

赵桂香,刘志强,古丽扎尔·吐尔逊. 截肢手术创伤对大鼠心脏电生理、心功能及 eNOS 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 79-87.

Zhao GX, Liu ZQ, Gurizal TS. Effects of amputation trauma on cardiac electrophysiology, cardiac function, and the endothelial nitric oxide synthase pathway in rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 79-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.013

截肢手术创伤对大鼠心脏电生理、心功能及 eNOS 通路的影响

赵桂香¹,刘志强²,古丽扎尔·吐尔逊³

(1.新疆医科大学第六附属医院心血管内科,乌鲁木齐 830002; 2.新疆医科大学第一附属医院心内管内科,乌鲁木齐 830054; 3.新疆喀什疏勒县解放军第 947 医院特诊科,新疆 喀什 844200)

【摘要】 目的 探究大鼠经截肢创伤后心脏电生理、心功能变化情况及其与内皮型一氧化氮合酶/一氧化氮(eNOS/NO)通路的关系。**方法** 建立左后肢创伤模型,将大鼠分为正常组(仅麻醉)、截肢对照组、截肢 0.25 h、截肢 0.5 h、截肢 0.75 h、截肢 1.5 h,每组 12 只。采用心电图(ECG)检测大鼠心率、QT 间期、PR 间期变化;超声检测左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS);右侧颈动脉插管检测左心室收缩压(LVSP)、左心室内压升高最高速率(+dp/dt max)、左心室内压降低最高速率(-dp/dtmax);试剂盒检测血清和心肌组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、髓过氧化物酶(MPO)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素-6(IL-6)水平;苏木精—伊红染色法(HE)染色观察心肌组织形态学变化;末端标记法(TUNEL)染色法观察心肌组织细胞凋亡情况;蛋白免疫印迹法检测心肌组织中 eNOS、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达。**结果** 与正常组相比,截肢 0.5 h、截肢 0.75 h 心率升高、QT 间期降低, LVSP、+dp/dmax、-dp/dmax、LVEF、LVFS 降低, MPO、MDA、TNF-α、IL-6 升高, SOD 降低,细胞排列疏松呈坏死状,伴有大量炎性细胞浸润;心肌细胞凋亡指数升高,心肌组织 Bcl-2 蛋白表达降低、Bax 蛋白表达升高, NO 水平、eNOS 蛋白表达降低,呈时间依赖性,差异具有显著性($P<0.05$);与截肢 0.75 h 相比,截肢 1.5 h 心率降低,QT 间期、PR 间期升高, LVSP、+dp/dmax、-dp/dmax、LVEF、LVFS 升高, MPO、MDA、SOD、TNF-α、IL-6 降低,心肌病理损伤程度有所减轻;心肌细胞凋亡指数降低, Bcl-2 蛋白表达升高, Bax 蛋白表达降低, NO 水平、eNOS 蛋白表达升高,差异具有显著性($P<0.05$)。**结论** 截肢手术创伤可使大鼠发生缺血性心电图改变,心功能受损及过度氧化应激、炎症损伤,其机制可能与 eNOS/NO 通路受到抑制有关。

【关键词】 截肢手术创伤;心功能;心电图;内皮型一氧化氮合酶;一氧化氮;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0079-09

Effects of amputation trauma on cardiac electrophysiology, cardiac function, and the endothelial nitric oxide synthase pathway in rats

ZHAO Guixiang¹, LIU Zhiqiang², GURIZAL Tulson³

(1. Department of Cardiology, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China.
2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054.
3. Department of Special Diagnosis, 947 Hospital of PLA, Shule County, Kashgar, Xinjiang 844200)

【基金项目】新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2018D001C315)。

【作者简介】赵桂香(1975—),女,本科,副主任医师,从事心血管疾病临床诊治研究。E-mail: zq217218219@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes in cardiac electrophysiology and cardiac function in rats after limb amputation and their relationships with the endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide (eNOS/NO) pathway.

Methods Seventy-two healthy 8-week old male Wistar rats were divided into the normal group (anesthesia only), amputation control, amputation 0.25 h, amputation 0.5 h, amputation 0.75 h, and amputation 1.5 h groups ($n=12$ rats per group). The left hind limb trauma model was established by amputation surgery. Changes in heart rate, QT interval, and PR interval were detected by electrocardiogram; the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening rate (LVFS) were measured by echocardiography; the left ventricular systolic pressure (LVSP), the highest rate of increase of left ventricular pressure ($+dp/dt \max$), and the highest rate of decrease of left ventricular pressure ($-dp/dt \max$) were measured by right carotid artery intubation; the level of malondialdehyde (MDA) in the myocardium was measured with thiobarbituric acid; the level of superoxide dismutase (SOD) was detected by pyrogallol colorimetry; Green's method was used to detect the nitric oxide (NO) levels; levels of myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; hematoxylin and eosin staining was used to observe the histopathological changes in the myocardium; myocardial cell apoptosis was observed by TUNEL staining; and the expression of eNOS, Bcl-2, and Bcl-2-related X protein (Bax) in the myocardium was detected by western blotting.

Results Compared with the normal group, the following changes were observed 0.5 h and 0.75 h after amputation: the heart rate increased, the QT interval decreased, LVSP, $+dp/dt \max$, $-dp/dt \max$, LVEF, and LVFS decreased, MPO, MDA, SOD, TNF- α , and IL-6 increased, and the myocardial cells were loosely arranged, necrotic, and accompanied with a large amount of inflammatory cell infiltration. Moreover, at these same time points, the following significant changes were observed in a time-dependent manner ($P < 0.05$): an increased apoptotic index of cardiomyocytes, decreased expression of Bcl-2 protein in the myocardium, increased expression of Bax protein, and decreased NO level and eNOS protein expression. Compared with 0.75 h after amputation group, the heart rate decreased at 0.5 h after amputation, the QT interval and PR interval increased, LVSP, $+dp/dt \max$, $-dp/dt \max$, LVEF, and LVFS increased, MPO, MDA, SOD, TNF- α , and IL-6 decreased, and the degree of myocardial pathological injury was alleviated. Moreover, significant differences were seen as following: a decreased apoptotic index of cardiomyocytes, increased Bcl-2 and eNOS protein expression, increased NO levels, and decreased Bax protein expression ($P < 0.05$).

Conclusions Amputation trauma causes ischemic electrocardiogram changes, cardiac function damage, excessive oxidative stress, and inflammatory damages in rats. The underlying mechanism may be related to inhibition of the eNOS/NO pathway.

【Keywords】 amputation trauma; cardiac function; electrocardiogram; endothelial nitric oxide synthase; nitric oxide; rat

截肢创伤属于特殊类型的创伤,手术前、后机体会发生应激反应,且延续至术后,损伤患者身体健康,其中心血管系统是截肢创伤应激作用的重要靶器官^[1]。创伤后机体发生炎症反应、氧化应激、Ca 离子超载,导致冠状动脉供血不足、心律失常、心功能受损等^[2]。调查显示^[3],30%术后并发症、50%术后死亡原因均为围术期心血管事件,因此探究截肢创伤心功能变化情况对于临床治疗、预防围术期心血管事件,提高患者预后具有积极的意义。eNOS/NO 通路在维持血管舒张、白细胞黏附以及抑制血小板凝集中发挥重要作用,多项研究指出该通路激活后对心肌缺血再灌注损伤中具有保护作用^[4-5],然而 eNOS/NO 通路与截肢创伤后心功能的关系,目前尚不清楚,本研究通过复制左后肢截肢创伤模型,观察大鼠心脏电生理、心功能变化情

况,并初步探究作用机制,以期对截肢创伤后心血管系统机制研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

72 只健康清洁级雄性 Wistar 大鼠,8 周龄,体重 220 ~ 260 g,购于新疆医科大学基础研究室, [SCXK2015-0001] [SYXK (新)2016-0008]。严格遵循动物伦理,伦理审批号: IACUC20170005,统一在温度 25℃,湿度 50% ~ 60%,自然光照条件下喂养,期间大鼠自由饮水摄食,饲养 1 周后用于研究。

1.2 主要试剂与仪器

髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 检测试剂盒 (上海抚生实业有限公司,货号: A002097); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A003-1、A001-3);一氧化氮(NO)含量检测试剂盒(北京 Solarbio 公司;货号:BC1475);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、苏木精—伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究,货号:P5318、PI326、C0105);Tunel 染色试剂盒(Roche 公司,瑞士,货号:11684817910);RIPA 组织裂解液(碧云天生物技术研究,货号:P0013C);B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)一抗(R&D 公司,美国,货号:AF810, AF820);eNOS、 β -actin 一抗(CST, 美国,货号:9572、4967);MP-150 型生理信号采集系统(Biopac, 美国);VEVO3100 小动物超声检测仪(VisualSonics, 加拿大);ChemiDox XRS 型凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国);XSP-BM21AY 荧光显微镜(Olympus, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备^[6]

采用 3% 异戊巴比妥钠以 80 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,采取仰卧位,切开左侧腹股沟皮肤,游离股动静脉,于腹壁牵动静脉结扎,在膝关节上方 1.3 cm 处将股静脉与股动脉之外其它结构完全切除,最终将股静脉与股动脉剪断,复制左后肢创伤模型。

1.3.2 动物分组

将大鼠分为正常组(仅麻醉不进行截肢处理),截肢对照组、截肢 0.25 h、截肢 0.5 h、截肢 0.75 h、截肢 1.5 h,每组 12 只大鼠。

1.3.3 大鼠心电图(electrocardiogram, ECG)检测

用 3% 异戊巴比妥钠 80 mg/kg 麻醉大鼠后,利用生理信号采集系统行 ECG 检测,于皮下插入针型电极,记录标准 II 导联心电图,频率设定为 10 kHz,扫描速率设定为 200 ms,观察心率、QT 间期、PR 间期变化情况。

1.3.4 超声检测左心室功能

3% 异戊巴比妥钠麻醉大鼠后,利用彩色多普勒超声检测仪,获取左心室长轴切面二维图像,对大鼠左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS),连续检测至少 3 个完整心动周期,求得平均值。

1.3.5 大鼠血流动力学检测

大鼠麻醉后,迅速将右颈总动脉分离,于远心端用丝线结扎,右侧颈动脉插管用 40 U/mL 肝素生理盐水浸润导管,观察压力曲线,待曲线呈正弦波形稳定 10 min 后检测左心室收缩压(Leftventricular Left ventricular systolic pressuere, LVSP),左心室内压降低最高速率(+dp/dt max)以及左心室内压降低最高速率(-dp/dtmax)。

1.3.6 样本采集

采集各组大鼠尾静脉血,3000 r/min 离心 10 min,收集上清液-20℃ 保存备用。采集尾静脉血后,麻醉处死,迅速获取左心室心肌,将外膜脂肪除去后,一部分置于-80℃ 保存;一部分置于 4% 多聚甲醛中固定。

1.3.7 指标检测

严格按照试剂盒说明,检测血清和心肌组织中 MPO、MDA、SOD、NO、TNF- α 、IL-6 水平。MPO 活性:1 g 心肌组织湿片在 37℃ 环境中被分解 1 μ mol 过氧化氢为 1 U/g。MDA 采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法。SOD 水平采用邻苯三酚比色法;NO 水采用 Green 法^[7];TNF- α 和 IL-6 采用酶联免疫吸附法。

1.3.8 HE 染色观察心肌组织形态学变化

常规制备石蜡切片,常规脱蜡脱水后,进行苏木精染色,10 min 后水洗后,0.5% 盐酸乙醇中分化后水洗,氨水中显蓝 30 s 后水洗,伊红染液复染 2 min,水洗后梯度乙醇水合、二甲苯透明、中性树脂封片后,置于显微镜下观察心肌组织变化情况。

1.3.9 末端标记法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)法检测心肌组织细胞凋亡

常规制备石蜡切片,根据 TUNEL 试剂盒说明进行操作,检测心肌组织细胞凋亡情况。凋亡细胞在荧光显微镜下发绿色荧光,观察并保存图片,采用 Image-J 软件定量分析细胞凋亡指数,凋亡指数(apoptotic index, AI)=细胞凋亡数量/细胞总数 $\times$ 100%。

1.3.10 蛋白免疫印迹法检测心肌组织 eNOS、Bcl-2、Bax 蛋白表达

取出冻存心肌组织,采用 RIPA 组织裂解液提取蛋白,离心后,采用 BCA 法检测蛋白含量,采用 SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白,将蛋白凝胶移至 PVDF 膜上行转膜反应,脱脂牛奶封闭后添加 eNOS、Bcl-2、Bax、 β -actin 一抗抗体(稀释倍数为 1:500),4℃ 过夜孵育,添加 HRP 标记二抗(稀释倍数为 1:5000),室温下孵育 2 h,采用 ECL 发光液进行

曝光显影,于凝胶成像仪中观察条带,将 β -actin 为内参蛋白,用 Image Pro-Plus 软件定量分析相对表达量。

1.4 统计学处理

本研究数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验,以 $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 截肢手术后大鼠 ECG 变化情况

与正常组相比,截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 大鼠心率、QT 间期、PR 间期无显著变化,差异无显著性($P>0.05$);截肢后 0.5 h,截肢后 0.75 h 心率逐渐升高、QT 间期、PR 间期逐渐降低,差异显著($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比,截肢后 1.5 h 心率降低,QT 间期、PR 间期升高,差异显著($P<0.05$)。见表 1。

2.2 截肢后大鼠心功能及血流动力学指标变化情况

与正常组相比,截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 大鼠 LVSP、+dp/dmax、-dp/dmax、LVEF、LVFS 无显著变化,差异无显著性($P>0.05$);截肢后 0.5 h,截肢后 0.75 h LVSP、+dp/dmax、-dp/dmax、LVEF、LVFS 逐渐降低,差异显著($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比,截肢后 1.5 h LVSP、+dp/dmax、-dp/dmax、LVEF、LVFS 升高,差异显著($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠 EGG 检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 1 Comparison of EGG changes in the rats of each group

组别 Groups	正常组 Normal group	截肢对照组 Amputation control group	截肢 0.25 h 组 Amputation 0.25 h group	截肢 0.5 h 组 Amputation 0.5 h group	截肢 0.75 h 组 Amputation 0.75 h group	截肢 1.5 h 组 Amputation 1.5 h group
心率(BPM)H	212.64 $\pm$ 7.75	214.86 $\pm$ 8.45	218.51 $\pm$ 9.47	224.54 $\pm$ 6.06*	230.97 $\pm$ 5.13#	218.28 $\pm$ 4.28#
QT 间期(ms)QT interval	191.24 $\pm$ 7.46	187.37 $\pm$ 7.72	185.18 $\pm$ 6.06	182.71 $\pm$ 5.96*	179.46 $\pm$ 7.02#	185.31 $\pm$ 1.37#
PR 间期(ms)PR interval	69.58 $\pm$ 4.13	68.64 $\pm$ 3.18	65.16 $\pm$ 3.87	64.24 $\pm$ 3.16*	63.47 $\pm$ 3.35#	67.08 $\pm$ 2.59#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与截肢 0.75 h 组比较,# $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group. * $P<0.05$. Compared with the amputation 0.75 h group, # $P<0.05$.

表 2 各组大鼠心功能及血流动力学检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Comparison of the changes of cardiac function and hemodynamics in the rats of different groups

组别 Groups	正常组 Normal group	截肢对照组 Amputation control group	截肢 0.25 h 组 Amputation 0.25 h group	截肢 0.5 h 组 Amputation 0.5 h group	截肢 0.75 h 组 Amputation 0.75 h group	截肢 1.5 h 组 Amputation 1.5 h group
LVSP(mmHg)	90.38 $\pm$ 5.12	88.77 $\pm$ 5.83	87.24 $\pm$ 4.12	85.05 $\pm$ 5.08*	84.27 $\pm$ 4.26*	88.45 $\pm$ 5.32#
+dp/dmax($\times 10^3$ mmHg/s)	5.54 $\pm$ 0.85	5.26 $\pm$ 0.47	5.02 $\pm$ 0.34	4.69 $\pm$ 0.65*	4.47 $\pm$ 0.38*	4.81 $\pm$ 0.32#
-dp/dmax($\times 10^3$ mmHg/s)	4.25 $\pm$ 0.67	4.13 $\pm$ 0.46	3.98 $\pm$ 0.45	3.75 $\pm$ 0.39*	3.58 $\pm$ 0.45*	3.95 $\pm$ 0.39#
LVEF(%)	85.33 $\pm$ 7.87	83.15 $\pm$ 6.96	79.95 $\pm$ 5.31	74.33 $\pm$ 6.28*	73.94 $\pm$ 4.67*	79.75 $\pm$ 5.84#
LVFS(%)	32.52 $\pm$ 4.31	30.42 $\pm$ 4.62	29.63 $\pm$ 5.41	27.89 $\pm$ 6.17*	27.52 $\pm$ 4.37*	30.86 $\pm$ 3.39#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与截肢 0.75 h 组比较,# $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group. * $P<0.05$. Compared with the amputation 0.75 h group, # $P<0.05$.

见表 2。

2.3 截肢后大鼠血清中氧化应激、炎症水平变化情况

与正常组相比,截肢对照组、截肢时及截肢后 0.75 h 大鼠血清 MPO、MDA、SOD、TNF- α 、IL-6 无显著变化($P>0.05$);截肢后 1.5 h MPO、MDA、TNF- α 、IL-6 升高,SOD 降低,差异显著($P<0.05$)。结果如图 1 所示。

2.4 截肢后大鼠心肌组织中氧化应激、炎症水平变化情况

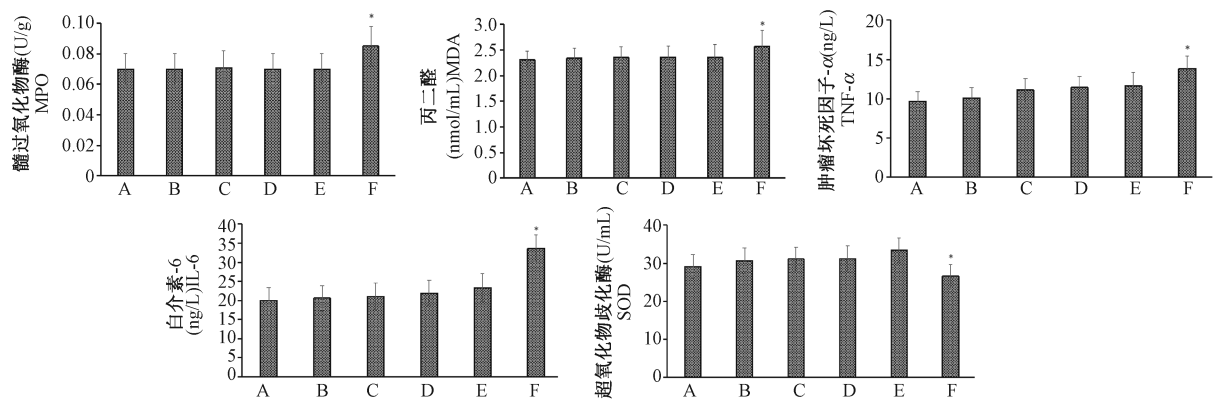
与正常组相比,截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 大鼠 MPO、MDA、SOD、TNF- α 、IL-6 无显著变化($P>0.05$);截肢后 0.5 h、0.75 h MPO、MDA、SOD、TNF- α 、IL-6 升高($P<0.05$),SOD 降低($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比,截肢后 1.5 h MPO、MDA、TNF- α 、IL-6 降低($P<0.05$),SOD 升高($P<0.05$)。结果如图 2 所示。

2.5 各组大鼠心肌组织形态学变化

正常组心肌组织染色均匀,细胞形态规则、排列整齐,未出现明显病理性改变;截肢后 0~0.75 h,细胞排列疏松,伴有大量炎性细胞浸润,细胞呈破碎、坏死状,随着时间的延长,心肌组织病理损伤程度加重。截肢后 1.5 h 后心肌病理损伤程度有所减轻。结果如图 3 所示。

2.6 各组大鼠心肌组织凋亡情况

与正常组相比,截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 心肌细胞凋亡指数无显著变化($P>0.05$);截

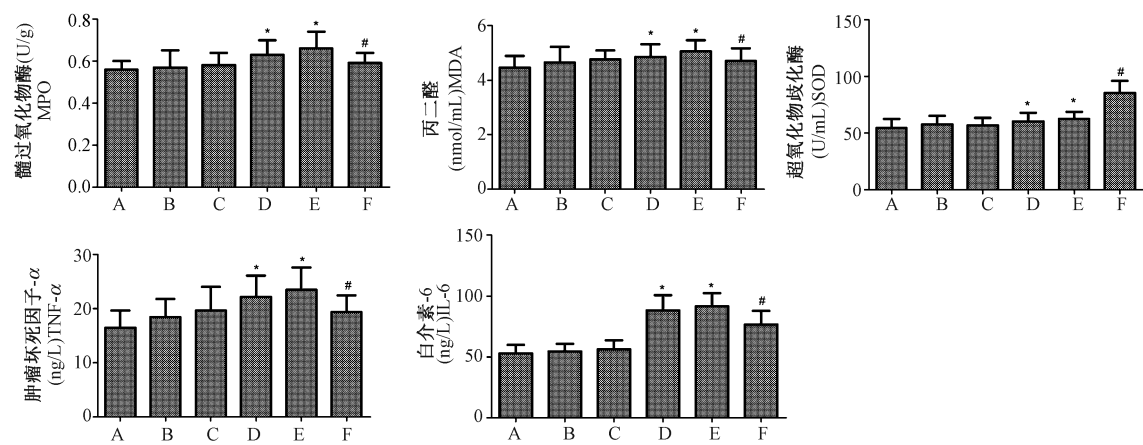


注：A、B、C、D、E、F 分别表示正常组、对照组、0.25 h 组、0.5 h 组、0.75 h 组、1.5 h 组。与正常组比较，* $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠 serum 鼠 MPO、MDA、SOD、TNF-α、IL-6 水平比较

Note. A, B, C, D, E, and F represent the normal group, the control group, the 0.25 h group, the 0.5 h group, the 0.75 h group, and the 1.5 h group, respectively. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 1 Comparison of the MPO, MDA, SOD, TNF- and IL-6 levels in the rat myocardium in each group



注：A、B、C、D、E、F 分别表示正常组、对照组、0.25 h 组、0.5 h 组、0.75 h 组、1.5 h 组。与正常组比较，* $P<0.05$ ；与 0.75 h 组比较，# $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠心肌组织中 MPO、MDA、SOD、TNF-α、IL-6 水平比较

Note. A, B, C, D, E, and F represent the normal group, the control group, the 0.25 h group, the 0.5 h group, the 0.75 h group, and the 1.5 h group, respectively. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the 0.75 h group. # $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of MPO, MDA, SOD, TNF-α and IL-6 levels in myocardium of the rats in each group

肢后 0.5 h、0.75 h 心肌细胞凋亡指数逐渐升高，差异显著($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比，截肢后 1.5 h 心肌细胞凋亡指数降低，差异显著($P<0.05$)。结果如图 4 和图 5 所示。

2.7 心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况

与正常组相比，截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达无显著变化($P>0.05$)；截肢后 0.5 h、0.75 h 组织中 Bcl-2 蛋白表达逐渐降低、Bax 蛋白表达逐渐升高，差异显著($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比，截肢后 1.5 h Bcl-2 蛋白表达升高，Bax 蛋白表达降低，差异显著($P<$

0.05)。结果如图 6 和图 7 所示。

2.8 各组心肌组织中 eNOS/NO 水平变化情况

与正常组相比，截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 心肌组织中 eNOS 蛋白表达无显著变化($P>0.05$)；截肢后 0.5 h、0.75 h 组织中 eNOS 蛋白表达逐渐降低，差异显著($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比，截肢 1.5 h eNOS 蛋白表达升高，差异显著($P<0.05$)；与正常组相比，截肢对照组、截肢时及截肢后 0.25 h 组织中 NO 水平无显著变化($P>0.05$)；截肢后 0.5 h、0.75 h 组织中 NO 水平逐渐降低，差异显著($P<0.05$)。与截肢后 0.75 h 相比，截肢后 1.5

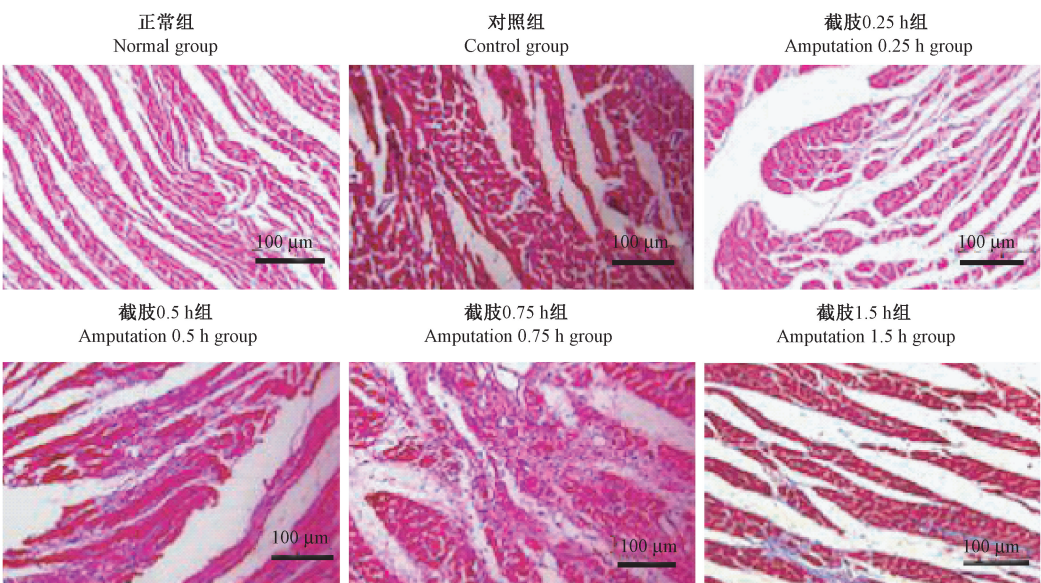


图3 各组大鼠心肌组织的病理学变化。HE 染色。
Figure 3 Histological changes of myocardial tissues in the rats. HE staining

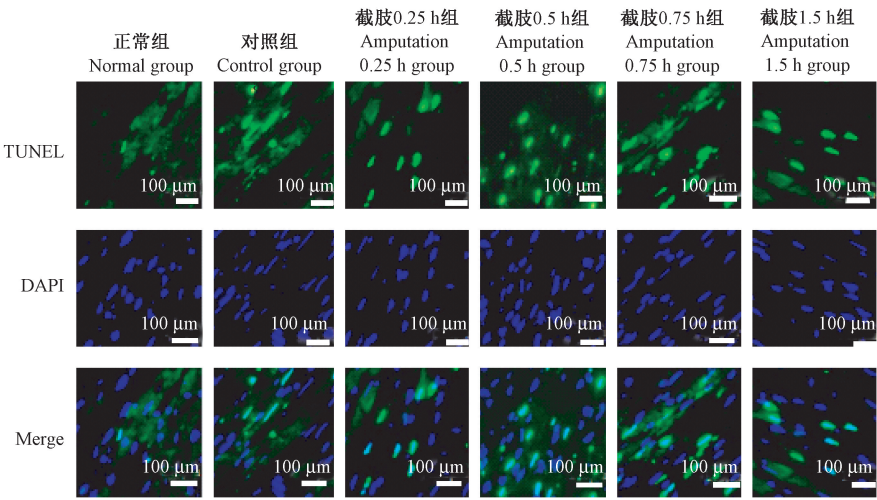


图4 各组大鼠心肌细胞的凋亡状况,TUNEL 染色
Figure 4 Apoptosis in cardiomyocytes cells in the rats of each group. TUNEL staining.

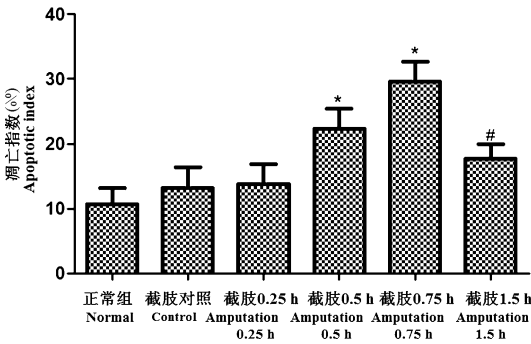
h NO 水平升高,差异显著 ($P<0.05$)。结果如图 8 所示。

3 讨论

截肢手术造成的创伤不但会损伤手术部位肢体,而且对机体重要器官如心、肝、肺等均会有一定程度的损伤。基础研究发现截肢创伤大鼠心肌组织染色后组织伴有炎细胞浸润,电镜提示心肌线粒体结构肿胀,且峭断裂,表明截肢创伤也会造成心脏损害,这可能是创伤后患者发生心律失常以及心功能障碍、心源性猝死的重要原因^[8]。报道显示心律失常在围手术期并发症中发生率为 10% ~

60%^[9]。目前截肢术后心功能损害的发生机制以及治疗方法尚不明确。因此本研究通过探究截肢手术后大鼠电生理、心脏功能损伤情况,并初步阐明截肢创伤后心肌损伤的作用机理。

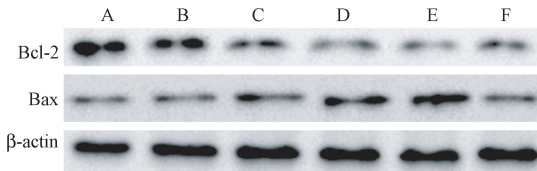
肢体创伤后可使局部组织通透性升高、血管内皮损伤引发机体应激反应与炎症反应,且效应可达心脏,引发心律失常、心肌缺血、心脏功能受损等疾病^[10]。本研究发现与正常大鼠相比,截肢手术后 0 ~ 0.75 h 内大鼠心率加快,PR 间期、QT 间期缩短,提示大鼠截肢创伤后心电图表现异常。LVSP 为评估心肌收缩射血能力的主要指标,+dp/dmax、-dp/dmax 为评估心肌收缩、舒张功能的主要指标,



注:与正常组比较,* $P<0.05$;与 0.75 h 组比较,# $P<0.05$ 。

图 5 各组大鼠心肌细胞凋亡指数的比较
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the 0.75 h group, # $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of the apoptotic indexes of cardiomyocytes in the rats of different groups

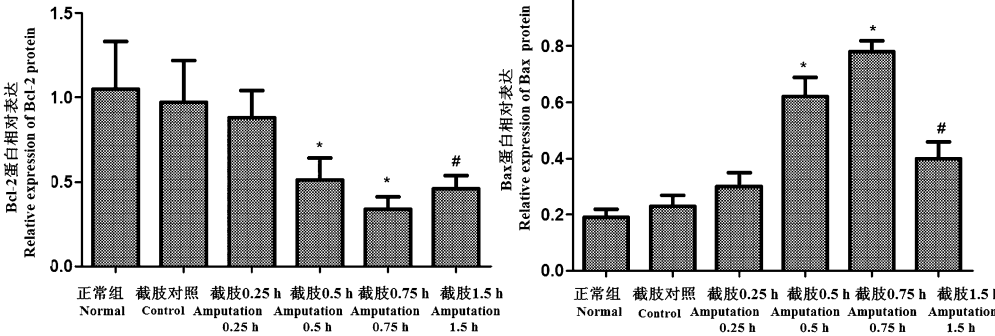


注:A、B、C、D、E、F 分别表示正常组、对照组、0.25 h 组、0.5 h 组、0.75 h 组、1.5 h 组。

图 6 Western blot 检测心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达
Note. A, B, C, D, E, and F represent the normal group, the control group, the 0.25 h group, the 0.5 h group, the 0.75 h group, and the 1.5 h group, respectively.

Figure 6 Expression of Bcl-2 and Bax proteins in the rat myocardial tissues. Western blot.

LVFS、LVEF 均是评估左心室收缩能力的指标,以往研究显示 LVSP、LVFS、LVEF 三者水平的下降均表明左心室收缩能力的降低^[11]。本研究发现截肢后



注:与正常组比较,* $P<0.05$;与截肢 0.75 h 组比较,# $P<0.05$ 。

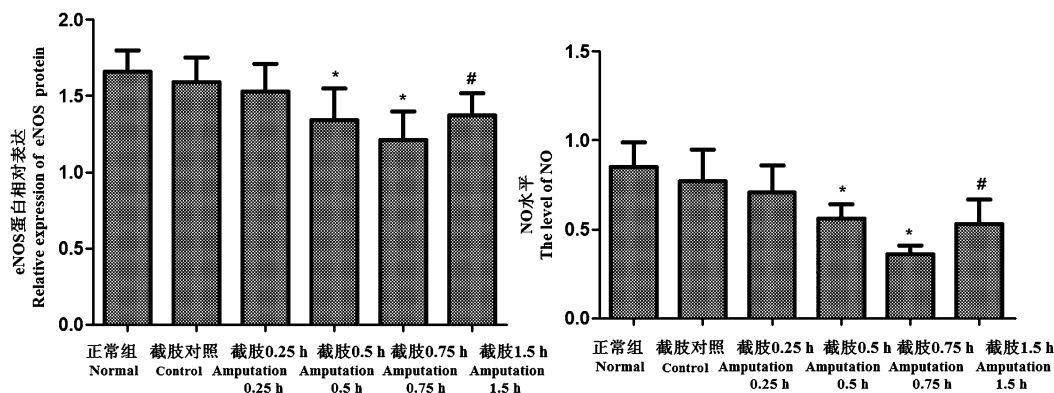
图 7 各组心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

Note.Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the amputation 0.75 h group, # $P<0.05$.

Figure 7 Comparison of the expression of Bcl-2 and Bax proteins in the rat myocardial tissues of each group

大鼠 LVSP、+dp/dmax、-dp/dmax、LVEF、LVFS 水平均降低,且术后 0.75 h 降至最低,1.5 h 水平升高,提示截肢手术会影响大鼠左心室功能,造成左心室舒张、收缩功能降低。本研究进一步通过病理学观察发现截肢后 0~0.75 h,心肌细胞排列疏松,伴有大量炎性细胞浸润,细胞呈破碎、坏死状,随着时间的延长,心肌组织病理损伤程度加重,1.5 h 后心肌病理损伤程度有所减轻,提示截肢后心肌组织出现病理性损伤,进而造成心室功能损伤。

正常生理状态下,体内自由基的合成与清除均处于动态平衡中,当受到病理性损伤后,机体中超氧负离子、羟自由基释放过多,造成膜磷脂、蛋白等氧化反应加剧,生成大量脂质过氧化物,损伤细胞膜完整性,导致细胞代谢功能受到障碍。MDA 为机体中脂质过氧化物代谢产物,因此其水平的高低能够反应组织自由基水平或细胞损伤程度。基础研究显示近期较多研究证实脂质过氧化及自由基生成过多是心肌组织损伤的重要原因,心肌组织受损后,组织中自由基过多无法及时清除,影响心肌细胞的呼吸作用,最后导致细胞死亡^[12-13]。本研究发现创伤后 0~0.75 h 心肌组织中 MDA 升高,SOD 降低,在第 0.75 h 均达到最高值,1.5 h 后 MDA 降低,SOD 水平升高,而通过分析本研究大鼠血清中氧化应激、炎症水平变化情况结果显示,截肢对照组、截肢时及截肢后 0.75 h 大鼠血清 MPO、MDA、SOD、TNF-α、IL-6 无显著变化;截肢 1.5 h MPO、MDA、TNF-α、IL-6 升高,SOD 降低,此结果与心肌组织氧化应激损伤结果有一定的差异,血清中各检测指标在 1.5 h 开始显著变化,而心肌组织在 0.75 h 开始显著变化。与心肌组织相比,血清中各检测指标变



注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与 0.75 h 组比较, # $P < 0.05$ 。
图 8 各组心肌组织中 eNOS 和 NO 水平比较
Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the 0.75 h group, # $P < 0.05$.

Figure 8 Comparison of eNOS and NO levels in the rat myocardial tissues of each group

化时间延迟,由此可以说明心肌组织氧化应激损伤不是由于截肢部位释放的,提示截肢创伤后会造成心肌组织氧化应激损伤,可能是造成截肢创伤后心肌损伤的重要病理学原因。同时也就一步说明创伤后器官损伤会造成炎症反应失控,血管内皮释放较多黏附因子,促进中性粒细胞聚集、黏附,进一步释放大量 TNF- α 、IL-6 等炎症因子,损害组织器官^[14-15]。本研究发现截肢创伤后心肌组织中 0~0.75 h Bcl-2 蛋白表达逐渐降低,Bax 蛋白表达逐渐升高,随后在 1.5 h Bcl-2 蛋白表达升高,Bax 蛋白表达降低,提示截肢创伤后心肌组织中炎症因子水平升高,造成炎性损伤,与 HE 染色结果相符合,提示心肌炎性损伤可能为截肢创伤后心肌手段的重要原因。

心肌组织损伤后可引发心肌细胞凋亡进而加重病理损伤,本研究采用 TUNEL 染色显示,与正常组相比截肢 0.75 h 内心肌细胞凋亡指数逐渐升高,1.5 h 后心肌细胞凋亡指数降低,提示截肢后可引发心肌细胞凋亡,这可能为导致心肌损伤的重要原因。细胞凋亡过程涉及凋亡诱导蛋白 Bax 及抑凋亡蛋白 Bcl-2,细胞正常状况下,Bcl-2、Bcl-XL、Bax 以二聚体形式存在于线粒体内以阻碍细胞凋亡;细胞损伤后,Bax 蛋白大量表达聚集于线粒体膜上,导致膜通透性增加,促使凋亡因子进入细胞内,激活 caspase 通路引发细胞凋亡^[16-17]。本研究发现截肢创伤后心肌组织中 0~0.75 h MPO、TNF- α 、IL-6 水平逐渐升高,在第 0.75 h 均达到最高值,随后在 1.5 h 水平降低,提示截肢创伤后心肌组织中炎症因子水平升高,造成炎性损伤,与 HE 染色结果相符合,

提示心肌炎性损伤可能为截肢创伤后心肌手段的重要原因。

NO 是由 eNOS 催化精氨酸生成,在血管扩张中发生重要作用,在心肌损伤时时其水平的升高可抑制心室重构。以往研究显示内源性 NO 水平的降低导致血管舒张功能减弱,加重心肌损伤,而内源性 NO 水平与 eNOS 的活性密切相关,eNOS 活性减弱则会导致 NO 释放减少,促进心力衰竭^[18]。在动物中研究发现对激活 eNOS/NO 信号传导,可降低心肌梗死面积减轻心脏重构不良,因此激活 eNOS/NO 信号可抑制心肌梗死所致心脏重构^[19]。本研究发现截肢创伤后 0.75 h 内 NO 水平、eNOS 蛋白表达降低,截肢 1.5 h NO 水平、eNOS 蛋白表达升高,提示 eNOS/NO 信号通路受抑与截肢后心肌损伤有关。

综上所述,截肢手术创伤后影响大鼠电生理、心功能,使大鼠发生缺血性心电图改变,心功能受损,引发心肌组织过度氧化应激、炎症损伤,其机制可能与 eNOS/NO 通路受到抑制有关,截肢手术创伤后心肌组织损伤机制较复杂,涉及较多信号通路,本研究仅对 eNOS/NO 通路变化情况进行研究,有关确切机制还有待后续深入探究。

参考文献:

[1] 王天潇,宗刚军. 创伤后应激障碍与心血管疾病 [J]. 心脏杂志, 2013,21 (5): 613-615.
[2] 刘蜜,徐菲菲,陶天琪,等. 内质网应激相关凋亡参与创伤后应激障碍大鼠心肌损伤的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(10): 1805-1805.
[3] Ellis MKM, Treggiari MM, Robertson JM, et al. Process improvement initiative for the perioperative management of

- patients with a cardiovascular implantable electronic device [J]. *Anesth Analg*, 2017, 125(1): 58-65.
- [4] González Arbeláez LF, Ciocci Pardo A, Swenson ER, et al. Cardioprotection of benzolamide in a regional ischemia model: Role of eNOS/NO [J]. *Exp Mol Pathol*, 2018, 105(3): 345-351.
- [5] Riquelme JA, Westermeier F, Hall AR, et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103(3): 318-327.
- [6] 张颖, 张海峰, 任青爱, 等. 构建截肢创伤模型大鼠肝脏功能变化及硫化氢的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(18): 2879-2883.
- [7] Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat [J]. *Science*, 1981, 212(4490): 56-58.
- [8] 王春光, 赵小祺, 要彤, 等. 围术期心律失常的原因与机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(2): 538-540.
- [9] 赵小祺, 王春光, 焦宏. 老年冠心病患者围术期心肌缺血及心律失常的特点 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(24): 7064-7065.
- [10] Pundi KN, Pundi KN, Johnson JN, et al. Sudden cardiac death and late arrhythmias after the Fontan operation [J]. *Congenit Heart Dis*, 2017, 12(1): 17-23.
- [11] Inohara T, Manandhar P, Kosinski AS, et al. Association of renin-angiotensin inhibitor treatment with mortality and heart failure readmission in patients with transcatheter aortic valve replacement [J]. *JAMA*, 2018, 320(21): 2231-2241.
- [12] Li YR, Santo A, Zhu H, et al. Graphene quantum dots protect against copper redox-mediated free radical generation and cardiac cell injury [J]. *React Oxyg Species (Apex)*, 2018, 6(17): 338-348.
- [13] Popova TA, Muzyko EA, Kustova MV, et al. Influence of the dense extract from herb of *Primula veris* L on the oxidative stress development and the functional state of the cardiomyocytes mitochondria of rats with experimental chronic heart failure [J]. *Biomed Khim*, 2018, 64(4): 334-343.
- [14] Caglayan B, Kilic E, Dalay A, et al. Allyl isothiocyanate attenuates oxidative stress and inflammation by modulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in traumatic brain injury in mice [J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 8(11): 576-586.
- [15] 乐海浪, 罗国强. 创伤后早期炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的研究进展 [J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(4): 763-765.
- [16] Vasilikos L, Spilgies LM, Knop J, et al. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(2): 160-165.
- [17] Pan LL, Wang AY, Huang YQ, et al. Mangiferin induces apoptosis by regulating Bcl-2 and Bax expression in the CNE2 nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(17): 7065-7068.
- [18] Riquelme J, Westermeier F, Pedrozo Z, et al. Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103(3): 318-327.
- [19] Li F, Zong J, Zhang H, et al. Orientin reduces myocardial infarction size via eNOS/NO signaling and thus mitigates adverse cardiac remodeling [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(4): 926-934.

[收稿日期] 2019-01-02