

休克期切痂对大鼠肺组织 ICAM-1、TNF- α mRNA 表达的影响

贺立新 郭振荣 吕艺 郝岱峰 柴家科 盛志勇

【摘要】 目的 研究烧伤后肺组织细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达和肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性变化的规律,探讨实施休克期切痂对上述指标变化的影响。方法 Wistar 大鼠 176 只,30%体表面积Ⅲ度烫伤,采用逆转录 PCR 方法分别观察伤后不同时相点及不同时机切痂后肺组织 ICAM-1、TNF- α mRNA 的表达及肺脏 MPO 活性变化。结果 烫伤后肺组织 ICAM-1 及 TNF- α 的 mRNA 表达在伤后 4 h 即已升高,分别在伤后 12 h 和 24 h 达到高峰,伤后 8 h 和 24 h 切痂组动物切痂后再次出现一峰值,但低于第一个峰值,伤后 96 h 恢复正常。未切痂组和 96 h 切痂组在伤后 7 d 仍未恢复正常;休克期切痂动物的肺组织 MPO 活性伤后 96 h 恢复正常,而非休克期切痂组动物一直维持较高水平。结论 尽早切痂去除坏死组织可阻断炎症介质及细菌毒素的释放,避免了内皮细胞大量合成 ICAM-1 等粘附分子,减轻由粘附分子介导的中性粒细胞对内皮细胞的进一步损害。

【关键词】 烧伤/外科学;切痂;粘附分子;肿瘤坏死因子;逆转录聚合酶链反应

The effect of escharectomy during burn shock stage on the expression of ICAM-1 and TNF- α mRNA of rat pulmonary tissue HE Lixin, GUO Zhenrong, LU Yi, et al. Burns Research Institute, 304th Hospital of PLA, Beijing 100037

【Abstract】 Objectives To study the rules of postburn expression of ICAM-1 and TNF- α and the rule of the change in the MPO activity in pulmonary tissue; to explore the influence of escharectomy on the changes in the above indices and to clarify the importance of escharectomy during shock stage. **Methods** One hundred and seventy six Wistar rats with 30 % TBSA III degree back scald were used. RT-PCR was used in the examination of the expression of pulmonary tissue ICAM-1 and TNF- α mRNA and of the change in pulmonary MPO activity after escharectomy. **Results** The expressions of pulmonary ICAM-1 and TNF- α mRNA began to increase at 4 hour postburn and reached peak level at 12 and 24 hours postburn, respectively. Their expressions returned to near control level 96 hours postburn in rats undergone escharectomy during shock stage. On the contrary, they remained at a relative high level even on 7th postburn day in both non-operated rats and the rats receiving escharectomy 96 hours postburn. In addition, pulmonary tissue MPO activity fell to near control level in rats undergone escharectomy during shock stage, but it maintained a high level in rats in which escharectomy was not done during shock stage. **Conclusion** These findings suggest that eschar could induce the production of endothelial adhesion molecules. Therefore escharectomy as early as possible is very important to prevent the expression and release of adhesion molecules and the development of SIRS.

【Key words】 Burns/SU; Escharectomy; adhesion molecule; TNF; RT-PCR

严重烧伤、创伤、休克、感染及炎症刺激等因素可导致内皮细胞损伤,微血管基底膜完整性受损,血浆外渗,使肺脏水肿形成,严重者可导致 ARDS 和肺功能衰竭,影响气体交换。近年来的研究发现,内皮细胞的损伤与内皮细胞受毒素及炎症刺激后粘附分子表达增加,介导粒细胞大量粘附脱颗粒直接损伤内皮细胞有

关。我们重点观察了烧伤后肺内皮细胞 ICAM-1、TNF- α mRNA 及肺组织 MPO 活性的变化特点及不同时机切痂对其影响,论证了实施休克期切痂的必要性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 176 只,体重 180 ~ 220 g,100℃ 12 s 造成背部 30%体表面积Ⅲ度烫伤,伤后腹腔注射

等渗盐水(50 ml/kg)抗休克。随机分为 4 组:A 组为单纯烫伤对照组,包括烫伤前,烫伤后 4, 8, 12, 24, 48, 96, 120, 168 h 9 个时相点;B 组为伤后 8 h 切痂组,包括伤后 12, 24, 48, 96, 120, 168 h 7 个时相点;C 组伤后 24 h 切痂,包括伤后 24, 48, 96, 120, 168h 5 个时相点;D 组伤后 96 h 切痂,包括伤后 120, 168 h 两个时相点。各切痂组于不同时相点一次切痂拉拢缝合。每个时相点 8 只动物。上述动物于各时相点活杀,取肺组织置液氮内保存。

1.2 肺组织 RNA 提取

取液氮保存的肺组织 50 ~ 70 mg,放入预冷的匀浆器中,加变性液 0.6 ml,剪碎,冰浴匀浆。将匀浆液移至 1.5 ml 离心管中,加 60 μl 2 mol/L NaAc,颠倒混匀后加入 0.6 ml 酚:氯仿:异丙醇,强力振荡 10 s,冰浴 10 min, 12 000 r/min 4℃,离心 20 min,取上清置入另一离心管中,加等量异丙醇, - 20℃ 放置 30 min。然后同上述条件离心,弃上清加预冷的 75% 酒精,溶解后离心,弃酒精干燥,加适量一焦磷酸二乙酸(DEPC)处理水稀释 50 倍。在紫外分光光度计上测定 RNA 的纯度和浓度。

1.3 模板 cDNA 合成

用逆转录的方法,按 Promega 公司逆转录试剂盒说明书操作,向冰浴中的 0.5 ml 离心管中加入逆转录体系及模板 RNA 2.0 μg,加无 RNA 酶水至 20 μl,混匀离心,42℃ 逆转录 60 min, 95℃ 变性 5 min,取出后立即冰浴、离心, - 20℃ 保存。

1.4 目的基因的扩增(PCR)

ICAM-1、TNF-α 引物由北京中科院微生物研究所合成,根据不同的目的基因,向 0.5 ml 离心管中加入: 10× Buffer 2.5 μl, dNTPs 1.0 μl,引物 1.0 μl,逆转录产物 0.5 ~ 3.0 μl。加无菌去离子水补充总体积至 25 μl,加液体石蜡覆盖,在 PCR 仪中变性 5 min, 85℃ 条件下加 Tag 酶(1 U/管)。两种目的基因的扩增条件,见表 1。

表 1 两种目的基因扩增的条件

Tab 1 PCR condition of two mRNA

检测指标	变性	退火	循环数
ICAM-1	95℃, 20 s	55℃, 30 s	30
TNF-α	94℃, 30 s	70℃, 1 min	36

1.5 PCR 产物的检测

用 0.5×TEB 制备 1.8% 琼脂糖凝胶,微波炉加热溶解后冷却至 60℃,加入溴化乙锭(质量浓度为 0.5 μg/ml),灌胶于电泳槽内,冷却后加样,恒压电泳,完毕后在紫外微机图像分析系统上进行数据分析,结果以目的 mRNA 的 OD 值计算 mRNA 的量。

1.6 肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性测定

取肺组织 100 mg,加入匀浆缓冲液 1 ml,冰浴中匀浆, 3 500 r/min 4℃,离心 30 min,弃上清,加 HTAB 1 ml 悬浮, - 70℃ 保存。测定时先将冰冻的标本室温溶解,超声处理 2 min, 60℃ 水浴 60 min, 12 000 r/min 4℃,离心 30 min,取上清 1 ml 加反应液 2.9 ml(每升含邻联茴香胺 167 mg, H₂O₂ 5 mg 及 0.5 mol/L PBS 100 ml),室温下立即在 460 nm 波长扫描 90 s,测 ΔA₄₆₀(90 ~ 30 s),以 1 min 内 ΔA₄₆₀ 计算酶活力。一个 MPO 酶活力定义为 25℃ 时每分钟分解 1 μmol H₂O₂。组织 MPO 活性以 U/mg 表示。

1.7 所得数据在 SAS 软件包上统计分析,以 $\bar{x} \pm s_x$ 计,组间统计学处理采用 t 检验。

2 结果

2.1 肺组织 ICAM-1 mRNA 变化

单纯烫伤组伤后 4 h mRNA 表达量即已开始升高,伤后 12 h 达到高峰,48 h 后略有下降,但伤后 96 h 再度升高,伤后 7 d 尚未恢复正常。8 h 切痂组在伤后 12 h ICAM-1 mRNA 表达量高于单纯烫伤组,48 h 后逐渐下降,至伤后 96 h 恢复伤前值。24 h 切痂组伤后 48 h 高于单纯烫伤组,伤后 96 h 开始下降,伤后 120 h 恢复正常。96 h 切痂组在观察期内未恢复正常,但略低于单纯烫伤组,见表 2。

表 2 各组 ICAM-1 mRNA 表达量(OD 值, $\bar{x} \pm s_x$)

Tab 2 Expression volume of ICAM-1 mRNA in each groups (OD value, $\bar{x} \pm s_x$)

组别	伤前	伤后时间(h)							
		4	8	12	24	48	96	120	168
A 组	1.12 ± 0.17	2.23 ± 0.45	3.03 ± 1.05	3.62 ± 0.32	2.63 ± 0.18	3.21 ± 0.56	3.45 ± 1.98	3.95 ± 1.99	4.12 ± 1.64
B 组	1.12 ± 0.17	2.23 ± 0.45	3.03 ± 1.05	3.85 ± 0.29	2.14 ± 0.22	1.94 ± 0.29	1.24 ± 0.36**	1.05 ± 1.24**	1.16 ± 0.64**
C 组	1.12 ± 0.17	2.23 ± 0.45	3.03 ± 1.05	3.62 ± 0.32	2.63 ± 0.18	3.58 ± 1.54	2.58 ± 0.17*	1.54 ± 0.27**	1.17 ± 0.16**
D 组	1.12 ± 0.17	2.23 ± 0.45	3.03 ± 1.05	3.62 ± 0.32	2.63 ± 0.18	3.21 ± 0.56	3.45 ± 1.98	3.85 ± 1.28	3.48 ± 0.87

与 A 组比较, * : P < 0.05, ** : P < 0.01

表 3 各组肺组织 TNF- α mRNA 表达量(OD 值, $\bar{x} \pm s_x$)Tab 3 Expression volume of TNF- α mRNA in each groups (OD value, $\bar{x} \pm s_x$)

组别	伤前	伤后时间(h)							
		4	8	12	24	48	96	120	168
A 组	1.60 \pm 0.32	1.64 \pm 0.34	2.36 \pm 0.61	3.92 \pm 0.79	4.27 \pm 0.68	2.71 \pm 0.29	3.85 \pm 1.13	3.97 \pm 0.94	4.33 \pm 0.88
B 组	1.60 \pm 0.32	1.64 \pm 0.34	2.36 \pm 0.61	3.99 \pm 0.74	4.39 \pm 1.05	2.18 \pm 0.58	1.81 \pm 0.49**	1.66 \pm 0.85**	1.60 \pm 0.71**
C 组	1.60 \pm 0.32	1.64 \pm 0.34	2.36 \pm 0.61	3.92 \pm 0.79	4.27 \pm 0.68	4.14 \pm 1.08	2.71 \pm 0.79*	1.74 \pm 0.99**	1.69 \pm 0.76**
D 组	1.60 \pm 0.32	1.64 \pm 0.34	2.36 \pm 0.61	3.92 \pm 0.79	4.27 \pm 0.68	2.71 \pm 0.29	3.85 \pm 1.13	3.93 \pm 0.56	2.48 \pm 0.72**

与 A 组比较: * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 表 4 肺组织 MPO 活性变化(U/g, $\bar{x} \pm s_x$)Tab 4 Changes of MPO in each groups (U/g, $\bar{x} \pm s_x$)

组别	伤前	伤后时间(h)							
		4	8	12	24	48	96	120	168
A 组	3.24 \pm 1.30	6.87 \pm 2.03	9.36 \pm 3.02	10.89 \pm 4.20	9.62 \pm 3.17	9.61 \pm 3.29	11.91 \pm 3.23	12.97 \pm 3.64	12.18 \pm 3.19
B 组	3.24 \pm 1.30	6.87 \pm 2.03	9.36 \pm 3.02	11.96 \pm 4.23	9.42 \pm 3.27	7.40 \pm 2.06*	4.35 \pm 1.21**	3.36 \pm 1.12**	3.33 \pm 1.07**
C 组	3.24 \pm 1.30	6.87 \pm 2.03	9.36 \pm 3.02	10.89 \pm 4.20	9.62 \pm 3.17	9.79 \pm 3.02	6.42 \pm 1.31	5.39 \pm 1.02**	3.39 \pm 1.14**
D 组	3.24 \pm 1.30	6.87 \pm 2.03	9.36 \pm 3.02	10.89 \pm 4.20	9.62 \pm 3.17	9.61 \pm 3.29	11.91 \pm 3.23	7.67 \pm 3.01	5.26 \pm 1.35**

与 A 组比较, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

2.2 肺组织 TNF- α mRNA 变化

单纯烫伤组伤后 4 h TNF- α mRNA 表达量即已开始升高,伤后 24 h 达到高峰,48 h 后略有下降,但伤后 96 h 再度升高,伤后 7 d 尚未恢复正常。8 h 切痂组在伤后 12 h TNF- α mRNA 表达量高于非切痂组,48 h 后逐渐下降,至伤后 96 h 恢复伤前值。24 h 切痂组伤后 48 h 高于单纯烫伤组,伤后 96 h 开始下降,伤后 120 h 恢复正常。96 h 切痂组在观察期内未恢复正常,但略低于单纯烫伤组,见表 3。

2.3 肺组织 ICAM-1 与 TNF- α mRNA 的表达进行了相关分析,发现两者呈正相关关系($r = 0.8936$)。

2.4 肺脏 MPO 活性变化

烧伤后 4 h 肺组织 MPO 活性大幅度上升,烧伤后 24 h 达到高峰,A 组 MPO 活性一直维持较高水平;B 组在切痂后短暂升高,随后大幅度下降,伤后 96 h 基本恢复正常;24 h 切痂组在伤后 96 h 逐步下降,伤后 168 h 也恢复了正常;96 h 切痂组在切痂后 MPO 活性也有不同程度降低,但观察期内未恢复至伤前值,见表 4。

3 讨论

细胞粘附分子(CAMs)是一类能介导细胞与细胞、

细胞与细胞外基质相互粘附的糖蛋白,其种类多,作用非常广泛,在炎症反应、缺血再灌注、创伤、休克、血液凝固、细胞损伤、免疫识别中起重要作用,粘附分子还参与跨膜信号的传递^[1]。炎症反应是烧伤后常见的并发症之一,也是导致机体出现 MODS 的重要原因。适度的炎症反应是机体对外来刺激的正常防御反应,但如果白细胞过度渗出聚集,尤其是粒细胞脱颗粒,超氧化物、蛋白水解酶及溶菌物质释放,就会造成对正常组织的严重损伤^[2]。尤其是白细胞与内皮细胞的过度粘附,会导致微循环毛细血管血栓形成,血小板聚集,最终导致内皮细胞肿胀,膜表面酶及许多受体失活,内皮细胞间的多聚蛋白质复合物连接断裂,造成微循环血管通透性增加,蛋白及体液转移、水肿形成^[3~5]。近年来粘附分子介导的内皮细胞损伤、白细胞的过度炎症反应日益引起重视,本文探讨了烧伤后 ICAM-1 的变化规律及其与 TNF- α 表达之间的关系,并对反映白细胞渗出情况的 MPO 活性进行了测定,研究不同时切痂对上述指标的影响。

目前的研究多集中在 ICAM-1 的表达对粘附的影响,ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族,细胞分布很广,其中在血管内皮细胞表达最强。ICAM-1 在血管内皮细

胞表面未激活时表达量较低,在 IL-1、TNF- α 、内毒素等因素刺激下表达量明显增加。白细胞表面的 β_2 整合素三种分子(CD11a/CD18, LFA-1; CD11b/CD18, Mac-1; CD11c/CD18, P150, P95)均能与血管内皮细胞表面的 ICAM-1 分子结合,介导白细胞与内皮细胞粘附。

本文采用逆转录 PCR 方法探讨烧伤后肺组织 ICAM-1 及 TNF- α mRNA 的表达,结果表明烧伤后 4 h ICAM-1 开始升高,伤后 12 h 达到高峰,此后略有下降,但 96 h 后再度升高,直至伤后 7 d 仍高于正常值。值得注意的是,实施切痂术能有效降低 ICAM-1 mRNA 表达量,而且切痂越早,ICAM-1 恢复正常越快,8 h 切痂优于 24 h 切痂,24 h 切痂优于 96 h 切痂,96 h 切痂优于不切痂。反映中性粒细胞渗出的 MPO 活性变化也说明了这一规律。虽然切痂后由于手术打击,ICAM-1 的表达会短暂升高,但很快会恢复正常。我们的研究表明,焦痂的存在是导致肺组织 ICAM-1 表达增加的重要原因。及早切除焦痂防止内皮细胞与白细胞之间过度粘附而形成微循环白细胞栓,缓解白细胞脱颗粒对内皮细胞的进一步损伤及白细胞大量渗出对肺组织的继发性损伤。

严重烧伤后有关肺脏损伤的报道已屡见不鲜,烧伤后 ICAM-1 在肺组织中的大量表达,可使白细胞,主要是中性粒细胞在肺微血管内粘附聚集,形成白细胞栓塞,最终使中性粒细胞在肺组织中大量渗出聚集,从而损伤肺实质细胞,导致肺功能损伤。以往认为烧伤后局部组织中 TNF- α 、IL-1、IL-8 等炎症介质的表达增加是引起粘附分子表达的主要刺激因素,我们采用逆

转录 PCR 方法检测了烧伤后肺组织中 TNF- α mRNA 的表达,虽然 TNF- α 的表达与 ICAM-1 的表达有显著相关的关系,但并不能肯定 TNF- α 刺激了 ICAM-1 的表达,TNF- α 的表达高峰在伤后 24 h,而 ICAM-1 的表达在烧伤 12 h 即已达到高峰,说明肺组织 ICAM-1 的表达并不单纯由 TNF- α 刺激形成,而是与多种毒性成分和缺血再灌注损伤有关^[6],其中与焦痂的存在关系最为密切,尽早实施切痂术是防止白细胞尤其是中性粒细胞在肺组织微血管内滚动、粘附、聚集、渗出及对组织细胞造成毒性损伤的最佳手段。

参 考 文 献

- 1 Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation; modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 1994, 55(5):662 - 675.
- 2 Korthuis RJ, Aderson DC, Granger DN, et al. Role of neutrophil-endothelial cells adhesion in inflammatory disorders. *J Crit Care*, 1994, 9(1):47 - 71.
- 3 Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, et al. Molecular determinants of reperfusion induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res*, 1994, 74(2):336 - 43.
- 4 Scannel G, Waxman K, Vaziri ND, et al. Effects of trauma on leukocyte intercellular adhesion molecule-1, CD11b, and CD18 expression. *J Trauma*, 1995, 39(4):641 - 4.
- 5 Asako H, Kurose I, Wolfe RE, et al. Mechanisms of lactoferrin induced leukocyte-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Microcirculation*, 1994, 1(1):27 - 34.
- 6 贺立新,郭振荣,盛志勇,等.休克期切痂对循环状况的改善.中华整形烧伤外科杂志,1998,14:326 - 329.

(收稿日期:1999-03-29;编辑:冷怀明)

· 征 文 · 消 息 ·

2000 年中国消化外科学术会议征文通知

由中华医学会重庆分会和《消化外科》编委会联合举办的“2000 年中国消化外科学术会议”定于 2000 年 6 月上旬在重庆召开。大会将邀请大陆、港台及欧美百余位著名消化外科专家到会并作讲演。现征文如下:

会议主题:消化外科迎接新世纪。征文内容:有关食道外科、胃肠外科、肝脏外科、胆道外科、胰腺外科、脾脏外科、门脉高压症、肛肠外科、内镜外科、内分泌外科、器官移植、营养支持、影像介入及护理等方面的临床与基础研究。征文要求:①学术论文需全文并附 600~800 字的内容摘要,摘要应含有目的、方法、结果、结论。②欲演示手术录像者请寄 600~800 字的内容简介。③注明作者姓名、单位、邮编并请自留底稿,恕不退稿。优秀论文将在《消化外科》发表。欢迎通过 E-mail 或软盘投稿。未投论文的医师,可直接来函索取邀请信。截稿日期:2000 年 3 月 31 日。联系人:重庆市沙坪坝区高滩岩西南医院肝胆外科中心 郑树国 顾小东;电话:023-65317637;E-mail: digisurg@263.net;邮编:400038。