

· 烧伤后脏器损害 ·

高迁移率族蛋白 B1 在严重烧伤延迟复苏大鼠急性肺损伤中的作用

梁勋 陈旭林 刘晟 王飞 孙立 王仁素

急性肺损伤能引起机体缺氧,导致远隔烧伤部位的脏器损害和功能不全。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为重要的促炎性细胞因子,在炎症疾病发生过程中的作用日益受到关注^[1]。新近研究显示, HMGB1 参与了 LPS 诱导的急性肺损伤发生^[2]。HMGB1 在严重烧伤延迟复苏后急性肺损伤发生中的作用如何,目前尚不明确。本文对此进行有关实验研究。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及处理

健康清洁级成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠 56 只,体质量 200 ~ 250 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。大鼠常温饲养 1 周,按照随机数字表法分为正常对照组(8 只)、烧伤延迟复苏组(24 只)和烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组(24 只)。致伤前大鼠腹腔注射 30 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,后 2 组大鼠于恒温水烫仪中用 98 °C 热水浸浴背部 12 s,造成 30% TBSA III 度烧伤(经病理切片证实,以下称烧伤);正常对照组大鼠用室温水浴模拟致伤。伤后 6、12、36 h,烧伤延迟复苏组大鼠腹腔注射乳酸林格液 2 mL · kg⁻¹ · TBSA⁻¹行液体复苏,烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组腹腔注射含正丁酸钠(美国 Sigma-Aldrich 公司)的乳酸林格液(两者体积比为 1:150),正丁酸钠每次剂量为 400 mg/kg。正常对照组大鼠未行其他处理。2 组烧伤大鼠分别于伤后 12、24、48 h(每时相点取 8 只)经心脏取血处死,行支气管肺泡原位灌洗,取肺组织标本进行如下检测;正常对照组大鼠行相同操作。

1.2 检测指标

1.2.1 肺组织病理学观察 肺脏组织标本常规石蜡包埋,切片,HE 染色。参照文献[3],根据肺间质水肿、肺泡内出血、中性粒细胞浸润 3 项指标进行肺损伤程度评分(0 分为正常、1 分为轻度、2 分为中度、3 分为重度、4 分为特重度),计算总分。

1.2.2 肺脏含水量 采用干湿质量法检测。取右上肺标本,用滤纸吸尽表面残留血液后,称取湿质量;放入 75 °C 烤箱内烘烤 72 h,称取干质量。肺脏含水量(%) = (湿质量 - 干质量) ÷ 湿质量 × 100%

1.2.3 血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中 TNF-α 和 IL-8 的含量 采用 ELISA 法进行测定。TNF-α 和 IL-8 的 ELISA 检测试剂盒均购自上海拜沃生物科技有限公司,操作

严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 肺脏中 HMGB1 蛋白表达 采用蛋白质印迹法检测。将肺组织置于不锈钢网上,加入 4 倍体积 4 °C 预冷的细胞裂解液,研磨制成匀浆。超声裂解,于 4 °C 下 900 × g 离心 10 min,收集上清液,采用二辛丁酸法测定蛋白浓度后进行蛋白质印迹法检测。采用兔抗 HMGB1 的多克隆抗体(稀释比为 1:1000,美国 Cell Signaling Technology 公司)作为一抗,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(稀释比为 1:2000,上海百沃科技有限公司),内参照为 β 肌动蛋白。应用 GK-330C* 凝胶成像分析系统(美国 United Biotechnology 公司)分析蛋白条带的灰度值,3 组大鼠的灰度值与内参照灰度值之比即为 HMGB1 的相对表达量。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,多重比较采用 LSD 或 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学观察

正常对照组大鼠肺间质无明显充血、出血、炎性细胞浸润。随着病程进展,烧伤延迟复苏组大鼠出现严重肺间质水肿、肺泡内出血、肺泡毛细血管壁破裂和炎性细胞浸润等病理学改变。于相同时相点下,烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组大鼠肺脏的病理学损害明显轻于烧伤延迟复苏组。见图 1。烧伤延迟复苏组大鼠伤后 12、24、48 h 肺脏的病理学总分分别为(3.9 ± 0.8)、(6.1 ± 1.2)、(8.6 ± 1.7)分,均显著高于正常对照组[(0.5 ± 0.5)分, *F* = 55.996, *P* = 0.000]。烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组大鼠伤后 12、24、48 h 肺脏的病理学总分分别为(2.6 ± 0.9)、(2.8 ± 0.8)和(3.3 ± 0.7)分,明显低于同时相点的烧伤延迟复苏组(*t* 值分别为 3.171、6.548、8.228, *P* 值均小于 0.01)。

2.2 肺脏含水量的变化

正常对照组大鼠肺脏含水量为(74.2 ± 4.1)%;烧伤延迟复苏组大鼠伤后 12、24、48 h 肺脏含水量分别为(78.3 ± 2.8)%、(81.8 ± 4.6)%和(84.6 ± 3.6)% ,均明显高于正常对照组(*F* = 3.878, *P* < 0.01)。烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组大鼠伤后 12、24、48 h 肺脏含水量分别为(74.9 ± 2.2)%、(75.9 ± 3.6)%、(78.0 ± 8.7)% ,均显著低于相同时相点的烧伤延迟复苏组(*t* 值分别为 2.271、2.623、2.769, *P* 值均小于 0.05)。

2.3 血清和 BALF 中 TNF-α 与 IL-8 含量的变化

烧伤延迟复苏组大鼠伤后 12、24、48 h 血清和 BALF 中

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2012.03.008

基金项目:国家自然科学基金(30872687)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院烧伤科

通信作者:陈旭林,Email:okcxl@126.com,电话:0551-2922332

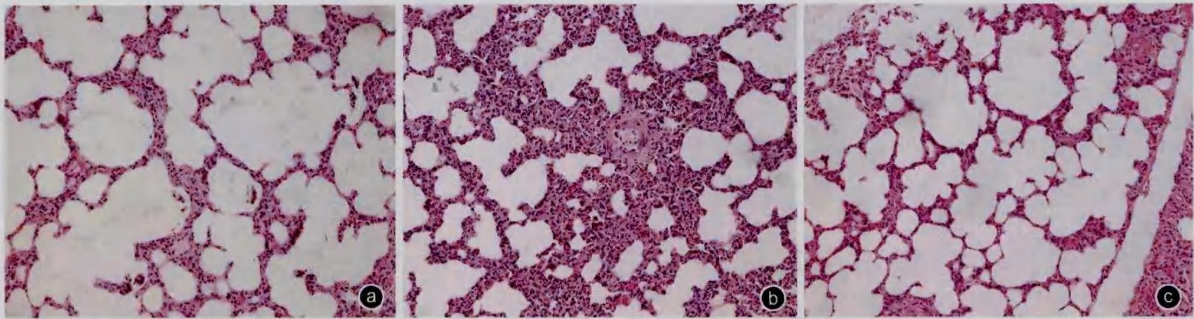


图 1 3 组大鼠伤后 24 h 肺组织病理学变化 HE × 100。a. 正常对照组大鼠肺间质无明显充血、出血、炎性细胞浸润; b. 烧伤延迟复苏组大鼠出现严重肺间质水肿、肺泡内出血、肺泡毛细血管壁破裂和炎性细胞浸润; c. 烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组大鼠肺组织病理学改变明显轻于烧伤延迟复苏组

TNF- α 、IL-8 含量均显著高于正常对照组及烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组; 烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组大鼠大多数时相点血清和 BALF 中 TNF- α 、IL-8 的含量与正常对照组接近。见表 1。

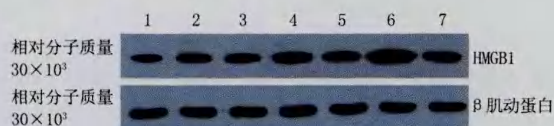
表 1 3 组大鼠血清和 BALF 中 TNF- α 和 IL-8 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α		IL-8	
	血清	BALF	血清	BALF
正常对照组	4.4 ± 1.4	18.6 ± 6.8	55.9 ± 35.2	6.8 ± 3.2
烧伤延迟复苏组				
伤后 12 h	9.6 ± 6.7 ^a	24.3 ± 6.6	133.8 ± 23.6	14.9 ± 5.2 ^a
伤后 24 h	10.0 ± 2.6 ^a	30.4 ± 19.7 ^a	193.3 ± 86.1 ^b	14.9 ± 7.1 ^a
伤后 48 h	12.9 ± 7.0 ^b	34.5 ± 12.0 ^b	434.2 ± 135.9 ^b	19.2 ± 10.1 ^b
烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组				
伤后 12 h	5.4 ± 1.5 ^c	21.7 ± 4.3	106.0 ± 22.4	6.7 ± 2.5 ^c
伤后 24 h	6.4 ± 1.4 ^c	22.8 ± 5.2	57.1 ± 16.9 ^d	10.4 ± 5.1
伤后 48 h	8.1 ± 1.5 ^c	23.7 ± 7.7 ^c	43.9 ± 26.6 ^d	14.6 ± 6.6 ^c
F 值	3.550	2.795	21.435	3.700
P 值	0.007	0.024	0.000	0.005

注: BALF 为支气管肺泡灌洗液; 正常对照组大鼠 8 只, 2 组烧伤大鼠各时相点鼠数为 8 只; 表格中两两比较的统计学量值为统计软件自动略去; 与正常对照组比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01; 与烧伤延迟复苏组比较, ^cP < 0.05, ^dP < 0.01

2.4 肺脏 HMGB1 蛋白表达的变化

烧伤延迟复苏组大鼠伤后 12、24、48 h 肺脏 HMGB1 蛋白灰度值之比分别为 1.28、1.62 和 2.17。烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组大鼠伤后 12、24、48 h 肺脏 HMGB1 蛋白灰度值之比分别为 1.27、1.41、1.33, 其中后 2 个时相点 HMGB1 蛋白灰度值之比明显低于烧伤延迟复苏组。见图 2。



注: 1. 正常对照组; 2、4、6 分别为烧伤延迟复苏组伤后 12、24、48 h; 3、5、7 分别为烧伤延迟复苏 + 正丁酸钠组伤后 12、24、48 h

图 2 3 组大鼠肺脏高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的蛋白表达

3 讨论

HMGB1 是一种广泛存在、高度保守的 DNA 结合蛋白, 在 DNA 重组、修复、复制和基因转录中起重要作用。在炎症物质刺激下固有免疫细胞可大量表达 HMGB1, 它们被分泌到细胞外以诱导单核巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞等合成并分泌炎症介质。HMGB1 既是炎症早期的启动者, 又是炎症晚期的促进者^[3]。正丁酸钠是一种存在于自然界的短链四碳脂肪酸盐, 也是 HMGB1 的抑制剂^[4]。

研究表明, 严重烧伤后 24 h HMGB1 基因表达明显增多, 且一直持续至伤后 72 h, 采用丙酮酸乙酯抑制 HMGB1 的表达, 能显著降低大鼠体内炎症介质水平, 对烧伤后肝脏和肾脏具有保护作用^[5-6]。该结果显示, HMGB1 介导了严重烧伤全身炎症反应过程, 参与了烧伤后全身多脏器损伤。本实验结果显示, 烧伤延迟复苏后 12 h 肺脏 HMGB1 表达开始逐渐上升, 使用正丁酸钠可以抑制该变化, 同时明显降低肺脏含水量, 明显减轻肺脏病理性损害。这一结果提示, HMGB1 参与了严重烧伤延迟复苏急性肺损伤的发生。

促炎性细胞因子 TNF- α 不仅可引起其他细胞因子的释放, 而且可促进中性粒细胞和内皮细胞之间的黏附以及中性粒细胞的移行, 在严重烧伤后急性肺损伤的发生中起重要作用。IL-8 属于超基因家族, 其主要功能是激活、趋化中性粒细胞到达炎症局部, 表达黏附分子, 释放蛋白水解酶及产生活性氧代谢产物, 引起组织损伤, 是介导急性肺损伤发生的另一重要炎症介质和免疫调节因子。本实验结果提示, HMGB1 介导了严重烧伤延迟复苏肺脏 TNF- α 和 IL-8 的产生, 并可能由此途径参与了急性肺损伤的发生。

参考文献

- [1] Wolfson RK, Chiang ET, Garcia JG. HMGB1 induces human lung endothelial cell cytoskeletal rearrangement and barrier disruption. *Microvasc Res*, 2011, 81(2): 189-197.
- [2] Hidaka S, Iwasaka H, Hagiwara S, et al. Gabexate mesilate inhibits the expression of HMGB1 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Surg Res*, 2011, 165(1): 142-150.
- [3] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162.
- [4] Nguyen LN, Lopes LC, Cordero RJ, et al. Sodium butyrate inhib-

its pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(11):2573-2580.

肾组织高迁移率族蛋白 B1 表达和急性肾损伤的影响. 中华外科杂志, 2007, 45(17):1210-1213.

[5] Huang LF, Yao YM, Dong N, et al. Association of high mobility group box-1 protein levels with sepsis and outcome of severely burned patients. Cytokine, 2011, 53(1):29-34.

(收稿日期:2012-01-16)

[6] 王强, 姚咏明, 王彦博, 等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠

(本文编辑:莫愚)

高压电烧伤大鼠血清内皮素 1 与一氧化氮变化及乌司他丁的干预作用

张庆富 刘鹏 周慧敏

微血管是电烧伤的主要靶组织之一,微血管损伤在电烧伤渐进性损伤过程中起重要作用^[1]。内皮素 1 和 NO 是重要的血管活性因子,在微血管功能调节方面发挥重要作用,因而探讨高压电烧伤后血清内皮素 1 和 NO 的变化规律,对于认识高压电对机体微血管损伤,尤其是渐进性损伤机制有重要意义。乌司他丁(UTI)作为一种广泛的酶活性抑制剂,已应用于烧伤感染的治疗,并取得了较好疗效。本实验通过复制高压电烧伤大鼠模型,进一步探讨内皮素 1、NO 在高压电对机体微血管损伤过程中的作用及 UTI 的疗效。

肢)处创面面积约 1 cm × 1 cm,深达骨骼。(2)假伤组致假伤前 15 min 取 8 只大鼠,同上行心脏采血;余下 40 只大鼠除电路不通电流致假伤外,其他处理与电伤组一致。(3)3 组中致伤的各 40 只大鼠给药方法及采血:伤后 2 min 内,腹腔注射 2 mL 生理盐水(假伤组、电伤组)或者 2 mL UTI 注射液(2 × 10⁴ U/kg,治疗组)。伤后 5 min、1 h、2 h、4 h、8 h 同上进行心脏采血(每组每时相点 8 只),分离血清待检。

1 材料与方 法

1.3 内皮素 1 及 NO 含量检测

1.1 主要仪器与试剂

统一采用 ELISA 双抗体夹心法检测上述血清标本中内皮素 1 含量,采用亚硝酸盐和硝酸盐法检测 NO 含量,具体操作按照试剂盒说明书进行。计算内皮素 1/NO 比值。

TC-30-20KVA 型调压器和 YDJ-10KVA 型实验变压器(武汉市得福电气有限公司),721 型分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),MK3 型酶标仪(美国热电公司),HPS-160 型生化培养箱(哈尔滨市东明医疗仪器厂)。内皮素 1 检测试剂盒(上海史瑞克生物科技有限公司),NO 检测试剂盒(美国 Promega 公司),硫化钠粉剂(天津市永大化学试剂开发中心),UTI 注射液(广东天普生化医药股份有限公司)。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行两因素析因设计的方差分析和 LSD 检验(软件自动略去该统计量值), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2 动物分组、模型制作与标本采集

2 结 果

河北医科大学实验动物中心提供成年清洁级 SD 大鼠 144 只,雌雄不拘,体质量 295 ~ 360 g。按随机数字表法将大鼠分为假伤组、电伤组和治疗组,每组 48 只。3 组大鼠实验前日左前肢、右后肢外涂 80 g/L 硫化钠脱毛并禁食。实验当日经腹腔按 3 mL/kg 剂量注射 10 g/L 戊巴比妥钠,待其麻醉后仰卧位固定于实验操作台上。

2.1 血清内皮素 1 含量

(1)电伤组内皮素 1 含量总体明显高于假伤组。电伤组内皮素 1 含量受伤后时间变化的影响,伤后 1 ~ 8 h 均显著高于本组伤前 15 min,且呈逐渐增高趋势。(2)治疗组内皮素 1 含量总体明显低于电伤组。治疗组内皮素 1 含量受伤后时间变化的影响,伤后 1 ~ 8 h 均显著高于本组伤前 15 min,且呈逐渐增高趋势。见表 1。

(1)电伤组和治疗组致伤前 15 min 各取 8 只大鼠,手术开胸,在直视下由心脏采血,离心后取上清液,置于 -80 °C 冰箱保存。2 组余下的各 40 只大鼠参照文献[2]方法制作模型,电击时升压器输出电压为 2 kV,通电时间为 3 s,电流强度为(1.80 ± 0.15) A。电流入口(左前肢)和出口(右后

2.2 血清 NO 含量

(1)电伤组 NO 含量与假伤组比较,总体差异无统计学意义(P 值均大于 0.05)。电伤组 NO 含量不受伤后时间变化的影响。(2)治疗组 NO 含量总体明显高于电伤组。治疗组 NO 含量不受伤后时间变化的影响。见表 2。

2.3 血清内皮素 1/NO 比值

(1)电伤组内皮素 1/NO 比值总体明显高于假伤组。电伤组内皮素 1/NO 比值受伤后时间变化的影响,伤后 1 ~ 8 h 均显著高于本组伤前 15 min,且呈逐渐增高趋势。(2)治疗组内皮素 1/NO 比值总体低于电伤组。治疗组内皮素 1/NO 比值受伤后时间变化的影响,伤后 1 ~ 8 h 均显著高于本组伤前 15 min,且呈逐渐增高趋势。见表 3。

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2012.03.009

基金项目:河北省自然科学基金(302551)

作者单位:050031 石家庄,河北医科大学第一医院烧伤整形外科

通信作者:周慧敏,Email:zhouhuimindocor@sohu.com,电话:

15132169900