论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0500-04

烧伤后血清中造血刺激活性组分分析

周燕虹,罗成基,郭朝华,孔佩艳,邹仲敏 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室,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 检测烧伤血清中是否有异常的造血刺激活性组分出现,并对其性质作初步鉴定。**方法** 采用离子交换层析分离正常及烧伤血清,用CFU-E、CFU-GM集落培养法检测各分离组分在烧伤前后造血刺激活性的变化,并对其进行热、酸、碱和酶处理后进一步检测造血活性。**结果** 小鼠烧伤血清经离子交换层析后得到A、B、C、D 4个组分,其中A、B组分红系造血刺激活性增高;C组分对红系和粒系造血刺激活性增高;且活性最强。D组分不具有造血刺激活性。A、B、C 3组分经酸处理和胰酶消化后活性消失,A、B组分经碱处理和热处理后活性消失,而C组分加热70 ℃以及经碱处理后仍保持部分活性。**结论** ①烧伤后血清经离子交换色谱分离得到的A、B、C、D 4组分中,A、B组分具有红系刺激活性,C组分活性最强,对红系和粒系均有刺激。②A、B、C 3个活性组分均为蛋白质,C组分对酸不稳定,对热和碱具有一定的稳定性,而A、B两组分既不耐热,对酸碱均不稳定。

关键词:烧伤;造血调控;离子交换层析

中图法分类号:R331.1; R446.11; R644.02 **文献标识码**:A

Analysis of hematopoietic stimulating factors in serum of burned mice

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, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To examine whether abnormal hematopietic activity components occurs in burned sera and identify their characteristics. **Methods** Serum samples harvested form burned and control mice were separated by ion-exchange chromatography. The hematopoietic activity of the components was investigated by CFU-E and CFU-GM culture methods. The hematopoietic activity of all the effective fractions was also tested after treatment with heat, trypsine, acid and alkali. **Results** The sera from burned and control mice were separated into four fractions (A, B, C, and D). Among them, fractions A and B from burned mice showed an increasing stimulating activity on erythropoiesis as compared with the controls, whereas fraction C was the most effective one in both erythropoiesis and granulopoiesis. Fraction D had no hematopoietic activity. All of the three effective fractions lost their activity after treatment with trypsine and acid. Fraction C partly maintained its hematopoietic activity after treatment with alkali and heated at 70 ℃. **Conclusion** Among the fractions obtained from burned sera by ion-exchange chromatography, fraction C is the most effective one on both erythropoiesis and granulopoiesis while fractions A and B are effective only on erythropoiesis. All of the three effective fractions are proteins. Fraction C is alkali-resistant and heat-stable, but fractions A and B are not.

Key words: burn; hematopoietic modulation; ion-exchange chromatography

本研究所前期的实验研究证实,烧伤后血清对正常小鼠骨髓红系、粒系造血具有正向调控作用,但这种调控作用是否是由已知造血调控因子分泌产生增加引起的还是其它未知因素,有待进一步分析,为此本研究通过离子交换层析技术对烧伤后早期造血刺激活性较强的血清进行分离和活性分析,以期了解烧伤后早期血清超常CSFs活性的物质基础,明确具有造血活性组分的理化和生物学特性。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和致伤方法

昆明种雄性小鼠40只(购自本校实验动物中心),7~8周龄,体质量20~24 g。本实验设烧伤组及正常对照组,每组20

基金项目:全军"九五"重点课题(96L045)
Supported by the Foundation for the Key Research Projects 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**:2005-01-18

只。烧伤组：以 3%凝固汽油致 TBSA 15% Ⅲ度烧伤（经病理切片证实）。正常及烧伤后 24 h 小鼠股动脉取血，常规方法制备血清，4 ℃保存备用。

1.2　仪器与试剂

1.2.1　主要仪器设备　　CO_2 培养箱，倒置显微镜，蛋白层析纯化系统（蛋白层析柱 2.0 cm × 20 cm，紫外检测仪，部分收集器、记录仪，电子蠕动泵，梯度洗脱装置）。

1.2.2　主要试剂　　RPMI1640（Gibco），小牛血清（Gibco），马血清（北京放射医学研究所），肌浸液（CSF 自制），10 U/ml EPO（麒麟公司），2.7%甲基纤维素，3%谷氨酰胺；10^{-4} mol/L β-巯基乙醇，DEAE-sephadex A50 葡聚糖凝胶（Pharmacia），1 mol/L NaCl，PBS（pH 6.8，20 mmol/L），1 mol/L HCl，1 mol/L NaOH，透析带分子载流量 5 000，微孔滤膜（0.22 μ）。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　DEAE-Sephdex A50 离子交换层析

1.3.1.1　凝胶的膨胀　　称取 DEAE-sephadex A50 2.0 g 溶于 200 ml 双蒸水，置 100 ℃沸水浴沸 2 h 使之充分吸水膨胀，随时观察凝胶，注意添加蒸馏水，勿使之干燥。

1.3.1.2　除气　　将处理好的凝胶置真空干燥器中抽真空，以除尽凝胶中的空气。

1.3.1.3　装柱　　在直径等于 2.0 cm 层析柱中，将凝胶上面多余的液体倾出，然后将浓浆状凝胶一次倾入柱中，使之自然沉降，避免颗粒间夹杂气泡，待凝胶沉集后，将双蒸水放出，并通过 2～3 倍柱床体积以上的 PB 缓冲液平衡过夜，使柱床体积稳定，然后在凝胶表面放一片尼龙滤布，以防在加样时，凝胶被冲起。装柱填料实际柱高为 20 cm。

1.3.1.4　加样　　将血清 2 ml 用 PB 缓冲液 1∶1 稀释，待柱中多余平衡液放出后，将样品小心加到凝胶柱上，打开管夹，使样品溶液流入柱内。

1.3.1.5　洗脱　　采用 PB（0.02 mol/L）～1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱，流速 0.55 ml/min，每 10 分钟收集 1 管，洗脱液经 280 nm 紫外监测，收集各分离峰分别透析除盐及微孔滤膜除菌，4 ℃保存备用。

1.3.2　活性检测　　采用集落培养法检测各分离组分造血刺激活性（CFU-E、CUF-GM），各分离组分按统一比例替代刺激因子加入体系。

CFU-E 培养体系如下：总体积 2 ml。其中 10^{-4} mol/L β-巯基乙醇 0.2 ml，3%谷氨酰胺 0.03 ml，马血清 0.7 ml，正常 BMC 终浓度 2.5×10^5/ml，2.7%甲基纤维素 0.7 ml，刺激因子（正常对照组：正常血清分离得到的各组分 0.2 ml；烧伤组：烧伤血清分离得到的各组分 0.2 ml；阳性对照组：10 U/ml EPO 0.2 ml；空白对照组：1640 培养液 0.2 ml），各体系最后以 1640 培养液补足到 2 ml。混匀各体系后分别加入 96 孔板，0.2 ml/孔，放入饱和湿度的 5%CO_2 37 ℃培养箱，7 d 后镜下观察计数集落，由 8 个以上细胞组成的暗黄或桔红色集落即为 1 个 CFU-E。

CFU-GM 培养体系：总体积 4 ml。其中马血清 1.2 ml，正常 BMC 终浓度 1×10^5/ml，2.7%甲基纤维素 1.4 ml，刺激因子（正常对照组：正常血清分离得到的各组分 0.5 ml；烧伤组：烧伤血清分离得到的各组分 0.5 ml；阳性对照组：肌浸液 0.5 ml；空白对照组：1640 培养液 0.5 ml），各体系最后以 1640 培养液补足到 4 ml。混匀各体系后分别加入 24 孔板，1 ml/孔，放入饱和湿度的 5%CO_2，37 ℃培养箱，6 d 后镜下观察计数集落。

1.3.3　分离有效活性组分的理化性质初步测定　　将离子交换层析所得活性组分分别进行加热、酸、碱和胰酶处理后，用于红系、粒系造血刺激活性检测。

1.3.3.1　热稳定性　　将此层析所得活性组分分别于 70 ℃、80 ℃、95 ℃水浴加热 15 min 后冰浴。

1.3.3.2　酸碱稳定性　　用 1.0 mol/L HCl 滴定各活性组分使其 pH = 2.0，尔后 37 ℃水浴 30 min；再加入 1.0 mol/L NaOH 中和，使 pH = 7.0；另用 1.0 mol/L NaOH 滴定，使 pH = 9.0；然后用 1.0 mol/L HCl 中和，使 pH = 7.0。

1.3.3.3　酶解反应　　向各待测样品中分别加胰酶（0.25%）消化，37 ℃水浴 30 min，冰浴终止反应。

经上述 3 步处理后，用于红系、粒系活性检测（CFU-E、CUF-GM）。以明确各有效组分的热稳定性、酸碱稳定性及酶解特性。

1.4　统计学分析

采用 SPLM 2.3 软件对结果进行 t 检验。

2　结果

2.1　血清离子交换层析及造血活性检测

烧伤和正常组小鼠血清经离子交换层析后，均得到 4 个分离峰，但峰面积有所不同（图 1）。无论正常或烧伤组 A、B、C 组分均有红系刺激活性，但烧伤后活性显著升高（图 2）；对于粒系仅 C 组分有一定刺激活性，并且烧伤组的活性明显高于正常组（图 3）。D 组分不具有红系或粒系造血刺激活性（图 2,3）。

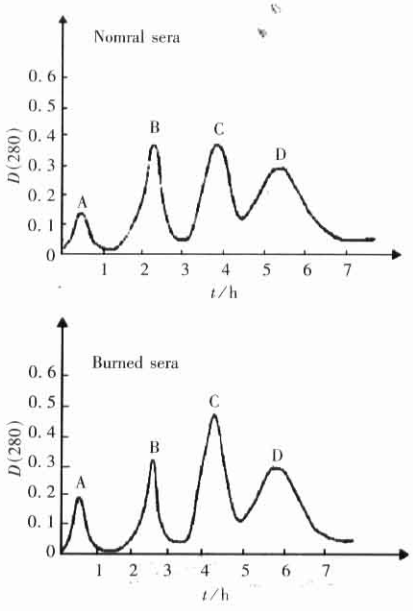
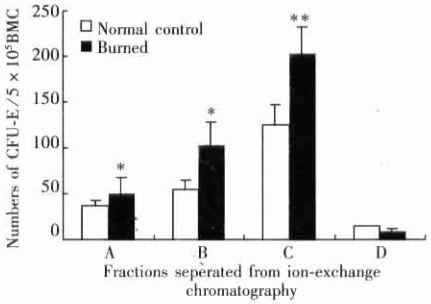


图 1　血清经 DEAE-sephadex A50 离子交换层析图谱

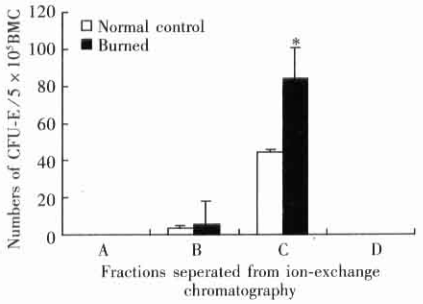
Fig 1　Profiles of serum components separated by ion-exchange chromatography



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* normal control

图2 烧伤血清层析各组分对 CFU-E 的刺激活性

Fig 2 CFU-E assay of components from burned sera on BMC formation



*：$P<0.05$，*vs* normal control

图3 烧伤血清各组分对 CFU-GM 的刺激活性

Fig 3 CFU-GM assay of components from bruned sera on BMC formation

2.2 各分离活性组分的理化性质

2.2.1 各组分的热稳定性 表1提示，A、B组分对热不稳定，加热70 ℃后丧失活性（$P<0.05$，与对照组比较）；而C组分较耐热，加热到70 ℃虽然活性有所下降，但仍然对CFU-E、CFU-GM有较高的刺激活性，加热到95 ℃时仍保持微弱的红系、粒系刺激活性。

表1 温度、pH值和胰酶对烧伤后血清各组分造血活性的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 The hematopoietic activity of burned sera components treated with heat, trypsine, acid and alkali（$\bar{x}\pm s$）

	Numbers of CFU-E/5 × 10⁵ BMC			Numbers of CFU-GM/5 × 10⁵ BMC		
	A	B	C	A	B	C
Control	55.8±9.5	103.3±24.4	202.8±30.2	–	–	84.0±16.6
70 ℃, 30 min	10.5±2.6*	4.8±1.7**	89.5±10.0**	–	–	65.0±12.1
95 ℃, 30 min	3.5±1.3**	1.8±1.7**	20.0±3.2**	–	–	22.7±6.11
pH 2.0, 30 min	5.8±2.8**	8.0±2.9**	4.3±4.0**	–	–	8.0±1.0**
pH 9.0, 30 min	10.5±3.1**	11.5±3.1**	93.8±14.4**	–	–	34.7±6.0**
Trypsine	0	0	0	–	–	0

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

2.2.2 各组分对酸碱的稳定性 表1显示A、B组分经pH 2.0的HCl和pH 9.0的NaOH处理后红系集落刺激活性丧失，说明气对酸碱均不稳定。C组分经pH=2.0的HCl处理后活性丧失，而经pH 9.0的NaOH溶液处理后仍保留部分造血刺激活性，说明C组分的活性对酸不稳定而对碱具有一定的耐受性。

2.2.3 各组分对胰酶的稳定性 经胰酶作用后，各组分的造血刺激活性均消失，说明各活性组分是蛋白质。

3 讨论

烧伤后造血系统功能改变与烧伤贫血、烧伤感染以及烧伤免疫都有非常密切的联系，直接影响病程的转归和预后。目前关于烧伤病因学、免疫学及呼吸、消化、心血管、泌尿等系统的研究已有大量报道，而研究烧伤造血反应的影响相对较少，并且文献主要集中在烧伤后外周血及骨髓、脾脏造血实质细胞在红、粒系造血的改变[1,2]，对于烧伤后机体造血调控的研究甚少。我室在既往关于放烧复合伤造血功能障碍及其重建的研究中发现，放烧复合伤后造血功能的恢复较单纯放射损伤快，其中有些造血功能指标介于单纯烧伤和单纯放射之间，表现为优于单放，次于单烧。单烧的实验动物在烧伤后除少数时相点外，外周血WBC、RBC、骨髓有核细胞计数及骨髓CFU-GM等指标均在正常值范围内波动或高于正常[3,4]。进一步的研究表明，单放、单烧、复合伤和正常小鼠骨髓基质细胞上清液也能刺激少量CFU-GM集落生长，并且活性依次为单烧上清液＞放烧上清液＞单放上清液[5]。最近的研究结果表明烧伤后血清能刺激体外CFU-E、CFU-GM生长，表现出高于正常的CSF样活性。以上这些研究结果提示，在烧伤应激反应后机体经过一系列复杂的局部和全身性神经内分泌及代谢的改变，血液中的确有造血活性物质的升高或出现，烧伤诱导大量的细胞因子在体液中的浓度发生改变，包括G-CSF、IL-1、IL-6、TNF-α、PEG2等，这些因子将不同程度地影响烧伤后的造血功能[6,7]。

自20世纪70年代初以来，许多学者对烧伤后血清蛋白组分进行了研究，但主要集中在研究烧伤毒性中分子以及其免疫抑制物质方面。黄文华等[8,9]采用SDS-PAGE分析烧伤面积大于30%患者的血清，与正常血清比较发现，烧伤后血清中出现至少4个异常电泳区带，并持续2～3周，其分子量为（17～45）×10^3，具有免疫抑制活性。该研究小组通过一系列实验研究[10]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需经实验证明。从造血调控的角度来研究烧伤后血清报道不多见。Wallner

等[11]曾报道大面积烧伤后血清对粒系有刺激活性而对红系抑制，并且进一步研究认为是 G-CSF 及 GM-CSF 水平增高和血清中一种分子量为(14～29)×10^3 的不均一的抑制红系蛋白质出现所致。最近，俄国学者发现从烧伤血浆中分离得到分子量为(0.5～1.5)×10^3 的中分子蛋白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[12]。而本实验经离子交换层析得到的 C 组分同时具明显的红系和粒系造血刺激活性，提示与上述作者分离所得到的成分不同。Gamelli 等[13]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，结果表明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。本实验中分离所得 A、B、C 是否包含 G-CSF、IL-1、IL-6 等造血刺激因子需要进一步验证。

离子交换是一种经典的蛋白质分离技术，本实验选用的 DEAE-Sephadex A50 即有离子交换能力，还有分子筛作用。烧伤后血清经离子交换层析后，得到峰型有所不同的 4 个组分，对各组分的造血活性检测结果提示烧伤后血清经离子交换层析所得 A、B、C 组分均有增强的红系造血刺激活性，其中 C 组分还具有较正常显著增高的红系及粒系造血刺激活性。通过对各活性组分的理化性质分析，我们发现 A、B 组分均不耐热，对酸碱均不稳定，C 组分加热后仍保留部分活性，说明其具有一定的耐热性，同时 C 组分经 pH 9.0 的碱性溶液处理后，也具有部分造血刺激活性，而经酸处理后活性消失，说明 C 组分不耐酸但对碱有一定的稳定性。胰酶与 A、B、C 3 组分作用后，活性均消失，进一步说明 A、B、C 均为蛋白质，但是这些造血刺激活性组分的本质及其生物学特性还有待继续研究。深入探讨烧伤后机体造血调控的机制，将有助于我们加深对烧伤后造血调控的理解，并有助于指导临床合理应用造血刺激因子。

参考文献：

[1] Deitch E A, Sittig K M. A serial study of the erythropoietic response to thermal injury[J]. Ann Surg, 1993, 217(3): 293－299.

[2] Christensen R P, Leckman S, Saffie J R, *et al*. Hematopoietic progenitor cells in an infant who developed pancytopenia following an extensive burn [J]. Burns Incl Therm Inj, 1988, 14(2): 101－106.

[3] 罗成基，郑景熙，冉新泽，等. 放射损伤复合烧伤对大鼠粒系造血的影响[J]. 第三军医大学学报，1983，5(2)：119－122.

[4] 罗成基，郑景熙，冉新泽，等. 放烧复合烧伤对大鼠红系造血的影响[J]. 第三军医大学学报，1982，4(2)：50－55.

[5] 郭朝华，罗成基，孔佩艳，等. 小鼠 15% Ⅲ度烧伤时骨髓基质细胞对粒单系祖细胞生长的影响[J]. 中华创伤杂志，1999，15(3)：187－189.

[6] Gibran N S, Heimbach D M. Mediators in thermal injury[J]. Semin Nephrol, 1993, 13(4): 344－358.

[7] Struzyna J, Pojda Z, Braun B, *et al*. Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF)in burned patients[J]. Burns, 1995. 21(6): 437－440.

[8] Huang W H, Hu Z X, Huang X Y, *et al*. Abnormalities of serum proteins following thermal injury[J]. Burns, 1989, 15(1): 11－14.

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

[10] 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.

[11] Wallner S F, Vantrin R, Katz Z, *et al*. The anemia of thermal injury: partial characterization of an erythroid inhibitory substance[J]. J Trauma, 1987, 27(6): 639－645.

[12] 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.

[13] 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.

（编辑　汪勤俭）

（上接 493 页）

栓形成伴血栓自溶；⑤溶栓治疗后血栓消失；⑥少数可能继发于药物或失血造成的低血压、氧需求增加及其他疾病造成冠脉内急性血栓形成；⑦冠状动脉开口异常、冠状动静脉瘘或心肌桥[2]。其中冠状动脉持久痉挛是最常见原因。本例为中年男性，发病前有不稳定性心绞痛发作，有高血压、高甘油三酯血症以及长期大量吸烟等多种心血管病危险因素，根据临床表现、典型的心电图改变及动态演变过程、心肌酶学的变化，急性下壁及广泛前壁心肌梗死的诊断成立。根据患者术后心绞痛发作表现为变异型心绞痛，此病例冠脉造影正常的原因首先考虑为冠状动脉痉挛；其次也可能为不稳定性的软斑块破裂，引起不完全性的管腔堵塞，继之血栓自溶或造影前尿激酶的使用，使血管再通。冠状动脉造影正常的急性心肌梗死患者，因存活心肌多、坏死心肌少，近期预后较好，但远期预后较差，其再发心绞痛或心肌梗死的情况较多，这主要是因为这类患者的冠脉容易痉挛、斑块易破裂以及血栓易形成。长期以来，选择性冠脉造影一直被认为是冠心病诊断的金标准，但冠状动脉造影正常者并不能完全排除冠脉病变的可能性，在临床工作中应引起高度重视，需结合临床，综合判断分析，以免漏诊。对于存在冠脉痉挛的病例，临床仍应按冠心病二级预防的措施，积极控制危险因素，以抑制动脉粥样硬化病变的形成或发展，还应特别强调使用钙拮抗剂以缓解冠脉痉挛。

关键词：急性心肌梗死；冠状动脉造影；冠状动脉痉挛
中图法分类号：R542.220.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Zimmerman F H, Cameron A, Fisher L D, *et al*. Myocardial infarction in young adult: Angiographic characterization, risk factors and prognosis(Coronary artery surgery study registry)[J]. J Am Coll Cardiol, 1995, 26: 654－661.

[2] 万琪林，程冠昌，洪　岩，等. 冠状动脉造影正常的急性心肌梗死患者的临床特征[J]. 中原医刊，2003，30(14)：14.

（编辑　刘洪娥）