

内皮素 1 与一氧化氮对大鼠严重烧伤后早期心功能迅即变化的影响

李百姓 黄跃生 尹泽钢

【摘要】 目的 了解内皮素 1 和 NO 是否参与严重烧伤后早期心功能的迅即变化。 **方法** (1)取 31 只 Wistar 大鼠,按随机数字表法分为假伤 A 组(7 只)、烧伤 A 组(10 只)、非选择性内皮素 A/B 受体拮抗剂 PD142893 组(7 只)和选择性内皮素 A 受体拮抗剂 BQ-123 组(7 只)。后 3 组大鼠制成 30% TBSA Ⅲ度烧伤模型,其中 PD142893 组和 BQ-123 组伤后即刻分别经静脉给予 PD142893(0.1 mg/kg)和 BQ-123(30 nmol · kg⁻¹ · min⁻¹)。假伤 A 组除致假伤外,其余处理同烧伤 A 组。采用生理信号采集处理系统,监测假伤 A 组和烧伤 A 组大鼠伤前及伤后 10、30、60、180 min 时的左心室收缩压(LVSP)、心率、左心室压力最大上升/下降速率(LV ± dp/dt max);计算 4 组大鼠伤后 10 min 上述各项心功能指标较各自伤前值变化的百分率。(2)另取 20 只 Wistar 大鼠,按随机数字表法分为假伤 B 组(4 只)和烧伤 B 组(16 只),同前致伤。烧伤 B 组分别于伤后 10、30、60、180 min(每时相点 4 只)取心脏组织,假伤 B 组伤后即刻取心脏组织,用 ELISA 法检测内皮素 1 和 NO 含量。 **结果** (1)与伤前值比较,烧伤 A 组大鼠伤后 10 min LVSP、心率、LV + dp/dt max、LV - dp/dt max 即明显下降(F 值分别为 7.14、16.40、14.09、14.98, P < 0.05 或 P < 0.01)。假伤 A 组大鼠受伤前后 4 项心功能指标无明显变化(F 值依次为 0.59、0.51、1.03、1.04, P 值均大于 0.05)。(2)与伤前值比较,伤后 10 min 烧伤 A 组 LVSP 下降 27%、心率下降 14%、LV + dp/dt max 下降 51%、LV - dp/dt max 下降 50%。PD142893 组伤后 10 min LVSP 下降 14%、心率升高 4%、LV + dp/dt max 下降 31%、LV - dp/dt max 下降 14%,与烧伤 A 组相比各指标变化情况显著改善(F 值分别为 8.10、6.50、23.67、10.39, P < 0.05 或 P < 0.01)。BQ-123 组大鼠心率较伤前升高 3%、LV - dp/dt max 下降 26%,与烧伤 A 组相比明显改善(F 值分别为 6.50、10.39, P < 0.05 或 P < 0.01);其 LVSP 和 LV + dp/dt max 变化百分率与烧伤 A 组接近(F 值分别为 8.10、23.67, P 值均大于 0.05)。(3)与假伤 B 组相比,烧伤 B 组伤后 10、60、180 min 心肌组织内皮素 1 含量均升高(F = 2.85, P < 0.05 或 P < 0.01),NO 含量于伤后 60、180 min 明显升高(F = 1.87, P 值均小于 0.05)。 **结论** 内皮素 1 可能参与了大鼠严重烧伤后早期心功能的迅即下降,在伤后立即出现的心肌损害中起重要作用。

【关键词】 烧伤; 一氧化氮; 心脏; 内皮素 1

Influence of endothelin-1 and NO on the instant change in cardiac function of rats at early stage of severe burn Li Bai-xing, HUANG Yue-sheng, YIN Ze-gang. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: HUANG Yue-sheng, Email: yshuang.tmmu@gmail.com, Tel: 023-68754173

【Abstract】 Objective To explore whether endothelin-1 and NO are involved in the instant changes in cardiac function at early stage of severe burn. **Methods** (1) Thirty-one Wistar rats were divided into sham burn A group (SA, n = 7), burn A group (BA, n = 10), non-selective endothelin A/B receptor antagonist PD142893 group (n = 7), and the selective endothelin A receptor antagonist BQ-123 group (n = 7) according to the random number table. Rats in the latter three groups were inflicted with 30% TBSA full-thickness burn. Immediately after injury, rats in PD142893 group and BQ-123 group were intravenously injected with PD142893 (0.1 mg/kg) and BQ-123 (30 nmol · kg⁻¹ · min⁻¹) respectively. Rats in SA group were treated the same as rats in BA group except for sham injury. The cardiac function indexes of rats in BA and SA groups including left ventricular systolic pressure (LVSP), heart rate (HR) and LV ± dp/dt max were monitored before injury and 10, 30, 60, 180 minutes post injury (PIM) using physiological signal ac-

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.01.005

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ200806)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:黄跃生,Email:yshuang.tmmu@gmail.com,电话:023-68754173

quisition and processing system. The respective changes in cardiac function indexes of rats in each group between PIM 10 and pre-injury in the value of percentage were calculated. (2) Another 20 Wistar rats were enrolled and divided into sham burn B group (SB, $n = 4$) and burn B group (BB, $n = 16$) according to the random number table, and they were subjected to above-mentioned injury. Heart tissues of rats in BB group were obtained at PIM 10, 30, 60, and 180 respectively (4 rats at each time point), and that in SB group were obtained immediately after injury. Endothelin-1 and NO contents in heart tissues were determined with ELISA. **Results** (1) Compared with the pre-injury value, LVSP, HR, LV + dp/dt max, LV - dp/dt max of rats in BA group decreased significantly since PIM 10 (with F value respectively 7.14, 16.40, 14.09, 14.98, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). No significant change was observed in above 4 indexes in rats of SB group between above mentioned two time points (with F value respectively 0.59, 0.51, 1.03, 1.04, P values all above 0.05). (2) In BA group, compared with the pre-injury value, LVSP decreased 27%, HR decreased 14%, LV + dp/dt max decreased 51%, LV - dp/dt max decreased 50% at PIM 10. Compared with those in BA group at PIM 10, cardiac function indexes were improved significantly in PD142893 group, with LVSP decreased 14% ($F = 8.10$, $P < 0.01$), HR increased 4% ($F = 6.50$, $P < 0.01$), LV + dp/dt max decreased 31% ($F = 23.67$, $P < 0.05$), LV - dp/dt max decreased 14% ($F = 10.39$, $P < 0.01$). In BQ-123 group, compared with the pre-injury value, HR increased 3%, LV - dp/dt max decreased 26% at PIM 10, which were obviously improved as compared with those in BA group (with F value respectively 6.50 and 10.39, $P < 0.05$ or $P < 0.01$); the percentage changes of LVSP and LV + dp/dt max in BQ-123 group were close to that in BA group (with F value respectively 8.10 and 23.67, P values both above 0.05). (3) Compared with those in SB group, myocardial tissue endothelin-1 content of rats in BB group increased significantly at PIM 10, 60, 180 ($F = 2.85$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and NO content increased significantly at PIM 60, 180 ($F = 1.87$, with P values all below 0.05). **Conclusions** Endothelin-1 may participate in the instant decline of cardiac function of rats at early stage of severe burn, and plays an important role in the instant myocardial damage after injury.

【Key words】 Burns; Nitric Oxide; Heart; Endothelin 1

以往研究表明,大鼠严重烧伤后迅速出现心功能下降^[1],但早期心肌迅即损害和功能降低的机制尚未阐明。本文观察内皮素 1 和 NO 是否参与大鼠严重烧伤后早期心功能迅即变化,拟为了解早期心肌迅即损害的机制和探寻临床防治手段提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

健康雄性 Wistar 大鼠 51 只,体质量 250 ~ 300 g,由第三军医大学实验动物中心提供。非选择性内皮素 A/B 受体拮抗剂 PD142893 购自瑞士 Alexis 公司,选择性内皮素 A 受体拮抗剂 BQ-123 购自德国 Calbiochem 公司,大鼠内皮素 1、NO ELISA 试剂盒购自美国 USCN LIFE 公司。RM6240B 型生理信号采集处理系统购自成都仪器厂,550 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司,TJ-2A 型单通道微量注射泵购自保定兰格恒流泵有限公司。

1.2 心功能实验

1.2.1 实验分组及处理 取 31 只大鼠,按随机数字表法分为假伤 A 组(7 只)、烧伤 A 组(10 只)、PD142893 组(7 只)和 BQ-123 组(7 只)。(1)烧伤 A 组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,背部剃毛,固定,用静脉留置针由右颈总动脉插管达左心室后,连接生理信号采集处理系统记录基础值(伤

前值),肝素帽封管。然后由大鼠大隐静脉插管,肝素帽封管,用于静脉给药。行上述处理后,将大鼠浸于 98 °C 热水 18 s,造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤)。伤后进行如下处理:按 Parkland 公式腹腔注射乳酸林格液抗休克($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \% \text{ TBSA}^{-1}$),伤后即刻给予 24 h 总量的 1/4;连接生理信号采集处理系统连续监测,并立即用单通道微量注射泵推注生理盐水(1 mL/kg)10 min。(2)PD142893 组、BQ-123 组同前致烧伤,除伤后即刻分别经静脉给予 PD142893(0.1 mg/kg)^[2]、BQ-123($30 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)^[3]外,其余处理同烧伤 A 组。(3)假伤 A 组除浸于 37 °C 温水模仿致伤过程外,其余处理同烧伤 A 组。

1.2.2 心功能监测 (1)提取假伤 A 组和烧伤 A 组大鼠伤前及伤后 10、30、60、180 min 的多项心功能指标数据,包括:左心室收缩压(LVSP)、心率、左心室压力最大上升/下降速率($\text{LV} \pm \text{dp/dt max}$)。(2)根据(1)的结果,以伤后 10 min 为观察时相点,提取 PD142893 组、BQ-123 组该时相点的各项心功能指标数据,并计算假伤 A 组、烧伤 A 组、PD142893 组、BQ-123 组伤后 10 min 较各自伤前值变化的百分率,公式:(伤后 10 min 值 - 伤前值) ÷ 伤前值 × 100%。

1.3 心肌组织内皮素 1 和 NO 测定

1.3.1 实验分组、标本采集及处理 另取 20 只

大鼠,按随机数字表法分为假伤 B 组(4 只)和烧伤 B 组(16 只)。2 组致伤模型制作方法同 1.2.1。烧伤 B 组分别于伤后 10、30、60、180 min(每时相点 4 只)开胸取心脏,用 4 ℃ 生理盐水洗去血液,去除大血管及心房组织,吸干水分,液氮中保存待测。假伤 B 组伤后即刻同上采集心肌组织标本保存待测。

1.3.2 ELISA 检测 取 0.1 g 心肌组织,加入 1 mL 4 ℃ 预冷的匀浆介质^[4]匀浆后,4 ℃,1500 × g 离心 10 min。收集上清液,分别按内皮素 1、NO ELISA 试剂盒说明书操作。用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度值,根据标准曲线计算内皮素 1、NO 含量。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析和重复测量的方差分析。

2 结果

2.1 心功能指标变化

(1)烧伤 A 组:与伤前比较,伤后 10 min LVSP 即明显下降 ($F = 7.14, P < 0.01$),30、60 min 回升,180 min 时再次下降 ($F = 7.14, P < 0.01$)。心率于伤后 10 min 开始下降 ($F = 16.40, P < 0.05$),此后持续降低,180 min 时达到最低值 ($F = 16.40, P > 0.05$)。见图 1。

$P < 0.01$)。LV + dp/dt max 伤后 10 min 下降 ($F = 14.09, P < 0.01$),30、60 min 回升但仍明显低于伤前值 ($F = 14.09, P < 0.01$),180 min 时再次降低 ($F = 14.09, P < 0.01$)。LV - dp/dt max 变化趋势同 LV + dp/dt max ($F = 14.98, P$ 值均小于 0.01)。(2)假伤 A 组:伤后 LVSP、心率、LV + dp/dt max 以及 LV - dp/dt max 较伤前无明显变化 (F 值各为 0.59、0.51、1.03、1.04, P 值均大于 0.05)。见表 1。

2.2 心功能指标变化百分率

与伤前值比较,伤后 10 min,烧伤 A 组大鼠 LVSP 下降 27%,心率下降 14%,LV + dp/dt max 下降 51%,LV - dp/dt max 下降 50%。与烧伤 A 组相比,PD142893 组伤后 10 min 各指标变化情况显著改善,LVSP 下降 14% ($F = 8.10, P < 0.01$),心率升高 4% ($F = 6.50, P < 0.01$),LV + dp/dt max 下降 31% ($F = 23.67, P < 0.05$),LV - dp/dt max 下降 14% ($F = 10.39, P < 0.01$)。BQ-123 组大鼠的心率和 LV - dp/dt max 与烧伤 A 组相比明显改善,心率较伤前升高 3% ($F = 6.50, P < 0.01$),LV - dp/dt max 下降 26% ($F = 10.39, P < 0.05$);但是其 LVSP 以及 LV + dp/dt max 变化百分率与烧伤 A 组接近,分别下降 21% ($F = 8.10, P > 0.05$) 和 46% ($F = 23.67, P > 0.05$)。见图 1。

表 1 2 组大鼠心功能指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	LVSP(mm Hg)	心率(次/min)	LV + dp/dt max(mm Hg/s)	LV - dp/dt max(mm Hg/s)
假伤 A 组	7				
伤前		129.1 ± 1.7	423 ± 13	10 097 ± 495	5809 ± 499
伤后 10 min		123.6 ± 2.2	434 ± 18	11 110 ± 671	5920 ± 461
伤后 30 min		123.2 ± 4.6	406 ± 14	10 276 ± 396	6167 ± 566
伤后 60 min		125.8 ± 4.3	405 ± 17	11 157 ± 520	6453 ± 538
伤后 180 min		130.7 ± 6.8	409 ± 23	10 179 ± 455	7266 ± 752
烧伤 A 组	10				
伤前		134.7 ± 4.3	426 ± 13	11 006 ± 409	6975 ± 410
伤后 10 min		101.7 ± 5.7 ^b	385 ± 14 ^a	5855 ± 546 ^b	3680 ± 342 ^b
伤后 30 min		122.1 ± 8.8	383 ± 8 ^a	8154 ± 547 ^b	4888 ± 330 ^b
伤后 60 min		124.1 ± 5.1	374 ± 14 ^b	8372 ± 522 ^b	4791 ± 276 ^b
伤后 180 min		114.1 ± 4.9 ^b	289 ± 12 ^b	6443 ± 634 ^b	3996 ± 286 ^b

注:LVSP 为左心室收缩压, LV ± dp/dt max 为左心室压力最大上升/下降速率;1 mm Hg = 0.133 kPa;与组内伤前值比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

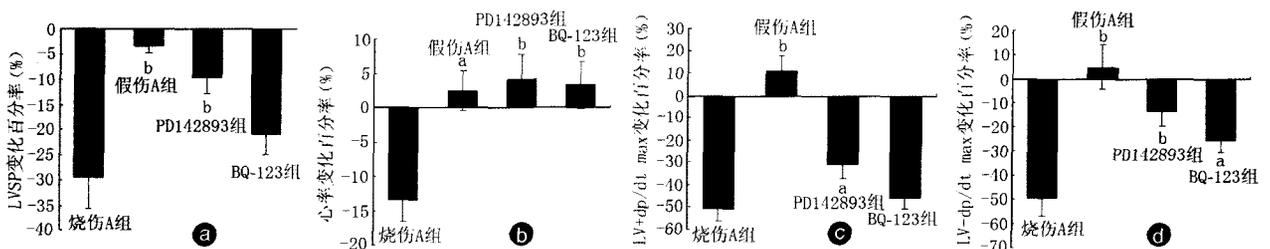


图 1 4 组大鼠伤后 10 min 心功能指标变化百分率。LVSP 为左心室收缩压, LV ± dp/dt max 为左心室压力最大上升/下降速率;与烧伤 A 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.3 心肌组织内皮素 1 和 NO 含量的变化

与假伤 B 组相比,烧伤 B 组伤后 10、60、180 min 心肌组织内皮素 1 含量均升高 ($F = 2.85$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), NO 含量于伤后 60、180 min 明显升高 ($F = 1.87$, P 值均小于 0.05)。见表 2。

表 2 2 组大鼠心肌组织内皮素 1 及 NO 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	内皮素 1 (pg/g)	NO (nmol/mL)
假伤 B 组	4	1777 ± 67	115 ± 20
烧伤 B 组			
伤后 10 min	4	2063 ± 22 ^a	151 ± 22
伤后 30 min	4	2002 ± 59	154 ± 11
伤后 60 min	4	2167 ± 86 ^b	161 ± 13 ^a
伤后 180 min	4	2095 ± 105 ^a	165 ± 8 ^a

注:与假伤 B 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

3 讨论

本研究结果显示,大鼠严重烧伤后 10 min 心功能急剧下降至最低点,这可能是严重烧伤休克和缺血缺氧的重要启动因素之一,因为心功能开始下降的时间早于血管通透性开始下降的时间(伤后 2~3 h)^[5]。此外由本研究结果可知,伤后 10 min 大鼠心肌组织内皮素 1 含量增加。在如此短暂的时间内,机体不可能合成新的内皮素 1,只能动用内皮细胞储存粒中储存的内皮素 1。细胞分泌的内皮素 1 主要在局部以自分泌和旁分泌的方式发挥作用^[6]。它有内皮素 A 和内皮素 B 2 种受体,前一受体介导血管收缩和细胞增殖等生物学行为,后者作用则相反。内皮素 1 通过内皮素 B 受体增加 NO 的释放量,而释放的 NO 可抑制内皮细胞释放内皮素 1^[7]。但本研究观察到,大鼠严重烧伤后某些时相点内皮素 1 和 NO 均升高,可能的原因为伤后内皮功能紊乱,内皮调节失调,正常状态下的内皮素 1 与 NO 分泌调节被破坏。可以证明心脏内皮调节失调的最直接证据是冠状动脉血流量和冠状动脉阻力异常^[8],因此欲进一步验证这一推测,可检测大鼠伤后心脏血流灌注情况。

伤后 10 min,大鼠心脏内皮素 1 含量增加显著而 NO 含量无明显改变,由此推测内皮素 1 可能参与了伤后 10 min 心脏功能的抑制。为验证此观点,我们分别应用非选择性内皮素 A/B 受体拮抗剂及内皮素 A 受体拮抗剂阻断内皮素 1 受体,观察心功能的变化。内皮素 1 对心功能的影响目前仍存在争议,有学者应用 2 种内皮素 B 受体激动剂 sarafotoxin-6c 和 IRL1620,分别引起正性肌力和负性肌力 2 种相反作用^[9]。Chu 等^[10]观察到内皮素 1 可与内源性去甲肾上腺素相互作用,去甲肾上腺素在组织

中的浓度决定内皮素 1 是增强还是减弱血管收缩性。本研究结果显示,应用 PD142893 后,伤后 10 min 大鼠心功能下降程度明显减轻,而 BQ-123 作用弱于 PD142893,其可能的原因是内皮素 B 受体也参与了伤后心功能抑制。如进一步观察内皮素 1 拮抗剂对伤后 180 min 心功能及心脏血流变化的影响,将更有助于了解该机制。

需要说明的是,因考虑到本研究的目的是观察内皮素 1 对心功能的作用,不论内皮素 1 水平升高或降低,只要给予足够剂量的拮抗剂,就可减轻内皮素 1 的作用,所以我们未观察阻断内皮素 1 受体之后心肌内皮素 1 和 NO 含量的变化。

综上所述,内皮素 1 可能参与了严重烧伤后早期迅即出现的心功能变化的发生,这为揭示严重烧伤后早期心肌迅即损害的机制、探寻其临床防治策略提供了重要参考资料。

参考文献

- [1] 雷泽源,黄跃生,肖蓉,等. 大鼠严重烧伤早期 RAS 的变化对心功能及心肌损害的影响. 第三军医大学学报, 2008, 30 (19): 1779-1783.
- [2] Liu LM, Ward JA, Dubick MA. Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin. Shock, 2003, 19 (3): 208-214.
- [3] Nitescu N, Grimberg E, Ricksten SE, et al. Endothelin B receptors preserve renal blood flow in a normotensive model of endotoxin-induced acute kidney dysfunction. Shock, 2008, 29 (3): 402-409.
- [4] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature, 2000, 405 (6785): 458-462.
- [5] 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. 中华烧伤杂志, 2006, 22 (3): 161-163.
- [6] Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, et al. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. Pharmacol Ther, 2006, 111 (2): 508-531.
- [7] Alonso D, Radomski MW. The nitric oxide-endothelin-1 connection. Heart Fail Rev, 2003, 8 (1): 107-115.
- [8] Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. Circulation, 2005, 111 (3): 363-368.
- [9] Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Inotropic effects of ETB receptor stimulation and their modulation by endocardial endothelium, NO, and prostaglandins. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287 (3): H1194-1199.
- [10] Chu L, Takahashi R, Norota I, et al. Signal transduction and Ca²⁺ signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium. Circ Res, 2003, 92 (9): 1024-1032.

(收稿日期:2009-11-20)

(本文编辑:罗勤)