

· 短篇论著 ·

大鼠烫伤后早期转化生长因子 β_1 /Smads 信号通路的活化

李华涛 夏照帆 韦多

1 材料与与方法

1.1 主要试剂来源

一抗:小鼠抗大鼠 β 肌动蛋白单克隆抗体(美国 Sigma 公司),山羊抗大鼠磷酸化 Smad 2/3 多克隆抗体、兔抗大鼠 Smad 3 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);二抗:辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗兔或山羊多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),HRP 标记的山羊抗小鼠多克隆抗体(美国 Calbiochem 公司)。SB431542(美国 Tocris 公司),Trizol 试剂(美国 Gibco BRL 公司),反转录(RT)-PCR 试剂盒(大连宝生物工程公司),二辛丁酸(BCA)试剂盒、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒及白细胞介素 1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒(美国 Pierce 公司),IL-6 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。PCR 仪(美国 Biometa 公司),半干电转移仪、图像分析仪、550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验分组及处理

健康成年雄性 SD 大鼠(第二军医大学实验动物中心) 88 只,体质量 180 ~ 200 g,按随机数字表法分为正常组 8 只、烫伤组 40 只、SB431542 组 40 只。后 2 组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,背部剃毛后置于 98 °C 水浴中浸烫 12 s,造成 30% TBSA III 度烫伤,按 Parkland 公式补充平衡盐溶液,分次腹腔注射。SB431542 组大鼠另于伤前 1 h 及伤后 11 h 腹腔内各注射 2.53 mg/kg SB431542。于伤后 1、4、8、12、24 h 处死两致伤组大鼠,采集肺组织和血清待检测,正常组亦行相应检测。

1.3 检测指标

1.3.1 RT-PCR 法检测肺组织转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) mRNA 表达 抽提肺组织样本总 RNA。引物由上海生物工程公司合成,TGF- β_1 上游引物 5'-GCAACAACGCAATCTATG-3',下游引物 5'-CCTGTATTCCGTCTCCTT-3'; β 肌动蛋白上游引物 5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3',下游引物 5'-TGGAAGCTGGACAGTGAG-3'。扩增产物长度分别为 300、200 bp,PCR 产物行常规凝胶电泳,扫描后以 TGF- β_1 与 β 肌动蛋白的吸光度比值表示目的基因的相对表达强度。

1.3.2 蛋白质印迹法检测肺组织磷酸化 Smad 2/3、Smad 3 蛋白含量 提取肺组织蛋白,用 BCA 法行蛋白定量,余下操作按蛋白质印迹法常规进行。扫描胶片,设正常组的目的蛋白与内参照 β 肌动蛋白条带的灰度比值为 100,磷酸化 Smad 2/3、Smad 3 蛋白含量 = 目的蛋白灰度值/ β 肌动蛋白灰度值。均重复测 3 次。

1.3.3 双抗体夹心 ELISA 法检测伤后 8 h 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度 按照试剂盒说明书测定细胞因子浓

度,Wlogit 软件拟合校正曲线。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行 *F* 分析。

2 结果

2.1 肺组织 TGF- β_1 mRNA 表达的变化

正常组大鼠 TGF- β_1 mRNA 的表达量为 1.04 ± 0.09 ,烫伤组、SB431542 组大鼠伤后各时相点 TGF- β_1 mRNA 的表达水平均与之接近 ($P > 0.05$)。

2.2 肺组织磷酸化 Smad 2/3、Smad 3 蛋白含量

Smad 2/3 蛋白含量的表达见图 1、表 1。正常组大鼠 Smad 3 蛋白含量为 100 ± 8 ,烫伤组、SB431542 组大鼠伤后各时相点 Smad 3 蛋白含量均与之相近 ($P > 0.05$)。

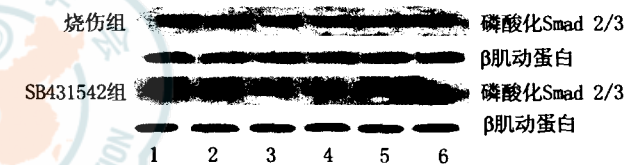


图 1 各组大鼠肺组织磷酸化 Smad2/3 蛋白的含量。1 为正常组;2~6 依次为伤后 1、4、8、12、24 h

表 1 各组大鼠肺组织磷酸化 Smad 2/3 蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间(h)				
	1	4	8	12	24
烫伤组	108 ± 6	78 ± 5 ^a	78 ± 5 ^a	111 ± 7	101 ± 6
SB431542 组	91 ± 5 ^b	64 ± 4 ^{bc}	51 ± 3 ^{bc}	62 ± 4 ^{bc}	76 ± 4 ^{bc}

注:数据以灰度比值表示;正常组大鼠 8 只,磷酸化 Smad 2/3 蛋白含量为 100 ± 6 ;其余 2 组鼠数各 40 只;与正常组比较,^a $P < 0.01$;与烫伤组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.3 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度

伤后 8 h,烫伤组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度均显著高于正常组 ($P < 0.01$),SB431542 组大鼠上述促炎细胞因子浓度下降约 20% ~ 30% ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清促炎细胞因子浓度 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组	8	29 ± 10	17 ± 6	32 ± 13
伤后 8 h				
烫伤组	8	626 ± 68 ^a	222 ± 56 ^a	726 ± 66 ^a
SB431542 组	8	503 ± 70 ^{ab}	164 ± 32 ^{ab}	578 ± 40 ^{ab}

注:数据以吸光度值表示;TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ,IL 为白细胞介素;与正常组比较,^a $P < 0.01$;与烫伤组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

既往研究表明,TGF- β_1 /Smads 信号通路在创伤后炎症反应、免疫功能中起重要调控作用,在不同的细胞类型或环境下表现为促炎或抗炎效应,烫伤后其传导活性可发生显著

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院全军烧伤中心

通讯作者:夏照帆,Email: xiazhaofan@hotmail.com,电话:021-

25070599

变化^[1-3]。本研究表明,大鼠烫伤后该信号通路的活化状态受到暂时的抑制,与 Tam 等^[1]的研究结果相似。以 TGF- β_1 I 型受体(T β R I)阻滞剂 SB431542 抑制该信号通路传导活性,可明显降低烫伤大鼠血清中促炎细胞因子浓度。笔者推测该通路活性的短暂抑制可能是机体对烫伤后过度炎症反应的自我保护机制,即适度下调炎症的强度,避免失控性全身炎症反应。此现象发生的机制可能是:(1)更早激活的核因子 κ B、丝裂原激活蛋白激酶类等信号系统引起促炎细胞因子、炎性介质大量释放^[4],继而负反馈于具有促炎性效应的 Smads 信号通路。(2) R-Smads 主要由 T β R I 激酶磷酸化^[5-6]。TGF- β_1 /Smads 活化后对白细胞有趋化、募集作用,但具体机制仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献

[1] Tam NP, Kiho C, Lee KA, et al. Burn injury induces an inhibitory signal in the lung Smad pathway. *Cytokine*, 2004, 27 (2/3): 66-73.
 [2] Kristina GH, Kiho C, Lee KA, et al. Burn-induced Thymic

apoptosis corresponds with altered TGF- β_1 and Smad 2/3. *J Surg Res*, 2002, 105(1): 4-9.
 [3] Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, et al. Smad 3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 597-604.
 [4] Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(4/5): 413-421.
 [5] Maria RD, Jeanne MK, Michael AG, et al. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor β in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor κ B-mediated signals. *J Exp Med*, 2000, 192(5): 695-704.
 [6] 牟达,何芳. TGF- β 与 MAPK 细胞内信号转导通路的交互调节及其在心血管疾病中的作用. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26(2): 130-134.

(收稿日期:2007-03-29)
 (本文编辑:莫愚)

· 技术与方法 ·

颈部深度烧伤气管导管固定法的改进

姜季鹤 陈志坚 王胜利 王和平 吕涛 邱长虹 李树仁

1 临床资料

2002 年 1 月—2007 年 6 月,笔者单位收治颈部深度烧伤患者 18 例,其中男 11 例、女 7 例,年龄 3~68 岁,烧伤总面积 9%~98%,Ⅲ度 7%~96% TBSA。18 例患者中 13 例有中、重度吸入性损伤。2 例入院时已行气管切开,其余 16 例入院后亦行气管切开。

2 导管固定方法

18 例患者气管切开后均采用塑料带套囊式一次性气管导管置入。其中 2005 年 6 月前收治的 11 例患者,气管切开采用常规固定法。2005 年 7 月后收治的 7 例患者,气管切开后将气管导管固定翼(导管口底盘)埋置于痂皮下固定(以下称埋置法)。其方法为:沿前正中切口痂皮下向两侧各游离 3~4 cm,置入气管导管后,将气管导管固定翼埋置于痂皮下,翼末端自痂皮穿出,4 号丝线经翼孔与痂皮一起缝扎,再用固定绳经两翼孔绕颈后固定。如遇颈前广泛焦痂需减压时,沿颌颈角做横切口,两侧至侧中线,此切口与前正中切口向上延长后形成“T”型,减压后创面以生物敷料覆盖。

3 结果

18 例中并发呼吸意外 7 例,其中 6 例为常规法固定患者。发生原因为气管导管完全脱出 1 例、不完全脱出(套管脱离气管,进入气管前间隙)5 例;1 例埋置法固定患者为痰液堵塞。

典型病例:患者男,38 岁,火焰烧伤后 2 h 收入笔者单位。诊断:(1)烧伤总面积 91%,Ⅲ度 87% TBSA。(2)重度

吸入性损伤。入院后在液体复苏的同时行气管切开术,置入 8 号带套囊式一次性气管导管,常规法固定。于伤后 3 d 翻身俯卧位后 2 h,患者突然出现躁动不安,立即改为仰卧位,见气管导管已完全脱出。按原位将气管导管再次置入,采用埋置法进行固定。患者症状好转,气管导管未再脱落。

4 讨论

气管切开是预防吸入性损伤和头、面、颈部深度烧伤后早期呼吸道梗阻的有效措施^[1-2],但在临床上,即使已行气管切开,患者仍可能发生呼吸意外^[3]。其原因为:头、面、颈和上胸部严重烧伤后早期,局部软组织水肿严重,痂皮压迫引发静脉回流障碍,再次加重水肿等。气管导管移位脱出是颈部深度烧伤气管切开后早期呼吸意外的常见原因,故气管导管的固定较重要。本组采用常规固定法的 11 例患者有 6 例发生气管脱出,而埋置法固定的 7 例患者均未发生此种情况。埋置法操作简单,导管固定牢靠,弥补了因颈部水肿变粗所致气管导管长度相对不足。合并颈部焦痂气管切开时,“T”型切口切开减压可更有效地松解痂皮压迫。

参考文献

[1] 姜季鹤,牛希华,赵耀华,等.救治无吸入性损伤烧伤并发上呼吸道梗阻 76 例. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(1): 62.
 [2] 路卫,夏照帆,陈旭林.吸入性损伤后预防性气管切开与紧急气管切开的临床研究. *中华烧伤杂志*, 2003, 19(4): 233-235.
 [3] 刘久春,吕红,孙海宁,等.吸入性损伤患者气管切开时易发生的意外及防治. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(6): 477.

(收稿日期:2007-07-20)
 (本文编辑:张红)