

· 早期脏器损害 ·

牛磺酸对严重烧伤大鼠心肌损害的保护作用

万福生 李国辉

【摘要】 目的 观察牛磺酸(Tau)对严重烧伤大鼠心肌损害的作用。 方法 将 Wistar 大鼠随机分为对照组(10 只,不致伤)、烧伤组(60 只)和 Tau 治疗组(60 只)。后两组大鼠造成 30% TBSA III 度烫伤(以下称烧伤),烧伤组伤后常规补液,Tau 治疗组伤后腹腔注射 Tau 400 mg/kg。于两组烧伤大鼠伤后 1、3、6、12、24、48 h 检测其血浆中心肌肌钙蛋白 T(cTnT)、丙二醛(MDA)的含量以及血浆、心肌组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管紧张素 II(Ang II)的含量、心肌钙离子水平,用透射电镜观察心肌组织形态结构变化,并与对照组的上述指标进行比较。将烧伤组大鼠血浆 TNF- α 、Ang II 检测结果分别与 cTnT 检测结果作相关性分析。 结果 烧伤组大鼠伤后 3 h 起血浆 cTnT 水平较对照组(0.16 ± 0.03) $\mu\text{g/L}$ 显著升高 ($P < 0.01$),12 h 达峰值(6.32 ± 0.41) $\mu\text{g/L}$,48 h 仍显著高于对照组 ($P < 0.01$)。烧伤组伤后 3—48 h 血浆 MDA 含量及心肌钙离子水平明显高于对照组 ($P < 0.01$);伤后 6—48 h 血浆和心肌组织 TNF- α 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$);血浆及心肌组织中 Ang II 水平分别于伤后 1—24 h、3—24 h 明显高于对照组 ($P < 0.01$)。Tau 治疗组上述指标在伤后多数时相点明显低于烧伤组 ($P < 0.01$)。烧伤组大鼠伤后早期心肌肌丝断裂溶解、线粒体肿胀、嵴减少,Tau 治疗组心肌组织接近正常。烧伤组大鼠血浆 TNF- α 、Ang II 浓度变化与 cTnT 之间呈显著正相关 (r 分别为 0.87 和 0.82, $P < 0.05$)。 结论 Tau 能抑制严重烧伤大鼠 cTnT、MDA、TNF- α 和 Ang II 的生成及心肌细胞内钙超载,对心肌损害有较好的保护作用。

【关键词】 烧伤; 牛磺酸; 心肌

Protective effects of taurine on myocardial injury in severely burned rats WAN Fu-sheng * LI Guo-hui.

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of taurine on myocardial injury in severely scalded rats. Methods A total of 130 healthy adult Wistar rats were randomly divided into 3 groups: the control group (C, without burns), the burn group (B, subjected to a 30% TBSA III degree scalding) and the treatment group (T, treated with intraperitoneal injection of taurine (400 mg/kg) immediately after scald injury). The plasma and myocardial tissue samples in B and T groups were harvested at 1, 3, 6, 12, 24 and 48 postburn hours (PBH) for the determination of the contents of cardiac troponin T (cTnT), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and angiotensin II (Ang II) in plasma, and the contents of TNF- α , Ang II and calcium in myocardial tissue. The morphological change in the myocardial tissue was observed with transmission electronic microscope (TEM) and was compared with that in C group. The changes in the plasma TNF- α and Ang II were analyzed in relation to that of plasma cTnT. Results The plasma cTnT content in B group at 3 PBH was markedly higher than that in C group ($0.16 \pm 0.03 \mu\text{g/L}$) ($P < 0.01$), and it peaked (6.32 ± 0.41) at 12 PBH and remained at high level at 48 PBH. While the plasma MDA content and the calcium level in B group were evidently higher than those in C group during 3 to 48 PBH ($P < 0.01$). The TNF- α contents in plasma and myocardial tissue during 6 to 48 PBH were significantly higher than those in C group ($P < 0.01$). The Ang II contents in plasma and myocardial tissue during 3 to 24 PBH were obviously higher than those in C group ($P < 0.01$). All the indices in T group were significantly lower than those in B group ($P < 0.01$). Histological examination revealed that there was myocardial damage in various degrees during early postburn stage in B group, such as focal dissolution and fragmentation of myofilament, mitochondrial edema, myocyte sarcoplasmic protrusions like piano keys. But all the above changes in T group were evidently ameliorated to near normal. There was close positive correlation between the change in the concentrations of plasma content of TNF- α and Ang II and cTnT in B group ($r = 0.87$ and 0.82 , $P < 0.05$). Conclusion The production of TNF- α , MDA, cTnT, Ang II and high calcium level of myocardiocytes in severely burned rats can be inhibited by taurine, which was beneficial in the management of myocardial injury after severe burns.

【Key words】 Burns; Taurine; Myocardium

心肌损害是烧伤后较严重的并发症之一,也是

加重烧伤后休克、导致多脏器功能损害的重要原因之一^[1]。研究显示,心肌局部肾素-血管紧张素系统(RAS)被激活和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)均与烧伤后心肌损害的发生有关^[2,3]。牛磺酸(taurine, Tau)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30060029)

作者单位:330006 南昌,江西医学院生物化学与分子生物学教研室(万福生);江西医学院附属第一医院烧伤科(李国辉)

是一种内源性细胞保护剂,对心肌缺血及再灌注损伤有较好的保护作用^[4],但对烧伤后心肌损害的作用目前鲜见报道。本研究采用烧伤大鼠模型,观察 Tau 治疗前后大鼠心肌超微结构和血浆及(或)心肌组织中心肌肌钙蛋白 T(cTnT)、丙二醛(MDA)、TNF-α、血管紧张素 II(Ang II)以及钙离子含量的变化,旨在探讨 Tau 对烧伤大鼠心肌损害的作用。

材 料 与 方 法

1. 动物模型制作:健康成年 Wistar 大鼠(江西医学院实验动物中心)130 只,雌雄各半,体重(240 ± 15)g,随机分为对照组(10 只)、烧伤组(60 只)和 Tau 治疗组(60 只)。后两组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,背部及体侧用 100 g/L 硫化钠脱毛,置 92 °C 水浴中 18 s,造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤)。烧伤组大鼠伤后腹腔注射等渗盐水 3 ml · kg⁻¹ · 1% TBSA⁻¹,将总量的一半分为两等份,分别于伤后即时和伤后 4 h 注入;另一半分为 4 等份,于伤后 8、12、16、24 h 注入。Tau 治疗组大鼠伤后立即腹腔注射 Tau(400 mg/kg),并在伤后 6、12、24 h 再各注射 1 次。对照组除不烧伤外,其余处理同烧伤组。

2. 标本采集与处理:两组烧伤大鼠于伤后 1、3、6、12、24、48 h 断头处死,每时相点 10 只;另处死对照组大鼠。大鼠断头后立即取血,离心半径 8.5 cm,1 000 r/min 离心 5 min,分离血浆,-80 °C 保存备用。取大鼠心肌组织,加入 9 倍体积的等渗盐水制成匀浆,离心后取上清,-80 °C 保存待检。

3. 血浆 cTnT 及 MDA 含量的检测:取大鼠血浆

标本,用酶联免疫吸附测定法检测 cTnT 含量,试剂盒由美国 Bioehringer Mannheim 公司提供;采用硫代巴比妥法检测 MDA 含量,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

4. 血浆和心肌 TNF-α、AngII 含量的测定:取大鼠血浆及心肌组织匀浆液上清,采用 TNF-α 和 AngII 放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所),用 SN-697 型全自动双探头放射免疫 γ 计数器(上海原子核研究所日环仪器一厂)测定其放射活性。

5. 心肌组织形态观察及钙离子含量的测定:取大鼠左心室肌,用常规方法制备电镜标本,在日本日立公司 H-600 型透射电镜下观察心肌形态学变化。心肌组织钙离子含量的测定采用原子吸收分光光度法,所用仪器为 Z28000 塞曼效应原子吸收分光光度仪(日本日立公司)。

6. 统计学处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。将烧伤组大鼠血浆 TNF-α、Ang II 检测结果分别与其血浆 cTnT 检测结果作相关性分析。

结 果

1. 血浆 cTnT、MDA、TNF-α 及 Ang II 含量的变化:烧伤组大鼠伤后 3—48 h 血浆 cTnT 及 MDA 含量均明显高于对照组($P < 0.01$),其中 cTnT 于 12 h 达峰值,MDA 于 6 h 达峰值。烧伤组血浆 TNF-α 水平伤后 6—48 h 明显高于对照组($P < 0.01$),12 h 时达峰值;Ang II 水平伤后 1—24 h 明显高于对照组($P < 0.01$),6 h 达峰值。Tau 治疗组上述指标在伤后多数时相点明显低于烧伤组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血浆 cTnT、MDA、TNF-α 及 Ang II 含量的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 The changes in the plasma contents of cTnT, TNF-α, MDA and Ang II in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	cTnT(μg/L)	MDA(nmol/L)	TNF-α(pmol/L)	Ang II(μg/L)
对照组	10	0.16 ± 0.03	3.6 ± 0.8	7.2 ± 1.2	0.854 ± 0.122
烧伤组					
伤后 1 h	10	0.43 ± 0.03	4.8 ± 1.0	8.1 ± 1.4	0.176 ± 0.019 [#]
伤后 3 h	10	1.87 ± 0.04 [*]	7.1 ± 1.1 [*]	9.0 ± 1.4	0.638 ± 0.027 [#]
伤后 6 h	10	4.95 ± 0.12 [#]	11.9 ± 1.1 [#]	39.0 ± 5.7 [#]	1.385 ± 0.029 [#]
伤后 12 h	10	6.32 ± 0.41 [#]	9.0 ± 1.0 [#]	87.1 ± 7.2 [#]	0.208 ± 0.236 [#]
伤后 24 h	10	4.51 ± 0.30 [#]	7.8 ± 1.0 [#]	52.0 ± 6.1 [#]	0.166 ± 0.020 [#]
伤后 48 h	10	2.63 ± 0.28 [#]	7.6 ± 1.0 [#]	45.7 ± 8.5 [#]	0.095 ± 0.015
Tau 治疗组					
伤后 1 h	10	0.18 ± 0.03	4.3 ± 0.7	7.1 ± 1.4	0.091 ± 0.013 [*]
伤后 3 h	10	0.21 ± 0.03 [*]	4.2 ± 0.8 [*]	8.1 ± 1.4	0.136 ± 0.013 [*]
伤后 6 h	10	0.85 ± 0.14 [*]	5.7 ± 1.1 [*]	11.6 ± 1.5 [*]	0.675 ± 0.031 [*]
伤后 12 h	10	0.97 ± 0.14 [*]	4.6 ± 0.8 [*]	20.8 ± 2.1 [*]	0.121 ± 0.015 [*]
伤后 24 h	10	0.95 ± 0.12 [*]	4.3 ± 0.8 [*]	15.9 ± 2.1 [*]	0.110 ± 0.013 [*]
伤后 48 h	10	0.62 ± 0.11 [*]	4.6 ± 0.8 [*]	16.4 ± 2.0 [*]	0.090 ± 0.013

注:与烧伤组同时相点比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,# $P < 0.01$

2. 心肌组织中 TNF- α 、Ang II 及钙离子含量的变化:烧伤组大鼠伤后 6 h 起心肌 TNF- α 含量较对照组显著升高,12 h 达峰值,48 h 仍维持在较高水平 ($P < 0.01$);心肌 Ang II 含量伤后 3 h 显著升高,6 h 达峰值,24 h 时仍高于对照组 ($P < 0.01$);钙离子含量伤后 3 h 显著升高,6 h 达峰值,48 h 时仍保持较高水平 ($P < 0.01$)。Tau 治疗组上述指标在伤后部分时相点较烧伤组明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠心肌组织中 TNF- α 、Ang II 及钙离子含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The changes in myocardial contents of TNF- α , Ang II and calcium in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	TNF- α ($\mu\text{g/g}$)	Ang II (ng/g)	钙离子 (mg/g)
对照组	10	0.85 \pm 0.05	1.23 \pm 0.18	0.075 \pm 0.006
烧伤组				
伤后 1 h	10	0.82 \pm 0.08	1.38 \pm 0.15	0.087 \pm 0.008
伤后 3 h	10	0.88 \pm 0.08	2.15 \pm 0.17 [#]	0.158 \pm 0.010 [#]
伤后 6 h	10	1.98 \pm 0.08 [#]	4.63 \pm 0.20 [#]	0.329 \pm 0.019 [#]
伤后 12 h	10	3.33 \pm 0.18 [#]	3.85 \pm 0.21 [#]	0.316 \pm 0.019 [#]
伤后 24 h	10	2.85 \pm 0.15 [#]	2.21 \pm 0.19 [#]	0.269 \pm 0.018 [#]
伤后 48 h	10	2.63 \pm 0.16 [#]	1.50 \pm 0.15	0.266 \pm 0.021 [#]
Tau 治疗组				
伤后 1 h	10	0.81 \pm 0.05	1.35 \pm 0.14	0.079 \pm 0.007
伤后 3 h	10	0.82 \pm 0.07	1.47 \pm 0.14 [*]	0.083 \pm 0.007 [#]
伤后 6 h	10	0.97 \pm 0.06 [*]	2.65 \pm 0.17 [*]	0.239 \pm 0.011 [#]
伤后 12 h	10	1.15 \pm 0.08 [*]	1.88 \pm 0.18 [*]	0.110 \pm 0.011 [#]
伤后 24 h	10	1.08 \pm 0.08 [*]	1.65 \pm 0.14	0.082 \pm 0.008 [#]
伤后 48 h	10	0.98 \pm 0.10	1.32 \pm 0.19	0.085 \pm 0.010

注:与烧伤组同时相点比较,* $P < 0.01$;与对照组比较,# $P < 0.01$

3. 心肌超微结构变化:烧伤组大鼠伤后 6—48 h 心肌结构均发生改变,其中 12 h 最明显,表现为肌丝断裂;细胞核肿胀,内容物减少;线粒体肿胀,嵴减少甚至形成空泡(图 1);心肌肌膜向间质突起呈“琴键”状(图 2)。Tau 治疗组心肌结构基本正常(图 3)。

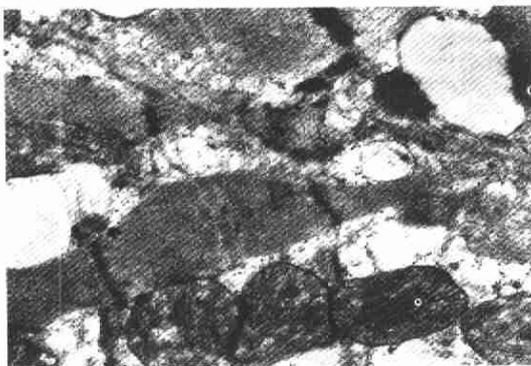


图 1 伤后 12 h 烧伤组大鼠心肌结构紊乱,线粒体空泡化,肌丝断裂 透射电镜 $\times 25\ 000$

Fig 1 There exhibited confused myocardial structure, vacuolization of mitochondria and fragmentation of myofilament in B group at 12 postburn hours TEM $\times 25\ 000$

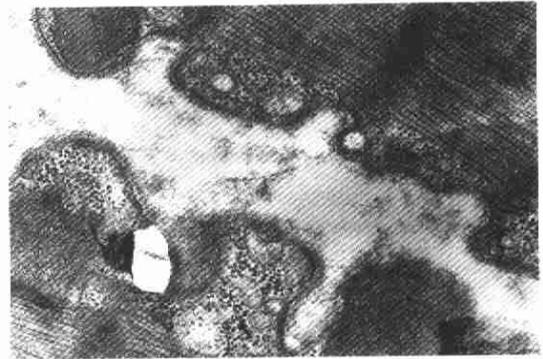


图 2 伤后 12 h 烧伤组大鼠心肌肌膜形成“琴键”样突起 透射电镜 $\times 25\ 000$

Fig 2 There exhibited myocyte sarcolemmal protrude like piano key in B group at 12 postburn hours TEM $\times 25\ 000$



图 3 伤后 12 h Tau 治疗组大鼠心肌细胞结构基本正常 透射电镜 $\times 25\ 000$

Fig 3 The myocardial structure of the rats in T group was nearly normal at 12 postburn hours TEM $\times 25\ 000$

4. 相关性分析:烧伤组大鼠血浆 TNF- α 、Ang II 浓度变化与 cTnT 之间存在显著正相关(r 分别为 0.87 和 0.82, $P < 0.05$)。

讨 论

大量临床及动物实验表明,严重烧伤后早期即存在心肌损害,且有学者提出了“休克心”概念^[1,5,6],值得人们高度重视。血浆 cTnT 浓度是反映心肌结构损伤程度的敏感指标之一。一般而言,血浆 cTnT 水平超过 0.5 $\mu\text{g/L}$ 则视为有心肌细胞损害^[7]。本实验结果显示,Tau 治疗组大鼠血浆 cTnT 水平较烧伤组明显降低,表明 Tau 对烧伤后心肌损害有较好的保护作用。

已有研究表明,烧伤后心肌损害与 TNF- α 等炎性细胞因子、RAS 激活及细胞内钙离子超载有关^[1,3,8,9]。本实验检测了烧伤大鼠血浆、心肌中 TNF- α 和 Ang II 及心肌中钙离子的含量,结果表明,烧伤组伤后 6 h 起血浆及心肌中 TNF- α 含量明显升高;而血浆 Ang II 含量在伤后 1 h 显著升高,心肌 Ang II 于伤后 3 h 显著升高。可见,大鼠烧伤后无论在其血浆还是心肌中,Ang II 水平升高均早于

TNF- α 。相关性分析结果表明,烧伤组大鼠血浆 TNF- α 、Ang II 浓度变化均与 cTnT 之间存在显著正相关,提示 TNF- α 和 Ang II 在大鼠烧伤后心肌损害的发生与发展过程中起着重要作用。TNF- α 主要由激活的单核-巨噬细胞系统产生,心肌也可分泌 TNF- α ,且心肌细胞膜上存在 TNF- α 受体,可见,心肌细胞既是 TNF- α 的分泌场所,也是其作用的靶细胞。TNF- α 具有多种生物学作用,可直接抑制心肌收缩,破坏钙稳态,参与心肌结构损伤。Tau 治疗组血浆和心肌中 TNF- α 和 Ang II 含量较烧伤组均有显著性降低,表明 Tau 对大鼠烧伤后血浆及心肌中 TNF- α 、Ang II 浓度升高有较好的抑制作用。

近年来有研究证实,Tau 具有调节细胞内钙稳态、抗氧化、抗炎及增强心肌收缩力等功能,是一种良好的内源性细胞保护剂,对心血管细胞有良好的保护作用,已用于心肌炎、心肌缺血、充血性心力衰竭及心律失常等心血管疾病的治疗^[10,11]。Tau 防治烧伤后心肌损伤的机制,一是 Tau 既能抑制由 Ang II 引起的细胞内钙超载,又能抑制烧伤后大鼠血浆及心肌中 Ang II 浓度升高。Ang II 是 RAS 激活后的主要活性物质之一,可抑制心肌内质网对钙的摄取与释放,促进细胞外钙内流,导致细胞内钙超载,而细胞内钙超载是导致心肌细胞损害的重要原因之一。研究显示,Ang II 还可诱导心肌细胞凋亡,而 Tau 能够抑制由 Ang II 引起的细胞凋亡^[12]。其二是 Tau 可抑制由内毒素/脂多糖(LPS)引起的白细胞与微血管内皮之间的黏附,从而抑制白细胞向血管外游走进入组织引起炎症^[13],还能下调中性粒细胞炎症介质的产生与释放^[14],这是 Tau 能降低烧伤大鼠心肌和血浆中 TNF- α 水平的重要原因。其三是 Tau 具有抗脂质过氧化、清除自由基、保护线粒体结构与功能的作用^[4],而线粒体膜结构与功能的完整性丧失是细胞不可逆性损伤的早期重要标志。另外,笔者还观察到 Tau 对严重烧伤大鼠心肌细胞信号转导通路——丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族成员 p38 激酶的激活有一定的拮抗作用(另文发表),这可能是 Tau 能降低烧伤大鼠心肌和血浆中 TNF- α 含量的又一原因。

MAPKs 是多种外界应激刺激因素(如缺血、缺氧、细胞因子等)诱发细胞产生效应的重要信号通路,凡是兴奋 G 蛋白偶联受体的物质(如血管紧张素、儿茶酚胺和内皮素等)和激活酪氨酸蛋白激酶的物质(如生长因子及其他细胞因子等)刺激细胞时,都要通过 MAPKs 通路,其中 p38 激酶主要参与细胞的应激反应,它不但可以促进 TNF- α 和白细胞介素 1(IL-1)等炎性细胞因子的分泌与释放,而且也促进细胞凋亡。有关 Tau 调节 p38 激酶及抑制 TNF- α 分泌与释放的具体机制,值得深入研究。

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”中的作用及其机制研究. 中华创伤杂志, 2002, 18: 205 - 209.
- 2 Maass DL, Hybki DP, White J, et al. The time course of cardiac NF-kappa B activation and TNF—alpha secretion by myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. Shock, 2002, 17: 293 - 299.
- 3 黄跃生. 烧伤后早期心肌损害的分子机制及防治研究进展. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 257 - 259.
- 4 万福生,刘波,赵小曼,等. 牛磺酸对大鼠在体缺血再灌注心肌线粒体呼吸酶系的影响. 基础医学与临床, 2000, 20: 333 - 335.
- 5 王水明,刘友生,陈锐. 严重缺氧后心肌细胞损害敏感性的分子机制. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 134 - 136.
- 6 张家平,黄跃生,刘敬,等. 烫伤大鼠心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶的活化及胞内分布规律的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 137 - 140.
- 7 汪涛,何为虎. 烧伤患者血清心肌钙蛋白 T 变化的临床意义. 中华烧伤杂志, 2000, 16: 147 - 149.
- 8 Badorf C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. Circulation, 2003, 107: 1024 - 1032.
- 9 黄跃生,杨宗城,迟路湘,等. 烧伤后“休克心”的研究. 中华烧伤杂志, 2000, 16: 275 - 278.
- 10 葛慧,陶亮,刘培庆,等. 牛磺酸对血管紧张素 II 改变心肌细胞内游离 Ca²⁺ 浓度作用的影响. 中国应用生理学杂志, 2000, 16: 26 - 29.
- 11 宿燕凤,杨英珍,陈灏珠. 牛磺酸及其在心血管系统疾病中的应用. 国外医学心血管病分册, 1996, 23: 138 - 141.
- 12 李华,万福生,杨薇,等. 牛磺酸对心肌细胞凋亡的保护及其机制. 南昌大学学报, 2004, 28: 170 - 173.
- 13 Egan BM, Chen G, Kelly CJ, et al. Taurine attenuates LPS-induced rolling and adhesion in rat microcirculation. J Surg Res, 2001, 95: 85 - 91.
- 14 Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, et al. Taurine chloramines down-regulate the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. Immunopharmacology, 1998, 40: 27 - 38.

(收稿日期:2004-08-15)

(本文编辑:罗勤)

读者·作者·编者

本刊对生物体内压力计量单位表示方法的要求

论文中生物体内的压力应用“mm Hg”或“cm H₂O”表示,并在首次出现时注明它们与 kPa 的换算关系(1 mm Hg = 0.133 kPa, 1 cm H₂O = 0.098 kPa)。如文稿的统计数据是以 kPa 表示时,请按 1 kPa = 7.5 mm Hg、1 kPa = 10.2 cm H₂O 进行相应换算后再投稿。