

烧伤合并内毒素血症 TNF α mRNA 原位表达与早期心肌损害的实验研究

赵雯 刘友生 王水明 王晓东

【摘要】 目的 观察 TNF α mRNA 及其蛋白在心肌细胞的原位表达,探讨烧伤合并内毒素血症早期心肌损害的可能机制。**方法** 采用 20% TBSA III 度烧伤复合内毒素血症多脏器损害模型,时相点设为伤后 0.5、1、3、6、12、24 和 48 h。将 178 只大鼠随机分为烧伤复合内毒素注射组(烧注组)、单纯烧伤(单烧组)、单纯内毒素注射组(单注组)和正常对照组。采用光、电镜观察,ELISA 及免疫组化,原位杂交染色,等观察大鼠心肌形态功能变化、血清 TNF α 含量变化、TNF α mRNA 及其蛋白在心肌细胞的定位及分布。**结果** 烧注组致伤早期心肌出现一系列损害性改变,如波浪变性、收缩带形成、肌纤维断裂和灶性胞浆内溶解等。左室收缩压(LVSP)及室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$)显著下降($P < 0.01$)。血清 TNF α 水平于 1 h 明显升高($P < 0.01$),3~6h 达高峰。TNF α mRNA 主要定位于心肌细胞和部分炎细胞。而单因素组病变程度轻,心肌损害不明显,血清 TNF α 峰值滞后以及心肌组织 TNF α mRNA 表达相对较弱。**结论** 烧伤合并内毒素血症状态下,心肌本身可表达 TNF α mRNA 及其蛋白,并可能作为机体 TNF α 产生来源之一,参与早期心肌结构与功能损害的发生发展。

【关键词】 内毒素血症; 心肌; 肿瘤坏死因子 α ; 原位杂交

An experimental study on the relationship between early myocardial injury and the in situ expression of TNF α mRNA in burned rats with endotoxemia ZHAO Wen, LIU Yousheng, WANG Shuiming, et al. Institute of Pathology, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 P. R. China

【Abstract】 Objective To observe the in situ expression of TNF mRNA and protein in myocardial cell, so as to explore the possible mechanism of early myocardial injury in scalded rats with endotoxemia. **Methods** One hundred and seventy eight Wistar rats inflicted with 20% TBSA III degree napalm burn compound with endotoxemia and multiple organ injury were employed as the model and were randomly divided into four groups as follow. (1) burn and infusion group (BI); the rats were burned and infused with endotoxin. (2) simple burn group (S); the rats were burned only. (3) simple endotoxin infusion group (EI); the rats were only infused with endotoxin. (4) normal control (C). The observation time points were designed to be 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 postburn hours (PBH). The morphological and functional changes in rat myocardium, the change in serum TNF α , the cellular location and distribution of TNF α mRNA and proteins were observed by light microscope (LM), electronic microscope (EM), ELISA, immunohistochemistry and in situ hybridization staining. **Results** There exhibited a series of pathomorphological changes in the myocardium at early postburn stage in rats of BI group, such as wavy degeneration of myocardial fibers, the formation of contractile bands, fragmentation of myocardial fibers and focal cytoplasmic lysis, etc. The left ventricular systolic pressure (LVSP) and the maximum change rate of intraventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$) decreased significantly ($P < 0.01$). Serum TNF α level increased obviously at 1 PBH ($P < 0.01$) and peaked at 3~6 PBH. It was found that TNF α mRNA was principally located in myocardial cells and in a part of inflammatory cells. But these milder pathomorphological changes in myocardial injury were found in rats of S and EI groups. In addition, there appeared elapsed TNF α peak values and relative weaker expression of myocardial TNF α mRNA.

Conclusion TNF α mRNA and protein could be expressed in myocardium in burned rats with endotoxemia which might be one of the origins of TNF in participating in the development of early postburn myocardial structural and functional injury.

【Key words】 Endotoxemia; Myocardium; Tumor necrosis factor α ; In situ hybridization

内毒素血症是严重烧伤患者的常见并发症,往往伴有不同程度的心功能不全,它是诱发烧伤后休克和多器官功能衰竭(MOF)的重要因素之一^[1,2]。

TNF α 是由单核/巨噬细胞产生的多肽细胞因子,是启动机体感染性和非感染性休克各种病理生理改变的始发和关键物质。新近体外研究报道,缺血、内毒素刺激后心肌细胞本身亦可合成并释放 TNF α ^[3,4],因此,深入研究烧伤合并内毒素血症所致的早期心肌损害与在体条件下心肌细胞原位表达 TNF α 之间

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所

的关系,对于进一步认识早期心肌结构功能损害的发生机制具有重要意义。本实验采用烧伤复合内毒素血症大鼠急性多脏器损害动物模型,免疫组化与分子原位杂交相结合,观察了 TNF α mRNA 及其蛋白在心肌细胞的原位表达,并探讨其可能的致伤机制。

材 料 与 方 法

1. 实验动物分组与致伤:健康 Wistar 大鼠 178 只(四川省中药研究所动物中心提供),雌雄各半,体重 200 ~ 240 g,随机分为烧伤复合内毒素注射组(烧注组,56 只)、单纯烧伤对照组(单烧组,56 只)、单纯内毒素注射对照组(单注组,56 只)和正常对照组(正常组,10 只)。时相点设为 0.5、1、3、6、12、24 和 48 h。动物模型按文献[5]介绍的方法制作。

2. 光镜、电镜观察:分别按常规石蜡切片、HE 染色、光镜观察和常规透射电镜制样、JEM-2000 电镜观察。

3. 心肌力学特性测定:应用四导生理记录仪经颈总动脉插入左心室,测量各组各时相点动物左室收缩峰压(LVSP)及室内压最大变化速率($\pm dp/dt_{max}$)。

4. 血清 TNF α 含量检测:TNF α 检测试剂盒购自北京邦定公司,具体操作按说明书进行。用 DG3022 酶联仪在 492 nm 处读取吸光度值。

5. 免疫组化染色:采用 SP 法。鼠抗 TNF α 购自北京邦定公司,SP 试剂盒购自中山生物公司,具体操作方法按说明书进行。

6. 分子原位杂交:心肌组织切片原位杂交染色按文献[6]方法略加修改。切片经缓冲液 37 $^{\circ}$ C 30 min,体积分数为 20% 的乙酸 4 $^{\circ}$ C 20 min 去除内源性碱性磷酸酶,探针(地高辛标记的 TNF α cDNA 探针由本校新桥医院呼吸研究所郭振辉博士馈赠)浓度 1 μ g/ml,42 $^{\circ}$ C 杂交 20 h,暗处显色 30 min ~ 1 h,质量浓度为 10 g/L 的核固红复染胞核,甘油明胶封片。对照设置及结果观察:杂交前用 RNase 消化和加不含探针的预杂交液切片做阴性对照,杂交阳性部位呈紫蓝或紫黑色,细胞核呈红色。

7. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Excel 6.0 版统计分析程序对实验数据进行单因素方差分析。

结 果

1. 血清 TNF α 含量变化:烧注组在 1 h TNF α 已明显升高($P < 0.01$),于 3 h 达到高峰;单注组和单烧组分别于 1 h,3 h 始明显升高($P < 0.01$),峰值均见于 12 h;单烧组于 1,3,6,24 h 显著低于烧注组($P < 0.01$),单注组在 1,3 h 显著低于烧注组($P < 0.01$),但在 24,48 h 反而高于烧注组($P < 0.01$,表 1)。

2. TNF α 免疫组化染色:烧注组 TNF α 的表达见于烧注后 1 ~ 24 h,呈弥散均质状,阳性反应呈棕黄色,主要定位于心肌细胞、血管内皮及部分炎细胞。3 ~ 12 h 在心肌胞浆中的表达呈强阳性。单烧组和单注组 TNF α 总体表达相对较弱,正常组未见明显阳性表达。

3. 分子原位杂交染色:烧注组 TNF α mRNA 在心肌组织中的表达主要见于 1 ~ 24 h,阳性信号较为广泛,呈紫兰色胞核胞浆型表达,主要定位于心肌细胞,于 3 ~ 12 h 表达呈强阳性(图 1,2)。单烧组和单注组 TNF α mRNA 在心肌细胞的表达相对较弱,正常对照组未见明显阳性表达。

4. 心肌病理组织学与超微结构变化:(1)烧注组:光镜下 0.5 ~ 3 h 心肌细胞轻 ~ 中度颗粒变性,部分胞浆疏松呈“虫蛀状”(图 3)。肌纤维波浪样排列,肌浆凝聚形成与肌纤维长轴垂直且宽窄不等的收缩横带。6 ~ 12 h 心肌多发片状溶解坏死,部分肌纤维严重波浪样变甚至扭曲、断裂(图 4)。24 ~ 48 h 大部心肌片状坏死,有的累及全层。电镜下 0.5 ~ 3 h 可见心肌膜下大泡形成,使肌膜与其下方肌丝“抬高”;肌原纤维走行紊乱,Z 线聚集形成收缩带伴两端肌丝断裂(图 5)。线粒体局灶性空化、间质水肿,有较多炎细胞和游离的线粒体、肌丝及髓鞘样小体。烧注 6 ~ 12 h 肌膜“指状”突起(图 6),线粒体嵴溶解或呈同心圆状、多见灶性胞浆内溶解甚至肌丝成片消失。24 ~ 48 h 见大量细胞器游离于间质。(2)单烧组:光镜主要见心肌轻 ~ 中度颗粒变性,少数肌

表 1 各组血清 TNF α 含量变化 (pmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The changes of TNF α content in serum in the different groups (pmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	伤 后 时 间 (h)						
		0.5	1	3	6	12	24	48
烧注组	56	31.76 ± 4.71	248.24 $\pm 20.59^{**}$	344.12 $\pm 50.00^{**}$	254.94 $\pm 40.00^{**}$	257.06 $\pm 85.88^{**}$	188.24 $\pm 19.41^{**}$	157.65 $\pm 38.24^{*}$
单烧组	56	34.71 ± 6.74	46.06 $\pm 17.65^{\Delta\Delta}$	114.12 $\pm 21.76^{**\Delta\Delta}$	178.24 $\pm 21.18^{**\Delta\Delta}$	231.76 $\pm 37.65^{**}$	129.41 $\pm 29.41^{**\Delta\Delta}$	112.35 $\pm 15.29^{**\Delta}$
单注组	56	32.35 ± 2.94	81.76 $\pm 22.94^{**\Delta\Delta}$	167.06 $\pm 56.47^{**\Delta\Delta}$	327.06 $\pm 80.12^{**}$	335.88 $\pm 41.18^{**}$	245.88 $\pm 38.82^{**\Delta}$	216.47 $\pm 70.00^{**}$

注:正常组 TNF α 为 (34.46 \pm 10.35) pmol/L;与正常组比较, ** $P < 0.01$;与烧注组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

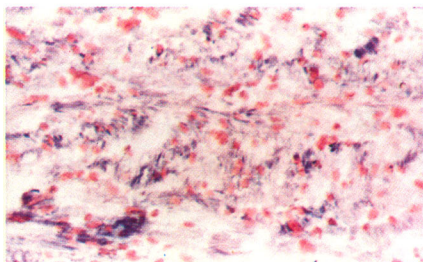


图 1 烧注组 6 h TNF α mRNA 阳性紫蓝色表达,较为广泛均质,位于心肌细胞 ISH \times 200

Fig 1 In burn with LPS 6h group, there exhibited a relative extensive and homogenous positive purplish blue expression of TNF mRNA in cardiac myocytes ISH \times 200

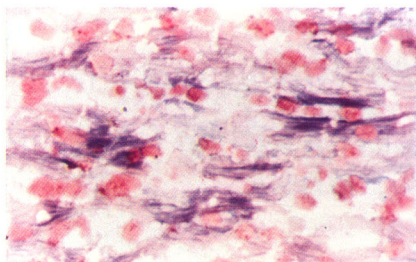


图 2 烧注组 12 h TNF α mRNA 较强阳性紫蓝色反应,位于心肌细胞 ISH \times 400

Fig 2 In burn with LPS 12h group, there exhibited stronger positive purplish blue expression of TNF mRNA in cardiac myocytes ISH \times 400

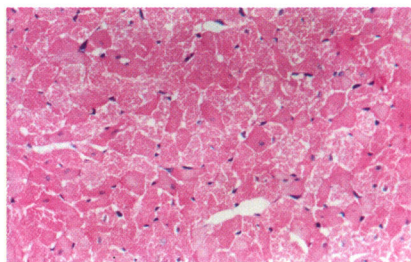


图 3 烧注组 1 h 心肌细胞颗粒变性,胞浆疏松 HE \times 400

Fig 3 In burn with LPS 1h group, there exhibited myocardial granular degeneration and cytoplasmic loosening HE \times 400

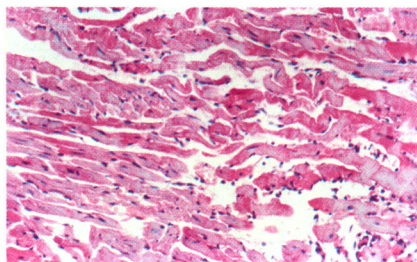


图 4 烧注组 6 h 肌浆凝聚,部分收缩带形成,肌纤维波浪样改变,有断裂,炎细胞浸润 HE \times 200

Fig 4 Burn combined LPS group 6 hours, condensation of sarcoplasm and formation of contractile bands, the wavy arrangement of muscle fibers present in myocardium of rats HE \times 200

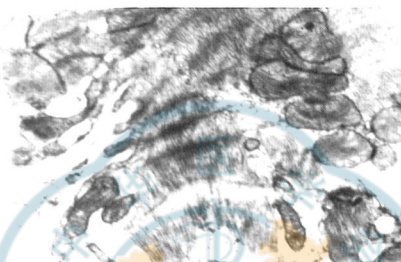


图 5 烧注组 3 h 心肌细胞 Z 线聚集,邻近肌丝断溶 TEM \times 10 000

Fig 5 Burn combined LPS 3 hours, clustering of Z line accompanying with fragmentation of adjacent myofibril in cardiac myocytes of rats TEM \times 10 000

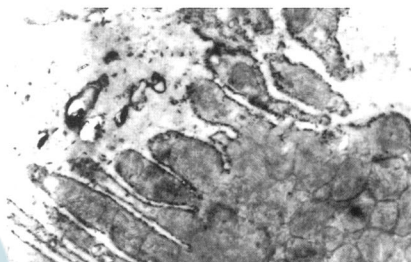


图 6 烧注组 6 h 心肌细胞肌膜“琴键样”突起,内含线粒体等,其下方肌丝多紊乱不均,部分断溶 TEM \times 10 000

Fig 6 Burn combined LPS 6PBH, piano key like myocyte sarcoplasmic protrude containing mitochondria etc with the derangement and partial lysis of underlying myofibril TEM \times 10 000

浆凝聚并有点状或小片状坏死。电镜示心肌细胞水肿,肌丝走行紊乱且部分断溶,线粒体局灶性空化及肌浆网扩张。(3)单注组:致伤较早时相未见明显病理改变。12~24 h 可见心肌嗜酸性增强但少见细胞坏死。电镜主要示心肌细胞、核周、间质肿胀,线粒体疏松或退变,血管内皮细胞水肿及大量吞饮小泡存在。(4)正常组:光、电镜检查均未见明显变化。

5. 心肌力学特性变化:烧注组 LVSP 于伤后 1 h、+dp/dtmax 于伤后 3 h 显著降低 ($P < 0.01$), 6 h 降至最低, 24~48 h 仍显著低于正常对照 ($P < 0.01$); 而 -dp/dtmax 于 0.5 h 即明显下降 ($P < 0.05$), 6 h 后呈进行性下降趋势。单烧组 LVSP、+dp/dtmax 于伤后 3 h、-dp/dtmax 于伤后 1 h 显著低于正常组 ($P < 0.05$), 峰值见于伤后 24 h ($P < 0.01$)。单注组各参数于伤后 6~24 h 显著降低 ($P < 0.01$)。单因素组各时相点参数值降低的幅度明显低于烧注组 ($P < 0.01$, 图 7-8)。

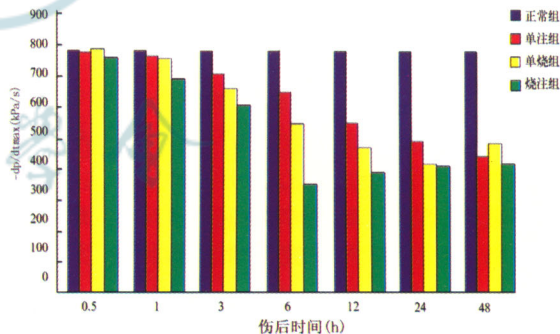


图 7 各组心肌 +dp/dtmax 变化 Fig 7 The change of myocardial +dp/dtmax in different groups

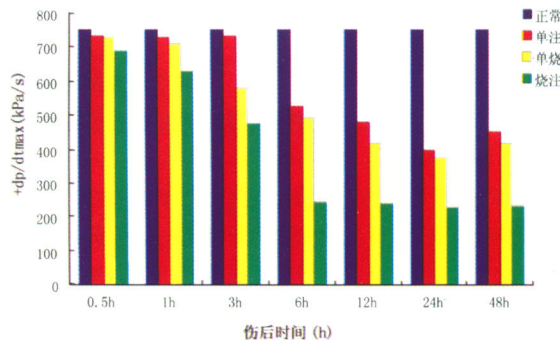


图 8 各组心肌 -dp/dtmax 变化 Fig 8 The change of myocardial -dp/dtmax in different groups

讨 论

TNF α 作为一种具有多种生物学效应的细胞因子,在严重创伤、脓毒症中可诱发炎症级联反应,刺激其他细胞因子产生并共同介导组织器官损害。内毒素是诱导 TNF α 生成、释放的主要刺激物,TNF α 发挥活性作用表现为对内毒素的依赖或协同作用^[7,8],因而在严重烧伤特别是合并内毒素血症条件下,内毒素及其诱生的 TNF α 对心肌细胞损伤及功能障碍的发生发展可能起着重要的作用。

在本实验中,烧伤合并内毒素血症早期心肌发生一系列损害性变化,与单烧组、单注组比较具有病变出现早、程度重、持续时间长、形态多样化的特点。其病变主要表现为:心肌细胞肌膜水肿、破裂,肌浆收缩带形成以至坏死等。心肌力学参数 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 显著下降;血清 TNF α 含量于伤后 1 h 即明显升高;原位杂交染色可见定位于心肌细胞的 TNF α mRNA 阳性信号;并且,随着 TNF α 阳性表达的逐渐增强,心肌病理组织学损伤趋势愈加明显,而 LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 进行性降低,其峰值与 TNF α 强阳性表达及血清含量呈显著负相关。这些结果提示,在烧伤合并内毒素血症条件下 TNF α 可大量生成释放,且心肌细胞原位表达的 TNF α 在核酸及蛋白质水平具有时间上的序贯性和强度上的一致性。Gurevitch 等^[3,4]认为,缺血或内毒素作用可促使心肌细胞本身合成、释放 TNF α ,并直接对心肌结构和功能产生损害作用。本实验结果为其提供了进一步的支持依据。尽管从本实验现有资料尚不能严格区分引起心肌损害作用,的是心肌自身分泌抑或是循环中的 TNF α ,但可以说明心肌通过“自分泌”或“旁分泌”产生的 TNF α ,也是促使血清 TNF α 升高的重要来源之一。提示在烧伤状态下小剂量内毒素作用,可促进 TNF α 在心肌细胞的表达和释放,进而明显加重心肌组织损伤。

黄宏等^[9]曾观察到,大鼠烧注后 TNF α 水平升高与肺水肿、小血管血栓形成及肺功能衰竭密切相关,与心肌细胞内游离钙离子浓度增加及细胞骨架 desmin、vinculin 的破坏也具有显著的相关性,提示 TNF α 不仅直接参与心肌组织结构的破坏,还可通过引发肺水肿、血管栓塞导致心脏前负荷增加,破坏心肌钙稳态和机械应力、信号传导以及网状支架作

用^[10,11],从而产生对心肌功能的损害。由于 TNF α 的生物学活性由与之相应的膜受体介导,心肌细胞膜上存在 TNF α 的两种受体(TNFR1 和 TNFR2)及其亚型,这使心肌既是 TNF α 的合成场所又是其作用的靶器官^[12],且 TNF α 对心肌的作用具有时间及浓度依赖性。这样,局部一经分泌且相对浓度较高的 TNF α 与心肌膜上受体的结合就更为迅速和直接。因而笔者认为,烧伤合并内毒素血症时心肌的损害效应在动物整体水平与内毒素诱导 TNF α ,在心肌细胞和单核/巨噬细胞大量产生、释放有关,但相对而言,心肌本身合成、释放导致局部 TNF α 浓度升高,对早期心肌结构及功能的损害作用可能具有更为重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Yao YM, Sheng ZY, Tian HM, et al. The association of circulating endotoxaemia with the development of multiple organ failure in burned patients. *Burns*, 1995, 21: 255 - 258.
- 2 Huang YS, Yang ZC, Yan BG, et al. Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns. *J Trauma*, 1999, 46: 428 - 432.
- 3 Gurevitch J, Frolkis I, Yuhay Y, et al. Tumor necrosis factor - α is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28: 247 - 252.
- 4 Kapadia S, Lee J, Torre - Amione G, et al. Tumor necrosis factor - α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*, 1995, 96: 1042 - 1052.
- 5 刘友生, 晏良遂. 烧伤复合内毒素血症时对肝脏的损害及其意义的研究. *中华整形烧伤外科杂志*, 1994, 10: 142 - 144.
- 6 蔡文琴, 王伯运, 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406 - 427.
- 7 Bone RC. Sepsis, sepsis syndrome and systemic inflammatory syndrome (SIRS). *JAMA*, 1995, 273: 155 - 156.
- 8 Remick DG, Strieter RM, Eskandari MK, et al. Role of tumor necrosis factor - α in lipopolysaccharide - induced pathologic alterations. *Am J Pathol*, 1990, 136: 49 - 54.
- 9 黄宏, 刘友生, 陈意生. PAF 和 TNF 在烧伤复合内毒素血症早期肺损伤中的作用. *中国急救医学*, 1998, 18: 16 - 19.
- 10 VanEyck JE, Powers F, Law W, et al. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa - force relation. *Circ Res*, 1998, 82: 261 - 271.
- 11 Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induce early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995, 110: 89 - 98.
- 12 Torre - Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation*, 1995, 92: 1487 - 1491.

(收稿日期: 2000 - 04 - 27)

(编辑: 张 宁)