

烧伤延迟复苏诱导心肌细胞凋亡

王广庆 于宝军 夏照帆 陈玉林 方之扬 葛绳德 刘世康

【摘要】 目的 探讨烧伤延迟复苏能否引起心肌细胞凋亡及其发生机制。**方法** 30% III 度烧伤 6 h 后进行复苏,再灌注 2、10、18 h 后抽提心肌组织中基因组 DNA,用 PCR 试剂盒检测凋亡,PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,观察基因组 DNA 是否出现特征性的凋亡图像并观察心肌组织中一氧化氮(NO)和脂肪酸含量的变化。**结果** 烧伤延迟复苏后心肌组织基因组 DNA 出现标志凋亡的“梯形”图像,随延迟复苏时间的延长大鼠心肌组织凋亡的发生率增加。NO 在延迟复苏后 2 h 显著降低,延迟复苏后不饱和脂肪酸含量显著低于烧伤后立即复苏大鼠,细胞膜僵硬显著增加。**结论** 烧伤后延迟复苏导致心肌组织细胞凋亡,其发生与 NO 含量减少、氧自由基产生增加有关。

【关键词】 心肌细胞;凋亡;烧伤;一氧化氮;延迟复苏

Myocardial apoptosis induced by delayed fluid resuscitation in a burned rat model WANG Guangqing, YU Baojun, XIA Zhaofan, et al. Burns Center, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

【Abstract】 Objective To explore the possibility and the mechanism of myocardial apoptosis induced by delayed fluid resuscitation in a burned rat model and its relationship with nitric oxide(NO) and oxygen-derived free radicals.**Methods** In a rat model with 30% III degree burn, the genomic DNA of the myocardial tissue was detected with ApoAlert™-PCR Ladder Assay Kit and visualized with agarose gel electrophoresis. Meanwhile, the NO and the content of unsaturated fatty acids were measured. **Results** In rats receiving delayed fluid resuscitation following burn, the myocardial genomic DNA exhibited DNA ladder-index of apoptosis, and the contents of myocardial NO and unsaturated fatty acid were much lower than those in rats receiving immediate resuscitation ($P < 0.05$). **Conclusion** The myocardial tissue undergoes apoptosis in burned rats receiving delayed fluid resuscitation, and the decreased NO and the production of oxygen-derived free radicals are also observed in this process.

【Key Words】 Myocardial cell; Apoptosis; Burns; Nitric oxide; Delayed resuscitation

烧伤后延迟复苏的病人心肌组织结构和功能受到损害,出现心律失常、心功能不全等,也更容易发生器官功能不全^[1]。夏照帆等^[2,3]观察到烧伤延迟复苏存在再灌注损伤。烧伤后微血管通透性增加,体液渗出,使有效循环血量降低,导致微循环灌注不足,组织器官及细胞发生缺血、缺氧,能量代谢障碍。如果缺血、缺氧不能及时纠正,持续一段时间后再进行液体复苏,则发生烧伤后延迟复苏再灌注损伤。在再灌注损伤时,心肌细胞的膜蛋白和膜脂质结构被破坏,细胞坏死。近来,细胞凋亡在缺血再灌注损伤中的作用日益受到重视。因为烧伤延迟复苏与缺血再灌注存在相似的病理基础,推测烧伤延迟复苏后,心肌细胞发生凋亡。本实验主要观察烧伤延迟复苏能否引起心肌细胞凋亡并探讨其发生机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39500150);国家杰出青年科学资助项目(39725029)

作者单位:200433 上海 第二军医大学长海医院烧伤中心

1 材料与方法

1.1 烫伤模型的制作

按统计学要求随机将 200~300 g 雄性 SD 大鼠 40 只进行分组,于实验前 12 h 剪毛,禁食但不禁水。0.7% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,背部 98℃ 沸水中烫伤 12 s,造成 30% TBSA III 度烫伤。烫伤后早期复苏的大白鼠,每 1% TBSA 补液总量为 4 ml/kg。烫伤延迟复苏的大白鼠每 1% TBSA 补液量按 5.33 ml/kg 计算,烫伤后 6 h 开始补液,补液量是计算输液量的 1/2,烫伤后 7 h 补充剩余的 1/2 量。

1.2 烫伤后心肌组织基因组 DNA 梯形带的检测

烫伤后 12、18、24 h 取烫伤鼠的心肌组织,提取基因组 DNA,用 ApoAlert™-PCR Ladder 试剂盒(Clontech)进行检测。基因组 DNA 0.5 μg 与 35 μl adaptor 混合物 55℃ 共同孵育 10 min,随后进行 PCR 反应,热启动 72℃,8 min;94℃,1 min;72℃,3 min,30 个循环;72℃,15 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察。

1.3 烫伤延迟复苏心肌组织 NO 的变化

40 只动物分为对照组、烧伤组、烧伤后立即复苏组 (IFR) 和烧伤延迟复苏组 (DFR), 每组 10 只, 均在伤后 8 h 取材。大鼠的心肌组织 100 mg 进行匀浆, 根据蛋白定量取匀浆液 0.1 ml (蛋白质量浓度为 0.1 mg/ml), 测定 NO⁻²+NO⁻³ 含量。蛋白测定用 Bradford 方法。

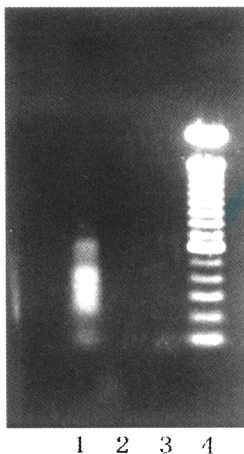
1.4 烫伤后心肌组织中脂肪酸组成的变化

IFR 和 DFR, 每组 10 只, 均在伤后 8 h 取材。取心肌组织约 200 mg, 氯仿-甲醇 (2:1) 液 2 ml, 含 0.05% 羟丁基甲苯 (BHT) 的氯仿液 2 ml, 匀浆提取, 氮气吹干, 加入甲醇: 苯: 氢氧化钠 (30:20:1) 溶液 2 ml, 室温放置 20 min 后, 加入 1.0 mol/L 盐酸-甲醇溶液 2 ml, 用正丁烷 3 ml 萃取生成的脂肪酸甲酯。测定脂肪酸的相对含量^[4]。

2 结果

2.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳

烫伤后 6 h 延迟复苏 2 h 后, 未出现心肌组织细胞凋亡, 延迟复苏 18 h 凋亡明显, 见图 1。检测烧伤后立即复苏组细胞凋亡仅在烧伤后 24 h 出现 1 例。烧伤延迟复苏后心肌组织细胞凋亡发生率随时间延长有所增加, 见表 1。



烧伤 6 h 延迟复苏 18 h (泳道 1) 后基因组 DNA 出现明显的细胞凋亡特征, 琼脂糖凝胶电泳后呈“梯形”改变。烧伤后延迟复苏 2 h (泳道 2) 和烧伤后 6 h (泳道 3) 细胞凋亡不明显, PCR 分子量参照 (泳道 4)

图 1 烧伤延迟复苏致心肌组织细胞凋亡

Lane 1, 2, 3 are the results of PCR with the templates of genomic DAN from burned rats with delayed fluid resuscitation after 24 h, 8 hand 6 h of burn injury correspondingly. Lane 4 is the PCR ladder marker

Fig 1 The apoptosis of cardiac myocytes from burned rats with delayed fluid resuscitation

表 1 烧伤不同时间发生心肌组织细胞凋亡的大鼠数目

Tab 1 The rates of apoptosis in the hearts from burned rats

n	伤后时间 (h)			
	8	16	24	
DFR	7	0	1	3
IFR	6	0	0	1

2.2 心肌组织中 NO 含量变化

对照组心肌组织 NO 含量为 (790 ± 49) nmol/mg, 烧伤组心肌组织中 NO 含量为 (2981 ± 298) nmol/mg, 烧伤后立即复苏组心肌组织中 NO 含量为 (2635 ± 256) nmol/mg, 而延迟复苏组为 (1624 ± 70) nmol/mg, 延迟复苏组 NO 产生量和立即复苏组比较明显下降 (P < 0.01)。

2.3 心肌组织中脂肪酸相对含量的变化

DFR 大鼠与 IFR 比较, 心肌多不饱和脂肪酸 (18-2C: 亚油酸、20-4C: 花生四烯酸) 相对含量显著降低, 多不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸 (16-C: 软脂酸、18-C: 硬脂酸、18-1C: 油酸) 的比值作为不饱和指数 (UI) 可以反映生物膜的僵硬程度。烧伤延迟复苏大鼠心肌生物膜的流动性降低, 僵硬程度增加, 见表 2。

表 2 烧伤后不同时间复苏对心肌组织脂肪酸相对含量的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The relative contents of fatty acid composition in myocardial tissue postburn (% , $\bar{x} \pm s$)

	16-C	18-C	18-1C	18-2C	20-4C	UI
IFR	14.1 ± 1.3	14.9 ± 1.6	9.0 ± 1.0	35.2 ± 1.7	26.9 ± 1.5	2.2 ± 0.3
DFR	18.0 ± 1.1	17.5 ± 1.0	10.0 ± 0.9	30.2 ± 2.2**	24.3 ± 1.9**	1.5 ± 0.1**

与 IFR 比较, **: P < 0.01

3 讨论

细胞凋亡是细胞的程序性死亡, 该过程受基因调控, 不引起周围组织的炎症性反应。细胞凋亡需要消耗能量, 活化核酸内切酶, 最终将基因组 DNA 切割成 180~200 碱基对倍数的片段。烧伤延迟复苏引起心肌细胞基因组出现细胞凋亡时典型的梯形带, 见图 1。表明烧伤延迟复苏引起心肌细胞凋亡, 而烧伤后立即复苏组的发生率则较低。在临床实践中, 观察到烧伤延迟复苏病人心功能不全发生率升高, 可能与烧伤延迟复苏存在心肌细胞凋亡的现象有关。延迟复苏后细胞死亡仍然发生, 破坏心肌组织结构。因此, 对该现象进行深入研究, 可以为防治烧伤延迟复苏心肌细胞凋亡提供可能的途径。

在烧伤延迟复苏引起心肌细胞凋亡的因素中, NO起着重要的作用。DFR组心肌组织 NO 含量显著少于 IFR 组。因此, 再灌注时心肌组织产生的氧自由基与 NO 结合是导致 NO 减少的主要原因, NO 具有保护细胞免于凋亡的作用。但是, NO 与超氧阴离子结合产生的氮氧阴离子对细胞具有更强的毒性。因此, NO 的作用有待于进一步研究。事实上, NO 在细胞凋亡中的作用报道不尽一致^[5]。认为 NO 在参与细胞凋亡的过程中具有双重作用, 它取决于 NO 的浓度和激活不同的信号转导通路。

烧伤延迟复苏心肌组织产生氧自由基增加。增加的氧自由基可以引起心肌组织中不饱和脂肪酸减少、饱和脂肪酸增加, 使细胞膜的僵硬增加^[4]。烧伤延迟复苏不饱和脂肪酸减少, 从另一个侧面证实烧伤延迟复苏氧自由基产生增加。增加氧自由基或耗竭内源性抗氧化剂可以引起细胞凋亡, 内源性或者外源性抗氧化剂能够抑制细胞凋亡, 因而认为细胞凋亡与氧自由基水平升高有关^[6]。

烧伤延迟复苏过程中存在着能量代谢障碍, 这种能量代谢障碍是导致细胞凋亡的重要因素。每一个细胞都有其特定的 ATP 水平或能量阈值, 只要细胞的物质代谢能够维持该水平的 ATP 供应, 这个细胞就能够存活, 当 ATP 水平下降, 但仍能够保证细胞凋亡过程

中大分子酶解、染色体浓缩、梯状 DNA 形成所需要的能量供应时, 就会发生细胞凋亡。只有细胞的 ATP 水平突然下降到无法启动细胞凋亡时, 细胞会发生坏死^[7]。因此, 烧伤后心肌组织 ATP 水平下降到某一阈值时^[2,3], 再进行复苏补充能量, 必然会诱发细胞凋亡。

烧伤延迟复苏能够引起心肌细胞凋亡, 氧自由基产生增加, NO 含量减少和能量代谢障碍可能是导致细胞凋亡的重要原因。

参 考 文 献

- 1 杨宗城, 黎鳌. 烧伤后多器官功能衰竭. 中华烧伤整形外科杂志, 1985, 1: 31-3.
- 2 Xia ZF, He F, Barrow RE, *et al.* Reperfusion injury in burned rats after delayed fluid resuscitation. JBCR, 1991, 12: 430-6.
- 3 Xia ZF, Barrow RE, He F, *et al.* Efficacy of leupeptin, superoxide dismutase, and verapamil in modulating delayed reperfusion damage after burn injury. JBCR, 1992, 13: 530-7.
- 4 王广庆, 安长荣, 赵庆春, 等. 烫伤后心肌脂肪酸含量的变化. 中国危重病急救医学, 1993, 5: 323-324.
- 5 Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. FEBS Lett, 1998, 433: 125-31.
- 6 Clutton S. The importance of oxidative stress in apoptosis. British Medical Bulletin, 1997, 53: 662-8.
- 7 Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, *et al.* Control of apoptosis by the cellular ATP level. FEBS Lett, 1996, 378: 107-10.

(收稿日期: 1999-08-30; 编辑: 冷怀明)

· 警 钟 ·

应用湿润烧伤膏发生不良后果的报告

潘开云 林培

病例 例 1: 男性, 23 岁, 右手腕部高压电接触烧伤, 伤后应用湿润烧伤膏治疗, 26 d 后因创面严重感染坏死入院。检查: 右手腕部屈侧感染创面 8 cm × 5 cm, 肉芽陈旧水肿, 创面污秽积脓, 腕部所有屈肌腱及正中神经裸露坏死, 右手呈屈曲挛缩畸形, 创面培养为绿脓杆菌。入院后行扩创及腹部带蒂皮瓣修复, 创面愈合, 但右手腕部功能已严重受损。

病例 例 2: 男性, 18 岁, 右手腕部高压电接触烧伤, 伤后应用湿润烧伤膏治疗, 38 d 后因创面严重感染, 并两次发生创面大出血而入院。检查: 右腕部屈侧陈旧性感染创面 6 cm × 5 cm, 肉芽老化, 污秽积脓, 腕部屈肌腱裸露坏死, 创面培养为金黄色葡萄球菌。入院第 3 天, 创面又发生大出血, 量约 100 ml, 遂急诊扩创探查, 见腕部尺动脉约 2 cm 被腐蚀破裂, 行尺动脉结扎,

清创及腹部带蒂皮瓣修复, 创面愈合, 但右手已呈屈曲挛缩畸形。

病例 例 3: 男性, 27 岁, 右手腕部高压电接触烧伤, 伤后应用湿润烧伤膏治疗, 24 d 后因创面严重感染, 坏死范围扩大而入院。检查: 右手及腕部呈严重毁损性坏死, 创面污秽流脓, 恶臭出蛆, 创面培养为绿脓杆菌, 因手腕部创面坏死毁损严重, 无法修复, 行右前臂中下 1/3 截肢术。

讨论 对电损伤创面主张早期清创及各种皮瓣修复早已成为共识。文章报告的 3 例均为高压电接触损伤后应用湿润烧伤膏治疗长达 3~4 周以上, 延误了治疗时机, 并引致创面严重感染坏死, 大出血, 最后导致截肢或手腕部功能严重损坏, 其教训深刻, 应当引起广泛重视。

(收稿日期: 1999-07-07; 编辑: 冷怀明)

作者单位: 363000 福建省漳州市医院烧伤整形科