

# 丙戊酸对致死性烫伤大鼠心肌的保护作用及机制研究

罗红敏 胡森 白慧颖 王海滨 杜明华 林志龙 马丽 王欢 吕艺 盛志勇

**【摘要】** 目的 研究丙戊酸(VPA)对致死性烫伤大鼠心肌的保护作用及机制。方法 78 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假烫组( $n=10$ )、假烫+VPA 组( $n=10$ )、烫伤组( $n=29$ )、烫伤+VPA 组( $n=29$ )4 组。采用 80 °C 水浴浸泡背部 15 s、双下肢 15 s、腹部 8 s 造成 55% 总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤大鼠模型;假烫组用 37 °C 水浴浸泡,部位和时间与烫伤组相同。烫伤(假烫)后即刻皮下注射 VPA300 mg/kg 或等体积生理盐水(作为对照)。各组分别于烫伤后 6 h 取 5 只大鼠腹主动脉血,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,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌细胞中组蛋白乙酰化水平及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)活化水平;各组余下大鼠观察 12 h 生存情况。结果 与假烫组相比,烫伤组大鼠伤后 6 h 血浆 CK-MB 水平明显升高( $U/L: 5\ 438.0 \pm 413.6$  比  $2\ 881.0 \pm 324.8$ ,  $P<0.05$ ),心肌组蛋白 3 第 9 位乙酰化的赖氨酸(Ac-H3K9)水平明显降低(灰度值: $0.55 \pm 0.18$  比  $1.00 \pm 0.20$ ,  $P<0.05$ ),心肌 caspase-3 活化水平明显增高(灰度值: $1.75 \pm 0.25$  比  $1.00 \pm 0.18$ ,  $P<0.05$ );而给予 VPA 处理后能明显降低血浆 CK-MB 水平[( $4\ 018.0 \pm 388.3$ ) U/L],明显升高心肌 Ac-H3K9 水平(灰度值: $2.20 \pm 0.23$ ),明显降低心肌 caspase-3 活化水平(灰度值: $1.33 \pm 0.20$ ),与烫伤组比较差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。Kaplan-Meier 生存曲线分析发现,VPA 能显著延长大鼠烫伤后存活时间,12 h 时大鼠存活率可由 0 升高至 50%( $P<0.05$ )。结论 VPA 能改善致死性烫伤休克大鼠心肌酶学指标并延长其存活时间,其机制可能与其对组蛋白去乙酰化酶及 caspase-3 的抑制作用有关。

**【关键词】** 烫伤; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 丙戊酸; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3

## The protective effect of valproic acid on myocardium in rats with lethal scald injury and its mechanism

Luo Hongmin\*, Hu Sen, Bai Huiying, Wang Haibin, Du Minghua, Lin Zhilong, Ma Li, Wang Huan, Lyu Yi, Sheng Zhiyong. \*Laboratory of Shock and Organ Dysfunction, Burn Institute, First Hospital Affiliated to the PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: Hu Sen, Email: bs0425@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effects of valproic acid (VPA) on myocardium in rats following lethal burn injury and its mechanism. **Methods** Seventy-eight Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to four groups: sham-scald group ( $n=10$ ), sham-scald + VPA group ( $n=10$ ), scald group ( $n=29$ ), and scald + VPA group ( $n=29$ ). Rats in the latter two groups were subjected to 55% total body surface area (TBSA) third-degree burns by immersing the back of the trunk for 15 seconds, both lower extremities for 15 seconds, and the abdomen for 8 seconds in 80 °C water. Sham-scald rats were immersed in 37 °C water instead. Rats were then subcutaneously injected with VPA (300 mg/kg) or normal saline as control. Blood of 5 rats in each group was with drawn from the abdominal aorta at 6 hours after injury for measurement of plasma creatine kinase-MB (CK-MB) activities; then the rats were sacrificed and heart tissues were harvested for the measurement of acetylated histone H3 and activated caspase-3 by Western Blot. The remaining rats were used for 12-hour survival analysis. **Results** Compared with sham-scald group, there was a significant increase in plasma CK-MB activities (U/L:  $5\ 438.0 \pm 413.6$  vs.  $2\ 881.0 \pm 324.8$ ,  $P<0.05$ ) and activated caspase-3 protein levels in heart tissue (gray value:  $1.75 \pm 0.25$  vs.  $1.00 \pm 0.18$ ,  $P<0.05$ ) and an significant decline in the acetylation levels of histone H3 (gray value:  $0.55 \pm 0.18$  vs.  $1.00 \pm 0.20$ ,  $P<0.05$ ) after major burn injury. VPA treatment significantly reduced the plasma CK-MB activities [( $4\ 018.0 \pm 388.3$ ) U/L], activated caspase-3 protein levels in heart tissue (gray value:  $1.33 \pm 0.20$ ), and raised the acetylation levels of histone H3 (gray value:  $2.20 \pm 0.23$ , all  $P<0.05$ ). Survival analysis by Kaplan-Meier curves showed that the survival was improved after VPA treatment, and the survival rate was increased from 0 to 50% at 12 hours ( $P<0.05$ ). **Conclusions** VPA can attenuate cardiac injury and improve survival in a rodent model of lethal burn injury. These protective effects may be due to its inhibitory effects on histone deacetylase and caspase-3 activation.

**【Key words】** Burn injury; Histone deacetylase; Valproic acid; Caspase-3

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2014.08.008

基金项目:国家自然科学基金(81301607);国家重点基础研究发展计划(973)项目(2012CB518101);全军医学科研“十一五”计划项目(06Z055)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官障碍实验室(罗红敏、胡森、白慧颖、杜明华、林志龙、马丽、王欢、吕艺、盛志勇),检验科(王海滨) 通信作者:胡森,Email:bs0425@163.com

烧伤是最严重的创伤之一,严重烧伤后机体会产生剧烈的生理、心理变化,致残及致死率极高。严重烧伤后机体细胞由于缺血/缺氧会发生凋亡,严重时会引起多器官功能障碍甚至死亡。目前烧伤性休克的主要救治方法是对患者进行及时有效的液体复苏,但是该方法在极端环境下(战场、森林火灾、地震等)很难有效实施。而一种更为有效的救治策略是应用口服补液、生命维持药物或针灸等非常规救治技术来提高机体对缺血/缺氧的耐受能力,从而延长其存活时间,为撤离及转运创造条件<sup>[1-5]</sup>。近年来研究发现,抗癫痫药物丙戊酸(VPA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,它能提高致死性失血性休克、脓毒性休克及烧伤动物的存活率,同时还能减轻缺血、炎症等打击引起的心、脑、肺、肝、肾等多器官功能损害,但具体机制尚不明确<sup>[6-12]</sup>。为此,本研究通过观察 VPA 对致死性烫伤大鼠心肌酶学指标、心肌组蛋白乙酰化水平、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)活化水平及生存时间的影响,旨在为 VPA 的作用机制研究提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物:**清洁级雄性 SD 大鼠 78 只,8~10 周龄,体质量 230~250 g,购自北京军事医学科学院动物中心,动物合格证号:SCXK-(军)2012-0004。适应性饲养 2 周,实验前禁食 12 h,自由饮水。

**1.2 实验药品与试剂:**VPA、丙诺啡、戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、放射免疫沉淀(RIPA)裂解缓冲液、膜封闭洗涤缓冲液(TBST)、脱脂奶粉、超敏电化学发光(ECL)液购自北京普利莱基因技术有限公司;小鼠抗大鼠三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠组蛋白 3 第 9 位乙酰化的赖氨酸(Ac-H3K9)抗体购自英国 Abcam 公司;兔抗大鼠活化型 caspase-3 抗体购自美国塞信通公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 分组与模型制备:**戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠,备皮后按随机数字表法分为假烫组( $n=10$ )、假烫+VPA 组( $n=10$ )、烫伤组( $n=29$ )、烫伤+VPA 组( $n=29$ )4 组。采用 80 °C 水浴背部 15 s、双下肢 15 s、腹部 8 s,造成 55%总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤模型(假烫组 37 °C 水浴浸泡相同时间);烫伤即刻皮下注射丙诺啡 0.1 mg/kg 镇痛,并皮下注射 VPA 300 mg/kg 或等体积生理盐水作为对照。

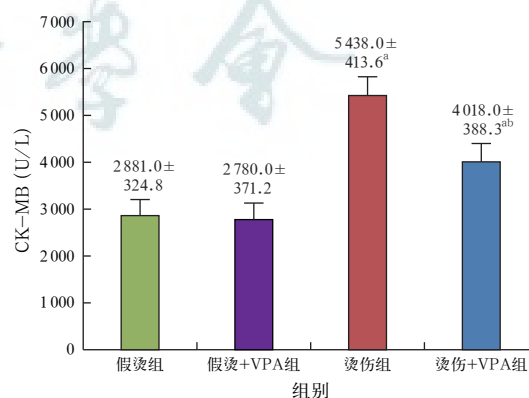
本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.3.2 指标检测与生存分析:**每组各取 5 只大鼠,于烫伤后 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。全自动生化分析仪测定血浆肌酸激酶同工酶(CK-MB);蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌细胞中 Ac-H3K9 及活化型 caspase-3 的水平。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 × g 离心 20 min,吸取上清并用 BCA 法进行蛋白浓度测定。行常规聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 60 min 后分别加入相应一抗:小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(1:5 000),兔抗大鼠活化型 caspase-3 单克隆抗体(1:1 000),兔抗大鼠 Ac-H3K9 多克隆抗体(1:400),4 °C 孵育过夜;TBST 洗 15 min × 3 次后分别加入相应二抗(1:5 000),室温孵育 30 min;TBST 洗 15 min × 3 次,用超敏 ECL 发光液发光、曝光、显影、定影,用 Image J 软件分析条带灰度。各组余下大鼠连续观察 12 h,记录死亡时间,并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。

**1.4 统计学方法:**应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,组间均数两两比较采用 SNK 检验;各组大鼠存活时间比较用时序检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 VPA 对烫伤大鼠血浆 CK-MB 水平的影响(图 1):**烫伤组血浆 CK-MB 较假烫组升高将近 1 倍( $P < 0.05$ );而烫伤+VPA 组血浆 CK-MB 水平较烫伤组明显降低,但仍显著高于假烫组(均  $P < 0.05$ )。

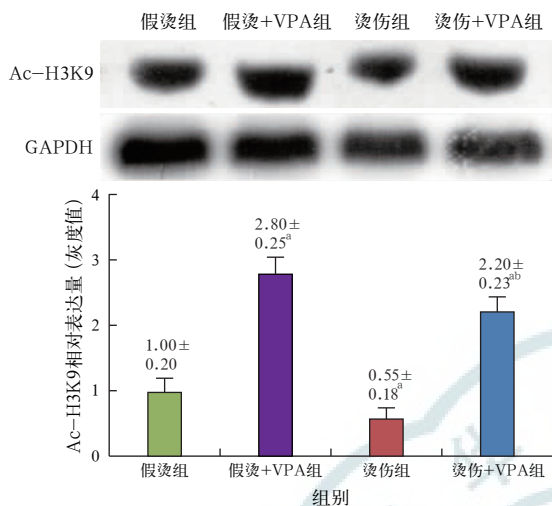


注:VPA 为丙戊酸,CK-MB 为肌酸激酶同工酶;与假烫组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与烫伤组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 1 VPA 对致死性烫伤大鼠伤后 6 h 血浆 CK-MB 水平的影响

**2.2 VPA 对烫伤大鼠心肌 Ac-H3K9 水平的影响(图 2):**烫伤组心肌 Ac-H3K9 水平较假烫组明显降

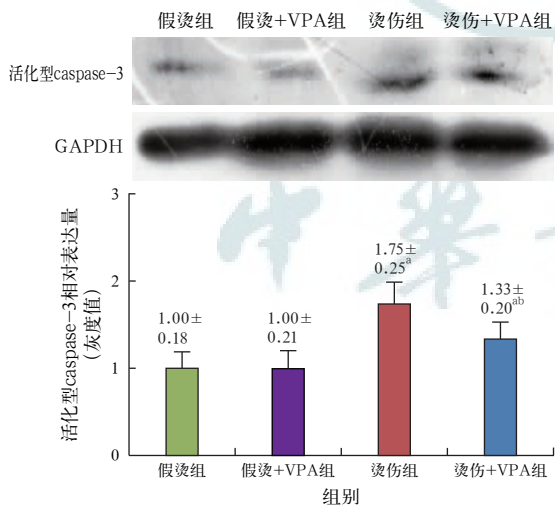
低( $P<0.05$ );而 VPA 处理后能明显提高大鼠心肌 Ac-H3K9 水平( $P<0.05$ )。



注:VPA 为丙戊酸,Ac-H3K9 为组蛋白 3 第 9 位乙酰化的赖氨酸, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶;与假烫组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与烫伤组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;

图 2 蛋白质免疫印迹试验检测 VPA 对致死性烫伤大鼠伤后 6 h 心肌 Ac-H3K9 水平的影响

2.3 VPA 对烫伤大鼠心肌 caspase-3 活化水平的影响(图 3):烫伤组心肌活化型 caspase-3 水平较假烫组明显升高( $P<0.05$ );而 VPA 处理后能明显降低大鼠心肌活化型 caspase-3 水平( $P<0.05$ )。

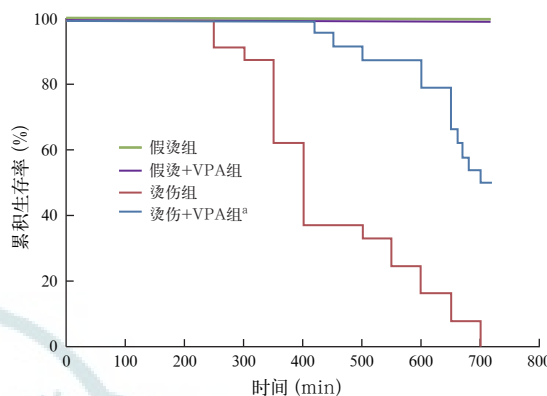


注:VPA 为丙戊酸,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶;与假烫组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与烫伤组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测 VPA 对致死性烫伤大鼠伤后 6 h 心肌 caspase-3 活化水平的影响

2.4 VPA 对烫伤大鼠生存时间的影响(图 4):烫伤

组大鼠伤后 12 h 死亡率为 100%, 平均死亡时间为 (450.0 ± 24.8) min;但给予 VPA 处理后,大鼠存活率明显提高,伤后 12 h 时达 50%( $P<0.05$ )。



注:VPA 为丙戊酸;与烫伤组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$

图 4 VPA 对致死性烫伤大鼠生存时间影响的 Kaplan-Meier 生存曲线

### 3 讨论

机体缺血 / 缺氧引起的器官功能损害是影响烧伤性休克伤员存活和预后的重要因素之一,而目前临床上烧伤性休克的常规治疗措施是液体复苏;但在战争、突发事故以及自然灾害现场,往往难以对烧伤性休克伤员进行及时、有效的液体复苏治疗。因此,在常规抗休克手段无法实施的情况下,如何利用生命维持药物提高重要器官实质细胞对缺血 / 缺氧的耐受能力,抑制细胞凋亡,保护重要器官的生理功能,延长伤员的存活时间,为安全转运和后续治疗争取时间,成为近年来的研究热点之一。

VPA 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,最近研究发现,VPA 能明显延长失血性休克和脓毒性休克动物的存活时间<sup>[6-9]</sup>,但其能否延长致死性烧伤性休克大鼠的存活时间及其作用机制尚未完全清楚。本研究通过建立 55% TBSA III 度烫伤大鼠模型,研究 VPA 对烧伤性休克大鼠存活时间和心功能的影响。与以往常见的 30% ~ 35% TBSA III 度烫伤大鼠模型相比,本模型是一个高致死性烫伤大鼠模型,在不给予任何干预的情况下,大鼠会在伤后 12 h 内死亡。本研究发现,伤后皮下注射 VPA 能使大鼠伤后 12 h 时的存活率提高到 50%。多器官功能障碍是重度烧伤患者的严重并发症之一<sup>[13]</sup>,而其发病机制与细胞凋亡增加有关<sup>[14]</sup>;心脏是维持机体基本生命的重要器官,而它又恰恰是严重烧伤后最易受累的器官之一<sup>[15-19]</sup>。因此,本实验进一步研究了 VPA 对烧伤性休克大鼠伤后心脏功能的影响。血浆 CK-MB 水平



是心肌损伤的生物学标志物之一<sup>[20]</sup>, 本研究结果发现, 致死性烫伤大鼠伤后血浆 CK-MB 水平明显升高, 而给予 VPA 后能显著降低血浆 CK-MB 水平, 提示 VPA 能减轻烧伤性休克引起的心脏功能损害。

本研究继续研究 VPA 对致死性烫伤大鼠的保护作用是否与其对组蛋白去乙酰化酶的抑制作用有关。研究发现, Ac-H3K9 是反映机体组蛋白乙酰化水平的一个可靠指标<sup>[21]</sup>。我们检测了伤后大鼠心肌 Ac-H3K9 的乙酰化水平, 结果发现, 大鼠伤后 6 h 心肌 Ac-H3K9 的乙酰化水平明显降低, 而给予 VPA 后能使其明显升高。

以往研究发现, 严重烧伤能导致机体组织细胞凋亡增加<sup>[22-29]</sup>, 而体内外研究发现 VPA 能抑制缺氧等刺激引起的细胞凋亡<sup>[20,30-32]</sup>。因此, 我们进一步研究了 VPA 对心肌细胞凋亡的影响。由于 caspase-3 的活化是细胞早期凋亡的标志, 我们检测了心肌组织 caspase-3 的活化水平, 以反映致死性烫伤大鼠伤后心肌细胞凋亡的变化。结果发现, 伤后大鼠心肌组织中 caspase-3 的活化水平明显升高, 而给予 VPA 后能使其活化水平有所降低, 提示 VPA 能抑制致死性烧伤大鼠伤后心肌组织 caspase-3 的活化, 从而抑制细胞凋亡, 保护心脏功能。

综上所述, 本研究证明 VPA 能保护致死性烫伤大鼠伤后的心脏功能, 延长动物的存活时间; 其作用机制可能是通过增加组蛋白的乙酰化修饰水平, 抑制 caspase-3 的活化并抑制细胞凋亡实现的。

### 参考文献

- [1] 胡森. 无静脉输液条件时低血容量休克救治技术的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(6): 323-325.
- [2] 杜明华, 罗红敏, 赵增凯, 等. 电针足三里穴对肠缺血/再灌注大鼠肠通透性的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(2): 117-121.
- [3] 胡森, 王磊, 周国勇. 电针足三里穴减轻烫伤大鼠小肠肠炎细胞因子引起的病理损害[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(4): 216-218.
- [4] 胡森, 盛志勇. 口服补液——战争或突发事件及灾害时救治烧伤休克的液体复苏途径[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(6): 635-636.
- [5] 侯经文, 胡森. 战、创(烧)伤性休克院前救治研究进展[J]. 中国全科医学, 2010, 13(6): 660-662.
- [6] Shults C, Sailhamer EA, Li Y, et al. Surviving blood loss without fluid resuscitation[J]. J Trauma, 2008, 64(3): 629-640.
- [7] Alam HB, Shuja F, Butt MU, et al. Surviving blood loss without blood transfusion in a swine poly-trauma model[J]. Surgery, 2009, 146(2): 325-333.
- [8] Li Y, Liu B, Fukudome EY, et al. Surviving lethal septic shock without fluid resuscitation in a rodent model[J]. Surgery, 2010, 148(2): 246-254.
- [9] Li Y, Alam HB. Creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype by modulation of acetylation in models of hemorrhagic and septic shock[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 710: 107-133.
- [10] 胡森, 侯经文, 李琳, 等. 丙戊酸对致死性失血性休克犬器官功能和预后的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(8): 471-474.
- [11] 刘旭, 刘志英, 王林洪, 等. 丙戊酸在缺血再灌注中神经保护作用及机制研究进展[J]. 河北联合大学学报(医学版), 2013, 15(3): 341-342.
- [12] 罗红敏, 胡森, 盛志勇. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂抗休克作用及其机制的研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2014, 15(1): 60-64.
- [13] 盛志勇, 杨红明, 柴家科. 大面积烧伤后多器官功能障碍综合征的临床防治[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(6): 435.
- [14] 郑爱民, 郭艳青, 张坤. 多器官功能障碍综合征中的细胞凋亡[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(6): 142-144.
- [15] Carlson DL, Horton JW. Cardiac molecular signaling after burn trauma[J]. J Burn Care Res, 2006, 27(5): 669-675.
- [16] Williams FN, Herndon DN, Suman OE, et al. Changes in cardiac physiology after severe burn injury[J]. J Burn Care Res, 2011, 32(2): 269-274.
- [17] 尹泽钢, 黄跃生, 李百姓. 大鼠严重烧伤后早期心脏功能和脏器血流量的变化及关系[J]. 中华烧伤杂志, 2010, 26(1): 10-13.
- [18] 黄跃生, 黎鳌, 杨宗城, 等. 严重烧伤病人心功能的变化及其原因探讨[J]. 第三军医大学学报, 1990, 12(4): 269-274.
- [19] 黄跃生. 烧伤后早期心肌损害与防治[J]. 中华烧伤杂志, 2008, 24(5): 369-371.
- [20] Kehl DW, Iqbal N, Fard A, et al. Maisel. Biomarkers in acute myocardial injury[J]. Transl Res, 2012, 159(4): 252-264.
- [21] Li Y, Yuan Z, Liu B, et al. Prevention of hypoxia-induced neuronal apoptosis through histone deacetylase inhibition[J]. J Trauma, 2008, 64(4): 863-871.
- [22] Gravante G, Delogu D, Sconocchia G. "Systemic apoptotic response" after thermal burns[J]. Apoptosis, 2007, 12(2): 259-270.
- [23] Zhang JP, Ying X, Liang WY, et al. Apoptosis in cardiac myocytes during the early stage after severe burn[J]. J Trauma, 2008, 65(2): 401-408.
- [24] Fukuzuka K, Rosenberg JJ, Gaines GC, et al. Caspase-3-dependent organ apoptosis early after burn injury[J]. Ann Surg, 1999, 229(6): 851-859.
- [25] Duan H, Chai J, Sheng Z, et al. Effect of burn injury on apoptosis and expression of apoptosis-related genes/proteins in skeletal muscles of rats[J]. Apoptosis, 2009, 14(1): 52-65.
- [26] 沈艳, 范鹏举, 郑军, 等. 重组腺病毒介导反义 p38 $\alpha$  基因抑制烧伤复合缺氧条件下大鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(11): 666-668.
- [27] 段红杰, 柴家科, 姚咏明, 等. 严重烧伤大鼠骨骼肌细胞凋亡的初步研究[J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(5): 304-306, 323.
- [28] 吕根法, 石宏伟, 王光远, 等. 胰岛素对烧伤血清致心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(4): 197-200.
- [29] 吕根法, 石宏伟, 樊磊, 等. 胰岛素强化治疗拮抗烫伤大鼠心肌细胞凋亡的机制研究[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(12): 714-717.
- [30] Lee JY, Kim HS, Choi HY, et al. Valproic acid attenuates blood-spinal cord barrier disruption by inhibiting matrix metalloproteinase-9 activity and improves functional recovery after spinal cord injury[J]. J Neurochem, 2012, 121(5): 818-829.
- [31] 李新枝, 聂政. 丙戊酸对大鼠急性脊髓损伤的保护作用[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(4): 347-350.
- [32] 李新枝, 肖莉, 石清明, 等. 丙戊酸对大鼠脊髓损伤后 Caspase-3 及 c-fos 表达的影响[J]. 西南国防医药, 2012, 55(7): 703-705.

(收稿日期: 2013-11-06)

(本文编辑: 李银平)