

· 早期损害 ·

热休克因子 1 基因转染对烧伤血清刺激的巨噬细胞炎性介质表达的影响

罗成群 尹朝奇 周建大 贺全勇 朱颖 李萍 陈铁夫 彭浩 徐阳成 陈佳



【摘要】 目的 了解外源性热休克因子 1(HSF 1)对烧伤血清刺激的巨噬细胞中相关炎性介质基因表达的影响。**方法** 制备严重烧伤和正常大鼠血清;构建 pcDNA 3.1/HSF 1 重组载体。将培养的 RAW 264.7 巨噬细胞株转染(具体分为:未转染、转染空载体、转染重组载体)后再分别使用前述 2 种血清刺激。另取部分未行血清刺激的转染重组载体的巨噬细胞,用蛋白质印迹法检测其 HSF 1 蛋白表达水平;反转录-PCR 法检测经血清刺激的细胞中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、高迁移率族蛋白 B1(HMGB 1)和白细胞介素 10(IL-10)基因表达水平。**结果** 已转染重组载体的细胞株较稳定,检出有 HSF 1 部分活化。反转录-PCR 检测到,未转染的正常血清刺激的巨噬细胞中 TNF- α 、HMGB 1、IL-10 的基因仅有少量表达,而烧伤血清刺激能明显上调其基因表达(分别为 0.910 ± 0.100 、 0.860 ± 0.020 、 0.430 ± 0.010);与转染空载体 + 烧伤血清组(上述 3 项指标分别为 0.800 ± 0.050 、 0.880 ± 0.030 、 0.420 ± 0.010)比较,转染重组载体 + 烧伤血清组可明显抑制巨噬细胞中 TNF- α 和 HMGB 1 的基因表达并上调 IL-10 的基因表达(分别为 0.130 ± 0.100 、 0.450 ± 0.020 、 0.450 ± 0.020)。**结论** 严重烧伤后给予 HSF 1 可以抑制巨噬细胞产生的某些促炎介质的表达,适当上调某些抗炎介质的表达,对机体发挥保护作用。

【关键词】 烧伤; 血清; 热休克蛋白质类; 巨噬细胞; 转染; 白细胞介素 10; 肿瘤坏死因子 α ; 高迁移率族蛋白质类

Influence of heat shock factor 1 gene transfection on the expression of inflammatory mediators in macrophages induced by burn serum LUO Cheng-qun, YIN Chao-qi, ZHOU Jian-da, HE Quan-yong, ZHU Jie, LI Ping, CHEN Tie-fu, PENG Hao, XU Yang-cheng, CHEN Jia. Department of Burns and Plastic Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, P. R. China

Corresponding author: YIN Chao-qi, Email: yinchaoqi@163.com, Tel: 13975176526

【Abstract】 Objective To investigate the influence of heat shock factor1(HSF1) on gene expression of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophage cells induced by burn serum. **Methods** Sera were separated from blood of normal rats and rats with severe burns, and the recombinant vector pcDNA3.1/HSF1 was constructed. RAW264.7 macrophages were divided into non-transfection group, vacant vector group (with burn and normal sera stimulation, respectively after vacant vector transfection) and recombinant vector group (with burn and normal sera stimulation, respectively after recombinant vector transfection). Some recombinant vector transfected macrophages without serum stimulation were prepared for the determination of HSF 1 expression with Western blotting. The mRNA expressions of TNF- α , HMGB 1 and IL-10 were determined with RT-PCR. **Results** The cell line attained after recombinant vector transfection was comparatively stable, with partial activation of HSF 1. Burn sera markedly upregulated TNF- α , HMGB1 mRNA expression (0.910 ± 0.100 , 0.860 ± 0.020 , respectively), but downregulated IL-10 expression (0.430 ± 0.010 , respectively) in normal macrophages, while these genes maintained in a very low level in normal macrophages with normal serum stimulation. macrophages with recombinant vector transfection and burn serum stimulation could obviously inhibit the expression of TNF- α and HMGB 1, but enhance the IL-10 gene expression (0.130 ± 0.100 , 0.450 ± 0.020 , 0.450 ± 0.020 , respectively) when compared with that with vacant vector transfection and burn serum stimulation (0.800 ± 0.050 , 0.880 ± 0.030 , 0.420 ± 0.010 , respectively). **Conclusion** HSF1 can inhibit the expression of some pro-inflammatory mediators in macrophages after a severe burns, indicating that appropriate upregulation of anti-inflammatory mediators might exert protective effects on the organism.

基金项目:国家自然科学基金(30672035)

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅三医院烧伤整形科

通讯作者:尹朝奇,Email:yinchaoqi@163.com,电话:13975176526

【Key words】Burns; Serum; Heat shock proteins; Macrophages; Transfection; Interleukin 10; Tumor necrosis factor alpha; High mobility group box proteins

严重烧伤后单核巨噬细胞过度活化,大量产生各种促炎、抗炎介质^[1,2],这种免疫系统的过度应答即为全身炎症反应综合征(SIRS),是病情进一步恶化发展为严重感染、多器官功能障碍综合征、多器官功能衰竭的途径和基础^[3],也是多年来严重烧伤患者病死率难以降低的根本原因。其中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和高迁移率族蛋白 B 1(HMGB 1)分别为最重要的早期和晚期促炎介质^[4],白细胞介素 10(IL-10)是最重要的抗炎介质。有研究表明,热休克反应(HSR)中活化的热休克因子 1(HSF 1)可直接与 TNF- α 基因启动子区的热休克元件结合而抑制 TNF- α mRNA 的表达^[5]。但 HSF 1 是否能直接调控 IL-10、HMGB 1 的表达,目前鲜见报道。

本研究中,笔者构建含 HSF 1 基因的重组表达载体,用其转染 RAW 264.7 巨噬细胞株,观察外源性 HSF 1 对烧伤血清刺激的巨噬细胞中相关炎症介质表达水平的影响并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640 培养基、Trizol 试剂(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),PCR 试剂盒(美国 BD 公司),Lipofectamine 2000 质粒转染剂盒、真核表达载体 pcDNA 3.1(美国 Invitrogen 公司),琼脂糖、限制性内切酶、T4 连接酶(美国 Biotechnology 公司),HSF 1 质粒和 RAW 264.7 巨噬细胞株(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室),DNA 酶 I(瑞士 Roche 公司),Taq 酶(大连宝生物工程有限公司)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 HSF 1 cDNA 的扩增及鉴定 对 HSF 1 cDNA 行 PCR 扩增,产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示约 1500 bp 的特异性条带,同预期结果相符。

1.2.2 pcDNA 3.1/HSF 1 重组载体的构建 将上述 PCR 产物纯化,与 pcDNA 3.1 载体酶切后共培养,挑取单克隆菌落,用碱裂解法制备少量载体,用限制性内切酶进行酶切鉴定,并送上海生工生物工程有限公司测序。取含有连接正确的 pcDNA 3.1/HSF 1 载体的菌种大量培养,抽提、纯化质粒 DNA。

1.2.3 pcDNA 3.1/HSF 1 转染巨噬细胞 根据

试剂盒说明书进行操作。细胞转染后冻存。

1.2.4 血清制备 健康清洁级 SD 大鼠(中南大学湘雅医学院实验动物学部)40 只,雌雄各半,体质量 220~320 g,按随机数字表法分为烧伤组、正常组,每组 20 只。烧伤组大鼠经腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,背部以 200 g/L 硫化钠脱毛后清洁皮肤,将脱毛区置于 92 °C 水浴中 12 s,造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实,以下称烧伤)。大鼠烧伤后立即经腹腔注入等渗盐水(40 ml/kg)抗休克,伤后 24 h 取其心脏血 4 °C 下静置 60 min,3000 × g 离心 10 min,取血清,分装后于 -20 °C 保存。正常组大鼠以 37 °C 水浴模拟致伤过程,其余操作同烧伤组。

1.2.5 细胞培养与血清处理 常规复苏巨噬细胞并接种于含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于培养箱中常规培养。至细胞生长达 70%~80% 融合时,取出培养瓶,弃去培养液,加入消化液,轻轻摇动使液体浸润所有细胞表面。消化数分钟,于显微镜下见胞质回缩、细胞间隙增大后倒掉消化液,4 °C 下加入用去离子水配制的 10 g/L RPMI 1640 培养液,反复吹打成细胞悬液,计数并接种在新的培养瓶内。将瓶中巨噬细胞置于 42 °C 的恒温水浴锅中温育 1 h,然后加入血清与 RPMI 1640 的混合液(体积比为 1:5),调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,常规培养 24 h 后待测。

1.2.6 细胞分组 (1)烧伤血清组(用烧伤血清刺激未转染的巨噬细胞)、转染空载体 + 烧伤血清组(巨噬细胞转染 pcDNA 3.1 空载体后用烧伤血清刺激)、转染重组载体 + 烧伤血清组(巨噬细胞转染 pcDNA 3.1/HSF 1 重组载体后用烧伤血清刺激)。(2)将正常血清作为烧伤血清的对照,对应前述 3 组细胞的实验操作,设正常血清组、转染空载体 + 正常血清组和转染重组载体 + 正常血清组。

1.2.7 观察指标 (1)取部分未行血清刺激的稳定转染重组载体的巨噬细胞,蛋白质印迹法分析巨噬细胞中 HSF 1 蛋白表达水平及潜在活性。(2)反转录-PCR 法检测各组巨噬细胞中炎症介质的基因表达水平。

1.3 统计学处理

部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 巨噬细胞中的 HSF 1 蛋白表达水平

转染重组载体的巨噬细胞经 G418 筛选 4 周后, 挑出 6 个阳性克隆用蛋白质印迹法进行分析。有 3 个阳性克隆中的 HSF 1 蛋白表达明显增加, 均出现相对分子质量约 72×10^3 的外源性 HSF 1 蛋白条带 (重组 HSF 1 蛋白相对分子质量约 72×10^3 , 内源性 HSF 1 蛋白相对分子质量约为 69×10^3), 并伴有磷酸化 HSF 1 条带 (相对分子质量约 82×10^3) 出现。

2.2 各组巨噬细胞的炎性介质基因表达水平

2.2.1 IL-10 mRNA 表达水平

在正常血清刺激下巨噬细胞中 IL-10 mRNA 均有少量表达, 就转染相同物质而言, 用烧伤血清刺激的细胞中该表达明显增加 ($P < 0.05$); 与转染空载体 + 烧伤血清组比较, 转染重组载体 + 烧伤血清组巨噬细胞的 IL-10 mRNA 表达有所增强。见表 1。

表 1 各组细胞中炎性介质 mRNA 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	白细胞介素 10	高迁移率族蛋白 B1	肿瘤坏死因子 α
正常血清组	0.040 ± 0.010	0.210 ± 0.010	0.120 ± 0.080
转染空载体 + 正常血清组	0.050 ± 0.010	0.210 ± 0.020	0.120 ± 0.070
转染重组载体 + 正常血清组	0.250 ± 0.020	0.270 ± 0.020	0.030 ± 0.010
烧伤血清组	0.430 ± 0.010 ^a	0.860 ± 0.020 ^a	0.910 ± 0.100 ^a
转染空载体 + 烧伤血清组	0.420 ± 0.010 ^a	0.880 ± 0.030 ^a	0.800 ± 0.050 ^a
转染重组载体 + 烧伤血清组	0.450 ± 0.020 ^a	0.450 ± 0.020 ^{ab}	0.130 ± 0.100 ^{ab}

注: 数据以吸光度值表示; 各组样本数为 3; 与正常血清刺激下的转染相同物质组比较, a: $P < 0.05$; 与转染空载体 + 烧伤血清组比较, b: $P < 0.05$

2.2.2 HMGB 1 mRNA 表达水平

正常血清刺激下巨噬细胞中仅有少量 HMGB 1 mRNA 表达, 用烧伤血清刺激能明显诱导该表达升高 ($P < 0.05$); 与转染空载体比较, 转染重组载体可明显抑制烧伤血清刺激下巨噬细胞中 HMGB 1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2.3 TNF- α mRNA 表达水平

正常血清刺激下巨噬细胞中仅有少量 TNF- α mRNA 表达, 而烧伤血清刺激能明显诱导该表达升高 ($P < 0.05$); 与转染空载体比较, 转染重组载体可明显抑制烧伤血清刺激的巨噬细胞中 TNF- α mRNA 表达 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

有文献报道, 热休克蛋白 70 的过表达可明显抑制内毒素/脂多糖诱导的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-12 等炎性细胞因子的表达^[6]; 体外培养的各种细胞经诱

导 HSR 后, TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、诱导型一氧化氮合酶、细胞黏附分子 1 及环氧合酶 2 等促炎因子水平明显降低^[7], 抗炎因子 IL-10 水平有所升高^[8]。上述报道都证实 HSR 抑制了 SIRS 的病理过程。作为 HSR 中的关键分子, HSF 1 调控了哪些炎性介质基因, 其分子机制如何? HSF 1 基因是否对最重要的早期促炎介质 TNF- α 、晚期促炎介质 HMGB 1 和抗炎介质 IL-10 均发挥调控作用, 其分子机制如何? 目前鲜见相关报道。

本实验构建 HSF 1 基因的真核表达载体, 并用其稳定转染 RAW 264.7 巨噬细胞株, 该细胞株中有 HSF 1 的部分活化。反转录-PCR 检测结果显示, 正常情况下 (正常血清刺激) RAW 264.7 巨噬细胞中仅有少量 TNF- α mRNA、HMGB 1 mRNA 和 IL-10 mRNA 的表达, 而烧伤血清刺激能明显上调前两者的表达; 与转染空载体比较, 转染重组载体所致的 HSF 1 高表达可明显抑制烧伤血清刺激下巨噬细胞中 TNF- α mRNA、HMGB 1 mRNA 的表达并上调 IL-10 mRNA 表达。目前普遍认为 TNF- α 是介导脓毒性休克和组织损伤的关键介质。HMGB 1 作为 DNA 结合蛋白参与稳定染色质结构、功能和基因转录调控, 它于伤后晚期高表达的特点, 使得治疗中采取拮抗 HMGB 1 的措施更具有实际价值。IL-10 是重要的抗炎因子, 抑制单核巨噬细胞产生 TNF- α , 并促进其分泌 IL-1 受体拮抗剂, 血浆中 IL-10 与 TNF- α 的比例异常将导致脓毒症发生、病情恶化和预后不良。笔者在前期的研究中观察到, 大鼠烧伤后血清中促炎因子 TNF- α 表达显著升高, 抗炎因子 IL-10 显著下降, 至 12 h 已降至极低水平。这与文献^[9]报道相一致。但本实验中观察到单纯用烧伤血清刺激后 IL-10 水平有上升趋势, 但较 TNF- α 变化晚, 刺激一定时间后, IL-10 无明显下降。分析原因, 可能是体外实验与体内环境条件不同, 烧伤后细胞因子复杂的调节机制将会启动。但本实验结果仍然可以表明, HSF 1 参与了对烧伤患者体内炎性介质 TNF- α 、HMGB 1 和 IL-10 的调控。

细胞因子作为机体防御系统的重要组成部分, 在调节宿主免疫反应过程中具有双向作用。较低水平的细胞因子对维护内环境稳定起着有益作用, 可调节机体免疫功能、增强抵抗力; 当细胞因子水平过高时, 过度的炎性反应会造成组织损伤和器官功能障碍等。因此, 机体需要的是微妙的平衡, HSF 1 可能参与了对这种平衡的调节。本实验为 HSF 1 的抗炎作用提供了新的证据, 同时为研究干预 SIRS 及其

他病理过程的手段提供了新的思路。

参考文献

[1] Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2004, 18(3):385 - 405.

[2] Schwacha MG. Macrophage and post-burn immune dysfunction. *Burns*, 2003, 29(1):1 - 14.

[3] Lin LM, William RP, Luis U. HMGB-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock*, 2006, 25(1):4 - 11.

[4] Ni Choileain N, Redmond HP. The immunological consequences of injury. *Surgeon*, 2006, 4(1):23 - 31.

[5] Xiao XZ, Benjamin DR. Seress-responses proteins in cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(3):685 - 690.

[6] Ding XZ, Fernandez - Prada CM, Bhattacharjee A, et al. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocytoid-derived macrophages. *Cytokine*, 2001, 16(6):210 - 219.

[7] Ialenti A, Di Meglio P, D'Acquisto F, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by the heat shock response in J774 murine macrophages. *Eur J Pharmacol*, 2005, 509(3):89 - 96.

[8] Johnson BJ, Le TT, Dobbin CA, et al. Heat shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide -induced inflammatory mediator production. *J Biol Chem*, 2005, 280(6):4037 - 4047.

[9] 王勇, 彭代智, 黄文华. 烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 IL-10 mRNA 表达的变化趋势. *第三军医大学学报*, 2001, 23(6):702 - 704.

(收稿日期:2007-01-31)
(本文编辑:赵敏)

· 经验交流 ·

896 例烧伤住院患者院前急救情况的调查及分析

唐祖国 廖家盛 李卫东

1 临床资料

收集遂宁市 2003 年 1 月—2006 年 1 月 896 例烧伤住院患者的资料,对院前救治措施如去除致伤源、冷疗、创面处理、补液等情况进行调查分析。

2 结果

入院前所用急救方法正确的有 187 例患者,占 20.87%; 582 例所用方法不当,占 64.96%;127 例未行院前急救,占 14.17%。不当的处理方法主要有:(1)去除致伤源不正确。84 例“灭火”方式不当,占 9.38%;212 例未脱衣物,占 23.66%;69 例脱衣物方法不当,占 7.70%。(2)冷疗不正确。291 例未行冷疗,占 32.48%;193 例冷疗时间不足,占 21.54%;88 例冷疗液选择不当(有污染、有害)或用量不当,占 9.82%;51 例不应冷疗,占 5.69%。(3)创面处置不正确。219 例未处理创面,占 24.44%;157 例涂抹有颜色药物,占 17.52%;39 例清创彻底,占 4.35%;137 例覆盖和包扎不牢固,占 15.29%;其他原因 18 例,占 2.01%。(4)补液不正确。218 例未补液,占 24.33%;77 例不该口服补液,占 8.59%;144 例口服补液的量、成分不恰当,占 16.07%;23 例延迟补液,占 2.57%;66 例静脉补液过量,占 7.37%;49 例静脉补液成分、速度不恰当,占 5.47%。

3 讨论

及时、有效的院前急救措施,不仅仅可以避免创面加大、加深,还可以防止烟雾、高热空气等引起吸入性损伤和过多吸收铅类等有害物质而造成中毒。冷疗一般多用于烧伤面

积 <20% TBSA 的患者,但大面积烧伤并非完全禁忌^[1]。冷疗水温以患者能耐受为准,宜用大量流动自来水,时间一般为 0.5 ~ 1.0 h,它不仅能避免创面加深,且能减轻疼痛,减少创面渗出和水肿。现在临床上不主张“彻底”清创,且在休克基本控制后实施,若盲目清创,势必会促使患者发生或加重休克、降低抵抗力,不利于控制感染。覆盖或包扎创面宜用清洁、吸湿性强、透气性好的材料;包扎时要均匀加压,敷料边缘至少要超过创缘 5 cm,注意固定在功能位以便观察肢端血供。研究表明,烧伤后 0.5 ~ 1.0 h 体液渗出最快,烧伤面积越大,渗出高峰期越提前,故尽早、准确补液是防止休克、多器官功能衰竭甚至死亡的关键^[2]。口服补液忌饮白开水,要控制量并作记录,每次不超过 200 ml,以免造成腹胀、呕吐、胃扩张等,同时有休克症状者,立即改用静脉补液。静脉补液首先选用平衡盐溶液,无条件时可选用 50 g/L 葡萄糖盐水 + 12.5 g/L 碳酸氢钠(体积 1:1)代替,其间注意患者病情变化,作好转送前的准备。

烧伤专业医务人员均要切实履行宣传烧伤急救知识和指导院前急救的职责^[3]。加强“120”救护人员和乡、村、社区医务人员烧伤急救知识的学习和院前急救培训,并借助媒体向群众普及烧伤急救常识。

参考文献

[1] 田纪文. 烧伤患者应用冷疗自救的调查. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(5):305.

[2] 黎鳌. 我国烧伤救治研究的过去、现在和未来. *中华烧伤杂志*, 2001, 17(1):5 - 7.

[3] 蒋章佳,涂红波,沈辉,等. 烧伤患者院前急救与护送经验. *中华全科医师杂志*, 2003, 2(3):152.

(收稿日期:2006-12-11)
(本文编辑:莫愚)

作者单位:629000 四川省遂宁市红十字医院急诊科