

烧伤早期脏器损害防治的研究进展

黄跃生

临床和实验研究证明,烧伤早期脏器损害仍是当前严重大面积烧伤死亡的主要原因,也是烧伤防治研究的重大课题。近年来,国内外从细胞和分子水平对此进行了深入广泛的研究,取得了一些重要进展,但仍有许多问题尚待研究解决。本文就此作一回顾与展望。

一、烧伤早期脏器损害机制的研究

1. 缺血缺氧是导致严重烧伤早期脏器损害的核心:严重烧伤后,由于血管通透性增加,大量血管内液外渗,导致有效循环血量减少,全身组织器官发生缺血缺氧;严重烧伤应激反应时大量血管收缩物质释放,为保障心、脑等重要生命器官的血供,体内血流发生再分配,使肠道、肾脏等外周组织器官处于缺血缺氧状态;缺血缺氧和炎症时,血管内皮细胞受损,粒细胞-内皮细胞粘附增强,内皮细胞肿胀,均使微血管管腔变窄,血流受阻,加重组织细胞的缺血缺氧。因此,缺血缺氧是严重烧伤后多种因素造成组织细胞损害交汇点。

缺血缺氧导致组织细胞损害的途径较多,能量是细胞维持正常结构与功能及生命活动的基础。线粒体是细胞缺血缺氧损害的核心靶细胞器,其损害是全身性缺血缺氧损害最关键的环节。烧伤后,心肌细胞线粒体细胞色素 C(cytC)氧化酶的活性显著降低, F_0F_1 -ATP 酶合成活性在烧伤后初期显著升高,3 h 后则显著降低;而 F_0F_1 -ATP 酶水解活性在烧

伤后初期显著降低,3 h 后则显著升高。心肌线粒体呼吸控制率(RCR)初期显著升高,3 h 后显著降低。线粒体 III 态呼吸(ST3)的变化与 RCR 基本一致,IV 态呼吸(ST4)仅于伤后 6 h 明显升高。RCR 是反映线粒体结构完整性和功能状态的灵敏指标,ST3 是代表二磷酸腺苷(ADP)对线粒体氧化磷酸化刺激效应的指标,ST4 代表 ADP 耗尽后线粒体维持自身形态、结构所必需的基础氧耗。烧伤 3 h 后 RCR 和 ST3 下降表明氧化磷酸化过程在一定程度上解偶联,6 h 后 ST4 明显升高提示线粒体消耗较多的氧以维持其自身形态与结构,抗御外来因素的损害。能量产生减少,使心肌细胞线粒体 Ca^{2+} 释放障碍,导致 Ca^{2+} 严重超载,引起细胞凋亡或死亡。 Ca^{2+} 超载可通过激活线粒体磷脂酶 A_2 (PLA₂)降解线粒体磷脂;激活线粒体一氧化氮合酶(NOS)使线粒体 NO 生成增加;或直接(间接)损害线粒体呼吸酶活性,进一步加重能量代谢障碍。 Ca^{2+} 转运阻断剂和 K^+ -ATP 通道开放剂可显著减轻烧伤后心肌细胞和线粒体损害。严重烧伤后大鼠肝细胞糖酵解增强、细胞有氧化严重受抑和葡萄糖转运功能增强可能与烧伤后缺氧诱导因子-1(HIF-1)表达明显增加有关。提出了以线粒体为中心,研究严重烧伤后缺血缺氧损害发生机制与防治策略的新思路,初步形成了烧伤后“休克心”的新观点。

生理条件下,线粒体通透性转换孔(PTP)处于关闭或亚通透状态,只允许分子量 < 300 的物质自由进出,不导致线粒体肿胀,可能与线粒体内外离子转运有关。在缺血缺氧等病理情况下,PTP 开放使线粒体氧化磷酸化出现障碍并释放 cytC 进入胞浆,导致细胞坏死与凋亡。PTP 的实质是一种通道复合体,由线粒体内膜上的腺苷酸转运酶(ANT)和外膜的电压依赖性离子通道(VDAC)蛋白以及基质中的亲环素 D(cyclophilin D, CyP-D)构成。笔者课题组以 [³H]DOG 直接检测烧伤后心肌细胞线粒体 PTP 开闭特性。研究结果显示,烧伤后心肌线粒体 PTP 开放增加,线粒体 cytC 通过开放的 PTP 漏出,使线粒体 cytC 含量减少。线粒体 Ca^{2+} 超载及自由基增加可能是烧伤后 PTP 开放的重要原因。烧伤

 **金磊® 赛增®**
JINTROPIN

本栏目由长春金赛药业
有限责任公司协办

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054202);军队“十五”指令性课题资助项目(01L066);教育部高等学校骨干教师资助计划项目;军队首批临床高新技术重大资助项目(第 23 项)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室

后心肌细胞线粒体 PTP 开放可产生以下后果,首先线粒体氧化磷酸化出现障碍;其次是线粒体 cytc 释放进入胞浆。前者使心肌细胞不能获得足够的能量;后者激活胞浆 Capase-3,诱发心肌细胞凋亡。提示烧伤后及早应用抗氧化药物并设法减轻线粒体 Ca²⁺ 超载,抑制心肌细胞线粒体 PTP 开放,可能是防治烧伤“休克心”的有效手段。

ATP 敏感的线粒体 K⁺ 通道(mitoK_{ATP})是细胞能量代谢的重要调节器,mitoK_{ATP} 开放剂可促进 K⁺ 与 H₂O 进入线粒体,使其体积增大,加强线粒体呼吸功能。mitoK_{ATP} 开放剂二氮嗪治疗后血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)均显著降低,说明其可有效减轻烧伤后心肌细胞损伤。二氮嗪处理组大鼠线粒体 K⁺ 内流速率及线粒体呼吸功能均明显高于烧伤组,说明线粒体 K⁺ 内流增加导致呼吸功能加强是二氮嗪保护烧伤后心肌细胞的具体机制之一。实验结果进一步证实二氮嗪处理组心肌线粒体丙二醛(MDA)含量显著低于烧伤组,提示抑制自由基产生也是二氮嗪保护细胞的机制之一。

缺氧对糖酵解的激活远远超过了细胞内可利用的葡萄糖浓度,葡萄糖是由膜上的葡萄糖载体转运到胞内的。因此,葡萄糖的跨膜转运是缺氧和缺血时能量代谢的重要限速步骤。缺氧条件下培养的正常大鼠肝细胞中膜糖蛋白 GLUT-1 的表达增加,并随缺氧时间的延长而变得明显,烧伤导致 GLUT-1 mRNA 和蛋白水平增加,与烧伤后机体损伤修复需要大量能量相适应。对细胞膜上 GLUT-1 数量的调节可能是组织对缺氧、缺血应激适应的一个重要机制。除缺氧外,多种环境和内在因素可在多个环节参与对 GLUT-1 蛋白表达的调控。利用体外培养的大鼠正常肝细胞,转染含有大鼠 GLUT-1 基因全长调控序列的荧光素酶报告基因载体,观察到缺氧明显诱导了报告基因的表达,随着缺氧时间的延长,其表达一直高于诱导前的水平。GLUT-1 是目前已知惟一的受缺氧双重诱导的基因,即受缺氧本身和缺氧导致的氧化磷酸化抑制的诱导,这可能是由 GLUT-1 介导的葡萄糖转运是缺氧和缺血时能量供应的限速步骤所决定的。缺氧和缺血导致的氧化磷酸化本身对 GLUT-1 mRNA 表达水平的双控制,使得不论是缺氧导致的线粒体氧化磷酸化水平降低,还是由于氰化物等中毒导致氧化磷酸化受抑引起线粒体 ATP 生成减少,细胞均能维持较高的糖原分解和 ATP 合成速率,满足机体的需要。这些研究结果对于深入揭示严重烧伤后缺血缺氧损害的分子机

制,寻找其防治措施具有重要的理论和临床意义。

2. 炎症反应失控与缺血缺氧相互关联、互为因果是发生烧伤早期脏器损害的关键:烧伤早期适度的炎症反应对机体具有保护作用,但是过度的炎症反应则是严重烧伤后发生多种并发症的重要机制。研究证明,缺血缺氧时,炎性细胞尤其中性粒细胞(PMN)与内皮细胞活化,使 PMN 粘附、聚集于脏器组织微血管内,可阻碍微血管血流,加剧微循环障碍和组织缺血缺氧。烧伤后心肌组织中 PMN 标志物髓过氧化物酶(MPO)显著增加,表明烧伤后 PMN 在心肌组织聚集增多。更为重要的是,活化的 PMN 可产生大量 MPO、弹性蛋白酶、氧自由基及肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子,造成组织细胞损害。因此,缺血缺氧与失控性炎症反应之间存在一定的内在联系。

核转录因子-κB(NF-κB)活化是机体效应细胞大量释放促炎细胞因子,导致组织炎症反应和组织损伤的关键步骤。正常情况下,NF-κB(主要为 P50/P65 二聚体)与其抑制蛋白 IκB 结合成无活性的三聚体存在于细胞浆中。烧伤后,IκB 与 NF-κB 解离,NF-κB 核定位序列暴露,由胞浆移位至胞核。在胞核内,NF-κB 与相应基因启动子或增强子中 κB 结合,启动细胞因子等的转录。NF-κB 被 TNFα 等促炎性细胞因子激活的同时,又促进这些细胞因子的表达,导致失控性炎症反应。烧伤后 1 h 心肌组织 NF-κB 活性即明显升高,伤后 3 h 达峰值,24 h 内均维持于高水平。NF-κB 活化在通常情况下是一快速、短暂的反应,但烧伤后心肌组织 NF-κB 活化持续时间较长,可能与烧伤后多种刺激因素持续存在有关。如严重烧伤后,尽管按公式及时进行补液治疗,但组织器官在较长一段时间内仍处于缺血缺氧状态;烧伤后缺血缺氧使肠黏膜屏障受损,肠道细菌和毒素不断入血,不断刺激机体效应细胞。这种情况也从一个侧面说明缺血缺氧与失控性炎症反应之间是相互关联的。

NF-κB 活化后,可促使多种促炎细胞因子的表达和分泌,TNFα 则是目前被公认的具有多种重要生物学活性的促炎细胞因子之一。烧伤后心肌组织 TNFα mRNA 表达增强,TNFα 可直接抑制心肌收缩和诱导心肌细胞凋亡,从而导致心功能受损。TNFα 对心脏血流动力学的影响以降低心肌收缩速度、射血分数、血压、全身血管阻力及心室舒张功能为特征。烧伤后左心室收缩压(LVSP)、± dp/dt max 均显著降低,而左心室舒张末压(LVEDP)上升,表明

心肌收缩功能和舒张功能均减退,提示心肌组织表达的 TNF α 参与了烧伤早期心肌收缩和舒张功能降低的过程。

3. 促炎信号通路是多种刺激因素引起烧伤早期脏器损害的中心环节:在多数刺激因素诱导细胞效应经过信号识别/与膜受体结合→信号转导→胞浆/核反应→细胞效应等这一过程中,信号转导是刺激因素诱导细胞效应产生的关键中间环节。细胞内存在多条信号途径以行使信号转导职能,阻断某些刺激因素的主要信号途径,有可能消除或消减刺激因素诱导的细胞效应。p38 激酶、c-jun N 末端激酶 (JNK) 两条主要应激活化的信号途径中,p38 激酶途径是严重烧伤早期心肌组织细胞主要的被激活途径。烧伤早期心肌细胞 p38 激酶途径迅速被激活,在伤后 24 h 内呈持续高活化状态,p38 激酶核转位伴随其活化全过程。同时烧伤早期心肌组织细胞外信号调节激酶 (ERK) 途径也迅速被激活,ERK 途径的活化可能与细胞自身抗损伤机制启动有关,提示 p38 激酶与 ERK 途径活化的强弱对比或失衡,可能是决定烧伤早期心肌细胞损害的重要细胞内机制。

二、烧伤早期脏器损害防治的研究

1. 内源性保护机制的阐明可为早期脏器损害的防治提供新策略:细胞内存在着广泛的自我保护机制。缺血缺氧和炎症时细胞的内源性保护机制是多方面多层次的。目前认为,缺血缺氧和炎症反应条件下,参与细胞保护(细胞生存相关)的蛋白主要有 3 类:细胞保护性应激蛋白——热休克蛋白 (HSP) 等;细胞生长和细胞保护相关核转录因子——HIF-1 等;抗凋亡相关蛋白——凋亡抑制蛋白 (IAP)、Bcl-2 等。

近年来研究表明,HSP70 作为一种细胞内源性保护蛋白,在防止应激引起的细胞损害或者使受损的细胞恢复方面起着重要作用。实验结果显示,腹腔注射 HSP70 诱导剂亚砷酸钠 24 h 后,大鼠小肠组织 HSP70 表达明显增强,能显著减轻严重烫伤早期肠粘膜屏障的破坏程度。大鼠烧伤后心肌组织 HSP70 蛋白表达升高,腹腔注射亚砷酸钠 6 mg/kg 可以显著诱导心肌组织 HSP70 的表达。提示 HSP70 可能在烧伤后早期心肌损害中发挥其内源性抗损伤作用。亚砷酸钠预处理组血清肌钙蛋白 I (TnI) 含量明显低于单纯烧伤组,且波动幅度较小,烧伤后 48 h 已经恢复正常水平,表明亚砷酸钠预处理诱导的热休克反应对烧伤后早期心肌损伤有一定的保护作用。笔者预先成功构建含全长 HSP70 基

因的重组腺病毒载体,并在体外实验中观察到,该载体对缺氧复氧损伤的肠上皮细胞具有保护作用。在此基础上,将构建的重组腺病毒载体通过静脉注射转染严重烧伤大鼠,可见肠粘膜组织病理改变较单纯烧伤组减轻,损伤指数明显降低,血清中 LDH 含量明显下降。表明静脉注射转染含 HSP70 基因的重组腺病毒载体,可成功介导 HSP70 在大鼠肠粘膜的过度表达,从而拮抗严重烧伤大鼠的肠粘膜损害,减轻细胞损害,对严重烧伤大鼠肠粘膜缺血缺氧性损伤有确切保护作用,为严重烧伤后肠粘膜的防治提供了基因治疗的可能途径。

HIF-1 是一种核转录因子,在低氧状况下诱导产生,在缺血缺氧性疾病中对机体起重要保护作用。正常氧浓度条件下,HIF-1 α 泛素化后迅速降解。缺氧时,HIF-1 α 蛋白降解减少,在组织和细胞中广泛表达,与 HIF-1 β 形成二聚体入核,结合靶基因调控序列的缺氧反应元件 (HRE),诱导大量基因的表达。HIF-1 启动下游基因表达上调,其生物学效应主要是促进糖酵解和有效利用氧,使红细胞增生、葡萄糖转运体增加,从而增加氧运输能力,促进细胞增殖、抗凋亡,促进血管再生等,所有这些功能都围绕着“维持低氧状态下的氧稳态,改善微循环”展开,提示 HIF-1 可能参与了缺氧细胞的能量代谢及氧利用障碍发生机制。大面积重度烧伤可以诱导心肌组织 HIF-1 α mRNA 水平和蛋白表达均增加,正常对照组左心室 HIF-1 蛋白含量明显高于右心室,提示左心室对缺血缺氧耐受能力较强。烫伤后右心室 HIF-1 蛋白量迅速增加,对缺氧反应性强,提示大面积重度烧伤使心肌组织发生缺血、缺氧性损害,缺氧诱导 HIF-1 α mRNA 水平增加,有助于提高心肌对缺氧的耐受能力。

2. 阻断信号通路可为早期脏器损害的防治提供新思路:p38 激酶抑制剂 SB203580 能有效抑制缺氧、烧伤血清刺激条件下心肌细胞 p38 激酶活化,减轻心肌细胞 LDH 漏出,减少心肌细胞凋亡,改善心肌细胞活力,表明 p38 激酶途径是烧伤早期主要致病因素导致心肌细胞损害的信号转导途径。p38 激酶抑制剂 SB203580 能下调缺氧、烧伤血清刺激条件下心肌细胞 TNF α 、诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) 及 cPLA₂ 表达,抑制 caspase-3 活化,从而降低心肌细胞 MDA 含量,延缓心肌细胞膜磷脂降解,减少细胞凋亡,提示 p38 激酶途径参与炎症相关基因表达和促进 caspase-3 活化是其介导缺氧、烧伤血清刺激条件下心肌细胞损害的重要机制。体内给予

SB203580 也能有效抑制烧伤早期心肌组织 p38 激酶活化,下调心肌组织炎症相关基因表达和降低 caspase-3 活性,减少心肌细胞肌酸激酶同工酶-MB (CK-MB) 丢失,降低心肌细胞凋亡程度,改善左心功能。

3. 基因转染可为早期脏器损害的防治提供新途径:缺氧和炎症因子等刺激因素可使细胞大量表达 c-fos、c-jun,并通过对下游基因表达的调控引起体内细胞一系列形态结构和功能代谢变化。通过转染 c-fos 和 c-jun 反义基因重组体,观察缺氧复合烧伤血清刺激下心肌细胞的保护作用。结果显示,加入烧伤血清并造成缺氧的非转染心肌细胞,细胞形态明显改变,细胞骨架网状结构紊乱,有的细胞骨架甚至全部断裂,呈颗粒状散布在核周围,细胞微管结构明显溶解和断裂;但转染了反义基因重组体后,心肌细胞胞浆丝与丝之间互相连接呈网状,由核向周边放射状分布,完整清晰,电镜下微管结构基本保持完好,偶见断裂和溶解现象。转染了反义基因重组体后,c-fos、c-jun mRNA 表达和蛋白表达显著减少,β-微管蛋白和肌钙蛋白表达水平显著升高。表明 c-fos、c-jun 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清刺激下的心肌细胞具有保护作用。由于本研究采用的体外研究模型基本模拟了在烧伤缺血缺氧时的主要损伤因素,可为烧伤早期脏器损害的防治提供新途径。

4. 防治烧伤早期损害的临床措施:(1)减轻缺血缺氧性损害:加强对立即复苏患者的监护,加快伤后 2~3 h 补液,检测血乳酸与剩余碱,了解细胞缺氧情况,使尿量达到 70~90 ml/h;对延迟复苏患者,在血流动力学的监测下,入院后 2 h 内补足第 1 个 24 h 补液量的一半,尽快纠正休克;防治休克心,应用多巴胺等药物扶持心功能,改善心肌营养和代谢;加用抗氧自由基药物,如维生素 E、大剂量维生素 C 等。(2)吸入性损伤的早期治疗:强调早期采取有

效措施,尽快消除原发与继发性损伤因素,防止发生并发症。烧伤后短期内吸氧(浓度 100%),尽快清除吸入的一氧化碳;头颈部烧伤伴吸入伤,伤后 6 h 面颈部水肿不明显时即行气管插管或气管切开,防止发生气道梗阻;若 PaO₂ 降低于 70~80 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),即用机械通气,防止呼吸功能衰竭;应用大剂量肺灌洗和外源性肺表面活性物质。(3)早期采用一次性大面积切痂,清除焦痂及痂下水肿液中炎症介质、内毒素,阻断或减轻失控性炎症反应:早期一次性切痂能明显减少血浆炎症介质及内毒素含量,有效地维护内脏功能,降低全身感染与内脏并发症的发生率,提高治愈率。(4)应用早期肠道营养:肠道营养能改善烧伤后肠道血液灌注,维护结构与功能。早期喂养能减少骨骼肌蛋白质分解,减轻肠道损伤、肠源性感染及肠道内毒素移位,降低肠源性高代谢。早期肠道喂养能尽快补充营养和微量元素,疗效明显优于延迟喂养和静脉营养。(5)加强烧伤早期肠源性感染的防治:烧伤早期,特别伴重度休克者多有肠源性感染,应采用针对肠道革兰阴性杆菌的有效抗生素和内毒素拮抗药物,加强对内毒素的监测。口服双歧杆菌等生态制剂以维护肠道微生态。

三、展望

烧伤早期脏器损害发生机制的研究还有待深入,对缺血缺氧和感染时细胞各种信号通路的交汇和内源性保护机制的研究、缺氧时细胞糖代谢和脂肪酸代谢的分子机制与调理的研究、线粒体损害在缺血缺氧细胞坏死和凋亡中的作用及其地位的研究等,将有助于进一步从细胞与分子水平阐明烧伤早期脏器损害的机制,寻求分子和基因水平的防治新方法,减少烧伤早期脏器损害的发生。

(收稿日期:2003-07-23)

(本文编辑:赵云 苟学萍)

· 消息 ·

《中华现代中西医杂志》《中华现代临床医学杂志》征稿通知

《中华现代中西医杂志》、《中华现代临床医学杂志》是综合性、国际性医学学术期刊。具有 ISSN/CN 标准刊号,被收入国内多种学术期光盘版。面向医、药、护、管、卫等专业的科研、教学、临床工作者。本系列刊物发表周期短。在本系列杂志上刊登论文者可获得继续教育学分。

栏目设有:专家论坛、论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药、药物研究、特检、护理、预防医学、医院管理等。来稿免收审稿费。

地址:北京 100039-40 信箱杂志编辑部收,电话:010-88285910,邮编:100039,电子信箱:YXZZ@sohu.com。