

· 论著 ·

烫伤大鼠结肠动力基本功能单位细胞损害和内质网应激研究

李颖 郭力



【摘要】 目的 了解严重烫伤大鼠结肠壁内神经运动末梢-肌间丛 cajal 间质细胞 (ICC)-平滑肌细胞超微结构改变以及葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 (caspase-12) 表达情况,探讨其在烫伤大鼠结肠动力损伤中的可能机制。方法 采用简单随机法将 50 只 SD 大鼠分为烫伤组 (40 只):大鼠造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤,伤后腹腔注射乳酸林格液 (50 mg/kg) 复苏。于伤后 3、6、12、24 h 处死大鼠,在距盲肠约 5 cm 处剪取近端结肠 4 cm 肠管,取中间各 1 cm 分别用体积分数 3% 戊二醛及体积分数 10% 甲醛固定。对照组 (10 只) 除不烫伤外,其余处理同烫伤组。取戊二醛固定的标本,透射电镜下观察大鼠肠道细胞变化情况。取甲醛固定的标本,采用免疫组织化学法检测结肠壁中 GRP78 和 caspase-12 的表达。结果 透射电镜下,对照组大鼠结肠平滑肌细胞排列整齐,肌细胞内细胞器丰富,核居中,常染色质均匀,线粒体嵴较多、滑面内质网较少,肌间丛神经元细胞器丰富,紧邻肌间丛神经元可见 ICC;烫伤组肠道平滑肌细胞形状不规则,排列紊乱,核周隙增宽,细胞内有溶解性大空泡,线粒体空泡样变,嵴溶解、固缩,粗面内质网扩张并部分溶解,ICC 核周细胞质明显减少。烫伤组伤后 3、6、12 h GRP78 评分分别为 (4.3 ± 0.9)、(6.0 ± 0.7)、(4.8 ± 1.1) 分,均高于对照组 [(2.4 ± 0.7) 分, $P < 0.05$];烫伤组伤后 6~24 h caspase-12 评分均高于对照组 ($P < 0.05$)。对照组细胞均有 GRP78 表达,烫伤组强度染色主要出现在黏膜和肌间神经丛、间质细胞,而平滑肌细胞多呈轻中度染色。烫伤后 3、12 h GRP78 呈阳性表达,伤后 6 h 呈强阳性。caspase-12 在伤后 3 h 阳性表达不明显,伤后 6、24 h 表达呈弱阳性,伤后 12 h 表达呈阳性;对照组未见 caspase-12 表达。结论 严重烫伤后大鼠结肠壁内神经运动末梢-肌间丛 ICC-平滑肌细胞存在明显病理改变,这与内质网过度应激启动 caspase-12 凋亡通路致细胞损伤可能有关。

【关键词】 烧伤; 结肠; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12; 葡萄糖调节蛋白 78

Study on endoplasmic reticulum stress and injury to basic function unit of colonic motility in rats with scald injury Li Ying, GUO Li. Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Corresponding author: GUO Li, Email: g2867255@126.com, Tel: 0830-2867255

【Abstract】 Objective To observe expressions of glucose-regulated protein (GRP78) and caspase-12 in nervous system-interstitial cells of Cajal (ICC) in smooth muscle in colonic wall in rats with scald injury, as well as their relevant ultrastructural changes, so as to probe the possible mechanisms of dynamic damage in murine colon after a scald injury. **Methods** Fifty healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into scald ($n = 40$) and control ($n = 10$) groups. Rats in scald group were inflicted with 30% TBSA full-thickness scald, and received an intraperitoneally injection of Ringer lactate solution (50 mg/kg) for resuscitation, while those in control group had similar treatment with the exception of scald. Rats in control group and scald group were sacrificed at 3, 6, 12, 24 post scald hour (PSH, 10 rats at each time point) for collection of 4 cm of colonic tissue, 5 cm proximal to the cecum. A segment of colonic wall, 1 cm in length, was obtained from the middle of the harvested segment of colon, and it was fixed with 3% glutaraldehyde or 10% formaldehyde. The samples fixed with glutaraldehyde were used to observe ultrastructural alterations under transmission electron microscope, while that with formaldehyde were used to observe expressions of GRP78 and caspase-12 in colonic wall by immunohistochemical assay. **Results** The colonic smooth muscle cells of rats in control group showed regular arrangement, their organelles were abundant, nucleus centrally located, euchromatin distributed evenly with more abundant mitochondrial cristae and less smooth endo-

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2009.03.012

基金项目:四川省科学技术厅重点科技自筹项目 (05JY029-143);四川省教育厅自然科学基金项目 (2003C011)

作者单位:646000 四川泸州医学院附属医院整形烧伤科

通信作者:郭力,Email:g2867255@126.com,电话:0830-2867255

plasmic reticulum, neuronal organelles were abundant in intermuscular plexus, and ICC could be seen in the neighborhood of neurons. The colonic smooth muscle cells appeared in irregular and disordered manner in scald group, perinuclear space was widened, intercellular vacuoles were observed, mitochondria showed vacuolation degeneration with dissolved and condensed cristae, rough endoplasmic reticula were dilated with partial dissolution, and perinuclear cytoplasm of ICC was obviously decreased. The expression of GRP78 was increased in scald group at 3, 6, 12 PSH (4.3 ± 0.9 , 6.0 ± 0.7 , 4.8 ± 1.1 score) as compared with that in control group (2.4 ± 0.7 score, $P < 0.05$). The expression of caspase-12 in scald group at 6, 12, 24 PSH was higher than that in control group ($P < 0.05$). GRP78 was consistently expressed in cytoplasm in control group, while in scald group, it mainly appeared in mucosa, myenteric plexus, and stromal cells, but only moderately or lightly expressed in smooth muscle cells. The expression of GRP78 was positive in scald group at 3, 6, 12 PSH, strongly positive at 6 PSH, and it was also expressed in cytoplasm in control group. The expression of caspase-12 in scald group was not obviously positive at 3 PSH, and weakly positive at 6, 24 PSH, but strongly positive at 12 PSH, while no expression was shown in control group. **Conclusions** Marked pathological changes are observed in enteric nervous system-interstitial cells of Cajal-smooth muscle in rats with severe scald injury. It may be related with cellular injuries induced by caspase-12 apoptotic pathways through activated endoplasmic reticulum stress.

[Key words] Burns; Colon; Apoptosis; Caspase-12; Glucose-regulated protein 78

内质网是真核细胞中蛋白质翻译、合成及 Ca^{2+} 存储的场所,对内外环境的变化极为敏感,其功能紊乱时出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及 Ca^{2+} 平衡紊乱的状态,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 是内质网上的伴侣蛋白,也是 ERS 的标志物,可促进内质网中未折叠蛋白正确折叠、修饰,具有保护内质网功能的作用。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 (caspase-12) 是存在于内质网上的促凋亡因子,正常状态下与 GRP78 结合,而过强的刺激可使 caspase-12 激活,启动凋亡通路。笔者以大鼠结肠动力基本功能单位(basic functional unit of intestinal motility, BFUIM) 为研究对象,针对组织亚细胞器形态结构改变与功能变化的关系,探讨大鼠烫伤后肠道动力障碍的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

健康成年 SD 大鼠 50 只(泸州医学院动物实验中心),雌雄不限,体质量 250 ~ 300 g。采用简单随机法将大鼠分为烫伤组(40 只):大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,背部剃毛、置于 98 °C 热水中 15 s 造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实)。伤后腹腔注射乳酸林格液(50 mg/kg)复苏,自由进食。于伤后 3、6、12、24 h 无痛断颈处死大鼠(每时相点 10 只)剖腹找到盲肠,距盲肠约 5 cm 处剪取近端结肠肠管 4 cm, PBS 漂洗,取中间各 1 cm 分别用体积分数 3% 戊二醛及体积分数 10% 甲醛固定。对照组(10 只)禁食、禁水 12 h,除不烫伤外其余处理同烫伤组。

1.2 检测指标

1.2.1 肠道平滑肌细胞形态的观察 取戊二醛固定的肠管标本,超薄切片,锇酸染色,透射电镜下观察大鼠肠道细胞变化情况。

1.2.2 免疫组织化学观察 取甲醛固定的肠管标本,常规石蜡包埋、切片,行链霉亲和素-生物素复合物法免疫组织化学染色,操作按试剂盒(加拿大 stressgen 公司)说明书进行。用美国 Leica 公司 DM4000B 型电子成像采集系统采集免疫组织化学切片图像。以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片随意观察 5 个视野,采用双盲法进行评分,计数 100 个细胞中的阳性细胞数。

结果判定采用综合评分法。根据细胞染色程度及阳性细胞面积记分。细胞不着色(即不着色)记 0 分,黄色(轻度染色)记 1 分,棕黄色(中度染色)记 2 分,深棕黄色(强度染色)记 3 分。无细胞染色记 0 分,细胞染色面积小于 25% 记 1 分,染色面积在 25% ~ 50% 记 2 分,染色面积大于 50% 记 3 分。根据上述 2 项指标的积分数将细胞 GRP78 和 caspase-12 的表达分为:阴性(-),积分为 0 ~ 1 分;弱阳性(+),积分为 2 ~ 3 分;阳性(++),积分为 4 ~ 5 分;强阳性(+++),积分为 6 ~ 7 分。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 14.0 统计软件行单因素方差分析。表达强度用非参数 Ridit 检验。

2 结果

2.1 透射电镜下细胞形态变化

对照组大鼠结肠平滑肌细胞排列整齐,肌细胞内细胞器丰富,核居中,常染色质均匀,线粒体嵴较

多、滑面内质网较少。肌间丛神经元细胞器丰富,有大量线粒体及粗面内质网,神经膨体内有较多的突触小泡。紧邻肌间丛神经元可见 cajal 间质细胞 (ICC),其核周胞质和突起内含发育良好的线粒体、内质网和高尔基体。烫伤组大鼠肠道平滑肌细胞形状不规则,排列紊乱,核周隙增宽,肌细胞胞质内有较多溶解性空泡,内质网扩张呈空泡样;肌间丛可见神经元胞质部分溶解,线粒体肿胀,嵴溶解,粗面内质网扩张,部分溶解。ICC 核周的细胞质明显减少,线粒体肿胀或空泡样变,胞质内可见许多自噬性空泡。胞内细胞器的数量较正常减少,核糖体减少,内质网扩张,粗面内质网脱颗粒,核内异常染色质明显。见图 1。

现在黏膜、肌间神经丛和间质细胞,而平滑肌细胞多呈轻中度染色(图 2)。烫伤组伤后 3、12 h GRP78 表达呈(++) ,伤后 6 h 呈(+++)。caspase-12 在烫伤后 3 h 阳性表达不明显,伤后 6、24 h 表达呈(+),伤后 12 h 表达呈(++);对照组未见 caspase-12 表达。见图 2。

表 1 各组大鼠 GRP78 与 caspase-12 评分情况(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	GRP78	caspase-12
对照组	10	2.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0
烫伤组	40		
伤后 3 h		4.3 ± 0.9 ^a	2.0 ± 0.6
伤后 6 h		6.0 ± 0.7 ^a	3.7 ± 1.0 ^a
伤后 12 h		4.8 ± 1.1 ^a	4.6 ± 1.0 ^a
伤后 24 h		3.2 ± 0.8	2.9 ± 1.0 ^a

注:GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, caspase-12 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12;与对照组比较,^aP < 0.05

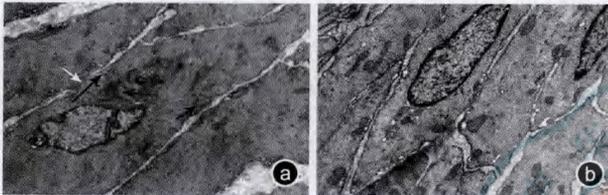


图 1 2 组大鼠肠道平滑肌细胞形态变化。a. 对照组平滑肌细胞排列整齐,胞核完整,细胞连接紧密(白色箭头),神经细胞线粒体(短黑色箭头)、内质网丰富(长黑色箭头) 透射电镜 × 12 000; b. 烫伤组大鼠伤后 3 h 平滑肌细胞膜周边有扩张小泡,线粒体轻度扩张 透射电镜 × 15 000

3 讨论

严重烫伤患者常伴有胃肠道动力功能障碍,在烫伤后早期,胃肠道病理改变和动力异常可先于临床症状出现。对胃肠道动力功能障碍机制和防治的研究在烧伤后肠源性感染中具有重要意义。有实验证明,严重烫伤大鼠胃肠道的排空及推进速率明显下降。郭力等^[1]对烫伤豚鼠胃肠道动力机制的研究表明,豚鼠烫伤及腹腔注射 LPS 后,肠道组织中降钙素基因相关肽含量明显增高,而 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶及 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶含量明显降低。1995 年有报道:烫伤大鼠肠道平滑肌细胞线粒体跨膜电势差 Δψ_m 下降或丧失,膜通透性

2.2 免疫组织化学结果

2.2.1 GRP78 和 caspase-12 评分 各组 GRP78 和 caspase-12 评分情况见表 1。

2.2.2 GRP78 和 caspase-12 表达 对照组大鼠肠道细胞均有 GRP78 表达,烫伤组强度染色主要出

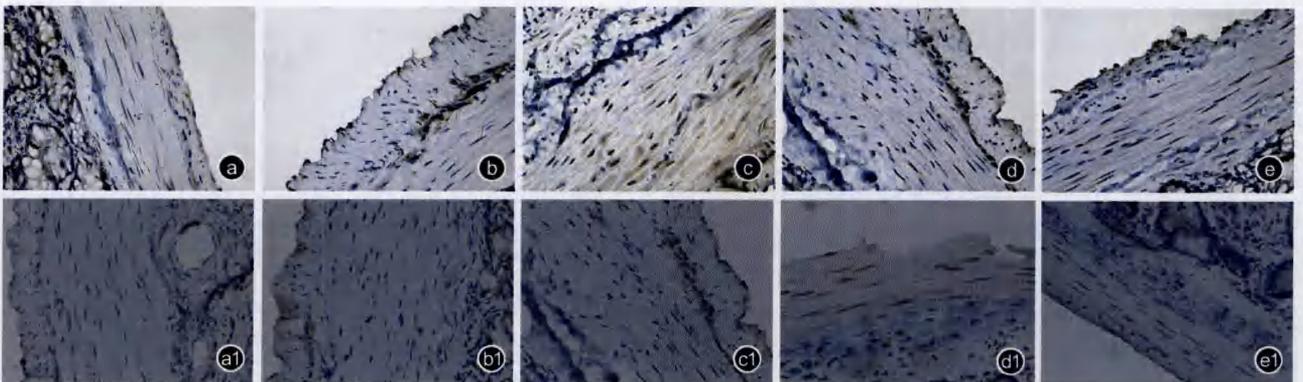


图 2 2 组大鼠结肠葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 (caspase-12) 表达情况 链霉菌亲和素-生物素复合物法 × 400。a ~ e. GRP78 表达情况; a1 ~ e1. caspase-12 表达情况; a. 对照组有阳性表达,黏膜细胞部分中度染色,平滑肌细胞染色轻或无,肌间丛神经元及间质细胞轻中度染色; b. 伤后 3 h,环纵行肌之间细胞胞质有中强度的阳性颗粒,平滑肌少许轻度染色或无染色; c. 伤后 6 h,黏膜细胞、肌间丛神经元及间质细胞呈强阳性,平滑肌细胞中度染色,平滑肌排列较紊乱; d. 伤后 12 h,肌间细胞阳性染色仍然呈中强度,平滑肌轻度染色; e. 伤后 24 h,平滑肌细胞及肌间细胞中均有轻中度染色颗粒; a1. 对照组阴性表达; b1. 伤后 3 h,阳性染色不明显,环行肌有部分轻度染色颗粒; c1. 伤后 6 h, caspase-12 表达呈阳性,环纵行肌之间神经元、间质细胞强度染色,平滑肌细胞染色较少; d1. 伤后 12 h 表达阳性,各细胞均有不同程度的中强度染色,胞质胞核均着色; e1. 伤后 24 h 表达呈弱阳性

改变、线粒体肿胀,最终导致氧化磷酸化脱耦联和 ATP 衰竭,功能不能执行。韩斌盛等^[2]通过对烫伤状态下豚鼠肠道平滑肌细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的相关检测观察到,在烫伤及 LPS 作用后线粒体内膜的电负性显著增强,内膜的通透性较正常增高,最终导致线粒体供能障碍,从而认为肠道平滑肌细胞线粒体膜电位改变是细胞凋亡的一条重要途径。

本实验结果表明,烫伤后大鼠肠道平滑肌细胞核周隙增宽,核异染色质增加,肌丝排列紊乱,肌细胞胞质内较多溶解性大空泡,细胞骨架和滑面内质网减少,线粒体肿胀,空泡样变或溶解。肌间丛神经元、ICC 出现局部胞质空泡,线粒体肿胀,嵴溶解,粗面内质网扩张并部分溶解。这些亚细胞结构的变化应该伴随有功能上的变化。已有研究观察到,内质网可能是细胞内诱导凋亡的一个新场所,因此提出了 ERS 反应性凋亡途径^[3]。

在严重烫伤后早期的应激状态下,肠道缺血缺氧,细胞 ERS 维持稳态,但过强的持久应激使细胞功能明显受损。本研究结果表明,烫伤后 3 h 大鼠结肠细胞 GRP78 显著升高,这是 ERS 自我保护以维持细胞稳态的结果。伤后 6 h 达最高值,伤后 12 h 明显减少;而 caspase-12 在伤后 12 h 表达较强。烫伤后 12 h 随着 GRP78 的降低,应激的保护作用减弱, caspase-12 的表达却显著增高,损伤加重。GRP78 与 caspase-12 交互作用共同调控着凋亡的发生。GRP78 水平升高可增强细胞在应激状态下的生存能力,具有细胞保护作用。GRP78 可抑制 caspase-12 所致凋亡,GRP78 被未折叠蛋白反应诱导表达,并发生重新分布,在胞质中形成亚群并充当内质网膜蛋白,可与 caspase-7 和 caspase-12 形成复合物,阻止 caspase-12 激活,并阻止其从内质网释放^[4]。我们的实验也观察到,在烫伤 12 h 后随着 GRP78 的降低,应激保护作用降低,损伤加重, caspase-12 的表达显著增高。由此推测,烫伤后早期肠道动力 BFUIM

不仅在结构上有不同程度的病理改变,其内质网功能也发生一些变化。内质网对缺血缺氧十分敏感,内环境的紊乱促使内质网未折叠蛋白积聚,从而诱导 ERS,使得 GRP78 大量表达并与内质网中错误折叠和未折叠蛋白结合,恢复蛋白质的正确构象,使蛋白质能够在细胞应激状态下继续正确合成,维持内环境的稳定。正常状态下 GRP78 与 caspase-7 和 caspase-12 以复合物形式存在,而 ERS 后 GRP78 从复合物上分离与腔内未折叠蛋白结合,导致 caspase-12 激活、释放增多,发生细胞凋亡^[5]。caspase-12 定位于内质网,可能是介导 ERS 反应性凋亡的关键分子,在死亡受体或线粒体凋亡中不被活化,并且 caspase-12 缺陷鼠能抵抗 ERS 反应性凋亡而对其他死亡刺激仍可发生凋亡^[6]。因此,我们认为大鼠烫伤后肠道动力功能单位的损伤与内质网过度应激启动 caspase-12 凋亡通路可能存在一定关系。

参考文献

[1] 郭力,施泽宏,张华彬,等. 烫伤及内毒素/脂多糖对豚鼠胃肠动力的影响. 中华烧伤杂志,2005,21(5):350-352.
 [2] 韩斌盛,郭力,李玲. 烫伤及内毒素作用对豚鼠结肠袋平滑肌细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的改变. 泸州医学院学报,2005,28(1):19-21.
 [3] Mehmet H. Caspases find a new place to hide. Nature,2000,403(6765):29-30.
 [4] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. J Biol Chem, 2001, 276(36):33869-33874.
 [5] Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem, 2001, 276(17):13935-13940.
 [6] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. FEBS Lett,2002,514(2/3):122-128.

(收稿日期:2008-09-19)

(本文编辑:张红)

· 消息 ·

中华医学会系列杂志网上在线订阅通知

为加强中华医学会系列杂志整体品牌宣传,扩大中华医学会系列杂志的影响力,做好期刊征订工作,开辟新的发行征订渠道,方便广大读者订阅,中华医学会杂志社在中华医学网上搭建了“中华医学会系列杂志网上在线征订在线支付平台”,现已正式开通。在线订阅不仅改变了原有单一的邮局征订渠道,而且较传统邮局征订具有更大的优势:使期刊征订工作不再是阶段性的,可以实现全年征订;同时网上订阅减少了订阅环节,节约了时间和成本,使杂志订阅更加便捷。欢迎广大读者网上在线订阅中华医学会系列杂志,订阅办法:请登陆中华医学网 <http://www.medline.org.cn/>,点击“在线订阅”或登陆 <http://ebook.medline.org.cn/>进行在线订阅和在线支付。网上订阅 2008 年全年杂志的订户将享受 9 折优惠。联系电话:010-85158339、85158299,传真:010-85158391,电子邮件地址:info@cma.org.cn。

中华医学会杂志社