

丙戊酸钠对严重烫伤大鼠早期生存率和心肌损伤的作用及机制

孟祥熙¹, 刘翔宇^{2,3}, 吴育寿³, 温海玲¹, 胡森⁴, 郑金光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整形医学部, 北京 100048; ³解放军医学院, 北京 100853; ⁴解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853

摘要: **背景** 丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)在严重烫伤早期心脏功能保护研究中取得很大进展, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)与心肌损伤密切相关, VPA与HIF-1 α 在严重烫伤心肌损伤中的作用机制仍有待探索。**目的** 研究VPA是否通过影响HIF-1 α 表达而减轻严重烫伤大鼠早期心肌损伤。**方法** 88只雄性SD大鼠随机分为假烫+0.9%氯化钠注射液组(NN组, n=24)、烫伤+0.9%氯化钠注射液组(SN组, n=32)、烫伤+VPA组(SV组, n=32);采用沸水法致50%总体表面积III度烫伤, 伤后即刻, NN组、SN组腹腔内注射0.25 mL 0.9%氯化钠注射液, SV组腹腔内给予VPA治疗(300 mg/kg, 溶于0.25 mL 0.9%氯化钠注射液)。分别于伤后3 h和6 h处死各组8只大鼠, 取腹主动脉血, 测定肌酸激酶同工酶(creatinine kinase isoenzyme, CK-MB)水平;取心肌组织, 观察心肌组织病理变化及凋亡心肌细胞, 测定心肌组织内肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平, 检测心肌组织内HIF-1 α 、BNIP3、裂解半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Cleaved caspase-3)蛋白表达水平;各组剩余大鼠观察12 h生存情况。**结果** 生存分析显示, 伤后12 h, SV组平均生存时间(550.00 \pm 17.32) min, 生存率50%, 优于SN组[平均生存时间(400.00 \pm 29.76) min, 生存率0]($P < 0.05$)。与NN组比较, SN组伤后3 h和6 h的CK-MB、心肌细胞凋亡率、TNF- α 、Cleaved caspase-3、HIF-1 α 和BNIP3蛋白表达均增加(P 均 < 0.05);与SN组比较, SV组伤后CK-MB、心肌细胞凋亡率、TNF- α 降低, Cleaved caspase-3、HIF-1 α 及BNIP3蛋白表达水平降低(P 均 < 0.05);SV组病理损伤较SN组有所改善。**结论** VPA能提高严重烫伤大鼠伤后早期生存率, 减轻心肌损伤, 可能与下调大鼠心肌组织内HIF-1 α 的表达有关。

关键词: 烫伤; 丙戊酸钠; 心肌损伤; 凋亡; 缺氧诱导因子-1 α

中图分类号: R644

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)02-0186-05

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.23121803

引用本文: 孟祥熙, 刘翔宇, 吴育寿, 等. 丙戊酸钠对严重烫伤大鼠早期生存率和心肌损伤的作用及机制 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (2): 186-190.

Effects and mechanisms of sodium valproate on early survival and myocardial injury in rats with severe scald injury

MENG Xiangxi¹, LIU Xiangyu^{2,3}, WU Yushou³, WEN Hailing¹, HU Sen⁴, ZHENG Jinguang²

¹Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China; ²Department of Burn and Plastic Surgery, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ³Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ⁴Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: ZHENG Jinguang. Email: zhengjinguang85@126.com

Abstract: Background Sodium valproate (VPA) has made great progress in the study of cardiac function protection in the early stage of severe scald injury, hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is closely related to myocardial injury, and the mechanism of action of VPA and HIF-1 α in myocardial injury in severe scald injury remains to be explored. **Objective** To investigate whether VPA attenuates early myocardial injury in severely scalded rats by affecting HIF-1 α expression. **Methods** Eighty-eight male SD rats were randomly divided into normal + 0.9% NaCl group (NN group, n=24), scald + 0.9% NaCl group (SN group, n=32), and scald + VPA group (SV group, n=32); III $^\circ$ scald with 50% of total surface area were caused by boiling water method, and NN and SN group were intraperitoneally injected with 0.25 mL of NaCl, and the SV group was intraperitoneally given VPA (300 mg/kg, dissolved in 0.25 mL of 0.9% NaCl) immediately after the injury. Eight rats in each group were executed at 3h and 6h after injury, and creatine kinase isoenzyme (CK-MB) levels were measured by taking blood from the abdominal aorta; myocardial tissues were taken for observation of myocardial tissue pathology and apoptotic cardiomyocytes, the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), the expression levels of HIF-1 α , BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3 (BNIP3), and cleaved caspase-3; the 12-hour

收稿日期: 2024-07-18

基金项目: 承德市科学技术研究与发展计划项目(201904A106)

第一作者: 孟祥熙, 硕士, 主治医师. Email: 125467374@qq.com

通信作者: 郑金光, 硕士, 主治医师. Email: zhengjinguang85@126.com

survival rate was observed in the remaining rats in each group. **Results** Survival analysis showed that at 12 h after injury, SV group had a mean survival time of (550.00±17.32) min and a survival rate of 50%, which were superior to that of SN group (mean survival time of [400.00±29.76] min and a survival rate of 0%, $P < 0.05$). Compared with NN group, CK-MB, cardiomyocyte apoptosis rate, TNF- α , cleaved caspase-3, HIF-1 α , and BNIP3 protein expression levels increased in SN group at 3h and 6h post-injury (all $P < 0.05$); compared with SN group, CK-MB, cardiomyocyte apoptosis rate, TNF- α were decreased, and cleaved caspase-3, HIF-1 α , and BNIP3 protein expression levels were decreased in SV group (all $P < 0.05$); pathologic injuries were improved in SV group compared to SN group. **Conclusion** VPA improves early post-injury survival and attenuates myocardial injury in severely scalded rats, which may be related to the down-regulation of HIF-1 α expression in rat myocardial tissue.

Keywords: scald; sodium valproate; myocardial injury; apoptosis; hypoxia-inducible factor-1 α

Cited as: Meng XX, Liu XY, Wu YSH, et al. Effects and mechanisms of sodium valproate on early survival and myocardial injury in rats with severe scald injury[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(2): 186-190.

严重烫伤后, 循环血量锐减, 心脏灌注不足, 心肌组织缺血缺氧而进一步引起心脏实质细胞的损伤^[1-2]。烧伤早期心肌损伤与心肌细胞凋亡密切相关, 同时伴有炎性因子生成、氧自由基产生、磷酸二酯酶 5-环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G 通路激活、Caspase-3 蛋白表达增加, 进一步诱导心肌细胞的凋亡, 加重心肌损伤^[3-4]。在心肌组织缺血缺氧的状态情况下心肌细胞内缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)蛋白水平升高, 并激活下游与缺氧相关的靶基因, 导致血管通透性增加、心肌收缩功能减退、能量代谢障碍, 诱导心肌细胞凋亡, 损伤心脏功能^[5]。丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)是临床上常用的治疗癫痫的一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 能改善烫伤休克大鼠心肌酶学指标, 降低肺部毛细血管通透性^[6-8], 降低失血性休克猪复苏需求, 改善血流动力学和实验室指标^[9]。本课题组由此推断 VPA 能改善低血容量休克动物模型心脏功能, 但具体机制仍不明确。因此, 本研究通过建立严重烫伤大鼠模型, 观察 VPA 对早期心肌损伤的影响并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 ~ 70 日龄雄性 SD 大鼠由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK(京)2019-0010, 体质量 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。所有动物实验均获得解放军总医院第四医学中心实验动物委员会的批准并严格依照其规定进行。

1.2 药品和试剂

丙戊酸钠、戊巴比妥钠购自 Sigma 公司, TUNEL 检测阳性对照制备试剂盒、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, Cleaved

Caspase-3 Rabbit mAb 购自 Cell Signaling 公司, Anti-BNIP3 antibody 购自 Abcam 公司, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) antibody 购自 Novous 公司; 二抗山羊抗兔 IgG/HRP、山羊抗小鼠 IgG/HRP 购自北京中杉金桥公司。全自动生化分析仪购自 Hitachi 公司(日本), 高速冷冻离心机购自 Kubota 公司(日本), 光学显微镜购自奥林巴斯有限公司(日本), 多波长酶标仪购自 Dynex 公司(美国)。

1.3 动物模型与分组

88 只大鼠随机分为 3 组。(1)假烫 + 0.9% 氯化钠注射液组(NN 组, $n=24$), 假烫后立即腹腔内注射 0.25 mL 0.9% 氯化钠注射液; (2)烫伤 + 0.9% 氯化钠注射液组(SN 组, $n=32$), 烫伤后立即腹腔内注射 0.25 mL 0.9% 氯化钠注射液; (3)烫伤 + VPA 组(SV 组, $n=32$), 烫伤后立即腹腔注射 VPA (300 mg/kg, 溶于 0.25 mL 0.9% 氯化钠注射液)。戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 剪除大鼠背部和腹部的毛发; 采用沸水法制作 50% 总体表面积 III 度烫伤大鼠模型, 根据 Meeh-Rubner 公式计算大鼠总体表面积, 设计一 15 cm×6 cm 矩形开口模板, 将大鼠背部、腹部分别放置于矩形开口中, 暴露欲烫伤部位皮肤, 同时保护剩余部分皮肤, SN 组和 SV 组于 100°C 沸水中背部浸泡 15 s、腹部浸泡 8 s^[7]; NN 组采用 37°C 水浴浸泡背部 15 s、腹部 8 s; 烫伤深度经病理结果证实为 III 度烫伤。每组根据烫伤后 3 h 和 6 h 两个观察时间点 3 组各处死 8 只大鼠, 通过腹主动脉取血, 分离左心室心肌组织置于 4% 多聚甲醛或 -80°C 冰箱保存。各组剩余大鼠 NN 组($n=8$)、SN 组($n=16$)、SV 组($n=16$)观察伤后 12 h 生存时间。

1.4 血清中肌酸激酶同工酶水平检测

各组大鼠伤后 3 h、6 h 行腹主动脉穿刺取血, 离心后取血清, 全自动生化分析仪测定磷酸肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)水平。

1.5 HE法观察心肌病理变化

伤后3 h、6 h处死大鼠后取3组大鼠心肌组织, 10%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片(5 μm), 苏木精-伊红(HE)染色后, 于倒置显微镜下观察并拍照。

1.6 TUNEL观察心肌细胞凋亡率

取伤后3 h、6 h的3组大鼠心肌组织, 4%多聚甲醛固定24 h, 石蜡包埋后, 5 μm 厚度切片, 二甲苯脱蜡、梯度乙醇水合, 蛋白酶K工作液20 min, TUNEL反应液37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中避光孵育60 min, PBS漂洗后荧光显微镜下观察拍照。随机选取心肌组织区域中5个非重叠400 \times 镜下视野, 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 $\times 100\%$ 。

1.7 ELISA测定心肌组织TNF- α 含量

称取伤后3 h、6 h的3组大鼠冰冻心肌组织50 mg, 加入细胞裂解液4 $^{\circ}\text{C}$ 下匀浆, 275 g离心15 min, 二喹啉甲酸法测定蛋白浓度, TNF- α 含量按照试剂盒说明书进行操作。

1.8 Western blot法测定心肌组织内HIF-1 α 、BNIP3和Cleaved caspase-3蛋白水平

称取伤后3 h、6 h的3组大鼠心肌组织100 mg, 加入1 mL RIPA裂解液匀浆, 于冰上静置20 min后275 g离心20 min, 吸取上清并用二喹啉甲酸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HIF-1 α (1:2 000), 兔抗大鼠BNIP3(1:100), 兔抗大鼠Cleaved caspase-3(1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST洗15 min \times 3次后分别加入相应二抗(1:5 000), 室温孵育30 min; TBST洗15 min \times 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。

1.9 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计学分析, 检测各项指标所得的结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD- t 检验, Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 组间比较采用Log-rank检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠生存情况比较

伤后3 h SN组和SV组大鼠全部存活; 伤后6 h, SN组存活10例(10/16), 生存率62.5%, SV

组全部存活; 伤后12 h, SN组存活0例(0/16), 平均生存时间(400.00 \pm 29.76) min, SV组大鼠存活8例(8/16), 平均生存时间(550.00 \pm 17.32) min, 生存率较SN组升高($P<0.001$)。见图1。

2.2 血清中CK-MB水平

伤后3 h和6 h, SN组CK-MB水平高于NN组($P<0.001$); 给予VPA治疗后, CK-MB水平在伤后3 h和6 h低于SN组($P<0.001$)。见图2。

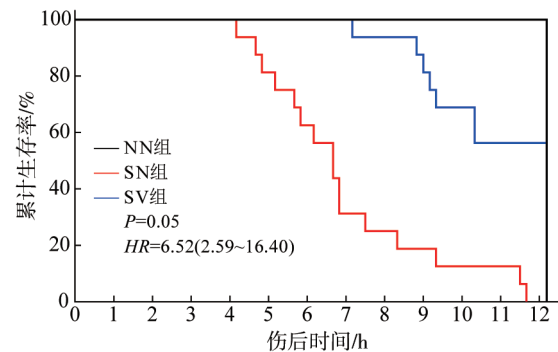


图1 两组大鼠Kaplan-Meier生存曲线

Fig. 1 Kaplan-Meier survival curves of rats in the two groups

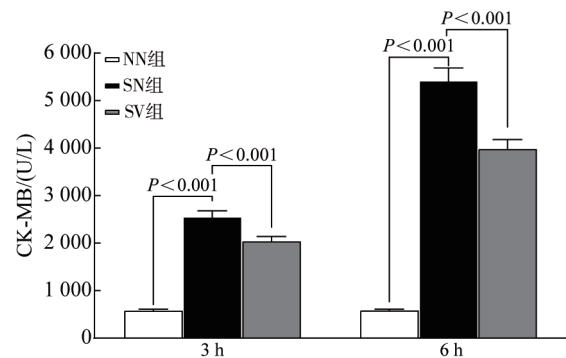


图2 VPA对CK-MB水平的影响

Fig. 2 Effect of VPA on CK-MB levels

2.3 心肌损伤程度和心肌细胞凋亡

严重烫伤后, 肌间隙出现水肿、增宽, 肌纤维排列紊乱, 心肌细胞出现凋亡, 随时间心肌损伤逐渐加重; 而SV组的病理变化较烫伤组减轻, 心肌细胞凋亡数量减少, 肌纤维排列较整齐, 见图3。SN组伤后心肌细胞凋亡率高于NN组(P 均 <0.001), 且烫后时间越长, 心肌细胞凋亡比例越高, 而VPA处理后心肌细胞凋亡率较SN组降低(P 均 <0.001), 见图4。

2.4 心肌组织内TNF- α 含量

伤后3 h和6 h, SN组TNF- α 含量高于NN组, SV组TNF- α 含量均低于SN组, 差异均有统计学意义(P 均 <0.001)。见图5。

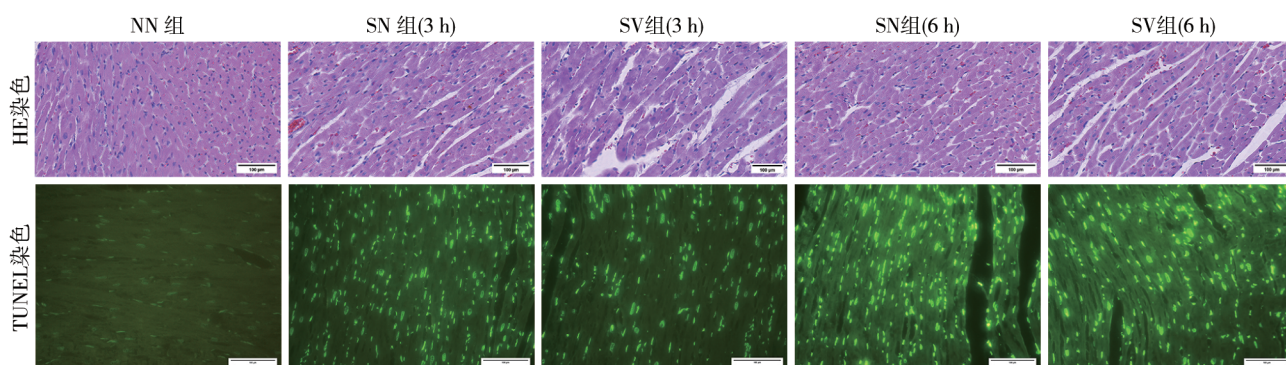


图3 倒置显微镜下心肌HE染色与荧光显微镜下心肌TUNEL染色(400×)

Fig. 3 HE staining of myocardium under inverted microscope and TUNEL staining of myocardium under fluorescence microscope (400 ×)

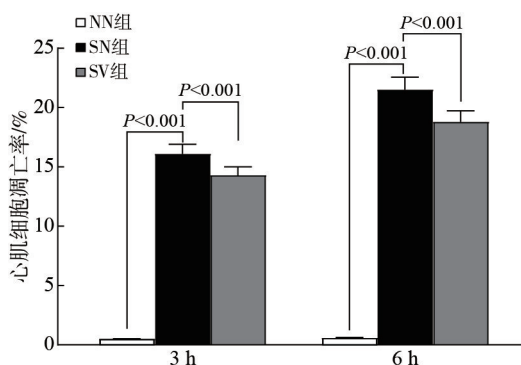


图4 荧光显微镜下观察VPA对心肌细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Effect of VPA on apoptosis rate of cardiomyocytes observed under fluorescence microscope

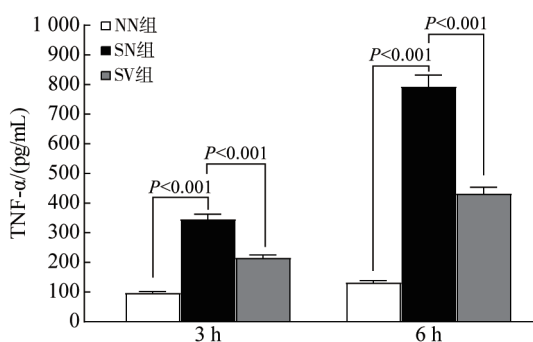


图5 VPA对心肌内TNF-α含量的影响

Fig. 5 Effect of VPA on intramyocardial TNF-α content

2.5 心肌组织内HIF-1α、BNIP3和Cleaved caspase-3蛋白表达水平

伤后3 h, 心肌组织HIF-1α, SN组较NN组表达水平增加($P < 0.001$), SV组较SN组表达减少($P = 0.007$), BNIP3和Cleaved caspase-3蛋白, SN组较NN组表达增加($P < 0.001$), SV组较SN组表达水平降低(P 均 < 0.001); 伤后6 h, SN组较NN组HIF-1α及其下游靶基因BNIP3蛋白、Cleaved caspase-3蛋白表达水平增加(P 均 < 0.001), SV组较SN组HIF-1α及其下游靶基因BNIP3蛋白表达水平减少(P 均 < 0.001), Cleaved caspase-3蛋白表达水平减少($P = 0.002$)。见图6。

3 讨论

重度烧伤0.5 h后心肌灌注下降15%以上, 随伤后时间延长逐渐加重^[10], 毛细血管通透性因烧伤明显增加, 血浆及组织液外渗至创面外和组织间隙, 常于伤后2~3 h最为急剧, 因此在血容量显著降低之前, 心肌组织即出现功能降低、缺血缺氧性损伤。VPA是一种短链脂肪酸类组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 既往研究发现在严重烧伤、低血容量休克、心肌梗死等动物模型中, VPA能降

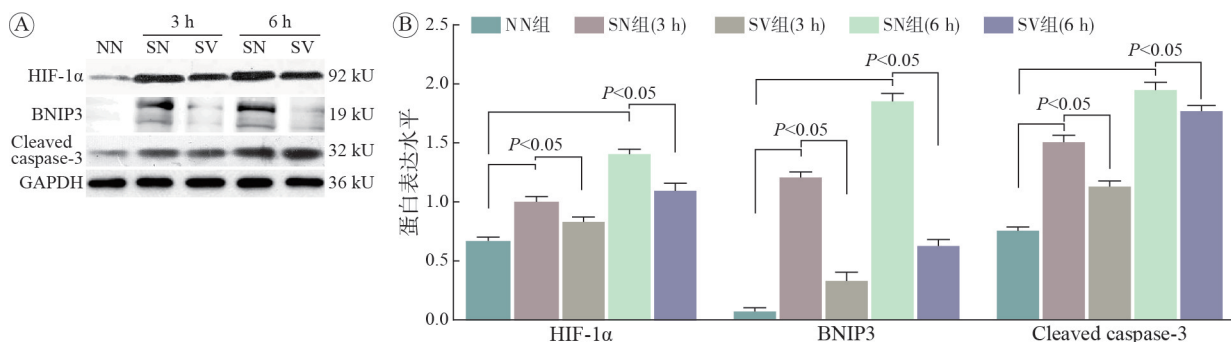


图6 Western blot法检测心肌组织内HIF-1α、BNIP3和Cleaved caspase-3的蛋白表达(A)及定量分析(B)

Fig. 6 Detection of HIF-1α, BNIP3 and cleaved caspase-3 protein expression in myocardial tissues by Western blot (A) and quantitative analysis (B)

低心肌酶学损伤指标,改善心脏泵血功能,减轻心肌组织氧化应激损伤,保护心肌功能^[6,11-12]。

烧伤面积>30%时,伤后早期即出现心肌功能障碍、心肌损伤。在本实验中同样证实,在伤后3 h、6 h,与NN组比较,SN组血清中CK-MB水平升高,心肌组织肌间隙出现水肿、心肌纤维排列,并随伤后时间延长,逐渐加重,并且SN组大鼠在伤后12 h内全部死亡;给予VPA治疗后,与NN组比较,SV组伤后3 h、6 h心肌酶学指标降低,心肌组织病理学提示损伤减轻,伤后12 h大鼠生存率为50%。以上结果表明,VPA对严重烧伤大鼠伤后早期心肌损伤具有一定治疗作用。

烧伤后引起的心肌细胞凋亡,是导致心肌损伤及其并发症发生发展的重要病理机制^[13-14],如果在严重烧伤早期能抑制心肌细胞凋亡,有利于心脏功能的保护、提高心肌细胞对缺血缺氧的耐受、减轻心肌损伤。Caspase-3是细胞早期凋亡的标志,反映伤后心肌细胞凋亡的情况^[15]。本研究中,大鼠在严重烧伤后,TUNEL染色提示SN组心肌凋亡数量较NN组增多,凋亡因子Cleaved caspase-3蛋白表达同样升高,与伤后时间呈正相关,提示严重烧伤导致心肌细胞凋亡;给予VPA治疗后,SV组心肌凋亡数量、Cleaved caspase-3蛋白表达较SN组降低,表明VPA能抑制严重烧伤大鼠心肌细胞凋亡,减轻心肌损伤。

在缺血/缺氧诱导心肌细胞损伤中,HIF-1 α 作为缺氧反应的敏感蛋白,伤后HIF-1 α 蛋白表达增加,损伤心脏功能,增加心肌细胞的凋亡比例^[16]。HIF-1主要由不稳定的HIF-1 α 和HIF-1 β 组成,HIF-1 α 转移到细胞核并与HIF-1 β 结合激活BNIP3表达,BNIP3作为HIF-1 α 下游靶基因,以往研究证实组织或细胞在缺血缺氧的条件下,HIF-1 α 表达增加,同时伴有其下游靶基因BNIP3的表达增加^[17-18];BNIP3隶属于Bcl-2蛋白超家族,是一种线粒体促凋亡蛋白,通过BH3结构与抗凋亡蛋白形成异二聚体后发挥促细胞凋亡功能^[19]。本实验室前期研究发现VPA能抑制严重烧伤大鼠心肌细胞凋亡^[20],但具体机制仍不明确,本研究发现,严重烧伤后SN组心肌组织内HIF-1 α 、BNIP3表达较NN组增加,给予VPA处理后,SV组HIF-1 α 、BNIP3表达较SN组降低,实验表明VPA能降低严重烧伤大鼠心肌组织内HIF-1 α 、BNIP3表达。在心脏炎症微

环境中TNF- α 是最初促炎因子,能诱导多种炎症因子、氧自由基表达,进而引起心肌功能障碍、心肌损伤及细胞凋亡^[21]。结果显示,严重烫伤后SN组心肌组织内TNF- α 含量较NN组升高,VPA治疗后,SV组TNF- α 水平较SN组降低,表明VPA能抑制心肌组织炎症反应。TNF- α 变化与心肌细胞凋亡情况、HIF-1 α 表达呈正相关,而HIF-1 α 与TNF- α 是否有相关性需后续实验进一步证实。

综上所述,本实验观察VPA对50% TBSA III度烫伤大鼠心肌损伤影响,证实VPA可能通过影响HIF-1 α 及下游靶基因BNIP3的表达来提高伤后早期生存率,减轻心肌损伤,抑制心肌组织炎症反应及心肌细胞凋亡。本研究的局限性在于仅观察了VPA通过影响HIF-1 α 信号通路对心肌细胞凋亡及心肌损伤的影响,后续将通过阻断信号通路来进一步验证结论。

作者贡献 孟祥熙、刘翔宇、吴育寿、温海玲:开展实验,数据收集,文章撰写;郑金光、胡森:研究指导,审读和修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: zhengjinguang85@126.com。

参考文献

- 1 Zhang RR, Zhang JL, Li Q, et al. Severe burn-induced mitochondrial recruitment of calpain causes aberrant mitochondrial dynamics and heart dysfunction [J]. Shock, 2023, 60 (2): 255-261.
- 2 Kazama I, Kuwana R, Muto M, et al. Subepicardial burn injuries in bullfrog heart induce electrocardiogram changes mimicking inferior wall myocardial infarction [J]. J Vet Med Sci, 2022, 84 (9): 1205-1210.
- 3 Zhu ZS, Zou B, Gao SY, et al. CD14 involvement in third-degree skin burn-induced myocardial injury via the MAPK signaling pathway [J]. Cell Biochem Biophys, 2022, 80 (1): 139-150.
- 4 Wen JJ, Cummins CB, Radhakrishnan RS. Burn-induced cardiac mitochondrial dysfunction via interruption of the PDE5A-cGMP-PKG pathway [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (7): 2350.
- 5 Zheng J, Chen PE, Zhong JF, et al. HIF-1 α in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review) [J]. Mol Med Rep, 2021, 23 (5): 352.
- 6 孟祥熙, 田雨沫, 胡森, 等. 丙戊酸钠对严重烧伤合并海水浸泡延迟补液模型大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 中国药房, 2022, 33 (17): 2113-2118.
- 7 张文华, 唐富波, 胡森, 等. 丙戊酸钠对重度烧伤大鼠肺微血管内皮屏障的保护作用和机制研究 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42 (10): 1064-1067.
- 8 朱美缔, 王树明, 郭思佳, 等. 丙戊酸钠对50%总体表面积III度烫伤大鼠肺功能保护作用的研究 [J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2023, 18 (1): 47-52.