

烧伤后早期血管通透性增高研究进展

张家平 黄跃生 汪仕良

血管通透性增高是引发烧伤后早期循环紊乱和休克的主要原因。经过几十年的研究,目前对其发生过程已有基本了解:炎性介质是主要诱发因素,微小静脉是主要发生部位,内皮屏障受损是主要病理基础,内皮旁途径是血管内液外渗的主要通道。但上述认识还不足以形成有效的临床防治措施。近年来,研究更加关注内皮屏障功能障碍在烧伤后早期血管通透性增高中的作用,提出了新的防治思路,本文对此作一回顾和展望。

1 烧伤后血管内皮屏障功能障碍的分子基础

细胞骨架、细胞间连接和基底膜是参与血管内皮屏障功能调节的主要结构。其中,细胞骨架起重要的桥梁作用,通过相关蛋白影响细胞间连接和内皮细胞与基底膜黏附,调节血管内皮通透性。烧伤对血管内皮细胞骨架、细胞间连接和血管内皮基底膜均造成不同程度的影响。

1.1 骨架蛋白

细胞骨架中,微丝与血管通透性关系最为密切。微丝由肌动蛋白组成,而肌动蛋白以球状肌动蛋白和纤维状肌动蛋白 2 种形式存在。正常细胞球状肌动蛋白和纤维状肌动蛋白之间维持动态平衡。当外界条件变化时,这种平衡发生改变,导致微丝重组和重排,细胞质膜下纤维状肌动蛋白消失,细胞内成束的纤维状肌动蛋白增多,形成应力纤维。应力纤维中,纤维状肌动蛋白与肌球蛋白相互作用产生收缩力,引起内皮细胞回缩,细胞间裂隙形成。用烧伤患者血清刺激正常人肺血管内皮细胞,可诱使应力纤维形成,伴随细胞通透性显著增强^[1]。最近笔者观察到,用体积分数 20% 的严重烧伤患者血清刺激正常人脐静脉内皮细胞 2、4 h,细胞单层的通透性分别增高 1.52 倍和 2.02 倍,伴随细胞平均面积缩小、细胞间裂隙形成。在细胞骨架方面,用体积分数 20% 的烧伤血清刺激正常人脐静脉内皮细胞 1 h,细胞内

出现明显的应力纤维;但刺激 4 h 后,部分细胞纤维状肌动蛋白开始变短、不连续或模糊;同时,部分细胞质膜下出现高密度、增宽的外周型纤维状肌动蛋白,在变圆的内皮细胞中尤为明显^[2](图 1),表明随着烧伤血清作用时间的延长,血管内皮细胞骨架发生复杂变化,不仅表现在分布上,其结构也受损。用 TNF- α + 烧伤后活化的中性粒细胞与内皮细胞共孵育,可导致类似现象:内皮细胞纤维状肌动蛋白的数量减少、长度变短^[3]。因此,烧伤后纤维状肌动蛋白的变化与炎性因子诱导内皮细胞纤维状肌动蛋白重分布有本质不同。其原因可能是烧伤血清的成分复杂,除炎性介质外,还含有氧化剂、过氧化物、变性胶原碎片和烧伤毒素等多种有害因子,对细胞骨架产生多重影响。

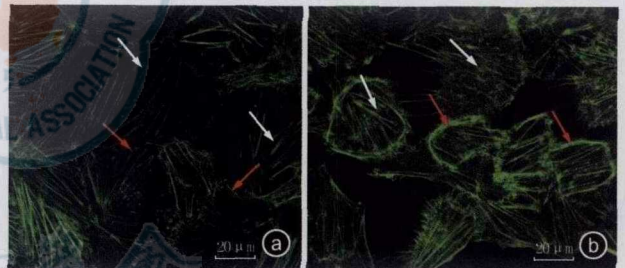


图 1 不同血清刺激下内皮细胞纤维状肌动蛋白形态与分布^[2] 异硫氰酸荧光素-鬼笔环肽染色,图中标尺全长为 20 μm 。a. 对照组细胞添加体积分数 20% 正常人血清培养; b. 烧伤组细胞用体积分数 20% 烧伤患者血清培养后 4 h,中央型肌动蛋白变短模糊(白色箭头),外周型肌动蛋白密度增高增宽(红色箭头)

1.2 紧密连接和黏附连接

紧密连接位于内皮细胞的近腔面,部分环绕整个细胞形成闭锁小带,见于脑血管内皮细胞;多数间断存在成为闭锁斑,见于其他器官内皮细胞。构成紧密连接的蛋白包括咬合蛋白(occludin)、闭合蛋白(claudin)、带状闭合蛋白(ZO)和连接黏附分子等。ZO 的 N 端与咬合蛋白胞内区的 C 端相连,其 C 端与胞质细胞骨架蛋白纤维状肌动蛋白相连。正常静脉血管内皮细胞纤维状肌动蛋白与 ZO-1 分布于细胞边缘,形成重叠度非常高的共存图像;烧伤血清刺激 1 h,纤维状肌动蛋白与 ZO-1 的分布出现离散,细胞结构变得粗糙、边缘模糊^[4]。内皮细胞培养实验显示,伴随细胞间间隙增大,烧伤血清使 ZO-1 离开

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.05.006

基金项目:重庆市自然科学基金(2008BB5031)

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、烧伤与复合伤国家重点实验室

细胞周边,出现内化,ZO-1 蛋白含量明显下降^[1]。上述情况表明,烧伤后血管内皮细胞的紧密连接受到严重破坏。

黏附连接指 2 个邻近内皮细胞之间存在 20 ~ 35 nm 的间隔,其中主要由钙黏蛋白充填。血管内皮细胞表达特异的内皮钙黏蛋白(VE cadherin),内皮钙黏蛋白的胞外 N 端与相邻细胞该蛋白的 N 端互相连接,使内皮钙黏蛋白在细胞间聚集成簇。内皮钙黏蛋白的 C 端通过 β 连环蛋白(β -catenin)与细胞骨架蛋白如纤维状肌动蛋白成链状连接。正常肺动脉内皮细胞的 β 连环蛋白和内皮钙黏蛋白平滑、连续分布于细胞周边;体积分数 30% 以上的烧伤血清刺激细胞 15 min,细胞周边 β 连环蛋白和内皮钙黏蛋白的分布发生断裂,形态呈拉链状,同时细胞内斑点状染色信号增多,提示内皮黏附连接完整性被破坏,蛋白发生内化(图 2)^[5]。Liu 等^[6]通过观察游离的大鼠静脉,也证实烫伤后血管内皮黏附连接部位受到损害。

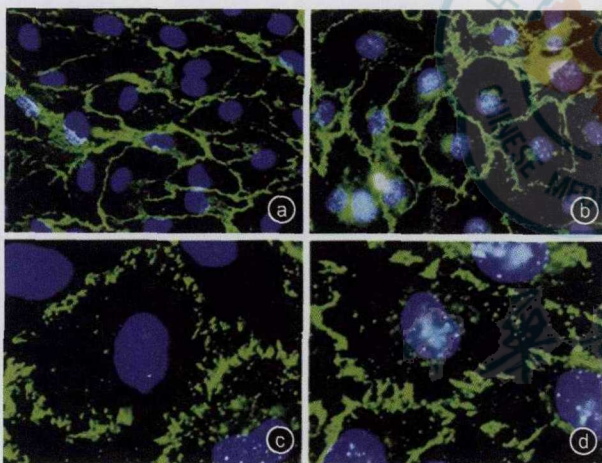


图 2 不同血清诱导内皮细胞黏附连接蛋白变化^[5] 异硫氰酸荧光素 $\times 630$ 。a. 正常血清组 β 连环蛋白;b. 正常血清组内皮钙黏蛋白;c. 烧伤组用烧伤血清刺激 15 min β 连环蛋白断裂,内皮黏附连接受损;d. 烧伤组用烧伤血清刺激 15 min 内皮钙黏蛋白断裂,内皮黏附连接受损

1.3 基底膜

由胶原蛋白、层黏连蛋白、纤维连接蛋白等组成的 ECM 膜,位于内皮细胞基底面,是大分子物质出血管的屏障。内皮细胞与基底膜间的黏附由整合素及相关蛋白介导,形成附着斑。整合素的胞外 N 末端与 ECM 蛋白相连,胞内 C 末端通过尾蛋白、 α 辅肌动蛋白等与骨架蛋白连接。有关血管基底膜在烧伤后早期血管通透性增强中的作用了解不多。最近,Reyes 等^[7]观察到烧伤后脑血管基底膜成分降解,血脑屏障破坏和脑组织水肿,而抑制 TNF- α 和

基质金属蛋白酶 9 分泌可部分逆转这一过程,表明基底膜降解参与烧伤后脑水肿的形成。

2 烧伤后血管内皮屏障功能障碍的机制

近年有报道提示,一些信号途径或分子参与烧伤后血管内皮屏障功能障碍,为烧伤后血管高通透性的临床防治提供了新思路 and 潜在靶点。

2.1 肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化

纤维状肌动蛋白/肌球蛋白的相互作用受 MLC 激酶(MLCK)的磷酸化作用调节。MLCK 磷酸化 MLC 丝氨酸 19/苏氨酸 18 位点,磷酸化的 MLC 活化肌球蛋白重链头部 ATP 酶,并产生能量促使纤维状肌动蛋白沿肌球蛋白滑动增加收缩力,这是调节内皮细胞回缩的经典“开/关”机制^[8]。在肺微血管内皮细胞中,烧伤血清刺激 5 min 即诱导 MLC 磷酸化,可以持续 30 min,伴随内皮细胞通透性增高;MLCK 抑制剂或特异性抑制肽可减少 MLC 磷酸化,抑制应力纤维形成,呈剂量依赖性降低烧伤血清诱导的内皮细胞通透性增高^[9],表明 MLCK 依赖的 MLC 磷酸化是烧伤后血管内皮应力纤维形成和血管通透性增高的重要机制。

MLCK 有 2 种亚型:MLCK-108 和 MLCK-210,在烧伤后早期血管通透性增高中起决定作用的是后者。Reynoso 等^[10]观察到,野生型小鼠 25% TBSA III 度烧伤后 60 min,肠系膜微血管通透性升高 1.61 倍,而 MLCK-210 基因敲除小鼠肠系膜微血管通透性仅为伤前的 93%;伤后 10 h 野生型小鼠零存活,MLCK-210 基因敲除小鼠存活率为 50%。但 MLCK 并非磷酸化 MLC 的惟一激酶,有研究指出 Rho 激酶可通过间接方式磷酸化 MLC。采用 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 能显著降低烧伤血清刺激诱导的肺微血管内皮细胞和皮肤静脉 MLC 磷酸化及通透性增高^[11],表明 Rho 激酶和 MLCK 共同参与烧伤后 MLC 磷酸化及其功能的调节。

2.2 p38 激酶的作用

MAPK 属丝氨酸/苏氨酸激酶,是细胞增殖、分化、存活等信号在细胞内转导的交汇点,包括细胞外信号调节激酶、p38 激酶和 c-Jun 氨基末端激酶 3 种成员。笔者先前的研究表明,p38 激酶在烧伤后迅速、持续活化,是介导烧伤后炎症反应和细胞凋亡的重要途径。现已证实,p38 激酶参与烧伤后血管内皮细胞应力纤维形成和 ZO-1 的解离和内化,抑制 p38 激酶能逆转烧伤后内皮细胞屏障功能紊乱。进一步的研究显示,p38 的 α 和 δ 亚型,而非 β 和 γ 亚

型参与该过程的调节^[12]。那么, p38 激酶调节血管内皮通透性的分子机制究竟为何?

最近笔者观察到, p38 激酶可能经磷酸化 I-钙调素结合蛋白(I-caldesmon)参与对烧伤后血管内皮通透性的调节。作为微丝结合蛋白, 钙调素结合蛋白最初在肌肉细胞中被发现, 通过影响 ATP 酶循环干扰肌动蛋白/肌球蛋白的相互作用抑制肌细胞收缩, 这一作用在钙调素结合蛋白磷酸化后被解除。内皮细胞存在钙调素结合蛋白基因, 其编码蛋白的相对分子质量小于肌细胞钙调素结合蛋白, 故称为 I-钙调素结合蛋白。用体积分数 20% 的严重烧伤患者血清刺激人脐静脉内皮细胞, 能诱导 I-钙调素结合蛋白磷酸化, 抑制 p38 激酶, 显著降低 I-钙调素结合蛋白的磷酸化水平, 伴随内皮细胞纤维状肌动蛋白重分布改善和内皮细胞通透性下降。进一步的研究表明, 高表达野生型 I-钙调素结合蛋白能显著抑制烧伤血清诱导的内皮细胞通透性增强^[2]。提示 p38/I-钙调素结合蛋白途径是烧伤后血管内皮细胞骨架重排和通透性变化的重要机制。内皮细胞纤维状肌动蛋白的重排受肌动蛋白结合蛋白的调节, 其中热休克蛋白 27 (HSP27) 调节肌动蛋白的聚合过程。在正常细胞中, HSP27 与球状肌动蛋白单体结合, 防止肌动蛋白聚合; 磷酸化后 HSP27 失去与球状肌动蛋白结合的能力, 导致纤维状肌动蛋白的聚合增强。HSP27 是 p38 激酶的已知底物^[13]。p38 激酶是否通过磷酸化 HSP27 参与烧伤后血管内皮骨架重组和应力纤维形成, 值得深入研究验证。

2.3 其他信号分子的作用

研究表明, 蛋白激酶 C (PKC) 参与对烧伤后血管内皮黏附连接的调节。烧伤血清可诱导血管内皮细胞黏附连接分子 β 连环蛋白和内皮钙黏蛋白的丝氨酸磷酸化, 导致 2 个连接分子在细胞周边的分布断裂、蛋白内化, 致使细胞间裂隙形成和通透性增强; 抑制 PKC 可降低 2 个连接分子的丝氨酸磷酸化水平, 逆转内皮通透性增高^[5]。已有研究观察到 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 与烧伤后血管内皮屏障功能障碍的关系。TLR 是机体免疫反应的重要分子, 其中 TLR-4 在细胞识别 LPS 方面发挥关键作用, 被认为是组织损伤或感染的生物感受器^[14]。烧伤大鼠伤后 TLR-4 的反应性显著增强, 使其受到 LPS 攻击后出现高死亡率^[15]。在 25% TBSA III 度烧伤大鼠模型中, TLR-4 基因敲除使肠系膜微血管通透性在伤后 60 ~ 90 min 降低 40% ~ 50%, 其作用与抑制白细胞的黏附贴壁有关^[16]。

3 问题与展望

尽管烧伤后早期血管通透性变化的发病机制仍未详尽阐明, 但这方面的研究一直在不断推进, 从起初认识相关诱发因素、细胞基础, 到近年初步揭示其分子基础和机制, 人们对烧伤后血管通透性变化发病机制的认识进一步深入, 为早日攻克这一医学难题带来曙光。回顾过往研究可以肯定的是, 烧伤后早期血管通透性变化除与内皮屏障结构基础的实质性破坏有关外, 更涉及内皮屏障的调节功能障碍。因此, 对其临床防治不但要注重早期细胞保护, 更要加强对内皮细胞功能的调节。可喜的是, 已有不少研究包括临床研究, 尝试采用药物和非药物手段, 或多或少改善了烧伤局部和全身的血管通透性, 减少了体液渗出和休克期补液量。这些方法包括应用炎症介质受体的拮抗剂、抗氧化剂以及冷疗、血浆置换和早期清创等^[17-20]。近年对烧伤后血管内皮屏障功能障碍分子机制的深入研究, 又为药物调控内皮细胞功能提供了一些新的作用靶点。相信在同仁的不懈努力下, 有望最终形成防治烧伤后早期血管高通透性的临床新举措, 从而减轻严重烧伤后早期损害, 推动烧伤整体救治水平进一步提高。

参考文献

- [1] Murphy JT, Duffy S. ZO-1 redistribution and F-actin stress fiber formation in pulmonary endothelial cells after thermal injury. *J Trauma*, 2003, 54(1):81-89; discussion 89-90.
- [2] Chu ZG, Zhang JP, Song HP, et al. p38 MAP kinase mediates burn serum-induced endothelial barrier dysfunction: involvement of F-actin rearrangement and I-caldesmon phosphorylation. *Shock*, 2010, E1 [2010-08-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. [published online ahead of print February 10, 2010].
- [3] Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, et al. Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor-alpha alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability. *Surgery*, 2000, 128(2):259-265.
- [4] 黄巧冰. 内皮细胞屏障与烧伤后血管通透性的关系及机制. *中华烧伤杂志*, 2007, 23(5):324-326.
- [5] Tinsley JH, Breslin JW, Teasdale NR, et al. PKC-dependent, burn-induced adherens junction reorganization and barrier dysfunction in pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289(2):L217-223.
- [6] Liu X, Wu W, Li Q, et al. Effect of sphingosine 1-phosphate on morphological and functional responses in endothelia and venules after scalding injury. *Burns*, 2009, 35(8):1171-1179.
- [7] Reyes R, Guo M, Swann K, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption after peripheral thermal injury in rats. *J Neurosurg*, 2009, 110(6):1218-1226.
- [8] Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng*, 2001, 29(2):247-278.
- [9] Tinsley JH, Teasdale NR, Yuan SY. Myosin light chain phos-

phorylation and pulmonary endothelial cell hyperpermeability in burns. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286 (4): L841-847.

[10] Reynoso R, Perrin RM, Breslin JW, et al. A role for long chain myosin light chain kinase (MLCK-210) in microvascular hyperpermeability during severe burns. *Shock*, 2007, 28 (5): 589-595.

[11] Zheng HZ, Zhao KS, Zhou BY, et al. Role of Rho kinase and actin filament in the increased vascular permeability of skin venules in rats after scalding. *Burns*, 2003, 29 (8): 820-827.

[12] Wang S, Huang Q, Guo X, et al. The P38alpha and P38delta MAP kinases may be gene therapy targets in the future treatment of severe burns. *Shock*, 2010, 34 (2): 176-182.

[13] Kayyali US, Pennella CM, Trujillo C, et al. Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2. *J Biol Chem*, 2002, 277 (45): 42596-42602.

[14] Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, et al. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 2006, 26 (5): 430-437.

[15] Murphy TJ, Paterson HM, Kriynovich S, et al. Linking the "two-hit" response following injury to enhanced TLR4 reactivity. *J Leukoc Biol*, 2005, 77 (1): 16-23.

[16] Breslin JW, Wu MH, Guo M, et al. Toll-like receptor 4 contributes to microvascular inflammation and barrier dysfunction in thermal injury. *Shock*, 2008, 29 (3): 349-355.

[17] Klein MB, Edwards JA, Kramer CB, et al. The beneficial effects of plasma exchange after severe burn injury. *J Burn Care Res*, 2009, 30 (2): 243-248.

[18] Demling RH. The burn edema process: current concepts. *J Burn Care Rehabil*, 2005, 26 (3): 207-227.

[19] Kremer T, Harenberg P, Hernekamp F, et al. High-dose vitamin C treatment reduces capillary leakage after burn plasma transfer in rats. *J Burn Care Res*, 2010, 31 (3): 470-479.

[20] Whaley JG, Tharakan B, Smith B, et al. (-)-Deprenyl inhibits thermal injury-induced apoptotic signaling and hyperpermeability in microvascular endothelial cells. *J Burn Care Res*, 2009, 30 (6): 1018-1027.

(收稿日期:2010-08-12)
(本文编辑:莫愚)

· 肠道通透性与营养进展链接 ·

维生素 (E、C) 及锌补充剂减弱烧伤患儿氧化应激的临床研究

研究选择烧伤后 48 h 内、致伤面积大于 10% TBSA 包括 1 个以上 II 度烧伤部位的 32 例患儿,随机分为无抗氧化剂补充的对照组 (15 例) 及抗氧化剂补充组 (17 例),于后组患儿入院第 2 天给予抗氧化剂,包括标准摄入量 1.5 倍的维生素 C、1.35 倍的维生素 E、2 倍的锌。结果给药前补充组与对照组丙二醛浓度分别为 $(4.5 \pm 1.1) \text{ nmol/mL}$ 、 $(2.7 \pm 1.3) \text{ nmol/mL}$,用药 7 d 后补充组患儿脂质过氧化水平 $[(3.1 \pm 1.0) \text{ nmol/mL}]$ 明显下降 ($P < 0.01$),与对照组 $[(2.5 \pm 1.2) \text{ nmol/mL}]$ 比较差异无统计学意义;补充组的伤口愈合时间为 5.3 d,明显短于对照组的 7.5 d,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。研究者认为,抗氧化剂的补充可以让烧伤患儿保持低水平脂质过氧化,明显提升机体抗氧化防御能力,从而应对烧伤后应激产生的氧自由基并加快伤口愈合。

卢鸿瑞,编译自《J Burn Care Res》,2009,30(5):859-866;韩春茂,审校

神经节苷脂在肠道中的保护作用

采用 32 只 SD 雄性大鼠,随机分为喂养组和对照组。喂养组持续给予含神经节苷脂 (GGs) 饲料 2 周,向大鼠腹腔注射 LPS (大肠杆菌, O111: B4 株),注射后 6 h 采样待测;对照组除给予无 GGs 饲料外操作同上。结果喂养组大鼠肠黏膜 IL-10 含量是对照组的 32 倍 ($P < 0.0001$),血浆 IL-10 含量是对照组的 2.4 倍 ($P < 0.001$),血浆中总体 NO 的生成量明显降低;在对照组大鼠肠道内可见免疫荧光染色阳性的诱导型 NO 合酶,喂养组大鼠染色为阴性且肠道紧密连接蛋白咬合蛋白表达丰富;共聚焦显微镜下,喂养组大鼠肠道组织染色展现出更加完整的细胞间紧密连接蛋白。研究者认为,服用 GGs 可能抑制了急性炎症介质和 NO 产生,伴随抗炎细胞因子 IL-10 升高,进而防止紧密连接蛋白咬合蛋白降解,保护肠上皮细胞。

卢鸿瑞,编译自《J Pediatr Gastroenterol Nutr》,2010,50(3):321-328;韩春茂,审校

己酮可可碱通过肌球蛋白轻链激酶调控烧伤后肠道紧密连接信号

烧伤能引起肠道屏障功能损害,导致全身炎症反应综合征和 MOF。肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 参与肠道屏障功能调节,激活后能增加肠上皮通透性。研究者推测,己酮可可碱 (PTX) 可通过减轻 MLCK 活化而降低严重烧伤后肠道通透性。他们利用 BALB/c 雄性小鼠制作 30% TBSA 烧伤模型,随机分为腹腔注射生理盐水组和 PTX (12.5 mg/kg) 组,另设正常对照组。用 ELISA 法检测肠组织 TNF- α 含量,免疫印迹法检测肠组织 MLCK、磷酸化核因子抑制蛋白激酶 IKK、核因子抑制蛋白 α (I κ B- α) 和 NF- κ B p65 蛋白表达。结果显示:烧伤后小鼠肠道 MLCK 水平是正常对照组的 3 倍,PTX 组小鼠 MLCK 水平与正常对照组比较无明显差异,烧伤诱导的肠上皮通透性下降;同正常对照组相比,PTX 组减少了细胞质 IKK、I κ B- α 磷酸化和 NF- κ B p65 细胞核移位 ($P < 0.05$)。研究者认为,烧伤后采用 PTX 治疗可以减弱紧密连接蛋白 MLCK 的活性,从而降低 TNF- α 合成和 NF- κ B 活性,通过减轻烧伤后肠道屏障的破坏程度达到治疗目的。

卢鸿瑞,王裴,编译自《J Trauma》,2009,66(1):17-25;韩春茂,王凤君,审校