文章编号:1000-5404(2005)11-1061-04

论著

烧伤小鼠血清中促造血成分的毛细管电泳分析

周燕虹,罗成基,郭朝华,孔佩艳,邹仲敏 (第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 分析烧伤后血清中造血刺激活性成分。**方法** 毛细管电泳分析烧伤血清及经离子交换层析所得造血活性组分A、B、C。**结果** ①烧伤血清经毛细管电泳后发现有6个主要变异峰不同于正常血清。②经离子交换分离后得到的具有造血活性的3种中的各亚组分(除33.6×10^3外),均与全血清毛细管电泳图谱中相应未知的变异峰的变化趋势相吻合。③A、B、C 3种组分经毛细管电泳分析,其主要成分分子量A为10×10^3、B为33.6×10^3、83.9×10^3、C为41.2×10^3、48.2×10^3。④$10\times10^3$和48×10^3蛋白与目前已报道的造血活性细胞因子分子量不一致。**结论** 烧伤后血清中产生了某些促进造血的物质。10×10^3、48×10^3蛋白的分子量与已报道的造血刺激因子的分子量不一致,其性质及功能有待进一步研究。

关键词: 烧伤;造血调控;毛细管电泳
中图法分类号: R331.1; R446.112; R644 **文献标识码:** A

Analyzing the hematopoietic stimulating factors in the burned mice serum by capillary electrophoresis

ZHOU Yan-hong, LUO Cheng-ji, GUO Zhao-hua, KONG Pei-yan, ZOU Zhong-min (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To examine whether abnormal hematopoietic activity components occurs in burned sera and identify their characteristic. **Methods** Serum samples harvested form burned mice and their fractions from ion-exchange chromatography were separated by capillary electrophoresis (CE) and were their molecular weights investigated. **Results** There were six abnormal peaks in burned sera different from control. Every subfraction separated from A, B, C fraction by CE appeared at the corresponding site in total serum CE profile and coincided with the abnormal peak respectively, except for 33.6×10^3 protein. The molecular weight detected by CE of fraction A is 10×10^3, fraction B 33.6×10^3 and 83.9×10^3, and C 41.2×10^3 and 48.2×10^3. The 10×10^3 protein in fraction A and 48×10^3 protein in fraction C did not match with any other reported hematopoietic cytokines. **Conclusion** Some stimulating hematopoietic proteins appeared in burned sera. Further research about 48×10^3 and 10×10^3 protein modulating hematopoiesis after burn injury is necessary.

Key words: burns; hematopoietic modulation; capillary electrophoresis

本室前期的研究结果表明烧伤小鼠血清在急性期含有较高的红、粒系刺激活性,而且这种活性的峰值及其提高的倍数与血清中EPO、GM-CSF升高的峰值和倍数不完全一致。进一步通过离子交换层析分离烧伤后血清,得到具有造血刺激活性的成分[1,2]。出现这种结果必然有其一定的物质基础,可能是原有的已知的造血促进物质的增加,也可能是抑制造血的成分相对降低,还有可能是体内有新物质的产生。为此,本实验以烧伤后急性期血清及其离子交换色谱层析后得到的造血刺激活性组分为研究对象,对全血清及其各有效分离组分进行毛细管电泳分析,以期了解烧伤后有关血清成分改变的情况以及这些成分与血清中造血刺激因素之间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物与致伤方法

昆明种雄性小鼠40只(购自本校实验动物中心),体质量22~28 g,作为血清供体,血清供体小鼠用3%凝固汽油致TBSA 15% Ⅲ度烧伤(经病理切片证实)。实验分为烧伤组(12、24、72

基金项目:全军"九五"重点课题(96L045)
Supported by the Key Research Project for the "Ninth Five-year Plan" of PLA (96L045)
作者简介:周燕虹(1972-),女,四川省洪雅县人,硕士,实验师,主要从事创伤应激与造血调控方面的研究,现在卫生毒理学教研室工作。电话:(023)68752589
通讯作者:罗成基,电话:(023)68752281
收稿日期:2005-01-04;修回日期:2005-04-26

h)和正常组。每1组10只,烧伤后12、24、72 h分别经股动脉取血,制备烧伤及正常血清。

1.2 主要仪器设备及药品试剂

1.2.1 仪器 毛细管电泳仪 BeckmanP/ACE system 5010型。微孔滤膜(0.22 μm, Milipore公司)、透析带 MW cut off 5000 (Milipore公司)。

1.2.2 试剂 DEAE-sephadex A50 葡聚糖凝胶 Pharmacia公司,1 mol/L NaCl, PB缓冲液(pH 6.8, 20 mmol/L),毛细管电泳CAP SDS 14-200kit Beckman公司, 1 mol/L HCl,1 mol/L NaOH,二巯基乙醇。

1.3 方法

1.3.1 样本收集 正常及烧伤后12、24、72 h小鼠经股动脉放血后按常规方法收集血清。

1.3.2 毛细管电泳分析 ①以正常血清、烧伤12、24、72 h血清为研究对象进行CE分析,分别比较致伤前后血清各蛋白峰的含量变化。②按文献[2]方法将烧伤后24 h血清经离子交换层析后得到的活性较高的组分A、B、C进行CE分析,以确定其分子量及含量。③CE步骤:将100 μl样品、200 μl样品缓冲液、10 μl Orange G染色剂,以及10 μl β-巯基乙醇,混合于EP管中,振荡混匀1 min→100 ℃水浴10~15 min→冰浴3 min→从反应样品中吸取200 μl加到测量样品杯→上机按配置软件的操作程序进行毛细管电泳分离和检测,各样品的分离检测时间为35 min。

1.3.3 结果与计算

1.3.3.1 未知蛋白相对浓度的计算 经毛细管电泳仪Goden软件分析,各蛋白质的峰面积与其浓度成正比。因此,各峰的面积能够代表其相对浓度,以峰面积代表蛋白的相对浓度。

1.3.3.2 未知蛋白的分子量计算 通过测得的未知试样的电泳图谱,求得各峰的迁移时间及内标出现时间该仪器配套的P/ACE软件拟合出曲线公式:

lg分子量 = −3.741 307 ×(内标出峰时间/样本出峰时间) + 6.950 864,计算各分离峰的分子量。

1.4 统计学分析

采用SPLM 2.3软件对结果进行基本统计量和单因素方差分析。

2 结果

2.1 全血清毛细管电泳

比较烧伤前后血清毛血管电泳图谱,经计算软件分析可知,在损伤后12、24 h全血清成分发生了变化,各变异峰的主要蛋白分子量及其峰面积见表1。

表1 烧伤后血清经毛细管电泳异常峰的分子量及峰面积($\bar{x} \pm s$)

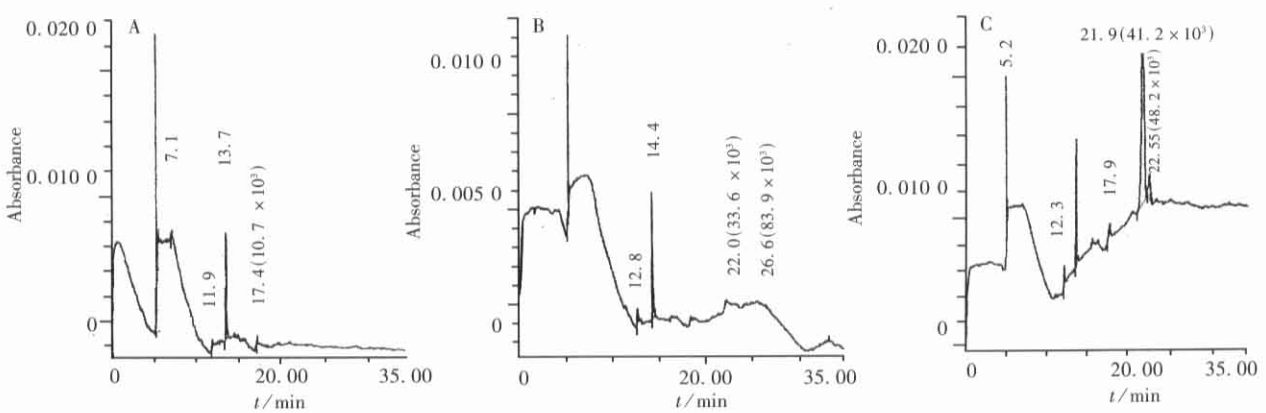
Tab 1 The molecular weight and area of abnormal peaks in burned sera analyzed by CE ($\bar{x} \pm s$)

Peak	Normal		12 h		24 h		72 h	
	MW($\times 10^3$)	PA	MW($\times 10^3$)	PA	MW($\times 10^3$)	PA	MW($\times 10^3$)	PA
1	12.03 ± 0.58	1.88 ± 0.32	11.67 ± 0.32	4.16 ± 0.09*	12.00 ± 0.32	1.13 ± 0.06	11.60 ± 0.41	0.73 ± 0.01*
2	44.24 ± 0.32	47.93 ± 0.31	41.46 ± 0.58*	46.10 ± 0.11	40.93 ± 0.38*	27.86 ± 0.13**	39.23 ± 0.24*	18.64 ± 0.04*
3	50.46 ± 0.33	5.56 ± 0.04	48.01 ± 0.19*	21.66 ± 0.07*	48.29 ± 0.27*	5.72 ± 0.10	47.36 ± 0.21*	0.25 ± 0.02**
4	56.22 ± 0.38	10.41 ± 0.17	51.12 ± 0.41*	8.03 ± 0.15	52.61 ± 0.49*	4.24 ± 0.07*	50.47 ± 0.31*	1.11 ± 0.03**
5	83.90 ± 0.52	4.14 ± 0.12	73.86 ± 0.33*	4.21 ± 0.04	80.33 ± 0.39*	2.23 ± 0.14*	73.03 ± 0.22*	1.76 ± 0.11
6	126.74 ± 0.48	0.33 ± 0.17	109.11 ± 0.4*	7.58 ± 0.12**	114.28 ± 0.51*	0.12 ± 0.03*	112.05 ± 0.43*	1.57 ± 0.11*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* normal; MW: Molecular weight; PA: Peak area

经对比发现,各相应的变异峰在烧伤后出峰时间均有所提前,其主要蛋白分子量有不同程度的降低,提示烧伤后这些峰内的蛋白可能在构成比上发生改变。另一方面,各峰的峰型及含量均有变化,主要表现在第2~5峰。

烧伤24 h血清分离出的A、B、C组分经毛细管电泳分析(图1),各峰所含主要蛋白的分子量及峰面积见表2。



A: A component; B: B component; C: C component

图1 血清各造血活性组分毛细管电泳图谱

Fig 1 The CE map of the effective components in burned sera

表 2　各活性组分分子量及在烧伤情况下峰面积变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　The molecular weight and peak area of effective components in burned and normal sera（$\bar{x} \pm s$）

Component	Molecular weight($\times 10^3$)	Normal peak area	Burn peak area
A	10.6 ± 0.138	0.439 ± 0.013	0.495 ± 0.011
B	33.6 ± 0.121	0.629 ± 0.017	0.810 ± 0.018
	83.9 ± 0.1312	0.787 ± 0.021	0.129 ± 0.101 **
C	12.0 ± 41.2	0.095 ± 0.007	0.095 ± 0.009
	41.2 ± 0.162	3.923 ± 0.018	5.197 ± 0.021 *
	48.2 ± 0.209	—	0.781 ± 0.025

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* normal peak area

由表 2 可知：烧伤后 A 组分的主要蛋白分子量为 10×10^3 左右，烧伤后含量升高，B 组分子中 33.6×10^3 峰面积变化不大，但 83.9×10^3 峰的峰面积在伤后显著下降，C 组分在烧伤后出现异常峰（48.2×10^3），而 41.2×10^3 峰也有所上升（$P<0.05$）。

2.2　3 种活性组分与全血清的毛细管电泳结果比较

本实验还显示经离子交换分离后得到的具有造血活性的 A、B、C 3 组分中各亚组分（除 33.6×10^3 外），均与全血清毛细管电泳图谱中相对应分子量位置的变异峰的变化趋势相吻合（表 3），提示烧伤后血清造血活性增强有其一定的物质基础。

表 3　3 种活性组分与全血清 CE 图谱中变异峰的对应关系

Tab 3　Relation ship between CE maps of total sera and three effective components

Component	Molecular weight（$\times10^3$）	Match to the aberrant peaks in the CE map of sera
A	10.6	Peak 1(Increase)
B	33.6	——
	83.9	Peak 5(Decrease)
C	41.2	Peak 2(Increase)
	48.2	Peak 3(New produce)

CE：Capillary electrophoresis

3　讨论

本研究前期的实验结果表明烧伤后血清具有高于正常的红系和粒系造血刺激活性，并且通过离子交换层析分离出 A、B、C 3 组活性成分[1,2]。最近，俄国学者从烧伤血浆中分离得到分子量为（0.5 ~ 1.5）$\times10^3$ 的中分子蛋白，并发现其对骨髓造血调控发挥着重要作用，这些中分子抑制红系而刺激粒系造血[3]。Gamelli 等[4]采用酶联免疫分析法检测了小鼠 15% Ⅲ度烧伤后骨髓、脾脏及血清中 G-CSF 的浓度，结果显示烧伤感染后脾脏和骨髓的 G-CSF 产量升高，血清中 G-CSF 的浓度则是正常的 14 倍。在前期的实验中，我们通过离子交换层析得到了 3 种烧伤血清中的造血刺激活性组分（ABC）[2]。经毛细管电泳测定 3 组分的分子量与已知的红、粒系造血调控因子比较，见表 4。

表 4　烧伤后血清活性组分与已知造血调控因子的比较

Tab 4　Comparison between well-known hematopoietic factors and effective components in burned sera

Positive regulatory cytokines		Negative regulatory cytokines	
Mouse cytokine name	Molecular weight（$\times10^3$）	Mouse cytokine name	Molecular weight（$\times10^3$）
EPO	30	TNF-α	17
BPA	25 – 40	TGF-β	25
IL-3	20 – 28	INF	30 ±
GM-CSF	21 – 23	IL-4	20
G-CSF	25	NRP	79
M-CSF	40 – 70, dimer	Lacoferrin	19 – 21
SCF	30	AIF	38 – 67
IL-6	26	MIP	78
IL-11	23	Granulocyte chalone	4
A	10×10^3(Main protein)	(Stimulate CFU-E)	
B	33.6×10^3(Main protein)	(Stimulate CFU-E)	
C	$(41-48)\times10^3$(Main protein)	(Stimulate CFU-E、CFU-GM)	

Molecular weights come from protein bank of NCBI. NRP: Negative regulatory protein; AIF: Acid isoferritin; MIP: Macrophage inflammatory protein

3.1　A 组分

前期结果表明 A 组分无论在烧伤组或正常组均表现一定的红系刺激活性，且烧伤后的该成分的红系刺激活性高于正常[2]。本次实验经 CE 分析测得烧伤后其主成分的分子量在 10×10^3 左右，且烧伤后此峰面积大于正常，这与全血清图谱中第 1 变异峰在伤后升高相吻合。但此峰分子量不与目前已知的任何一个红系造血刺激因子的分子量接近，其性质目前尚待深入分析。

3.2　B 组分

前期实验中，对比烧伤前后，发现烧伤后 CFU-E 刺激活性高于伤前[2]。通过毛细管电泳分析后，正常时此组分包括两个峰：33.6×10^3、83.9×10^3，在伤后 33.6×10^3 峰含量变化不显著，而 83.9×10^3 峰几乎消失。推测 83.9×10^3 分子量的峰可能对红系造血具有抑制作用，而 33.6×10^3 峰则可能对红系有刺激作用。对比已知细胞因子，小鼠 EPO 分子量为 30×10^3 左右，此组分活性峰接近 30×10^3 左右，并且对比前后峰面积发现烧伤后峰面积有所增加，这与我们以前通过放免法测得的烧伤伤后 EPO 水平变化趋势一致，但此组分是否就是 EPO 尚不能肯定，需通过单抗进一步鉴定。另一方面，B 组分中可能为抑制成分的 83.9×10^3 蛋白与抑制红系分化的负性调节因子 NRP 的分子量接近，而 NRP 是一种红系造血抑制因子，主要影响

BFU-E 的 DNA 合成，对抗 IL-3 和(或)BPA 对红系的正性调节作用。烧伤后 83.9×10^3 峰的消失与全血清图谱中第五变异峰的变化相吻合，从侧面提示了烧伤后血清活性升高不仅与正性调控成分的含量升高，同时也涉及负性调控因子的下降。因此有必要将 83.9×10^3 的蛋白进一步纯化后作生物活性鉴定。

3.3 C 组分

前期结果表明 C 组分兼有红系和粒系刺激活性[2]。经 CE 分析，C 组分在正常时只有 41.2×10^3 峰，烧伤后出现另一 48.2×10^3 峰，而前期的实验证明 C 组分对 CFU-E、CFU-GM 的活性分别为正常的 1.6 和 1.89 倍。根据图谱分析，造成这种活性升高的原因很可能与 48.2×10^3 峰的出现有关，这一分子量与目前已知的造血刺激因子的分子量均不相吻合，提示这一活性组分中可能存在未被人们认识或已知但未明确有造血活性的物质。至于 41.2×10^3 峰是促进还是抑制组分，目前很难确定，但它与最近发现的 EPO 模拟肽(EPO mimetic peptide)的分子量($2\times21\times10^3$)接近[5~7]。C 组分的变化与全血清图谱中变化最大的第 2、3 峰在烧伤后的变化趋势一致，并与黄文华等[8]发现的烧伤后血清异常蛋白的分子量范围接近，进一步证实了烧伤后异常蛋白存在。该作者通过一系列实验研究[9]认为异常蛋白就是触珠蛋白。而目前关于触珠蛋白是否对造血有调控作用尚少见报道，至于 C 组分的活性是否与触珠蛋白有关有待进一步研究证明。

综合以上实验结果，我们认为烧伤早期血清的确产生了促进红、粒系造血的活性的成分，这其中可能包含有 EPO、GM-CSF 升高的因素，也不排除还有尚未被人们认识到的其它因子的作用的可能性(包括目前已知的蛋白但未认识到与造血的关系，以及其它新的蛋白成分)。仅凭分子量及理化特性并不能肯定就是有新物质的产生，对此，还应采用现代免疫学及分子生物学、细胞生物学等技术对此结果进行深入的分析研究。

参考文献：

[1] 周燕虹，罗成基，郭朝华，等. 烧伤后血清对骨髓红、粒系造血功能的影响[J]. 中华烧伤杂志，2005，21(3)：176－179.

[2] 周燕虹，罗成基，郭朝华，等. 烧伤后血清中造血刺激活性组分分析[J]. 第三军医大学学报，2005，27(6)：500－503.

[3] Volchegorskii I A, Tishevskaia N V, Kuznetsov D A. Effects of medium-weight molecules isolated from plasma of healthy and burnt animals on the cellular composition of cultured bone marrow erythroblastic islets[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2002, (2): 30－36.

[4] Gamelli R, He L K, Hahn E. Granulocyte colony-stimulating factor: release is not impaired after burn wound infection[J]. J Trauma, 2002, 53(2): 284－289.

[5] Livnah O, Stura E A, Johnson D L, *et al*. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 A[J]. Science, 1996, 273(5274): 464－471.

[6] Wrighton N C, Farrell F X, Chang R, *et al*. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin [J]. Science, 1996, 273(5274): 458－464.

[7] Wells J A. Hormone mimicry[J]. Science, 1996, 273(5274): 449－450.

[8] Huang W H, Hu Z X, Lou Z H, *et al*. Further explorations of abnormalities in serum proteins following burns[J]. Burns, 1991, 17(6): 462－467.

[9] 王凤君，黄文华，黎 鳌，等. 烧伤后血清类触珠蛋白物质性质的确定[J]. 中华整形烧伤外科杂志，1997，13(5)：365－367.

(编辑 汪勤俭)

"2005 中日消化道肿瘤学术研讨会"征文通知

由第三军医大学西南肝胆外科医院、《消化外科》杂志编辑部主办，上海第二医科大学仁济医院、山东大学齐鲁医院、青岛医学院附属医院、解放军 401 医院协办的"2005 中日消化道肿瘤学术研讨会"将于 2005 年 9 月 15～18 日在山东青岛市举行。研讨会将邀请 10 余名日本及欧洲著名消化外科专家以肝胆胰及胃肠肿瘤的外科治疗为主题作学术演讲及 Video 演示。同时国内众多知名中青年消化外科专家亦将应邀出席。欢迎全国外科同仁踊跃投稿参会。

征稿：有关肝脏肿瘤、胆道肿瘤、胰腺肿瘤及胃肠道肿瘤的外科治疗与基础研究。请寄全文及 800 字左右的摘要，优秀论文将在《消化外科》发表，参会者可获得国家继续教育Ⅰ类学分 8 分。截稿日期：2005 年 8 月 10 日，请注明会议征文。欢迎 E-mail 投稿。

投稿请寄：重庆市第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所《消化外科》编辑部 收 邮编：400038

联 系 人：郑树国，陈 敏 电话：(023)68754655 传真：(023)65317637 E-mail：digsurg@263.net