

· 烧伤后炎症反应 ·

G 蛋白不同亚型在严重烫伤小鼠补体活化巨噬细胞分泌功能中的作用

胡远兵 彭代智 黄文华 黎鳌 周新

【摘要】 目的 观察严重烫伤后活化的补体对小鼠腹腔巨噬细胞(PM ϕ)分泌一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子(TNF) α 的影响,探讨信号传递途径中不同 G 蛋白亚型的作用。方法 血浆采集分组:补体血浆组,采用小鼠 18% TBSA III 度烫伤模型;去补体血浆组,先在小鼠腹腔注射眼镜蛇毒素因子(CVF)去补体后再按上述标准烫伤。伤后 6 h 分别收集两组小鼠全血制备血浆,用于培养正常小鼠的 PM ϕ 及经抑制型 G 蛋白(Gi)阻断剂百日咳毒素(PT)预处理的 PM ϕ 、经刺激型 G 蛋白(Gs)激活剂霍乱毒素(CT)预处理的 PM ϕ ,观察各组细胞培养上清液中 NO 及 TNF- α 含量的变化。结果 补体血浆组培养上清液中的 NO 和 TNF- α 含量分别为(80 \pm 12) μ mol/L 和(46 \pm 6)%,明显高于去补体血浆组的(34 \pm 5) μ mol/L 和(26 \pm 5)%($P < 0.01$)。PT 预处理后补体血浆组 PM ϕ 产生的 NO 明显下降[(45 \pm 10) μ mol/L, $P < 0.01$],而 TNF- α 活性[(58 \pm 10)%]增加($P < 0.05$),CT 预处理后补体血浆组 PM ϕ 产生的 NO 增加[(105 \pm 18) μ mol/L, $P < 0.05$],TNF- α 的活性[(27 \pm 6)%]降低($P < 0.01$)。结论 严重烫伤后活化补体引起 PM ϕ 分泌 NO 和 TNF- α 增多这一现象,至少部分是通过 G 蛋白途径实现的。其中对 PM ϕ 生成 NO 的调控主要是通过 Gi 蛋白途径发挥作用,对 PM ϕ 分泌 TNF- α 的调控则以 Gs 蛋白信号通路为主。

【关键词】 烧伤; 补体; 巨噬细胞; GTP 结合蛋白质类; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子 α

The role of different subtypes of G protein in the secretory function of macrophages stimulated by activated complement following severe burn injury HU Yuan-bing, PENG Dai-zhi, HUANG Wen-hua, LI Ao, ZHOU Xin. Institute of Burn Research, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
Corresponding author: PENG Dai-zhi, Email: dzpeng@yahoo.com, Tel: 023-68754176

【Abstract】 Objective To investigate the influence of activated complement on the secretory function of peritoneal macrophage (PM ϕ) in the production of nitric oxide(NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), especially in the role of different G-protein subtypes in this process after burns. Methods The mice inflicted by 18% TBSA full-thickness scald was established and employed as the model. And the mice were divided into A (the complements were preserved and activated) and B (with intraperitoneal injection of CVF to deplete complement before scald) groups. The plasma of the mice in the two groups was collected at 6 postburn hour (PBH) and cultured with PM ϕ from normal mice. The PM ϕ were pretreated with pertussis toxin (PT) and with cholera toxin (CT). The NO and TNF- α levels in the supernatant of normal PM ϕ culture with different pretreatment were measured by Greiss assay. Results The NO and TNF- α contents in group A [(80 \pm 12) μ mol/L, (46 \pm 6)%] were obviously higher than those in group B [(34 \pm 5) μ mol/L, (26 \pm 5)%, $P < 0.01$]. The NO content produced by PM ϕ (45 \pm 10 μ mol/L) in A group decreased ($P < 0.01$), while the TNF- α activity (58 \pm 10)% increased by PT pretreatment ($P < 0.05$). On the contrary, the NO content produced by PM ϕ (105 \pm 18 μ mol/L) in group A increased ($P < 0.01$), while the TNF- α activity (27 \pm 6)% decreased by CT pretreatment ($P < 0.01$). Conclusion These results indicates that the secretory function of normal PM ϕ can be enhanced by complement activation after thermal injury, which might partly be due to the effect of activated complement components through complement receptor coupled G-protein. In the secretory function of complement stimulated M ϕ , Gi protein has a major role in the production of NO, Gs protein is mainly involved in the secretion of TNF- α .

【Key words】 Burns; Complement; Macrophages; GTP binding protein; Nitric oxide; Tumor necrosis factor-alpha

基金项目:国家自然科学基金重大资助项目(39290700-01),全军“九五”医学科研规划重点课题资助项目(96L042)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(胡远兵现在武警成都医院内一科,610041)

通信(讯)作者:彭代智,Email:dzpeng@yahoo.com,电话:023-68754176

烧伤后出现的免疫功能紊乱,是并发全身感染、多器官功能衰竭的主要原因之一。其中已经明确的有补体活化加剧,巨噬细胞膜 G 蛋白活化,腹腔巨噬细胞(PM ϕ)分泌更多的一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症介质¹⁻⁴。补体活化巨噬细胞产生 NO 和 TNF- α 的信号传递是否通过 G 蛋白系统,何种 G 蛋白参与了这一过程,目前还不清楚。本实验拟观察不同亚型的 G 蛋白在上述过程中的作用。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂及仪器:抑制型 G 蛋白阻断剂百日咳毒素(pertussis toxin, PT)、刺激型 G 蛋白激活剂霍乱毒素(cholera toxin, CT)和 RPMI 1640 培养基均购自美国 Sigma 公司。450 型酶联免疫检测仪购自美国 Bio-Rad 公司,1815-TC 型二氧化碳孵箱购自美国 Shel-Lab 公司,普通光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

2. 血浆采集:健康昆明小白鼠(第三军医大学实验动物中心),雌雄各半,体重 22 ~ 25 g。(1)补体血浆组(10 只):制备小鼠 18% TBSA III 度烫伤模型,伤后 6 h 补体活化最明显时抽取小鼠腋下血,分离收集血浆^{2]}。(2)去补体血浆组(10 只):在小鼠腹腔注射眼镜蛇毒素因子(cobra venom factor, CVF)10 μ g 去除补体,24 h 后按上述标准烫伤⁴,伤后 6 h 取血制备血浆。两组血浆于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3. PM ϕ 的制备及分组:取 15 只健康昆明小白鼠,雌雄不限。处死后用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗腹腔间隙,收集细胞混合后分为 6 组:补体血浆对照组、去补体血浆对照组、PT 预处理补体血浆组、PT 预处理去补体血浆组、CT 预处理补体血浆组、CT 预处理去补体血浆组(PT 及 CT 的浓度均为 100 μ g/L),每组 10 孔,加入 24 孔培养板,用贴壁法纯化,瑞氏-吉姆萨染色后提示 PM ϕ 比例 > 90%。各组细胞分别加入含体积分数 50% 补体的血浆或去补体血浆的 RPMI 1640 培养液(含体积分数 10% 小牛血清),常规培养 24 h,收集上清液送检^{5]}。

4. 检测指标:(1)用实验室配制的 Greiss 溶液检测细胞培养上清液中 NO 的含量。(2)参照文献[1]用 L929 细胞结晶紫染色法检测上清液的细胞杀伤率(cytocidal ratio, CR),以此反映其 TNF- α 含量。

5. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用华西医科大学医用统计程序包对数据进行单因素 Q 检验(Newman-Keuls 法)及双因素方差分析。

结 果

1. PT 预处理对 PM ϕ 分泌 NO 的影响:NO 检测结果依次为预处理去补体血浆组 < 去补体血浆对照组 < 预处理补体血浆组 < 补体血浆对照组,见表 1。双回归方差分析表明,补体和 PT 因素在影响 NO 产生中的交互作用非常显著(补体 * PT: $P = 0.000$)。

表 1 PT 预处理对 PM ϕ 分泌 NO 的影响 (μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	NO
补体血浆对照组	10	80 \pm 12
去补体血浆对照组	10	34 \pm 5*
预处理补体血浆组	10	45 \pm 10*
预处理去补体血浆组	10	26 \pm 4 $^{\Delta}$

注:与补体血浆对照组比较,* $P < 0.01$;与预处理补体血浆组比较,# $P < 0.01$;与去补体血浆对照组比较, Δ $P < 0.05$

2. PT 预处理对 PM ϕ 分泌 TNF- α 的影响:各组 TNF- α 检测结果依次为去补体血浆对照组 < 预处理去补体血浆组 < 补体血浆对照组 < 预处理补体血浆组,见表 2。双因素方差分析表明,补体和 PT 在影响 TNF- α 产生中的交互作用不明显(补体 * PT: $P = 0.170 > 0.05$)。

表 2 PT 预处理对 PM ϕ 分泌 TNF- α 的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TNF- α
补体血浆对照组	10	46 \pm 6
去补体血浆对照组	10	26 \pm 5 $^{\#}$
预处理补体血浆组	10	58 \pm 10*
预处理去补体血浆组	10	32 \pm 6 $^{\Delta}$ *

注:与补体血浆对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与预处理补体血浆组比较, Δ $P < 0.05$;与去补体血浆对照组比较, \star $P < 0.05$

3. CT 预处理对 PM ϕ 分泌 NO 的影响:NO 检测结果依次为去补体血浆对照组 < 预处理去补体血浆对照组 < 补体血浆对照组 < 预处理补体血浆组,见表 3。双因素方差分析表明,补体和 CT 在影响 NO 产生中的交互作用不明显(补体 * CT: $P = 0.068 > 0.05$)。

表 3 CT 预处理对 PM ϕ 分泌 NO 的影响 (μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	NO
补体血浆对照组	10	80 \pm 12
去补体血浆对照组	10	34 \pm 5 $^{\#}$
预处理补体血浆组	10	105 \pm 18*
预处理去补体血浆组	10	44 \pm 10 $^{\Delta}$ *

注:与补体血浆对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与预处理补体血浆组比较, Δ $P < 0.01$;与去补体血浆对照组比较, \star $P < 0.05$

4. CT 预处理对 PMφ 分泌 TNF-α 的影响:各组 TNF-α 检测结果依次为预处理去补体血浆组 < 去补体血浆对照组 < 预处理补体血浆组 < 补体血浆对照组,见表 4。双因素方差分析表明,补体和 CT 在影响 TNF-α 产生中的交互作用非常显著(补体 * CT; P = 0.001 < 0.05)。

表 4 CT 预处理对 PMφ 分泌 TNF-α 的影响(%, $\bar{x} \pm s$)
Tab 4 Influence of CT pretreatment on TNF-α production by PMφ(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TNF-α
补体血浆对照组	10	46 ± 6
去补体血浆对照组	10	26 ± 56*
预处理补体血浆组	10	27 ± 6*
预处理去补体血浆组	10	21 ± 3# [△]

注:与补体血浆对照组比较, * P < 0.01;与预处理补体血浆组比较,# P < 0.05;与去补体血浆对照组比较,△ P < 0.05

讨 论

严重烧伤后早期,坏死细胞、变性蛋白聚集物、细胞碎片、线粒体膜及肠源性内毒素等均可经过旁路途径激活补体。补体活化片段有 C3a、C4a、C5a 和 C5b-9 膜攻击复合物,其中 C5a 是强有力的趋化因子。活化补体使巨噬细胞分泌大量的炎症介质,降低了细胞的杀菌功能,也导致细胞自身损伤和组织被破坏。去除补体后,巨噬细胞分泌的炎症介质水平显著下降^[1,6]。

烧伤后早期巨噬细胞活化过程表现在跨膜信号的明显异常,其中补体活化巨噬细胞的过程主要通过 G 蛋白参与^[4,7,8]。炎症介质作用于细胞主要是通过细胞膜表面的 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs)发挥作用。在膜水平上,GPCRs 通过与膜内侧的 G 蛋白偶联产生 G 蛋白循环,将信号转导给下游的效应分子系统。补体受体 C5aR 就是属于 GPCRs 大家族的成员,C5a 与 C5aR 结合后,通过 G 蛋白的跨膜信号转导发挥趋化、促代谢、免疫调节作用。而 C5b-9 可以使肾小球系膜细胞产生 NO、TNF-α 增多。但是至今尚未明确其跨膜信号转导途径与 G 蛋白的关系^[9]。

G 蛋白根据其其对腺苷酸环化酶(AC)作用的不同分为两大类:抑制型 G 蛋白(Gi)和激活型 G 蛋白(Gs)。CT 可以催化辅酶 I (Co I)的腺苷二磷酸(ADP)-核糖基转移到 Gs 亚基的精氨酸残基上,使 G 蛋白发生 ADP-核糖化进而被激活。PT 可以催化 Gi 进行核糖基化,中断其信号传递^[10]。有研究表明,严重烧伤后,补体过度活化使 PMφ 分泌 TNF-α 和 NO 增加,并且在此过程中 G 蛋白显著活化^[11,4,8]。

本实验观察到,去补体血浆可明显降低 PMφ 的分泌功能;PT 预处理可以使 PMφ 产生的 NO 含量下降、TNF-α 增加;而 CT 预处理可以使 PMφ 产生的 TNF-α 含量下降、NO 增加。结果提示,严重烫伤后,活化补体刺激 PMφ 产生 NO 的信号传递受到 G 蛋白尤其是 Gi 蛋白的调控,但不能排除其他 G 蛋白的调节作用;活化补体刺激 PMφ 产生 TNF-α 的信号传递受 G 蛋白的调节,其中 Gs 蛋白的作用最为明显,但不能排除其他途径的调节作用。此外,非补体活化因素的其他成分受 Gi 和 Gs 蛋白的调节,也参与了刺激 PMφ 产生 NO 和 TNF-α 的过程。

由于 G 蛋白种类的多样性,各种 G 蛋白之间相互作用、相互制约。Gi 活化后,可以直接抑制 AC 的活性,使其在循环中产生的 β、γ 亚基可以与 Gsα 亚基相结合形成三聚体(基态),使其失去对 AC 的催化作用。Gi 又分为 Gi1、Gi2、Gi3 3 种,不同的 G 蛋白共同处于一个矛盾的平衡中,所以在信号传递时,多种 G 蛋白共同参与、相互调节^[11]。C5a 和 C3a 对中性粒细胞内游离 Ca²⁺ 的刺激均可被 PT 阻断,使其与鸟苷三磷酸(GTP)的亲合力上升 1.5 ~ 3.0 倍,提示 C3a、C5a 活化中性粒细胞的作用是通过受体偶联对 PT 敏感的 Gi 蛋白所介导的^[12,13]。CT 或前列腺素 E₂ (PGE₂) 均可增加细胞内环腺苷一磷酸(cAMP)浓度。内毒素/脂多糖(LPS)可刺激 PMφ 增加 TNF-α 的分泌量,加入 CT 或 PGE₂、cAMP 的类似物可以抑制 LPS 的作用,提示 cAMP 在 PMφ 受 LPS 刺激产生 TNF-α 的信号途径中有不可缺少的抑制作用^[14]。Murthy 等^[15]报道,用垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)刺激 NO 合酶(NOS),其活性可以被 PT 和 Giα1-2 的抗体抑制,提示 Giα1-2 是 NOS 活性接受刺激信号的途径之一。

补体活化片段刺激 PMφ 产生 NO 的信号途径可能是:补体活化片段结合到 Gi 偶联的 PMφ 补体受体上并激活 Giα。活化的 Giα 可以直接激活鸟苷酸环化酶(GC),催化 GTP 水解为环鸟苷一磷酸(cGMP),同时抑制腺苷三磷酸(ATP)水解为 cAMP 并以 cGMP 为第二信使,作用于依赖它的蛋白激酶(G 激酶)使之活化。G 激酶被激活后,引起 NOS 活性增高,增加 NO 的合成。在产生 TNF-α 时,其信号转导途径中 Gs 所起的作用似乎更重要,一方面 cAMP 必不可少,另一方面 cAMP 的大量增加会明显抑制 TNF-α 的产生。目前尚不能排除其他物质的调节作用。

总之,严重烫伤后活化的补体通过复杂的信号

转导途径激活巨噬细胞,其中 G 蛋白途径中的 Gi 和 Gs 很可能都发挥了重要作用。本实验结果表明,补体活化片段通过 Gi 发挥作用,补体活化片段与 Gs 的关系至今鲜见报道。由于信号转导途径和 G 蛋白调节的复杂性,目前要完全弄清楚补体的信号转导途径还有困难,补体活化 PM ϕ 的信号传递亦有待更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 胡远兵,彭代智,黄文华,等.严重烧伤后补体活化的动态变化及对巨噬细胞分泌功能的影响.中华烧伤杂志,2000,16:231-233.
- 2 Luo G, Peng D, Zheng J, et al. The role of NO in macrophage dysfunction at early stage after burn injury. Burns, 2005, 31: 138-144.
- 3 Schwacha MG, Chaudry IH, Alexander M. Regulation of macrophage IL-10 production postinjury via beta2 integrin signaling and the P38 MAP kinase pathway. Shock, 2003, 20:529-535.
- 4 胡远兵,彭代智,黄文华,等.严重烧伤后巨噬细胞膜蛋白 GTP 酶活性变化及补体对其影响.白求恩医学院学报,2003,1:147-149.
- 5 Corcoran ML, Stevenson WGS, Witt DLD, et al. Effect of cholera toxin and pertussis toxin on prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase production by human monocytes. Arch Bio Biophys, 1994, 310: 481-488.
- 6 汪正清,鲜尽红,罗雪,等.重度烧伤小鼠血清及去补体后血清诱导巨噬细胞凋亡作用的体外实验研究.免疫学杂志,2004,20:475-477,482.

- 7 彭代智,黄文华.烧伤后失控性炎症反应的巨噬细胞信号转导机制研究进展.第三军医大学学报,2004,26:2168-2170.
- 8 Peng DZ, McManus AT, Hu Y, et al. Complement activation stimulate GTPase activity and secretory function of macrophages following burns. J Burn Care Rehabil, 2001,22(2Suppl):126.
- 9 王迎伟,徐静华,汤仁仙,等.抗胸腺细胞血清性肾炎模型大鼠肾小球中 C5b-9 的沉积及 NO、TNF- α 含量分析.中国病理生理杂志,2004,20:54-59.
- 10 Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Ann Rev Biochem, 1987, 56: 615-649.
- 11 Linder ME, Gilman AG. Purification of recombinant Gi α and Go α proteins from Escherichia coli. Methods Enzymol, 1991, 195: 202-206.
- 12 Norguer L, Dohos G, Konatzki E, et al. Complement fragment C3a stimulates Ca²⁺ influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G-protein. J Biochem, 1993, 217: 289-294.
- 13 Fazal N, Al-Ghoul WM, Schmidt MJ, et al. Lyn-and EPK-mediated vs. Ca²⁺-mediated neutrophil O₂-responses with thermal injury. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283: 1469-1479.
- 14 Katakami Y, Nkao Y, Koizumi N, et al. Regulation on TNF production by mouse peritoneal macrophages: the role of cellular cyclin AMP. Immunology, 1988, 64: 719-724.
- 15 Murthy KS, Makhlof GM. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide-dependent activation of membrane-bound NO synthase in smooth muscle mediated by pertussis toxin-sensitive Gi1-2. J Biol Chem, 1994, 269: 15977-15980.

(收稿日期:2004-11-12)

(本文编辑:王旭)

· 技术与方法 ·

微粒皮制作实用方法介绍

戴海华 海恒林 华云飞 边琳芬 吴胜刚 李强 张志扬 李克荣

改装刀具:去除多用轧皮机刀具(SZS-79-4C型,上海手术器械厂)的刀间隔层,将刀片并拢间隔缩短为1mm,制成轧制微粒皮的刀具。操作方法如同加工邮票状皮肤,制备的微粒皮规格为1mm×1mm。利用新鲜猪皮制备微粒皮时,注意大张猪皮的厚度应控制在1mm。

移植方法:处理烧伤创面至待植皮状态,充分止血。参照文献[1]轻提绸布,将漂浮在等渗盐水中的微粒皮转移至用以覆盖创面的新鲜猪皮真皮面上,再将带微粒皮的猪皮真皮面贴敷于创面。间断缝合固定,用厚层无菌敷料适当加压包扎,避免过早拆开敷料错动尚未黏附牢固的猪皮。通常术后5d首次检视创面,若无明显的局部或全身感染,亦可延至7d后。猪皮下如有积血积液,可作局部切开引流并继续包扎。术后10d左右,微粒皮已开始扩展为可辨认的皮片,其上覆盖的猪皮表现为局部干结。术后3周,微粒皮继续扩展、增厚并融合成片,覆盖自体皮的猪皮逐渐脱落,其下仅为创面的猪皮可持续成活4~6周。

临床应用及结果:笔者对38例大面积深度烧伤患者的

创面按照上述方法进行微粒皮移植手术,供、植皮面积比平均为1.0:(9.0±2.7),微粒皮移植术区占患者总体表面积的(45±18)%,占烧伤总面积的74%。微粒皮成活面积占总植皮面积的(90±5)%,约95%创面封闭时的平均手术次数为6.5次[伤后(42±5)d]。脓毒症和内脏并发症发生率为28.5%,患者生存率为94.7%。

讨论 将原有轧皮机刀具简单改装后制备微粒皮,可明显降低劳动强度、提高工作效率,微粒皮均匀、漂浮同向性好,方便按植皮面积调整供皮量。

以新鲜猪皮作微粒皮的覆盖物,具有取材方便、费用低、制作容易、随时可用等优点^[2]。但应注意新鲜猪皮必须先消毒后加工,以增强与自体微粒皮和创面之间的黏附效果。

参 考 文 献

- 1 张明良,曹大鑫,常致德,等.微粒体皮肤移植在大面积烧伤病人中应用.中华整形烧伤外科杂志,1987,3:100-102.
- 2 李克荣,郑冠吾,戴海华.新鲜猪皮覆盖自体微粒皮修复大面积Ⅲ度烧伤.中华整形烧伤外科杂志,1995,11:170.

(收稿日期:2005-04-11)

(本文编辑:王旭)

作者单位:313000 湖州,解放军第九十八医院烧伤整形科