

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：趙偉廷，賴慧卿

Wei-Ting Chao, Ph.D. ; Hui-Chin Lai, Ph.D.

以大鼠模擬區域麻醉對於手術造成的心臟衰竭所產生的保護機制

The Protective Mechanism of Regional Anesthesia in Surgery Induced Heart Failure in Rat

研究生：蔡靖涵

Ching-Han Tsai

中華民國一〇四年七月

東海大學生命科學系碩士論文

以大鼠模擬區域麻醉對於手術造成的
心臟衰竭所產生的保護機制

The Protective Mechanism of Regional
Anesthesia in Surgery Induced Heart
Failure in Rat

The seal of Tungshai University is a circular emblem with a scalloped border. It features the university's name in Chinese characters '東海大學' at the top and 'TUNGSHAI UNIVERSITY' in English around the perimeter. The year '1955' is inscribed at the bottom. In the center, there is a stylized design of a building or a cross-like symbol.

研究生：蔡靖涵

Ching-Han Tsai

指導教授：趙偉廷，賴慧卿

Wei-Ting Chao, Ph.D. ; Hui-Chin Lai, Ph.D.

中華民國一〇四年七月

致謝

在東海的兩年研究生生涯裡，匯集了許多人的幫助與鼓勵，無論是直接或間接，最終都是促使我能順利的完成實驗及論文。

首先，感謝我的指導教授趙偉廷老師與台中榮總麻醉科賴慧卿醫師在研究上給予我許多的啟發、指導以及寶貴的意見，讓我在研究與思考邏輯上獲益良多，並且提供充裕的資源，使本論文得以順利完成。接著，我要特別感謝南華大學葉月嬌老師在大學時期的悉心指導與研究所時期的支持與鼓勵，除了是我在科學研究上的啟蒙老師，更是在做人處事及生涯規劃上給予我方向的貴人。承蒙以上三位教授於論文初稿的不吝斧正和口試時寶貴的建議及意見，使論文內容更趨充實，在此深表謝意。

感謝台中榮總心臟內科劉尊睿醫師提供許多實驗上的資源、感謝台中榮總教學研究部王麗娟學姊在實驗上給予我許多教導及建議、感謝動物房洪義文先生熱情地贊助實驗動物、感謝趙偉廷老師實驗室助理魏婉貞學姊在實驗上的指導、感謝東海大學生命科學系的同學們及學弟妹們在實驗上的協助與意見，我才能夠順利完成碩士學位。最後，要感謝親愛的家人長久以來的默默支持與關心，使我無後顧之憂地在學業上全力以赴。懷著感恩的心並祝福曾經幫助我的人，身體健康，事事順心。

目錄

致謝	I
目錄	II
中文摘要	III
英文摘要	V
前言	1
研究目的	13
材料與方法	14
研究結果	25
討論	30
參考文獻	35
圖次	45
圖	46
附錄	53
個人資料	59

中文摘要

過去在臨床上的研究發現手術時對人體所造成的刺激似乎是外來壓力的主要來源，可能因此造成心肌細胞的損傷，甚至死亡。手術傷口造成的壓力會使病患交感神經活性增加、使賀爾蒙、免疫反應及凝血系統發生明顯變化。壓力導致的數種協同機制都會引起心臟衰竭以及其他併發症。在先前便有學者實驗發現相較於全身麻醉，利用脊髓麻醉可以降低心臟衰竭的風險。然而詳細機轉尚未清楚，所以本論文研究主要是以大鼠模擬臨床手術模型去釐清此種壓力是經由何種途徑去造成心肌受到傷害。初步的結果發現 surgery 組 (埋管+左肋開胸) 的心臟尖端處明顯相較於 control 組來得肥大，而 marcaine 組 (埋管+脊椎麻醉藥+左肋開胸) 則降低此現象的發生；此外，測量血液中腎上腺素的含量，結果顯示在 surgery 組明顯增加，而在 Marcaine 處理組則有減少的現象。而利用西方墨點法分析與內質網壓力及細胞自噬相關的蛋白 GRP78、LC3II 表現量在 surgery 組明顯增加，而在 Marcaine 處理組則有減少的趨勢。由此可知，手術傷口確實會造成內質網壓力及自噬作用增加，而利用脊髓麻醉則能減緩此現象。此外，利用電子顯微鏡觀察超微結構發現心臟組織中的粒腺體相較於 control 組面積較大，結構鬆散，由此推測粒線體的功能受損進而引發

細胞自噬及細胞凋亡，使得心臟細胞走向衰竭。本研究將可提供未來患有心血管疾病的高危險群病患在手術麻醉時施以脊椎麻醉進而保護心臟功能的參考方向。

Abstract

Heart failure is defined as a complex clinical syndrome which can result from any structural or functional cardiac disorder that impairs the ability of ventricle to fill with or eject blood. The increased sympathetic activity associated with injury induces distinct changes in the host's hormonal and immune response and in the coagulation system. A number of synergistic mechanisms are involved in cardiac complications during stress. Epidural anesthesia has been shown to reduce the risk of major postoperative morbidity such as MI (myocardial infarction) or death, however, the underlying mechanism is still unclear. This study was designed to simulate the clinical surgery and spinal anesthesia model in rat to clarify heart injury and the damage recovering mechanism. Oxidative stress related apoptosis and ER (endoplasmic reticulum) stress related autophagy will be monitored in myocardial injury and recovery process. Our preliminary results showed that epinephrine, norepinephrine and NT-proBNP in the blood serum are increased through sympathetic activity in Surgery group, and Marcaine treatment can reverse these changes. We also found that Marcaine treatment can

suppress GRP78 and LC3II protein expression which are related to ER stress and autophagy. In conclusion, Marcaine treatment can reduce ER stress induced myocardial apoptosis which was induced after surgery. Additionally, increased mitochondrial area was found in Surgery group, while Marcaine treatment can rescue the mitochondria phenotype. This study demonstrated that giving regional anesthesia may protect patients who are having high risk of heart diseases prior to surgery.

前言

心臟跳動是維持生命存在的基本條件，但許多外來的刺激可能造成心肌細胞的損傷，甚至死亡。然而手術時對人體所造成的刺激似乎是外來壓力的主要來源，例如：食道癌的病患在進行食道切除及縱隔腔淋巴擴清手術時，常造成迷走神經損傷而影響心跳速率；大部分的病患在術後數日內即恢復原有之心跳速率，但少數年紀大且原本心臟不好的病患則易因心率不整導致心臟缺氧。此外，手術傷口所造成的壓力會使病患的交感神經活性增加、使賀爾蒙及免疫反應及凝血系統發生明顯變化 (Freise and Van Aken, 2011)。而壓力導致的數種協同機制都會引起心臟的併發症產生，例如：血液中兒茶酚胺增加會使左心室負荷量和心跳速率增加，同時降低冠狀動脈灌注的時間；促腎上腺皮質釋放激素數值升高會減少心臟 NO 釋放和增加內皮素的生成，這些都會加重冠狀動脈內皮功能的障礙 (Stenseth et al., 1994)。另外，紀錄微創和較大的手術後血清中壓力激素的數值也都是增加的，壓力發生的早期是發炎前期也會經由活化基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases ; MMP) 使血小板不穩定 (William et al., 2001)。綜合上述，心血管的因素會使高風險的病患在手術期間死亡率達 63%，而低風險的病患其死亡率達 30% (Freise and Van Aken, 2011)。過去的

研究中指出，在一般外科手術包括心臟外科、普通外科及創傷外科等手術中皆容易使氧化壓力 (Oxidative Stress) 增加，尤其是臟器移植及骨科手術中的再灌流過程中，常因過度刺激交感神經造成心臟的負擔上升而使氧化壓力增加，最後產生負面的影響，此種作用在高齡患者的情形更加顯著 (Marczin, 2005; Risby et al., 1994; Tornberg et al., 2005)。在 1996 年時即有實驗證明，對於 70 歲以上的老年患者，在進行骨科涉及到開放式手術，例如關節置換或脊柱外科手術時，常因手術使之產生的自由基及相關的發炎症狀而導致手術後產生併發症以及恢復速度緩慢，且此情形在肺部及心血管的相關併發症更是常見 (Franklin and Lefer, 1996; Oxman et al., 1997)。

手術後隨著患者體內自由基濃度的升高，進而造成細胞功能障礙或器官受損，對於這些術後對抗氧化壓力的治療上，雖然許多文獻已經證實有許多抗氧化藥物例如 vitamin E 及 coenzyme Q10 可以幫助修復術後對心臟及體內的損害 (Franklin et al., 2012)，不過，依然很少有研究氧化壓力對於手術後的影響詳細機制以及在預防與治療上有效的方法。

動物模式之優勢 (Animal models)

動物模式指在動物身上進行生物、行為之研究成果，及在動物產

生的先天或誘發性病理變化，在人類或另種動物有類似現象，以作為參考，此稱為動物模式。一般而言，動物模式主要針對人類疾病而言，稱為人類疾病動物模式，此種動物模式主要利用某些動物產生與人類特定疾病類似之反應 (Zutphen et al., 1993)。

實驗動物模式一般分成四類，且前兩類較為常用：

一、實驗或誘發模式 (Induced or experimental models)：嘗試將所研究之疾病以實驗誘導方式在動物身上表現。例如以肝臟部份切除術觀察其肝臟再生或以 alloxane 誘導糖尿病之發生。基因轉殖及基因剔除動物已越來越普遍，因以人為方式引入或剔除基因，故屬誘發模式；通常誘發模式的變異大於自發模式。

二、自發模式 (Spontaneous or natural models)：又稱自然實驗，疾病自然發生，非由研究者所誘導。例如裸鼠、裸大鼠或貓之神經節脂沉積症(gangliosidosis)，通常此類模式之再現性較高。

三、負模式 (Negative or non-reactive models)：此模式與前兩模式相反，指某特定人類疾病不會發生在此動物上，例如淋球菌感染不會發生在兔子上。負模式通常可表示動物對某特殊刺激不具反應能力，常用於對疾病抵抗機制之研究。

四、孤兒模式 (Orphan models)：某種疾病自然存在於某動物，但卻在人類身上找不出可對照、類似的疾病，之後才在人類身上找出

類似的疾病。例如禽類馬立克病 (Marek's disease)，牛海綿樣腦病 (BSE) — 俗稱狂牛病。

所謂演化上與人接近的品種 (如猿猴)，在人類疾病動物模式之選擇上不一定比所謂較低等之動物 (如貓、老鼠等) 更具絕對優勢。有兩類廣義的動物模式因素需要考慮，一指根據類似結構及功能 (analogy) 而來，另一類指根據同質性 (homology)，即結構上來自於演化上同一祖先且有類似功能者。主要的決定要素，乃根據受測試品種的病理與疾病之表現與人的相似性而定 (Svendson et al., 1994)。例如：Wistar大鼠即是幼年啟動性糖尿病之很好模式之一。其它動物也許在演化上更接近於人類，但未必找得到糖尿病品種。

麻醉 (Anesthesia)

「麻醉」是一種在手術當中利用藥物使痛覺及知覺暫時消失的醫療技術，使手術過程中感覺不到疼痛，同時方便於手術之進行。麻醉可分全身麻醉、區域麻醉及局部麻醉。全身麻醉是利用麻醉藥來抑制中樞神經，再配合其他藥物來達到肌肉的鬆弛及止痛，但患有心血管疾病者也會增加其風險度；區域麻醉，常見的硬膜外麻醉 (Epidural Anesthesia)，是利用置入脊椎硬腦膜外腔的小導管來加入局部麻醉藥已達到神經阻斷及手術中止痛的目的，也可提供手術後止痛的途徑。

而本研究利用大白鼠模擬區域麻醉的給予是利用脊髓腔埋管替代脊椎硬腦膜外埋管，因為與人體相較之下，大白鼠的脊椎較小，在技術上無法做到椎硬腦膜外埋管。

臨床研究顯示，胸段硬膜外鎮痛 (Thoracic Epidural Anesthesia, TEA) 能降低胸腔手術時交感神經張力及內分泌反應。2003年研究發現胸段硬膜外鎮痛也能使減少心臟心率變異性得到更好的手術後恢復 (Licker et al., 2003)；在1993年，發現硬膜外給予嗎啡可減少有心臟危險因子的病患術後引起心肌缺氧的風險 (Beattie et al., 1993)；而2004年研究也指出術後硬膜外鎮痛比靜脈鎮痛能顯著降低胺基酸的氧化 (Schricker et al., 2004)；硬膜外麻醉能顯著降低心臟手術病人壓力反應及術後血液中腎上腺素及正腎上腺素的量 (Hoar et al., 1976; Kirno et al., 1994; Liem et al., 1992; Moore et al., 1995; Stenseth et al., 1994)。然而，在先前便有學者實驗發現相較於全身麻醉(general anesthesia)，利用脊髓麻醉可以降低在手術中腎上腺素的分泌量進而在降低術後引發呼吸暫停及低血氧症的潛在風險 (Welborn et al., 1990; William et al., 2001; Williams et al., 2006)。硬膜外麻醉和鎮痛能有效減少術前手術壓力、手術併發症和改善預後 (Atkinson et al., 2013; Park et al., 2001)。

氧化壓力 (Oxidative Stress) 與心臟衰竭 (Heart Failure)

愈來愈多的研究證實活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的量增加造成氧化壓力，使細胞膜、蛋白質及 DNA 受到損害並傳遞訊息引起細胞凋亡，進一步改變心臟的功能；心肌細胞自人體出生後便極少複製，所以當心肌細胞受到損害時，可能漸漸走向心臟衰竭 (heart failure) (Bergamini et al., 2009)。活性氧的主要來自於粒線體 (mitochondria)，當活性氧的濃度增加時，與細胞老化 (aging)、細胞凋亡 (apoptosis) 及細胞壞死 (necrosis) 具有關聯性 (Rydstrom, 2006)。細胞凋亡是當細胞凋亡訊息傳遞途徑被活化時，細胞所產生的程序性自殺行為。而粒線體是細胞中的能量廠，主要提供細胞能量的來源，在氧化壓力及細胞凋亡中扮演重要的角色 (Lai et al., 2003)。

心臟衰竭被定義為一種複雜的臨床綜合症狀，為任何形態上或功能上的心臟受損。在工業化國家中，心臟衰竭是主要的發病率及死亡率之高風險疾病，而主要以老年人為首要患病者，是一種日益嚴重的公共疾病問題。心肌梗塞、高血壓、心肌症以及心臟瓣膜疾病皆是主要導致心臟衰竭的原因。過去已經有許多臨床研究證實氧化壓力在心臟衰竭中具有很重要的影響，會使心肌的形態及結構改變。在面臨不同的壓力刺激時，會使兒茶酚胺釋出到血液當中且同時活化 β -adrenergic receptor，並刺激心臟的功能。過去文獻指出 β -adrenergic

receptor 在調節心臟功能方面所扮演很重要的角色，若改變 β -adrenergic receptor 的訊息傳遞路徑會導致各種不同的心臟失能，例如心肌梗塞、高血壓性心臟衰竭以及心臟肥大等；此外，在心臟衰竭的過程中， β -adrenergic receptor 的訊息傳遞途徑也會產生改變 (Amin et al., 2011)。

內質網壓力 (Endoplasmic Reticulum Stress, ER Stress)

內質網是在真核生物細胞中由膜狀結構圍成的胞器，控制許多細胞內重要程序，例如鈣離子恆定環境平衡、蛋白質合成、蛋白質運輸及細胞凋亡，為細胞中的重要細胞器。在某些情況下，當蛋白質無法折疊成形時，未折疊成形的蛋白質就會堆積在內質網上。當細胞之內質網中累積過多的未折疊蛋白的時候，即產生內質網壓力，從而啟動壓力蛋白 (stress protein) 之活化、改變轉錄因子活性作用及增加輔助折疊蛋白 (chaperon protein) 合成。然而，過多的內質網壓力存在時，會誘發訊息傳遞，引起細胞凋亡。而內質網壓力所引起的細胞凋亡被發現與缺血性心臟病及心臟衰竭具有密切的關聯性 (Egger et al., 2007; Toth et al., 2007)。先前已有許多文獻證實 GRP78 蛋白可作為內質網壓力的指標，當細胞處於生理或病理嚴重狀況下，鈣離子恆定環境平衡遭到破壞，造成未摺疊或錯誤摺疊的蛋白質堆積在內質網內腔導致內

質網逆境，而且細胞會活化一系列訊號傳導路徑，統稱未摺疊蛋白質反應 (Unfolded Protein Response, UPR)。其中一個 UPR 的特徵是內質網逆境蛋白質(葡萄糖調節蛋白質)的誘導表現。目前了解最清楚的是葡萄糖調節蛋白質 78 (Glucose Regulated Protein, GRP78)，也是備為熟知的免疫球蛋白重鏈結合蛋白質又稱為 BiP，具有調節鈣離子功能及執行其身為分子伴侶的任務，負責膜蛋白及分泌蛋白質的折疊 (Lee, 2005)；此外，在過去文獻中已知當內質網壓力產生時，會進一步引發自噬作用 (Li et al., 2008) (詳見附錄一)。

自噬作用 (Autophagy)

自噬作用普遍存在於真核細胞中，為細胞中自體吞噬的過程 (Reggiori and Klionsky, 2002)。自噬作用包含三種主要形式：伴侶分子中介自噬作用 (chaperone-mediated autophagy, CMA)、微自噬作用 (microautophagy) 及巨自噬作用 (macroautophagy)。細胞飢餓主要啟動微自噬作用及巨自噬作用，將目標分子轉移穿越溶酶體 (lysosome) 膜，而伴侶分子中介自噬作用則是間接發生反應 (Massey et al., 2004)。

一、伴侶分子中介自噬作用：是藉由 chaperone 蛋白所達成的自體吞噬機制，chaperone 普遍存在於細胞質中，主要功能是幫助進行轉譯 (translation) 出的蛋白質進行折疊 (folding)，當蛋白質 folding 錯

誤 (通常是未摺疊蛋白) 時, chaperone 便會將蛋白質帶至溶酶體膜上, 最後這些蛋白會 translocate 至 lysosome 中進行分解回收 (Lee et al., 2009)。

二、微自噬作用: 是藉由 lysosome 的膜向內凹陷, 將細胞質中的小分子物質或胞器以直接吞噬的方式將其併入 lysosome 中, 再以 lysosome 內的 hydrolase 將其清除分解。

三、巨自噬作用: 可將細胞胞器、蛋白質等包覆進 vacuole, 形成自噬小體 (autophagosome), 最終將與 lysosome 結合將其內的細胞胞器、蛋白質加以分解, 屬於三種路徑最為複雜也是目前相關研究領域最為關心的部份。巨自噬作用的過程依序可以歸納為 initiation、elongation 和 closure、maturation (Dere et al., 2010)。

在 elongation 和 closure 的過程中會將 phagophore 的膜延長, 並將無用的細胞質大分子物質, 或微生物包裹起來, 形成 autophagosome。Autophagosome 是一個特殊的雙層膜構造, LC3 分子會在 autophagosome 的膜上, 而且在這個過程 LC3-I 會分解成 LC3-II (Kabeya et al., 2000; Suxuki et al., 2001; Mizushima et al., 2007), 因此, 許多文獻會以 LC3-II 表現量, 作為 autophagy 活性的指標 (Chen et al., 2009; Klionsky et al., 2008)。進入 maturation 階段時, autophagosome 會與 lysosome 融合形成 amphisome, 內層膜會被 lysosomal hydrolase

破壞而溶解形成單層膜的 autolysosome (亦稱 autophagolysosome) , 而裡面的物質會被分解成最基本的成分, 藉由 membrane permeases 釋放到細胞質中, 供細胞再利用 (Deretic, 2010; Dwivedi and Ahnn, 2009) 。巨自噬作用 (macroautophagy) 又可稱為自噬作用 (autophagy) , 是目前三種形式中研究較清楚的。自噬作用的命名主要衍伸自希臘字, 代表"自身" (auto) 、"食噬" (phagy) , 顧名思義, 自噬作用利用形成的雙層膜與溶酶體融合後, 形成自噬小體 (autophagosome) 的結構, 將 cargo 降解並回收再利用 (Levine and Klionsky, 2004) (詳見附錄二) 。在目前的研究證據認為自噬作用有主要兩種生理目的, 一為細胞在窮困環境中提供胺基酸以利生存; 二為降解細胞中半衰期較長的蛋白質及老化受損的胞器 (Elmore et al., 2001) 。當酵母菌處在細胞飢餓環境中, 自噬作用的活化有助於促進酵母菌的存活 (Tsukada and Ohsumi, 1993) 。在哺乳類研究中也是類似的情況, 當減少或移除餵食可引發小鼠體內細胞提高自噬作用的活化 (Mizushima, 2004) 。當細胞中泛素蛋白酶體無法正常進行分解, 導致大量摺疊異常的蛋白質堆積在細胞中, 形成不可溶的聚集體 (aggresome) , 此時會藉由引發自噬作用活化來清除堆積的蛋白質 (Fortun et al., 2003; Iwata et al., 2005; Kamimoto et al., 2006) 。外界壓力、缺氧、過度擁擠、高溫、細胞飢餓、細菌或病毒感染皆會導致自

噬作用活化 (Dorn et al., 2002; Kirkegaard et al., 2004)；除此之外，自噬作用對於腫瘤生成、個體正常發育、生命週期、細胞生長調控及抗老化機制皆扮演重要的角色 (Bergamini et al., 2003; Levine and Klionsky, 2004; Longo and Finch, 2003; Melendez et al., 2003; Vellai et al., 2003)。

細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡又稱為細胞程式死亡 (programmed cell death)，在生物個體發育與維持成體恆定的過程中，與細胞分裂同樣扮演著重要的角色。例如：在發育過程中細胞凋亡機制可協助挑選出最適合留存的功能細胞，以及參與塑造個體與器官的形態長成；而在成體中，細胞凋亡則扮演著淘汰衰老細胞以及剔除危險細胞 (如：受到環境傷害或病毒感染而造成遺傳物質突變或損傷，無法被修復且可能造成個體威脅的細胞) 的重要功能。相較於另一種常見的細胞死亡形式「壞死」(necrosis)，細胞凋亡為生物體內正常生理性細胞死亡的機制，其過程是由特定的蛋白質或酵素所調控 (Hengartner and Bryant, 2000)。

細胞凋亡的調控機制主要經由兩條途徑：(1) 死亡受體路徑 (death receptor pathway)：又稱為外在路徑 (extrinsic pathway)，當細胞受到刺激 (病毒感染、細胞壓力、化學治療藥、DNA 破壞等)，細胞膜表面的死亡訊息受體 (death receptor) 與死亡配體 (death ligand)

會結合而活化受體的死亡領域 (death domain)，進一步誘導細胞內的訊息傳遞 (signal transduction)，最後活化階梯序列的 Caspases 而導致細胞凋亡；(2) 粒線體路徑 (mitochondrial pathway)：又稱為內在路徑 (intrinsic pathway)，當老化、DNA 受損、化學或物理刺激時，粒線體膜發生變化而引起細胞凋亡 (MacFarlane and Williams, 2004)。然而，外在路徑也會活化內在路徑進行。

粒線體在細胞內是產生能量的重要胞器。近代研究發現，粒線體在調節細胞死亡路徑上，扮演一個重要的角色。當粒線體遭受 DNA 破壞、氧化傷害和其他基因毒性的因子刺激時，會導致不可逆細胞死亡。在細胞死亡時，粒線體膜電位會崩塌，促進一系列不可逆的細胞死亡程序。粒線體膜上 Bcl-2 家族負責調節粒線體外膜的完整性及功能 (Jeong and Seol, 2008)。Bcl-2 家族 (Bcl-2 family) 依據功能區分：

(1) 抗凋亡蛋白 (anti-apoptotic proteins)：如 Bcl-2, Bcl-xL；(2) 原凋亡蛋白 (pro-apoptotic proteins)：如 Bax, Bad (Burlacu, 2003; Desagher and Martinou, 2000; Hengartner and Bryant, 2000)。此外先前文獻指出 p53 蛋白透過與 Bcl-2 蛋白相互作用而直接參與調節粒線體外膜 (Vaseva and Moll, 2009)(詳見附錄三)。

研究目的

許多外來的刺激都可能造成心肌細胞的損傷，甚至死亡。過去的研究發現，手術時對人體所造成的刺激似乎是外來壓力的主要來源，而壓力導致的數種協同機制都會引起心臟衰竭以及其他併發症。在先前便有學者實驗發現相較於全身麻醉，利用脊髓麻醉可以降低心臟衰竭的風險。然而這個機制的詳細機轉目前尚未清楚，因此本論文之研究目的為：

1. 以 Sprague-Dawley 品系大白鼠建立模擬臨床手術引起心臟受損之動物模型。
2. 釐清手術所引發的壓力為何種途徑去造成心肌受到損害。
3. 確定全身麻醉併用區域麻醉能降低手術中壓力的產生，進而減少心肌的損傷。

材料與方法

1. 實驗動物 (Animals)

實驗動物是由台中榮民總醫院動物中心自行繁殖的 SD (Sprague-Dawley) 品系雄性大白鼠，週齡 6-8 週，實驗體重控制在 250-300g (275 ± 25 g)，單籠個別飼養於室內相對溼度 65-75%、室溫 19-25°C、晝夜 12 小時光照/12 小時黑暗自動光照控制的動物房中，採自由進食及飲水。

2. 實驗設計 (Experimental design)

實驗動物於脊椎埋管一週後，在全身麻醉後，注射脊椎麻醉藥使之反應 5 分鐘後，再模擬臨床手術，傷口縫合後，等待 3 小時後犧牲，取血液及心臟組織待分析。本研究將動物隨機分為四組，(A) Control 組，動物沒有經過任何處理；(B) Sham 組，動物僅埋管，未給予脊椎麻醉藥與模擬手術；(C) Surgery 組，動物埋管一週後，未給予脊椎麻醉藥，但給予模擬手術；(D) Marcaine 組，動物埋管一週後，給予脊椎麻醉藥並模擬手術。(詳見附錄四)

3. 實驗動物之埋管及模擬手術 (Animal treatment)

實驗動物使用體重介於 250-300g 之 SD (Sprague-Dawley) 品系雄性大白鼠。利用 Zoletil 50 (Virbac™)與 Rompun® 比例 1：1 混合均勻後將 Sham、Surgery、Marcaine 組的大白鼠麻醉 (1ml/kg body weight，腹腔注射)，將大白鼠的背部毛剃除，並在脊椎之腰椎骨節 L4 和 L5 (詳見附錄五，以人體脊椎骨節圖替代大白鼠) 之間開洞，找到兩個骨節後，將其周圍的結締組織與肌肉組織去除，以針線穿過兩個骨節並固定 polyethylene tube，接著找出脊髓腔的洞口將 polyethylene tube 埋入脊髓腔中 (脊髓腔中含有脊髓神經與脊髓液，找到脊髓腔時，能略見透明的脊髓液滲出，埋入 polyethylene tube 時，由於導管碰觸脊髓神經，故能看見大白鼠的尾巴略為抽動)，接著打入脊椎麻醉藥 Marcaine® Spinal 0.5% Heavy 約 50ul 以作為術後鎮痛後，即可縫合。待一週後，利用 Zoletil 50 (Virbac™)與 Rompun® 比例 1：1 混合均勻後將 Surgery、Marcaine 組的大白鼠麻醉 (1ml/kg body weight，腹腔注射)，並將大白鼠左肋胸口的毛剃除，Surgery 組的大白鼠左肋胸口劃開約 10 分鐘，再進行縫合；而 Marcaine 組的大白鼠則先找出一週前埋的 polyethylene tube，打入脊椎麻醉藥 Marcaine® Spinal 0.5% Heavy 約 50ul，等待 5 分鐘使麻醉藥作用後，將大白鼠左肋胸口劃開約 10 分鐘，再進行縫合。等待 3 小時後，以二氧化碳氣體麻醉將實驗動物

犧牲，取血液及心臟組織待分析。(詳見附錄六)

4. 石蠟包埋 (Paraffin embedding)

石蠟包埋法是將樣本經由固定、脫水、澄清、滲蠟後，再包埋於石蠟中。實驗動物犧牲後，取出心臟組織以 1X PBS 沖洗乾淨，浸泡於 10% Formaldehyde 中，於室溫下 overnight (固定)。隔日依序浸泡於 10% Ethanol、20% Ethanol、30% Ethanol、50% Ethanol、70% Ethanol、95% Ethanol 中各 20 分鐘，接著浸泡於 100% Ethanol 30 分鐘 (脫水)，接著依序浸泡於 100% Ethanol 與 Xylene 比例 3 : 1、1 : 1、1 : 3 中各 40 分鐘，再浸泡於 Xylene 中 1.5 小時 (澄清)。緊接著在 62°C 烘箱中進行，依序浸泡於 Xylene 與 Paraffin 比例 3 : 1、1 : 1、1 : 3 中各 1.5 小時，再浸泡於 Paraffin 中 2 小時 (滲蠟)。關掉烘箱使 Paraffin 凝固，隔日再打開烘箱待 Paraffin 溶解後更換新的 Paraffin 浸泡 2 小時後，即可將組織進行包埋。組織石蠟包埋塊以石蠟切片機薄切 3-5 μ m 的薄度，薄切片皆置入水溫約 40°C 的水浴槽中使薄片展開，再以含有 Poly-L-Lysine 的玻片撈起後待風乾，完成石蠟切片步驟。

5. 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

使用 Histostain[®]-SP Kits (Invitrogen™) 來對石蠟組織玻片進行免疫

化學組織染色。為了使玻片脫蠟，將玻片放置於 62°C 的烘箱 10 分鐘後，將玻片置入 Xylene 中 20 分鐘。接著依序置入 100% Ethanol、95% Ethanol、80% Ethanol、70% Ethanol、50% Ethanol、1X PBS 各 5 分鐘。接著將玻片放入隔水加熱的 100°C 的 Citric acid Buffer 中作用 20 分鐘 (抗原活化)，將玻片放入 1X PBS 中清洗 5 分鐘後，將玻片周圍以 Kimwipe 擦拭乾淨，利用 Liquid-repellent Slide Marker Pen 在玻片上的組織周圍畫線以防止後面步驟的溶液溢出玻片。接著在玻片上加入 H₂O₂ 與 Methanol 比例 1:9 的混合液中 10 分鐘，再放入 1X PBS 中清洗 5 分鐘後，用血清阻斷溶液 (Serum Blocking Solution) 反應 10 分鐘以進行阻斷 (blocking)，接著將血清阻斷溶液以 Kimwipe 吸乾，加入初級抗體於 4°C 反應 overnight。隔日，回收初級抗體後，放入 1X PBS 中清洗 5 分鐘後，加入次級抗體 (Biotinylated Second Antibody) 在室溫下作用 10 分鐘，放入 1X PBS 中清洗 5 分鐘後，加入 Enzyme Conjugate Buffer 並在室溫下靜置 15 分鐘，放入 1X PBS 中清洗 5 分鐘後，再加入 DAB Buffer 在室溫下避光靜置 5 分鐘進行呈色。再以 1X PBS 輕輕沖洗後，利用 Hematoxylin Buffer 在室溫下靜置 3-7 分鐘的對比染色，再以 1X PBS 輕輕沖洗。將玻片置入 1X PBS 中清洗 8 分鐘後，再依序放入 95%酒精、100%酒精各 10 分鐘，室溫下放乾 15 分鐘後，再放入 Xylene 10 分鐘，再取出於室溫下放乾 15 分鐘即可以 Mounting

Medium 進行包埋，之後便可以光學顯微鏡進行觀察及拍照。

6. 腎上腺素分析 (Epinephrine assay with ELISA Kit)

為了比較各組大鼠血清中的腎上腺素含量之多寡，實驗動物犧牲後，取血液並離心 3000rpm，15 分鐘，收集上清液得血清待用。取 10 μ l Standard A-F、10 μ l Control 1 或 2 以及 100 μ l 樣品加到 Extraction Plate，每格再加入 25 μ l 的 TE Buffer 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 60 分鐘。去除每格溶液後，每格加入 1ml 之 Wash Buffer 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 5 分鐘，接著重複 wash 1 次後並去除每格溶液。每格加入 150 μ l Acylation Buffer 後，再加入 25 μ l Acylation Reagent，並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 20 分鐘。去除每格溶液後，每格加入 1ml 之 Wash Buffer 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 5 分鐘，接著重複 wash 1 次後並去除每格溶液。接著，每格加入 100 μ l Hydrochloric Acid 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 10 分鐘。接著從 Extraction Plate 中取 90 μ l Standard、Control 以及樣品加到 Microtiter Plate 中，每格再加入 25 μ l Enzyme Solution 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 1 分鐘混合均勻後，靜置於 37°C 烘箱中 2 小時。接著取 100 μ l Standard、Control 以及

樣品加到 96 well plate，再加入 50 μ l Noradrenaline Antiserum，靜置於 4 $^{\circ}$ C overnight。隔日，以 300 μ l Wash Buffer wash 4 次後，每格加入 100 μ l Enzyme Conjugate 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm) 上，室溫下 30 分鐘。再以 300 μ l Wash Buffer wash 4 次後，每格加入 100 μ l Substrate 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm) 上，室溫下避光 20-30 分鐘。接著每隔再加入 100 μ l Stop Solution 即可以 Microplate Reader 進行終點分析測讀，設定波長 450nm。

7. 正腎上腺素分析 (Norepinephrine assay with ELISA Kit)

為了比較各組大鼠血清中的正腎上腺素含量之多寡，實驗動物犧牲後，取血液並離心 3000rpm，15 分鐘，收集上清液得血清待用。取 10 μ l Standard A-F、10 μ l Control 1 或 2 以及 100 μ l 樣品加到 Extraction Plate，每格再加入 25 μ l 的 TE Buffer 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm) 上，室溫下 60 分鐘。去除每格溶液後，每格加入 1ml 之 Wash Buffer 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm) 上，室溫下 5 分鐘，接著重複 wash 1 次後並去除每格溶液。每格加入 150 μ l Acylation Buffer 後，再加入 25 μ l Acylation Reagent，並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm) 上，室溫下 20 分鐘。去除每格溶液後，每格加入 1ml 之 Wash Buffer 並蓋上 Adhesive Foil 置放於

Shaker (600rpm)上，室溫下 5 分鐘，接著重複 wash 1 次後並去除每格溶液。接著，每格加入 100 μ l Hydrochloric Acid 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 10 分鐘。接著從 Extraction Plate 中取 90 μ l Standard、Control 以及樣品加到 Microtiter Plate 中，每格再加入 25 μ l Enzyme Solution 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 1 分鐘混合均勻後，靜置於 37 $^{\circ}$ C 烘箱中 2 小時。接著取 100 μ l Standard、Control 以及樣品加到 96 well plate，再加入 50 μ l Noradrenaline Antiserum，靜置於 4 $^{\circ}$ C overnight。隔日，以 300 μ l Wash Buffer wash 4 次後，每格加入 100 μ l Enzyme Conjugate 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下 30 分鐘。再以 300 μ l Wash Buffer wash 4 次後，每格加入 100 μ l Substrate 並蓋上 Adhesive Foil 置放於 Shaker (600rpm)上，室溫下避光 20-30 分鐘。接著每格再加入 100 μ l Stop Solution 即可以 Microplate Reader 進行終點分析測讀，設定波長 450nm。

8. 測量心衰指數 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit

For N-Terminal Pro Brain Natriuretic Peptide (NT-ProBNP))

實驗動物犧牲後，取血液並離心 3000rpm，15 分鐘，收集上清液得血清待用。取 100 μ l Standard 及樣品加到 Pre-coated 96 well plate 並

靜置於 37°C 烘箱中 2 小時。去除每格溶液後，每格加入 100µl Detection Reagent A 並靜置於 37°C 烘箱中 1 小時，接著以 Wash Buffer wash 3 次，再加入 100µl Detection Reagent B 並靜置於 37°C 烘箱中 30 分鐘，再以 Wash Buffer wash 5 次。接著每格加入 90µl Substrate Solution 並靜置於 37°C 烘箱中 15-25 分鐘，接著每格再加入 50µl Stop Solution 即可以 Microplate Reader 進行終點分析測讀，設定波長 450nm。

9. 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM)

實驗動物犧牲後，取心臟組織的心尖及心基底部的部位，並將兩部位皆切成 3-5 個約 3 x 3 x 3 mm 的組織塊。將組織浸泡在 Karnovsky 固定液 (4% PA + 5% Glutaraldehyde) 中 1.5-2 小時，用 0.1M Cacodylate Buffer 置換 3 次、每次 10 分鐘，接著浸泡於 1% 四氧化銻 (Osmium Tetraoxide, O_5O_4) 30 分鐘，再以 0.1M Cacodylate Buffer 置換 3 次、每次 10 分鐘，接著依序置換 50% Ethanol、75% Ethanol、95% Ethanol 各 15 分鐘，接著浸泡於 100% Ethanol 中 15 分鐘 3 次。之後依序置換成 100% Ethanol 與 PO (1,2-Propylene Oxide) 比例 3 : 1、1 : 1、1 : 3 各 15 分鐘及 100% PO 10 分鐘 3 次，接著再依序置換 PO 與環氧樹脂 (Epon 812) 比例 3 : 1、1 : 1 及 1 : 3，分別為 1 小時、4 小時及 8 小時，最後浸泡於 100% Epon 中 12 小時。接著將組織撈起置入 capsule

中進行 100% Epon 包埋，再將 capsule 置入 40°C 烘箱中 18 小時及 60°C 烘箱中 24 小時，待冷卻後將 capsule 切開取出樹脂塊即可切片。組織先切成大梯形以超薄切片機 (Ultracut) 切成 0.3 μ m 厚度的切片，將厚切片撈至含有水的玻片上烘乾，以 1% Toluidine Blue 染色待乾後，以清水沖洗染劑再烘乾，接著以光學顯微鏡確認所要觀察的部位後，將組織切成更小的梯形，再薄切成 80nm 的薄度後，以銅網 (亮面) 撈取薄片，並將銅網放入銅網盒待乾。銅網乾後使用 Uranyl Acetate 滴在銅網 (亮面朝上) 上，避光靜置 30 分鐘，以二次水清洗後待乾，再以 Lead Citrate 滴在 Parafilm 上，並蓋上銅網 (亮面朝下，使銅網浮於液珠上) 7 分鐘，即完成重金屬染色步驟。銅網風乾後，即可使用穿透式電子顯微鏡 (HITACHI HT7700) 觀察心臟組織中粒線體的形態及結構。

10. 蛋白質萃取 (Protein extraction)

實驗動物犧牲後，取心臟組織的心尖及心基底部的部位。加入 lysis buffer (tissue protein extraction reagent, protease inhibitor, Na₃VO₄ 200mM, NaF 500mM, DTT 100mM, pH7.6) 於含組織的 eppendorf 中。以均質棒將組織磨碎，再於 4°C 中離心 12000rpm，20 分鐘。收集上清液，進行蛋白質定量。

11. 蛋白質定量 (Determination of protein concentration)

使用 Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo™) 來進行蛋白質定量。在鹼性條件下，利用蛋白質對二價銅離子 (Cu^{2+}) 進行還原，所生成的一價銅離子 (Cu^+) 可與 BCA (bicinchoninic acid) 試劑專一性的結合，依溶液中濃度大小呈現的不同顏色深淺所反應出不同的蛋白質濃度，以 Microplate Reader (波長設定在 595nm) 讀取吸光值，依據標準品所繪之標準曲線而估算出樣本之蛋白質濃度，標準品製備是以胎牛血清蛋白 (Bovine/serum Albumin, BSA) 調配成各種不同濃度 (Blank、31.25、62.5、125、250、500mg/ml) 的標準液。取 10 μl 的檢體及標準品加入 96-well ELISA plate，再調配 BCA reagent kit 中的 Reagent A (bicinchoninic acid, BCA) 和 Reagent B (CuSO_4) 以 50：1 比例均勻混合後，取 200 μl 加入含 10 μl 檢體及標準品之 96-well ELISA plate，再放置於 37°C 烘箱搖晃 30 分鐘，再以 Microplate Reader 進行終點分析測讀，設定波長 562nm，稍後 Microplate Reader 將自動依標準品所繪之濃度對應吸光值之標準曲線而估算出檢體之蛋白質濃度。

12. 西方墨點法 (Western blotting assay)

依據蛋白質定量結果調配蛋白質檢體，與 4 倍之 SDS-PAGE sample buffer 混合後，放置於 95°C 的熱水中 5 分鐘，使蛋白質完全變性令其

結構展開，之後將蛋白質檢體注入 10%或 12%的聚丙烯酰胺電泳膠片，以固定電壓 (80-150V) 進行電泳，蛋白質分離完畢後，接著進行轉印。將已經以 Transfer Buffer 浸潤的海綿鋪於轉印槽上，鋪上兩張已用 Transfer Buffer 沾濕的濾紙，再鋪上已用甲浸潤的 PVDF 轉印膜，小心將膠片於水中取下並放置 PVDF 轉印膜上。除去膠與膜之間的氣泡後，再鋪上兩張沾濕的濾紙後，再鋪上一層海綿。架好裝置後以 200mA 轉印 1 小時。轉印完畢後，將轉印膜晾乾。以 5%脫脂奶粉 (溶於 0.1% Tween20 的 TBS, TBST) 於室溫下進行 Blocking 約 1 小時，接著以 TBST 清洗 3 次 10 分鐘，再加入初級抗體於 4°C 隔夜反應。隔日，回收初級抗體後，以 TBST 清洗 3 次 10 分鐘，以 IgG-HRP 次級抗體在室溫下作用 1 小時。最後以 TBST 清洗 3 次 10 分鐘，在膜上加入 ECL 試劑。ECL 試劑會與 HRP 反應發出冷光，可用 X 光片感光顯影。

13. 數據分析 (Statistics)

本實驗採用 ImageJ 軟體來測量粒線體面積及心臟組織尖端角度，並觀察各組間是否有統計上的差異。統計方式採用 ANOVA 分析組間差異，並以 student's t-test 進行顯著差異分析，設定 $p < 0.05$ 表示在統計上有顯著意義，且每個實驗至少重覆三次以上獨立實驗，最後實驗結果以平均值加減標準誤表示 (mean±S.E.M.)。

研究結果

1. 大鼠模擬臨床手術造成受損的心臟之外觀觀察及測量

根據過去文獻指出當身體在接受極大的疼痛時，會造成心臟受損而有形態上的變化。本實驗室以 SD 品系雄性大白鼠，週齡 6-8 週，體重控制在 250-300g，作為模擬臨床手術之動物模型來觀察手術時的疼痛對心臟外觀的形態是否造成改變，並觀察是否手術前給予脊椎麻醉能阻斷疼痛的傳遞訊息進而降低心臟的受損。由結果我們可以發現 surgery 組 (埋管+左肋開胸) 的心臟尖端處明顯相較於 control 組來得肥大，而 marcaine 組 (埋管+脊椎麻醉藥+左肋開胸) 則降低此現象的發生 (如圖一 A)；此外，我們也統計心臟尖端之角度，發現 sham (僅埋管)、surgery 及 marcaine 組相較於 control 組皆較肥大，而 marcaine 組再相較於 surgery 組有減緩肥大的現象 (如圖一 B)。接著，我們從心臟組織的外觀上看見心臟尖端處有肥大現象，所以我們利用石蠟包埋切片染 H&E stain 觀察細胞核的形態，結果發現在 surgery 組中有許多細胞核皺縮的現象，而 marcaine 組的細胞核皺縮現象有減少 (如圖一 C)。

2. 以穿透式電子顯微鏡觀察各組心臟組織中之粒線體形態

心臟有跳動才能維持生命的存在。粒線體 (mitochondria) 是普遍存在細胞中的胞器，負責消耗氧氣並將自食物取得的物質轉換為能量，而粒線體所產生的能量以 ATP (adenosine triphosphate) 的方式呈現，被傳送到細胞質以提供細胞百分之九十的能量來源。心臟的跳動需要許多能量來維持，故在心臟中遍佈許多的粒線體以提供心臟維持跳動的能量。我們經由穿透式電子顯微鏡發現在 surgery 組的心臟組織中有泡泡出現 (如圖二 A 之左圖箭頭處)，且其粒線體面積與 control 組相較之下似乎略微大些 (如圖二 A)；我們進一步統計粒線體的面積後，發現 surgery 組相較於 control 組有顯著較大，而 marcaine 組相較於 surgery 組則明顯較小 (如圖二 B)。

3. 測量血清中交感神經活性之指標

我們已知外來疼痛的刺激會促使交感神經活化時，會分泌出腎上腺素與正腎上腺素，進而使心跳速率增加、血壓升高及呼吸急促等，故將腎上腺素與正腎上腺素作為交感神經活化之指標。由結果顯示出腎上腺素 (epinephrine) 的分泌量在 sham 及 surgery 組相較於 control 組皆顯著增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的分泌量則有顯著降低 (如圖三 A)。而正腎上腺素 (norepinephrine) 的分泌量在 sham 與

surgery 組相較於 control 組皆顯著增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的分泌量則有顯著降低 (如圖三 B)。

4. 測量心臟衰竭指數

正常個體的心臟血管系統會製造出兩種心房分泌的 peptides：ANP、BNP，而當出現心臟衰竭的現象時，心房會擴大，進而誘發 ANP 及高濃度 NT-proBNP 的分泌，故 NT-proBNP 在臨床上是偵測心臟功能非常優良的指標。根據我們的研究，手術產生身體劇烈的疼痛時，交感神經被活化而釋出大量腎上腺素與正腎上腺素進而造成心跳速率過快的現象，使心臟容易引發衰竭的現象，進而造成 NT-proBNP 的分泌量增加。由結果比較各組血液中 NT-proBNP 的數值，得知 sham、surgery 組血液中的含量明顯增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組則顯著減少 (如圖四)。

5. 心臟組織中的腎上腺素接受體 β_1 -AR、 β_2 -AR 蛋白質之表現量情形

在面臨不同的壓力刺激時，會使兒茶酚胺釋出到血液當中且同時活化 β -adrenergic receptor，並刺激心臟的功能。過去文獻指出 β -adrenergic receptor 在調節心臟功能方面所扮演很重要的角色，若改變 β -adrenergic receptor 的訊息傳遞路徑會導致各種不同的心臟失能，

例如心肌梗塞、高血壓性心臟衰竭以及心臟肥大等；此外，在心臟衰竭的過程中， β -adrenergic receptor 的訊息傳遞途徑也會產生改變。本論文結果以 IHC 染 β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AR)、 β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) 發現在 surgery 及 marcaine 組相較於 control 組皆表現量增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的表現量則有降低 (如圖五 A、B)。而利用 western blot 觀察各組間 β_2 -AR 蛋白質的表現量，發現 surgery 組相較於 control 組皆顯著增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的表現量則有顯著降低，從統計上也得到相同結果 (如圖五 C、D)。

6. 以西方墨點法分析與內質網壓力、自噬作用相關之蛋白質表現量

根據過去文獻的證實，我們已知氧化壓力在心臟衰竭中具有很大的影響，會促使心肌的結構改變導致心臟逐漸走向衰竭。而氧化壓力會誘發內質網壓力產生；內質網壓力則會導致自噬作用過度活化細胞凋亡；自噬作用則會使心肌細胞死亡逐漸造成心臟的衰竭。我們經由 western blot 的結果發現內質網壓力信號調節因子 GRP78 蛋白及自噬作用之指標 LC3 蛋白之表現量相較於 control 組皆在 surgery 組中增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的表現量則有降低 (如圖六)。

7. 以西方墨點法分析與細胞凋亡相關之蛋白質表現量

在生物個體發育與維持成體恆定的過程中，細胞凋亡又稱為細胞程式死亡，與細胞分裂同樣扮演著重要的角色。而細胞凋亡的調控機制主要兩條途徑之一為粒線體路徑 (mitochondrial pathway) 又稱為內在路徑 (intrinsic pathway)，當細胞老化、DNA 受損、化學或物理刺激時，粒線體膜會發生變化而引起細胞凋亡。由圖二結果我們已知心臟組織中之粒線體形態上有受到影響而發生變化，所以我們進一步利用 western blot 觀察細胞凋亡相關蛋白 Bax 與 p53 蛋白質之表現量情形，結果顯示 Bax 與 p53 蛋白質相較於 control 組皆在 surgery 組中增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的表現量則有降低 (如圖七)。

討論

根據行政院衛生署的統計當中顯示，心臟疾病排名十大死因中的第二位，由此可知心臟疾病為僅次於癌症的高死亡率疾病，是國人不得不重視的問題。其中心臟衰竭為多個心血管疾病導致的結果，影響的層面甚廣，包括神經系統、神經賀爾蒙、肌肉結構、發炎反應、心臟本身的功能、血管功能及血管的反射接受器等 (Crimi et al., 2009)。許多外來的刺激都可能造成心肌細胞的損傷，甚至死亡，然而手術時對人體所造成的刺激似乎是外來壓力的主要來源。

當身體有壓力產生的時候，大腦是主要被影響到的器官，而心血管的功能會受到大腦和心臟之間交互作用的影響，短期的壓力可以促使不同的器官產生功能上的適應，例如心臟，使其改善心血管的功能，但長期的壓力反而會對體內的衡定造成傷害，文獻指出壓力會使心血管功能不正常，例如發展成缺血性心臟病、心肌梗塞、心臟衰竭、心律不整甚至是猝死等 (Davis and Natelson, 1993; McEwen, 2007)。本研究發現以模擬臨床手術之動物模型來觀察手術時的疼痛對心臟外觀的形態 (如圖一)，sham、surgery及marcaine組的心臟尖端處變得肥大，且有細胞核皺縮的現象。在心臟外觀及初步觀察細胞核形態上皆有顯著差異，故我們初步確定了動物模式得建立是成立的。

心臟的跳動需要許多能量來維持，故在心臟中遍佈許多的粒線體以提供心臟百分之九十的能量來維持跳動。而先前文獻指出心肌細胞中的氧化壓力上升時，會造成粒線體的形態改變及功能受到損傷，進而引發細胞自噬作用而造成心肌細胞死亡 (Tsutsui et al., 2011b)。

外界壓力、缺氧、過度擁擠、高溫、細胞飢餓、細菌或病毒感染皆會導致自噬作用活化 (Dorn et al., 2002; Kirkegaard et al., 2004)。，在研究中以穿透式電子顯微鏡發現到，在surgery組的心臟組織中有許多泡泡的結構出現 (如圖二A之左圖箭頭處)，且進一步統計粒線體的面積後，發現surgery組相較於control組有顯著較大，而marcaine組相較於surgery組則明顯較小 (如圖二B)。根據先前文獻證實，我們推測泡泡或許是經由內質網壓力所引發的自噬作用過程中所產生的自噬小體 (autophagosome)。

在不同的壓力刺激下，交感腎上腺髓質系統 (sympathetic – adrenal medullary system) 和下視丘-腦垂腺-腎上腺軸 (hypothalamic-pituitary–adrenal, HPA) 會被活化，當下視丘感應到壓力的時候，會使交感腎上腺分泌出來，這是屬於中樞神經系統刺激交感神經所誘發出來的結果，此刺激路徑會使腎上腺髓質和交感神經末端釋出大量的腎上腺素 (epinephrine) 和正腎上腺素 (norepinephrine) 至血液循環當中進而導致心肌細胞的損傷 (Dhalla and Temsah, 2001)。而在本論文

中，發現血清中的腎上腺素與正腎上腺素的分泌量皆在sham、surgery及marcaine組相較於control組皆顯著增加，而marcaine組相較於surgery組的分泌量則有顯著降低 (如圖三)。

正常個體的心臟血管系統會製造出兩種心房分泌的peptides：ANP、BNP，而當出現心臟衰竭的現象時，心房會擴大，進而誘發ANP及高濃度NT-proBNP 的分泌，故NT-proBNP在臨床上是偵測心臟功能非常優良的指標 (Tsutsui et al., 2011a)。本論文中比較各組血液中NT-proBNP的數值，得知sham、surgery組血液中的含量明顯增加，而marcaine組相較於surgery組則顯著減少 (如圖四)。

在面臨不同的壓力刺激時，會使兒茶酚胺釋出到血液當中且同時活化 β -adrenergic receptor，並刺激心臟的功能 (Xu et al., 2008)。 β -adrenergic receptor在調節心臟功能方面所扮演很重要的角色，若改變 β -adrenergic receptor的訊息傳遞路徑會導致各種不同的心臟失能，例如心肌梗塞、高血壓性心臟衰竭以及心臟肥大等 (Morisco et al., 2008)。本論文結果以IHC及western blot觀察 β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AR)、 β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR)之表現量發現surgery組相較於control組皆顯著增加，而marcaine組相較於surgery組的表現量則有顯著降低，從統計上也得到相同結果 (如圖五)。

由先前文獻中我們已知氧化壓力會誘發內質網壓力產生；內質網壓力則會導致自噬作用過度活化細胞凋亡；自噬作用則會使心肌細胞死亡逐漸造成心臟的衰竭 (Azfer et al., 2006; Takemura et al., 2006; Yorimitsu and Klionsky, 2007)。而本研究經由western blot得知在衰竭的心臟中，內質網壓力、自噬作用及細胞凋亡之指標蛋白皆在surgery組中增加，而marcaine組相較於surgery組的表現量則有降低 (如圖六、七)。由此我們證實了在心臟衰竭中，氧化壓力、內質網壓力、自噬作用及細胞凋亡無論間接或直接皆參與其中的影響機制。

綜合以上結論，在本論文研究中發現手術時產生的疼痛刺激確實對心臟造成外觀形態及粒線體的受損，且無論是直接或間接，皆透過內質網壓力、自噬作用及細胞凋亡來引起心臟的受損。此外，手術時產生的疼痛刺激也確實會促使交感神經的活化，而大量釋出腎上腺素與正腎上腺素。而先前許多文獻指出當腎上腺素與正腎上腺素大量被分泌時，會促使心跳速率增加、血壓升高及呼吸急促等，對於本身具有潛在性心血管疾病或是年紀較大的患者，大大地增加罹患術中或術後的心血管疾病相關併發症的風險。然而，若在手術前多給予脊椎麻醉藥來抑制疼痛刺激與交感神經之間的訊息傳遞途徑，在內質網壓力、自噬作用及細胞凋亡中皆有表現量減少的現象，而腎上腺素與正腎上腺素的分泌量也顯著降低，更重要的是心臟受損的情形也大幅減緩，

由此可提供未來有效降低具有潛在性心血管疾病或是年紀較大的患者在術中或術後產生心血管疾病相關併發症的風險。

參考文獻

Amin, P., Singh, M., and Singh, K. (2011). beta-Adrenergic Receptor-Stimulated Cardiac Myocyte Apoptosis: Role of beta1 Integrins. *Journal of signal transduction* 2011, 179057.

Atkinson, C.J., Ramaswamy, K., and Stoneham, M.D. (2013). Regional anesthesia for vascular surgery. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia* 17, 92-104.

Azfer, A., Niu, J., Rogers, L.M., Adamski, F.M., and Kolattukudy, P.E. (2006). Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291, H1411-1420.

Beattie, W.S., Buckley, D.N., and Forrest, J.B. (1993). Epidural morphine reduces the risk of postoperative myocardial ischaemia in patients with cardiac risk factors. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie* 40, 532-541.

Bergamini, C., Cicoira, M., Rossi, A., and Vassanelli, C. (2009). Oxidative stress and hyperuricaemia: pathophysiology, clinical relevance, and therapeutic implications in chronic heart failure. *European journal of*

heart failure *11*, 444-452.

Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., and Gori, Z. (2003). The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* *57*, 203-208.

Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular and molecular medicine* *7*, 249-257.

Chen, Y., Azad, M.B., and Gibson, S.B. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation* *16*, 1040-1052.

Crimi, E., Ignarro, L.J., Cacciatore, F., and Napoli, C. (2009). Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nature reviews Cardiology* *6*, 292-300.

Davis, A.M., and Natelson, B.H. (1993). Brain-heart interactions. The neurocardiology of arrhythmia and sudden cardiac death. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* *20*, 158-169.

Deretic, V. (2010). Autophagy of intracellular microbes and mitochondria:

two sides of the same coin? *F1000 biology reports* 2.

Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology* 10, 369-377.

Dhalla, N.S., and Temsah, R.M. (2001). Sarcoplasmic reticulum and cardiac oxidative stress: an emerging target for heart disease. *Expert opinion on therapeutic targets* 5, 205-217.

Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr., and Progulske-Fox, A. (2002). Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cellular microbiology* 4, 1-10.

Dwivedi, M., and Ahnn, J. (2009). Autophagy--is it a preferred route for lifespan extension? *BMB reports* 42, 62-71.

Egger, L., Madden, D.T., Rheme, C., Rao, R.V., and Bredesen, D.E. (2007). Endoplasmic reticulum stress-induced cell death mediated by the proteasome. *Cell death and differentiation* 14, 1172-1180.

Elmore, S.P., Qian, T., Grissom, S.F., and Lemasters, J.J. (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2286-2287.

Fortun, J., Dunn, W.A., Jr., Joy, S., Li, J., and Notterpek, L. (2003). Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23, 10672-10680.

Freise, H., and Van Aken, H.K. (2011). Risks and benefits of thoracic epidural anaesthesia. *British journal of anaesthesia* 107, 859-868.

Hengartner, M.O., and Bryant, J.A. (2000). Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? *Symposia of the Society for Experimental Biology* 52, 1-12.

Hoar, P.F., Hickey, R.F., and Ulliyot, D.J. (1976). Systemic hypertension following myocardial revascularization. A method of treatment using epidural anesthesia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 71, 859-864.

Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A., and Kopito, R.R. (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *The Journal of biological chemistry* 280, 40282-40292.

Jeong, S.Y., and Seol, D.W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports* 41, 11-22.

Kamimoto, T., Shoji, S., Hidvegi, T., Mizushima, N., Umebayashi, K., Perlmutter, D.H., and Yoshimori, T. (2006). Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of

autophagic activity. *The Journal of biological chemistry* 281, 4467-4476.

Kirkegaard, K., Taylor, M.P., and Jackson, W.T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature reviews Microbiology* 2, 301-314.

Kirno, K., Friberg, P., Grzegorzczak, A., Milocco, I., Ricksten, S.E., and Lundin, S. (1994). Thoracic epidural anesthesia during coronary artery bypass surgery: effects on cardiac sympathetic activity, myocardial blood flow and metabolism, and central hemodynamics. *Anesthesia and analgesia* 79, 1075-1081.

Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., *et al.* (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151-175.

Lai, H.C., Liu, T.J., Ting, C.T., Sharma, P.M., and Wang, P.H. (2003). Insulin-like growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle mitochondria via activation of PI 3 kinase/Akt pathway. *Molecular and cellular endocrinology* 205, 99-106.

Lee, A.S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35, 373-381.

Lee, S.J., Cho, K.S., and Koh, J.Y. (2009). Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* 57, 1351-1361.

Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell* 6, 463-477.

Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D.R., and Lee, A.S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell death and differentiation* 15, 1460-1471.

Liem, T.H., Booij, L.H., Hasenbos, M.A., and Gielen, M.J. (1992). Coronary artery bypass grafting using two different anesthetic techniques: Part I: Hemodynamic results. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 6, 148-155.

Longo, V.D., and Finch, C.E. (2003). Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 299, 1342-1346.

MacFarlane, M., and Williams, A.C. (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports* 5, 674-678.

Massey, A., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The international journal of*

biochemistry & cell biology 36, 2420-2434.

McEwen, B.S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews* 87, 873-904.

Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387-1391.

Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 2491-2502.

Moore, C.M., Cross, M.H., Desborough, J.P., Burrin, J.M., Macdonald, I.A., and Hall, G.M. (1995). Hormonal effects of thoracic extradural analgesia for cardiac surgery. *British journal of anaesthesia* 75, 387-393.

Morisco, C., Marrone, C., Galeotti, J., Shao, D., Vatner, D.E., Vatner, S.F., and Sadoshima, J. (2008). Endocytosis machinery is required for beta1-adrenergic receptor-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes. *Cardiovascular research* 78, 36-44.

Park, W.Y., Thompson, J.S., and Lee, K.K. (2001). Effect of epidural anesthesia and analgesia on perioperative outcome: a randomized, controlled Veterans Affairs cooperative study. *Annals of surgery* 234, 560-569; discussion 569-571.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic cell* 1, 11-21.

Rydstrom, J. (2006). Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1757, 721-726.

Schricker, T., Meterissian, S., Wykes, L., Eberhart, L., Lattermann, R., and Carli, F. (2004). Postoperative protein sparing with epidural analgesia and hypocaloric dextrose. *Annals of surgery* 240, 916-921.

Stenseth, R., Bjella, L., Berg, E.M., Christensen, O., Levang, O.W., and Gisvold, S.E. (1994). Thoracic epidural analgesia in aortocoronary bypass surgery. I: Haemodynamic effects. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 38, 826-833.

Takemura, G., Miyata, S., Kawase, Y., Okada, H., Maruyama, R., and Fujiwara, H. (2006). Autophagic degeneration and death of cardiomyocytes in heart failure. *Autophagy* 2, 212-214.

Toth, A., Nickson, P., Mandl, A., Bannister, M.L., Toth, K., and Erhardt, P. (2007). Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 7, 205-218.

Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of

autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 333, 169-174.

Tsutsui, H., Kinugawa, S., and Matsushima, S. (2011a). Oxidative stress and heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301, H2181-2190.

Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S., and Yokota, T. (2011b). Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 48, 68-71.

Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 414-420.

Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., and Muller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426, 620.

William, J.M., Stoddart, P.A., Williams, S.A., and Wolf, A.R. (2001). Post-operative recovery after inguinal herniotomy in ex-premature infants: comparison between sevoflurane and spinal anaesthesia. *British journal of anaesthesia* 86, 366-371.

Xu, Y.J., Arneja, A.S., Tappia, P.S., and Dhalla, N.S. (2008). The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Experimental and*

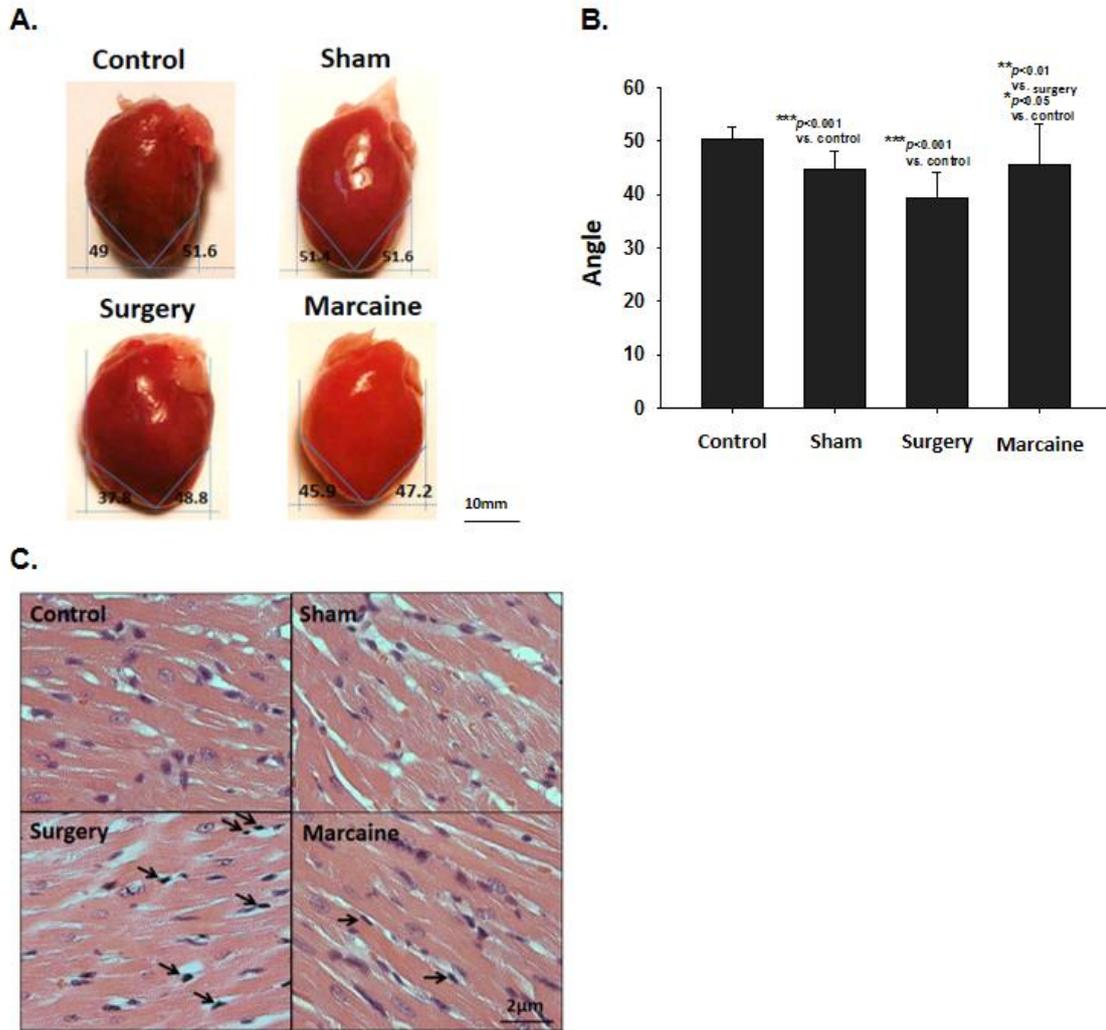
clinical cardiology 13, 57-65.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy* 3, 160-162.

圖次

圖一、大鼠模擬臨床手術造成受損的心臟之外觀觀察及測量 …	46
圖二、粒線體之形態及面積	47
圖三、交感神經活性之指標	48
圖四、心臟衰竭指數	49
圖五、觀察心臟組織中，腎上腺素接受體 β -AR 蛋白的表現量情形	50
圖六、以 western blot 觀察內質網信號調節因子 GRP78 及自噬作用指標 LC3 蛋白質之表現量	51
圖七、以 western blot 觀察與細胞凋亡相關蛋白之 Bax 及 p53 蛋白質之表現量	52

圖

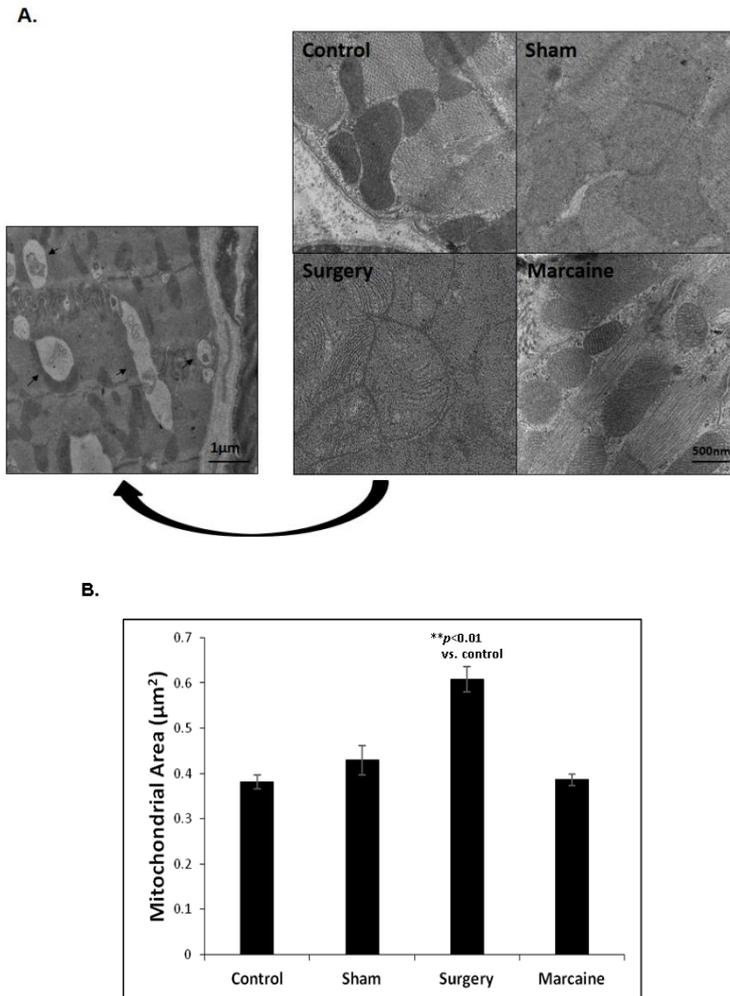


圖一、大鼠模擬臨床手術造成受損的心臟之外觀觀察及測量

A. 比較四個組別之心臟尖端角度。(Scale bar = 10mm)

B. 統計心臟尖端之角度。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $N = 7$)

C. 以石蠟切片染 H&E stain 觀察各組細胞核形態。(Scale bar = 2 μ m)



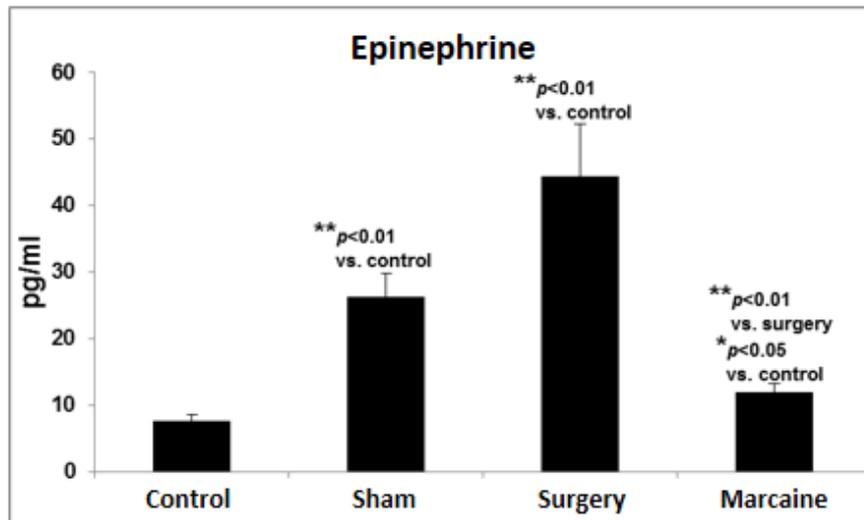
圖二、粒線體之形態及面積

A. 以穿透式電子顯微鏡觀察各組心臟組織中之粒線體形態。(Scale bar = 500nm and 1µm)

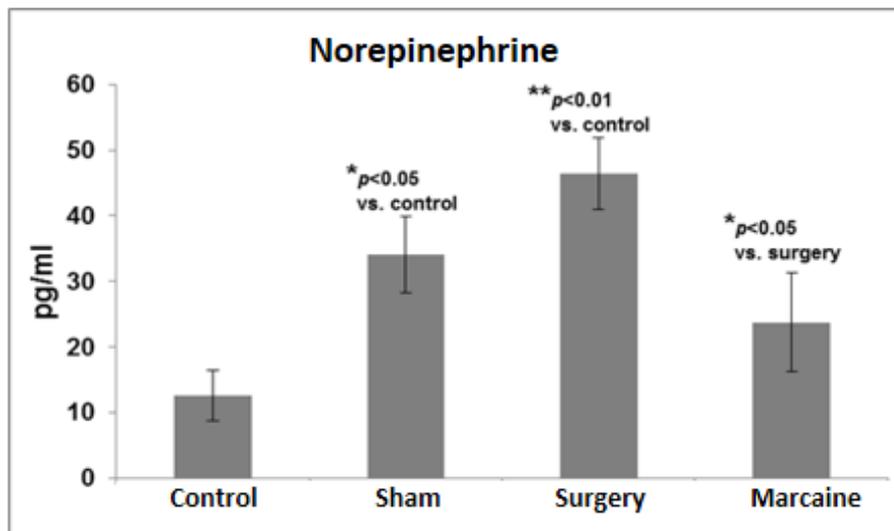
B. 統計心臟組織中之粒線體面積。(N = 6)

N = 6 意指各組有 6 隻大鼠，每一隻皆取心臟組織心尖部來包埋、切片，並以穿透式電子顯微鏡拍照。統計上，分析各組每隻大鼠的粒線體照片至少 5 張得到一個平均值，再以各組 6 隻大鼠的 6 個平均值做統計。

A.



B.

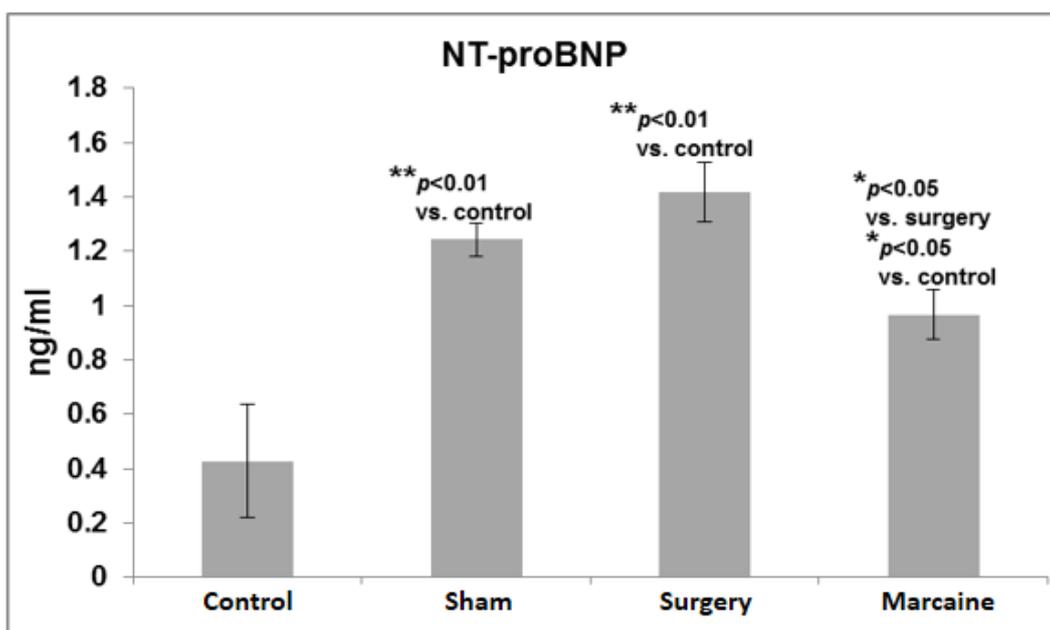


圖三、交感神經活性之指標

A. 比較四個組別之血清中腎上腺素含量。(N = 3)

B. 比較四個組別之血清中正腎上腺素含量。(N = 3)

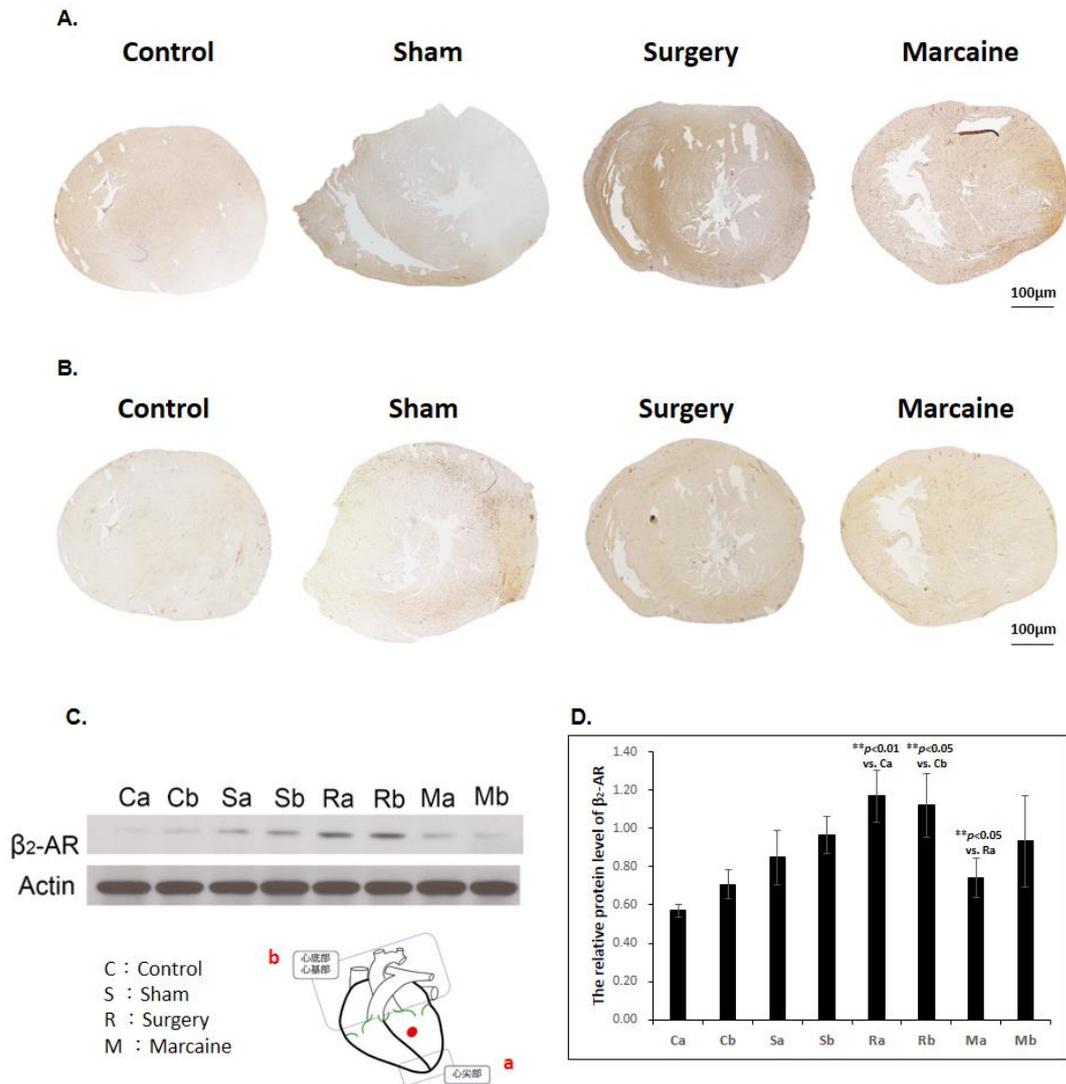
可發現 sham 與 surgery 組相較於 control 組皆顯著增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的分泌量則有顯著降低。



圖四、心臟衰竭指數

比較四個組別之血清中心臟衰竭指數。(N = 3)

可看見血液中 NT-proBNP 的數值，得知 sham、surgery 組血液中的含量明顯增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組則顯著減少。

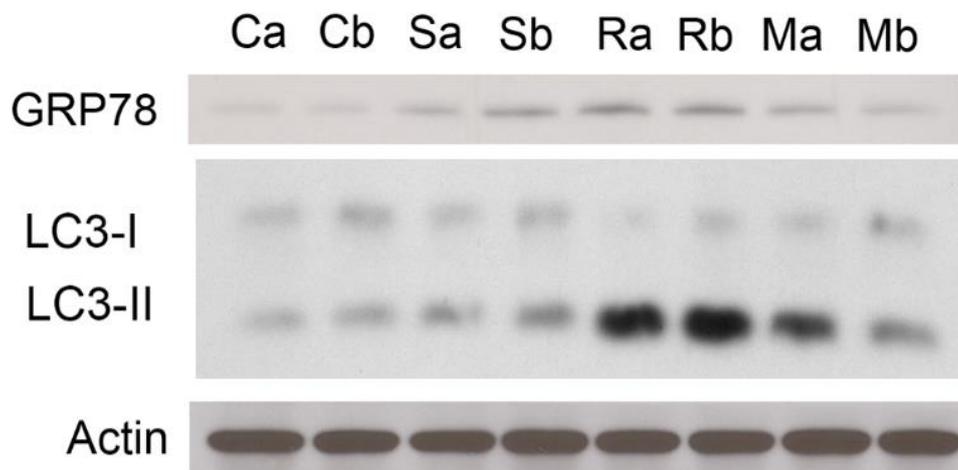


圖五、觀察心臟組織中，腎上腺素接受體 β -AR 蛋白質的表現量情形

A.B. 以石蠟切片染 IHC，觀察各組中 β_1 -AR (A)、 β_2 -AR (B) 蛋白質的表現量情形。(scale bar = 100 μ m)

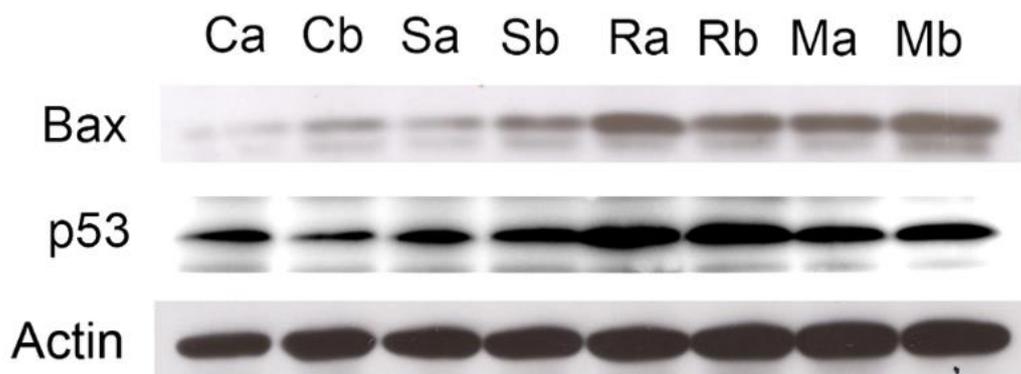
C. 以 western blot 觀察各組間 β_2 -AR 蛋白質的表現量。(C = Control, S = Sham, R = Surgery, M = Marcaine, a = 心尖部, b = 心基底部)

D. 統計並比較各組中 β_2 -AR 蛋白質的表現量。(N = 5)



圖六、以 western blot 觀察內質網信號調節因子 GRP78 及自噬作用指標 LC3 蛋白質之表現量情形。

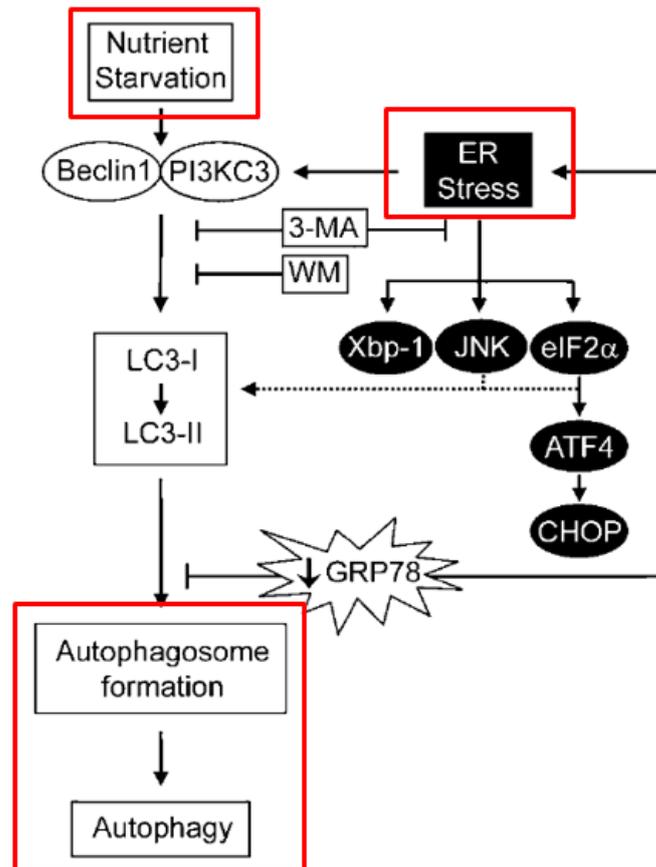
可發現 GRP78 及 LC3 蛋白質表現量相較於 control 組在 surgery 組中增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的表現量則有降低。(C = Control, S = Sham, R = Surgery, M = Marcaine, a = 心尖部, b = 心基部)



圖七、以 western blot 觀察與細胞凋亡相關蛋白之 Bax 及 p53 蛋白質之表現量情形。

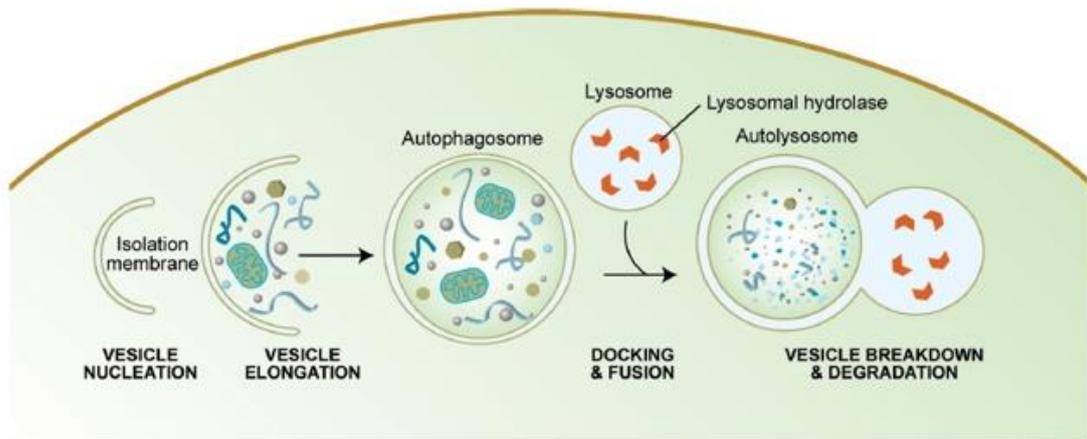
可發現 Bax 及 p53 蛋白質表現量相較於 control 組在 surgery 組中增加，而 marcaine 組相較於 surgery 組的表現量則有降低。(C = Control, S = Sham, R = Surgery, M = Marcaine, a = 心尖部, b = 心基部)

附錄



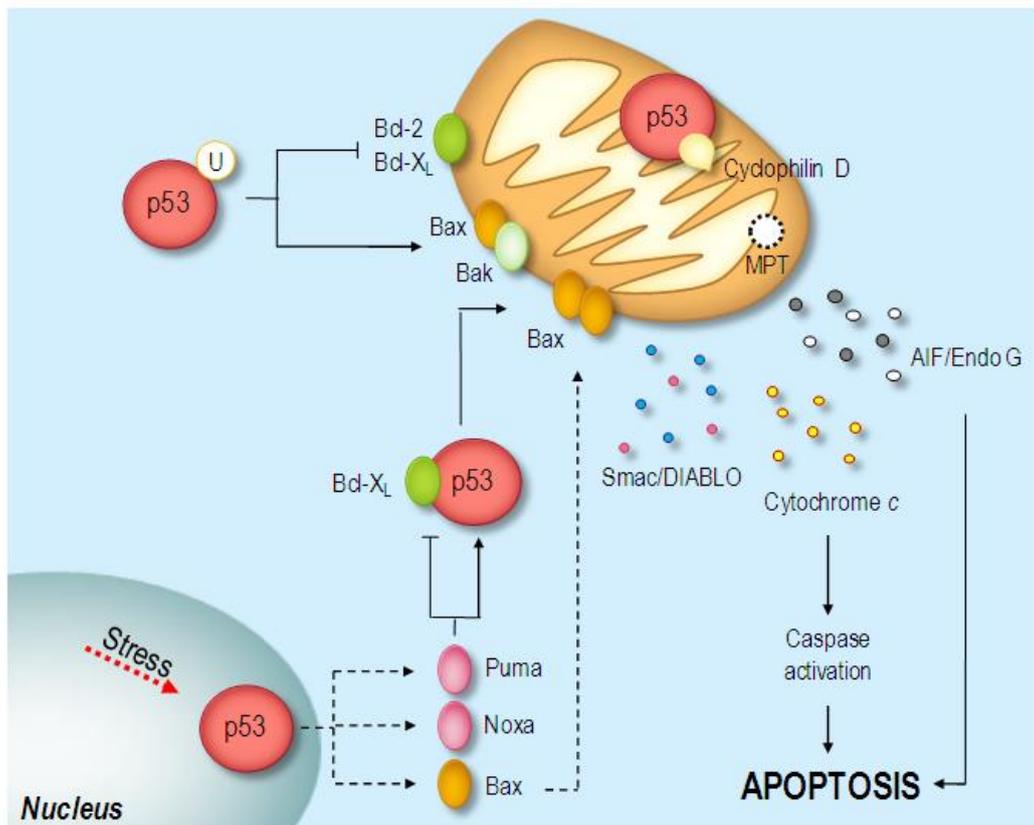
(Li et al., 2008)

附錄一、內質網壓力(ER stress) 與 自噬作用(Autophagy)



(Melendez and Levine, 2009)

附錄二、自噬作用 (Autophagy)



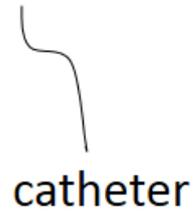
(Vaseva and Moll, 2009)

附錄三、細胞凋亡 (Apoptosis)

a. Control



b. Sham



catheter

c. Surgery



catheter

+ operation

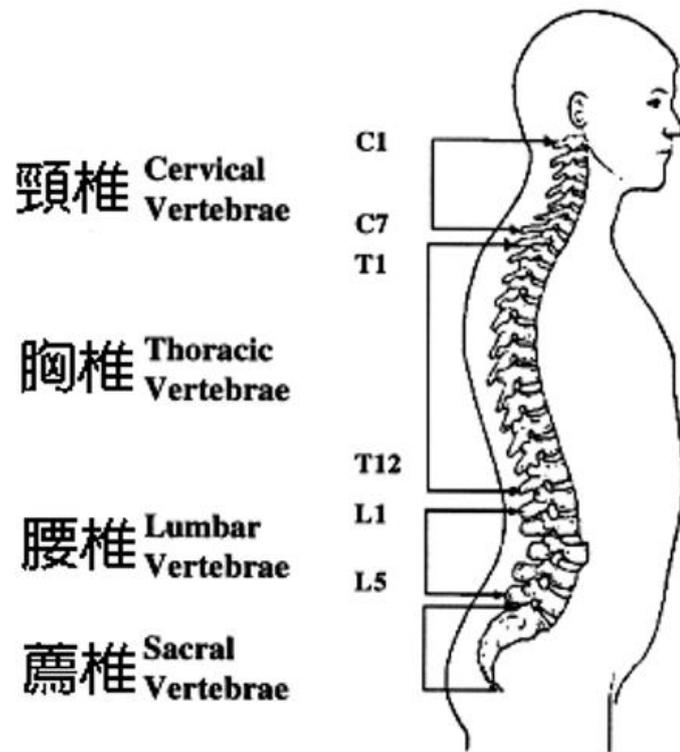
d. Marcaine



catheter

+ Marcaine
+ operation

附錄四、實驗組別



From : web.it.nctu.edu.tw

附錄五、人體脊椎類別

1. 腰椎L4和L5之間開洞



5. 縫合



2. 找出兩個骨節，並清除周圍肌肉



↓ 一週後

6. 施打約50ul的脊椎麻醉藥Marcaine



3. 以針線固定導管並將其埋入脊髓腔



7. 模擬手術在左肋開洞



4. 施打約50ul的脊椎麻醉藥Marcaine



8. 縫合後，待3小時後犧牲



*步驟1, 2, 3, 4, 5之埋管僅Sham、Surgery、Marcaine組操作。

*步驟6僅Marcaine組操作。

*步驟7, 8僅Surgery、Marcaine組操作。

附錄六、實驗動物埋管及模擬手術

個人資料

中文姓名：蔡靖涵

英文姓名：Ching-Han Tsai

戶籍地：新北市

出生日期：1991 年 01 月 30 日

電子郵件：zan156156@yahoo.com.tw

學歷

2006 – 2009 私立南山高級中學

2009 – 2013 私立南華大學自然生物科技學系

2013 – 2015 私立東海大學生命科學所生物醫學組

經歷

私立東海大學生命科學系遺傳學助教

私立東海大學生命科學系普通生物學助教

私立東海大學生命科學系組織學亮點計畫課程助教