

烫伤大鼠复苏前后小肠组织凋亡基因表达的变化

陈静 王甲汉 任加良

【摘要】 目的 观察烫伤大鼠复苏前后小肠组织中原癌基因 c-fos、增殖细胞核抗原(PCNA)及凋亡促进基因 Bax 蛋白等表达的变化规律。方法 采用 Wistar 大鼠 30% TBSA Ⅲ度烫伤模型,根据伤后观察时间分为复苏前(伤后 2.0 h,未补液)、复苏后 0.5 h(伤后 2.5 h)、2.0 h(伤后 4.0 h)、4.0 h(伤后 6.0 h)组,每组 8 只。伤后 2.0 h 开始,后 3 组大鼠常规补液抗休克。4 组大鼠于不同时相点放血致死,留取小肠组织标本用以检测 c-fos、PCNA 及 Bax 的表达。结果 c-fos、PCNA 及 Bax 在烫伤大鼠复苏前的表达水平分别为(65.8±4.2)%、(74.5±2.4)%、(26.3±5.7)%;复苏后 0.5、2.0 h 3 种基因表达均有明显增加,其中 0.5 h 达高峰,分别为(92.4±5.7)%、(85.6±4.5)%、(67.1±6.6)%,与复苏前比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);复苏后 4.0 h 各基因表达与复苏前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 严重烫伤复苏早期,大鼠小肠组织凋亡基因表达显著增加。

【关键词】 烧伤; 再灌注损伤; 小肠; 凋亡基因

Changes in the expression of apoptotic genes in the intestinal tissue of scalded rats before and after resuscitation CHEN Jing*, WANG Jia-han, REN Jia-liang. *Plastic Surgery Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100041, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the dynamic changes in the expression of c-fos, proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and Bax in the intestinal tissue of scalded rats before and after resuscitation.

Methods Wistar rats inflicted with 30% TBSA full thickness scald were employed as the model and randomly divided into four groups with 8 in each group, i. e. 2.0, 2.5, 4.0, 6.0 postscald hour (PSH) groups. Rats in each group received routine fluid infusion at 2 PSH, and were sacrificed at 2, 2.5, 4, 6 PSH, respectively. Then the intestinal tissue of the rats was harvested for the detection of the expression of c-fos, PCNA and Bax. **Results** The expression of c-fos, PCNA and Bax at 2.0 PSH group (65.8±4.2%, 74.5±2.4%, 26.3±5.7%, respectively) significantly increased when compared with those in 2.5 PSH group (92.4±5.7%, 85.6±4.5%, 67.1±6.6%, respectively) ($P < 0.01$). The expression of 3 genes increased dramatically at 2.5 and 4.0 PSH, and reached the peak at 2.5 PSH. There was no obvious difference in the gene expression between 4 PSH and 2 PSH groups. **Conclusion** The expression of apoptotic genes in the intestinal tissue of scalded rats increased significantly during early resuscitation stage after burn injury.

【Key words】 Burns; Reperfusion injury; Intestine, small; Apoptosis gene

补液抗休克、恢复器官有效灌注,是严重烧伤后早期救治的主要手段与目的,但与此同时造成的器官缺血再灌注损伤也是难以避免的副作用。肠黏膜结构和功能保护,已成为防治休克后多器官功能损伤的重要研究领域,通过某些措施可以达到防护目的^[1]。缺血再灌注损伤是涉及多学科、多领域的病理生理性改变,其过程和机制仍在不断探索中。已有研究表明,缺血再灌注损伤可引起组织氧自由基改变、腺苷三磷酸(ATP)酶水解、Ca²⁺超载等各种变化,且上述因素除本身可对组织细胞造成损伤外,还能通过基因的调控诱导细胞凋亡^[2]。为此,笔者观测了烫伤大鼠复苏前后小肠组织中原癌基因 c-fos、增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen,

PCNA)和凋亡促进基因 Bax 蛋白等凋亡相关基因的表达,以便进一步探讨这些基因在烧伤休克期小肠缺血再灌注损伤及修复重建中的作用。

材 料 与 方 法

1. 动物模型及分组:雄性 Wistar 大鼠(南方医科大学实验动物中心)32 只,体重 250~300 g。大鼠以 200 g/L 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,背部脱毛后浸入沸水 12 s 致 30% TBSA Ⅲ度烫伤(病理切片证实)。将烫伤大鼠随机分为复苏前(伤后 2.0 h,未补液)、复苏后 0.5 h(伤后 2.5 h)、2.0 h(伤后 4.0 h)、4.0 h(伤后 6.0 h)组,每组 8 只。伤后 2.0 h 开始,给予后 3 组烫伤大鼠腹腔注射林格液(40 ml/kg)抗休克。4 组大鼠分别于不同时相点放血致死,留取小肠组织标本置 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定,4℃保存备用。

作者单位:100041 北京,中国医学科学院中国协和医科大学整形外科医院(陈静);南方医科大学南方医院烧伤科(王甲汉、任加良)

2. 免疫组织化学检测方法: c-fos、PCNA 及 Bax 鼠单克隆抗体购自美国 MBI 公司, 生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (SP) 染色超敏试剂盒购自福州迈新生物技术公司, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂为美国 Sigma 公司产品。将小肠组织块脱水、石蜡包埋后切片, 片厚 5 μm 。经脱蜡水化后, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 10 min, 按试剂盒要求进行 SP 染色操作。用 PBS 分别代替第一、二、三抗体做阴性对照。细胞质内出现棕黄色颗粒为 c-fos 和 Bax 免疫反应阳性细胞, 细胞核内出现棕黄色颗粒为 PCNA 免疫反应阳性细胞。每张切片连续观察 5 个高倍视野, 计数每 100 个细胞中的阳性细胞数, 以阳性细胞率 (%) 表示。

3. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 8.0 统计软件进行 χ^2 检验。

结 果

与复苏前大鼠比较, 复苏后 0.5 h 开始, c-fos、PCNA 及 Bax 免疫反应阳性细胞在小肠壁各层, 包括黏膜上皮、黏膜下层、腺组织和肌层的血管平滑肌细胞、内皮细胞中均有明显增多 ($P < 0.01$), 至复苏后 4.0 h 差异已无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 种基因标记阳性细胞率的时间变化规律一致, 见表 1。

表 1 烫伤大鼠小肠组织凋亡基因表达的变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Change in the expression of the apoptotic genes in intestinal tissue of scalded rats (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	c-fos	PCNA	Bax
复苏前	8	65.8 \pm 4.2	74.5 \pm 2.4	26.3 \pm 5.7
复苏后 0.5 h	8	92.4 \pm 5.7**	85.6 \pm 4.5**	67.1 \pm 6.6**
复苏后 2.0 h	8	83.7 \pm 6.1**	80.8 \pm 4.8**	55.0 \pm 7.3**
复苏后 4.0 h	8	68.7 \pm 8.1	72.4 \pm 6.8	22.8 \pm 6.0

注: 与复苏前比较, * $P < 0.01$; 与复苏后 4.0 h 比较, # $P < 0.01$

讨 论

在小肠外科治疗及有关研究中, 缺血再灌注损伤所造成的小肠组织破坏已屡见报道。现已证实, 缺血再灌注可造成组织细胞多方面的损伤, 其中包括氧自由基损伤、ATP 酶水解、 Ca^{2+} 超载等, 并可诱导细胞凋亡^[1]。氧自由基等对组织的损伤作用已较明确, 而细胞凋亡与缺血再灌注的关系目前颇受关注。

组织细胞的缺血再灌注能引起 ATP 酶水解、能量消耗、细胞跨膜梯度破坏、 Ca^{2+} 进入细胞内产生 Ca^{2+} 超载, 进而激活相关酶系统产生损伤和诱导细胞凋亡。汪虹等^[3]报道, 烧伤早期家兔小肠蚓状黏膜上皮层、固有层的淋巴小结和散在淋巴组织中

可见较多凋亡细胞, 提示严重烧伤后细胞凋亡是肠道细菌及内毒素移位的细胞学基础。这种现象同样可用以解释烧伤复苏后小肠组织缺血再灌注损伤的病理机制。有报道证实, 小肠缺血再灌注后, c-fos、PCNA 及 Bax 在小肠组织的表达规律与氧自由基变化相反, 即从再灌注开始逐渐增多, 60 min 后又明显减少^[4], 说明小肠缺血再灌注损伤可通过基因调控促进细胞凋亡。本实验结果的变化规律与其相同, 但变化时间存在差异, 可能与动物模型包括动物种类、致伤方式、再灌注模型等及标本阳性率统计方法不同有关。

c-fos 被称为第三信使和内源性延迟保护因子, 可通过膜信号激活第二信使、 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶或环磷酸腺苷 (cAMP) 依赖蛋白激酶修饰细胞浆因子, 使之激活并转入细胞核内, 促进 c-fos 蛋白的表达, 继而激活多种其他基因发挥生理功能。PCNA 与 DNA 的复制及细胞增殖有关, 而 Bax 的表达说明损伤后细胞凋亡促进基因被激活。c-fos、PCNA 及 Bax 在增殖与凋亡功能上的协调统一性, 提示它们在组织细胞损伤及修复重建中处于重要地位。本实验中, 烫伤大鼠复苏后 0.5—2.0 h, 小肠组织凋亡基因表达均明显增多, 表明通过基因调控的细胞凋亡同样参与了小肠组织的缺血再灌注损伤过程。目前可通过对严重烧伤大鼠早期应用重组人生长激素 (rhGH), 抑制小肠黏膜细胞凋亡, 维护肠黏膜形态结构及屏障功能, 达到对小肠黏膜的保护作用^[5]。

应该指出的是, 由于目前对凋亡基因的作用和影响尚缺乏深入研究, c-fos、PCNA 及 Bax 的作用又不甚相同, 所以它们在烧伤休克复苏后的缺血再灌注损伤中, 究竟是加重破坏还是参与修复, 有待进一步观察。

参 考 文 献

- 1 夏中元, 郑利民. 参附注射液防护肠黏膜缺血再灌注损伤的实验研究. 中华创伤杂志, 2001, 17: 235 - 236.
- 2 Bastide M, Bordet R, Pu Q, et al. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19: 1309 - 1315.
- 3 汪虹, 缪玉兰, 马克炯, 等. 烧伤早期家兔小肠细胞凋亡的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 141 - 144.
- 4 赵佐庆, 刘福兰, 张玲, 等. 犬小肠缺血再灌注后血中 NO 和 SOD 与小肠黏膜凋亡相关基因表达的改变. 基础医学与临床, 2002, 22: 336 - 338.
- 5 宋国栋, 王德昌, 覃军, 等. 重组人生长激素对烧伤大鼠肠黏膜结构及细胞凋亡的影响. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 207 - 209.

(收稿日期: 2003 - 09 - 04)

(本文编辑: 王 旭)