减少烧伤后 IL-1、TNF- $\alpha$ 、Ang II 的释放, 减少心肌细胞凋亡有关。

**关键词** 依那普利拉; 严重烧伤; 心肌损伤; IL-1; TNF- $\alpha$ ; cTnI; Ang II; 细胞凋亡

中图分类号 R 644; R 542.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1263-05

心肌损伤是严重烧伤后的常见并发症, 其发生机制尚未明确, 研究<sup>[1]</sup>表明肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的激活是造成严重烧伤后心肌损伤的重要原因之一。依那普利拉为依

那普利的有效成分, 是一种竞争性血管紧张素转换酶抑制剂, 能阻断血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I) 转换为血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II), 临床上常用来降血压。研究<sup>[2-3]</sup>表明, 依那普利拉对心肌有保护作用, 可能与依那普利拉能改善心室重构, 增加 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、减少 Bax 在心肌细胞中的表达相关, 但机制尚未明确, 且依那普利拉在严重烧伤大鼠心肌损伤的保护、减少心肌细胞凋亡的作用方面研究甚少。该研究通过对严重烧伤大鼠模型使用依那普利拉进行干预, 观察严重烧伤大鼠早期血清心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I)、白介素 1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、心肌匀浆及血清 Ang II 水平、心肌细胞凋亡的数量, 观察依那普利拉对严重烧伤大鼠心肌的保护作用, 以寻找防治严重烧伤心肌损伤的新方法。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 清洁级 SD 大鼠 66 只, 雌性 ( $200 \pm 20$ ) g, 购自安徽医科大学实验动物中心。随机分为 3 组, 对照组、烧伤组和治疗组, 对照组 6 只大鼠, 烧伤组和治疗组分为伤后 1、3、6、12、24 h 共计 5 个时相点, 每时相点 6 只大鼠。

**1.2 烧伤动物模型制作** 烧伤动物模型制作参考相关文献<sup>[4]</sup>, 以 10% 水合氯醛 (0.03 ml/kg) 腹腔注射麻醉后称重, 根据 Meeh-Rubner 公式 [ $A = k \times (W^{2/3}) / 10\,000$ ,  $A$  为体表面积, 以  $m^2$  计算;  $W$  为体重, 以 g 计算;  $k$  为常数] 计算出其 30% 体表面积大小, 背部剃毛, 剃毛区置于 98 °C 水浴中 18 s, 造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤 (病理切片证实)。烫伤后立即给予乳酸钠林格液腹腔注射补液抗休克 [按照 parkland 公式  $4\text{ ml} \times \text{体重 (kg)} \times \text{Ⅱ、Ⅲ度烧伤面积 (\%)}]$  治疗组按 1 mg/kg 将依那普利拉于伤后抗休克液中补入, 对照组不做处理。烧伤后动物分笼饲养, 自由进食、饮水。

## 1.3 观察指标

**1.3.1 ELLSA 法检测大鼠血清中 cTnI、IL-1、TNF- $\alpha$**

2016-06-02 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085SMH231)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院烧伤科, 合肥 230022

作者简介: 台运成, 男, 硕士研究生;

胡德林, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: hdl0522@163.com

水平变化 cTnI、IL-1、TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒购自武汉新启迪生物科技有限公司,操作严格按说明书执行。

1.3.2 ELLSA 法测定心肌匀浆与血清中 Ang II 水平变化 Ang II ELISA 检测试剂盒购自武汉新启迪生物科技有限公司,操作严格按说明书执行。

1.3.3 原位末端标记技术(TUNEL 法)检测心肌细胞凋亡 具体步骤按照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(ROCHE)操作说明,切片内心肌细胞胞核内有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。400 倍光镜下,每组两张玻片,每张玻片随机选择 4 个视野,计算阳性细胞数,心肌细胞凋亡数取其平均数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,同一时相点烧伤组与治疗组两组间样本均数间的比较采用  $t$  检验;同一时相点对照组、烧伤组和治疗组 3 组样本均数间的比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验;同一组内部的不同时相点组间均数变化趋势采用方差分析。

## 2 结果

2.1 烧伤组与治疗组大鼠血清中 cTn I 的水平变化 方差分析显示烧伤组与治疗组大鼠血清 cTn I 水平在伤后各时相点均有显著性升高( $P < 0.01$ ),两组血清 cTn I 在伤后均先升高,于 3 h 达峰值,后呈下降趋势。同一时相点 3 组间方差分析结果显示:与烧伤组比较,治疗组各时相点血清 cTn I 水平升高幅度均低于烧伤组( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 烧伤组与治疗组大鼠血清中 IL-1 及 TNF- $\alpha$  的水平变化 方差分析结果表明,烧伤组与治疗组血清 IL-1、TNF- $\alpha$  水平在伤后各时相点均有显著性升高( $P < 0.01$ ),两组血清 IL-1、TNF- $\alpha$  在伤后均先升高,于 3 h 达峰值,后呈下降趋势。 $t$  检验结果显示,与烧伤组比较,治疗组各时相点血清 IL-1、TNF- $\alpha$  水平升高幅度均低于烧伤组( $P < 0.01$ )。见表 2。

2.3 烧伤组与治疗组大鼠血清及心肌匀浆液中 Ang II 水平变化 方差分析结果表明,烧伤组血清中 Ang II 水平在伤后各时相点均呈显著性升高

表 1 不同时相点烧伤组与治疗组血清中 cTn I 检测结果( $n = 30$ , pg/ml  $\bar{x} \pm s$ )

时间(h)	对照组	烧伤组	治疗组	F 值	P 值	q 值	P* 值
1	50.23 $\pm$ 2.35	565.05 $\pm$ 25.04	443.76 $\pm$ 19.52	1 286.0	<0.01	16.16	<0.05
3	50.23 $\pm$ 2.35	651.91 $\pm$ 22.57	520.69 $\pm$ 25.04	1 578.0	<0.01	16.47	<0.05
6	50.23 $\pm$ 2.35	570.42 $\pm$ 23.50	447.48 $\pm$ 18.57	1 474.0	<0.01	17.36	<0.05
12	50.23 $\pm$ 2.35	507.43 $\pm$ 28.55	380.15 $\pm$ 15.32	949.7	<0.01	16.62	<0.05
24	50.23 $\pm$ 2.35	400.31 $\pm$ 20.70	335.44 $\pm$ 21.42	699.3	<0.01	9.21	<0.05
F 值		88.62	73.46				
P 值		<0.01	<0.01				

P\* 表示方差分析后烧伤组与治疗组比较时 q 统计量对应的概率值

表 2 烧伤后不同时相点大鼠血清中 IL-1、TNF- $\alpha$  组间分布特征( $n = 30$ , pg/ml  $\bar{x} \pm s$ )

指标	伤后时间(h)	烧伤组	治疗组	t 值	P 值
IL-1	1	462.72 $\pm$ 17.47	352.62 $\pm$ 12.82	12.44	<0.01
	3	501.70 $\pm$ 10.01	382.65 $\pm$ 15.60	15.73	<0.01
	6	454.58 $\pm$ 18.22	325.56 $\pm$ 13.63	13.89	<0.01
	12	426.76 $\pm$ 23.00	297.88 $\pm$ 21.39	10.05	<0.01
	24	354.78 $\pm$ 21.65	232.15 $\pm$ 19.08	10.41	<0.01
	F 值	51.76	70.02		
	P 值	<0.01	<0.01		
TNF- $\alpha$	1	392.38 $\pm$ 16.55	319.15 $\pm$ 17.32	7.49	<0.01
	3	422.95 $\pm$ 10.90	356.32 $\pm$ 18.01	7.75	<0.01
	6	368.71 $\pm$ 12.40	300.73 $\pm$ 16.77	7.98	<0.01
	12	309.99 $\pm$ 17.08	244.50 $\pm$ 9.91	8.12	<0.01
	24	223.81 $\pm$ 19.26	170.64 $\pm$ 14.34	5.42	<0.01
	F 值		153.74	130.18	
	P 值		<0.01	<0.01	

( $P < 0.01$ ) ,但烧伤组心肌匀浆中 Ang II 水平在伤后各时相点虽高于对照组 ,但不呈现显著性升高趋势( $P = 0.32$ ) ;治疗组血清和心肌匀浆中 Ang II 水平在伤后各时相点均呈显著性升高( $P < 0.01$ ) 。两组心肌匀浆及血清水平在伤后 3 h 达峰值 ,后呈下降趋势。

除烧伤后 1 h 时相点外 ,治疗组其他时相点血清中 Ang II 水平升高幅度均低于烧伤组 ( $P <$

0.05) ;除烧伤后 1、12 h 时相点外 ,治疗组其他各时相点心肌匀浆中 Ang II 水平升高幅度虽均低于烧伤组 ,但组间比较差异无统计学意义。见表 3。

**2.4 烧伤组与治疗组大鼠心肌细胞凋亡情况** 烧伤后细胞凋亡数量在各时相点显著增加 ,且凋亡数量逐渐增加 ,于 24 h 凋亡数量最多 ,治疗组在各时相点凋亡数量显著少于烧伤组( $P < 0.05$ ) 。见图 1、表 4。

表 3 各组大鼠血清及心肌匀浆液中 Ang II 检测结果( $n = 30$   $\mu\text{g/ml}$   $\bar{x} \pm s$ )

指标	伤后时间( h)	烧伤组	治疗组	$t$ 值	$P$ 值
血清 Ang II					
	1	324.92 $\pm$ 40.28	297.27 $\pm$ 27.69	1.38	0.196 0
	3	461.69 $\pm$ 46.19	375.55 $\pm$ 16.60	4.30	0.001 6
	6	414.32 $\pm$ 30.43	342.80 $\pm$ 17.32	5.00	0.000 5
	12	361.28 $\pm$ 23.70	311.51 $\pm$ 23.21	3.67	0.004 3
	24	337.17 $\pm$ 30.45	280.82 $\pm$ 24.99	3.50	0.005 7
$F$ 值					
$P$ 值		<0.01	<0.01		
心肌 Ang II					
	1	1.83 $\pm$ 0.23	1.52 $\pm$ 0.11	2.98	0.013 8
	3	2.74 $\pm$ 1.15	2.16 $\pm$ 0.31	1.19	0.260 5
	6	2.37 $\pm$ 1.16	2.05 $\pm$ 0.19	0.67	0.520 0
	12	2.24 $\pm$ 0.15	1.93 $\pm$ 0.12	3.95	0.002 7
	24	2.08 $\pm$ 0.20	1.87 $\pm$ 0.12	2.20	0.052 0
$F$ 值		1.24	10.23		
$P$ 值		0.32	<0.01		

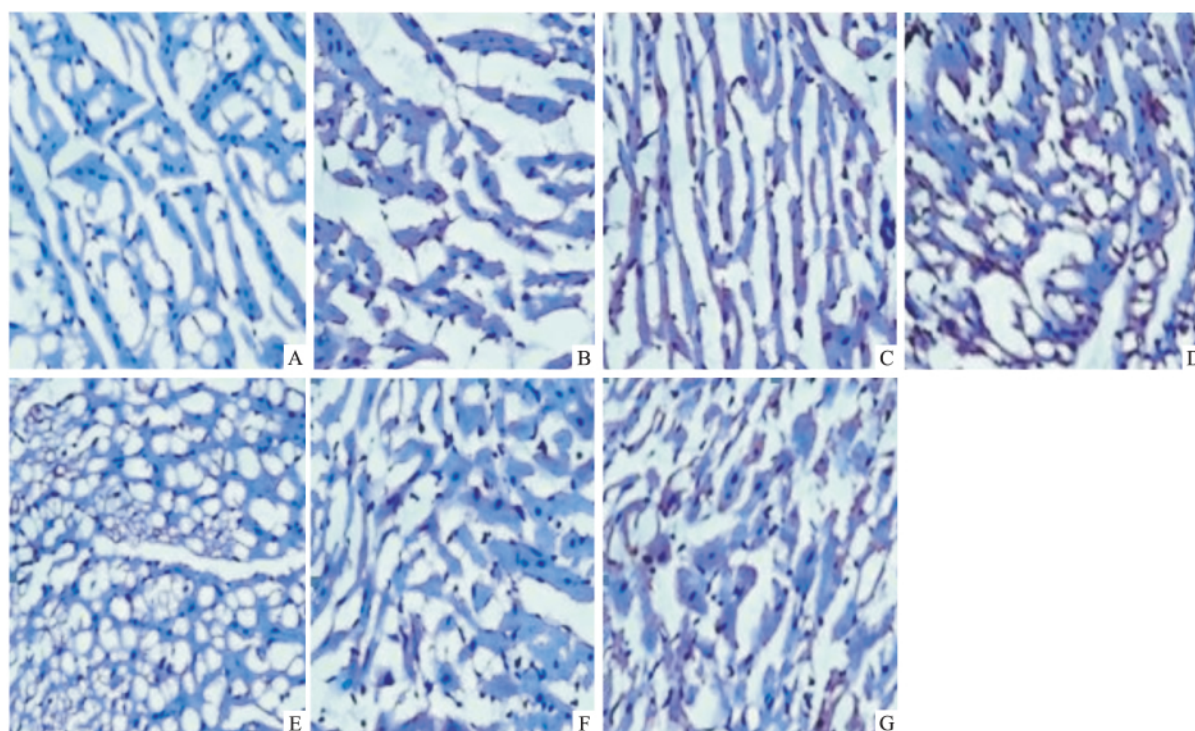


图 1 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡情况  $\times 400$

A: 对照组; B ~ D: 烧伤组 1、6、24 h; E ~ G: 治疗组 1、6、24 h

表4 烧伤组和治疗组大鼠心肌细胞凋亡情况比较( $n=30$   $\bar{x} \pm s$ )

组别	伤后时间(h)					F 值	P 值
	1	3	6	12	24		
烧伤组	0.90 ± 0.27	1.60 ± 0.34	3.80 ± 0.78	6.70 ± 1.79	8.80 ± 2.24	37.50	<0.01
治疗组	0.50 ± 0.13	1.10 ± 0.19	2.30 ± 0.42	4.10 ± 0.91	5.70 ± 1.23	54.01	<0.01
t 值	3.27	3.14	4.45	3.17	2.97		
P 值	0.008	0.010	0.002	0.010	0.014		

### 3 讨论

烧伤后机体心脏早期即发生损伤,尤其在严重烧伤后,损伤更为明显。烧伤后心肌的损伤可引起泵血功能减弱、有效循环血量减少等,并可对其他器官产生影响,其受损则影响重大。因此对烧伤后心肌损伤机制及对烧伤后心脏保护的研究就尤为重要。严重烧伤后心肌损伤的机制尚未完全明了,但主要与烧伤后心肌缺血低氧造成的损害有关。cTn I 是一种心肌调节蛋白,被认为是反映心肌损伤程度高敏感、高特异的“金标准”<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明 cTn I 浓度升高不仅能够提示心肌存在损伤,而且还预示着脓毒症等非心源性疾病的心肌功能障碍及预后。在烧伤早期,心肌细胞发生缺血、低氧等,严重时可导致心肌细胞膜通透性增加、心肌细胞完整性丧失、细胞亚微结构发生改变、心肌内肌钙蛋白发生裂解为较小片段,甚至发生细胞坏死,随之 cTn I 释放入血,循环中 cTn I 浓度升高。实验中烧伤组与治疗组血清 cTn I、IL-1、TNF- $\alpha$  水平及心肌细胞凋亡数量较对照组显著升高,且治疗组明显低于烧伤组,说明严重烧伤时心肌确有损伤,且使用依那普利拉后可以减轻心肌损伤、减少心肌细胞的凋亡,起到了保护心肌的作用。

研究<sup>[7]</sup>表明,由 RAS 系统引起的氧化应激和内皮细胞功能不全是心血管疾病发生的核心。Ang II 作为 RAS 系统中最主要的活性物质,Ang II 通过与其受体 AT-1 结合,可以起到调节血流、促炎等复杂的生物功能<sup>[8]</sup>。可能是严重烧伤后,大量液体的丢失可直接引起心肌的缺血低氧损害;而严重烧伤后机体的应激反应及毒素吸收刺激了炎症细胞因子 IL-1、TNF- $\alpha$  等的大量释放,致失控性炎症反应,进一步引起微循环障碍,加重心肌损伤,这与研究<sup>[9]</sup>结果相近。研究<sup>[1]</sup>表明高水平的 Ang II 可直接引起心肌细胞膜通透性改变,导致心肌细胞坏死与凋亡。Bcl-2 和 Bax 是和细胞凋亡密切相关的基因,Bcl-2 和 Bax 在体内通常以二聚体形式发挥作用,二者蛋

白比例决定细胞存活或死亡,Bcl-2 主要通过抑制细胞凋亡起到保护作用,Bax 基因有直接促进细胞凋亡的功能。实验结果显示机体在烧伤后心肌及血清中 Ang II 水平明显升高,治疗组血清及心肌匀浆中的 Ang II 的表达低于烧伤组,说明在烧伤后机体 RAS 系统被激活,研究<sup>[10]</sup>表明心肌内存在有独立的局部的 RAS 系统,心肌局部 RAS 系统在烧伤后迅速启动,血管紧张素转换酶活性增高,心肌 Ang II 产生增多,从而直接导致心肌损害。依那普利拉作为 ACEI 类药物,是一种竞争性血管紧张素转换酶抑制剂,能阻断 Ang I 转换为 Ang II,减少 Ang II 的释放,改善心肌缺血低氧情况,减少机体氧自由基生成引起生物膜脂质过氧化,减轻能量代谢障碍以及细胞内电解质紊乱。同时依那普利拉能减轻烧伤后机体的应激反应,减少 IL-1、TNF- $\alpha$  等炎症因子的大量释放,而大量炎症因子的释放可能是细胞凋亡的诱导信号,引起了细胞质 Bax 的构象改变,导致 Bax 向线粒体转移形成 Bax 同源二聚体,进一步使得线粒体内外膜开放,释放凋亡诱导因子(AIF)和细胞色素 C(cyc),促进 Caspases 激活和蛋白的水解,引起最终细胞凋亡<sup>[11]</sup>,具体机制尚不清楚。依那普利拉减少烧伤后 IL-1、TNF- $\alpha$ 、Ang II 的释放,减少心肌细胞凋亡,起到了保护心肌的作用,可以为严重烧伤大鼠心肌损伤的保护提供一种方法。

### 参考文献

- [1] 黄跃生. 严重烧伤后早期心肌损害的细胞分子机制与防治策略研究进展[J]. 中华烧伤杂志, 2006, 22(3): 161-3.
- [2] 蔡智荣, 孙 婷, 王仁萍, 等. 依那普利对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及凋亡基因 bcl-2、Bax 的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2005, 21(3): 158-61.
- [3] 张兵钱, 黄跃生, 张家平, 等. 依那普利对严重烫伤大鼠早期心肌损害的防治作用[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(5): 335-8.
- [4] Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease [J]. Am J Cardiol, 2002, 89(2A): 3A-9A, discussion 10A.
- [5] Favory R, Nevriere R. Significance and interpretation of elevated

- troponin in septic patients[J]. *Crit Care* ,2006 ,10(4) : 224.
- [6] Labugger R ,Organ L ,Collier C ,et al. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction[J]. *Circulation* ,2000 ,102( 11) : 1221 – 6.
- [7] Kiarash A ,Pagano P J ,Tayeh M ,et al. Upregulated expression of rat heart intercellular adhesion molecule-1 in angiotensin II-but not phenylephrine-induced hypertension[J]. *Hypertension* ,2001 ,37( 1) : 58 – 65.
- [8] Izumi Y ,Kim S ,Zhan Y ,et al. Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH( 2) -terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats[J]. *Hypertension* ,2000 ,36( 4) : 511 – 6.
- [9] 李登辉 胡德林 李亚南 等. 益赛普对脓毒症大鼠心肌损伤与炎症因子表达的影响[J]. *安徽医科大学学报* ,2015 ,50( 7) : 925 – 8.
- [10] Capers Q ,Alexander R W ,Lou P ,et al. Monocyte chemoattractant protein expression in aortic tissues of hypertensive rats[J]. *Hypertension* ,1997 ,30( 6) : 397 – 402.
- [11] 任闯山 ,王 伟. 凋亡基因 Bax 和 Smac 在胃癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药* ,2008 ,48( 26) : 50 – 1.

## Protective effects and mechanism of enalaprilat on myocardial injury of severely burned rats

Tai Yuncheng ,Yu Youxin ,Li Denghui ,et al

( *Dept of Burns ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022*)

**Abstract Objective** To observe the early situation of myocardial damage in rats ,and explore the protective effect of enalaprilat's early intervention in myocardial damage in severely burned rats and to preliminarily study its mechanism of action by the direct method of burns caused by hot water to build the rat model. **Methods** 66 female SD rats were randomly divided into the control group (  $n = 6$  ) , burn group (  $n = 30$  ) ,and the treatment group (  $n = 30$  ) . Burn and treatment groups were divided into 1 ,3 ,6 ,12 ,24 h time points after injury ,each time point had six rats. The burn and the treatment group rats were taken use of the direct method of burns caused by hot water to build the severely burned model. The rats were given fluid infusion( ip. ) to anti-shock after injury. The treatment group was intervened with enalaprilat. The abdominal aortic blood and heart tissue were taken at each time point. The concentrations of serum cTn I , IL-1 , TNF- $\alpha$  , Ang II and myocardial Ang II were detected by ELISA. The myocardial apoptosis was detected by TUNEL. **Results** The concentrations of serum cTn I of burn and treatment groups were significantly increased compared with the control group at each time point(  $P < 0.05$  ) . The increased rates of serum cTn I concentrations of the treatment group were lower than the burn group(  $P < 0.05$  ) . The concentrations of serum IL-1 and TNF- $\alpha$  of burn and treatment groups were significantly increased compared with the control group at each time point(  $P < 0.05$  ) . The increased rates of serum IL-1 and TNF- $\alpha$  concentrations of treatment group were lower than the burn group(  $P < 0.05$  ) . The concentrations of myocardial homogenates and serum Ang II were significantly increased(  $P < 0.05$  ) . The increased rates of myocardial homogenates and serum Ang II of treatment group were lower than the burn group at each time point(  $P < 0.05$  ) . The number of myocardial apoptosis increased significantly after injury and the number of the treatment group was significantly less than burn group at each time point(  $P < 0.05$  ) . **Conclusion** Early myocardial damage occurs in severely burned rats. Enalaprilat takes protective effect in myocardial damage of severely burned rats. Enalaprilat can reduce the release of IL-1 , TNF- $\alpha$  , Ang II and reduce myocardia apoptosis then protect the heart.

**Key words** enalaprilat; severely burned; myocardial injury; IL-1; TNF- $\alpha$ ; cTn I ; Ang II ; apoptosis