

PGE₂ 及 cAMP 在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系造血变化中作用的实验研究

向德兵 刘友生 王水明 王晓东

【摘要】 目的 探讨前列腺素 E₂(PGE₂)、环磷酸腺苷(cAMP)在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系造血变化中的作用。**方法** 178 只昆明种小鼠随机分为烧伤合并内毒素注射组、单纯烧伤组、单纯内毒素注射组和等渗盐水对照组。应用放射免疫分析和免疫组化法,动态检测各组小鼠致伤后 1 周内,骨髓细胞环氧酶-2(COX-2)表达及 PGE₂、cAMP 含量,并对粒单系造血变化进行了动态观察。

结果 烧伤合并内毒素血症早期骨髓粒单系略呈增生反应,继而呈现造血抑制。骨髓细胞 COX-2 表达、骨髓细胞上清 PGE₂ 和细胞内 cAMP 在 12 h~5 d 显著升高,且 cAMP 与 PGE₂ 呈显著正相关($r = 0.978, P < 0.01$),而与粒-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)呈显著负相关($r = -0.971, P < 0.01$)。

结论 PGE₂ 在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系抑制中起重要作用,抑制效应是通过其与特异性受体结合,激活腺苷酸环化酶,使骨髓细胞内 cAMP 升高。

【关键词】 烧伤; 内毒素血症; 骨髓; 环氧酶-2; 前列腺素 E₂; 环磷酸腺苷

An experimental study on the role of PGE₂ and cAMP on the postburn change in the granulopoiesis in bone marrow in burned mice with endotoxemia XIANG De-bing, LIU You-sheng, WANG Shui-ming, WANG Xiao-dong, Institute of Pathology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing, 400038. P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the role of PGE₂ and cAMP in the postburn change in granulopoiesis in bone marrow in burned mice with endotoxemia. **Methods** One hundred and seventy eight mice were randomly divided into burn with LPS administration, simple burn, simple LPS administration and control (injection of normal saline) groups. The COX-2 expression and the contents of PGE₂ and cAMP in myeloid cells in injured mice in all groups were determined by RIA (radioimmuno-assay) within 1 postburn week and immunohistochemistry methods. At the same time the change in granulopoiesis was dynamically observed. **Results** The granulopoiesis was enhanced slightly at the early stage of burn and with endotoxin challenge, followed by suppression. The COX-2 expression in myeloid cells the contents of PGE₂ on supernatant of marrow cells and intracellular cAMP in the myeloid cells was increased at 12 postburn hour(PBH) up to 5 postburn day (PBD). Furthermore, the change in the cAMP was evidently and positively correlated with that of PGE₂ ($r = 0.978, P < 0.01$), but was negatively correlated with that of CFU-GM ($r = -0.971, P < 0.01$). **Conclusion** PGE₂ might play pivotal roles in the postburn granulopoiesis suppression in bone marrow during endotoxemia. This effect might be accomplished by its ligating to its special receptor and to activate adenylate cyclase so as to increase the intracellular content of cAMP in bone marrows.

【Key words】 Burn; Endotoxemia; Bone Marrow; COX-2; PGE₂; cAMP

严重感染是烧伤后难以控制的并发症,危及患者生命。许多研究表明,严重烧伤感染后外周血白细胞(WBC)数量减少,功能障碍,机体出现免疫抑制。本研究从 WBC 生成的角度探讨机体免疫功能受损的机制,在 20% TBSA Ⅲ度烧伤合并内毒素小鼠模型腹腔注射后 1 周内,检测小鼠 WBC、粒-巨噬细胞集落形成单位(colony forming unit-granulocyte/

macrophage, CFU-GM)及骨髓细胞环氧酶-2(cyclooxygenase, COX-2)表达、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)含量的变化。

材料与方 法

一、实验动物分组和模型制作

1. 动物分组:体重 20~24 g 健康昆明种雄性小鼠 178 只(本校实验动物中心提供),随机分为烧伤合并内毒素注射组(简称烧注组),单纯烧伤组(简称单烧组),单纯内毒素注射组(简称单注组)和等渗盐水对照组(简称对照组)。前 3 组均于烧伤和/或内

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770759)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院病理研究所(向德兵现在第三军医大学大坪医院病理科,400042)

通讯作者:刘友生(电话:023-68754431)400038 重庆,第三军医大学西南医院病理研究所

毒素注射后 3、6、12 h 以及 1、3、5、7 d 处死取材, 每组各时相点分别为 8 只动物, 对照组为 10 只动物。

2. 动物模型制作: 小鼠 20% TBSA III 度体表烧伤按文献[1]方法进行。烧注组于伤后立即腹腔注射 *E. coli* O111B4 纯化脂多糖(LPS, 1 μg/g, 2 ml 无菌等渗盐水稀释), 制作烧伤合并内毒素血症的实验动物模型; 单烧组于伤后立即腹腔注射 2 ml 无菌等渗盐水; 单注组除不造成烧伤外, 余同烧注组; 对照组动物背部脱毛后腹腔注射 2 ml 无菌等渗盐水。

二、检测指标及方法

1. 外周血 WBC 计数: 按常规方法。
2. 粒单系祖细胞培养: 参考文献[2]进行。
3. 放射免疫分析法检测骨髓细胞上清中 PGE₂、cAMP: PGE₂、cAMP 放免试剂盒分别购自东亚免疫技术公司及上海第二医科大学核医学教研室。

4. COX-2 免疫组织化学染色: COX-2 单克隆抗体购自武汉博士德公司, 生物素化二抗、SP 复合物购自北京中山公司。骨髓细胞涂片, 免疫组织化学染色采用 SP 法, 一抗稀释度为 1:50。结果判断: 胞浆呈棕黄色或褐色为阳性染色。阳性细胞数: < 10%, +; 10% ~ 20%, ++; > 20%, +++。

三、统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 行单因素方差分析和相关性检验。

结 果

1. 外周血 WBC 的变化: 烧注组 WBC 于伤后 3 h 显著高于正常对照组、单烧组和单注组, 以后逐渐下降, 于伤后 3、5 d 显著低于对照组和单注组, 伤后 3 d 显著低于单烧组, 伤后 7 d 有所回升, 但仍低于正常对照组; 单烧组于伤后 3 d 显著低于正常对照组; 单注组伤后 12 h ~ 3 d 略低于对照组, 但差异无显著性意义, 见表 1。

表 1 不同时间小鼠外周血 WBC 的变化 (1 × 10⁹/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The postburn dynamic changes of WBC (1 × 10⁹/L, $\bar{x} \pm s$)

伤后时间	组别		
	烧注组	单烧组	单注组
3 h	8.73 ± 1.22*△#	7.05 ± 0.97	7.00 ± 0.83
6 h	8.08 ± 1.06	7.32 ± 0.92	7.37 ± 0.98
12 h	7.26 ± 1.06	6.95 ± 0.97	6.53 ± 0.81
1 d	6.20 ± 0.88	6.03 ± 0.83	6.35 ± 0.58
3 d	5.02 ± 0.77**△##	5.50 ± 0.77*	6.80 ± 0.85
5 d	5.28 ± 0.86*##	5.97 ± 0.81	7.18 ± 0.59
7 d	5.62 ± 0.76	6.55 ± 0.82	6.68 ± 0.96

注: 与对照组(6.86 ± 1.13)比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 烧注组与单烧组比较, △ *P* < 0.05, △△ *P* < 0.01; 烧注组与单注组比较, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01, 各时相点鼠数为 8 只

2. 骨髓 CFU-GM 变化, 烧注组 CFU-GM 伤后 3、6 h 略高于对照组, 但很快就下降, 伤后 12 h 显著低于对照组, 伤后 1 d、3 d 达最低水平(图 1, 2), 持续至 5 d 仍显著低于对照组, 并于伤后 1、3 d 显著低于单烧组和单注组。单烧组伤后 3、6 h 略有升高, 以后开始下降, 于伤后 1、3 d 显著低于对照组。单注组仅在伤后 1 d 显著低于对照组, 见表 2。

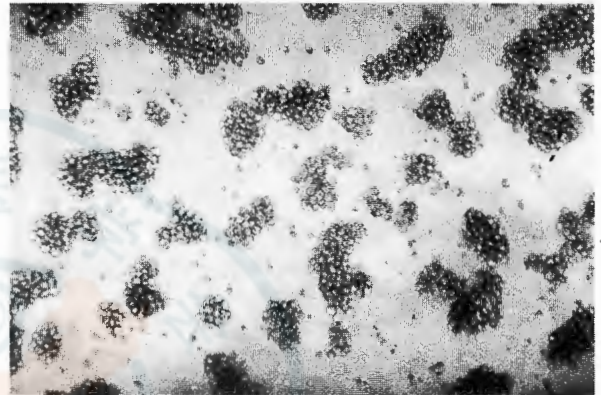


图 1 对照组粒单系祖细胞集落(CFU-GM) 光镜 × 50
Fig 1 CFU-GM Control in normal group LM × 50

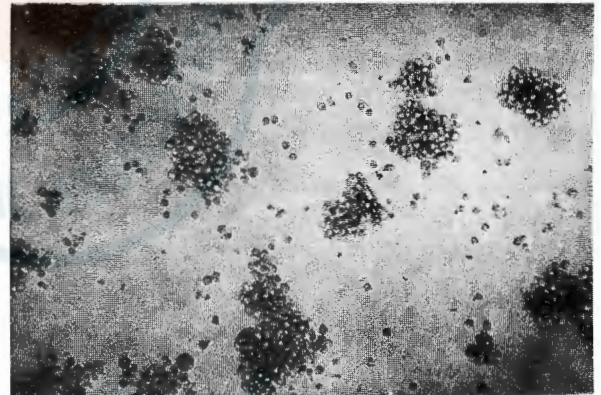


图 2 烧注组 1 d 粒单系祖细胞集落(CFU-GM), 数目明显减少 光镜 × 50
Fig 2 CFU-GM decreased evidently in burn group 1 PBD LM × 50

表 2 不同时间小鼠骨髓 CFU-GM 变化 (集落数/4 × 10⁵, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The postburn change of CFU-GM in bone marrow (colonies/4 × 10⁵, $\bar{x} \pm s$)

伤后时间	组别		
	烧注组	单烧组	单注组
3 h	96.00 ± 8.34	97.17 ± 7.52	90.17 ± 7.22
6 h	95.83 ± 6.65	101.00 ± 7.21	93.17 ± 8.45
12 h	85.50 ± 6.47*	91.00 ± 10.26	89.33 ± 7.74
1 d	69.33 ± 5.82**△△##	86.33 ± 6.28*	86.00 ± 6.57*
3 d	73.17 ± 5.42**△##	84.00 ± 6.45*	88.50 ± 5.75
5 d	86.00 ± 6.96*	90.83 ± 6.46	93.17 ± 7.14
7 d	86.83 ± 7.19	93.50 ± 6.92	95.83 ± 7.67

注: 与对照组(94.60 ± 7.52)比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 烧注组与单烧组比较, △ *P* < 0.05, △△ *P* < 0.01; 烧注组与单注组比较, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01, 各时相点鼠数为 8 只

3. 骨髓细胞上清中 PGE₂ 含量变化: 烧注后 12 h 骨髓细胞上清 PGE₂ 含量较正常对照组明显升高, 1 d 达高峰, 以后逐渐下降, 但持续至 7 d 仍维持在较高水平。烧注组 PGE₂ 于伤后 1 d 显著高于单烧组, 1、3 d 显著高于单注组。单烧组 12 h PGE₂ 显著升高, 3 d 达高峰。单注组 12 h、1 d PGE₂ 显著高于正常对照组。见表 3。

表 3 不同时相点小鼠骨髓细胞上清 PGE₂ 含量变化 (pg/5 × 10⁶, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The postburn change of PGE₂ content in BMNC supernatant (pg/5 × 10⁶, $\bar{x} \pm s$)

伤后时间	组别		
	烧注组	单烧组	单注组
3 h	114.45 ± 16.06	116.94 ± 17.77	134.60 ± 19.72
6 h	141.61 ± 15.59	137.29 ± 20.35	138.32 ± 21.97
12 h	175.79 ± 23.87**	151.23 ± 23.53*	159.71 ± 22.69**
1 d	231.81 ± 31.92** ^{△##}	178.04 ± 41.06**	153.07 ± 13.01**
3 d	218.59 ± 33.43** ^{###}	191.17 ± 29.15**	139.32 ± 18.51
5 d	164.19 ± 24.39**	155.97 ± 14.72	145.28 ± 21.96
7 d	147.30 ± 28.30	139.06 ± 19.82	121.07 ± 17.06

注: 与对照组(124.76 ± 19.21)比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 烧注组与单烧组比较; △ P < 0.05, △△ P < 0.01; 烧注组与单注组比较; # P < 0.05, ### P < 0.01, 各时相点鼠数为 8 只

4. 骨髓细胞内 cAMP 含量变化: 烧注组骨髓细胞内 cAMP 伤后 12 h 显著升高, 1 d 达高峰, 持续至伤后 7 d 仍维持在较高水平, 并于伤后 1、3 d 显著高于单烧组, 1~7 d 显著高于单注组。单烧组伤后 12 h~5 d cAMP 显著高于对照组, 单注组伤后 12 h、1 d 显著高于对照组。骨髓细胞内 cAMP 与骨髓细胞上清 PGE₂ 含量呈显著正相关 (r = 0.978, P < 0.01), 与 CFU-GM 呈显著负相关 (r = -0.971, P < 0.01), 见表 4。

表 4 小鼠骨髓细胞内 cAMP 含量变化 (pmol/5 × 10⁶, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The postburn change of intracellular cAMP content of BMNC (pmol/5 × 10⁶, $\bar{x} \pm s$)

伤后时间	组别		
	烧注组	单烧组	单注组
3 h	8.90 ± 1.19	8.35 ± 0.96	8.42 ± 1.15
6 h	9.29 ± 0.82	9.06 ± 1.38	9.47 ± 1.36
12 h	11.22 ± 0.95**	10.70 ± 0.92**	10.66 ± 0.81**
1 d	15.91 ± 1.01** ^{△△##}	12.88 ± 1.52**	11.77 ± 1.16**
3 d	15.07 ± 0.81** ^{△##}	13.08 ± 2.00**	9.70 ± 1.88
5 d	11.48 ± 1.02** ^{###}	11.57 ± 1.61**	8.78 ± 0.99
7 d	9.74 ± 1.06*	9.28 ± 0.82	8.04 ± 1.26

注: 与对照组(8.83 ± 0.71)比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 烧注组与单烧组比较; △ P < 0.05, △△ P < 0.01; 烧注组与单注组比较; # P < 0.05, ### P < 0.01, 各时相点鼠数为 8 只

5. COX-2 免疫组织化学染色结果: 烧注组伤后 6 h 可见散在的阳性细胞 (+), 12 h 阳性细胞数增多 (+ +), 1、3 d 阳性细胞数明显增多 (+ + +, 图

3), 5、7 d 阳性细胞数减少 (+)。单烧组伤后 6、12 h 可见少量阳性细胞 (+), 1、3 d 阳性细胞数增多 (+ +, 图 4), 5、7 d 可见少量阳性细胞 (+)。单注组 12 h 可见较多阳性细胞 (+ +), 以后逐渐减少, 3 d 后偶见阳性细胞。对照组偶见 COX-2 阳性细胞。



图 3 烧注组 1 d 骨髓细胞 COX-2 蛋白胞浆呈阳性, 数量明显增多 (+ + +) SP × 400

Fig 3 The positive BMNC increased obviously (+ + +) with positive COX-2 protein in the cytoplasm burn injection group SP × 400



图 4 单烧组 1 d 骨髓细胞 COX-2 蛋白胞浆呈阳性, 数量较多 (+ +) SP × 400

Fig 4 The positive BMNC increased (+ +) with positive COX-2 protein in the cytoplasm. simple burn group SP × 400

讨 论

临床上, 严重烧伤患者常因多种原因合并内毒素血症, 是引起全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能衰竭 (MOF) 的重要原因之一^[3]。骨髓粒单系造血功能的改变是烧伤后机体反应的重要病理改变之一。近年来对烧伤后外周血 WBC 数量和功能的变化研究较多, 而对造血干/祖细胞增殖、分化和调控研究较少, 且由于研究对象和方法的不同所报道的结果不尽一致。笔者注意到, 烧伤合并内毒素注射组伤后 12 h 内外周血 WBC 升高, 可能与 LPS 和 PAF 等刺激单核-巨噬细胞分泌集落刺激因子 (CSFs) 增多, 从而加快骨髓造血细胞增殖、骨髓贮备池和外周血边缘池释放增多、中性粒细胞凋亡被

抑制及血液浓缩等多种因素有关^[4]。而后期持续低于对照组水平则主要与粒单系祖细胞(CFU-GM)增殖、分化及成熟受阻有关^[5,6]。

PGE₂ 是一种增殖负性调控因子,在体内外均可抑制骨髓及脾脏 CFU-GM 的形成,在 CFU-GM 增殖中起重要作用。COX-2, 又称前列腺素内过氧化物合成酶 2 (PGHS-2), 主要在经刺激活化的免疫细胞中表达,是催化 PGE₂ 合成的主要限速酶^[7]。已有的研究表明,严重烧(创)伤或感染后,多种因素(如 LPS, PAF, TNF- α , IL-1, NO, TGF- β 等)均可刺激 COX-2 诱导表达,从而产生大量的 PGE₂。本实验采用放射免疫分析方法测定了骨髓细胞上清中 PGE₂ 水平,采用免疫组化法检测了骨髓细胞中 COX-2 的表达,结果各实验组 PGE₂ 水平较对照组均有不同程度的升高,其变化趋势与骨髓细胞中 COX-2 表达变化趋势基本一致,表明烧注组伤后骨髓组织局部产生的 PGE₂ 主要由 COX-2 催化产生。

PGE₂ 的抑制效应主要通过与其特异性受体结合,激活腺苷酸环化酶(AC),使细胞内 cAMP 升高,进而发挥作用^[8]。本研究应用放射免疫分析法检测了骨髓细胞内 cAMP 含量变化,烧注组 12 h ~ 5 d cAMP 水平显著升高,经相关性检验得知,cAMP 水平与骨髓细胞上清 PGE₂ 水平呈显著正相关,骨髓细胞内 cAMP 含量与 CFU-GM 呈显著负相关。表明烧注组伤后经 PGE₂ 途径产生的 cAMP 在骨髓粒单系抑制中起重要作用。文献也报道 cAMP 类似物 dBcAMP 或腺苷酸环化酶激动剂 Forskolin 对 CFU-GM 有明显的抑制作用^[5]。cAMP 抑制造血干/祖细胞对各种刺激的有丝分裂反应,并使祖细胞的生长

停滞在细胞周期的 G1 期,主要通过 cAMP 依赖的蛋白激酶 A (PKA)、丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK)、核因子 κ B (NF- κ B)、激活的转录因子/cAMP 反应元件 (ATF/CRE)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 等多种信号通路抑制细胞增殖、分化^[9,10]。

参 考 文 献

- 1 魏泓,主编. 医学实验动物学. 成都:四川科学技术出版社,1998. 389 - 392.
- 2 葛忠良,杨景山,主编. 医学细胞化学与细胞生物学技术. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1992. 6:305 - 315.
- 3 Yao YM, Sheng ZY, Tian HM, et al. The association of circulating endotoxemia with the development of multiple organ failure in burned patients. *Burns*, 1995, 21: 255 - 258.
- 4 Chitnis D, Dickerson C, Munster AM, et al. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol*, 1996, 59: 835 - 839.
- 5 Gamelli RL, He LK, Liu H, et al. Burn wound infection-induced myeloid suppression, the role of prostaglandin E₂, elevated adenylate cyclase, and cyclic Adentsine monophosphate. *J Trauma*, 1998, 44: 469 - 474.
- 6 Shoup M, Weisenberger JM, Wang JL, et al. Mechanisms of neutropenia involving myeloid maturation arrest in burn sepsis. *Annals of Surgery*, 1998, 228: 112 - 122.
- 7 Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *J Biochem Cell Biol*, 1999, 31: 551 - 557.
- 8 Fernandez-Botran R, Suzuki T. Prostaglandin-sensitive adenylate cyclase of a murine macrophage-like cell line (P388D1): II. Isolation and partial characterization of PGE₂-binding proteins. *J Immunol*, 1984, 133: 2662 - 2667.
- 9 Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, 1993, 262: 1069 - 1072.
- 10 Schwacha MG, Samy TSA, Catania RA, et al. Thermal injury alters macrophage responses to prostaglandin E₂: contribution to the enhancement of inducible nitric oxide synthases activity. *J Leuko Biol*, 1998, 64: 740 - 746.

(收稿日期:2001-01-25)

(本文编辑:赵云)

· 警钟 ·

烧伤休克期体位不当并发窒息四例

李永忠

笔者单位近 8 年来收治的烧伤患者中,4 例因休克期体位不当而并发窒息,其中 3 例死亡,教训深刻。

本组中 1 例患者烧伤总面积为 34% TBSA,其中 III 度面积为 5% TBSA,面颈部均为深 II 度创面,疑伴有吸入性损伤,但未引起重视。伤后 47 h 欲行双手削痂植皮术,在侧卧行硬膜外置管麻醉的过程中,患者突然躁动、摆头,继之呼吸骤停,行紧急气管插管时见咽峡部有水疱。插管后,待其病情

稳定即行气管切开,遂抢救成功。余下的 3 例中,1 例 II 度烧伤患者(面积 80% TBSA)在使用翻身床翻身时窒息死亡;另 2 例烧伤面积各为 97%、60% TBSA 的患者,皆因夜间家属为其侧身而致窒息死亡。

体会及教训:对大面积烧伤患者而言,随着抗休克治疗的进行及病程的延续,创面局部及远隔部位水肿逐渐明显,伤后 24 h 达高峰,咽喉部亦不例外。此时变动体位,易致喉头部位梗阻或坠积性水肿,引起窒息,本组 4 例皆如此,应引以为戒。

(收稿日期:2001-07-02)

(本文编辑:罗勤)

作者单位:071000 保定,解放军第二五二医院烧伤科