



中國醫藥大學
臨床醫學研究所
碩士學位論文

早期乳酸林格氏液的復甦治療可以減輕大白鼠心臟
受到創傷併發出血性休克的心臟凋亡

**Early resuscitation by lactated Ringer's solution
alleviates cardiac apoptosis of trauma-hemorrhagic
shock in 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：劉建良
Chien-Liang Liu

中華民國九十八年七月

早期乳酸林格氏液的復甦治療可以減輕大白鼠心臟受到創傷併發出血性休克的心臟凋亡

摘要

背景：在因創傷而造成死亡中，創傷併發出血性休克往往是主要的原因。當身體在沒有胸腔或心臟傷害的機械性傷害的情況下，不論在臨床上或動物實驗中都發現有次發性的心臟傷害。凋亡在其中被認為扮演一個重要的角色。雖然乳酸林格氏液被認為可以減少創傷引起的發炎性物質及凋亡細胞的數目，但是鮮少研究發表針對心臟凋亡的效果。因此我們的動物實驗研究是否創傷併發出血性休克會引發心臟凋亡以及乳酸林格氏液復甦治療的效果，同時該治療效果的細胞內傳遞訊息路徑。

研究方法：21 隻 Sprague Dawley 雄性大鼠(300-350 克)被隨機分成對照組、出血休克組及休克後復甦組三組。創傷併發出血性模組藉由腹部切開後再縫合的傷口以及藉抽血造成的 60 分鐘的休克而達成。復甦治療藉由乳酸林格氏液及抽出的血液在 10 分鐘之內輸注，並恢復休克前血壓並維持穩定而完成。每一組大鼠在處置後在第 0、4、8 小時作犧牲，藉由 TUNEL 染色、HE 染色及西方染墨法將取出的心臟組織作

研究。

實驗結果：藉由 HE 染色法發現休克組及復甦組的心肌細胞相對於對照組有明顯的減少。但是其中的復甦組減少的情形沒有休克組明顯。休克組的促凋亡信號(FasL, FADD, bax, bad) 均相對於對照組在有明顯的上升($p < 0.05$)。復甦治療組相對於休克組不但減少促凋亡信號外，同時可以增加磷酸化的 IGF-1R, PI3K, Akt 訊號($p < 0.05$)。在 TUNEL 染色方面，除偵測到休克組及復甦組中皆出現凋亡現象外，復甦組相對於休克組有明顯減少凋亡細胞的數目。

結論：創傷併發出血性休克可以同時藉由 fas/fasL 及粒線體依賴性的路徑引起心臟凋亡。但早期的乳酸林格氏液的復甦治療可以藉由減少促凋亡信號及活化 IGF1R/PI3K/Akt 路徑來減輕心臟凋亡。

Early resuscitation by lactated Ringer's solution alleviates cardiac apoptosis of trauma-hemorrhagic shock in rats

Abstract

Background: Trauma complicated hemorrhagic shock is the leading cause in trauma deaths. Mechanical trauma of body without chest or cardiac injury would induce secondary cardiac damage in clinical and laboratory studies. Apoptosis was regarded as an important role. Although lactated Ringer's (L/R) solution resuscitation would decrease the levels of cytokines and the amount of apoptotic cells, few reports discussed about the effects for cardiac apoptosis. Therefore we investigated whether trauma-hemorrhagic shock (THS) would induce cardiac apoptosis, in addition, the therapeutic effects and the intracellular mechanism of L/R solution resuscitation.

Material and Method: Twenty-one male Sprague Dawley rats (300~350 g) were randomly divided into sham (C), hemorrhagic shock (S), and hemorrhagic shock with resuscitation (R) groups. THS was induced by the cutting wound sutured over abdomen and maintained 60 minutes shock by withdrawal blood. Then

resuscitation with auto-transfusion and L/R in 10 minutes after shock restored pre-shock blood pressure. Each group was scarified in different hours after intervention at zero hour, four hours, and eight hours. Cardiac tissue were collected and evaluated for apoptosis by TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) stain, Haematoxylin & Eosin(HE) stain, and western blot.

Result: HE stain showed significant decrease of cardiomyocyte amount compared S group to C group and R group. But Less decrease of that in R group compared to S group. S group had significant elevation of pro-apoptotic signals (fas/fasL, fas associated death domain (FADD), bax, bad) compared to C group ($p < 0.05$). Resuscitation can decrease the pro-apoptotic signals, in addition, increased of phosphorated IGF-1R, phosphorated PI3K, and Akt amounts compared between R and S group ($p < 0.05$). TUNEL stain showed existence of apoptotic cells in both S and R groups. R group significant decrease the cell amount of apoptosis compared to S group.

Conclusion: THS induces cardiac apoptosis by fas/fasL and

mitochondrial dependent pathways, and early L/R solution resuscitation can alleviate cardiac apoptosis by decrease the amounts of pro-apoptotic signals and activate IGF1R/PI3K/Akt pathway.



謝辭

在漫長的論文寫作期間，陸續閱讀了數篇所上的畢業論文，每次看到謝辭時總是會有許多的感觸。一篇論文的完成，讓我經歷了腸枯思竭、焦慮不安，等到終於撰寫到自己論文謝辭時，卻遲遲難以下筆。因為，對於同時要兼顧工作與學業的我來說，面對生涯中遲了好多年且幾經才起步、實現的願望，內心的感觸實在不容易以簡單的文字來表達。

一直認為當工作與興趣能夠結合是一件很幸福的事，於是決定回學校取得碩士學位，想要兼顧自己從事研究的興趣，考上的幸福感直到進入臨床醫學研究所後立刻轉變成辛苦與壓力。對一個在職生來說，就讀研究型的研究所真的是一件須要毅力的事情，修課期間經常要趕上班、上課及實驗室，雖然辛苦，但修課期間卻是最令人感到快樂與滿足的日子，真正難熬的是論文的寫作。

這本論文得以按照最初的題目與現在的面貌完成，首先要感謝的當然是我最敬愛的兩位指導教授：中國醫藥大學的黃志揚老師和附設醫院的吳錫金醫師。特別感謝基礎醫學研究所所長黃志揚老師，在這兩年來不但提供了完善的實驗環境，還在整個研究過程中不時予以協助、指正及解答疑惑，

包容我緩慢的論文寫作速度，並耐心的提點我論文的方向與論述方法，此外還要特別感謝臨床醫學研究所張耀田學長所建立的大鼠創傷休克模組。另外在這兩年研究的歷程中，能夠順利的兼顧學業與工作，對於附設醫院急診部主任陳維恭主任多方面的協助與關懷，在此也獻上最深誠的感謝。

最後謹將此論文獻給摯親家人，因為他們不斷的支持與鼓勵，才能讓我專心完成此論文。



目錄

第一章 前言	1
第一節 研究背景	1
1.1.1 創傷併發出血性休克	1
1.1.2 創傷併發出血性休克的輸液治療	2
1.1.3 心臟的凋亡	3
1.1.4 創傷與心臟凋亡	3
第二節 研究目的	6
第二章 研究方法	7
第一節 研究材料	7
2.1.1 藥品及材料來源	7
2.1.2 Antibody	9
2.1.3 實驗儀器	10
第二節 研究設計	11
2.2.1 動物分組	11
2.2.2 創傷併發出血性休克模組	11
2.2.3 出血性休克及復甦治療	12
2.2.4 組織淬取	12

2.2.5 HE 染色法及 TUNEL 染色法	12
2.2.6 電泳及西方染墨法	13
第三節 統計方法	14
第一節 描述性統計分析	15
3.1.1 H.E. stain	15
3.1.2 NF κ B	15
3.1.3 TNF- α	15
3.1.4 Fas/FasL 和 FADD	16
3.1.5 p-Bad/Bax 和 Bid/tBid	16
3.1.6 IGF1R 和 磷酸化 Akt	16
3.1.7 TUNEL stain	17
第二節 推論性統計分析	18
第四章 討論	32
第一節 結果討論	32
第二節 其他相關性討論	35
第三節 研究限制	36

第五章 結論與建議	37
第一節 結論	37
第二節 建議	37
第六章 參考文獻	38



圖表目錄

Fig. 1 對照組的心肌細胞與休克組的心肌細胞，H. E. 染色圖	19
Fig. 2 休克組的心肌細胞和復甦組心肌細胞 H. E. 染色圖	20
Fig. 3 Nuclear factor κ B (NF κ B) 和磷酸化 NF κ B(p- NF κ B) 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	21
Fig. 4 TNF- α 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	22
Fig. 5 FasL 和 FADD 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	23
Fig. 6 Bid 和 t-Bid 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	24
Fig. 7 Bax 和磷酸化 Bad 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	25

Fig. 8 磷酸化 IGF-1 受體在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	26
Fig. 9 磷酸化 PI3K 和磷酸化 Akt 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量	27
Fig. 10 對照組、創傷併出血組、休克後復甦組在休克後第 0 小時的心肌細胞 DAPI、TUNEL 染色的變化以及二者合併圖	28
Fig. 11 創傷併出血組、休克後復甦組在休克後第 4 小時的心肌細胞 DAPI、TUNEL 染色的變化以及二者合併圖	29
Fig. 12 創傷併出血組、休克後復甦組在休克後第 8 小時的心肌細胞 DAPI、TUNEL 染色的變化以及二者合併圖	30
Fig. 13 心肌細胞經過創傷併發出血性休克而引起的凋亡過程及復甦治療效果提出的細胞內路徑圖	31

第一章 前言

第一節 研究背景

1.1.1 創傷併發出血性休克

創傷是健康照護中最重要課題，在小於 44 歲的人口中更是排名第一的死亡原因(1)。尤其「創傷併發出血性休克」在創傷引起的死亡原因中是一個首要因素(2)。創傷而併發出血性休克時，會引起組織需求和供給的不均衡現象產生，而導致細胞的缺氧、發炎介質的釋放、以及器官的傷害。臨床上為了避免這樣的情形惡化，會施行許多處置，包括：輸液復甦、手術控制出血、骨折固定等等。但是越來越多的研究指出，不光只是減少出血恢復組織灌流，同時應該注意到創傷併發休克引起的身體免疫反應而造成的生物體二次傷害(3)。基於此原則，「傷害控制」的手術方法；也就是在急性創傷時期減少大面積的外科手術，以減少處置對身體所造成的壓力，而以分段手術的方式，將重建手術留在日後身體度過急性期時再完成。除了手術之外，輸液復甦治療在創傷併發休克的治療中，也扮演一個決定預後的重要角色。

1.1.2 創傷併發出血性休克的輸液治療

創傷併發出血性休克的輸液選擇包括晶體溶液(生理食鹽水、乳酸林格氏液等)、膠體溶液(合成血漿、白蛋白等)、濃縮紅血球、全血、以及冷凍血漿等。雖然臨床上有許多輸液選擇，但是晶體溶液仍然是較佳的選擇(4)。要注意的是凝血因子在大量輸液中需要補充，以避免出現因為稀釋而造成的血液凝固異常(5, 6, 7)。

許多國家的到院前創傷治療指引中對於創傷現場立即的輸液復甦治療都有所著墨(8)。在高山救援中，環境的不同輸液復甦治療也需要不同的準則以達最佳效果及避免併發症的產生(9)。另外，在多重創傷的情況下，在手術治療外，適當的輸液復甦治療更可以爭取手術時間及成功機率。

在許多的臨床及基礎研究中，創傷併發休克的輸液治療的機轉包括恢復組織的灌流、預防組織的缺氧、減少細胞發炎物質的反應以及減少細胞凋亡等(10, 11)。在輸液的總量方面，過量的輸液將會造成不必要的腹水產生甚至引起腹腔腔室症候群的併發症(12, 13)；有限制的輸液量在大鼠的出血併發休克實驗中也較大量輸液有較佳的存活率以及較少的發炎物質產生(14)。但在臨床研究中，創傷後大量輸血對於死亡率並沒有相當理想的預測價值。由此可見，輸液治療的有效與否會因為創傷休克時間的長

短不同、創傷當時的環境不同、以及輸液種類的不同而有所差異。

1.1.3 心臟的凋亡

對於心臟受到創傷併發缺血性休克的傷害，一般可分為三種情形：壞死、凋亡、以及自我吞噬作用。心臟的凋亡，曾經在許多的疾病中被報告，例如：敗血症(15)、缺血性心臟病(16, 17)、充血性心臟衰竭(18, 19)、以及擴張性心肌病變(20)。夜間睡眠缺氧及肥胖(21)、慢性的飲食缺乏鎂離子(22)、慢性酒精濫用(23)也被報告和心臟凋亡有相關性。在治療方面，除了對於引起的疾病作治療(如對於敗血症的抗生素治療、對於缺血性心臟病的心導管加上氣球擴張術治療)，許多研究正針對抑制心臟凋亡路徑的合成物評估安全性及效果(如非選擇性的 caspase inhibitor、抗氧化劑、鈣離子阻斷劑、類胰島素成長因子-1 等)。(24)

1.1.4 創傷與心臟凋亡

談到創傷與心臟凋亡的關係時，有研究指出在沒有胸腔及心臟直接挫傷的情形下，仍然會造成心肌梗塞的發生(25)，以及動物實驗中的大鼠在受到燒燙傷後或機械性傷害後，有引發心臟凋亡的現象(26)。創傷所引發的次發性心臟傷害，在創傷病人中被認為扮演了一個極重要的角色(27, 28)，同時它也意味著較差的存活率及預後(28)。

創傷會引起局部組織的傷害，誘發系統性的發炎反應，同時也會促使神經內分泌系統的反應。這些發炎物質包括了 NF κ B, TNF- α , IL-1 及 IL-6 等等(29, 30)。NF κ B 是一個可以促進發炎的物質，可視為 TNF- α 產生的轉錄因子。TNF- α 被認為是在特殊情境下(例如：內毒素血症，心臟的缺血及再灌流傷害，燒燙傷，身體機械性傷害但沒有併發休克)，抑制心臟功能的一個因子(31)。當 TNF- α 和它的細胞的受體結合時，它可以引發下游 caspase 的連鎖反應，引起 DNA 的裂解。換句話說，機械性傷害後引起過量的 TNF- α 產生，而這些 TNF- α 在和細胞表面受體結合後，藉由活化的氧化氮產物去誘發心臟細胞的凋亡。即使傷害距離心臟有一段距離，TNF- α 還是可以藉由血液傳送到心臟(32)。Fas/FasL 隸屬於 TNF 家族，是另一個可以造成心肌凋亡的成員。如同 TNF- α ，它也可以藉由活化 caspase 連鎖反應而引起細胞的凋亡。

相對於系統性的發炎反應，創傷併發出血性休克會活化心肌內的 NF κ B 及 TNF- α 。NF κ B 在活化後會移動到細胞核內去刺激 TNF- α 的轉錄。在心臟受到傷害後的凋亡反應中 TNF- α 是心臟的一個抑制介質，同時也是一個很重要的促進因子，它同時可以抑制心臟的收縮功能(33)，也同時促進心肌細胞的凋亡(34)、心臟病理性肥大。Fas 及 fasL，則是另一種可以

引發多種細胞凋亡的蛋白，例如淋巴球、肝臟細胞等。Fas 在心臟細胞的凋亡在充血性心臟衰竭以及缺血性心臟病的致病機轉上面，是經過完整確認的(35, 36)，同時是一個不好預後的指標。

心肌細胞在創傷之後會因為許多因素而凋亡，例如：缺氧(37)、缺氧後再灌流、酸中毒、心肌張力、TNF- α 、fasL 等等。而「凋亡」可以視為被兩種機轉所引發的計畫性細胞死亡，第一種是經由外來路徑，又稱為死亡受體依賴性路徑，包括 fas/fasL 或 TNF- α 來誘發。當 fasL 或是 TNF- α 和它的接受體結合後，將會形成 FADD。而 FADD 會誘發並活化 caspase 8 的前趨物而形成活化態，接著繼續活化在凋亡過程中的作用者 caspase 3 進而使細胞凋亡。第二種路徑則是內因性的路徑，也就是粒線體相關的路徑(38)，主要是由會引起凋亡的蛋白質(例如：Bad)和可以抑制凋亡的蛋白質(例如：Bcl-2 家族)的平衡來決定細胞最後的命運。

第二節 研究目的

這個實驗主要在研究(a)創傷併發出血性休克是否會引發心臟凋亡 (b) 早期乳酸林格氏液的輸液對於心肌細胞的治療效果 (c) 關於這個治療效果是針對何種機轉引起的。我們假設創傷併發出血性休克將藉由 fas 相關的路徑以及粒線體相關路徑而引發心肌細胞凋亡，早期的輸液治療將藉由減輕促進凋亡的信號的影響同時活化 IGF1/PI3K/Akt 存活路徑去減少細胞凋亡反應。



第二章 研究方法

第一節 研究材料

2.1.1 藥品及材料來源

(1) 購自美國 Sigma 公司

SDS (Sodium dodecyl sulfate)

NaCl (Sodium chloride)

MgCl₂ (Magnesium chloride)

BSA (Bovine serum albumin)

DEPC (Diethyl pyrocabonate)

Acrylamide

(2) 購自美國 USB 公司

Tris - base

Glycine

(3) 購自美國 Gibco/BRL 公司

PBS (Dulbecco' s Phosphate-Buffered Saline)

(4) 購自聯工化學廠股份有限公司

Na₂H₂P₀4 · 2H₂O (Sodium phosphate)

Acetic acide

K₂HP₀4 (Potassium phosphate, dibasic)

HCl (Chloric acid)

KH₂P₀4 (Potassium phosphate, monobasic)

(5) 購自美國 Roche 公司

Proteinase K

Complete proteinase inhibitor cocktail tables

(6) 購自美國 BMA 公司

ProSieve color protein markers

LE-Agarose

(7) 購自美國 Amresco 公司

Boric acid

Bis-acrylamide

APS (Ammonium persulfate)

(8) 購自美國 Pharmacia Biotech 公司

2-Mercaptoethanol

(9) 購自美國 NEN 公司

PVDF membrane

(10) 購自美國 TEDIA 公司

Methanol

(11) 購自美國 Hyclone 公司

FBS (Fetal Bovine Serum)

(12) 購自美國 Biotecx 公司

Ultraspec RNA reagent



(13) 購自美國 CPG 公司

TEMED

(14) 購自美國 ANGUS 公司

Glycerol

(15) 購自慕容科技有限公司

Ethanol

Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)

2.1.2 Antibody

<u>名稱</u>	<u>廠牌</u>
IGF-I	Santa Cruz Biotechnology
IGF-II	Santa Cruz Biotechnology
Bad	Transduction Laboratories (BD)
Bcl2	Transduction Laboratories (BD)
α -tubulin	NEO MARKERS
FADD	Santa Cruz Biotechnology
Nip3	Transduction Laboratories (BD)
Fas	Santa Cruz Biotechnology
Fas-ligand (fasL)	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-mouse IgG - HRP	SERVING SCIENCE TOUGH IMMUNOCHEMISTRY

2.1.3 實驗儀器

<u>名稱</u>	<u>廠牌</u>
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
transilluminator	National Labnet Company
Homogenizer knots tissue grind	Wheaton
power supply	Bio Rad
Glass Microfibre Filter (Dia. 47 mm ϕ)	Whatman
Membrane Filter (Dia. 47 mm ϕ) (Pore size: 0.2 μ m)	Whatman
Vortex mixer model VM-100	PIGISYSTEM LAB. INSTRUMENTS. INC
CO2 Water-Jacketed incubator	NUAIRE
DNA 電泳槽	Mupid-2
數位影像儀	Kodak
雙片垂直型電泳槽	Bio Rad
水浴加熱器	TKS WB201
天平	OHAUS
微量天平	OHAUS
倒立顯微鏡	Nikon type 120

第二節 研究設計

整個動物實驗的所有實驗步驟均經過台灣省台中市中國醫藥大學動物中心所認可，同時遵循 NIH 公告的實驗室動物照顧原則。

2.2.1 動物分組

實驗動物條件，重量約 300-350 公克的雄性大鼠(購自台灣的國際科學動物中心)，飼養環境室溫在 25°C 且維持 12 小時的日夜循環時間(早晨設定為上午 7 點)。所有大鼠以標準的實驗室飼料供應餵食(編號 5001; PMI Nutrition International Inc. Brentwood, MO, USA) 及飲水，以隨機方式分配這 21 隻大鼠到三個不同的組別。對照手術組(3 隻)、出血性休克組(9 隻)、出血性休克後復甦組(9 隻)。在出血性休克組和復甦組中，我們在處置後的 0 小時、4 小時及 8 小時各犧牲三隻大鼠。

2.2.2 創傷併發出血性休克模組

重量約 300 到 350 公克的雄性 Sprague Dawley 大鼠，藉由腹腔注射 sodium pentobarbital (每公斤 30 毫克)麻醉，於麻醉之後進行氣管插管以供應 100%氧氣。我們使用由肝素處理過的聚乙烯所製造的導管 (PE50)，對於右側的股動脈及股靜脈來建立管路，而平均動脈壓(MAP)則藉由右側股動脈的壓力傳導到機器紀錄(Cardiomax-model 85; Columbus

Instruments International Co., Ohio, U. S. A)。大鼠的創傷則由劍突下到恥骨間沿腹部中線切開來建立，並立即用聚乙烯縫線縫合。

2.2.3 出血性休克及復甦治療

在休克組及復甦組，藉由 10 分鐘內的抽血過程(每公斤 2.5 毫升)以維持平均動脈壓 40 ± 5 毫米汞柱。休克時間維持 60 分鐘。在出血組，我們將原本抽出來的血液，藉由靜脈導管在 10 分鐘內重新輸回大鼠體內以回復休克前的平均動脈壓。在復甦組，在 10 分鐘內我們除了重新輸回之前抽出的血液外，另外加入乳酸林格氏液。在自體輸液或復甦治療後，動脈和靜脈導管移除並縫合，並將每隻大老鼠送回自己原本的飼養籠。

2.2.4 組織淬取

實驗樣本的取得是先將左心室心肌組織浸泡在 PBS(0.14 M NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 14 mM K₂HPO₄)緩衝液(每 100 毫克組織加入 0.5 毫升的 PBS) 5 分鐘，接著均質液放在冰塊上 10 分鐘後，離心 30 分鐘(每分鐘 12000 轉)，取上清液冰存於 -70°C 的環境以便進一步實驗之用。

2.2.5 Hematoxylin & eosin(H. E.)染色法及 TdT-mediated dUTP

nick-end labeling (TUNEL)染色法

心臟左心室先藉由福馬林沖洗，接著使用酒精脫水，再使用福馬林包

埋後，切成 0.2 微米後的福馬林切片。藉由 xylene 去福馬林及恢復水分。關於 H. E. 染色，當所有切片都完成 hematoxylin 及 eosin 染色後，接著用清水沖洗及用酒精脫水，最後再用 xylene 作兩次的沖洗。顯微照相使用的是 Zeiss Axiophot 顯微鏡。關於 TUNEL，這些切片先用 proteinase K 處理，接著使用 phosphate-buffered saline 沖洗，用 permeabilisation 溶液 incubation, 最後用 PBS 再沖洗兩次。在 37°C 下用凋亡偵測試劑 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) 60 分鐘裡去檢視發出 450-500 nm 綠色螢光的 TUNEL 陽性的細胞核。TUNEL 陽性的細胞的平均數是藉由至少 5-6 個不同的位置，2 個切片，三個範圍(上、中、下)，每個分組三個的左心室標本所確認。所有的計算至少有兩個互相不影響也不知結果的個體所完成。

2.2.6 電泳及西方染墨法

心臟組織萃取物中蛋白質的濃度藉由 Bradford 方法(Bio-Rad Protein Assay, Hercules, CA)去決定。蛋白檢體(每條軌道 50 微克)藉由 75 伏特的電流在 10% SDS polyacrylamide 膠體電泳(SDS-PAGE)中分離。電泳後的蛋白藉由轉移工具(Bio-rad)被轉移到 polyvinylidene difluoride(PVDF) 膜(Millipore, Bedford, MA, 0.45 μ m pore size)。

PVDF 膜接著浸泡於含有 5%牛奶的 TBS 緩衝液中。第一抗體包括 fas ligand、fas receptor、fas associated death domain (FADD)、Bad、Bax, insulin growth factor-I receptor (IGFIR)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Akt 以及 α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 和 Bcl-2 (BD)。它們皆以 1:5000 的比例稀釋為抗體緩衝液，在 4°C 下靜置隔夜。這些免疫染色點在 10 分鐘內以 TBS 緩衝液清洗三次，然後浸置在含有 IgG-HRP、山羊萃取的抗兔子 IgG-HRP 或驢子的抗山羊 IgG-HRP (Santa Cruz) 的二次抗體溶液中一小時後，於 TBS 緩衝液中稀釋 500 倍。這些免疫染色點再用 TBS 緩衝液在 10 分鐘內沖洗三次。接著使用加強螢光的西方點墨法反應劑 (Santa Cruz, CA, USA) 去顯現這些免疫螢光染色蛋白，並且用 Fujifim LAS-300 螢光偵測系統去定量 (Tokyo, Japan)。

第三節 統計方法

所有的蛋白質的資料皆使用平均值 \pm 標準差的方式呈現。對於對照組、出血性休克組、以及出血性休克後復甦組的蛋白質濃度、TUNEL 陽性細胞數量的比較，皆使用 T 檢定。若 p 值小於 0.05 視為有統計學上的顯著差異。

第三章 研究結果

第一節 描述性統計分析

3.1.1 H.E. stain

為了解在休克及復甦治療之後是否對於心肌細胞有型態上面的影響，我們使用 H.E. 染色法來觀察，我們分別對於對照組、休克組在第 0, 4, 8 小時取得的左心室心肌檢體作分析。

從對照組可見清晰的細胞核及緊密的心肌細胞排列；而在休克組中隨著時間的增加，雖然沒有明顯全面細胞核的縮小，但是可見到些許心肌細胞的細胞質染色上面漸漸淡化，而心肌細胞的排列也漸漸鬆散(Fig. 1)；在復甦組中的心肌細胞相對於休克組，隨著時間的增加也出現有些許鬆散情形，但是相對於休克組鬆散程度、細胞核質變化都相對休克組輕微(Fig. 2)。

3.1.2 NF κ B

在休克或休克加上復甦治療後我們偵測 NF κ B 及磷酸化 NF κ B(p- NF κ B)的蛋白量。NF κ B 和 α actin 的比值在前 8 小時之內有上升的趨勢，特別在休克後八小時的休克組對於同時間的對照組有 23%的顯著上升 ($p < 0.05$)，另外，同時間的復甦組相對於對照組有 35%的顯著下降

($p < 0.05$) (Fig. 3)。

3.1.3 TNF- α

在設定的三個時間點裡相對休克組和對照組 TNF- α 和 β -actin 的比值都沒有統計學上的差異。復甦組在 0 小時的量相對於休克組有 50% 的顯著下降($p < 0.05$)(Fig. 4)。

3.1.4 Fas/fasL 和 FADD

相對於對照組，休克組中所有時間點的 fasL 和 β -actin 的比值都顯著的上升，尤其是在第 4 小時的時間點上，約有 5 倍的上升($p < 0.01$)。另外，休克組中 FADD 和 β -actin 的比值在第四小時相對於對照組有兩倍的顯著上升($p < 0.01$)。復甦組的 FasL 和 β -actin 的比值在 4 小時及 8 小時相對於對照組皆有 50% 的顯著下降($p < 0.01$, $p < 0.05$)。復甦組 FADD 和 β -actin 的比值在復甦治療後第八小時的時間點相對於休克組有 50% 的顯著下降($p < 0.01$) (Fig. 5)。

3.1.5 p-Bad/Bax 和 Bid/truncated Bid (tBid)

休克組中 Bax 和 tBid 對於 β -actin 的比值隨著時間有上升的趨勢。在第 8 小時的時候，休克組的 Bax 和 β actin 比值以及 tBid 和 β actin 比值個別有 1.5 倍及 4 倍的顯著上升($p < 0.05$)。復甦組的 Bax 和 tBid 對於

β actin 的比值相對於休克組於第 4 與第 8 小時個別有 50% 顯著的下降 ($p < 0.05$) (Fig. 6, 7)。

3.1.6 IGF1R 和 磷酸化 Akt

復甦組 IGF1R 和磷酸化 Akt 的比值相對於休克組在第 8 小時時間點時有顯著的下降 (Fig. 8, 9)。

3.1.7 TUNEL stain

在休克及休克加上復甦治療後，我們於不同的時間點取得的心肌細胞，用 DAPI 染色法以及 TUNEL 染色法去偵測心肌細胞是否產生了凋亡的現象。可以明顯見到心肌細胞在創傷並未併發休克時，就有出現約 17.83% 的細胞產生凋亡現象，然而休克組將引起相對於對照組的心肌細胞約三倍左右 (58.39%) 數目的心肌細胞凋亡 (Fig. 10)，而在經過復甦治療組可以部分抑制凋亡產生的細胞數目 (23.4%)。在休克後第四及第八小時的心肌細胞，休克組皆有約五成左右的心肌細胞凋亡，在接受復甦治療的組別均有部分抑制的效果 (Fig. 11, 12)。

第二節 推論性統計分析

由 H. E. 染色法可以發現心肌細胞的排列隨著休克後時間的增長而有越來越鬆散的情形，加上細胞質的淡化都意味著休克將會對心肌細胞產生傷害；同時在復甦組中可以發現在各個時間點都相對於休克組有較輕微的變化，但是沒有辦法恢復到如同對照組一般，我們推測此現象可證明輸液治療可以減輕休克所造成的心肌傷害。TUNEL 染色法中也可看到休克後明顯增加凋亡細胞的數目，而復甦治療可減輕部份休克所造成的傷害。最後，在心肌細胞受到創傷出血性休克及復甦治療的相關路徑方面，我們可以推論是經由內外任路徑及心臟保護的路徑作調控。(Fig. 13)



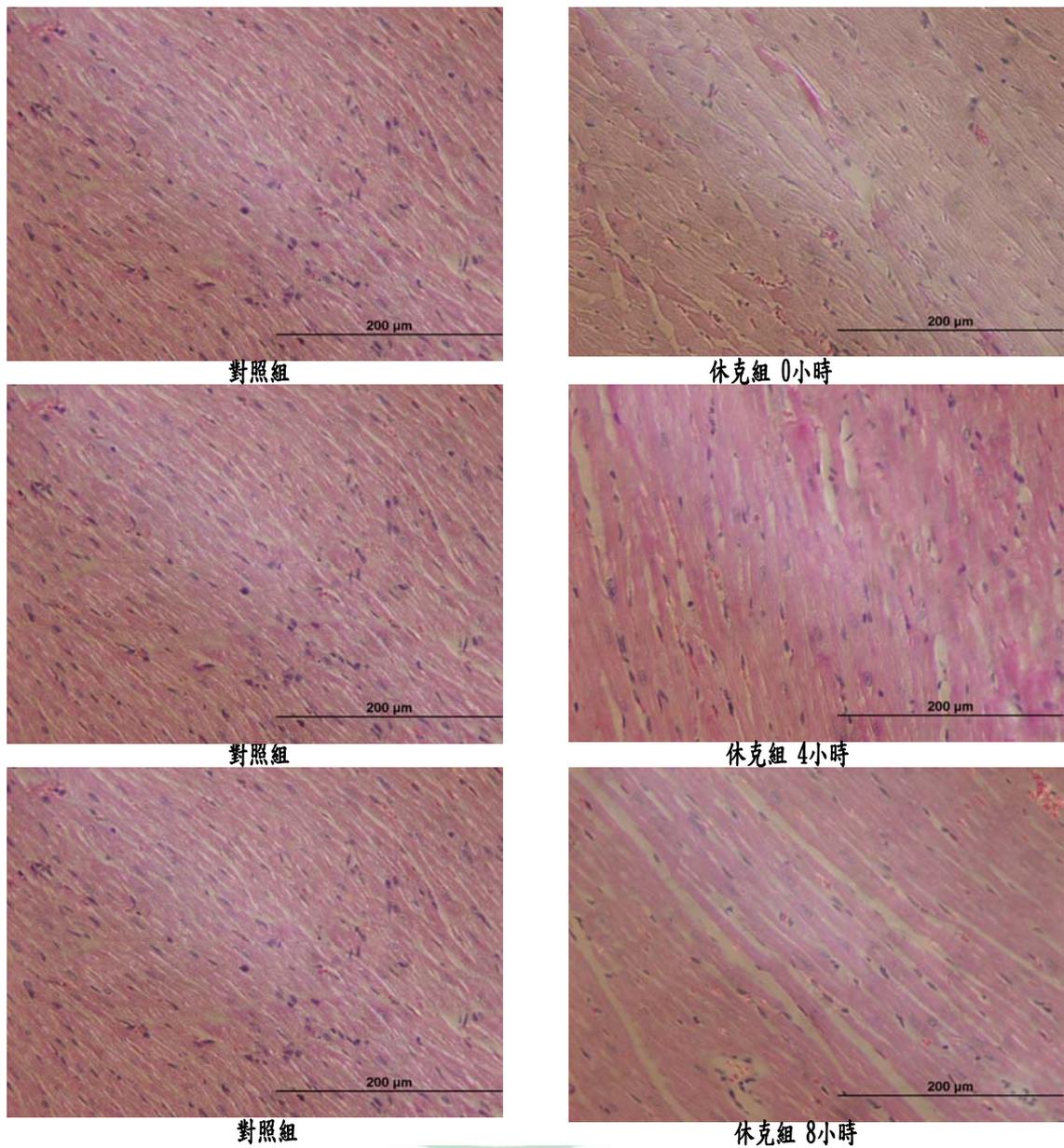
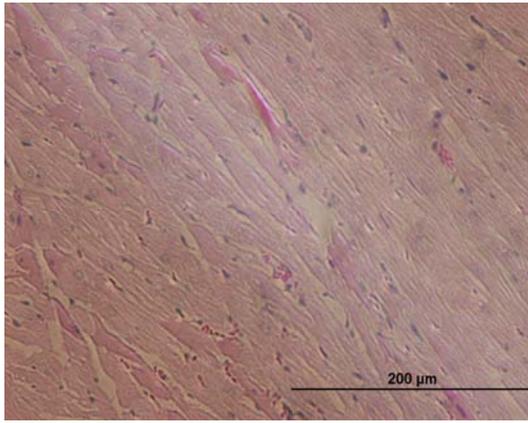
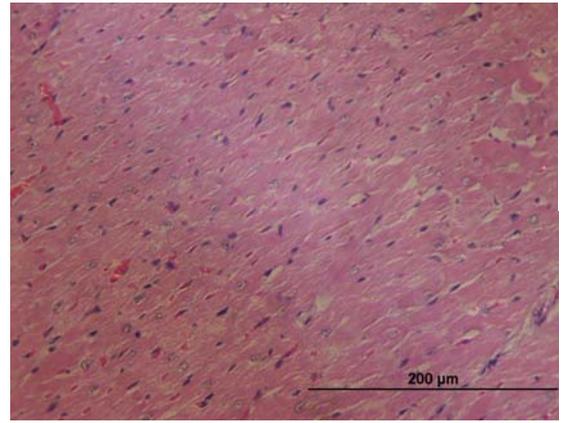


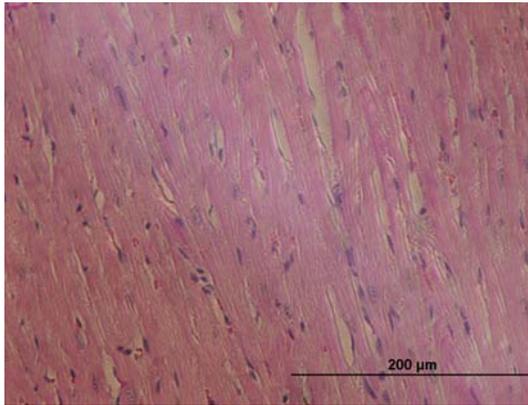
Fig. 1 左方對照組的心肌細胞細胞核清晰可見，細胞排列整齊緊密；右方休克組的心肌細胞，由上而下隨著休克後的時間越來越長，細胞質染色淡化，更明顯的是細胞的排列漸漸鬆散



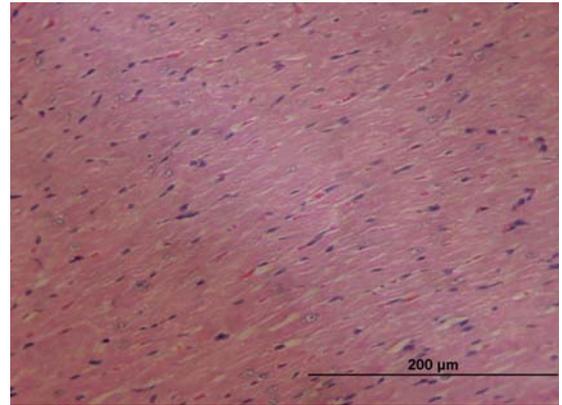
休克組 0小時



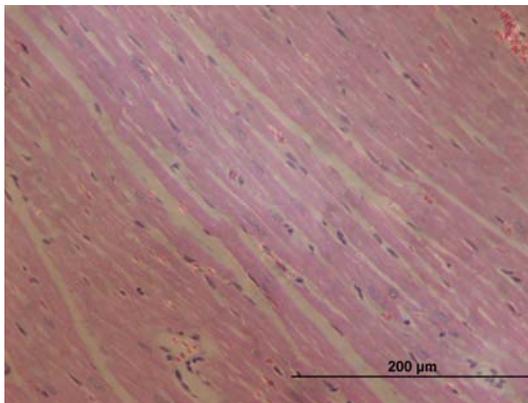
復甦組 0小時



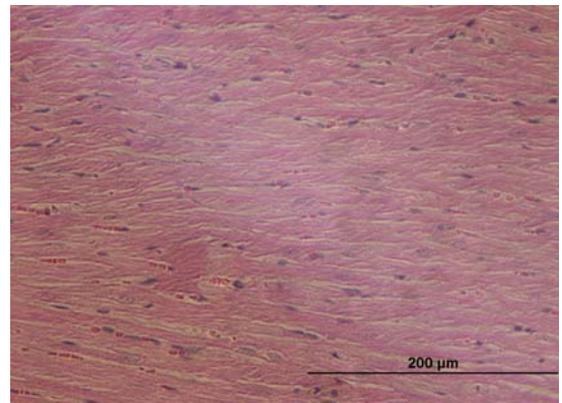
休克組 4小時



復甦組 4小時



休克組 8小時



復甦組 8小時

Fig. 2 左方休克的心肌細胞由上而下隨著休克後的時間越來越長，細胞質染色淡化，細胞的排列漸漸鬆散；而在右方復甦組中上述情形皆有出現但在任何相對時間都較休克組輕微

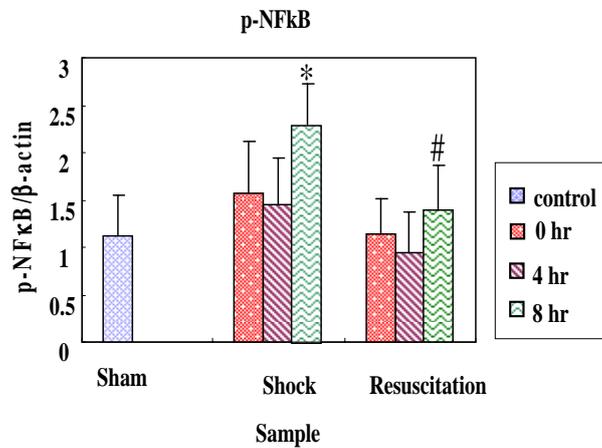
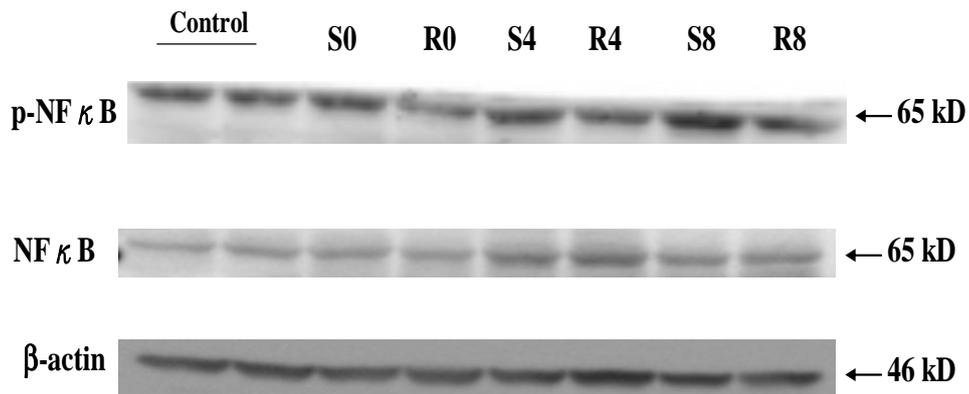


Fig. 3 Nuclear factor κB (NF κB) 和磷酸化 NF κB (p- NF κB) 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於對照組 $p < 0.05$; # 相對於休克組 $p < 0.05$

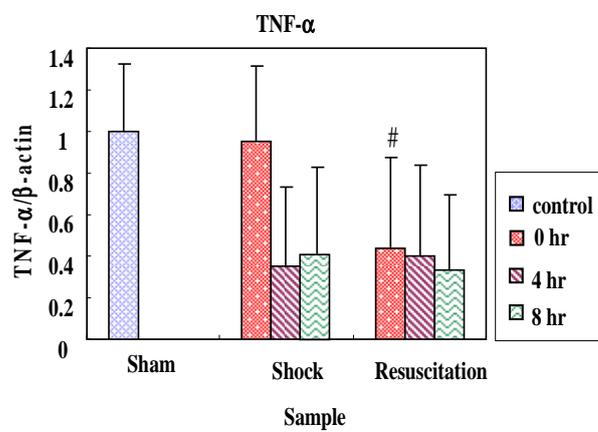
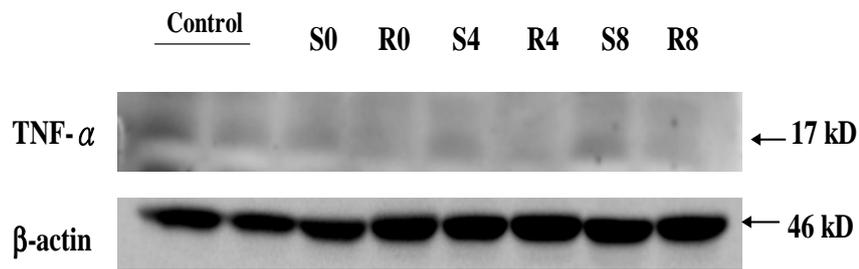


Fig. 4 TNF- α 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於休克組 $p < 0.05$

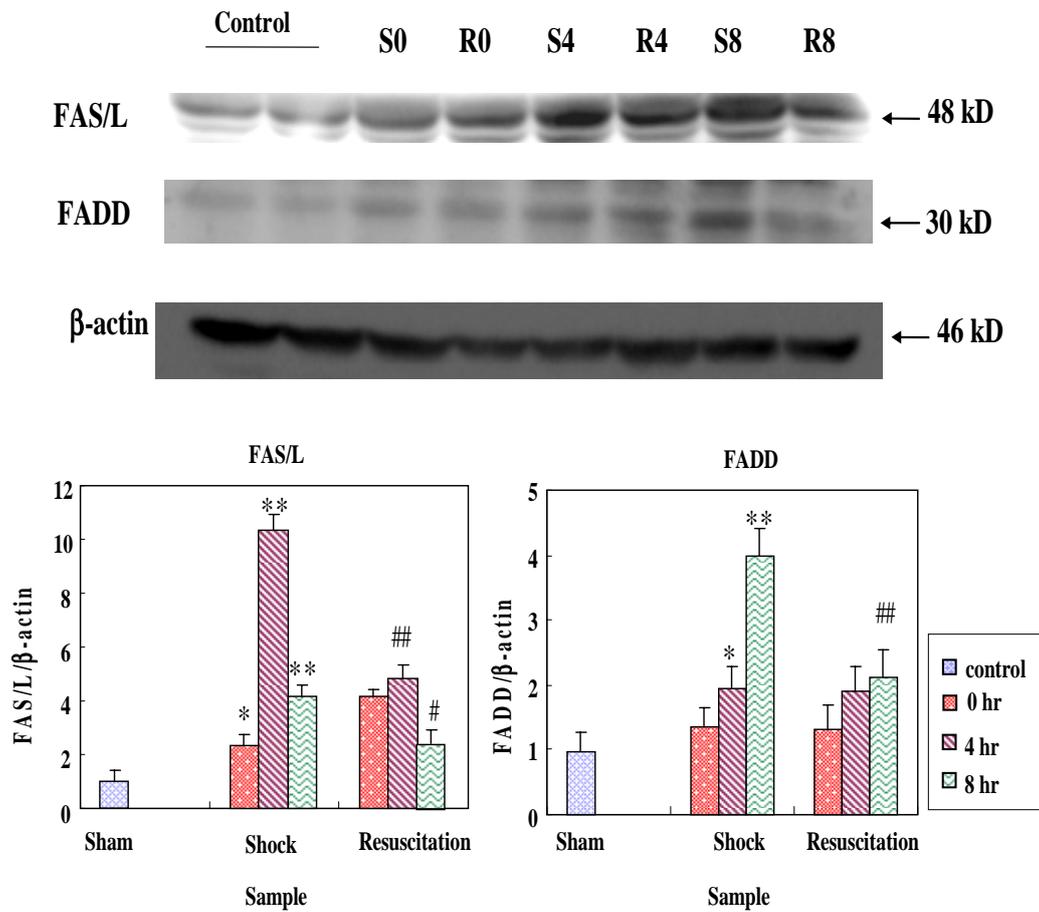


Fig. 5 FasL 和 FADD 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於對照組 $p < 0.05$; # 相對於休克組 $p < 0.05$

** 相對於對照組 $p < 0.01$; ## 相對於休克組 $p < 0.01$

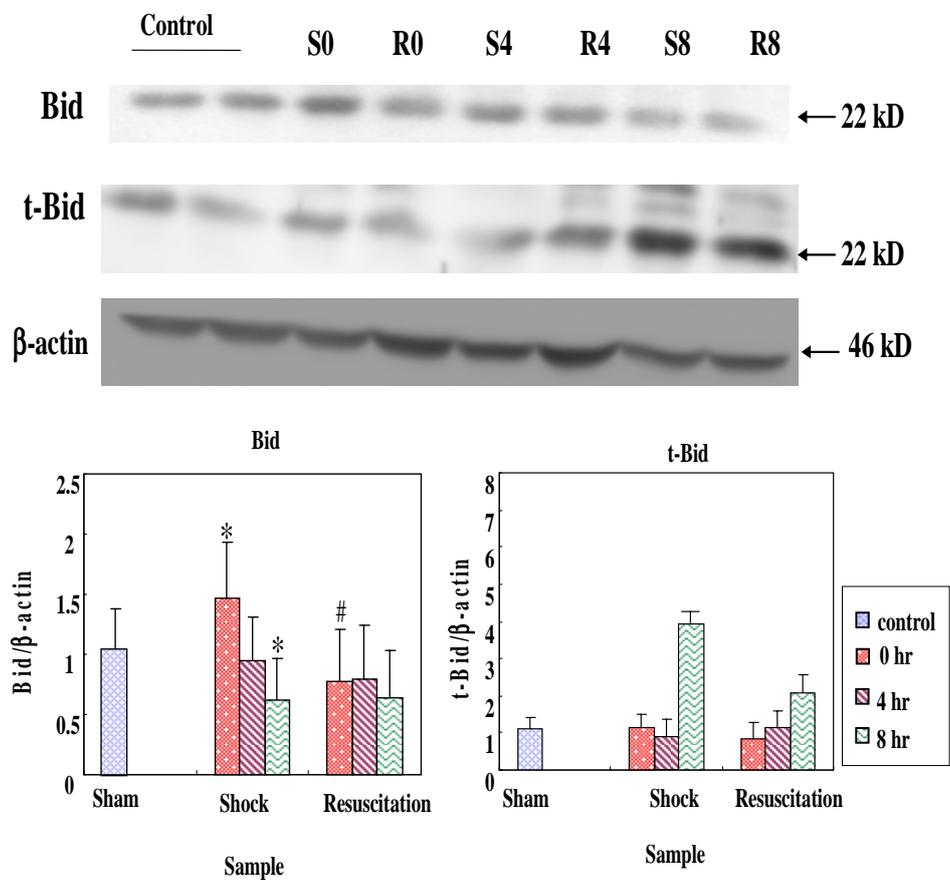


Fig. 6 Bid 和 t-Bid 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於對照組 $p < 0.05$; # 相對於休克組 $p < 0.05$

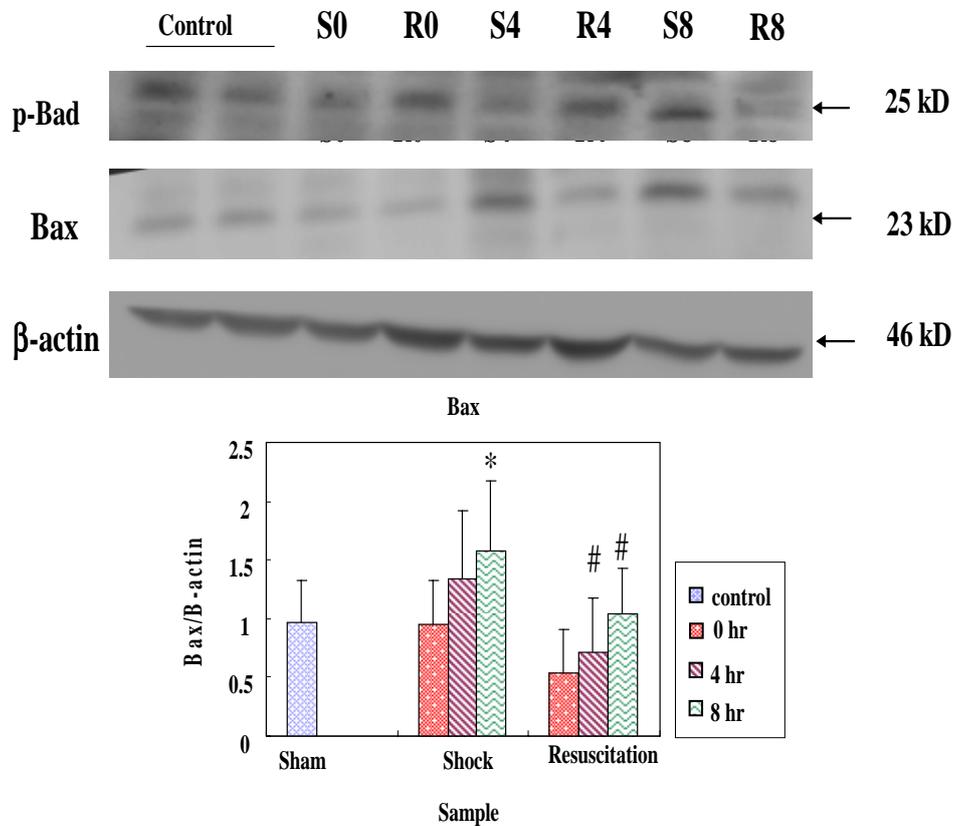


Fig. 7 Bax 和磷酸化 Bad 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於對照組 $p < 0.05$; # 相對於休克組 $p < 0.05$

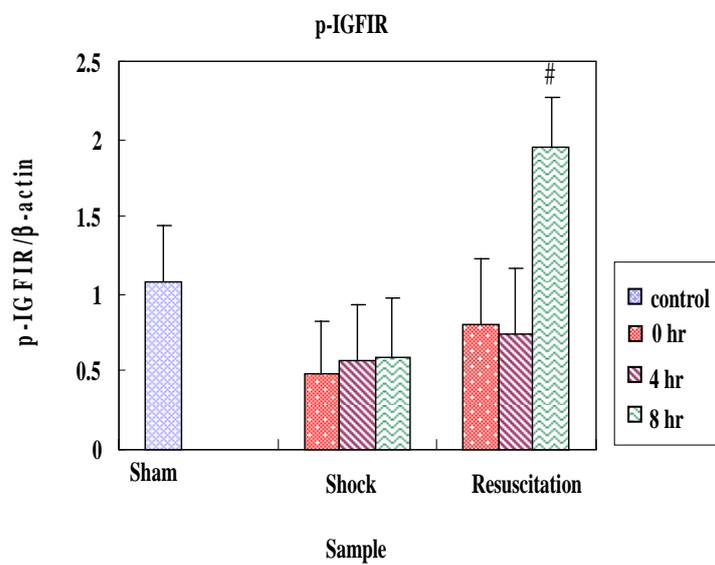
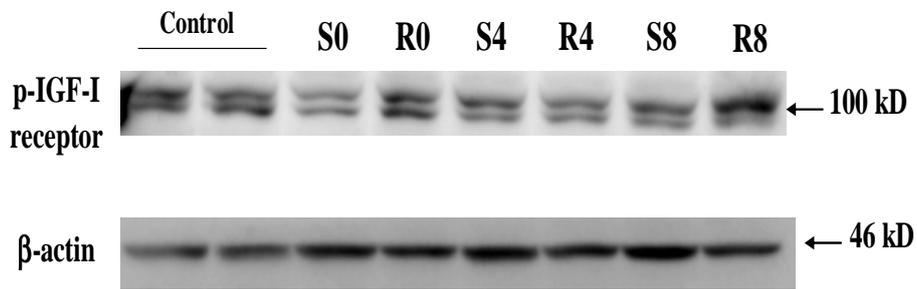


Fig. 8 磷酸化 IGF-1 受體在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於對照組 $p < 0.05$; # 相對於休克組 $p < 0.05$

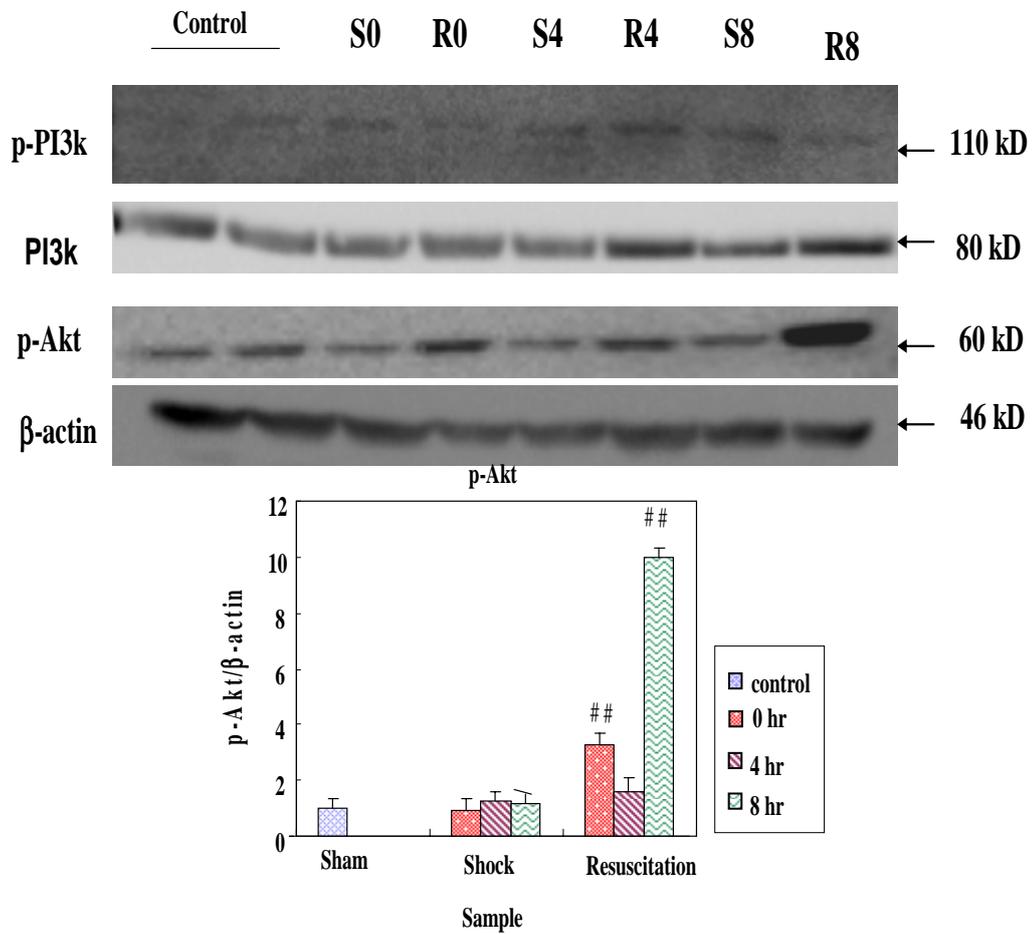


Fig. 9 磷酸化 PI3K 和磷酸化 Akt 在對照組、休克組、休克加上復甦組在休克或復甦治療後第 0、4、8 小時的表現量

* 相對於對照組 $p < 0.05$; # 相對於休克組 $p < 0.05$

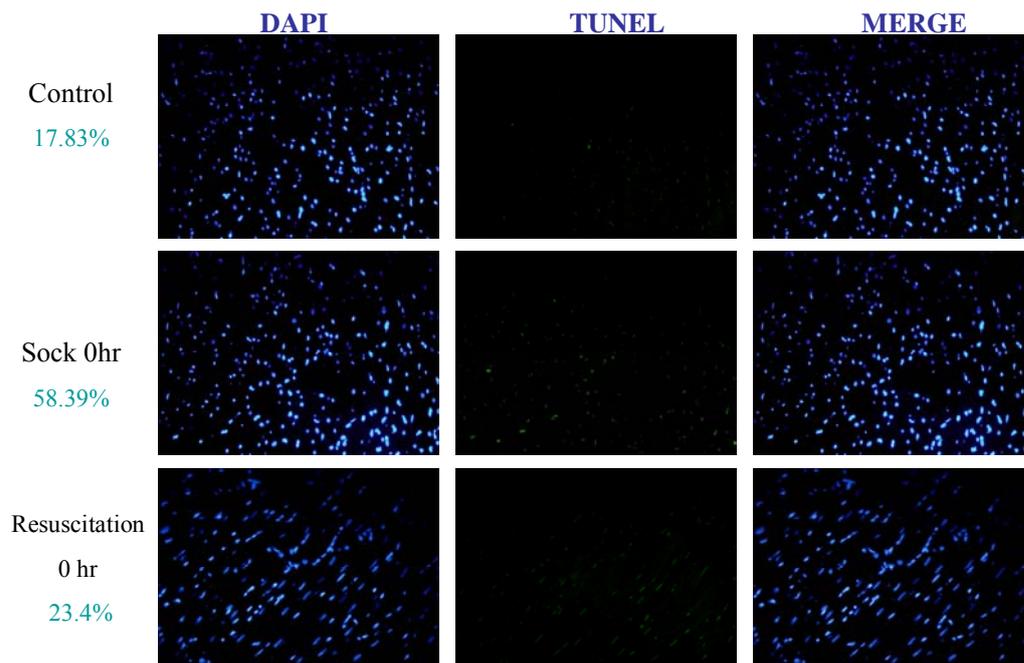


Fig. 10 對照組、創傷併出血組、休克後復甦組在休克後第 0 小時的心肌細胞 DAPI、TUNEL 染色的變化以及二者合併圖(圖中百分比為凋亡細胞在此畫面中的細胞數中所占比例)

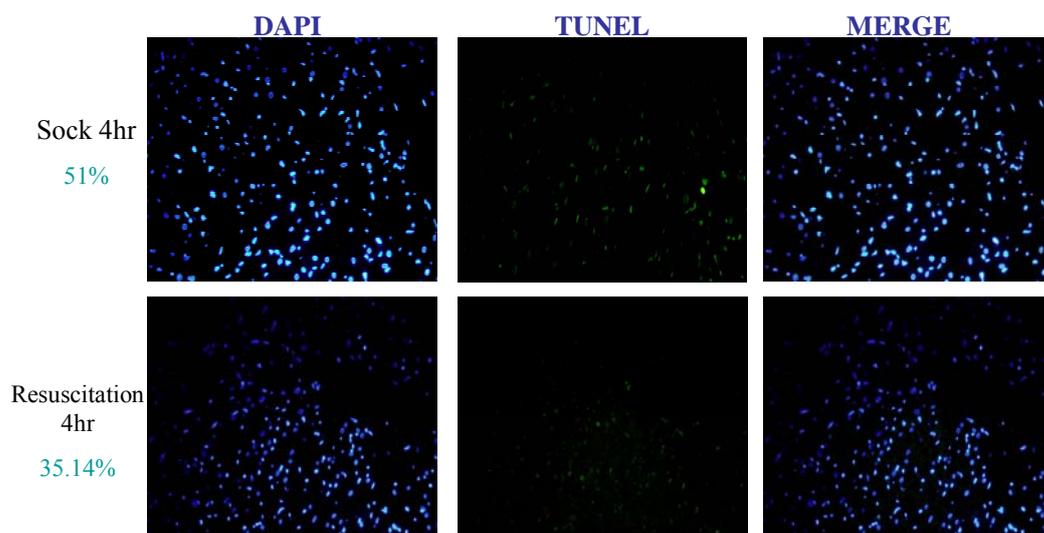


Fig. 11 創傷併出血組、休克後復甦組在休克後第 4 小時的心肌細胞 DAPI、TUNEL 染色的變化以及二者合併圖(圖中百分比為凋亡細胞在此畫面中的細胞數中所占比例)

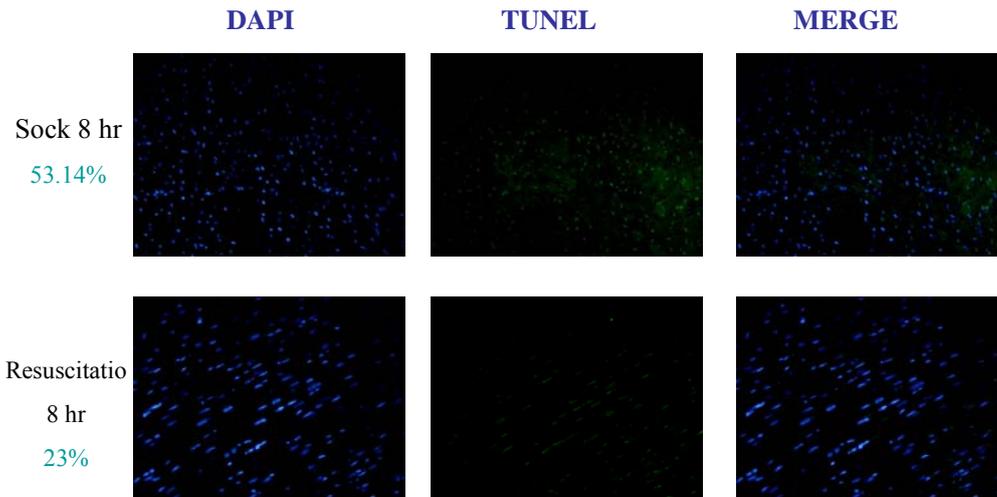


Fig. 12 創傷併出血組、休克後復甦組在休克後第 8 小時的心肌細胞 DAPI、TUNEL 染色的變化以及二者合併圖(圖中百分比為凋亡細胞在此畫面中的細胞數中所占比例)

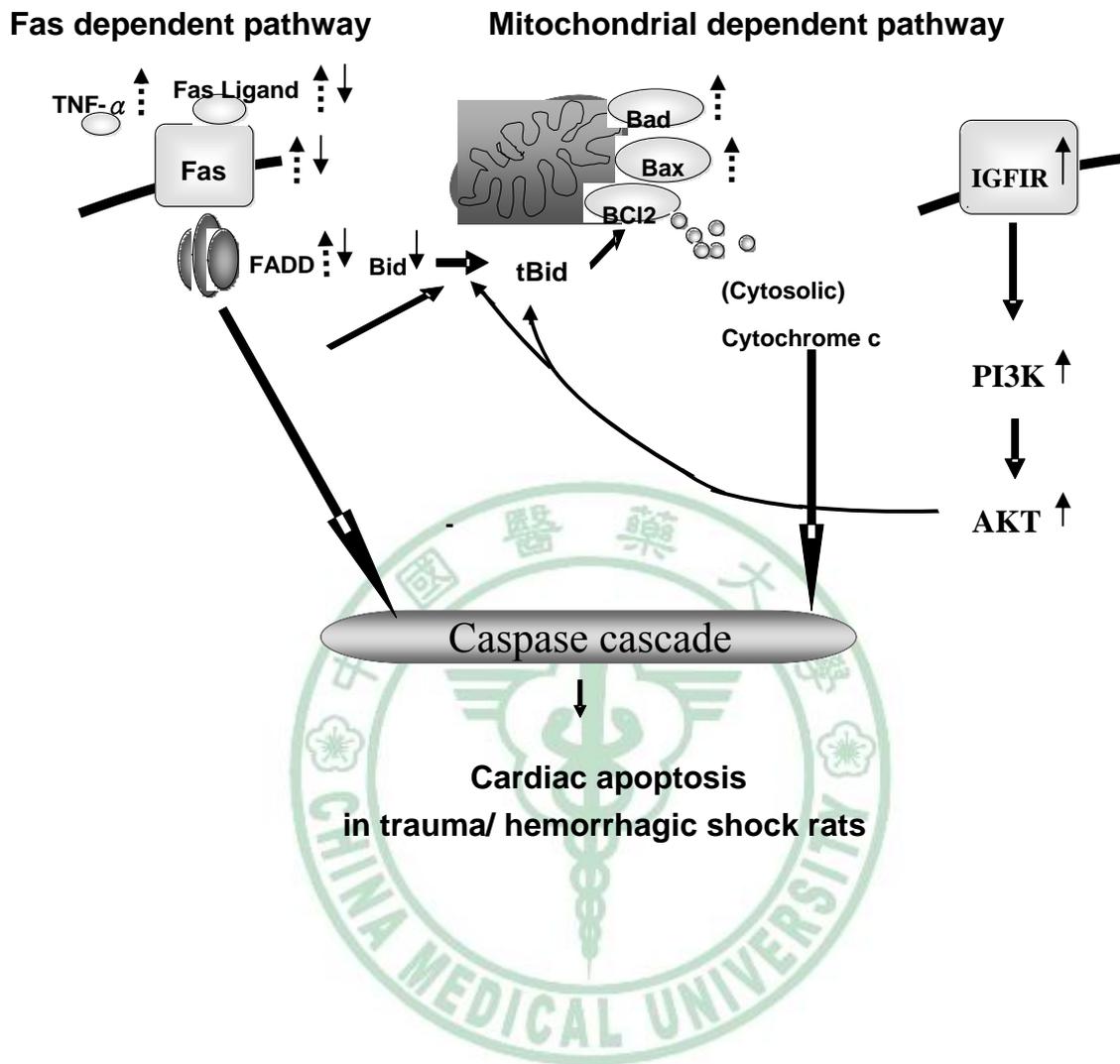


Fig. 13 根據實驗結果，我們對於心肌細胞經過創傷併發出血性休克而引起的凋亡過程(虛線箭頭)，以及復甦治療效果(實線箭頭)提出的細胞內路徑圖

第四章 討論

第一節 結果討論

當發生出血性休克時，為了維持身體器官的灌流，必須藉由出血的控制及輸液治療去達成。然而，在開始手術控制出血前，過度的輸液治療卻是有害的(39)。因為這將會使剛形成的血栓造成崩解，導致發炎性物質的增加以及凝血功能異常等副作用。利用適度的輸液復甦來維持相對的低血壓，被證實比傳統兩三倍的膠體溶液灌流來得有效(40)。所以在本實驗的設計中，我們使用連續的血壓監測作為復甦治療的依據，藉由適量的輸液以恢復休克前的平均動脈壓為目標，而非以固定的兩到三倍的輸液量以避免瞬間過高的平均動脈壓而造成副作用。輸液的乳酸林格氏液，是一種被使用多年的低張的晶體溶液，它被證明引起較少的免疫反應，以及較少抑制凝血功能的作用，也比較不會粘稠而影響到快速輸液，並且有較佳的第三空間灌流。故雖然在臨床上有許多晶體溶液可以選擇，我們仍然基於此理論選擇乳酸林格氏液作為復甦治療的溶液。

當出血性休克發生時，輸液復甦治療可以減少細胞凋亡的產生。雖然抑制凋亡的效果會隨著不同溶液而有不同效果，至今仍沒有任何一種溶液可以確切的優於另外一種溶液(41)。然而復甦的時間是另外一個處理創傷

性出血休克的重要課題。動物實驗中顯示，延遲性的復甦治療(出血性休克 60 分鐘後)相對於早期復甦治療(出血性休克 15 分鐘後)會增加死亡率，同時也增加了 IL-6 的濃度(42)。但是在臨床研究裡，在軀幹穿刺傷的病人處置上，延遲性的復甦治療可以改善預後(43)。故在時間上面尚沒有一個確切的建議輸液治療時間，基於臨床上應用可能性，我們仍然以休克 60 分鐘作為到院前可能消耗的時間為假設，設定 60 分鐘的休克時間後給予輸液治療。

雖然 TUNEL 染色會遺漏許多沒有 DNA 裂解但是細胞萎縮的凋亡細胞，我們使用 H. E. 染色法去偵測心肌細胞這樣型態上的改變，期待進而減少 TUNEL 染色的偽陰性率。但是在本實驗中，我們並沒有藉由 H. E. 染色法而改變對於凋亡細胞比例的計算。但是我們仍然可以從心肌細胞較鬆散的排列、心肌細胞的細胞質染色淡化等發現創傷性休克的確造成了心臟傷害，且復甦治療有部分抑制此傷害的效果。我們實驗中呈現了創傷併發出血性休克在沒有復甦治療的情形下將引發心肌細胞凋亡，然而 Guan 的研究團隊報告指出，在多重創傷併發休克的早期並沒有偵測到心肌細胞凋亡(44)。這個現象可能是偵測凋亡的檢查方式敏感性不同，以及休克模式不同所導致。

不論是局部或全身性的發炎介質，都可以引起器官的功能不良。我們相信 fas/fasL 在創傷併發出血性休克的前八小時裡，對於引起心臟凋亡反應的效果是大於 TNF- α 的。造成這個現象的原因，可能是因為心肌細胞對於兩種不同信號的不同敏感度所造成的結果。當促進凋亡的訊號高過引起反應的域值時，心臟才會產生凋亡反應。這個保護機制被視為是已經高度分化而極少再分裂的心肌細胞的保護。創傷併發出血性休克也會活化粒線體相關的凋亡路徑。我們的實驗發現促進凋亡的信號(例如：Bax、p-Bad、tBid)均有上升。

雖然創傷併發出血性休克會引起心肌細胞凋亡，但是乳酸林格氏液的復甦治療可以減少凋亡信號進而減少心肌細胞凋亡。我們的實驗中發現不論是死亡受體相關路徑的凋亡信號(fas/fasL、FADD)或是粒線體相關的凋亡路徑的凋亡信號(bax、p-bad、tBid)，在休克 60 分鐘後經過乳酸林格氏液的復甦治療後，皆有明顯的下降。

類胰島素成長因子(IGF-1)是一個促進心臟生理性肥大(心臟增加容積但是沒有纖維化的過程)及心臟功能的重要因子。在它和細胞表面受體結合後，可以活化一個 PI3K 的 tyrosine kinase 受體。而這個 IGF1/PI3K 路徑已被證實對於心衰竭、心肌病變及心肌梗塞時有益(45)。

另外，IGF1/PI3K 路徑可以藉由活化 Akt 而有抑制凋亡的作用。我們發現在乳酸林格氏液復甦治療後，IGF-1 的受體、PI3K 以及 Akt 的濃度在出血性休克後 8 小時內皆有顯著的上升。我們認為這是心臟對於創傷併發出血性休克的保護性代償機轉。

第二節 其他相關性討論

在已發表的研究中，所表現的創傷性出血性休克而造成心臟凋亡多是由於系統性的發炎反應，隨著血液的傳送到心臟而引起次發性的心臟傷害。在本實驗，我們強調創傷出血性休克本身所造成心肌細胞旁及心肌細胞本身的凋亡反應，而非遠端次發的發炎物質引起的反應。但是由於創傷性休克的不同或是創傷的種類不同，所誘發的系統上或局部的發炎物質可能有所不同，而對於心臟凋亡的作用上更可能有許多差異，在接續實驗及臨床應用上面需要留意。

第三節 研究限制

本實驗使用為雄性 SD 大鼠，有均一的年齡和體重，試圖去減少因為賀爾蒙及年齡所引起的偏差。首先，本實驗用的是腹壁創傷後縫合去模擬人體受到創傷的情形，並沒有辦法完全模擬真實的多重創傷引起的骨折或大範圍挫傷等所產生的傷害，所引起的發炎及免疫反應是否相同則需要進一步研究。第二，本實驗使用乳酸林格氏液作為復甦溶液，並無法討論是否乳酸林格氏液的溶液滲透壓或其中成分也具有治療效果。第三，本實驗所採取的採樣時間為休克及復甦後八小時，是否本實驗證明的正面效果有持續性的效益仍需要進一步的實驗去證明。



第五章 結論與建議

第一節 結論

我們證實了心臟在創傷併發出血性休克的前 8 小時內會引起發炎反應，進而引起心肌細胞的凋亡。它是藉由死亡受體以及粒線體相關的凋亡路徑所完成。早期(創傷後 1 小時)的乳酸林格氏液的復甦治療，具有藉由阻斷上述兩個路徑而減輕凋亡反應的治療效果。同時，輸液復甦治療可以加強 IGF1/PI3K/Akt 路徑而抑制凋亡反應。這些細胞內反應我們認為是心臟在創傷併發出血性休克後的重要適應性反應。

第二節 建議

我們證明了早期的乳酸林格氏液對於創傷性性休克有部分抑制心臟凋亡的效果。根據此趨勢，我們應該更積極在創傷性休克之後，維持血壓的穩定。甚至在到院前救護的處置上面，更應在現行將患者載往醫院的運輸功能之外，加強現場即時的復甦治療。另外，在內科疾病中有許多正在研究的化合物可能對於心臟凋亡有助益，我們建議在後續的治療當中可以考慮除了早期的復甦治療外，加入可以加強保護的化合物並延長監測時間，以了解是否有更佳以及持續的治療效果。

第六章 參考文獻

1. Arroyo JS. Crosby LA: Basic rescue and resuscitation. Trauma system concept in the United States. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1995;318:11-6.
2. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, et al: Epidemiology of trauma deaths: A reassessment. *J Trauma* 1995; 38(2):185-193.
3. Gebhard F. Huber-Lang M.: Polytrauma--pathophysiology and management principles. *Langenbecks Archives of Surgery*. 2008;393(6):825-31.
4. Rizoli SB: Crystalloids and colloids in trauma resuscitation: a brief overview of the current debate. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*. 2003;54(5):S82-88.
5. Mitra B. Mori A. Cameron PA. Fitzgerald M. Street A. Bailey M.: Massive blood transfusion and trauma resuscitation. *Injury*. 2007;38(9):1023-9.
6. Ho AM. Dion PW. Cheng CA. Karmakar MK. Cheng G. Peng Z. Ng YWA: Mathematical model for fresh frozen plasma transfusion strategies during major trauma resuscitation with ongoing hemorrhage. *Canadian Journal of Surgery*. 2005;48(6):470-8.
7. Ho AM. Karmakar MK. Dion PW: Are we giving enough coagulation

- factors during major trauma resuscitation? American Journal of Surgery. 2005;190(3):479-84.
8. Peep Talving, Joakim Palstedt, Louis Riddez: Prehospital management and fluid resuscitation in hypotensive trauma patients admitted to Karolinska university hospital in Stockholm. Prehos Disast Med 2005;20(4):228-234.
 9. Sumann G. Paal P. Mair P. Ellerton J. Dahlberg T. Zen-Ruffinen G. Zafren K. Brugger H.: Fluid management in traumatic shock: a practical approach for mountain rescue. Official recommendations of the International Commission for Mountain Emergency Medicine (ICAR MEDCOM). High Altitude Medicine & Biology. 2009: 10(1):71-75.
 10. Hierholzer C. , Kalff J.C., Omert L., Tsukada K., Loeffert J.E., Watkins S.C. et al.: Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. Am. J. Physiol. 1998;275:L611.
 11. Hetts SW: To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. JAMA 1998;279:300-307.
 12. Mayberry JC. Welker KJ. Goldman RK. Mullins RJ: Mechanism of acute ascites formation after trauma resuscitation. Archives of Surgery. 2003: 138(7):773-6.
 13. Balogh Z. McKinley BA. Cocanour CS. Kozar RA. Valdivia A. Sailors RM.

- MooreFA: Supranormal trauma resuscitation causes more cases of abdominal compartment syndrome. *Archives of Surgery*. 138(6):637-642.
14. Zhao ZJ, Sun JW, Deng Z.: Effects of different means of fluid resuscitation on the activity of nuclear factor-KappaB in peripheral blood mononuclear cells in rats with hemorrhagic shock. *Chinese Critical Care Medicine*. 2007; 19(5):299-302.
15. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al.: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Cri Care Med* 1999;27:1230-1248.
16. Takemura G, Fujiwara H.: Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2004;101:1-16.
17. QZ Feng, YS Zhao, Eltyeb abdelwahid: The role of Fas in the progression of ischemic heart failure: prohypertrophy or proapoptosis. *Coronary Aretery Disease* 2008;19(7):527-534.
18. Narula J, Hajjar RJ, Dec GW.: Apoptosis in the failing heart. *Cardiol Clin*. 1998;16:691-710.
19. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, factor SM, et al.: A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003;111:1497-1504.

20. Taisei Yamamura, Hiroshi Nakamura, Takuo Yamamoto, Seiji Umemoto, Takashi Fujii, Nobuyuki Kobayashi et al.: Fas expression and apoptosis correlate with cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 1999;63:149-154.
21. Lee SD. Kuo WW. Bau DT. Ko FY. Wu FL. Kuo CH. Tsai FJ. Wang PS. Lu MC. Huang CY: The coexistence of nocturnal sustained hypoxia and obesity additively increases cardiac apoptosis. *Journal of Applied Physiology*. 2008;104(4):1144-53.
22. Tejero-Taldo MI. Chmielinska JJ. Weglicki WB: Chronic dietary Mg²⁺ deficiency induces cardiac apoptosis in the rat heart. *Magnesium Research*. 2007;20(3):208-12.
23. Hajnoczky G. Buzas CJ. Pacher P. Hoek JB. Rubin E.: Alcohol and mitochondria in cardiac apoptosis: mechanisms and visualization. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*. 2005; 29(5):693-701.
24. Khoynzhad, Ali. Jalali, Ziba. Tortolani, Anthony JA: synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure. *Texas Heart Institute Journal*. 2007; 34(3):352-9.
25. Ismailov RM, Ness RB, Weiss HB, Lawrence BA, Miller TR.: Trauma

associated with acute myocardial infarction in a multi-stat hospitalized population. *Int J Cardiol* 2005;105:141-146.

26. Tao L, Liu HR, Gao F et al.: Mechanical traumatic injury without circulatory shock causes cardiomyocyte apoptosis: role of reactive nitrogen and reactive oxygen species. *AJP-Heart circ Physiol* 2005;288:H2811-H2818.
27. A.R. Edouard, J.E. Benoist, C. Cosson, O. Mimos, A. Legrand, K. Samii.: Circulating cardiac troponin I in trauma patients without cardiac contusion. *Intensive Care Med* 1998;24:569-573.
28. Matthew Martin, Philip Mullenix, Peter Rhee, Howard Belzberg, Demetrios Demetriades, Ali Salim.: Troponin increases in the critically injured patient: Mechanical trauma or physiologic stress? *J Trauma*. 2005;59:1086-1091.
29. Sanjiv Dhingra, Anita K. Sharma, Rakesh C. Arora, Jan Slezak, Pawan K.: Signal IL-10 attenuates TNF- α -induced NF κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovascular Research* 2009;82(1):59-66.
30. Daniel R. Meldrum, Robert Shenkar, Brett C. Sheridan, Brian S. Cain, Edward Abraham, Alden H. Harken.: Hemorrhage activates myocardial NF κ B and increases TNF- α in the heart. *J Mol Cell Cardiol*

1997;29:2849-2854.

31. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE.: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-beta are responsible for the in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996;183:949-958.
32. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CJ et al.: Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996;98:2854-2865.
33. Shahani R, Marshall JG, Rubin BB, Li RK, Walker PM, Lindsay TF.: Role of TNF-alpha in myocardial dysfunction after hemorrhagic shock and lower-torso ischemia. *Am J Physiol* 2000;287:H942-H950.
34. Nagata S.: Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
35. Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN.: Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H456-463.
36. Yamaguchi S, Yamaoka M, Okuyama M, Nttoube J, Fukui A, Shirakabe M et al.: Elevated circulation levels and cardiac secretion of soluble fas ligand

- in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1999;83: 1500-1503.
37. Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T et al.: Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1994;75:426-433.
38. Michael T. Crow, Kartik Mani, Yuong-Jae Nam, Richard N. Kitsis.: The mitochondrial death pathway and cardiac myocytes apoptosis *Cir. Res.* 2004;95:957-970.
39. McCunn M, Dutton R. End-points of resuscitation: How much is enough ? *Curr Opin Anaesthesiol* 200;13:147-53.
41. Burris D, Rhee P, Kaufmann C, Pikoulis E, Austin B, Eror A, DeBraux S, Guzzi L, Leppaniemi A.: Controlled resuscitation for uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma* 1999;46:216-23.
42. G. Tom Shires, Leslie K. Browder, Trina P.V. Steljes, Shelley J. Williams, Timothy D. Browder, Annabel E. Barber. The effect of shock resuscitation fluids on apoptosis. *The Amer J of Surg.* 2005;189:85-91.
43. William H. Bickell, Mattew J. Wall, Paul E. Pepe, R. Russell Martin, Victoria F. Ginger, Mary K. Allen, Kenneth L. Mattox.: Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso

injuries. NEJM 1994;331:11-5-1109.

44. Jian Guan, Da-Di Jin, Li-Juan Jin , Qi Lu.: Apoptosis in organs of rats in early stage after polytrauma combined with shock. J Trauma 2002;52:104-111.

45. Lynette Pretorius, Kate L Owen, Garry L Jennings, Julie R McMullen.: Promoting physiological hypertrophy in the failing heart. Clinical and experimental pharmacology and physiology.2008;35:438-441.

