

· 论 著 ·

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体及其受体在烧伤大鼠胸腺组织中的表达

冷向锋 王德昌 张秋 冯永强 王坤 肖虎 霍然 薛文君



【摘要】 目的 了解肿瘤坏死因子(TNF)相关的凋亡诱导配体(TRAIL)及其受体在严重烧伤大鼠胸腺组织细胞异常凋亡中的作用。方法 将 50 只 Wistar 大鼠随机分为假伤组(模拟烧伤)10 只和烧伤组 40 只(设伤后 4、12、24、48 h 4 个时相点)。应用膜联蛋白 A5-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染法,观察大鼠胸腺组织中细胞凋亡的情况;反转录-聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测 TRAIL 的死亡受体 5(DR5)、DR4、诱骗受体 1(DcR-1)、DcR2 在大鼠胸腺组织中的表达。结果 与假伤组大鼠细胞凋亡率[(6.7 ± 0.8)%]比较,烧伤组于伤后 4 h[(17.1 ± 0.4)%]起增高,12 h 时[(25.2 ± 1.1)%]达高峰,48 h 时仍明显高于假伤组(P < 0.05)。烧伤组大鼠胸腺组织中 DR5 的表达显著高于假伤组,DcR2 的表达则显著低于假伤组;其余受体的表达组间相似。结论 严重烧伤后早期大鼠胸腺组织的细胞凋亡明显增加,且胸腺组织中 DR5 和 DcR2 的表达异常,提示 TRAIL 凋亡途径可能参与了病理性细胞凋亡过程。

【关键词】 烧伤; 肿瘤坏死因子类; 胸腺; 细胞凋亡; 配体

Expression of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand and its receptor in thymus during early post-burn stage in rat with severe burns LENG Xiang-feng, WANG De-chang, ZHANG Qiu, FENG Yong-qiang, WANG Kun, XIAO Hu, HUO Ran, XUE Wen-jun. Department of Burns and Plastic Surgery, the Medical School Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, P. R. China

Corresponding author: WANG De-chang, Email: lxzfqn@yahoo.com.cn, Tel: 0531-85186369

【Abstract】 Objective To investigate the effect of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptor on apoptosis in thymus during early post-burn stage in rat with severe burns. Methods Fifty Wistar rats were randomly divided into sham scald group (SS, n = 10) and burn group (n = 40). The apoptosis in thymus in rats was detected with annexin V/FITC-PI double staining at 4, 12, 24, 48 post-burn hours (PBH). The expression of TRAIL death receptor DR5, DR4 and its decoy receptor DcR1, DcR2 in thymus were detected by RT-PCR and Western blot at above time-points. Results Compared with that in SS group (6.7 ± 0.8)%, the apoptosis in the thymus in burn group started to increase at 4 PBH [(17.1 ± 0.4)%], peaked at 12 PBH [(25.2 ± 1.1)%], and it was still evidently higher than that in SS group at 48 PBH (P < 0.05). There was no obvious difference in the apoptosis rate in rats in burn group among all the time-points. The expression of DR5 in burn group at each time-points was significantly higher than those in SS group, while that of DcR2 showed an opposite tendency (P < 0.05). The expression of DR4, DcR1 was similar in both groups. Conclusion The marked increase in apoptosis rate in rat thymus at early post-burn stage, and the significant change in the expression of DR5 and DcR2 show that TRAIL pathway may participate in apoptosis.

【Key words】 Burns; Tumor necrosis factors; Thymus gland; Apoptosis; Ligand

肿瘤坏死因子(TNF)相关的凋亡诱导配体(TRAIL),是继 FasL 之后 TNF 家族中的新成员^[1,2]。它在体内分布广泛,具有快速、有效诱导体内异常细胞凋亡,而不影响正常细胞功能的独特凋亡诱导特性。TRAIL 介导的与凋亡有关的受体有 4

种,包括死亡受体 4(DR4)、DR5 和诱骗受体 1(DcR1)、DcR2。TRAIL 作为一种新型凋亡分子,是否参与了严重烧伤后胸腺细胞的异常凋亡过程,笔者对此进行了相关的实验研究。

1 材料与方 法

1.1 动物来源与主要材料

成年近交系 Wistar 大鼠 50 只,2~3 月龄,雌雄各半,由山东省立医院实验动物中心提供。膜联蛋白 A5-异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)产自

作者单位:250021 青岛,山东省立医院烧伤整形科[冷向锋(现在青岛大学医学院附属医院烧伤整形科,266003)、王德昌、冯永强、王坤、肖虎、霍然、薛文君];山东大学药学院组合化学研究所(张秋)

通讯作者:王德昌,Email:lxzfqn@yahoo.com.cn,电话:0531-85186369

法国 Immunotech 公司,由深圳晶美生物工程有限公司分装。兔抗大鼠 TRAIL、DR4 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。羊抗大鼠 DR5、DcR1、DcR2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。Trizol 试剂盒、Taq 酶购自上海生工生物工程有限公司。莫洛尼白血病病毒(M-MLV)反转录酶购自立陶宛 MBI 公司。流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。BioPhotometer 定量仪购自德国 Eppendorf 公司。ImageMaster VDS 凝胶电泳扫描仪购自美国 Pharmacia 公司。TRAIL 各受体的 PCR 引物^[1,3]由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 实验分组及处理

50 只 Wistar 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,将其编号后应用 Excel 软件分为假伤组 10 只和烧伤组 40 只,其中烧伤组设 4 个时相点(伤后 4、12、24、48 h),每时相点 10 只。烧伤组大鼠按文献[4]操作:用 30 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(1.3 mg/kg),剪去大鼠背部肩至髋部毛发,将无毛发区置于 98 °C 水浴中持续 10 s,造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤)。伤后立即腹腔注射 40 ml/kg 等渗盐水进行液体复苏,创面涂碘伏抗感染,每天 2 次。假伤组大鼠除将无毛发区置于 37 °C 水浴中持续 18 s 外,其余处理同烧伤组。同法麻醉 2 组大鼠,打开其胸腔,切取胸腺组织。

1.3 膜联蛋白 A5-FITC/PI 双染法检测严重烧伤后早期大鼠胸腺组织细胞的凋亡

以预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗胸腺组织,并去除脂肪及坏死组织。将胸腺组织剪碎,转移至 150 目钢网研磨;以 300 目钢网过滤细胞悬液,加入适量 PBS 混悬。离心半径 8.5 cm,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入适量冷 PBS 同上离心 5 min,弃上清液。取 100 μl 细胞悬液加入 5 ml 试管中,并加入 1 μl 膜联蛋白 A5-FITC 和 5 μl PI(20 μg/ml),将试管置冰上避光孵育 10 min。用去离子水按体积比 1:3 稀释结合缓冲液后,向上述试管加 400 μl 预冷的结合缓冲液,轻轻混匀后再加入 400 μl PBS,上流式细胞仪分析并计算凋亡率。

1.4 反转录-PCR 检测严重烧伤后早期大鼠胸腺组织中 TRAIL 受体的表达

参照试剂盒说明书提取 TRAIL 受体的 RNA。以 1 μg RNA 为模板、Oligo(dT)15 为引物,在 20 μl 反应体系内,加入 5 倍缓冲液 4 μl、脱氧核苷三磷酸 20 nmol、核糖核酸酶抑制剂 20 U 及 M-MLV 反转录酶 200 U,于 42 °C 进行反转录反应 1 h,置于 70 °C

水浴中 10 min,于 4 °C 下保存。参照文献[5]进行 PCR,以 β 肌动蛋白为内参照。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后,采用凝胶电泳扫描仪进行扫描,以 TRAIL 受体与 β 肌动蛋白的平均吸光度(A)值之比,表示 TRAIL 受体的相对表达强度。

1.5 蛋白质印迹(Western blot)法检测严重烧伤后早期大鼠胸腺组织中 TRAIL 及其受体的表达

应用 RIPA 裂解液抽提大鼠胸腺组织的总蛋白,以 4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉法测定蛋白浓度,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot。分别检测内参照 β 肌动蛋白和 TRAIL 及其受体 DR4、DR5、DcR1 和 DcR2 在胸腺组织中的表达。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件。3 组以上计量资料的均数比较,差异有统计学意义时,两两之间采用 q 检验。

2 结果

2.1 严重烧伤后早期大鼠胸腺组织细胞的凋亡率

假伤组大鼠细胞凋亡率为(6.7 ± 0.8)%;与假伤组比较,烧伤组大鼠于伤后 4 h[(17.1 ± 0.4)%]起增高,12 h[(25.2 ± 1.1)%]达高峰,24 h 时为(22.5 ± 0.5)%,48 h 为(21.9 ± 0.9)%,均明显高于假伤组(P < 0.05)。烧伤组各时相点之间比较,差异无统计学意义(P > 0.05)。

2.2 反转录-PCR 检测严重烧伤后早期大鼠胸腺组织中 TRAIL 受体的表达

烧伤组大鼠各时相点胸腺组织中 DR5 的表达均高于假伤组[(0.54 ± 0.11), P < 0.05],DcR2 的表达则低于假伤组[(1.36 ± 0.10), P < 0.05]。见表 1,图 1。

表 1 两组大鼠胸腺组织中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	死亡受体 4	死亡受体 5	诱骗受体 1	诱骗受体 2
假伤组	10	0.85 ± 0.14	0.54 ± 0.11	1.40 ± 0.15	1.36 ± 0.10
烧伤组					
伤后 4 h	10	0.90 ± 0.10	0.88 ± 0.08 ^a	1.50 ± 0.12	0.99 ± 0.08 ^a
伤后 12 h	10	0.84 ± 0.12	0.97 ± 0.10 ^a	1.37 ± 0.10	0.95 ± 0.06 ^a
伤后 24 h	10	0.88 ± 0.20	0.89 ± 0.15 ^a	1.39 ± 0.18	0.87 ± 0.14 ^a
伤后 48 h	10	0.86 ± 0.14	0.87 ± 0.09 ^a	1.42 ± 0.13	0.90 ± 0.10 ^a

注:数据以吸光度值之比表示;与假伤组比较,a: P < 0.05

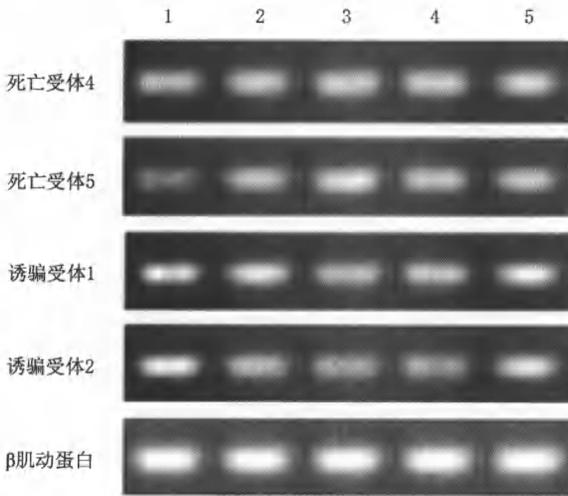


图 1 反转录-PCR 检测大鼠肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的受体表达。1. 假伤组; 2. 烧伤组伤后 4 h; 3. 烧伤组伤后 12 h; 4. 烧伤组伤后 24 h; 5. 烧伤组伤后 48 h

2.3 Western blot 检测严重烧伤后早期大鼠胸腺组织中 TRAIL 及其受体的表达

烧伤组伤后 12 h, 胸腺组织中 DR5 的表达升高, 48 h 时仍高于假伤组; 烧伤组伤后 4 h DcR2 的表达低于假伤组, 24 h 时其表达开始上升, 但伤后 24、48 h 仍低于假伤组。TRAIL 及其余受体的表达与假伤组相似。见图 2。

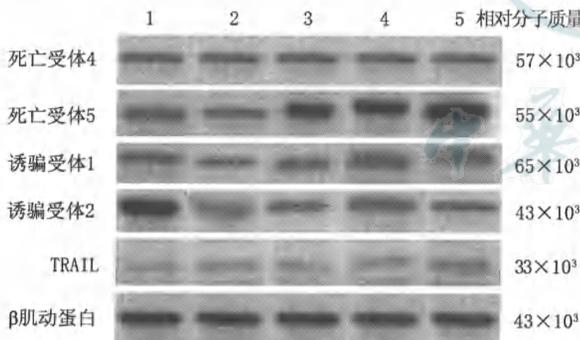


图 2 应用蛋白质印迹法分析大鼠肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 及其受体表达。1. 假伤组; 2、3、4、5 分别为烧伤组伤后 4、12、24、48 h

3 讨论

细胞凋亡又称为程序化细胞死亡, 是某些生理或病理条件下, 细胞接受某种信号的触发后, 主动发生的一连串细胞变化, 最终导致非炎症反应细胞死亡过程。它可及时清除受损及危险的细胞, 对维持机体的正常功能十分重要。

细胞凋亡在严重烧伤后免疫功能紊乱过程中发挥着重要作用。烧伤后机体内细胞凋亡的发生是一种普遍现象。其中淋巴组织和器官最易发生细胞凋

亡, 包括胸腺、脾脏、骨髓、淋巴结及全身散在的淋巴组织等。这可能是创伤后免疫功能低下的直接原因。阳剑波等^[6]观察到, 烧伤诱导胸腺细胞发生严重的病理性凋亡, 随即可致胸腺萎缩。烧伤、感染等严重损伤可诱导主要免疫细胞之一的巨噬细胞凋亡, 导致其免疫功能下降^[7]。严重烧伤后, 中性粒细胞作为血液循环中比例最大、最早到达炎症反应部位的细胞, 也通过细胞凋亡的方式被巨噬细胞识别而吞噬。严重烧伤后机体的免疫功能发生紊乱, 这是机体易发生全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭, 并导致患者死亡的主要原因^[8]。

严重烧伤后机体免疫功能紊乱, 主要表现为细胞免疫功能降低^[9]。胸腺作为 T 淋巴细胞成熟和释放的场所, 具有维持细胞免疫功能稳定和外围 T 淋巴细胞池恒定的作用。因此研究严重烧伤后胸腺细胞的凋亡改变及发生机制有重要的临床意义。本研究检测了严重烧伤大鼠胸腺组织的细胞凋亡情况。结果表明, 伤后早期细胞凋亡异常增加, 提示其可能是引起胸腺功能降低、导致伤后机体免疫功能紊乱的原因之一, 为揭示严重烧伤后细胞免疫功能紊乱的机制提供了依据。

TRAIL 通过与靶细胞表面的受体 (DR4、DR5、DcR1、DcR2) 特异性结合而使细胞凋亡。DR4、DR5 可与 TRAIL 特异性结合, 它们具有的胞质内死亡区, 与 TNF 受体超家族其他成员类似, 可以通过死亡结构域激发和转导凋亡信号, 激活蛋白酶解级联反应, 经线粒体依赖性、非依赖性 2 条途径引发凋亡的生物学效应, 导致细胞死亡。DcR1、DcR2 的胞外区均有 2 个与 DR4、DR5 高度同源、富含半胱氨酸的重复序列, 能够与 TRAIL 结合。但是 DcR1 无胞内区, DcR2 的胞内死亡区不完整, 呈无功能的截断状态。因此 DcR1 和 DcR2 与 TRAIL 结合后均不能转导凋亡信号。

TRAIL 受体水平表达的改变, 可以在一定程度上反映被诱导凋亡的细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性。DR5 作为 TRAIL 的死亡受体, 与 TRAIL 结合可诱导细胞的凋亡, 而 DcR2 与 TRAIL 结合则可抑制该现象。严重烧伤后早期大鼠胸腺组织中 DR5 的表达增高, 而 DcR2 的表达降低, 提示 TRAIL 凋亡通路有可能参与了病理性凋亡过程。

参考文献

[1] Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al. Intracellular regulation of trail-induced apoptosis in human melanoma cells. J Immunol, 1998, 161(6): 2833 - 2840.

[2] Vindrieux D, Devonec M, Benahmed M, et al. Identification of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in adult rat ventral prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 198 (1Pt 2): 115 - 121.

[3] Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, et al. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 1998, 254 (3): 439 - 459.

[4] 刘宏, 吴雄飞, 金锡御. 缺血预适应对缺血再灌注肾脏粘附分子表达的影响. *第三军医大学学报*, 2002, 24 (3): 289 - 291.

[5] 冷向锋, 王德昌, 张秋, 等. 严重烧伤大鼠肾脏细胞凋亡及其机制的研究. *中华烧伤杂志*, 2006, 22 (2): 121 - 123.

[6] 阳剑波, 邓恭华, 尤家驷, 等. 参麦对小鼠烧伤后胸腺细胞凋亡的保护作用及机制探讨. *中国病理生理杂志*, 1998, 14 (3): 330.

[7] 罗非君, 尤家驷, 罗正曜. 休克与巨噬细胞凋亡. *国外医学生理病理科学与临床分册*, 2000, 20 (3): 210 - 212.

[8] 詹剑华. 烧伤免疫的研究现状. *实用临床医学*, 2001, 2 (3): 125 - 127.

[9] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3 (6): 673 - 682.

(收稿日期: 2006 - 04 - 20)

(本文编辑: 莫愚)

· 病例报告 ·

电烧伤并发多发性脑梗死一例

崇恩球 崔高宇 陈远 张正学

患者男, 29 岁, 高压电烧伤后 15 h 入院。查体: 意识清楚, 血压 120/68 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 创面分布于右颞顶、胸、背、右上肢、左手及双足, 烧伤总面积 14%, 其中深 II 度 2%、III 度 12% TBSA。入院后急诊行右上肢清创术, 术中见右前臂广泛性肌肉坏死, 以尺侧为重并累及尺骨, 患者拒绝行截肢术。于伤后 7、11、18 d 行右颞顶、胸、背、左手及双足创面清创植皮或局部皮瓣转移术。伤后 27 d 患者右上肢桡动脉搏动消失, 5 h 后继发右肘肱动脉破裂出血, 立即在静脉复合麻醉下行右上臂中下 1/3 截肢术。术中出血少, 血压维持在 120/75 mm Hg 左右。术后准备返回病房时, 患者突然出现呼吸停止, 血压为 0 mm Hg。立即给予气管插管、气囊辅助呼吸、肾上腺素 1 mg 静脉推注、加压补液、输血等治疗, 1 h 后患者恢复自主呼吸, 血压为 98/60 mm Hg, 但一直处于浅昏迷状态, 双侧瞳孔等大等圆, 对光反射灵敏, 双侧巴宾斯基征阳性。次日查头部 CT 示: 双侧颞叶、枕叶、左顶叶脑实质内及双侧基底节区均有小片状或大片密度减低区。予以脱水、降低颅内压、抗感染、疏通血管等治疗。5 d 后患者意识清楚, 失语, 左上肢肌力 II 级、双下肢肌力 III 级。经高压氧等治疗, 住院 95 d 患者创面愈合出院, 出院时左上

肢肌力 III 级、双下肢肌力 IV 级, 能发音但言语不清楚。

讨论 烧伤后出现脑梗死的报道较少。因热力烧伤并发脑梗死的病例已有文献报道^[1,2], 而电烧伤并发脑梗死尚为少见。热力烧伤后并发脑梗死, 其机制可能与烧伤后血液浓缩、血细胞黏附聚集、血流动力学及血液流变学指标改变等因素导致微血栓形成有关^[3]。电烧伤后出现脑梗死可能与电损伤机制有关。研究表明, 电流是沿着最低的电阻处行进, 故其穿过皮肤后可沿着血管传导, 使血管内膜细胞崩解导致栓塞^[4]。本例患者伤后 27 d 发生上肢桡动脉栓塞并出血, 继而出现意识障碍、呼吸骤停, 查头部 CT 示颅内多发性脑梗死, 除了与电烧伤机制有关, 也可能与呼吸骤停相关。

参考文献

[1] 董永盛, 余孔谋, 邱世国. 烧伤后并发脑梗塞二例. *中华烧伤杂志*, 2005, 21 (1): 74.

[2] 肖伯春, 厉建华, 周新平, 等. 特重度烧伤并发脑梗死一例. *中华烧伤杂志*, 2003, 19 (5): 270.

[3] 黎鳌. 黎鳌烧伤学. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 267 - 274.

[4] 黄跃生. 烧伤科特色治疗技术. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 229 - 230.

(收稿日期: 2006 - 07 - 17)

(本文编辑: 张红)

作者单位: 844200 新疆维吾尔自治区疏勒县, 解放军第十二医院烧伤整形科 (崇恩球、陈远、张正学); 第三军医大学西南医院神经外科 (崔高宇)

· 消息 ·

中国医师协会烧伤科医师分会成立

中国医师协会烧伤科医师分会成立大会暨第一次全体委员会议于 2007 年 4 月 16 日在山东曲阜召开。根据中国医师协会的相关规定和程序, 在中国医师协会负责人的主持和监督下, 对烧伤科医师分会会长和第一届委员会的候选人进行了无记名投票选举。选举结果: 贾赤宇教授为该分会会长, 吴军、张国安、郇京宁、韩春茂、岑瑛、陈存富教授为副会长, 郝岱峰副教授为总干事。同时选举产生了第一届委员会委员: 贾赤宇、陈存富、张国安、吴军、郇京宁、韩春茂、岑瑛、陈华德、谢卫国、付晋凤、杨晓东、彭毅志、刘毅、刘旭盛、薛宝升、雷晋、李宗瑜、朱世辉、郝岱峰。在贾赤宇会长的主持下, 第一届委员会全体委员共同讨论了关于完善组织机构、增补分会委员及发展分会会员等议题; 决定于 2007 年 11 月在广州召开中国医师协会烧伤科医师分会第一届年会。

中国医师协会烧伤科医师分会