

丙戊酸钠对重度烫伤大鼠肺微血管内皮屏障的保护作用和机制研究

张文华¹, 唐富波², 胡 森¹, 杜明华³

¹解放军总医院医学创新部 创伤修复与组织再生研究中心, 北京 100853; ²武警四川总队医院 烧伤科, 四川乐山 614000; ³解放军总医院第一医学中心 急诊科, 北京 100853

摘要: 背景 严重烧伤后患者出现全身炎症反应综合征, 可引起毛细血管渗漏症, 最终导致多器官功能障碍, 严重影响预后。组蛋白乙酰化在毛细血管渗漏的进展过程中发挥重要作用。丙戊酸钠作为去乙酰化的抑制剂, 可能保护烧伤患者器官功能。目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸钠 (valproic acid, VPA) 对烫伤大鼠肺微血管内皮屏障的保护作用及其机制。方法 SD 大鼠随机分为假烫+0.9% 氯化钠注射液组 (NN 组)、假烫+VPA 组 (NV 组)、烫伤+0.9% 氯化钠注射液组 (SN 组)、烫伤+VPA 组 (SV 组), 每组 16 只。分别于伤后 2 h 和 6 h 处死大鼠。取肺组织测定肺微血管通透性、组织含水率和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 含量、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性和组蛋白 H3K9 位赖氨酸的乙酰化 (Ac-H3K9) 水平。结果 与 NN 组相比, SN 组 2 h 和 6 h 大鼠肺微血管通透性和肺组织含水率均显著增加 (P 均 < 0.05); 同时 VEGF 水平、MPO 活性及 Ac-H3K9 表达也明显增高。伤后 6 h, 与 SN 组相比, SV 组大鼠肺微血管通透性降低, 肺组织含水率减少, VEGF 水平、MPO 活性、Ac-H3K9 表达降低 (P 均 < 0.05)。结论 VPA 可显著减轻严重烫伤引起的肺微血管内皮屏障损害, 其作用机制可能与丙戊酸钠对 VEGF 和 MPO 的抑制作用有关。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 丙戊酸钠; 烫伤; 血管通透性; 微血管内皮屏障

中图分类号: R 644 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2021)10-1064-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.10.012

网络出版时间: 2021-10-25 09:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20211022.1125.006.html>

引用本文: 张文华, 唐富波, 胡森, 等. 丙戊酸钠对重度烫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, 1094.

Protective effect and mechanism of sodium valproate on pulmonary microvascular endothelial barrier in severely scalded rats

ZHANG Wenhua¹, TANG Fubo², HU Sen¹, DU Minghua³

¹Research Center of Trauma Repair and Tissue Regeneration, Medical Innovation Research Division, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Burn and Plastic Surgery, Sichuan Hospital of the Chinese People's Armed Police Forces, Leshan 614000, Sichuan Province, China; ³Department of Emergency, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: DU Minghua. Email: forrestdo@163.com

Abstract: **Background** Patients are prone to have a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) after severe burns. SIRS can cause capillary leakage, and lead to multiple organ dysfunction, which seriously affects the prognosis. Histone acetylation plays an important role in the progression of capillary leakage. As an inhibitor of deacetylation, sodium valproate may protect the organ in burnt patients. **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of histone deacetylase inhibitors called VPA on microvascular endothelial barrier in rats after severe burn injury. **Methods** Rats were randomly divided into four groups: normal+0.9% NaCl normal saline (NN group), normal+VPA (NV group), scald+0.9% NaCl normal saline (SN group), scald+VPA (SV group) with 16 rats in each group. Rats were sacrificed at 2 h and 6 h after injury. Pulmonary microvascular permeability, tissue water content, vascular endothelial growth factor (VEGF), myeloperoxidase (MPO) activity and acetylation of histone H3K9 lysine (Ac-H3K9) were detected in lung tissues. **Results** Compared with the NN group, lung microvascular permeability and lung tissue moisture content increased significantly in the SN group at 2 h and 6 h (all $P < 0.05$); At the same time, the level of VEGF, the activity of MPO, and the expression of Ac-H3K9 also significantly increased (all $P < 0.05$). However, compared with SN group, they all decreased in the SV group at 6 h after injury (all $P < 0.05$). **Conclusion** VPA can reduce the damage of pulmonary microvascular endothelial barrier caused by severe scald, and its mechanism may be related to the inhibitory effect on VEGF and MPO.

Keywords: histone deacetylase inhibitor; valproic acid; scald; vasopermeability; vascular endothelial barrier

Cited as: Zhang WH, Tang FB, Hu S, et al. Protective effect and mechanism of sodium valproate on pulmonary microvascular endothelial barrier in severely scalded rats [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42 (10) : 1064-1067, 1094.

收稿日期: 2021-06-04

基金项目: 军队十三五后勤科研重点项目 (BHJ17J010); 解放军总医院苗圃基金 (18KMM40)

Supported by the 13th Five Years Major Scientific Research Program of General Logistics Department of PLA (BHJ17J010)

作者简介: 张文华, 女, 硕士。研究方向: 创、烧伤休克与多器官功能障碍综合征的机制及防治。Email: 390104506@qq.com

通信作者: 杜明华, 男, 博士, 主治医师。Email: forrestdo@163.com

严重烧伤后,全身炎症反应和微血管通透性增高引起血管内液体向组织中渗漏,是组织水肿和低血容量性休克的主要原因。同时,血管内皮屏障受损导致液体复苏过程中大量血管内液体进入组织及空腔脏器,减少血液循环量,加重组织水肿和脏器功能损伤,导致多器官功能障碍综合征及高病死率^[1-2]。组蛋白的乙酰化修饰是基因转录调节过程中重要的组成部分,在失血性休克条件下,机体去乙酰化增强,导致细胞功能紊乱甚至死亡^[2]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACIs)能够抑制细胞的高度去乙酰化水平,在分子水平上提高细胞对致死性损伤的耐受能力,并可以减轻缺血缺氧引起的心、脑、肾等重要脏器的损伤^[3]。研究发现 HDACIs 能提高缺氧损伤心肌细胞拮抗缺氧的能力,应用于严重烫伤、脓毒性休克和失血性休克动物模型中,可以提高机体抗炎症、抗缺氧、抗休克等能力,保护其重要脏器功能^[4-5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度特异性的血管内皮有丝分裂素,其可以特异地作用于血管内皮细胞中的受体,在血管内皮通透性调节中起到重要作用^[6-7]。近期研究表明,HDACIs 能在动物实验和体外细胞实验中抑制 VEGF 的表达^[8]。丙戊酸钠(valproic acid, VPA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制药物,研究表明在失血性休克和脓毒症动物实验中丙戊酸钠可以修复组蛋白的乙酰化水平,减少重要脏器损伤,提高动物存活率。近年的动物研究发现,在严重烧伤烫伤动物模型中,丙戊酸钠可以保护脑、心脏和肠道等重要脏器的功能,提高存活率^[9-11]。本研究将观察丙戊酸钠对 50% TBSA III 度烫伤大鼠模型肺微血管内皮屏障是否具有保护作用并探讨其作用机制。

材料与方法

1 主要试剂和仪器 丙戊酸钠购自 Selleck 公司,VEGF、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和 H3K9 ELISA 试剂盒购自北京依科赛公司,甲酰胺购自 Sigma 公司,分光光度计购自赛默飞公司(NanoDrop Lite)。恒温干燥箱购自丹泊仪器(昆山)有限公司,全自动酶标仪购自德国 Biosys 公司(Bioreader)。

2 动物模型与分组 所有动物实验均获得实验动物委员会的批准并严格依照实验动物委员会的规定及相关推荐进行。清洁级雄性 SD 大鼠 64 只,

购自北京华阜康生物科技股份有限公司,60~70 d 龄,体质量(250 ± 10) g。适应性饲养 2 周,实验前 12 h 禁食,4 h 禁饮。随机分配为 4 组:1)NN 组($n=16$),假烫后即刻腹腔内注射 0.9% 氯化钠注射液(100 mg/kg);2)NV 组($n=16$),假烫后即刻腹腔内注射丙戊酸钠(300 mg/kg , 100 mg/mL 0.9% 氯化钠注射液);3)SN 组($n=16$),烫伤后即刻腹腔内注射 0.9% 氯化钠注射液(100 mg/kg);4)SV 组($n=16$),烫伤后即刻腹腔内注射丙戊酸钠(300 mg/kg , 100 mg/mL 0.9% 氯化钠注射液)。腹腔内注射戊巴比妥钠注射液(50 mg/kg)麻醉满意后,背、腹部皮肤备皮;烫伤组在 100°C 水温下烫伤背部 15 s、腹部 8 s;假烫组在 37°C 水温下浸泡背部 15 s、腹部 8 s。烫伤/假烫后立即擦干皮肤水分并予相应治疗措施,烫伤后 2 h 和 6 h 取材。于各观察点前 30 min 麻醉大鼠,颈静脉注射 2% 伊文思蓝(20 mg/kg , 20 mg/mL),30 min 后开胸,自心尖部置入冲洗管并固定,剪开右心耳,灌注 37°C 保存的 1% 肝素盐水,冲洗至灌出液清亮后,取肺组织放置于液氮中待测。

3 分光光度法测定肺微血管内皮通透性 取冲洗净血液及残余 EB 的肺组织 0.2 g,装入含有 2 mL 甲酰胺的试管中,放置于 37°C 恒温水浴箱中 24 h, $1\,500 \text{ g}$ 离心 30 min,提取上清液,分光光度计于 620 nm,1 cm 光径比色皿检测吸光度值,根据标准曲线得出相应 EB 含量。

4 干湿重法测定肺组织含水率 在吸水纸上吸去肺组织表面水分后,剪取适量新鲜肺组织,称湿重,置于 90°C 恒温干燥箱中,取出标本称干重(D)。肺组织含水率($\%$)= $(W - D)/W \times 100\%$ 。

5 分光光度法检测肺组织 MPO 活性 准确称量肺组织,以配好的试剂二溶液为匀浆介质,按照重量体积比 1:19 加入匀浆介质制备成 5% 的组织匀浆,不需要进行离心;取 5% 组织匀浆 0.9 mL 加 3 号试剂 0.1 mL,充分混匀后 37°C 水浴 15 min,取出后待测;混匀, 60°C 水浴 10 min,取出后立即用分光光度计于 460 nm 处,1 cm 光径比色皿,双蒸水调零,检测各管吸光度值。

6 ELISA 法测定肺组织中 VEGF 和 Ac-H3K9 含量 固定时间点取组织后,立即置于液氮中。反复冻融 3 次后,取 0.3 g 组织加入 0.5 mL 组织裂解液,研磨后 $1\,500 \text{ g}$ 离心 5 min,取上清,冻存于 -20°C 冰箱中待检测。常温融化上清和 ELISA 试剂盒后,按照说明书要求,检测标准曲线。向试剂盒中加入 100 μL 上清,盖上贴纸,在避光 37°C

下反应 1 h。300 μ L 洗液洗板 5 次。加入底物反应液 100 μ L，避光、室温、摇床上反应 30 min，弃去上清，洗板 5 次，加入 HRP 反应液 100 μ L，反应 15 min，酶标仪检测 450 nm 处吸光度，并计算样品浓度。

7 统计学方法 应用 SPSS23.0 统计软件处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 肺组织微血管通透性与含水率 与假烫组相比，大鼠烫伤后 2 h 即出现肺伊文思蓝含量增高 ($P < 0.05$)，烫伤后 6 h 增高更为显著 ($P < 0.05$)；与 NS 组相比，SV 组大鼠肺伊文思蓝含量在烫伤后 2 h 时无明显差异，在烫伤后 6 h 时明显降低 ($P < 0.05$)。说明丙戊酸钠能够缓解严重烫伤引起的肺微血管内皮通透性增高。与假烫组大鼠相比，烫伤组大鼠烫伤后 2 h 肺组织含水率升高 ($P < 0.05$)，烫伤 6 h 显著升高 ($P < 0.05$)。与 SN 组比较，SV 组肺组织含水率在烫伤 2 h 和烫伤 6 h 时均有所降低 (P 均 < 0.05)。说明 VPA 能够降低严重烫伤引起的肺组织水肿。见表 1。

2 肺组织 VEGF 含量、MPO 活性和 Ac-H3K9 表

达 与假烫大鼠比较，SN 组和 SV 组大鼠 VEGF 水平在 2 h 和 6 h 时均明显增高 (均 $P < 0.05$)。烫伤 2 h 后，SV 组与 SN 组 VEGF 水平无统计学差异；烫伤 6 h 后，SV 组大鼠 VEGF 水平明显低于 SN 组大鼠 ($P < 0.05$)。说明 VPA 治疗后能够有效降低严重烫伤引起的肺组织 VEGF 水平增高，进而降低非微血管通透性。与假烫大鼠相比，SN 组和 SV 组大鼠 MPO 活性在烫伤 2 h 和 6 h 时均明显增高 (P 均 < 0.05)。与 SN 组比较，SV 组大鼠肺 MPO 活性在 6 h 时明显降低 ($P < 0.05$)，差异有统计学意义，在烫伤 2 h 时两组间无统计学差异。说明 VPA 能够缓解严重烫伤引起的肺组织 MPO 活性升高。与 NN 组比较，烫伤 2 h 时，SN 组 Ac-H3K9 水平开始下降 ($P < 0.05$)，烫伤 6 h 时下降更为明显 ($P < 0.05$)。SN 组大鼠肺组织 Ac-H3K9 水平在烫伤 2 h 时即恢复到高于正常水平 ($P < 0.05$)，烫伤 6 h 时增高更为明显 ($P < 0.05$)，差异有统计学意义。见表 2。

讨 论

目前烧伤后早期救治工作的重点集中在如何维持组织灌注和保护重要脏器的功能^[12]。然而，因烧伤后机体微血管内皮屏障受到损伤，即使足量补充液体复苏，仍可能导致一系列严重威胁烧

表 1 丙戊酸钠对烫伤后肺组织微血管通透性和含水率的影响

Tab. 1 Effect of sodium valproate on microvascular permeability and water content of lung tissue after scald

Index	NN (n=8)	NV (n=8)	SN (n=8)	SV (n=8)	F	P
Permeability of lung tissue						
2 h	41.27 $\pm$ 2.92 ^a	41.51 $\pm$ 2.77 ^a	65.39 $\pm$ 4.85 ^a	49.41 $\pm$ 3.48	78.90	<0.001
6 h	41.05 $\pm$ 3.19 ^a	41.87 $\pm$ 3.18 ^a	73.98 $\pm$ 4.18 ^a	59.98 $\pm$ 4.45	139.01	<0.001
Water content of lung tissue						
2 h	65.41 $\pm$ 2.17 ^a	65.33 $\pm$ 2.22 ^a	73.1 $\pm$ 2.28 ^a	69.64 $\pm$ 1.90	24.33	<0.001
6 h	65.12 $\pm$ 2.15 ^a	65.91 $\pm$ 2.58 ^a	79.36 $\pm$ 2.67 ^a	72.37 $\pm$ 2.15	61.14	<0.001

^a $P < 0.05$, vs SV group.

表 2 VPA 对烫伤后肺组织 VEGF 含量、MPO 活性和 Ac-H3K9 表达的影响

Tab. 2 Effect of sodium valproate on VEGF content, MPO activity and Ac-H3K9 expression in lung tissue after scald

Index	NN (n=8)	NV (n=8)	SN (n=8)	SV (n=8)	F	P
VEFG of lung tissue						
2 h	22.66 $\pm$ 2.85 ^a	22.63 $\pm$ 3.12 ^a	44.98 $\pm$ 2.67 ^a	34.98 $\pm$ 2.45	120.82	<0.001
6 h	22.90 $\pm$ 2.54 ^a	23.14 $\pm$ 2.18 ^a	73.00 $\pm$ 2.62 ^a	48.05 $\pm$ 1.93	838.86	<0.001
MPO of lung tissue						
2 h	1.30 $\pm$ 0.25 ^a	1.18 $\pm$ 0.22 ^a	3.77 $\pm$ 0.52 ^a	2.23 $\pm$ 0.36	89.85	<0.001
6 h	1.25 $\pm$ 0.25 ^a	1.23 $\pm$ 0.30 ^a	5.58 $\pm$ 0.37 ^a	3.97 $\pm$ 0.47	289.77	<0.001
Ac-H3K9 of lung tissue						
2 h	1.02 $\pm$ 0.04 ^a	1.38 $\pm$ 0.09 ^a	0.85 $\pm$ 0.07 ^a	1.25 $\pm$ 0.06	98.17	<0.001
6 h	1.02 $\pm$ 0.04 ^a	1.88 $\pm$ 0.07 ^a	0.54 $\pm$ 0.06 ^a	1.45 $\pm$ 0.08	668.15	<0.001

^a $P < 0.05$, vs SV group.

伤患者生命的并发症^[13-14]。肺通常是严重烧伤后首先受到损伤的器官之一,大部分烧伤患者甚至在没有发生吸入性损伤和感染的情况下也会发生急性肺损伤和肺水肿。因此研究对烧伤后肺微血管内皮屏障具有保护作用的药物,对于减轻肺水肿、急性肺损伤及减少烧伤补液需求十分必要^[15-17]。

本研究采用 50% TBSA Ⅲ度烫伤大鼠模型探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 对烫伤大鼠肺微血管内皮屏障的保护作用。结果发现在严重烫伤后,大鼠肺微血管内皮屏障被破坏,微血管内皮通透性明显增高,肺组织水肿。VPA 治疗后能保护烫伤引起的肺微血管内皮屏障损伤,降低烫伤大鼠肺微血管内皮通透性,减轻组织水肿。

组蛋白的乙酰化修饰是基因转录调控的关键机制之一。HATs 和 HDACs 的在生理状态下的动态平衡共同调节组蛋白的总体乙酰化水平,称为“组蛋白的乙酰化平衡”。HDACIs 是去乙酰化酶活性抑制药物,可以降低组蛋白的去乙酰化水平,从而升高组蛋白的乙酰化水平,保护细胞功能。研究表明,HDACIs 能够抑制失血性、脓毒症等休克条件下细胞的去乙酰化过程,恢复组蛋白的乙酰化平衡,减轻缺血缺氧引起的心、脑、肾等重要脏器的损伤^[3]。丙戊酸钠是一种 HDACIs 类药物^[18]。研究表明,在失血性休克和脓毒症动物实验中,丙戊酸钠可以修复组蛋白的乙酰化水平,减少重要脏器损伤,提高动物生存率^[19]。本研究发现,正常大鼠腹腔注射丙戊酸钠后能够明显提高肺的组蛋白乙酰化水平;烫伤 2 h 后大鼠肺的组蛋白乙酰化水平即出现降低,烫伤 6 h 后乙酰化水平明显降低;烫伤大鼠经丙戊酸钠治疗后,在烫伤后 2 h 和 6 h 均能显著提高组蛋白乙酰化水平。因此猜想丙戊酸钠可能通过提高组蛋白乙酰化水平改善烫伤大鼠预后。

烧伤引起组织 VEGF 表达和 MPO 活性增加。HDACIs 类药物在动物实验和体外细胞实验中抑制 VEGF 表达水平^[20]。本研究发现大鼠严重烫伤后肺组织 VEGF 表达增加,MPO 活性增强,同时出现肺微血管内皮通透性升高和肺水肿;严重烫伤大鼠经丙戊酸钠治疗后,其肺组织 VEGF 表达和 MPO 活性相对低于烫伤大鼠,同时肺微血管通透性降低,肺水肿减轻。说明丙戊酸钠通过抑制严重烫伤后 VEGF 的表达和中性粒细胞浸润,保护肺微血管内皮屏障,降低肺微血管通透性和肺

水肿。

综上所述,本研究发现严重烫伤会导致肺微血管内皮屏障的损害,与前人研究类似。丙戊酸钠能够对抗此病理过程并保护肺微血管内皮屏障,从而改善烫伤后急性肺水肿等并发症,其作用机制可能与丙戊酸钠对 VEGF 和 MPO 的抑制作用有关。

参考文献

- 1 Peeters Y, Lebeer M, Wise R, et al. An overview on fluid resuscitation and resuscitation endpoints in burns: Past, present and future. Part 2 - avoiding complications by using the right endpoints with a new personalized protocolized approach [J]. *Anaesthesiol Intensive Ther*, 2015, 47 (SpecNo): s15-s26.
- 2 Ulker E, Parker WH, Raj A, et al. Ascorbic acid prevents VEGF-induced increases in endothelial barrier permeability [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 412 (1/2): 73-79.
- 3 Tang FB, Dai YL, Zhou GY, et al. Valproic acid treatment inhibits vasopermeability and improves survival in rats with lethal scald injury [J]. *J Burn Care Res*, 2018, 39 (2): 209-217.
- 4 Li W, Gao XH, Liu WF, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid alleviates acute lung injury induced by severe hemorrhagic shock and resuscitation in rats [J]. *Shock*, 2020, 54 (4): 474-481.
- 5 Luo CC, Huang CS, Ming YC, et al. Calcitonin gene-related peptide downregulates expression of inducible nitric oxide synthase and caspase-3 after intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Pediatr Neonatol*, 2016, 57 (6): 474-479.
- 6 Yang BH, Yu DD, Liu JW, et al. Antitumor activity of SAHA, a novel histone deacetylase inhibitor, against murine B cell lymphoma A20 cells in vitro and in vivo [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36 (7): 5051-5061.
- 7 Yu WH, Ho YL, Huang PT, et al. The phosphorylation state of GSK3 β serine 9 correlated to the development of valproic acid-associated fetal cardiac teratogenicity, fetal VPA syndrome, rescued by folic acid administration [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2016, 16 (1): 34-45.
- 8 Xu Y, Xu D, Zhu SJ, et al. Induction of apoptosis and autophagy in metastatic thyroid cancer cells by valproic acid (VPA) [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (7): 8291-8297.
- 9 Guo YZ, You YH, Lv D, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to insulin resistance and cardiac dysfunction after burn injury in mice [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116912.
- 10 Zheng Q, Liu W, Liu ZN, et al. Valproic acid protects septic mice from renal injury by reducing the inflammatory response [J]. *J Surg Res*, 2014, 192 (1): 163-169.
- 11 吴育寿,岳晓彤,柴家科,等.丙戊酸钠对重度烧伤复合伤休克延迟补液大鼠内脏组织灌流和生存率的影响[J].*中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2020, 15 (1): 10-17.
- 12 Deng GR, Ling Q, Wu BH, et al. Protection mechanism of deacetylase inhibitor on spleen of rats with severe hemorrhagic shock [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9 (6): 572-576.
- 13 罗红敏,胡森,卞徽宁,等.丙戊酸钠对严重烫伤后肠屏障功能的保护作用及机制[J].*中华危重病急救医学*, 2017, 29 (3): 221-227.
- 14 Rae L, Fidler P, Gibran N. The physiologic basis of burn shock and the need for aggressive fluid resuscitation [J]. *Crit Care Clin*, 2016, 32 (4): 491-505.