



中國醫藥大學
臨床醫學研究所
碩士學位論文

輸液治療部分恢復出血性休克加乘誘發
糖尿病大鼠造成之心肌傷害機轉探討

Resuscitation partially restores the synergistic cardiac
damage induced by hemorrhagic shock in diabetic rats

指導教授：黃志揚 教授
Chih-Yang Huang

共同指導教授：吳錫金 副教授
Hsi-Chin Wu

研究生：林冠合
Kuan-Ho Lin

中華民國九十八年七月

中文摘要

糖尿病患者之主要臨床症狀除了血糖過高外，亦常伴隨血脂異常的發生，增加併發心血管疾病的危險性外，外傷引起的壓力更是糖尿病病情的促進因子。外傷一直是台灣地區四十歲以下民眾的第一殺手。外傷死亡早期主要原因包括頭部外傷與出血性休克，晚期則為器官衰竭。儘管過去一、二十年間，許多的臨床與基礎之研究，仍然無法針對多重器官衰竭作有效的改善，其死亡率仍高達40~50%。而當病患本身有糖尿病及外傷兩種因素時，體內更會大量產生如氧化壓力(ex: reactive oxygen species, ROS)、被修飾的脂蛋白、血流的壓迫等而造成細胞損傷。同時會激起各種生理反應，其中細胞激素(cytokine)的釋放，會造成過度的發炎反應，使細胞與組織受損進而引起併發症的發生，但出血性外傷是否造成心肌損傷及二者是否因此加乘傷害患者心肌細胞組織及其分子訊息機轉，且使用輸液治療後是否能完全回復，其答案及機制均有待進一步探討。

本研究乃藉助鏈氮黴素(Streptozotocin, STZ) 注射65mg/ml/kg誘發6~8週齡大白鼠，一週後測血糖>200mg/dl則視為高血糖大鼠，再施以出血性休克一小時模式並進行有無輸液治療處理，來加以探討糖尿病伴隨出血性休克在有無輸液治療後其心肌細胞損害的差異。

實驗將大白鼠的左心室游離，並採用西方墨點法，及組織染色切片分析。實驗結果顯示糖尿病現象及出血性休克均造成胚胎基因IGFII表現增加，造成IGFIIR pathway活化，並經Gαq、PKCα進一步活化calcineurin (Ca²⁺-sensitive phosphatase)，並 dephosphorylated p-Bad使其變成Bad，Bad因與粒線體膜結合，促使粒線體膜上電子傳遞鏈遭到破壞，而造成粒線體膜電位不穩定，進而使*Cytochrome c*由粒線體內釋出並活化下游Caspase 9及3；引發DNA斷裂並使得心肌細胞走向凋亡。但所有現象均在輸液治療後有部分回復的現象。同時輸液補充並進一步促進survival 路徑相關蛋白，如PI-3k，p-Akt 及p-Bad的表現。對survival pathway的壓制，以糖尿病組(DM)影響大於出血性休克組(HS)；且在兩個因素結合的組別更具有加乘性的傷害。而對apoptosis pathway的促進作用則是出血性休克組影響大於糖尿病組(DM)；而糖尿病合併出血性休克組(DM+HS)更加乘性促進；但在輸液治療的組別(DM+HS+R)，則明顯具有抑制其傷害並且呈現部分恢復的結果。

綜合所有證據顯示，糖尿病大白鼠伴隨大量出血性休克後確實造成心肌細胞加乘性的傷害，並經加乘活化IGF-II pathway與粒線體障礙誘發心肌細胞走向凋亡，惟輸液治療後有減緩且部分恢復的現象，但終究無法完全使其恢復。

Abstract

The major clinical symptom of diabetic is excessively high blood glucose level, followed with the increase of abnormal blood lipid, and the risk of cardiovascular disease. In Taiwan, the incidence of diabetes is increasing. Today, trauma has the highest mortality rate in the population below 40 years old of Taiwan, and the major death causes of trauma are head injury and hemorrhagic shock in early time, organ failure in later period. Though during past ten to twenty years had operated much clinical and basic research, it was still less effective improvement, the mortality rate still reached as high as 40~50%. When patient has diabetes and/or trauma factors, it will induce the oxidized pressure (ex: reactive oxygen species, ROS), decorated lipoprotein, blood stream oppression, and create the cell damage. In addition, the cytokine release will lead the excessive inflammation, it will cause the cells and organizations injury and then complications occurred. However, if the synergistic injury effects of these two factors will occur in myocardial cell, the exactly molecular mechanisms, and if the resuscitation treatment recover the damage, were needed to be further revealed.

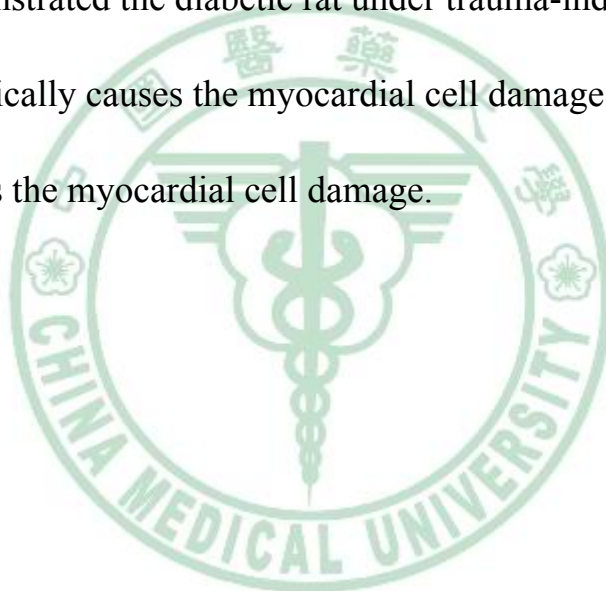
This research used the diabetic rats induced by Streptozotocin, (STZ, 65mg/ml/kg). Then, the diabetic rats treated with or without hemorrhagic

shock, and resuscitation was applied to the diabetic plus hemorrhagic shock rats. We aim to investigate if the myocardial cell injury in diabetes rat will be enhanced by trauma-induced hemorrhagic shock, and whether resuscitation will rescue the damage effect.

The excised left ventricles from rats was applied to Western blotting and histological analysis. Result showed that diabetics and hemorrhagic shock cause the embryonic gene IGFII expression increase, and may pass through IGFIIR pathway, activating Gαq and PKCα, further activate calcineurin (Ca²⁺-sensitive phosphatase), and dephosphorylated p-Bad into Bad. Then, Bad binds to the mitochondrion membrane, induces the imbalance of the energy producing electron transferring chain on the mitochondrion membrane, causes the mitochondrion membrane potential unstable, and then causes *Cytochrome c* releasing from the mitochondrion and activates downstream *Caspase 9*、*3*. The caspases cause DNA fragmentation and lead the myocardial cell toward apoptosis. However, all phenomena have partially recover after resuscitation treatment. Resuscitation even further promotes the cardiac survival pathway related protein, PI-3k, p-Akt and p-Bad activation.

The combination of diabetes mellitus and hemorrhagic shock contribute to synergistically damage in cardiac apoptosis. Diabetes mellitus has the

dominant negative effect in survival pathway, while hemorrhagic shock has the dominant positive influence in apoptosis pathway. Treatment of resuscitation provides partially therapeutic effect on damage and improve the survival pathway from diabetes mellitus combined with hemorrhagic shock. This research could provide some useful information to patients has diabetes mellitus and undergone hemorrhagic shock and resuscitation treatment. All evidences demonstrated the diabetic rat under trauma-induced hemorrhagic shock, synergistically causes the myocardial cell damage. Resuscitation partially restores the myocardial cell damage.



致謝

承蒙 黃志揚老師在學業及實驗上細心與耐心的帶領指導與教誨，使本論文得以即時順利完成，在此致上最大的敬意與謝忱。

感謝 陳維恭老師在探討主題方向上的指點與啟發，而能夠進行如此有意義的研究。也感謝 吳錫金老師在學業上的指導，而能夠順利完成研究所的課業。

也感謝 江素瑛老師在研究方向上的協助與熱心提供建議，而能夠減少在研究上摸索的時間。

感謝 張耀田醫師及其助理們在實驗上的大力幫忙。

由衷感謝實驗室的夥伴對我的幫忙，尤其是 熾甄在實驗技術上的幫助，以及實驗結果的整理和統計，讓此研究主題得以完成。

最後要感謝我的太太，對我因為就讀研究所而減少了許多與她相處的時間，所展現的包容和體貼。也因為有她在後面的支持，才能夠讓我無後顧之憂的完成學業。

目次

書名頁	-----	
口試委員審定書	-----	
中文摘要	-----	I
英文摘要	-----	III
致謝	-----	VI
目錄	-----	VII
圖表目錄	-----	IX
第一章 前言		
第一節 研究背景與文獻探討	-----	1
第二節 研究目的	-----	9
第二章 研究方法		
第一節 研究材料及研究設計	-----	13
第二節 統計方法	-----	28
第三章 研究結果		
第一節 描述性統計分析	-----	29
第二節 推論性統計分析	-----	35
第四章 討論		
第一節 結果討論	-----	37

第二節 其他相關性討論	39
第三節 研究限制	40
第五章 結論與建議	
第一節 結論	41
第二節 建議	41
圖表	42
參考文獻	53



圖表目錄	頁
Figure 1 : 以 H&E 染色觀察心臟整體型態變化之情形 -----	42
Figure 2 : 以 Trichrome Masson 染色觀察心肌細胞纖維化情形 -----	43
Figure 3 : 以 TUNEL assay 染色法觀察心肌細胞凋亡情形 -----	44
Figure 4 : 以 Western blotting 方法分析 IGF1R 蛋白表現量 -----	45
Figure 5 : 以 Western blotting 方法分析 Gαq、p-PKCα 蛋白表現量 -----	46
Figure 6 : 以 Western blotting 方法分析 Calcineurin 蛋白表現量 -----	47
Figure 7 : 以 Western blotting 方法分析 Cytochrome c、Caspase 9 蛋白表現量 -----	48
Figure 8 : 以 Western blotting 方法分析 Caspase 3 蛋白表現量 -----	49
Figure 9 : 以 Western blotting 方法分析 p-PI3K 蛋白表現量 -----	50
Figure 10 : 以 Western blotting 方法分析 p-Akt 蛋白表現量 -----	51
Figure 11 : 以 Western blotting 方法分析 p-Bad 蛋白表現量 -----	52

第一章 前言

第一節 研究背景與文獻探討

一、糖尿病與心肌病變

糖尿病患者之主要臨床症狀除了血糖過高外，亦常伴隨血脂異常的發生，而增加併發心血管疾病的危險性¹。在全世界的統計中，糖尿病患者的人數預計將從西元1995年的1.35億人口增加到西元2025年的3.0億人口²。而在台灣，糖尿病患者的人數也有上升的趨勢。

糖尿病的患者得到心血管疾病的風險也同時上升。心血管疾病的併發症又會惡化與糖尿病相關的一些疾病，例如會造成大血管的粥狀硬化(如頸動脈，主動脈，股動脈)及增加冠狀動脈硬化的可能。這些都會導致心肌梗塞、中風及肢體損失的風險。以微小血管的角度來看，也會造成心肌細胞的病理生理的變化。糖尿病也會造成心臟結構和功能的影響，就是一般所稱的糖尿病心肌病變(diabetic cardiomyopathy)。這個名詞是由Rubler *et. al* 在30年前所提出，當時他描述了四個糖尿病患演變成心臟衰竭但是冠狀動脈確是血流通暢的²。所以，糖尿病心肌病變代表了在沒有高血壓及冠狀動脈疾患下的心室功能缺損，尤其是舒張力的缺損，之後將會導致心臟衰竭^{2,3}。

而糖尿病會導致血管的粥狀動脈硬化，占了糖尿病患死亡原因的80%

左右。主要原因即是持續的曝露在高血糖之下對血管的細胞產生了一系列的影響。高血糖會造成蛋白質和脂質的糖化作用而影響了正常的結構，改變了蛋白質酵素的功能，影響了受體接收訊號的能力，經由巨噬細胞(monocyte-derived macrophages)、上皮細胞(endothelial cells)及平滑肌細胞(smooth muscle cells)的交互影響作用，而加速了粥狀硬化的進行。Protein kinase C (PKC) 的活化，也會影響到生長因子的表現。細胞內的糖分經由己糖胺路徑(hexosamine pathway)進行糖化也會影響到正常酵素的機能。高血糖也會增加氧化壓力(oxidative stress)，主要會造成超氧離子(superoxide anion)的過度產生，而影響到粒線體的電子傳遞鏈(mitochondrial electron transport chain)。高血糖也會促進各種細胞例如單核球(monocyte)及脂肪細胞(adipocyte)分泌出細胞激素(cytokine)，而促使發炎持續進行⁴。高血糖也會導致反應氧族(reactive oxygen species, ROS)的過度產生，經由在粒線體上的作用，抑制了粒線體的代謝，而促使了血管結構改變⁵。也會進一步活化細胞的凋亡路徑訊號使細胞產生凋亡⁶。

氧化壓力若導致了糖尿病心肌病變，會造成心肌細胞的減少及纖維化，減少了左心室心肌細胞的收縮力，而導致心臟衰竭。主要是 advanced glycated end products(AGE)及其受體(receptors)的產生，會造成 nuclear factor-kappaB 的活化，而驅動了一系列的信息傳遞，造成心肌細胞重鏈

(myosin heavy-chain; MHC)的基因表現，而促使 alpha-MHC isoform 轉變成beta-MHC isoform。而影響到心肌的收縮舒張功能⁷。

血漿中持續增加的自由脂肪酸(serum-free fatty acids)和持續的高血糖都會使心臟的功能受到影響。心肌細胞中堆積的三酸甘油脂會更加惡化心肌細胞的代謝功能使心臟衰竭更易發生⁸。腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor-alpha) 的增加，也會促進左心室的intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 、 vascular adhesion molecule (VCAM)-1 、 beta2-lymphocyte-integrins (+)及 cytokine(如 interleukin , IL-1beta) 的表現，使得心肌細胞持續發炎和纖維化(fibrosis)⁹。

二、心臟衰竭

心臟衰竭在美國就有超過五百萬人深受這個疾病的困擾，從西元1990年到西元2004年總共增加了33%的住院病患，而同時期因心肌梗塞住院的則減少了8%。愈來愈多的研究發現糖尿病和心臟衰竭有密不可分的關係¹⁰。早期使用心臟都卜勒超音波等工具以發現心臟衰竭，並給予治療是很重要的。血管張力素反轉酶抑制劑(angiotensin-converting enzyme inhibitors)及血管張力素二受體拮抗劑(angiotensin II receptor antagonists)都可能有一部分治療效果¹¹。因為糖尿病導致的氧化壓力會促使超氧產物產生及使得心肌細胞中的腎素-血管張力素系統(rennin-angiotensin system,

RAS)活化，促進細胞內血管張力素二的濃度，之後導致心臟細胞的凋亡(apoptosis)及纖維化(fibrosis)¹²。經由臨床上的切片檢查也可以發現在糖尿病同時也有擴張性心肌病變(dilated cardiomyopathy)的病患，相較於單純的擴張性心肌病變病患，其心肌上的凋亡細胞(apoptotic cells)明顯較多¹³。同時，氧化壓力產生的心跳過快也會導致心肌細胞的肥大和纖維化(fibrosis)¹⁴。經由結構的改變，使得心室收縮舒張的功能受到更大的影響¹⁵。就算是糖尿病人目前沒有明顯的心臟方面的不適，經過超音波檢測仍可以發現心臟壁的變化和收縮及舒張功能的減退¹⁶。而同時有糖尿病且進展到心臟衰竭的病患，就算是年紀較輕，其存活的時間仍然較單純心臟衰竭的病患短了許多¹⁷，使得糖尿病成為影響心臟衰竭病患存活率的重要因素¹⁸。一些研究也發現，有糖尿病的病人同時有高血壓，相比於只有糖尿病的病人而言，更容易產生心房顫動(atrial fibrillation ,AF)，AF已經被發現會增加中風及心肌梗塞的危險¹⁹。若病患在心肌梗塞後做過心導管手術(percutaneous coronary intervention ; PCI)，如果他同時有糖尿病，則他因心臟衰竭再次入院的機率就會高於沒有糖尿病的病患²⁰。

三、外傷的出血性休克

意外傷害一直是青年及成人死亡的主要原因。外傷早期死亡主要原因包括頭部外傷造成的神經方面的損傷及出血性休克，晚期則是因為器

官組織細胞受到創傷後，因缺血性反應，及再灌流所造成的直接傷害，及誘發的發炎反應、免疫失去控制所造成的再度傷害，及可能的感染，而導致多重器官衰竭。儘管過去一、二十年間，許多的臨床與基礎之研究，仍然無法針對多重器官衰竭作有效的改善，其死亡率仍高達40~50%。所以在外傷的病人，一開始需要先穩定病人的生命徵象，控制出血及給予必要的輸液以避免及治療出血性休克，以避免組織器官灌流的降低，造成缺血缺氧的現象產生傷害，而誘發免疫系統的活化造成免疫症候群及凝血功能的進一步異常。之後則是嘗試減少發炎反應及免疫的失調情形，及控制可能的感染，以希冀可以減少病患進入多重器官衰竭導致死亡的可能。

出血性休克常代表了一個快速的明顯的血管內容積的減少，常導致血液動力學的不穩定，減少氧氣的運送，減少組織的灌流，細胞呈現缺氧進而器官受損死亡。治療的原則是停止出血及恢復循環的血管內容積。對於持續流血的、較老的、或有心肌梗塞危險因子的病患，盡速維持足夠的血色素濃度(hemoglobin)是格外重要的²¹。因為在創傷後出血性休克時，紅血球也會產生傷害，造成紅血球凝集及黏滯(aggregation and adhesion)，並產生形態上的改變，而使得氧氣的傳送減少，微循環的血流降低²²。微循環的氧氣輸送是取決於微血管的形態、血液動力學、及紅血球的氧含量，所以適當的輸液輸血是需要的。一氧化氮(nitric oxide, NO)

在休克的時候也會過量產生，而導致血管擴張及系統性的血壓下降²³。

在休克後產生的急性發炎反應是複雜的且無法以單一的反應路徑來解釋，而治療的方法也僅有部分的嘗試使用低劑量的類固醇(low-dose corticosteroids)且尚未有定論²⁴。若受到了感染的威脅，則會對細胞產生直接的傷害，一些毒素及介質的產生也會造成組織的缺氧，細胞結構的破壞，微循環及凝血功能異常，進而使細胞壞死及凋亡²⁵。

當進入多重器官衰竭的危險時，所謂的壓力性賀爾蒙(stress hormone)會大量產生而影響粒線體的功能。產生了一個雙向的發炎、免疫、賀爾蒙、及代謝齊聚的反應。此時，能量的產生、代謝的速度、及正常細胞的生理都受到減慢，產生了功能上的異常。因為粒線體的功能下降及氧化物質的磷酸化反應，使得細胞代謝下降，使細胞逐漸走向死亡²⁶。這時候會產生大量的細胞激素(cytokines)，以達到各種促進及抑制的效果，監測細胞激素(如 interleukins)的濃度變化，可以知道和病患是否會進入器官衰竭有相當的關聯性²⁷。有一些研究也提出了可以監測 hypoxia-inducible factor 1alpha(HIF-1alpha)及其相關分子如eNOS、iNOS、cyclooxygenase 2(COX-2)、heme oxygenase 1(HO-1)、plasma nitric monoxide(NO)、prostaglandin(PGI)、carbon monoxide(CO)，則可以提早得知血管循環是否因出血性休克而造成缺氧的損傷²⁸。也可以監測lactate的濃度以評估組織損傷的程度及復甦是否足夠²⁹。

四、復甦

在外傷大出血後，當病患到達醫院時，通常會進行輸液輸血的動作。此時進行的復甦(resuscitation)也會對免疫產生各種影響³⁰。不同的復甦輸液速度也會對血糖及細胞激素(如interleukin-1beta(IL-1beta)濃度產生變化³¹。依照高級外傷救命術(Advanced Trauma Life Support)，若病患呈現低血壓，則需要使用適當的輸液及輸血以拉高血壓。但一開始即給予大量輸液則有可能使出血量增加，但較晚給予大量輸液則可能使病患再度出血，適當的觀察實際情形再做決定是需要的³²。使用輸液也會導致凝血情形及纖維素原(fibrinogen)代謝被破壞而造成血流不止，適當的矯正凝血功能也是需要的³³。使用高張(hypertonic)溶液進行復甦已被證實對腦神經功能的預後是有幫助的，如果再加上藥物pentoxifylline 則更有幫助³⁴。也有研究表示，使用加入ethyl pyruvate(EP)的輸液，來進行抗發炎的反應，對出血後的存活是有提高的效果^{35,36}。

也有新的嘗試，使用較低血壓的復甦似乎對預後也是有幫助的，不過須要選擇適當的輸液例如Hextend(6% hydroxyethyl starch in a balanced salt solution)³⁷。已經有研究證實，適當的低體溫對出血性傷害的存活率及腦神經功能預後是有提高，但無法降低可能的感染可能³⁸。

五、心臟，出血性休克，糖尿病

心臟是人體非常重要的器官，對人體生命徵象的維持，產生足夠的血壓以提供適當的循環及組織的供給氧氣及養分都有舉足輕重的地位。若因為外傷造成的出血性休克嚴重，進而使得心臟也產生了缺血性的傷害，對於病患的預後，會有顯著的影響。以低體溫的方式治療，對在休克後又進行復甦的心臟功能，可以產生保護的效果³⁹。另有些研究，也提出了當心臟因缺血及再灌流後產生受損時，可使用一些特殊的製劑來減少心臟受損的範圍^{40,41,42}。

心臟功能下降導致心臟衰竭的因素已被多方面的探討⁴³。而糖尿病本身會導致心肌細胞的病變這也是許多研究發現了的事情，在分子生物及細胞的研究當中，也已經證實了它的機轉和傷害^{44,45,46}。

綜合由前述可知，當病患本身有糖尿病，又遭逢外傷出血性休克時，體內將有可能會有更大量產生如氧化壓力(ex: reactive oxygen species, ROS)、被修飾的脂蛋白、血流的壓迫等而造成細胞損傷⁴⁷。同時會激起各種生理反應，其中細胞激素(cytokine)的釋放，會造成過度的發炎反應，使細胞與組織受損進而引起併發症的發生^{48,49}。其中一個很重要的影響就是有可能會引起心臟的功能受損，而使得心臟產生的變化，影響到病患的預後。

第二節 研究目的

糖尿病會造成心肌病變及損傷，外傷出血性休克也會因細胞激素等的變化而造成心肌損傷。此二者是否因此加乘傷害患者心肌細胞組織及其分子訊息機轉，且使用輸液治療後是否能完全回復或部分恢復，其答案及機制均尚未得知。

以前即有許多的學者，致力於嚴重出血的研究，但若要進行臨床實驗則有其倫理及道德的考量。而以動物模型研究，較能控制各項變因，使得研究單純化，所以目前大部分的出血性休克研究病理機轉都是以動物模型來探討。主要有兩種模型，分為非控制性出血模型(Uncontrolled hemorrhage model)及控制性出血模型(Controlled hemorrhage model)。兩種模型各有其優缺點^{50,51,52}。

非控制性出血模型以斷尾等方式來造成出血性休克，好處是可以適切的反應臨床狀況也造成組織的損傷，壞處是出血量無法有效的控制。控制性出血模型則能控制休克的嚴重程度且容易操作，壞處則是臨床上常常出血量是無法有效控制的而與臨床表現有差距。

控制性出血模型又可分為固定血容積模型(fixed-volume model)及固定血壓模型(fixed-pressure model)。

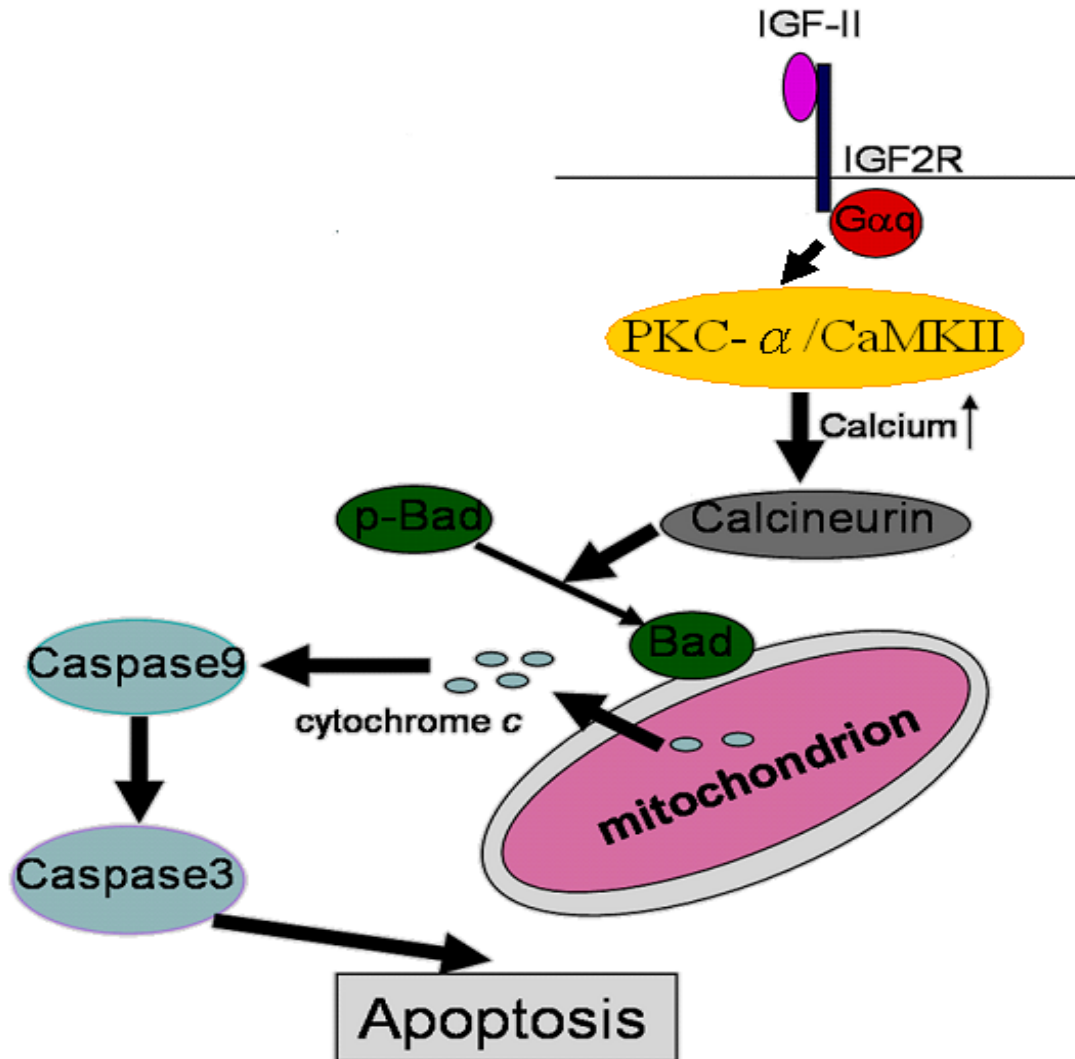
固定血容積模型是以實驗動物的體重來決定出血量，影響的變數包

括誘發休克的速度、休克時間、休克嚴重程度、及使用的輸液種類及麻醉藥種類等等。優點是可以評估休克代償機轉，缺點則是低血壓的程度難以固定。

固定血壓模型則是藉由動脈導管及血壓監測器監測血壓，之後抽血以達到所設定的休克狀態血壓。優點是低血壓的程度、期間及出血量都可被控制和監測。所以本實驗是採用固定血壓模型來做為模擬出血性休克的模型。

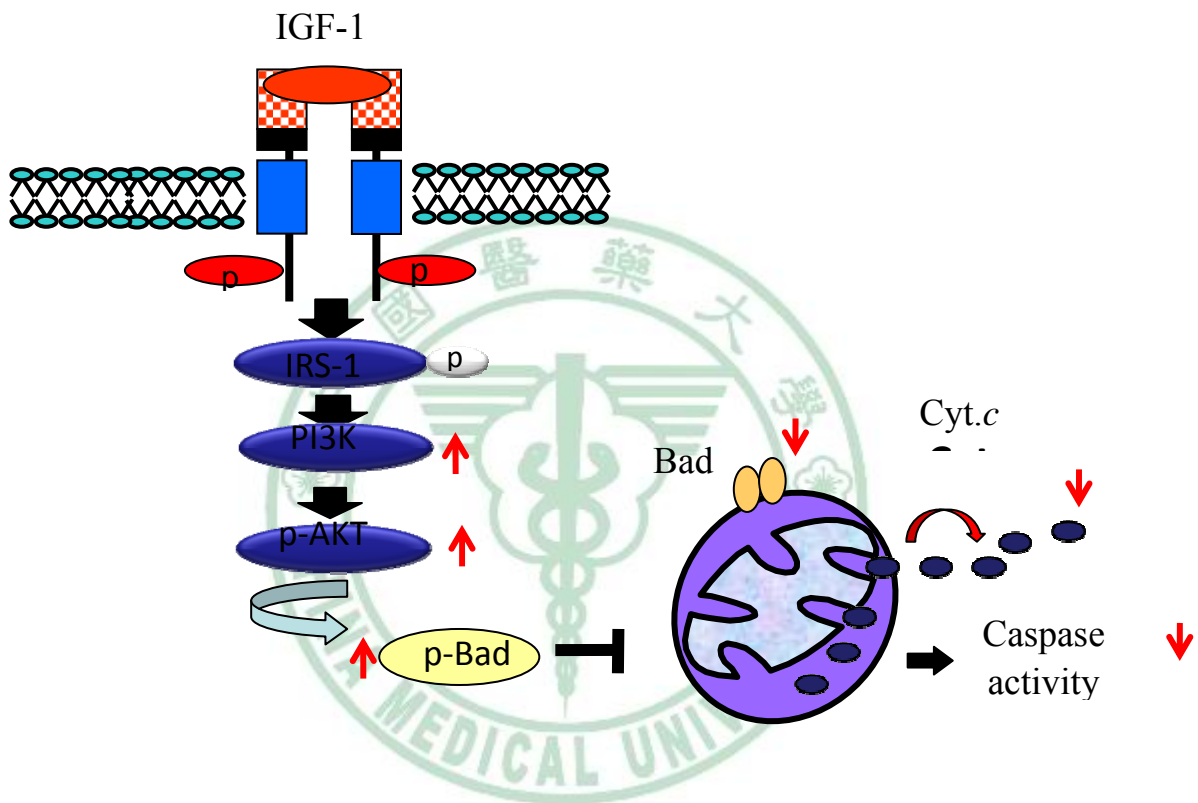
在糖尿病的誘導上，本實驗乃藉助鏈氮黴素(Streptozotocin, STZ) 注射65mg/ml/kg誘發6~8週齡大白鼠，一週後測血糖 >200mg/dl則視為高血糖大鼠。之後進入出血性休克的模型進行實驗。以出血性休克一小時模式並進行有無輸液治療處理。之後採集大白鼠的左心室檢體，進行各項檢驗。包括了組織切片，染色，TUNEL assay，及西方墨點染色法(Western blotting)。

在心臟細胞的凋亡路徑上(apoptosis pathway)，如下圖所示，此路徑已由 Chun-Hsien Chu *et.al* 於西元2008年發表於 *Endocrinology* 197; 381-390.



本實驗由西方墨點染色法(Western blotting)，測出IGFIIR、Gαq、p-PKCα、Calcineurin、cytochrome *c*及Caspase 9、Caspases 3 等各凋亡蛋白表現，以探討心肌細胞是否進入了凋亡的狀態。並同時監測抗凋亡蛋白 p-Bad 的表現。

另外，本實驗也由西方墨點染色法(Western blotting)，進行測量心肌細胞存活路徑(survival pathway)(如下圖，由Delafontaine *et. al* 於西元2004年發表於*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*)的各蛋白。觀察心臟細胞是否透過活化PI3K/Akt 路徑而達到保護心肌細胞的表現。



經由以上已知的路徑，來加以探討糖尿病伴隨出血性休克在有無輸液治療後其心肌細胞損害的差異。

第二章 研究方法

第一節 研究材料及研究設計

一、實驗材料：

(1) 購自美國Sigma公司

Acrylamide (A-8887)

BSA (Bovine serum albumin)

DEPC (Diethyl pyrocabonate)

MgCl₂ (Magnesium chloride ; M-8266)

NaCl (Sodium chloride ; S-7653)

Paraformaldehyde

SDS (Sodium dodecyl sulfate ; L-4509)

Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate ; 17-1316-10)

STZ (Streptozotocin ;)

(2) 購自美國USB公司

Glycine (G-8165)

Tris-Base (T-8600)

Tris-HCl (T-8650)

(3) 購自聯工化學廠股份有限公司

Acetic acide

HCl (Chloric acid)

KCl (Potassium chloride)

K_2HPO_4 (Potassium phosphate,dibasic)

KH_2PO_4 (Potassium phosphate,monobasic)

$Na_2H_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Sodium phosphate)

(4) 購自美國Roche公司

RNase (109142)

Proteinase K (161519)

Proteinase K inhibitor (Proteinase inhibitor cocktail tables ; D-68298)

(5) 購自美國BMA公司

Gel star (50535)

ProSieve color protein markers

(6) 購自美國Amresco公司

APS (Ammonium persulfate ; 0486-25G)

Boric acid (0588-1KG-PTM)

Bis-acrylamide (0172-100G)

Phenol (0945-400ML)

(7) 購自美國NEN公司

PVDF membrane

(8) 購自美國CPG公司

TEMED (P-E90051)

(9) 購自慕容科技有限公司

Methanol

Ethanol



(10) 購自德國Roche公司

In Situ Cell Death Detection Kit, POD

(11) Antibody

名稱

廠牌

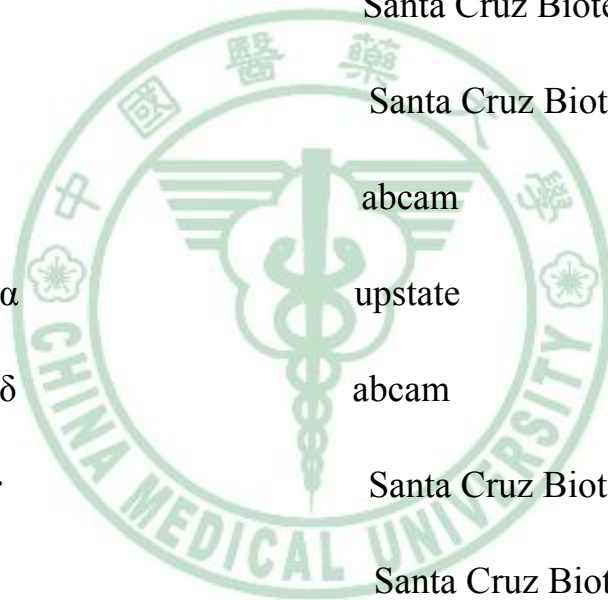
β -Actin

Santa Cruz Biotechnology

Phospho-IGFIR

abcam

IGFI	abcam
IGFIR	abcam
Phospho-PI-3k	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Akt	Cell signaling
Phospho-Bad	Santa Cruz Biotechnology
Bad	Santa Cruz Biotechnology
IGFII	Santa Cruz Biotechnology
IGFIIR	Santa Cruz Biotechnology
Gαq	abcam
Phospho-Pkc-α	upstate
Phospho-Pkc-δ	abcam
Cytochrome <i>c</i>	Santa Cruz Biotechnology
CASPASE-3	Santa Cruz Biotechnology
CASPASE-9	Santa Cruz Biotechnology
ANP	Santa Cruz Biotechnology
BNP	Santa Cruz Biotechnology
IL-6	abcan
Rac1	abcan
Phospho-JAK2	Santa Cruz Biotechnology



STAT3	Santa Cruz Biotechnology
TGFβ1	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Smad2/3	Santa Cruz Biotechnology
Sp1	Santa Cruz Biotechnology
CTGF	BD Biosciences

二、實驗儀器：

名稱

廠牌

GeneAmp PCR system

Techgene

Spectrophotometer

Hitachi U-2001

Centrifuge

Kubota-1720

Shark

TKS

水浴加熱器

FIRSTEK SCIENTRIC

Millipore

Nalgene

高壓殺菌釜

Tomin TM322

PH meter

Microcomputer pH/mV/TEMP METER 617

Homogenizer knots tissue grind

Wheaton

Glass Microfibre Filter (Dia. 47 mmφ)

Whatman

Vortex mixer model VM-100

PIGISYSTEM

LAB.

INTRUMENTS.INC

DNA 電泳槽	Mupid-2
數位影像儀	Kodak
天平	OHAUS
微量天平	OHAUS
正立螢光顯微鏡	ZEISS L8-80M
全波長酵素免疫分析儀	Molecular Device Spec 384

三、動物實驗設計-出血性休克模式

第一組:控制組(Control) (只施行剖腹手術, Sham operation)

第二組:出血性休克組(HS : Hemorrhagic shock)

第三組:糖尿病組(DM : Diabetes Mellitus)

第四組:糖尿病加出血性休克組(DM+HS)

第五組:糖尿病加出血性休克加復甦組(DM+HS+R : Resuscitation)

本實驗所採用出血性休克模型是使用固定血壓之出血性休克模型 (fixed-pressure hemorrhage), 在第二組(HS)、第四組(DM+HS)及第五組(DM+HS+R)中, 出血性休克的誘發是以從左股動脈抽血, 在十分鐘內讓平均動脈壓下降至 40 ± 5 mmHg, 並以抽血及輸血方式維持此血壓60分

鐘。休克維持以後，第二組、第四組不給予急救；而第五組(DM+HS+R)則給予輸血及輸液急救（原抽血量均完全輸回，並加同一體積輸血量之林格氏液予以輸注），急救應於十分鐘內完成。第一組(Control)及第三組(DM)除了接受剖腹、動靜脈插管及給予基本輸液外，在實驗期間並不誘發出血休克及復甦急救。急救期後實驗物之動靜脈插管給予拔除，並將血管結紮，令其甦醒。所有實驗動物至其規劃實驗終了時間點時，均給予安樂死以取得心臟組織。

(3-1)實驗動物準備

本實驗研究的大白鼠（Sprague-Dawley rats）購自樂斯科，實驗研究的大白鼠全部為雄性。所有購入的動物先飼養於中國醫藥大學動物中心，室溫維持在23℃，並保持固定光照週期（光-暗週期：各12小時），大白鼠飼養至年齡6~8週大，將SD品系雄性大白鼠共分五組，第一組：控制組(Control)，第二組：出血性休克組(HS)，第三組：糖尿病組(DM)，第四組：糖尿病出血性休克組(DM+HS)，第五組：糖尿病出血性休克及輸液治療組(DM+HS+R)。

以STZ進行誘導為糖尿病鼠一週後；測量其血糖值>200dl/ml，即視為高血糖，才進行實驗。大白鼠在實驗前不限制日常飲食。實驗前三天實驗動物送至實驗室以適應實驗室的環境。實驗前15分鐘穩定實驗動物

生理狀況並以溫度控制器維持實驗動物體溫($37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)直至實驗完成。

(3-2)麻醉方式

以氣麻機使用isoflurane麻醉劑，直到大白鼠被適當麻醉。

(3-3)導管準備

以 Polyethylene tubes (PE-50) 進行動靜脈插管，包括插入右股靜脈以作為輸液輸注之用。另一Polyethylene tubes (PE-50) 導管插入右股動脈並以Cardiomax- II model 85 (Columbus Instruments International Co.Ohio,USA)持續監測平均動脈壓。插入左股動脈以作為抽血要成出血性休克及輸血急救之用。所有實驗動物在實驗中均給予林格氏液輸注 (10 ml/kg body weight/hr)，以補充體液喪失。

(3-4)動物實驗步驟

Trauma/Hemorrhagic shock/Resuscitation步驟:

(3-4-1)準備期 (30分鐘)：包括剖腹手術 (從恥骨到劍突沿腹中線切開大

白鼠腹部曝露腸部內臟後，立即將傷口縫合)、儀器準備及動

靜脈插管，完成以上步驟開始實驗計時。

(3-4-2)穩定期 (10分鐘)：完成準備期後，將大白鼠靜置並監測其血壓

以穩定10分鐘生理徵象。誘發出血性休克：10 分鐘內從大白鼠靜脈導管抽血(2.5 ml/kg body weight)，平均動脈壓維持在 40 ± 5 mmHg。

(3-4-3)休克休克維持期 (60分鐘)：藉抽血或將血回輸維持平均動脈壓在 40 ± 5 mmHg;持續60分鐘。

(3-4-4)復甦急救 (Resuscitation) 期：將抽出之血(2.5 ml/kg body weight) 加上靜脈輸液(lactated Ringer's solution) (5 ml/kg body weight) 輸回實驗動物血管內。

(3-4-5)恢復期：移除導管、血管結紮、動物甦醒。

動物甦醒後依予以安樂死方式犧牲各組大白鼠，並立即從死亡大白鼠採集心臟組織。恢復期期間若大白鼠死亡而接近預定時程，立即以上述方式取得組織以供研究。

四、摘取組織：

將大白鼠麻醉後，快速犧牲，利用剪刀由腹腔往上剪開至胸腔，以

胸腔撐開器撐開肋骨，之後將心臟小心的剪下，殘留的血液以PBS清洗，並將心臟放入冰的PBS中放血，待放血完畢，並清洗乾淨後，將組織分兩部分，一部份作為組織切片染色之用；另一部份做為組織萃取之用。組織切片染色的部分首先以10%福馬林（formalin）固定至少12個小時後，組織進行脫水；進行組織萃取的部分以錫箔紙小心包好，放入-80 °C冰箱中儲存，做為進行西方墨點法。

五、組織切片（Histological analysis）：

切取SD rat的左心室心臟組織，將其以PBS清洗（rinse），接著以10% 福馬林（formalin）固定至少12個小時後，組織進行脫水。首先將左心室心臟組織樣品浸泡於PBS約30分鐘，再浸泡於0.85% NaCl 30分鐘，接著以不同濃度之酒精（分別為70%、85%、95%及100%）分別浸泡15、30、30及30分鐘，其中浸泡於70%、100%酒精之步驟需重覆兩次，並使用新鮮的酒精使其充分脫水。脫水後接著進行包埋，首先將心臟組織樣品浸泡於100% xylene約30分鐘，進行兩次，接著再浸泡於1：1之xylene/paraffin溶液中於60°C下處理45分鐘，最後在浸泡於100% paraffin於60°C下處理20分鐘（此步驟需重複3次）。組織包埋完後即可進行切片，切片厚度約為5 μm。

(5-1) 組織染色：

a. H&E stain--將所得之組織切片利用H&E (hematoxylin and eosin) 染色以進行觀察。其方法乃將切片標本脫蠟後，以hematoxylin染3分鐘，以 ddH₂O清洗，接著浸泡85 %酒精1分鐘。再以eosin溶液染5分鐘。而後依次浸泡於70 %、80 %、90 %酒精，最後再分別移入100 %酒精各2分鐘、xylene 兩次各30 秒後，封片。

b. Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL assay)-- 原理為利用TdT酵素催化，將標記有biotin的dNTP轉移到3'-OH端，並加入標記有過氧化氫酵素的streptavidin與biotin 作用，在利用受質呈色反應偵測凋亡的細胞。處理方法為將組織切片放入Hybridization Incubator 60 °C 30分鐘使蠟較易被溶解，之後再放入100 % Xylene中作用5分鐘 (重複三次)，進行脫蠟。接著依序放入100 %、95 %、90 %、85 %、75 %、70 % Alcohol中浸泡各5分鐘，在放入ddH₂O浸泡5分鐘。完成復水的動作後，將切片用拭鏡紙小心擦乾，用DaKo pan圈出section的範圍，注意不可讓section乾掉，加入proteinase K，覆蓋過切片範圍，作用25分鐘，注意不可讓section乾掉，作用完畢以PBS washing 5分鐘重複兩次。將切片擦乾，加入0.1 % sodium citrate覆蓋過切片，作用8分鐘，作用完畢以PBS washing 5分鐘重複兩次。將切片擦乾，加入Blocking buffer覆蓋過切片，作用30分鐘，作用完畢以PBS washing 5

分鐘重複兩次。以1：9 = Enzyme Solution：Label Solution覆蓋過切片範圍即可，放入37 °C的Hybridization Incubator中作用一小時，注意需避光，作用完畢以PBS washing 5分鐘重複兩次。以DAPI：PBS = 1：10000作用5分鐘，過程中需避光，作用完畢以PBS washing 5分鐘重複兩次。之後在螢光顯微鏡下觀察切片。

c. Trichrome Masson stain-- 將組織切片浸泡在Xylene中3分鐘，重複3次進行脫蠟的動作，之後將切片依序泡在100 % Alcohol中3分鐘重複3次，95 %及80 % Alcohol中3分鐘各一次，最後放入ddH₂O 5分鐘完成復水的過程。接著加入Bouin's solution在室溫下反應overnight，使組織切片的顏色更加明顯。之後將切片放置在水龍頭下，洗淨其上殘留的Bouin's solution染劑。隨後加入Hematoxylin solution作用5分鐘染細胞核，再以流動的ddH₂O洗淨殘留的染劑。再加入Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin 作用5分鐘染細胞質，再以ddH₂O洗淨多餘染劑。接著加入Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid Solution 作用10分鐘，使組織切片能夠吸收 aniline blue 的染劑。將 Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid Solution 洗淨後，隨即加入 Aniline Blue Solution 作用5分鐘染collagen，之後用ddH₂O洗淨殘留染劑。再加入1 % acetic acid solution作用5分鐘，接著將染劑用ddH₂O洗淨。最後，依序將切片放入95 %及100 % Alcohol重複兩次，接著再放入Xylene中5分鐘重複三次。最後將切片晾

乾，封片。

(5-2) 游離左心室：

將五組老鼠犧牲後取其心臟，截取整顆心臟，以PBS將心臟清洗乾淨，剪除心臟上殘餘之脂肪及血管，以拭鏡紙輕輕將水分吸乾，秤得全心重。隨即再剪下兩個心房以及右心室，剩下左心室，秤重並紀錄之，左心室組織分成五等分，放入離心管（Eppendorf tube）存放於-80 °C 冰箱，做為未來進行西方墨點法之用。

六、蛋白質濃度測定（Lowry protein assay）：

蛋白質的定量採用Lowry protein assay，其原理為蛋白質先與鹼性的銅離子作用，蛋白質中tyrosine 及tryptophan再還原phosphomolybdate而形成有顏色之複合物。此複合物顏色淺度與蛋白質中芳香族胺基酸的強度成正比。本方法過程為當鹼性銅離子試劑與蛋白質中少數胜肽鍵（peptide bond）反應，產生低層次之biuret顏色，其次當folin-Ciocalteu phenol reagent試劑加入後，與蛋白質中的tyrosine 及tryptophan反應後產生藍綠色之複合物。同時以BSA (Bovine Serum Albumin) 為對照組，首先配置standard (0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml)，用來當做標準曲線，接著將樣品稀釋為50倍（總體積為50 μ l），然後加入250 μ l 的Alkaline

copper reagent (2% Na-K tartrate、1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、2 % Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH；三者以1：1：98之比例混合)，並置於室溫下作用10分鐘；然後加入25 μl 的Folin-Ciocalteu phenol reagent混合，並置於室溫下作用30分鐘。最後，以750 nm吸光值測定並換算蛋白質的濃度。(LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. J Biol Chem 1951. 193:265-75.)

Standard

mg/ml	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
BSA(0.5mg/ml)	0	10	20	30	40	50
ddH ₂ O(μl)	50	40	30	20	10	0
Total(μl)	50	50	50	50	50	50

七、西方點墨法 (Western blotting)：

取樣品蛋白40 mg與5X loading dye混合均勻煮沸5分鐘，再進行SDS-聚丙稀胺板膠電泳分析。SDS-聚丙稀胺板膠電泳之上層膠體為3.75 % Stacking gel，下層膠體為10 %或12 %或15 %的 Separating gel。將做好之板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液 (Electrode buffer) 注滿電泳槽，然後將處理過的蛋白樣品溶液加入板膠上所形成的U型槽中，以75伏特進

行電泳。電泳結束後進行蛋白轉移，將膠體取出，將膠體平鋪在一張浸濕的Whatman 3M濾紙上，此時將預先用甲醇浸濕的PVDF membrane蓋在膠體上面，依次再覆蓋一張浸濕的3M濾紙，並以玻棒輕趕走其間的氣泡後裝入Transfer Holder，然後置於Electrotransfer Tank（內含Transfer buffer），於4 °C下進行100伏特電壓轉移，電轉移1個半小時之後，取出PVDF membrane浸入含5 %（w/v）脫脂牛奶（Blocking buffer）（PBS-non-fat milk powder）於室溫下搖動一個小時。將PVDF membrane置於4 °C冰箱中與一級抗體反應overnight，之後以Washing buffer清洗三次，每一次10分鐘，最後再清洗一次倒掉即可。再以secondary antibody（2 μ l/ml 1X TBS buffer）於4 °C下反應2小時，以相同的方式清洗PVDF membrane，再進行呈色反應。

第二節 統計方法

將各組數據，利用Sigma Plot軟體，以One Way ANOVA方法(單因子變異數分析)，分析數據是否有顯著意義，然而，當ANOVA的F-test顯著之下，只能得知群組平均值不完全相同，但並未獲得那兩組不相同，因此必須執行兩組間之比較。進而利用t-test 方法，兩兩一組檢視其中兩組有無顯著差異，並輔助P值，視其數據正確的可能機率。



第三章 研究結果

第一節 描述性統計分析

一、顯微鏡觀察經過出血性休克有無輸液治療的糖尿病鼠之心臟型態

我們進一步了解心肌細胞的變化，並觀察心肌細胞的型態有無任何差異性存在。我們將心臟組織以10%的福馬林固定之後，再截取心臟組織靠近中心點的位置，切片後以H&E的染色法，觀察心臟橫切面與心肌細胞的組織型態之變化。而H&E stain之Haematoxylin與Eosin分別是染細胞核與細胞質。如《Figure 1.》所示，Control組為一正常心臟巨觀的橫切面圖，其左、右心室腔壁、孔徑大小正常。與控制組比較，HS、DM、DM+HS與DM+HS+R組的大白鼠，其心臟整體有變大趨勢，呈現肥大的現象，其左、右心室的心肌組織有受拉扯的情形，而DM+HS組大白鼠心肌組織傷害明顯較大；DM+HS+R組其型態也有受到傷害。

二、以Trichrome Masson染色觀察經過出血性休克有無輸液治療量之糖尿病大鼠心肌細胞纖維化的情形

接著我們使用了Trichrome Masson的染色方式，觀察五組不同處理的心肌細胞，有無纖維化的情形出現。Trichrome Masson stain一般是染具有膠原蛋白纖維的組織部份，經染色後膠原蛋白纖維的組織部份呈現藍色

反應。所得結果如《Figure 2.》所示，與Control組相比，HS與DM+HS組之心肌組織，有較多解不規則斷裂與些微藍色的膠原蛋白纖維產生，表示有纖維化的情形出現，DM組同樣有些微的不規則與藍色膠原蛋白的表現，而DM+HS與HS、DM組相比有明顯嚴重的不規則斷裂與藍色的膠原蛋白纖維產生，而DM+HS+R組不規則的斷裂與藍色的膠原蛋白纖維產生的現象有減少的情形，表示纖維化的情況有被減輕。

三、以TUNEL assay觀察經過出血性休克有無輸液治療之糖尿病大鼠心肌細胞凋亡的變化

我們將心臟組織切片，採用Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL assay)的染色方式，觀察心肌細胞的凋亡的情形，本實驗中藍色螢光點是染DAPI stain，表示同一平面中所有細胞的所在位置；而綠色螢光點是染TUNEL stain，若出現綠螢光色點為凋亡的心肌細胞。所得的結果如《Figure 3.》所示，與控制組比較，HS與DM+HS組，有大量的凋亡細胞產生，而DM組同樣有些微的凋亡細胞產生，而DM+HS與HS、DM組相比有明顯嚴重的凋亡細胞產生，而DM+HS+R組其凋亡細胞產生的現象有減少的情形，表示凋亡的情況有被抑制。

從TUNEL assay的實驗結果可知，DM+HS組有明顯加乘性的傷害，

而DM+HS+R組有恢復的現象，可以壓制心肌細胞凋亡的產生，達到保護心肌細胞的作用。

四、以Western blotting方法分析凋亡訊息傳遞路徑蛋白的變化：

由上述染色的實驗結果，呈現了除了Control組外其他組別均有傷害，但DM+HS組其心肌細胞受到加乘的影響，DM+HS+R組則是又恢復的現象但在HE組織切片染色中，其心臟整體看來卻無法恢復，可能是因為輸液治療加上體內補償機制的的作用有抑制傷害但在外觀上則無法馬上恢復。所以接著想探討，經出血性休克有無輸液治療其心肌細胞誘發凋亡訊息路徑的蛋白產生，是否有加乘性的上升，而經輸液治療後是否有恢復的結果？

a. 觀察心臟組織透過路徑之IGFII R、Gαq、p-PKCα、Calcineurin

凋亡蛋白表現

接下來我們使用Western Blotting方法來探討出血性休克經有無輸液治療心肌細胞之凋亡訊息傳遞路徑，及觀察經輸液治療後心肌細胞的影響。將左心室組織萃取出蛋白液，利用Western Blotting來分析IGFII receptor pathway的蛋白IGFII R、Gαq、p-PKCα及Calcineurin的蛋白表現。從《Figure 4.》結果所示，我們發現與控制組比較，IGFII R蛋白量均在HS、

DM與DM+HS組均呈現上升的表現。且DM+HS組與DM組相比在IGFII R蛋白質表現量有加乘性的上升，達到統計上的顯著差異。而DM+HS+R組，與DM+HS組相比，蛋白則有被壓制下來。經量化的結果，達到統計上的顯著的意義。

從《Figure 5.》結果所示，我們發現與控制組比較， $G\alpha_q$ 及p-PKC α 的蛋白量均在HS、DM與DM+HS組均呈現上升的表現，在DM+HS組與HS組在p-PKC α 蛋白質表現量有加乘性的上升，達到統計上的顯著差異。而DM+HS+R組，與DM+HS組相比，p-PKC α 這蛋白都有被壓制下來。經量化的結果，達到統計上的顯著的意義。

在《Figure 6.》結果所示，與控制組比較，Calcineurin的蛋白量均在HS與DM+HS組均呈現上升的表現，且DM+HS組與DM組相比Calcineurin蛋白表現量有加乘性的上升，達到統計上的顯著差異。而DM+HS+R組，與DM+HS組相比，Calcineurin這蛋白都有被壓制下來。經量化的結果，達到統計上的顯著的意義。

b. 觀察心臟組織透過路徑之cytochrome c及caspase 9的凋亡蛋白表現

將左心室組織萃取出蛋白液，利用Western Blotting來分析出血性休克經有無輸液治療之心肌細胞之cytochrome c及caspase9凋亡蛋白表現量的影響。從《Figure 7.》結果所示，可觀察到與控制組相比，HS、DM與

DM+HS組造成 cytochrome *c*及 caspase 9的蛋白表現量上升，尤其是DM+HS與DM、HS組相比，蛋白表現高達兩倍之多，且達到統計上的顯著差異。在經輸液治療後DM+HS+R組，與DM+HS組相比，其蛋白表現量都下降，達到統計上顯著的意義。

由上述實驗結果，HS、DM與DM+HS組其心肌細胞均活化凋亡蛋白之表現，經輸液治療後DM+HS+R組都能將這些蛋白壓制下來。

c. 觀察心臟組織Caspases 3蛋白表現情形

由《Figure 8.》結果所示，可觀察到凋亡之訊息傳遞路徑最下游的凋亡蛋白（非活化態與活化態caspase 3）蛋白表現，發現與控制組比較，非活化態與活化態caspase 3的蛋白量均在HS、DM與DM+HS組，蛋白都有大量表現，達到統計上的顯著的差異。在DM+HS組，與HS、DM組相比，其蛋白表現量呈現加乘性的上升，達到統計上顯著的意義。而且經輸液治療後DM+HS+R組，與DM+HS組相比，其蛋白表現量都下降，達到統計上顯著的意義。

由此可知，HS、DM與DM+HS組之心肌細胞均活化細胞凋亡的訊息傳遞路徑，且DM+HS組有加乘性的傷害，但在經輸液治療後DM+HS組都有被壓制下來達到保護作用。

五、以Western blotting方法分析anti-apoptosis訊息路徑蛋白的變化：觀

察心臟組織透過活化p-Bad蛋白達到抗心肌細胞凋亡

由上述的實驗結果得知，DM+HS組在凋亡蛋白均有加乘性的傷害，而DM+HS+R組經輸液治療後可以壓制心肌細胞凋亡蛋白的表現。因此，進一步探討是否會活化促進心肌細胞抗凋亡蛋白的表現呢？

利用Western Blotting來分析p-Bad 這個抗凋亡蛋白的表現，《Figure 11.》結果所示，與Control組比較，在HS、DM、DM+HS與DM+HS+R組，p-Bad這抗凋亡蛋白的表現都有明顯被抑制，並達到統計上顯著的意義。與DM+HS組比較，在經過輸液治療後(DM+HS+R)，其p-Bad這個抗凋亡的蛋白表現有上升的趨勢。且由《Figure 11.》結果得知，DM+HS與HS、DM相比有加乘性傷害的趨勢，但經過輸液治療後(DM+HS+R)並不會抑制心肌細胞活化這個抗凋亡蛋白的表現。由此可知，DM+HS+R可以藉由活化p-Bad這個抗凋亡的蛋白的表現，來達到保護心肌細胞的作用。

六、以Western blotting方法分析survival訊息傳遞路徑蛋白的變化：

觀察心臟組織透過活化PI3K/Akt pathway達到保護心肌細胞

由上述實驗結果得知，DM+HS+R可以活化抗凋亡的蛋白的表現達到保護心肌細胞，那是否也會透過活化PI3K/Akt 訊息傳遞路徑達到保護作用。利用Western Blotting來分析PI3K、p-Akt這些蛋白的表現，從《Figure 9、10.》結果所示，與Control組比較，在HS、DM、DM+HS與DM+HS+R組，PI3K、p-Akt這些survival蛋白的表現都有明顯被抑制，並達到統計上

顯著的意義。而且由《Figure 9、10.》的結果得知，DM+HS與HS、DM相比有加乘性傷害的趨勢，而DM+HS+R與DM+HS組相比，經輸液治療會促進心肌細胞活化這些survival蛋白的表現。

由上述的實驗結果，經輸液治療可以透過活化這些survival蛋白的表現達到保護心肌細胞的作用。

第二節 推論性統計分析

實驗將大白鼠的左心室游離，並採用西方墨點法，及組織染色切片分析。實驗結果顯示，糖尿病現象及出血性休克均造成胚胎基因IGFII表現增加，造成IGFIIR pathway活化，並經Gαq、PKCα進一步活化 calcineurin (Ca²⁺-sensitive phosphatase)，並 dephosphorylated p-Bad使其變成Bad，Bad因與粒線體膜結合，促使粒線體膜上電子傳遞鏈遭到破壞，而造成粒線體膜電位不穩定，進而使Cytochrome c由粒線體內釋出並活化下游Caspase 9及3；引發DNA斷裂並使得心肌細胞走向凋亡。但所有現象均在輸液治療後有部分回復的現象。同時輸液補充並進一步促進survival路徑相關蛋白，如PI-3k，p-Akt及p-Bad的表現。對survival pathway的壓制，以糖尿病組(DM)影響大於出血性休克組(HS)；且在兩個因素結合的

組別更具有加乘性的傷害。而對apoptosis pathway的促進作用則是出血性休克組(HS)影響大於糖尿病組(DM)；而糖尿病合併出血性休克組(DM+HS)更加乘性促進；但在輸液治療的組別(DM+HS+R)，則明顯具有抑制其傷害並且呈現部分恢復的結果。



第四章 討論

第一節 結果討論

綜合所有證據顯示，糖尿病大白鼠伴隨大量出血性休克後確實造成心肌細胞加乘性的傷害。

經切片後，以H&E的染色法，觀察心臟橫切面與心肌細胞的組織型態之變化。與控制組比較，HS、DM、DM+HS與DM+HS+R組的大白鼠，其心臟整體有變大趨勢，呈現肥大的現象，其左、右心室的心肌組織有受拉扯的情形，而DM+HS組大白鼠心肌組織傷害明顯較大。

使用Trichrome Masson的染色方式，HS與DM+HS與DM組之心肌組織，有較多不規則斷裂與些微藍色的膠原蛋白纖維產生，表示有纖維化的情形出現，DM+HS組明顯嚴重許多。DM+HS+R組則有減少的情形。

使用TUNEL assay的染色方式，HS與DM+HS組，有大量的凋亡細胞產生，而DM組同樣有些微的凋亡細胞產生，而DM+HS與HS、DM組相比有明顯嚴重的凋亡細胞產生，而DM+HS+R組其凋亡細胞產生的現象有減少的情形。

用Western Blotting來分析凋亡路徑上的蛋白表現。IGFII R、Gαq、p-PKCα、Calcineurin、cytochrome c、caspase 9及caspase 3的蛋白量均在HS、DM與DM+HS組均呈現上升的表現。且DM+HS組與DM組相比有加

乘性的上升。而DM+HS+R組，與DM+HS組相比，蛋白則有被壓制下來。
p-Bad 這個抗凋亡蛋白的表現則與上述的情形相反⁵³。

利用Western Blotting來分析存活路徑上的PI3K、p-Akt這些蛋白的表現⁵⁴。在HS、DM、DM+HS與DM+HS+R組，PI3K、p-Akt這些survival蛋白的表現都有明顯被抑制。DM+HS與HS、DM相比有加乘性傷害的趨勢，而DM+HS+R與DM+HS組相比，經輸液治療會促進心肌細胞活化這些survival蛋白的表現。

由Western Blotting 來看，可以發現在凋亡路徑上的蛋白，因為HS而增加的幅度比因為DM而增加的幅度來得高。表示出血性休克對心肌細胞凋亡的影響大於糖尿病的影響。分析有可能是因為出血性休克時造成細胞缺氧及發炎反應的急速變化而快速促進細胞凋亡所致。相較於糖尿病一般認為是較慢性的變化所以影響幅度較小。當然詳細的機轉和原因還有待探討。就像是抗凋亡蛋白p-Bad，反而是在糖尿病組的下降幅度大於出血性休克組的。

由Western Blotting來分析存活路徑上的PI3K、p-Akt蛋白，也可以發現DM組下降的幅度大於HS組。或許糖尿病的慢性長期影響對於細胞受傷後的努力恢復存活是影響較大的。就如臨床上，一般都相信糖尿病的患者傷口都較不易癒合和復原一樣。當然詳細的機轉和原因仍有待探討。

比較特別的是，可以發現，在凋亡路徑上的蛋白，在DM+HS+R這組上，濃度有時會發現低於控制組，也就是說，經過復甦的細胞，會產生凋亡的程度比控制組還低，這是比較特別的現象。推測是否有可能在DM+HS+R時，已經有一些細胞死亡，加上在復甦的時候，因為輸液使得心室腔產生壓力變化，刺激了一些其它神經回饋等等的器官機轉，反而導致細胞凋亡蛋白的濃度下降。當然，詳細的原因也是我們以後希望能夠探討和研究的地方。

實驗結果是集中在可以發現DM+HS+R和DM+HS組的差別，也就是適當的復甦確實是有益處的，對臨床上的應用也是重要的。與控制組的比較也是我們未來要努力的方向。

第二節 其他相關性討論

本實驗採用的糖尿病大白鼠，是用STZ進行誘導的，屬於急性的糖尿病誘發，造成insulin的生合成產生破壞，這和一般臨床上的慢性糖尿病病患是有可能產生差異的。使用原來即是糖尿病的肥胖大白鼠來進行試驗也是我們未來考慮的方向。

本實驗未再加入額外的物質而是使用乳酸林格氏液(lactated Ringer's

solution)來進行復甦。已經有一些初步研究發現，可以使用

Dehydroepiandrosterone (DHEA)來抑制因缺血後再灌流產生的氧傷害

⁵⁵。而DHEA對因氧傷害而阻斷了的糖尿病大白鼠的平滑肌修復，也有恢復

其功能的效果⁵⁶。當糖尿病大白鼠因某些原因合併產生氧傷害時，也已經

有研究發現，綠茶萃取物可以有效的對心臟產生保護作用，是很好的抗

氧化物質⁵⁷。使用高張溶液來進行復甦治療也已經被廣泛的探討。

第三節 研究限制

研究中幾個研究限制值得進一步探討。首先，研究分組的實驗室數值存在廣泛的差異。可能是由於大白鼠的個別差異造成的。在每個時間點，每組偏小的樣本數，存有實驗室數值廣泛差異，將導致統計資料更多的影響。若要消除或降低實驗研究的偏差，每組大白鼠更大的樣本應被列入考慮。

第五章 結論與建議

第一節 結論

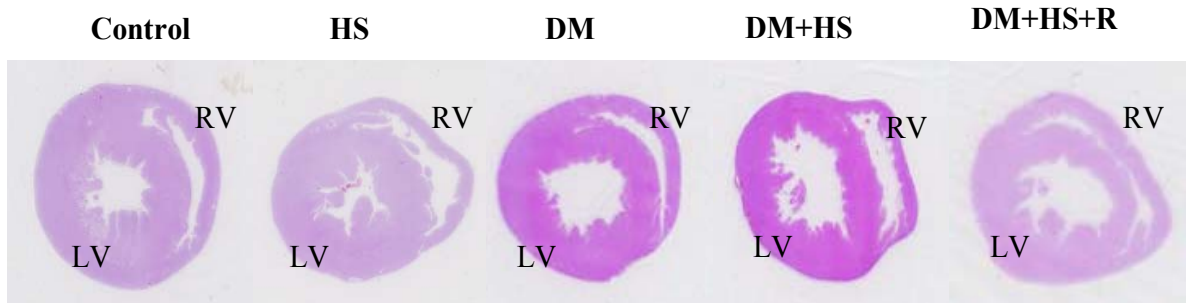
綜合所有證據顯示，糖尿病大白鼠伴隨大量出血性休克後確實造成心肌細胞加乘性的傷害，輸液治療後有減緩且部分恢復的現象，但終究無法完全使其恢復。在近代醫學，對各種抗氧化物的研究愈來愈廣泛，例如綠茶萃取物等等，都有報告顯示有抗氧化和抗缺血後細胞傷害的效果。今後將嘗試額外搭配添加其他抗氧化物質或中醫藥等。期盼能促進更好的恢復效果。



第二節 建議

在現代，糖尿病的病人愈來愈多，且外傷的照護愈受重視，而人的生命價值及生活品質也愈受尊重。進行有關已是糖尿病人，又因外傷而出血性休克所導致的傷害的研究，雖然變因增多了，但是相信更符合臨床的可能，也會對臨床醫學與基礎醫學都有相當的助益。在動物模型的研究結果完善之後，也可以對臨床病患的照護產生不同程度的啟發和思考方向。

圖表



LV= Left ventricle ; RV= Right ventricle

Figure 1：以 H&E 染色觀察心臟整體型態變化之情形

利用組織切片觀察所有組別其心臟橫切面。Control 組為一正常心臟橫切面圖，其左右心室腔壁、孔徑大小正常；HS 其左右心室均有擴張的現象，其心室壁厚度均有變薄、變細，已走向擴張性的肥大；DM、DM+HS 與 DM+HS+組其左右心室均有擴張的現象，其心室壁厚度均有變薄、變細，特別是 DM+HS 組更為明顯；已走向擴張性的肥大。

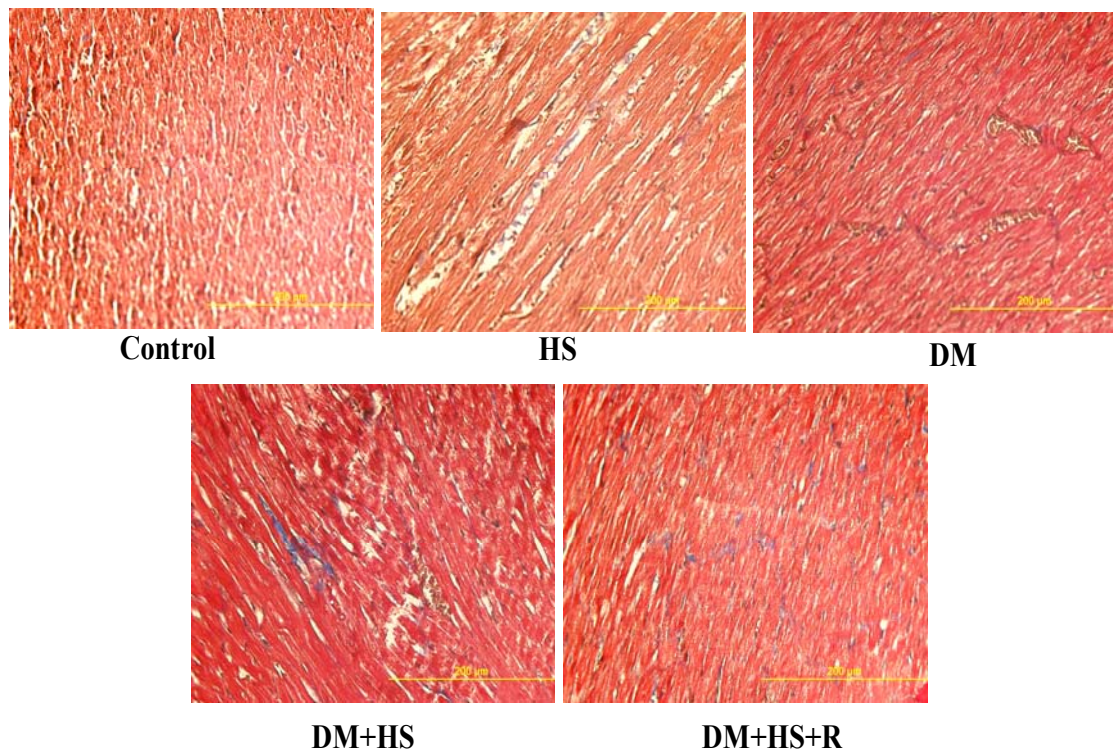


Figure 2：以 Trichrome Masson 染色觀察心肌細胞纖維化情形

與 Control 組相比，HS 心肌組織，有較多解不規則斷裂與些微藍色的膠原蛋白纖維產生，表示有纖維化的情形出現，DM 組同樣有些微的不規則與藍色膠原蛋白的表現，而 DM+HS 與 HS、DM 組相比有明顯且嚴重的不規則斷裂與藍色的膠原蛋白纖維產生，而 DM+HS+R 組不規則的斷裂與藍色的膠原蛋白纖維產生的現象有減少的情形，表示纖維化的情況有被改善的現象。

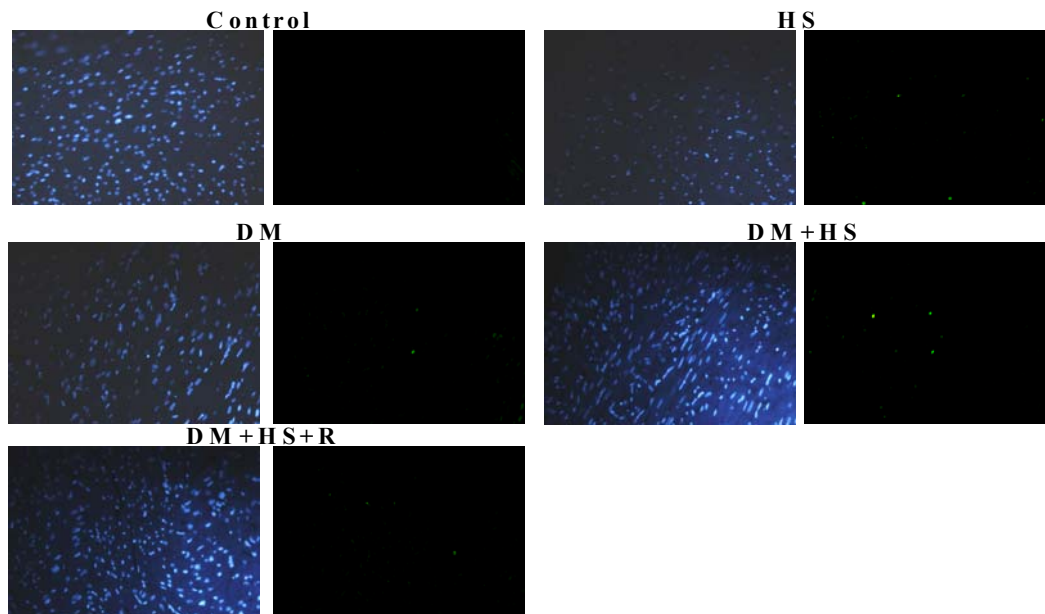


Figure 3：以 TUNEL assay 染色法觀察心肌細胞凋亡情形

將心臟組織以 PBS 清洗乾淨，再用 10% 中性福馬林固定，以 TUNEL assay 染色法觀察心肌細胞的凋亡情形，藍色螢光點是染 DAPI stain，表示同一平面中所有細胞的所在位置；而綠色螢光點是染 TUNEL stain，若出現綠螢光色點為凋亡的心肌細胞。由結果發現 HS、DM、DM+HS 與 DM+HS+R 相較於控制組，心肌細胞凋亡的情形，都有明顯的增加。其中 DM +HS 與 HS、DM 組相比，凋亡情形有較為嚴重；而 DM+HS+R 與 DM +HS 組相比有明顯的減少。

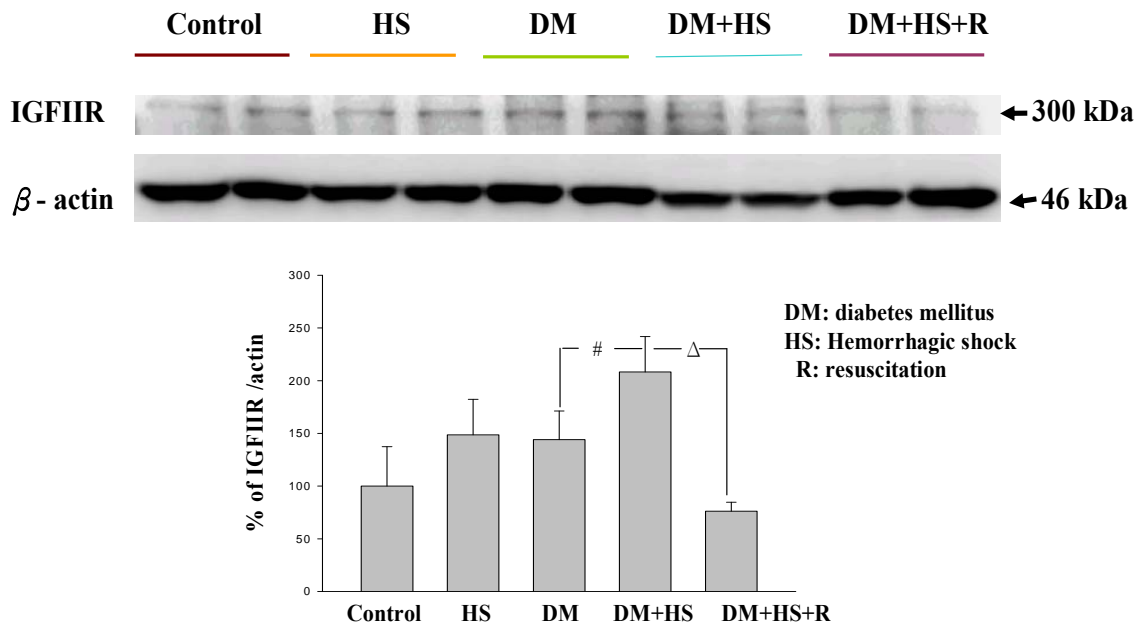


Figure 4：以Western blotting方法分析IGFIIR蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM、DM+HS相較於Control，IGFIIR蛋白的表現有上升的趨勢，DM+HS與HS、DM相比，蛋白的表現都有加乘性上升的趨勢，特別是DM與DM+HS相比後，IGFIIR其蛋白的表現有明顯加乘性上升的現象，並達到統計上顯著差異；而DM+HS+R與DM+HS相比後，IGFIIR其蛋白的表現有明顯下降的現象，並達到統計上顯著差異。

(#表示 $P < 0.05$ ，DM與DM+HS組比較，具顯著差異； Δ 表示 $P < 0.05$ ，與DM+HS+R組比較，具顯著差異)

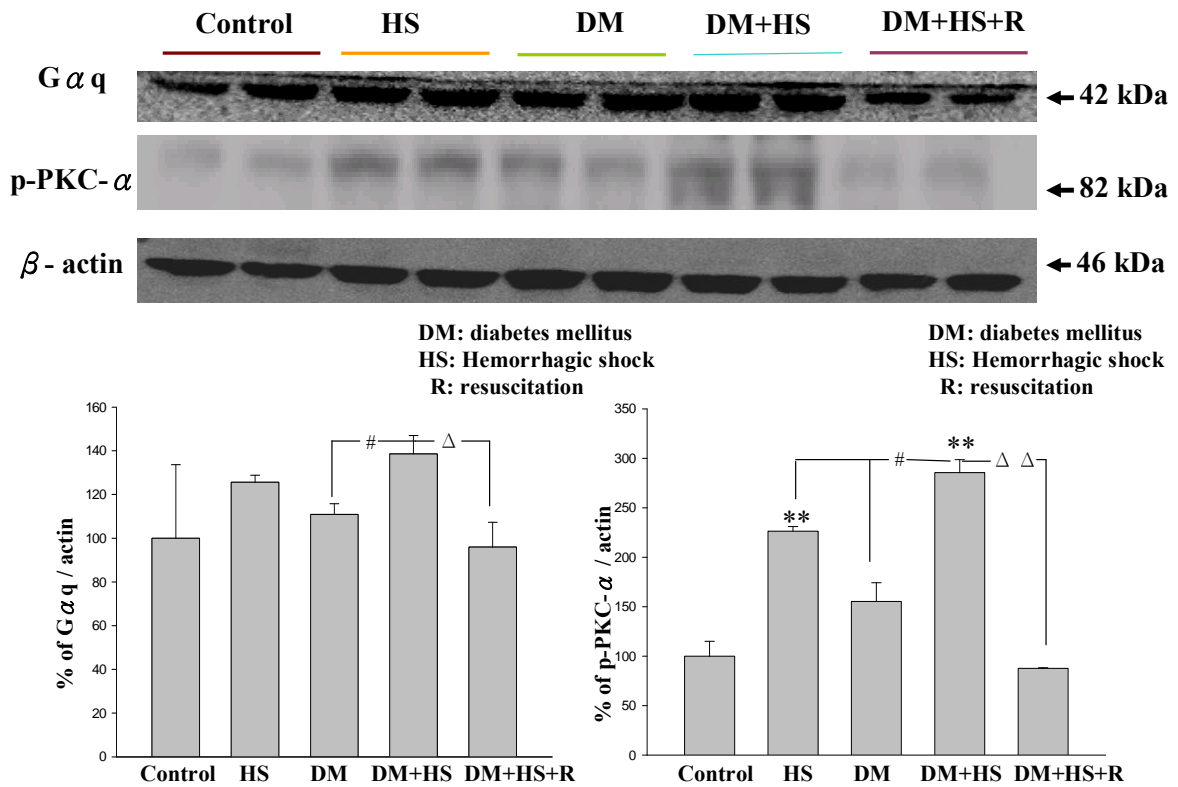


Figure 5：以Western blotting方法分析Gαq、p-PKCα蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM、DM+HS組相較於控制組，Gαq、p-PKCα蛋白的表現有明顯的上升，特別是p-PKCα蛋白表現達到統計上顯著差異，而DM+HS組，與HS組相比，p-PKCα蛋白的表現有加乘性上升的趨勢，特別是DM+HS+R組與DM+HS組相比，其Gαq、p-PKCα蛋白的表現有明顯被壓制的現象，並達到統計上顯著差異。（**表示 P<0.05，與控制組比較，具顯著差異；#表示 P<0.05，與DM+HS組比較，具顯著差異；Δ表示 P<0.05，ΔΔ表示 P<0.01，與DM+HS+R組比較，具顯著差異）

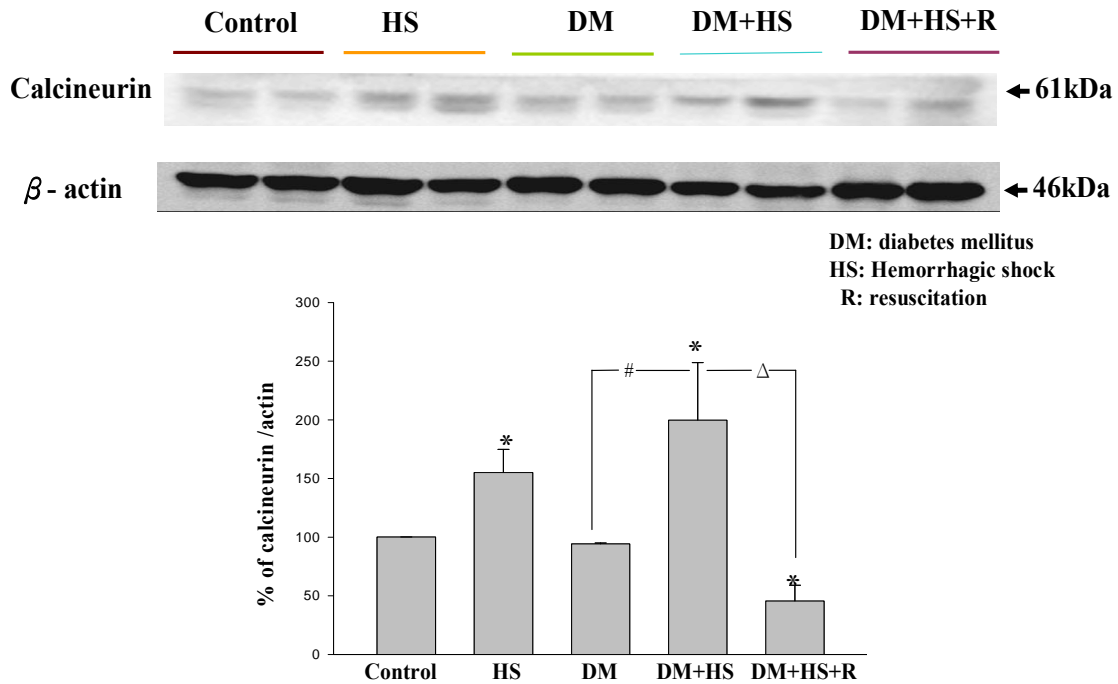


Figure 6：以Western blotting方法分析Calcineurin蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM+HS組相較於控制組，Calcineurin蛋白的表現有明顯的上升，並達到統計上顯著差異，而DM+HS組，與DM相比，Calcineurin蛋白的表現呈現加乘性上升的趨勢，並達到統計上顯著差異，而DM+HS+R組，與DM+HS相比，Calcineurin蛋白的表現有被壓制下來的趨勢，並達到統計上顯著差異。（*表示 $P < 0.05$ ，與控制組比較，具顯著差異；#表示 $P < 0.05$ ，與DM+HS組比較，具顯著差異； Δ 表示 $P < 0.05$ ，與DM+HS+R組比較，具顯著差異）

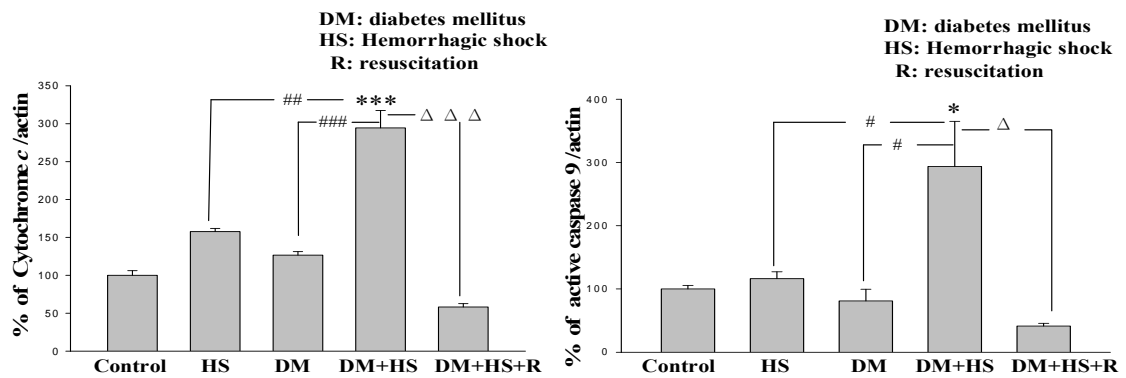


Figure 7 : 以Western blotting方法分析Cytochrome *c*、Caspase 9蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM、DM+HS相較於Control，Cytochrome *c*、Caspase 9 蛋白的表現有明顯的上升，而DM+HS達到統計上顯著差異，HS、DM與DM+HS相比，蛋白的表現都有加乘上升的趨勢，特別是DM+HS與DM+HS+R相比後，其蛋白的表現有明顯下降的現象，並達到統計上顯著差異。（*表示 $P < 0.05$ ，與控制組比較，具顯著差異；#表示 $P < 0.05$ ，##表示 $P < 0.01$ ，###表示 $P < 0.001$ ，與DM+HS組比較，具顯著差異； Δ 表示 $P < 0.05$ ， $\Delta\Delta\Delta$ 表示 $P < 0.001$ ，與DM+HS+R組比較，具顯著差異）

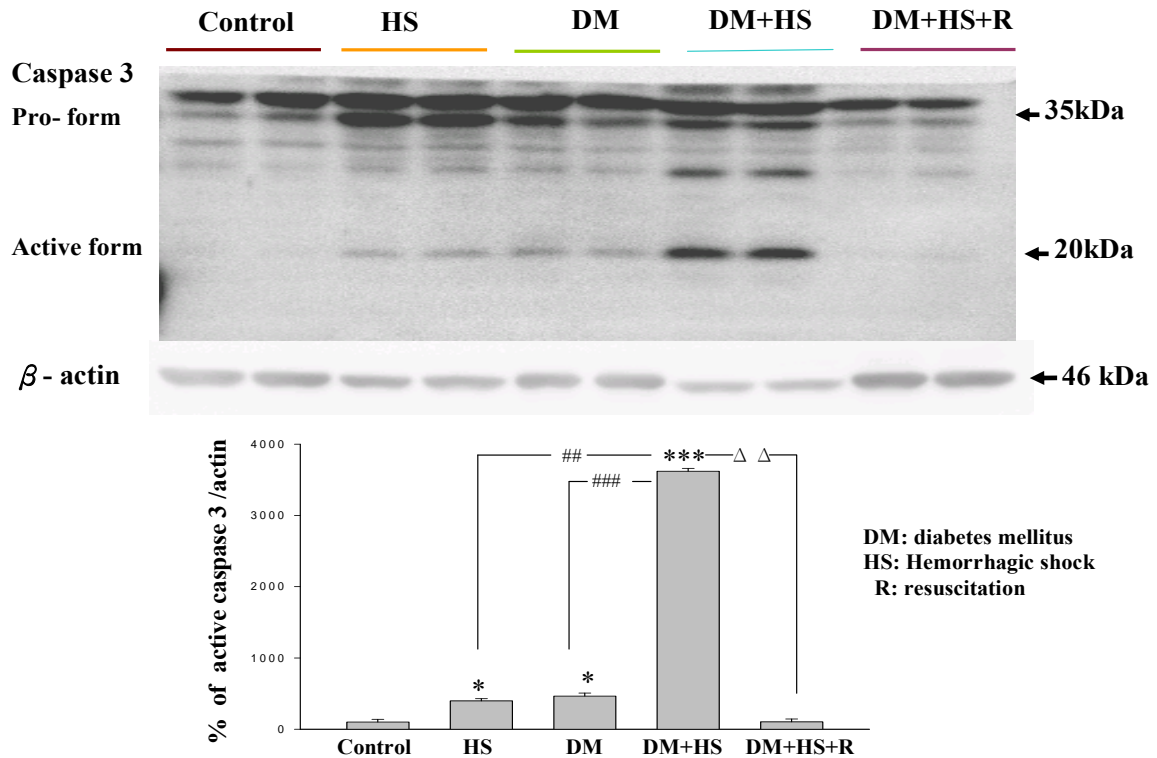


Figure 8 : 以Western blotting方法分析Caspase 3蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM、DM+HS相較於Control，Caspase 3蛋白的表現有明顯的上升，且達到統計上顯著差異，DM+HS與HS、DM相比，蛋白的表現都有加乘上升的趨勢，特別是DM+HS+R與DM+HS相比後，Caspase 3其蛋白的表現有明顯下降的現象，並達到統計上顯著差異。（*表示 $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ 與控制組比較，具顯著差異；##表示 $P < 0.01$ ，###表示 $P < 0.001$ ，與DM+HS組比較，具顯著差異； $\Delta\Delta$ 表示 $P < 0.01$ ，與DM+HS+R組比較，具顯著差異）

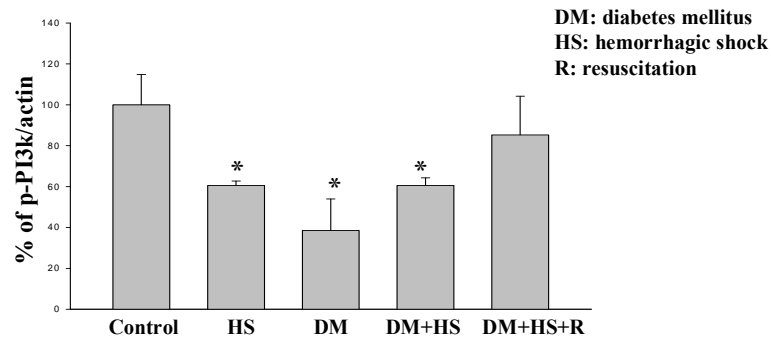
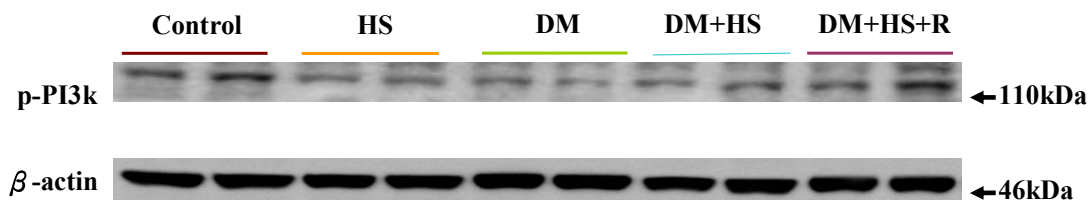


Figure 9 : 以Western blotting方法分析p-PI3K蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM與DM+HS組相較於控制組，p-PI3K蛋白的表現有明顯的抑制，且達到統計上顯著差異，而DM+HS+R組有些微的回復，與DM+HS相比。(*表示 P < 0.05，與控制組比較，具顯著差異)

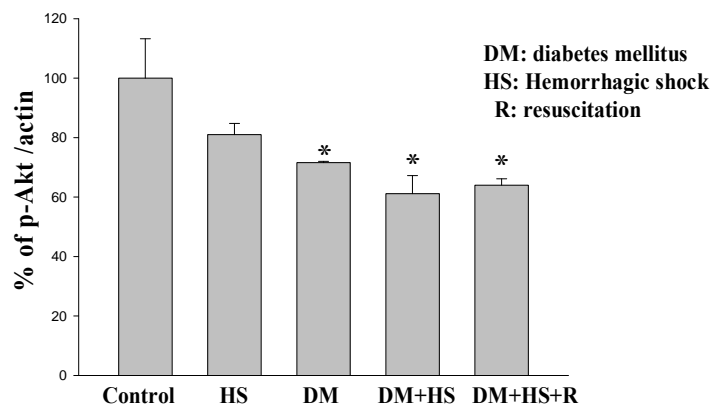
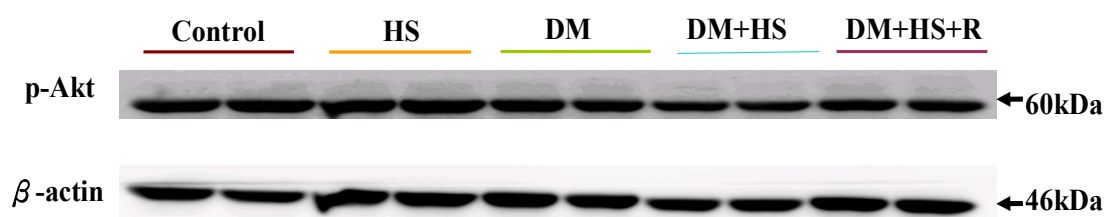


Figure 10：以Western blotting方法分析p-Akt蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM、DM+HS與DM+HS+R組相較於控制組，p-Akt蛋白的表現有明顯的抑制，且達到統計上顯著差異，而DM+HS+R組些微的回復，與DM+HS相比。(*表示 $P < 0.05$ ，與控制組比較，具顯著差異)

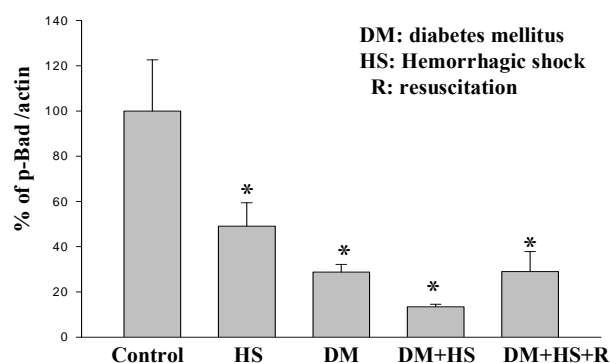
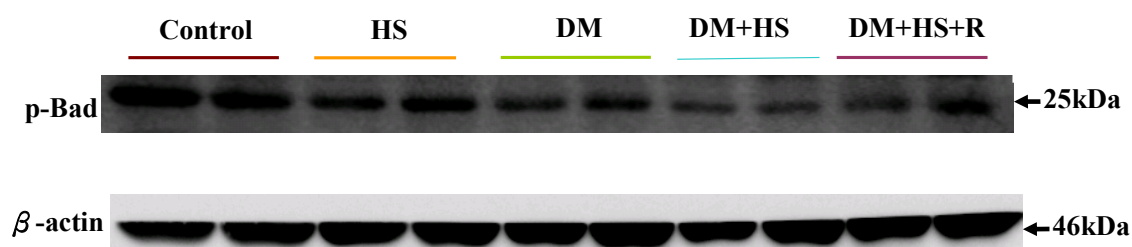


Figure 11 : 以Western blotting方法分析p-Bad蛋白表現量

從實驗結果發現HS、DM、DM+HS與 DM+HS+R組相較於控制組，p-Bad蛋白的表現有明顯的下降，並達到統計上顯著差異，而DM+HS組，與HS及DM組相比，p-Bad蛋白的表現都有加乘性下降的趨勢，特別是DM+HS+R與DM+HS組相較之下，其蛋白的表現有回復的現象>(*表示 P < 0.05，與控制組比較，具顯著差異)

參考文獻

1. Caroline S. et al. Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus. *Circulation* 115:1544-1550, 2007.
2. Boudina S, Abet,E Dale. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 115(25):3213-23, 2007 Jun 26.
3. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 54(6):1615-25, 2005 Jun.
4. Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Advances in Cardiology*.45:1-16, 2008.
5. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Research & Clinical Practice*.77 Suppl 1:S41-5, 2007 Sep.
6. Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxidants & Redox Signaling*. 9(3):343-53, 2007 Mar.
7. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Catalano MG, Vercellinatto I, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative Stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology*.

- 147(12):5967-74, 2006 Dec.
8. Guha A, Harmancey R, Taegtmeier H. Nonischemic heart failure in diabetes mellitus. *Current Opinion in Cardiology*. 23(3):241-8, 2008 May.
 9. Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, Dhayat N, Schmidt A, Noutsias M, Song XY, Spillmann F, Riad A, Schultheiss HP, Tschope C. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*. 102(6):500-7, 2007 Nov.
 10. Masoudi FA, Inzucchi SE. Diabetes mellitus and heart failure: epidemiology, mechanisms, and pharmacotherapy. *American Journal of Cardiology*. 99(4A):113B-132B, 2007 Feb 19.
 11. Cothen-Solal A, Beauvais F, Logeart D. Heart failure and diabetes mellitus: epidemiology and management of an alarming association. *Journal of Cardiac Failure*. 14(7):615-25, 2008 Sep.
 12. Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*. 57(12):3297-306, 2008 Dec.
 13. Kuethe F, Sigusch HH, Bornstein SR, Hilbig K, Kamvissi V, Figulla HR.

- Apoptosis in patients with dilated cardiomyopathy and diabetes: a feature of diabetic cardiomyopathy. *Hormone Et Metabolic Research*. 39(9):672-6, 2007 Sep.
14. Yamamoto E, Lai ZF, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y, Ito T, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of Hypertension*. 24(10):2057-69, 2006 Oct.
15. Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G, Vercellinatto I, Bardini P, Geuna S, Catalano MG, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. *Endocrinology*. 149(1):380-8, 2008 Jan.
16. Gonzalez-Vilchez F, Ayuela J, Ares M, Pi J, Castillo L, Martin-Duran R. Oxidative stress and fibrosis in incipient myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients. *International Journal of Cardiology*. 101(1):53-8, 2005 May 11.
17. Gorelik O, Almozni-Sarafian D, Alon I, Shteinshnaider M, Chachashvily S, Tzur I, Modai D, Cohen N. Heart failure in diabetes mellitus: clinical features and prognostic implications. *Cardiology*. 103(3):161-6, 2005.

18. Burger AJ, Tsao L, Aronson D. Prognostic impact of diabetes mellitus in patients with acute decompensated heart failure. *American Journal of Cardiology*. 95(9):1117-9, 2005 May 1.
19. Aksnes TA, Schmieder RE, Kiildsen SE, Ghani S, Hua TA, Julius S. Impact of new-onset diabetes mellitus on development of atrial fibrillation and heart failure in high-risk hypertension. *American Journal of Cardiology*. 101(5):634-8, 2008 Mar 1.
20. Nakatani D, Sakata Y, Mizuno H, Shimizu, Suna S, Usami M, Ito H, Yasumura Y, Hirayama A, Takeda H, Hori M, Sato H, Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group. Impact of diabetes mellitus on rehospitalization for heart failure among survivors of acute myocardial infarction in the percutaneous coronary intervention era. *Circulation Journal*. 73(4):662-6, 2009 Apr.
21. Gutierrez G, Reines HD, Wult-Gutierrez Me. Clinical review: hemorrhagic shock. *Critical Care*. 8(5):373-81, 2004 Oct.
22. Machiedo GW, Zaets SB, Berezina TL, Xu DZ, Feketova E, Spolarics Z, Deitch EA. Trauma-hemorrhagic shock-induced red blood cell damage leads to decreased microcirculatory blood flow. *Critical Care Medicine*. 37(3):1000-10, 2009 Mar.

23. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Critical Care*. 7(5):359-72, 2003 Oct.
24. Chow CC, Clermont G, Kumar R, Lagoa C, Tawadrous Z, Gallo D, Betten B, Bartels J, Constantine G, Fink MP, Billiar TR, Vodovotz Y. The acute inflammatory response in diverse shock states. *Shock*. 24(1):74-84, 2005 Jul.
25. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Critical Care Medicine*. 29(7 Suppl):S99-106, 2001 Jul.
26. Singer M., De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 364(9433):545-8, 2004 Aug 7-13.
27. DeLong WG Jr, Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. (422):57-65, 2004 May.
28. Zhang Y, Ming J, Li T, Yang G, Xu J, Chen W, Liu L. regulatory effects of hypoxia-inducible factor 1 α on vascular reactivity and mechanisms following hemorrhagic shock in rats. *Shock*. 30(5):557-62, 2008 Nov.
29. Reynolds PS, Barbee RW, Ward KR. Lactate profiles as a resuscitation

- assessment tool in a rat model of battlefield hemorrhage resuscitation. *Shock*. 30(1):48-54, 2008 Jul.
30. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *American Journal of Physiology*. 259(4 Pt 2):R663-78, 1990 Oct
31. Subeq YM, Peng TC, Hsu BG, Lin NT, Chao YF, Hu TM, Lee RP. Effects of different fluid resuscitation speeds on blood glucose and interleukin-1 beta in hemorrhagic shock. *Journal of Trauma-Injury Infection Et Critical Care*. 66(3):683-92, 2009 Mar.
32. Hirshberg A, Hoyt DB, Mattox KL. Timing of fluid resuscitation shapes the hemodynamic response to uncontrolled hemorrhage: analysis using dynamic modeling. *Journal of Trauma-Injury Infection Et Critical Care*. 60(6):1221-7, 2006 Jun.
33. Martini WZ, Chinkes DL, Sondeen J, Dubick MA. Effects of hemorrhage and lactated Ringer's resuscitation on coagulation and fibrinogen metabolism in swine. *Shock*. 26(4):396-401, 2006 Oct.
34. Cruz RJ Jr, Yada-Langui MM, de Figueiredo LF, Sinosaki S, Rocha e Silva M. The synergistic effects of pentoxifylline on systemic and regional perfusion after hemorrhage and hypertonic resuscitation. *Anesthesia &*

Analgesia. 102(5):1518-24, 2006 May.

35. Cal B, Chen F, Lin X, Miller E, Szabo C, Deitch EA, Ulloa L.

Anti-inflammatory adjuvant in resuscitation fluids improves survival in hemorrhage. *Critical Care Medicine*. 37(3):860-8, 2009 Mar.

36. Cai B, Deitch EA, Grande D, Ulloa L. Anti-inflammatory resuscitation

improves survival in hemorrhage with trauma. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*. 66(6):1632-9; discussion 1639-40, 2009 Jun.

37. Handrigan MT, Bentley TB, Oliver JD, Tabaku LS, Burge JR, Atkins JL.

Choice of fluid influences outcome in prolonged hypotensive resuscitation after hemorrhage in awake rats. *Shock*. 23(4):337-43, 2005 Apr.

38. Deniz T, Agalar C, Ozdogan M, Edremitlioglu M, Eryilmaz M, Devay SD,

Deveci O, Agalar F. Mild hypothermia improves survival during hemorrhagic shock without affecting bacterial translocation. *Journal of Investigative Surgery*. 22(1):22-8, 2009 Jan-Feb.

39. Hsu CY et al. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia for post-resuscitation myocardial dysfunction. *Shock*. 2008, Dec 22

40. David Bar-Or, MD, Michelle C. McDonald, PhD, et al. Reduction of infarct size in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion by the synthetic peptide DAHK. *Crit Care Med*. 34:1955-1959, 2006

41. Muchael A. Tortorici, PharmD, Patrick M. Kochanek, MD, FCCM; Robert R. Bies, PharmD, PhD, et al. Therapeutic hypothermia-induced pharmacokinetic alterations on CYP2E1 chlorzoxazone-mediated metabolism in a cardiac arrest rat model. *Crit Care Med.* 34:785-791, 2006
42. Naoaki Harada, MD, Kenji Okajima, MD, Mitsuhiro Uchiba, MD. Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Crit Care Med.* 34:1883-1891, 2006.
43. Lee MA et al. Role of gut-lymph factors in the induction of burn-induced and trauma-shock-induced acute heart failure. *Int J Clin Exp Med.* 1(2):171-80, 2008.
44. Adeghate E. Molecular and cellular basis of the etiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem.* 261:187–191, 2006
45. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 25:543–567.
46. Poornima, Indu G. Parikh, Pratik. Shannon, Richard P. : Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circulation Research.* 98(5):596-605, 2006.

47. Creager MA, Luscher TF. Diabetes and vascular disease; pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation* 108:1527-1532, 2003.
48. Rosen, P. Nawroth, P P. King, G. et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research Reviews*. 17(3):189-212, 2001
49. Manuela Aragno, Raffaella Mastrocola, Giuseppe Alloatti, et al. Oxidative Stress Triggers Cardiac Fibrosis in the Heart of Diabetic Rats. *Endocrinology* 149(1):380-388, 2008.
50. Majde JA. Animal models for hemorrhage and resuscitation research. *Journal of Trauma-Injury Infection Et Critical Care*. 54(5 Suppl):S100-5, 2003 May.
51. Hauser CJ. Preclinical models of traumatic, hemorrhagic shock. *Shock*. 24 Suppl 1:24-32, 2005 Dec.
52. Lomas-Niera JL, Pert M, Chung CS, Ayala A. Shock and hemorrhage: an overview of animal models. *Shock*. 24 Suppl 1:33-9, 2005 Dec.
53. Chun-Hsien Chu, Bor-Show Tzang, Li-Mien Chen, et al.

IGF-II/mannose-6-phosphate receptor signaling induced cell hypertrophy and atrial natriuretic peptide/BNP expression via G_{αq} interaction and protein kinase C- α /CaMKII activation in H9c2 cardiomyoblast cells. *J. Endocrinol.* 197: 381 – 390, 2008

54. Youl Kang H. Hwan Kim S. Jun Lee W. et al. Effects of ginseng ingestion on growth hormone, testosterone, cortisol, and insulin-like growth factor 1 responses to acute resistance exercise. *Journal of Strength & Conditioning Research.* 16(2):179-83, 2002
55. Aragno M. Parola S. Brignardello E. et al. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats. *Diabetes.* 49(11):1924-31, 2000
56. Arsgno M, Mastrocola R, Catalano MG, Brignardello E, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes.* 53(4):1082-8, 2004 Apr.
57. Pon Velayutham Anandh Babu, Kuruvimalai Ekambaram Sabitha, Chennam Srinivasulu Shyamaladevi. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions.* 162: 114–120, 2006