

# 烫伤合并金葡菌感染大鼠组织 CD14 mRNA 的改变

李红云 姚咏明 施志国 于燕 董宁 盛志勇

**【摘要】 目的** 探讨细菌脂多糖受体 CD14 在烫伤合并金黄色葡萄球菌(金葡菌)感染中的变化规律及其意义。**方法** 采用大鼠 20% 总体表面积Ⅲ度烫伤合并金葡菌攻击造成脓毒症模型,动态检测心、肝、肺、肾等重要器官中 CD14 mRNA 表达的改变,同时观察内毒素在动物循环及主要脏器内的分布特点。**结果** 烫伤合并金葡菌脓毒症早期,各脏器内毒素含量即明显高于正常对照组,并于 2~6 h 达峰值,其中以肝、肺组织内毒素水平升高幅度最为显著( $P < 0.05$ )。而血浆内毒素水平亦于伤后 2 h 显著高于正常对照组(分别为 0.305 6 EU/ml 和 0.125 0 EU/ml,  $P < 0.05$ )。与此同时,小肠组织中二胺氧化酶的活性明显降低( $P < 0.05$ )。烫伤合并金葡菌感染后,各组织 CD14 mRNA 的表达亦呈不同程度升高( $P < 0.05$ ),其中肺脏改变尤为显著,伤后 6、24 h 肺脏 CD14 mRNA 表达分别为正常对照组的 1.80 和 1.81 倍。**结论** 烫伤合并金葡菌攻击可导致内毒素移位和组织 CD14 mRNA 表达不同程度升高,CD14 基因表达的上调可能与移位内毒素的刺激作用有关。

**【关键词】** 烧伤; 金黄色葡萄球菌; 脂多糖受体,CD14; 内毒素; 感染; 脓毒症

The change in CD14 mRNA expression in rats with scald injury and *Staphylococcus aureus* challenge LI Hongyun, YAO Yongming, SHI Zhiguo, YU Yan, DONG Ning, SHENG Zhiyong. Burn Institute, The 304th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100037, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To investigate the potential role and changes in CD14 in postburn *Staphylococcus aureus* sepsis. **Methods** Wistar rats were subjected to a 20% total body surface area (TBSA) full-thickness thermal injury and followed by *Staphylococcus aureus* challenge. Plasma and tissue samples from liver, kidneys, lungs and heart were collected to determine endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) levels and CD14 mRNA expression. **Results** It was found that after thermal injury combined with *Staphylococcus aureus* sepsis, LPS levels in various tissues were markedly increased, peaking at 2~6 h ( $P < 0.05$ ), then returned to baseline at 24h. Plasma LPS level was also increased significantly at 2hrs after *Staphylococcus aureus* challenge compared with that in normal control animals(0.3056 EU/ml vs. 0.1250EU/ml,  $P < 0.05$ ). In addition, the intestinal diamine oxidase (DAO) activity decreased( $P < 0.05$ ). This indicated that the integrity of intestinal mucosa was damaged. Meanwhile, tissue CD14 mRNA expressions were up-regulated in all tissues( $P < 0.05$ ), especially in lungs. **Conclusion** These data suggested that gut-originated LPS translocation and CD14 mRNA expression could be induced by thermal injury with *Staphylococcus aureus* sepsis. The up-regulation of CD14 gene expression might be associated with the local endotoxin activation secondary to postburn sepsis.

**【Key words】** Burns; *Staphylococcus aureus*; CD14; Endotoxin; Sepsis

研究表明,CD14 作为革兰阴性菌( $G^-$ 菌)脂多糖的重要受体,与脂多糖结合蛋白(LBP)共同构成内毒素增敏系统,可显著提高多种细胞对内毒素的敏感性,其在  $G^-$ 菌脓毒性休克中的重要地位日益受到关注<sup>[1]</sup>。近年来,随着对革兰阳性菌( $G^+$ 菌)研究的不断深入,人们发现 CD14 也可作为  $G^+$ 菌细胞壁成份(如肽聚糖和脂磷壁酸)的功能受体,在介

导  $G^+$ 菌所致的单核/巨噬细胞活化和细胞因子的产生中亦具有一定作用<sup>[2,3]</sup>。但迄今为止,关于 CD14 与  $G^+$ 菌关系的研究仅限于体外观察,对于  $G^+$ 菌脓毒症时 CD14 在体内的变化规律及其意义目前尚缺乏了解。本研究采用大鼠烫伤合并金葡菌感染模型,动态观察体内内毒素和 CD14 mRNA 表达的变化规律,并对两者之间的关系进行了初步探讨。

## 材 料 与 方 法

### 一、实验动物与模型制备

雄性 Wistar 大鼠,体重 220~300 g,购来后饲养 1 周以上,实验前禁食过夜,但自由饮水。以质量浓

基金项目:国家重点基础发展规划项目(G1999054203)、国家杰出青年科学基金(3D125020)和军队杰出中青年人才专项基金(98J013)军队医学科研“十五”计划资助项目(01MA207)

作者单位:100037 北京,解放军第三〇四医院烧伤研究所基础部

**表 1** 血浆及组织中内毒素含量的动态变化 ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )  
**Tab 1** Changes in endotoxin levels in plasma and tissues ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

组织	鼠数	NC	TC	伤后时间 (h)				
				0.5	2	6	12	24
肝 (EU/g)	10	1.126 0 ±0.203 0	1.615 0 ±0.230 7	2.201 3* ±0.339 6	2.359 9 ±0.611 3	2.177 3 ±0.461 2	2.010 0* ±0.158 8	1.259 4 ±0.427 5
肺 (EU/g)	10	0.714 0 ±0.095 0	0.960 5 ±0.107 3	1.329 0* ±0.287 0	0.521 3 ±0.091 4	1.411 0* ±0.343 0	1.369 9* ±0.179 5	0.662 6 ±0.072 2
肾 (EU/g)	10	1.095 0 ±0.257 0	0.856 7 ±0.164 3	1.984 1 ±0.568 3	2.309 1*## ±0.368 0	0.963 4 ±0.296 7	1.186 4 ±0.209 0	0.980 7 ±0.188 3
心 (EU/g)	10	1.632 0 ±0.334 0	1.240 2 ±0.300 0	2.046 6 ±0.681 0	2.119 6 ±0.542 5	2.591 5 ±0.888 8	0.829 8 ±0.133 8	1.268 1 ±0.265 3
血浆 (EU/ml)	10	0.125 0 ±0.025 0	0.101 9 ±0.021 6	0.226 3 ±0.098 4	0.305 6*## ±0.043 1	0.153 4 ±0.053 9	0.108 2 ±0.018 5	0.189 0* ±0.02 45

注:与正常对照组 (NC) 相比, \*  $P < 0.05$ ; 与烫伤对照组 (TC) 相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**表 2** 小肠组织 DAO 活性的改变 (U/mg 蛋白,  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )  
**Tab 2** Changes in DAO activity in intestinal tissues ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

检测指标	鼠数	NC	TC	伤后时间 (h)				
				0.5	2	6	12	24
DAO	10	0.240 ± 0.025	0.250 ± 0.026	0.219 ± 0.076	0.157*## ± 0.021	0.182* ± 0.011	0.167* ± 0.065	0.179 ± 0.019

注:与正常对照组 (NC) 相比, \*  $P < 0.05$ ; 与烫伤对照组 (TC) 相比, #  $P < 0.05$

度 2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 质量浓度 20% 硫化钠脱毛, 温水洗净, 纱布擦干。将其背部浸于沸水中 12 s 造成 20% 体表总面积 (TBSA) III 度烫伤, 伤后立即腹腔注射乳酸林格液 (40 ml/kg) 抗休克, 创面涂以碘酊抗感染。动物单笼饲养, 常规饮食, 足量饮水。烫伤后 24 h, 给大鼠腹腔注射对数生长期的产 B 型肠毒素金黄色葡萄球菌 (古典 S6 菌株) 菌液 1 ml (浓度为  $8 \times 10^9$  CFU/ml) 造成脓毒性休克。该模型 24 h 动物死亡率约为 80%。

二、动物分组

70 只大鼠随机分为 3 组: 正常对照组 (NC), 于麻醉后活杀; 烫伤对照组 (TC), 于烫伤后 24 h 活杀; 烫伤合并金黄色葡萄球菌感染组, 分别于 0.5、2、6、12、24 h 活杀, 各时相点动物数均为 10 只。

三、检测指标及方法

1. 血浆及组织内毒素含量检测: 严格无菌取大鼠心、肝、肺、肾组织于 3 倍体积无热原等渗盐水中匀浆, 采用改良过氯酸法预处理组织匀浆液及血浆, 以鲎试验基质显色法 (LAL) 定量测定。

2. 小肠组织二胺氧化酶 (DAO) 活性的测定: 采用改良分光光度法测定<sup>[4]</sup>。

3. 组织 CD14 mRNA 表达: 采用半定量逆转录 PCR 方法检测。CD14 引物参照文献合成<sup>[5]</sup>。同时以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参对照, CD14 与内参对照的比值作为基因表达相对含量。

四、统计学处理

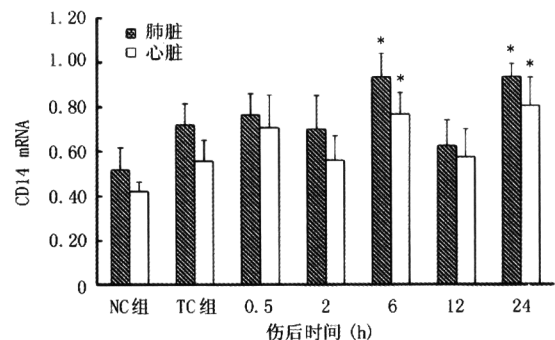
数据以  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  表示。应用 SAS 统计软件数据包

(6.12 版) 进行  $t$  检验、方差分析和相关分析等。

结 果

1. 内毒素水平的动态变化: 如表 1 所示, 单纯烫伤 24 h 后, 血浆和各主要脏器中内毒素含量无明显改变。但烫伤合并金黄色葡萄球菌攻击后 0.5 h, 各脏器及血浆中内毒素含量即明显高于正常对照组, 其中以肝、肺组织内毒素水平改变最为显著 ( $P < 0.05$ ), 并于 2~6 h 达峰值, 24 h 则显著降低, 基本降至正常范围 ( $P > 0.05$ )。

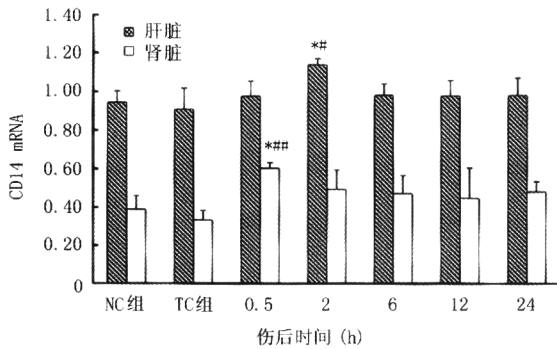
2. 小肠组织 DAO 活性的变化: 正常情况下和单纯烫伤后 24 h, 大鼠小肠组织 DAO 活性无明显差异。但烫伤合并金黄色葡萄球菌攻击后小肠组织 DAO 活性明显降低, 伤后 2~12 h 均显著低于对照组水平 ( $P < 0.05$ , 表 2), 提示小肠粘膜完整性遭到严重破坏, 粘膜屏障功能可能受损。



注:与正常组 (NC) 相比, \*  $P < 0.05$

图 1 大鼠肺、心组织中 CD14 mRNA 表达的改变

Fig 1 Changes in CD14 mRNA expression in lungs and heart



注:与正常对照(NC)组相比,\* $P < 0.05$ ;与烫伤对照(TC)组相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

图2 大鼠肝、肾组织中CD14 mRNA表达的改变

Fig 2 Changes in CD14 mRNA expression in liver and kidneys

3. 组织CD14 mRNA的表达:如图1、2所示,正常大鼠心、肺、肝、肾等组织中均有少量CD14 mRNA表达,烫伤后24 h各组织CD14 mRNA表达有所波动但在统计学意义上差异无显著性意义。而烫伤合并金葡菌攻击后各组织CD14 mRNA表达均有不同程度升高( $P < 0.05$ ),其中肺脏改变尤为显著。伤后6 h,肺组织CD14 mRNA表达已达伤前的1.8倍,且24 h仍处于较高水平。

## 讨 论

CD14是一种主要位于单核/巨噬细胞和中性粒细胞表面的糖蛋白,作为内毒素的敏感受体其表达可受内毒素直接调控或经内毒素诱导的多种介质间接调节。近年体外研究显示,金葡菌的肽聚糖和脂磷壁酸也可与CD14结合促进单核/巨噬细胞活化和炎症介质的产生,且抗CD14抗体可有效抑制肽聚糖诱导巨噬细胞内核转录因子NF- $\kappa$ B的活化,提示CD14依赖的信号转导途径也参与了 $G^+$ 菌诱发的某些反应<sup>[6]</sup>。因此,了解烧伤后 $G^+$ 菌脓毒症中CD14的变化规律及其调控机制将有助于揭示失控炎症反应的本质,并为其早期干预探索新途径。

本组资料中,单纯烫伤打击后24 h,动物血浆和肝、肺、心、肾等主要脏器内毒素水平均无明显改变。烫伤合并金葡菌攻击后,肝、肺、肾等组织内毒素水平明显高于正常对照组,而心脏内毒素仅呈升高趋势,提示烫伤合并金葡菌脓毒症后体内内毒素主要分布在肝、肺、肾等组织中。与其它组织相比,肝、肺组织中内毒素水平的改变更为显著且持续时间更长,而血浆内毒素水平仅为为一过性升高,表明肝、肺可能是烫伤合并金葡菌脓毒症后内毒素的主要蓄积场所。这可能是由于肝脏系胃肠道血液进入人体循环的首要门户,由肠道移位的内毒素首先经门静脉入肝并在肝内灭活、清除。而肺、肾内毒素水平

的升高可能由于伤后肝脏库普弗细胞吞噬能力受损及对内毒素的廓清能力下降,移位的内毒素“溢出”至体循环中并经血液途径播散至肺、肾等组织<sup>[7]</sup>。此外,肺、肾还分别经呼吸道和泌尿道与外界直接相通因而易于并发感染,可能也会导致局部组织内毒素水平升高。上述结果表明,烫伤合并金葡菌脓毒症可导致动物局部组织内毒素水平明显升高。

以往研究表明,急性创伤、休克打击后肠源性内毒素移位并蓄积于局部组织可明显上调机体主要脏器CD14 mRNA的广泛表达,进而在调节机体失控炎症反应和多器官损害中具有重要作用<sup>[8]</sup>。本实验中,正常大鼠心、肝、肺、肾等组织均有少量CD14 mRNA表达,而烫伤对照组CD14 mRNA表达未见明显改变。烫伤合并金葡菌感染后心、肝、肺、肾等重要脏器中CD14 mRNA表达则进一步增加,表明严重损伤打击后金葡菌脓毒症亦可诱导机体局部组织CD14 mRNA表达上调。与其它组织相比,肺脏CD14 mRNA表达升高最为显著,这可能与肺组织对细菌攻击易感性高、局部大量炎性细胞聚集有关。关于金葡菌脓毒症中CD14基因表达上调的确切机制目前尚未完全阐明。本实验结果显示,烫伤合并金葡菌攻击后肺脏CD14 mRNA表达的上调与肺内毒素的改变具有相似的变化趋势,提示内毒素可能也参与了 $G^+$ 菌脓毒症中CD14 mRNA表达的调控。值得注意的是,伤后24 h动物肺、心内毒素水平已降至伤前值,但其CD14基因表达仍表现为升高趋势,提示在金葡菌脓毒症中内毒素可能并非上调CD14基因表达的惟一因素。Landmann等<sup>[9]</sup>在体外观察中亦证实,除内毒素外, $G^+$ 菌的脂磷壁酸和金葡菌的细胞壁成份提取物也可刺激单核细胞表面膜CD14表达上调。由于缺乏金葡菌肽聚糖和脂磷壁酸的特异性抗体,本实验尚未对此进行进一步证实。关于CD14在 $G^+$ 菌脓毒症病理生理过程中的意义及其确切调控机理仍有待进一步探讨。

## 参 考 文 献

- 1 方文慧,姚咏明,施志国. 细胞膜脂多糖受体CD14研究进展. 国外医学. 免疫学分册, 1998, 21:246-249.
- 2 Timmerman CP, Mattsson E, Martinez L, et al. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. Infect Immun, 1993, 61:4167-4172.
- 3 Hattori Y, Kasai K, Akimoto K, et al. Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from staphylococcus aureus in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 233:375-379.
- 4 黎君友,于燕,郝军,等. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. 氨基酸和生物资源, 1996, 18:28-30.

- 5 Galea E, Reis DJ, Fox ES, et al. CD14 mediates endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells. *J Neuroimmun*, 1996, 64: 19 - 28.
- 6 Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, et al. CD14 is a cell - activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem*, 1996, 271: 23310 - 23316.
- 7 Freudenberg MA, Freudenberg N, Galanos C. Time course of cellulose distribution of endotoxin in liver, lung and kidneys of rats. *Br J Exp Pathol*, 1982, 63: 56 - 65.
- 8 姚咏明, 于燕, 方文慧. 创伤后内毒素增敏效应在多器官损害中的作用. *中国危重病急救医学*, 1998, 12: 712 - 718.
- 9 Landmann R, Knopf HP, Link S, et al. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1996, 64: 1762 - 1769.

(收稿日期: 2000 - 09 - 04)

(本文编辑: 赵云)

### · 经验交流 ·

## 大剂量补钙及早期手术治疗氢氟酸深度烧伤 11 例

陈炯 韩春茂 王帆

氢氟酸对人体皮肤、软组织和骨骼具有高度腐蚀性,高浓度或较大面积氢氟酸烧伤后,还可因氟离子的迅速吸收导致严重低钙血症而危及生命。我科采用大量补钙及早期切痂手术治疗氢氟酸烧伤 11 例,取得较好疗效,现介绍如下。

患者男, 25 岁, 头面部氢氟酸烧伤, 清水冲洗 15 min 后于伤后半小时入院。查体: 意识清楚, 体温 37℃, 脉搏 86 次/min, 呼吸 20 次/min, 血压 128/75 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。头面部肿胀, 表皮大部分脱落。实验室检查: 血清离子钙为 0.702 mmol/L (正常值为 1.12 ~ 1.23 mmol/L)。心电图检查未发现异常。诊断: 4.1% 头面部氢氟酸深度烧伤。入院后即用 50% 硫酸镁溶液湿敷创面, 10% 葡萄糖酸钙 20 ml 静脉滴注, 并给予止痛、抗感染等治疗。2 h 后患者出现四肢抽搐, 遂继续补钙, 至伤后 18 h 共静脉滴注 10% 葡萄糖酸钙 120 ml, 复查血清离子钙为 1.197 mmol/L。伤后 4 h 在全麻下行头面部切痂、辐照猪皮覆盖术。术中见前额发际处有一深达颅骨的焦痂 (10 cm × 10 cm)。术中共输入 10% 葡萄糖酸钙 30 ml。术后血清离子钙降至 0.635 mmol/L, 静脉滴注 10% 葡萄糖酸钙 20 ml 后升至 1.216 mmol/L。术后 3 d 共补入 10% 葡萄糖酸钙 110 ml, 血清离子钙水平维持在 1.197 mmol/L 左右。切痂术后 4 d 行自体皮分区取植术 (眼周取腹股沟部全厚皮, 额面部取双大腿中厚皮)。术后每天静脉滴注 10% 葡萄糖酸钙 20 ml, 维持血清离子钙水平在 1.077 mmol/L 左右, 连用 5 d。术后 2 周, 分别以头皮旋转皮瓣和自体皮肤修复额部颅骨皮质暴露区及部分颜面残余创面, 术后 4 周创面愈合出院。

**讨论** (1) 氢氟酸烧伤后严密监测血钙及大剂量补钙是早期治疗的关键。氢氟酸一旦接触人体皮肤、粘膜后, 因氟

离子可迅速穿透组织引起细胞膜液化、细胞坏死、骨质脱钙<sup>[1]</sup>和深部组织迟发性剧痛, 并与体内离子钙结合成不溶性氟化钙, 从而导致电解质紊乱, 包括低血钙、低血镁和高血钾<sup>[2]</sup>。Upfal 等<sup>[2]</sup>提出下列情况可能出现严重低钙血症: ①氢氟酸浓度 > 50%, 烧伤面积 > 1%; ②任何浓度的氢氟酸, 烧伤面积 > 5%; ③吸入氢氟酸浓度 > 60% 的烟雾。浓氢氟酸所致烧伤面积 2.5% 的烧伤患者在伤 2 ~ 3 h 内可发生低钙血症。Tepperman<sup>[3]</sup>报道 1 例氢氟酸 III 度烧伤死亡病例, 其烧伤面积仅为 2.5%。(2) 早期切痂有利于纠正低血钙。氢氟酸烧伤创面的深度决定氢氟酸浓度、接触时间和局部处理情况。有文献报道氢氟酸浓度 > 20% 常导致深度烧伤<sup>[2]</sup>。对深度氢氟酸烧伤, 应在患者病情平稳后及早施行切(削)痂术, 防止氢氟酸的继续吸收。(3) 延期区域性植皮能更安全地使创面得到良好修复。由于患者伤后早期病情不稳定, 加上切痂手术出血量较多, 危险性大, 患者难以承受较长时间的手术, 且精细的植皮也难以保证手术一次性成功。因此, 我们采用在早期切痂后先用生物敷料覆盖, 4 d 后待创面血运良好时再行自体皮移植的方法, 这样既能保证患者生命安全, 又使创面得到及时的修复。

### 参 考 文 献

- 1 许伟石, 主编. 现代烧伤治疗. 北京: 北京科学技术出版社, 1995. 139 - 141.
- 2 Upfal M, Upfal M, Doylec. Medical management of hydrofluoric acid exposure. *J Occup Med*, 1990, 32: 726 - 731.
- 3 Tepperman PB. Fatality due to acute systemic fluoride poisoning following a hydrofluoric acid skin burn. *J Occup Med*, 1980, 22: 691 - 692.

(收稿日期: 2001 - 04 - 16)

(本文编辑: 张宁)

作者单位: 325200 瑞安市人民医院烧伤科(陈炯); 浙江大学医学院附属二院烧伤科(韩春茂、王帆)