

· 烧伤免疫 ·

# 严重烧伤大鼠胸腺诱导型一氧化氮合酶表达对细胞凋亡的影响

胡章颜 程上穆 朱清仙



**【摘要】** 目的 观察严重烧伤大鼠胸腺诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达对胸腺细胞凋亡的影响,探讨一氧化氮(NO)与胸腺病理损害的关系。方法 将56只雄性Wistar大鼠随机分为对照组(8只)、烧伤组(24只)、烧伤+硫酸甲基异硫脲(SMT)组(24只)。后两组大鼠背部造成30%TBSAⅢ度烧伤,伤后分别立即静脉注射等渗盐水、等渗盐水+SMT(7.5 mg/kg);对照组不予烧伤及SMT处理。两烧伤组分别于伤后6、24、72 h检测胸腺重量、胸腺细胞凋亡情况(原位缺口末端标记法)、胸腺iNOS表达情况(免疫组织化学染色法),采用体视学方法测定阳性细胞密度,每时相点8只;同时测定对照组相应指标。结果 烧伤组大鼠伤后24、72 h胸腺重量分别为(153±14)、(91±22)mg,明显轻于对照组[(243±12)mg,  $P < 0.01$ ];烧伤+SMT组此时明显高于烧伤组( $P < 0.01$ )。对照组大鼠胸腺皮、髓质可见散在少量凋亡阳性细胞、iNOS阳性细胞。烧伤组大鼠伤后6 h胸腺皮质有凋亡阳性细胞及少量iNOS阳性细胞;伤后24 h时凋亡阳性细胞分布于被膜下皮质、皮髓交界处及髓质,iNOS阳性细胞广泛出现在小叶间隔内血管旁;伤后72 h时凋亡阳性细胞使胸腺皮质广泛呈现棕褐色;伤后6~72 h烧伤组iNOS阳性细胞呈进行性增加( $P < 0.05$ )。烧伤+SMT组大鼠伤后各时相点阳性细胞较少且分布不均,凋亡灶少见,未见iNOS阳性细胞。烧伤组大鼠伤后24、72 h凋亡阳性细胞密度分别为(2.428±0.728)×10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>、(5.586±1.233)×10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>,高于对照组和烧伤+SMT组( $P < 0.01$ )。结论 严重烧伤大鼠伤后早期胸腺细胞凋亡率增加,iNOS在胸腺表达增强并促进了胸腺细胞凋亡;SMT则能部分改善这一现象。

**【关键词】** 烧伤; 细胞凋亡; 胸腺; 诱导型一氧化氮合酶

**Influence of induced nitric oxide synthase expression on apoptosis of thymocyte in burn rats** HU Zhang-yan\*, CHENG Shang-mu, ZHU Qing-xian. \*Department of Anatomy, Medical College of Shaoxing University, Shaoxing 312000, P. R. China

**【Abstract】** Objective To investigate the influence of induced nitric oxide synthase (iNOS) expression on apoptosis of thymocyte in burn rats, and to explore the relationship between NO and pathological lesion of the thymus gland in burn rats. Methods Fifty-six male Wistar rats were enrolled in the study and randomized into control (C, n=8, without treatment), burn (B, n=24), and S-methylisothiourea (SMT, n=24) groups. Equal amount of isotonic saline solution and SMT (7.5 mg/kg) were respectively intravenously infused into the rats in B and SMT groups after being inflicted with 30% TBSA full-thickness burns. The weight of thymus gland in each group were weighed, and thymocyte apoptosis and iNOS expression were determined with TUNEL method and immunohistochemistry, respectively at 6, 24, 72 postburn hours (PBH), with 8 rats at each time-point. The number of apoptotic cells and the density of iNOS positive cells in thymus was measured by stereological method. Results The weight of thymus in B group at 24 and 72 PBH [(153±14), (91±22)mg] were obviously heavier than those in C group, but much lighter than those in SMT group ( $P < 0.01$ ). A few apoptotic cells and iNOS positive cells were observed in cortex and medulla of thymus in C group, while they were observed in B group at 6 PBH, and the number of cells began to increase at 24 PBH, distributing in medulla, parenchyma, the boundary of cortex, and medulla under capsule. The iNOS positive cells in B group at 24 PBH were distributed around the interlobular septum. A large number of cortical cells with brown staining were observed in B group at 72 PBH, and the number of iNOS positive cells also increased, with scattered distribution and clear cell boundary. Fewer positive cells with uneven distribution, no iNOS positive cells, and few apoptotic foci were observed in SMT group after burns. The density of apoptotic cells in B group at 24 and 72 PBH was (2.428±0.728)×10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup> and (5.586±1.233)×10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>, respectively, which was obviously higher than that in C and SMT group. The density of iNOS positive cells in B group was increased in a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Conclusion The apoptotic rate of thymocyte in severely burn rats increases early after burns. The up-regulation of iNOS expression in thymus can

作者单位:312000 浙江绍兴文理学院医学院解剖学教研室(胡章颜);南昌大学医学院组织胚胎学教研室(程上穆、朱清仙)

promote apoptosis of thymocytes, while SMT can partially ameliorate this phenomenon.

**【Key words】** Burns; Apoptosis; Thymus gland; Induced nitricoxide synthase

严重烧伤后早期应激和炎症反应诱发的组织细胞凋亡是伤后脏器功能不全的原因之一。这些反应激活免疫细胞、组织细胞产生细胞因子和炎症介质,在诱发组织细胞凋亡中起了关键作用。研究表明,烧伤后早期组织细胞病理性凋亡是一种普遍现象,多发生在淋巴组织,伤后免疫细胞大量凋亡是导致免疫功能低下的直接原因之一<sup>[1]</sup>。胸腺是培育和选择 T 淋巴细胞的中枢免疫器官,严重烧伤后,胸腺反应较早且最为明显。本研究主要采用诱导型一氧化氮合酶(iNOS)免疫组织化学染色、原位缺口末端标记(TUNEL)法,观察烧伤大鼠胸腺 iNOS 阳性细胞、凋亡阳性细胞的表达,以探讨一氧化氮(NO)与烧伤大鼠胸腺病理损害的关系。

### 材料与方法

1. 主要试剂:多克隆兔抗鼠 iNOS 一抗购自美国 Santa Cruz 公司,iNOS 特异性抑制剂硫酸甲基异硫脲(SMT)购自美国 Cayman 公司,TUNEL 试剂盒购自美国 Promega 公司,链霉亲和素-生物素复合物试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

2. 动物模型与分组:56 只雄性 Wistar 大鼠(南昌大学医学院实验动物中心),体重(200 ± 13) g,按随机数字表分为对照组 8 只、烧伤组 24 只、烧伤 + SMT 组 24 只。后两组大鼠采用 50 g/L 的氯胺酮(0.1 g/kg)腹腔注射麻醉后,以 80 g/L 的硫化钠于背部脱毛,采用控时控温控压蒸气烫伤仪(南昌大学第一附属医院烧伤科)在压力 0.03 MPa、温度 106 °C 下持续作用 8 s,造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤),伤后立即腹腔注射等渗盐水(40 ml/kg)抗休克<sup>[2]</sup>。此外烧伤 + SMT 组大鼠伤后立即静脉输注 SMT (7.5 mg/kg)<sup>[3]</sup>,持续 12 h。对照组除不予烧伤及 SMT 处理外,其余处理同前。

3. 标本采集与胸腺重量的检测:烧伤组和烧伤 + SMT 组大鼠分别于伤后 6、24、72 h 处死,开胸取出完整胸腺,天平称重后取部分组织于液氮中速冻 15 s,置入冻存管内于 -70 °C 冰箱中保存。对照组大鼠处理同上。

4. 胸腺 TUNEL 染色观察:采用 OCT 包埋剂包埋经液氮保存的胸腺组织块,切片(厚度 5 μm)。选取相邻 2 张较完好的切片贴附于经防脱片剂氨基三乙氧基硅烷液处理的载玻片上,干燥后放入丙酮

液(4 °C)固定 5 min。参照 TUNEL 试剂盒说明书操作,光学显微镜(×600,下同)下调亡阳性细胞呈棕黄色或棕褐色,背景为蓝色,阴性对照采用蒸馏水代替重组末端脱氧核糖核苷酸转移酶。

5. 胸腺 iNOS 免疫组织化学染色观察:取各组切片,参照文献[4],采用 1:300 稀释的多克隆兔抗鼠 iNOS 一抗原液进行操作。于光学显微镜下观察,iNOS 阳性细胞呈棕黄色或棕褐色,背景为蓝色,以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。

6. 体视学测量胸腺阳性细胞密度:采用点阵测试系统,总测试点为 100 个。光学显微镜下 d 为 12 μm、a 为 144 μm<sup>2</sup>、A<sub>T</sub>为 14 400 μm<sup>2</sup>。取各组标本作连续切片,隔 5 张取 1 张,共 5 张切片,于镜下每张切片取 5 个阳性细胞相对密集的视野,以阳性细胞为测试目标,整个胸腺作为包容空间,计数落在测试目标截面的测试点数和包容空间参照系内测试目标的截面数,算出阳性细胞密度(×10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>) = (K ÷ α<sup>3/2</sup> × β) × [ΣNx]<sup>3/2</sup> ÷ [ΣPc] × [ΣPx]<sup>1/2</sup>。Nx 为参照系内测试目标截面数;Px 为测试目标截面测试点数;Pc 为参照系内总测试点数;α 为每个测试点代表的面积;β 为形状系数,取值 1.38;K 为尺寸分布系数,取值 1。

7. 统计学处理:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

### 结果

1. 伤后 72 h 内烧伤组大鼠胸腺重量呈线性下降,伤后 6、24、72 h 均值分别为对照组的 94% (P > 0.05)、63% (P < 0.01)、37% (P < 0.01),其中伤后 72 h 胸腺外观呈现明显的脏器萎缩。见表 1。

表 1 各组大鼠伤后不同时相点胸腺重量(mg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	伤后时间(h)		
		6	24	72
烧伤组	24	228 ± 18	153 ± 14*	91 ± 22*
烧伤 + SMT 组	24	233 ± 12	204 ± 11*	165 ± 16*

注:对照组 8 只大鼠,胸腺重量为(243 ± 12) mg;与对照组比较,\* P < 0.01;与烧伤组比较,# P < 0.01

2. 对照组大鼠胸腺皮、髓质散在少量凋亡阳性细胞,且皮质多于髓质,阳性细胞多呈单个散布,偶尔聚集成群。伤后 6 h,烧伤组胸腺皮质可见凋亡阳性细胞,被膜下有皮质丛状凋亡灶(图 1);伤后 24 h,凋亡阳性细胞明显增多,分布于被膜下皮质、皮髓

交界处及髓质,前两处细胞常聚集成群呈灶状分布,也可见沿血管分布呈团块或花瓣状,分布不均;伤后72 h,凋亡阳性细胞占据大部分视野,皮质细胞广泛呈现棕褐色,阳性细胞密度明显高于对照组( $P < 0.01$ )。烧伤+SMT组伤后6~72 h凋亡阳性细胞密度较烧伤组低,其中伤后24、72 h尤其明显( $P < 0.01$ ),阳性细胞分布不均,凋亡灶少见。见表2。

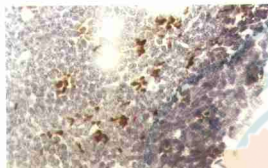


图1 伤后6 h烧伤组大鼠胸腺皮质存在凋亡阳性细胞,被膜下可见皮质从灶状凋亡灶。TUNEL x600

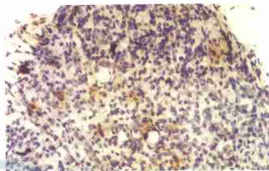


图2 伤后72 h烧伤组大鼠胸腺皮质可见iNOS阳性细胞,单个散在分布。DAB x600

表2 各组大鼠伤后不同时间点胸腺凋亡阳性细胞密度( $\times 10^{-5}/\mu\text{m}^3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	伤后时间(h)		
		6	24	72
烧伤组	24	1.101 ± 0.414*	2.428 ± 0.728*	5.586 ± 1.233*
		0.894 ± 0.018*	1.648 ± 0.522 <sup>△</sup>	3.862 ± 0.861 <sup>△</sup>
烧伤+SMT组	24	0.894 ± 0.018*	1.648 ± 0.522 <sup>△</sup>	3.862 ± 0.861 <sup>△</sup>
		0.018*	0.522 <sup>△</sup>	0.861 <sup>△</sup>

注:对照组8只大鼠,胸腺凋亡阳性细胞密度为(0.609 ± 0.311) × 10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>;与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与烧伤组比较, $\Delta P < 0.01$

3. 对照组胸腺有少量iNOS阳性细胞,密度为(0.07 ± 0.04) × 10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>,以胸腺基质细胞中的巨噬细胞、树突状细胞居多。烧伤组伤后6 h iNOS阳性细胞密度为(0.09 ± 0.04) × 10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>;伤后24 h iNOS阳性细胞广泛出现在小叶间隔内血管旁,单个散在或聚集分布,被膜下皮质、皮髓交界处及髓质内也见分布,密度为(0.38 ± 0.14) × 10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>,明显高于伤后6 h( $P < 0.05$ );伤后72 h iNOS阳性细胞明显增多,单个散在,阳性细胞界限清楚,密度为(0.77 ± 0.22) × 10<sup>-5</sup>/μm<sup>3</sup>,明显高于伤后24 h( $P < 0.05$ ,图2)。伤后6~72 h烧伤+SMT组未见iNOS阳性细胞。

## 讨 论

严重烧伤使机体产生的应激反应失常,免疫系统受损,免疫细胞增殖受抑,细胞凋亡、坏死及器官损害<sup>[8]</sup>。胸腺细胞凋亡可被热应激、γ射线、糖皮质

激素及抗CD3单克隆抗体等诱导,胸腺出现萎缩,表现为一种应激性退化<sup>[9]</sup>。本实验结果证实,烧伤组大鼠胸腺细胞凋亡加剧,各时相点内胸腺重量减少,萎缩;相同时相点下,烧伤+SMT组变化幅度低于烧伤组,表明SMT可减轻严重烧伤后胸腺细胞的凋亡,降低胸腺应激性萎缩的程度,与文献[7]的结果相似。笔者认为,严重烧伤后胸腺细胞凋亡、胸腺萎缩与iNOS表达有关。

生理状态下,胸腺自稳态要求胸腺细胞保持一定程度的凋亡率,目前认为主要由两种因素引起:糖皮质激素和NO<sup>[10,9]</sup>。胸腺基质细胞如巨噬细胞、树突状细胞、血管内皮细胞产生的NO是胸腺双阳性T淋巴细胞阴性选择的主要效应分子<sup>[8]</sup>。本实验观察到,烧伤后胸腺凋亡阳性细胞分布并不均匀,以被膜下皮质、皮髓交界处及髓质内为常见,多聚集成灶状。这些区域是巨噬细胞、树突状细胞、血管内皮细胞等胸腺基质细胞的主要分布地,它们受到诸如肿瘤坏死因子(TNF)α、干扰素γ(IFN-γ)、白细胞介素10等的刺激,常活化表达iNOS,已有相关文献报道<sup>[10]</sup>。本研究表明,iNOS阳性细胞的分布与上述部位基本一致。由此得出结论:在烧伤后机体产生的各种细胞因子的刺激下,胸腺基质细胞表达了iNOS,产生NO及其代谢产物,促进了胸腺细胞凋亡。本研究结果表明,烧伤后主要是巨噬细胞、树突状细胞表达iNOS,产生NO参与胸腺细胞的凋亡。伤后6 h,烧伤组和烧伤+SMT组的凋亡阳性细胞密度大致相同,可能是伤后应激反应所产生的iNOS尚未表达的结果。烧伤应激可增加机体糖皮质激素水平,其过量也可引起胸腺细胞发生凋亡,但它大多在48 h后被激活。本研究显示,伤后24 h胸腺细胞凋亡已加剧,笔者认为这种变化是iNOS表达的结果,至于两者的具体关系,有待进一步探讨。

NO是一种多效性的介质和信号分子,由一氧化氮合酶(NOS)通过左旋精氨酸末氨基氮氧化合

成。目前有一些新的认识:神经型 NOS、内皮型 NOS 也可诱导性表达;生理条件下, iNOS 在多种类型细胞中也可作为结构性酶存在<sup>[11]</sup>。小剂量的 NO 在多种生理性自稳态中发挥作用,但在脂多糖或细胞因子、氧化应激作用下, iNOS 活性增强,持续合成大量的 NO,可引起细胞凋亡。烧伤产生的应激和伤后各种细胞因子、炎性介质大量释放,促使 iNOS 广泛表达于胃、肠、心、肺等器官,参与这些器官的病理损害过程。iNOS 在烧伤后机体免疫系统中表达,抑制免疫活性细胞的增殖,引起免疫抑制<sup>[12]</sup>。烧伤后 iNOS 在脾脏中高表达导致 T 淋巴细胞凋亡,是脾细胞增殖受抑的主要原因<sup>[12]</sup>。本研究显示,对照组胸腺皮质和髓质交界区有少量 iNOS 阳性细胞,这与胸腺基质细胞表达 iNOS,参与胸腺双阳性细胞负性选择相符。伤后 24 h 烧伤组 iNOS 阳性细胞在小叶间隔毛细血管及周围广泛表达、明显增多,说明胸腺血管内皮细胞受伤后相关致炎因子和细胞因子(IFN-γ、TNF-α 等)作用, iNOS 表达增强。Hosnuter 等<sup>[13]</sup>报道,烧伤后 24 h 患者的血液和尿液中亚硝酸根离子/硝酸根离子明显增加, iNOS 的活性升高,结构性 NOS 的活性降低。伤后 72 h 烧伤组 iNOS 阳性细胞广泛分布在被膜下皮质、皮髓交界处和髓质内,这些部位的巨噬细胞、树突状细胞和血管内皮细胞是胸腺内 NO 的主要来源<sup>[10]</sup>。SMT 处理后,烧伤大鼠胸腺内未见 iNOS 表达。SMT 是一种非氨基酸左旋精氨酸类似物,对 iNOS 的底物左旋精氨酸产生竞争性抑制,占据左旋精氨酸的结合位点,阻断 iNOS 的合成,从而抑制了其在胸腺组织中的表达。

参 考 文 献

1 黎鳌,主编.黎鳌烧伤学.上海:上海科学技术出版社,2001. 318-338.

2 王年云,陈江.介绍一种体表蒸气烫伤动物模型的制作方法.中华烧伤杂志,2003,19:306.  
 3 Chen LW, Hwang B, Chag WJ, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibitor reverses exacerbating effects of hypertonic saline on lung injury in burn. Shock, 2004, 22:472-477.  
 4 Yan Z, Chen Z, Chen Z. Modulation of nitric oxide synthase isoenzymes in reperfused skeletal muscle. Chin J Traumatol, 2000, 3: 76-80.  
 5 Maekawa T, Kajihara H, Okabayashi K, et al. Impairment of splenic B and T lymphocytes in the early period after severe thermal injury: immunohistochemical and electron microscopic analysis. Burns, 2002, 28:329-339.  
 6 蒋定文,郭明秋,陈立茵,等.热应激诱导的胸腺细胞凋亡及相关分子表达.中国免疫学杂志, 2001, 17:232-235.  
 7 de la Rosa P, Barnett JB, Schafer R. Characterization of thymic atrophy and the mechanism of thymocyte depletion after in vivo exposure to a mixture of herbicides. J Toxicol Environ Health A, 2005, 68: 81-98.  
 8 Tai XG, Toyo-oka K, Yamamoto N, et al. Expression of an inducible type of nitric oxide synthase in thymus and involvement of NO in deletion of tr-stimulated double-positive thymocytes. J Immunol, 1997, 158:4696-4703.  
 9 Brewer JA, Kanagawa O, Sleckman BP, et al. Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo. J Immunol, 2002, 169:1837-1843.  
 10 Lu L, Bonham CA, Chambers FG, et al. Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells; nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. J Immunol, 1996, 157:3577-3586.  
 11 Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, et al. Nitric oxide, cell signaling and cell death. Toxicology, 2005, 208:177-192.  
 12 Valenti L, Mathieu J, Chancerelle Y, et al. Nitric oxide inhibits spleen cell proliferative response after burn injury by inducing cytostasis, apoptosis, and necrosis of activated T lymphocytes: role of the guanylate cyclase. Cell Immunol, 2003, 221:50-63.  
 13 Hosnuter M, Gurel A, Babuccu O, et al. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rat following thermal injury. Burns, 2004, 30:121-125.

(收稿日期:2006-05-18)

(本文编辑:莫愚)

· 消息 ·

《创伤学——基础与临床》即将出版

由王正国院士主编,王忠诚、王澍寰、朱晓东、张涤生、张震康、郭应禄、顾玉东、盛志勇、黄志强、程天民、葛宝丰等院士和专家共同编撰的医学巨著《创伤学——基础与临床》,2006年11月由湖北科学技术出版社正式出版。

全书分上、下两册。共20篇,600余万字,定价760元。其内容包括创伤外科基础、创伤流行病学、创伤后内脏并发症、创伤修复、组织工程、交通伤、特殊创伤、烧伤、战伤、创伤整形、颅脑创伤、口腔颌面部创伤、胸部创伤、腹部创伤、泌尿生殖系统创伤、四肢创伤、手部创伤、脊柱脊髓伤和骨盆伤、创伤护理、创伤康复等方面。

本书的特点和特色在于每一篇内容都由著名专家把关,尽可能全面地介绍本专业领域的知识并充分反映国内外在这一领域中的研究现状,同时也提出了一些在理论上和实际应用中存在的问题。全书内容全面翔实,理论与实际应用并重,可视为当今我国创伤学的一部代表作。

如欲购买,可与湖北科学技术出版社联系,地址:湖北省武汉市洪山区雄楚大街268号,邮政编码:430070;联系电话:027-87679468,87679467。