

褪黑激素对严重烧伤大鼠心肌损害的保护作用

韩晓华 徐璐

【摘要】目的 探讨褪黑激素(MLT)对严重烧伤大鼠早期心肌损害的保护作用及机制。**方法** 将 30 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假伤组、烧伤组和 MLT 组,每组 10 只。采用大鼠背部皮肤浸入沸水中 15 s 造成 30%总体表面积Ⅲ度烫伤复制烧伤动物模型;假伤组大鼠背部皮肤浸入 37 ℃水中。伤后立即腹腔注射溶剂(1%乙醇生理盐水)或 MLT 10 mg/kg。伤后 6 h 鼠尾取血后处死大鼠,取心肌组织,检测丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和髓过氧化物酶(MPO)活性,以及血清肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)水平。**结果** 与假伤组比较,烧伤后心肌组织 MDA 含量升高了 66.7%(nmol/mg:1.55 ± 0.17 比 0.93 ± 0.05),GSH 含量下降了 27.8% (nmol/mg:13.58 ± 0.33 比 18.82 ± 0.55,均 $P < 0.01$),GSH-Px 活性被轻度抑制 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$:74.04 ± 3.42 比 93.79 ± 3.76, $P < 0.05$),MPO 活性则增加至 2.8 倍 (U/g:9.43 ± 1.15 比 3.41 ± 0.27, $P < 0.01$),提示心肌产生明显的氧化应激损伤。除 GSH-Px 外,MLT 治疗可改善上述各种异常,与烧伤组比较差异均有统计学意义 [MDA (nmol/mg):0.89 ± 0.08 比 1.55 ± 0.17, GSH (nmol/mg):17.23 ± 0.54 比 13.58 ± 0.33, MPO (U/g):6.91 ± 0.51 比 9.43 ± 1.15, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。此外,烧伤后血清 CK 及 LDH 水平分别较假伤组增加至 37.8 倍和 7.4 倍(均 $P < 0.01$);MLT 治疗后二者分别降低了 32.9%及 21.2% ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。**结论** MLT 对严重烧伤早期的心肌损害具有保护作用,其机制可能和 MLT 抑制烧伤诱导的氧化应激损伤有关。

【关键词】 褪黑激素; 烧伤; 心肌组织; 氧化应激; 大鼠

Protective effect of melatonin on myocardial injury in severely-burned rats HAN Xiao-hua, XU Luo.

Department of Physiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong, China

Corresponding author: HAN Xiao-hua, Email: xiaohua.han@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of melatonin (MLT) on myocardial injury in severely-burned rats and its mechanism. **Methods** A total of 30 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to three groups: sham group, burn group and MLT group, each $n = 10$. The dorsal skin of animal was immersed into boiling water for 15 seconds to induce 30% total body surface area (TBSA) full-thickness burn, or immersed into 37 ℃ water for sham operation. Immediately after burn, the animals in burn group and MLT group were given intraperitoneally vehicle (1% alcohol in normal saline) or MLT (10 mg/kg) respectively. Six hours postburn, the blood from tail vessel was collected for serum preparation. After sacrificed, the myocardial tissues of rats were collected for the determination of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) as well as glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase (MPO) activities. Serum levels of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were also estimated. **Results** Compared with the sham control, burn injury increased MDA by 66.7% (nmol/mg: 1.55 ± 0.17 vs. 0.93 ± 0.05) and decreased GSH by 27.8% (nmol/mg: 13.58 ± 0.33 vs. 18.82 ± 0.55, both $P < 0.01$) in myocardial tissues, GSH-Px activity was also slightly inhibited ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$: 74.04 ± 3.42 vs. 93.79 ± 3.76, $P < 0.05$), but MPO level was found to increase to 2.8 folds (U/g: 9.43 ± 1.15 vs. 3.41 ± 0.27, $P < 0.01$). These changes indicated the occurrence of oxidative stress in myocardial tissues after severe burn. MLT treatment relieved most of the abnormality with significant statistical significances [MDA (nmol/mg): 0.89 ± 0.08 vs. 1.55 ± 0.17, GSH (nmol/mg): 17.23 ± 0.54 vs. 13.58 ± 0.33, MPO (U/g): 6.91 ± 0.51 vs. 9.43 ± 1.15, $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. In addition, the serum levels of CK and LDH in burn group increased to 37.8 folds and 7.4 folds respectively (both $P < 0.01$). MLT treatment reduced CK by 32.9% and reduced LDH by 21.2% ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusion** MLT treatment exerts the protective effect on myocardial injury in severely-burned rats, which is attributed predominantly to its inhibition on burn-induced oxidative stress injury.

【Key words】 Melatonin; Burn injury; Myocardial tissue; Oxidative stress; Rat

心肌损害是烧伤早期较严重的并发症之一,表

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.12.014

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2010CM066);山东省高等学校科技计划项目(J10LC16);山东省青岛市科技计划基础研究项目(10-3-4-3-9-jch)

作者单位:266071 山东,青岛大学医学院生理学教研室

通信作者:韩晓华,Email: xiaohua.han@163.com

现为心脏收缩能力降低、心排血量(CO)减少、心律失常甚至心力衰竭(心衰),在烧伤休克的发生发展中起重要作用^[1-2]。有研究表明:心肌损害的发生可能与烧伤后缺血缺氧性损伤及氧化应激损伤、局部肾素-血管紧张素系统(RAS)激活以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放有关^[3-5]。由于常规补液并不能

完全消除烧伤后组织缺血缺氧性损伤,近年来早期应用抗氧化剂受到重视^[6]。褪黑激素(MLT)是由松果体分泌的神经-内分泌激素,多种细胞或动物模型中被证明是很强的抗氧化剂^[7-8],在烧伤早期器官功能损伤中起重要作用^[9-11]。本研究采用 30% 总体表面积(TBSA)Ⅲ度烧伤大鼠模型,探讨 MLT 治疗对烧伤后心肌损害的保护作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器:MLT、硫代巴比妥酸、1,1,3,3-四乙氧基丙烷、还原型辅酶Ⅱ(NADPH)、二硫硝基苯、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽还原酶、过氧化氢酶为美国 Sigma 公司产品,其余试剂为国产分析纯。Genesys 2 型分光光度计(美国 Thermo 公司),Cobas Fara II 型全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司)。

1.2 实验动物及烧伤模型制备:健康雄性 SD 大鼠 30 只〔青岛市药品检验所动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鲁)20030010〕,体重 200~250 g,按照随机数字表法分为假伤组、烧伤组及 MLT 组 3 组,每组 10 只。腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉动物后背部剃毛。烧伤组及 MLT 组大鼠背部皮肤浸入沸水中 15 s 造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤复制烧伤模型;假伤组大鼠背部浸入 37℃水中 15 s 假烫伤。所有动物于伤后立即腹腔注射溶剂(1%乙醇生理盐水)或 MLT(10 mg/kg),30 min 后再给予 15 ml 生理盐水补液。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学要求。

1.3 标本采集及测定:伤后 6 h 鼠尾取血后断头处死。取 200 mg 心肌组织,冰浴下剪碎匀浆,离心取上清,测定丙二醛(MDA,硫代巴比妥酸比色法^[12])、GSH(Griffith 法^[13])、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px, Flohe 法^[14])、髓过氧化物酶(MPO, Grisham 法^[15])活性,血清肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)水平用全自动生化分析仪测定。

1.4 统计学分析:所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 Prism 3.0 进行单因素方差分析,两组之间比较采用 Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLT 对烧伤后心肌组织 MDA、GSH、GSH-Px 和 MPO 水平的影响(表 1):与假伤组比较,烧伤后心肌组织 MDA 水平升高了 66.7%,而 GSH 含量下降了 27.8%,GSH-Px 呈轻度下降,MPO 活性则增加至 2.8 倍($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。MLT 治疗使 MDA、MPO 分别降低了 42.6% 和 26.7%,GSH 升高了 26.9%($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对 GSH-Px 活性无明显影响。提示严重烧伤后心肌组织产生明显的氧化应激损伤;早期 MLT 治疗可改善上述异常。

2.2 MLT 对烧伤后血清 CK 及 LDH 水平的影响(表 1):与假伤组比较,烧伤后血清 CK 和 LDH 水平分别增加至 37.8 倍和 7.4 倍(均 $P < 0.01$);MLT 治疗使二者分别降低了 32.9% 及 21.2%($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。以上结果说明 MLT 对烧伤后心肌损害具有一定保护作用。

3 讨论

氧化应激是导致烧伤后心肌损伤的重要机制之一,心肌组织内大量产生的自由基至少来自 2 条途径:①组织缺血缺氧性损害:严重烧伤后血管通透性增加,大量血浆外渗、血容量锐减可导致组织缺血缺氧。本实验中大鼠虽然进行了液体复苏,但由于烧伤早期液体的渗出非常迅速而腹腔内液体吸收相对缓慢,实际上形成了一种非典型缺血/再灌注模型。②炎症介质的释放作用:大量释放入血的炎症介质(如白细胞介素-1、TNF- α)及心肌局部释放的 TNF- α ,促使中性粒细胞(PMN)在心肌内聚集、活化,PMN 可通过释放各种蛋白水解酶和氧自由基引起组织损伤^[3,10]。内源性抗氧化剂(如 GSH、维生素 E)被大量消耗,抗氧化酶如 GSH-Px、超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,导致机体抗氧化能力低下,加重自由基中介的组织损伤。

MLT 为强效抗氧化剂,可清除机体内各种自由基,如羟自由基、脂质过氧化物、超氧阴离子及 H₂O₂ 等^[7-8],尤其是对体内毒性最强的羟自由基清除能力,为内源性抗氧化剂 GSH 的 4 倍,是维生素 E 的 2 倍^[8]。此外,MLT 还可增加细胞内多种抗氧化酶

表 1 MLT 对严重烧伤大鼠心肌组织 MDA、GSH、GSH-Px、MPO 及血清 CK、LDH 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	心肌组织				血清	
		MDA(nmol/mg)	GSH(nmol/mg)	GSH-Px(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	MPO(U/g)	CK(U/L)	LDH(U/L)
假伤组	10	0.93 ± 0.05	18.82 ± 0.55	93.79 ± 3.76	3.41 ± 0.27	54.3 ± 83.0	344.3 ± 39.0
烧伤组	10	1.55 ± 0.17 ^a	13.58 ± 0.33 ^a	74.04 ± 3.42 ^b	9.43 ± 1.15 ^a	2053.0 ± 275.4 ^a	2566.0 ± 183.4 ^a
MLT 组	10	0.89 ± 0.08 ^d	17.23 ± 0.54 ^{bd}	75.24 ± 7.24 ^b	6.91 ± 0.51 ^{ac}	1377.0 ± 135.0 ^{ac}	2021.0 ± 107.5 ^{ad}

注:MLT:褪黑激素,MDA:丙二醛,GSH:还原型谷胱甘肽,GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶,MPO:髓过氧化物酶,CK:肌酸激酶,LDH:乳酸脱氢酶;与假伤组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与烧伤组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

(如 GSH-Px、SOD) 活性, 提高机体抗氧化水平^[7]。在烧伤动物模型中, MLT 也具有很强的抗氧化作用, 如 Sener 等^[9]发现 MLT 可明显改善烧伤后肺、肝及肾脏的氧化应激损伤; 本课题组^[10]及张俊毅等^[11]也分别报道了 MLT 对大鼠烧伤后肾损害及急性肺损伤的保护作用, 该作用与 MLT 强大的自由基清除作用密切相关。但是 MLT 与烧伤后心肌损害的关系尚未见报道。

本研究中观察到, 大鼠烧伤后心肌 MDA 明显升高, 而 GSH 含量、GSH-Px 活性下降, MPO 明显升高, 表明严重烧伤后心肌存在明显的氧化应激损伤。MLT 治疗可改善上述大多数异常 (GSH-Px 除外), 提示 MLT 在心肌中的抗氧化作用主要与其强大的自由基清除能力有关。此外, MLT 明显抑制了烧伤后显著升高的 MPO 活性, 说明它的心肌保护作用可能和减少 PMN 介导的组织损伤有关。

血清心肌酶学标志物 (如 CK、LDH) 是诊断烧伤后心肌损伤的重要手段之一。大鼠烧伤 6 h 后血清 CK 和 LDH 水平显著提高, 表明烧伤早期即可出现心肌损伤; 经过 MLT 治疗后明显降低二者的血清水平, 说明 MLT 对烧伤后心肌损害具有一定的保护作用。

综上所述, MLT 治疗能明显抑制烧伤诱导的氧化应激反应, 从而对伤后心肌产生一定的保护作用。由于该药无明显的毒副作用^[7], 可作为烧伤抗氧化治疗中很有前途的候选药物之一。

参考文献

- [1] 黄跃生, 李志清, 吴庆云, 等. 缺血缺氧在大鼠烧伤后“休克心”中的作用及其机制探讨. 中华创伤杂志, 2002, 18: 205-209.
- [2] Knobloch K. Non-invasive hemodynamic monitoring in burn shock resuscitation. Burns, 2010, 36: 1135-1136.
- [3] 卫伟, 夏照帆. 烧伤后的氧化应激研究进展. 中华外科杂志, 2005, 43: 192-194.

- [4] Maass DL, Hybki DP, White J, et al. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. Shock, 2002, 17: 293-299.
- [5] 吕根法, 石宏伟, 樊磊, 等. 胰岛素强化治疗拮抗烧伤大鼠心肌细胞凋亡的机制研究. 中国危重病急救医学, 2011, 23: 714-717.
- [6] Berger MM, Soguel L, Shenkin A, et al. Influence of early antioxidant supplements on clinical evolution and organ function in critically ill cardiac surgery, major trauma, and subarachnoid hemorrhage patients. Crit Care, 2008, 12: R101.
- [7] Vijayalaxmi T, Thomas CR Jr, Reiter RJ, et al. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. J Clin Oncol, 2002, 20: 2575-2601.
- [8] Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. J Pineal Res, 1993, 14: 151-168.
- [9] Sener G, Sehirli AO, Satiroglu H, et al. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. Burns, 2002, 28: 419-425.
- [10] 韩晓华, 温冠清, 徐珞. 褪黑激素对严重烧伤早期肾功能损害的保护作用. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 721-723.
- [11] 张俊毅, 丁春华, 凌亦凌, 等. 褪黑素抑制大鼠急性肺损伤时核转录因子-kB 的表达. 中国危重病急救医学, 2008, 20: 604-606.
- [12] Cruz RJ Jr, Harada T, Sasatomi E, et al. Effects of ethyl pyruvate and other alpha-keto carboxylic acid derivatives in a rat model of multivisceral ischemia and reperfusion. J Surg Res, 2011, 165: 151-157.
- [13] Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem, 1980, 106: 207-212.
- [14] Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, 1984, 105: 114-121.
- [15] Grisham MB, Benoit JN, Granger DN. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. Methods Enzymol, 1990, 186: 729-742.

(收稿日期: 2012-03-09) (本文编辑: 李银平)

· 科研新闻速递 ·

电刺激迷走神经对大鼠短暂局限性脑缺血预后的影响

最近美国科学家观察了电刺激迷走神经对大鼠短暂局限性脑缺血后 3 周内梗死面积和神经修复的作用。实验分为电刺激迷走神经组和对照组, 每组 10 只。先分离右侧迷走神经后结扎近端大脑中动脉制备大鼠短暂脑缺血模型。电刺激迷走神经组于结扎 30 min 后电刺激右侧迷走神经 (20 Hz, 每隔 5 min 刺激 10 min, 共 60 min); 对照组除无迷走神经刺激外, 其余操作同电刺激迷走神经组。于大脑中动脉结扎后 24 h、48 h 和 1、2、3 周对所有动物进行神经学评分, 处死动物后取材, 病理切片评价神经损伤程度。结果发现: 与对照组相比, 电刺激迷走神经组脑缺血面积明显较小 ($P < 0.02$); 尽管在 3 周的观察中, 两组动物神经元评分均有一定程度的增高, 但电刺激迷走神经组动物神经元评分显著高于对照组 ($P < 0.05$)。缺血过程中, 电刺激迷走神经组和对照组动物大脑中动脉血供范围内的脑组织血流量无统计学差异 [正常水平的 $(31.9 \pm 10.4)\%$ 比 $(29.9 \pm 9.1)\%$, $P = 0.6$]。研究人员认为, 在缺血早期进行电刺激迷走神经对短暂局限性缺血具有神经保护作用, 该保护作用至少可持续 3 周。

杜明华, 编译自《J Neurosci Res》, 2012, 90: 887-894; 胡森, 审校