文章编号:1000-5404(2014)03-0213-04

论著

Ghrelin对放烧复合伤大鼠的救治作用

刘 聪,李 宏,李 蓉,粟永萍 (400038 重庆,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,重庆市纳米医药工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 探索Ghrelin对放烧复合伤大鼠是否具有救治作用,并对其产生救治作用的可能机制做初步研究。**方法** 120只清洁级雄性SD大鼠按随机数字表法分为4组:正常组(Con)、单纯Ghrelin处理组(GHR,即对正常大鼠腹腔注射Ghrelin)、放烧复合伤组(CRBI,5 Gy全身均匀照射+15%全身体表面积皮肤Ⅲ度烧伤)、Ghrelin治疗组(CRBI+GHR),GHR每天1次,连续5 d腹腔注射,剂量3.37×10^{-2}mg/kg,每组30只。观察项目包括:①大鼠30 d存活率;②造血功能:7、14、21 d外周血象和第10天脾结节形成实验、脾脏指数、骨髓有核细胞计数;③最后1次给药后2、4、6 h血清中炎性介质TNF-α、IL-6,神经递质乙酰胆碱(ACH),肾上腺素(E)及皮质醇(Cor)的含量。**结果** Ghrelin可显著提高CRBI动物存活率(约25%);与CRBI组相比可显著提高第7天外周血中WBC计数($P<0.05$),第10天骨髓有核细胞计数亦明显高于CRBI组,但在脾结节及脾脏指数方面尚未观察到显著差异($P>0.05$);与CRBI组相比,还可使伤后第4天血清中TNF-α及IL-6含量降低($P<0.05$),乙酰胆碱总体含量降低($P<0.05$),肾上腺素及皮质醇水平下降($P<0.05$)。**结论** Ghrelin对放烧复合伤大鼠具有一定的救治作用,其作用的发挥可能与其减轻造血功能抑制,下调促炎介质水平并调节植物神经系统的兴奋性有关。

[关键词] 放烧复合伤;Ghrelin;救治作用
[中图法分类号] R644.05; R818.74; R977.1 [文献标志码] A

Therapeutic effects of ghrelin on combined radiation and burn injury in rats

Liu Cong, Li Hong, Li Rong, Su Yongping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of ghrelin on combined radiation and burn injury in rats and investigate the possible mechanism involved in its therapeutic effects. **Methods** A total of 120 male SD rats were randomly divided into 4 groups, control group (Con), ghrlein treatment group (GHR, receiving intraperitoneal injection of ghrelin), combined radiation and burn injury group (CRBI, receiving total body 5 Gy ^{60}Co irradiation and full-thickness burn injury on 15% TBSA), combined injury with ghrelin treatment group (CRBI+GHR). Ghrelin was given to the corresponding rats through intraperitoneal injection at a dose of 3.37×10^{-2}mg/kg for 5 consecutive days. Survival rate for 30 d, hematopoietic function, peripheral hemogram of the 7th, 14th, and 21st days, spleen nodes forming experiment, spleen index and bone marrow nucleated cell counts (BMNC) at the 10th day, serum levels of TNF-α, IL-6, acetylcholine (ACH), epinephrine (E) and cortisol (Cor) at the 2nd, 4th, and 6th hours after the final injection of ghrelin were measured. **Results** Ghrelin significantly improved the survival rate of combined radiation and burn injury rats (about 25% compared with CRBI group). As to the hematopoietic function, the WBC count at the 7th day and BMNC at the 10th day were significantly elevated ($P<0.05$). However, the spleen node counts and spleen index don't indicate a significant difference ($P>0.05$). Compared with CRBI group, ghrelin treatment significantly reduced the content of proinflammatory mediator TNF-α and IL-6, neurotransmitter Ach and E, and endocrine hormone Cor ($P<0.05$) in the serum at the 4th day after last ghrelin injection. **Conclusion** Ghrelin has therapeutic effect on combined radiation and burn injury rats, which might be due to its alleviating the inhibition of hematopoietic function, down-regulating the pro-inflammatory mediators and regulating the excitability of

[基金项目] "十二五"国家科技支撑计划项目(2013BAK03B05-02);军队"十二五"重大项目(AWS11C002-009)
[通信作者] 粟永萍,E-mail:mumian3385@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131016.1904.004.html(2013-10-16)

autonomic nervous system.

[**Key words**] combined radiation and burn injury; ghrelin; therapeutic effect

Supported by the "Twelfth Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2013BAK03B05-02) and the Major Project of "Twelfth Five-year Plan" of PLA (AWS11C002-009). Corresponding author: Su Yongping, E-mail: mumian3385@163.com

Ghrelin是一种仅由28个氨基酸构成的多肽类内分泌激素,主要由胃肠道分泌,由于可刺激生长激素释放,调节食欲并促进胃肠道蠕动,故又称"胃饥饿素"。自1999年被Kojima等[1]发现以来,Ghrelin的功能已得到了更多的阐释,尤其是在肥胖症、厌食症等疾病的治疗上扮演着重要的角色。此外,有学者[2]研究发现Ghrelin还对放射合并内毒素损伤动物具有一定的救治作用,并认为可能主要与其提高了迷走神经的兴奋性,抑制过度炎性反应有关。但对放烧复合伤是否也具有救治意义,目前尚不清楚。故本研究拟从该角度来初步探究Ghrelin能否用于放烧复合伤的治疗。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ghrelin购自成都凯捷生物技术有限公司,TNF-α、IL-6炎症因子ELISA检测试剂盒(大鼠)购自北京四正柏生物技术有限公司,肾上腺素(E)标准品购自美国Sigma公司,血清乙酰胆碱(ACH)含量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,皮质醇(Cor)放免检测试剂盒购自北京北方生物技术研究所,高氯酸、冰醋酸购自成都科龙化工试剂厂(均为分析纯),血常规稀释液由西南医院检验科惠赠。

1.2 实验动物分组和处理

清洁级健康雄性SD大鼠120只,体质量(220±20)g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。所有动物采用随机数字表法分组:正常对照组(Con)、单纯Ghrelin处理组(GHR,即对正常大鼠腹腔注射Ghrelin)、放烧复合伤组(combined radiation and burn injury, CRBI)和Ghrelin治疗组(CRBI+GHR),每组30只。大鼠禁食12 h后采用^{60}Co进行全身照射,受照剂量为5 Gy,照后1 h内行15% TBSA Ⅲ度烧伤(主要用5 kW溴钨灯光辐射致伤,动物背部皮肤距离光源约70 cm,致伤时间为28 s,烧伤严重程度由相应的病理切片证实)。伤后立即腹腔注射40 mL/kg生理盐水以防休克。Ghrelin溶解后采用腹腔注射,剂量为3.37×10^{-2} mg/kg,连续5 d;正常组及复合伤组给予相同剂量的生理盐水。伤后动物单独饲养,常规饮食、水,室内温度控制在(25±1)℃。

1.3 存活率及血象观察

各组30只,观察30 d大鼠一般状况和死亡率;分别于伤后第7、14、21天取尾静脉血并于西南医院检验科行血常规检测,各时间点每组取8~10只动物。

1.4 脾结节形成实验(clone formation units-spleen, CFU-S)及其相关指标

Con组和GHR组各7只,另2组各13只。结合Zhang等[3]的方法拟对大鼠伤后第10天内源性脾结节形成情况进行观察,同时计算脾脏指数(即脾脏质量与大鼠体质量比值,mg/g);骨髓有核细胞(BMNC)计数:取右后肢股骨,用眼科剪小心剪去股骨两端,并用带有6号针头的注射针吸取3%冰醋酸,小心冲洗骨髓腔,直至冲洗液变清亮,累计冲洗体积10 mL。充分吹打冲洗液尽量使无核细胞破裂而有核细胞分散均匀,适当稀释后于倒置显微镜下计数。对于各项指标,每组均取6只动物。

1.5 大鼠伤后第4天血清中的各项指标检测

各组20只,分别于伤后第4天给药后2、4、6 h取股静脉血(各时相点每组取5只动物),3 000 r/min×10 min常温离心,小心分离血清并迅速分装于-80 ℃冻存。①TNF-α、IL-6的检测:严格按照ELISA试剂盒操作说明进行;②肾上腺素含量检测:送至本校中心实验室,以0.4 mol/L $HClO_4$等比例混合血清,4 ℃、12 000 r/min×12 min离心,取上清过滤后利用高效液相色谱仪进行分析;③乙酰胆碱含量检测:严格按照试剂盒操作说明进行;④皮质醇含量检测:采用放免法,标本送至西南医院核医学科,由专人进行检测。

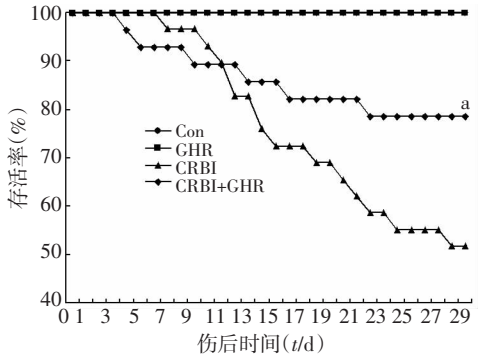
1.6 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件,存活率比较行χ^2检验;其余计数资料均以$\bar{x}\pm s$表示,各组间比较行t检验。

2 结果

2.1 大鼠30 d存活率及外周血象观察

2.1.1 存活率 Con组、GHR组动物无死亡,存活率100%。CRBI组存活率51.72%,CRBI+GHR组存活率78.57%,两者比较差异具有统计学意义($P<0.05$,图1)。



a: $P<0.05$,与CRBI组比较

图1 各组大鼠30 d存活率情况

2.1.2 外周血象 主要观察WBC,发现CRBI+GHR组伤后第7天外周血WBC计数明显高于CRBI组($P<0.01$,图2)。

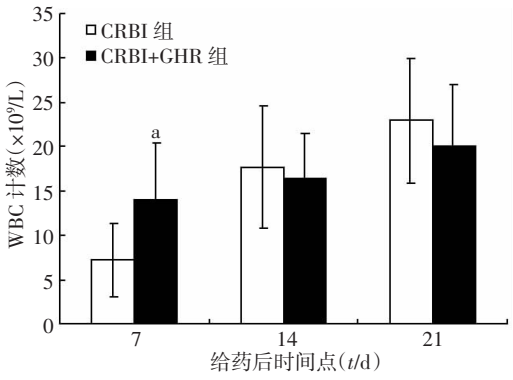
2.2 各组大鼠伤后第10天造血功能观察

2.2.1 内源性CFU-S 各组均未观察到明显的脾结节形成,各组间比较无统计学差异($P>0.05$)。见表1。

2.2.2 脾脏指数 CRBI组和CRBI+GHR组脾脏指数与另2组相比明显降低,但相互比较并无统计学差异($P>0.05$)。见表1。

2.2.3 BMNC计数 CRBI+GHR组BMNC明显高于CRBI

组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。



a: $P<0.01$,与 CRBI 组比较

图 2　CRBI 组、GHR 组伤后第 7、14、21 天外周血 WBC 计数

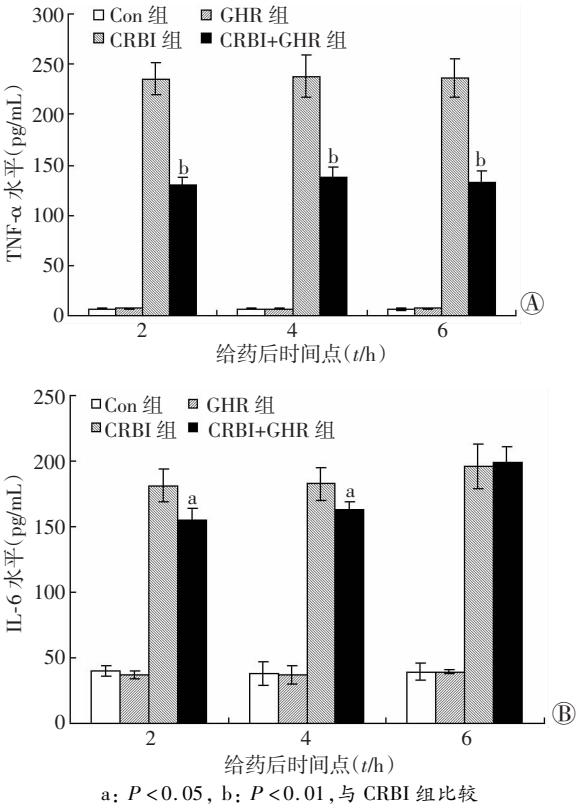
表 1　各组大鼠伤后第 10 天造血指标测定结果($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	脾结节(个)	脾脏指数(mg/g)	BMNC(10^7/股骨)
Con 组	0	2.61 ±0.42	7.91 ±2.03
GHR 组	0	2.74 ±0.29	8.26 ±2.15
CRBI 组	0.33 ±0.82	1.85 ±0.71	3.08 ±1.04
CRBI + GHR 组	0.67 ±0.82	2.12 ±0.36	7.46 ±2.33[a]

a:$P<0.01$,与 CRBI 组比较

2.3　各组大鼠血清 TNF-α、IL-6 水平

伤后第 4 天给药后第 2、4、6 小时,CRBI 组及 CRBI + GHR 组动物血清中 TNF-α、IL-6 含量均显著增高。但 CRBI + GHR 组与 CRBI 组比较,GHR 可分别降低给药后第 2、4、6 小时血清中的 TNF-α 水平($P<0.01$)和第 2、4 小时血清中的 IL-6 水平($P<0.05$)。见图 3。

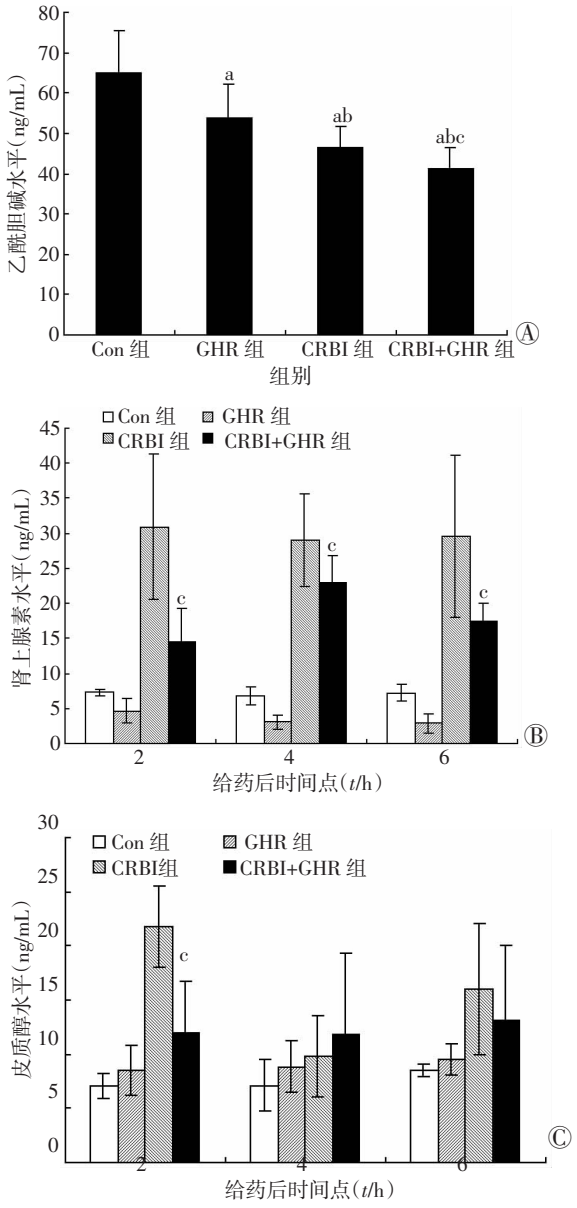


a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 CRBI 组比较

图 3　各组大鼠给药后各时相点 TNF-α(A)、IL-6(B)的变化

2.4　乙酰胆碱、肾上腺素及皮质醇含量测定

各组大鼠乙酰胆碱总含量相互比较差异具有统计学意义($P<0.05$);而对于肾上腺素,各组之间在各时相点比较也均有差异,其中 CRBI + GHR 组血清中的肾上腺素含量显著低于 CRBI 组($P<0.05$);此外,CRBI 组血清皮质醇含量显著升高,CRBI + GHR 组在给药后 2 h 其含量得到有效降低($P<0.05$),但在 4、6 h CRBI 组与 CRBI + GHR 组比较无统计学差异($P>0.05$)。这提示 GHR 对复合伤大鼠植物神经系统及 HPA 轴的兴奋性产生了一定影响。见图 4。



a:$P<0.05$,与 Con 组比较;b:$P<0.05$,与 GHR 组比较;c:$P<0.05$,与 CRBI 组比较

图 4　各组大鼠给药后乙酰胆碱(A)总含量及各时相点肾上腺素(B)及皮质醇(C)的变化

3　讨论

放烧复合伤经常发生于核战争或核事故中,由于

复合了辐照损伤和烧伤两种致伤因素,因此伤情复杂程度重于单伤而极易导致死亡[4]。其中早期急性应激反应、造血功能障碍和急性炎性反应是最主要的表现和致死因素,因此如何阻止这几个方面的发生、发展而提高存活率就显得尤为关键[5]。

重度放烧复合伤所致的造血功能障碍常常表现为全血细胞的减少,尤其是对射线比较敏感的白细胞,白细胞如中性粒细胞、淋巴细胞的减少会导致正常的抗炎体系失衡,使机体对感染的易感性增加。通过我们的研究发现,Ghrelin可使重度放烧复合伤大鼠第7天外周白细胞数下降幅度减小,第10天骨髓有核细胞数也有明显增加(相对于CRBI组),说明Ghrelin可减轻由复合伤所致的造血功能抑制;射线照射可引起骨髓内大部分造血干细胞凋亡,脾脏则成为主要的造血器官。然而我们的研究发现Ghrelin并未能使CFU-S和脾脏指数增加,提示Ghrelin对血象的保护作用极有可能是通过与骨髓内的造血干细胞相互作用而实现的(如通过与某些干细胞上的Ghrelin受体GHS-R1相结合从而促进细胞的增殖与分化或抑制凋亡等),其具体机制仍待研究。而这可能是Ghrelin对放烧复合伤动物具有救治作用的新机制。

急性炎性反应时血循环中促炎介质TNF-α、IL-6及IL-1β显著升高。对于放烧复合伤,Ghrelin降低血清炎症介质水平,减轻炎症反应程度可能与以下机制有关:①对细胞的作用。Ghrelin作用的发挥依赖与其受体(主要是GHS-R1a)的特异性结合,而该受体分布广泛,除常见于下丘脑及垂体外,在其他组织细胞内也有分布,如胸腺细胞、巨噬细胞和T细胞等。Ghrelin与其受体结合后可抑制活化的巨噬细胞和T细胞分泌促炎介质,而其机制可能与抑制核因子(NF-κB)的活化有关[6]。因此Ghrelin对炎症和免疫系统均有正向的调节作用[7]。②对植物神经系统的影响。首先,放烧复合伤早期常伴有交感神经的过度活化和迷走神经兴奋性的降低。交感神经的过度激活主要表现为肾上腺髓质大量分泌儿茶酚胺,最主要的是肾上腺素。过多的肾上腺素可使血液淤滞,组织器官缺血而加重炎症或休克。本研究中,Ghrelin降低了血清中的肾上腺素水平,说明其可抑制交感神经活性;另外,乙酰胆碱有抑制炎性细胞分泌促炎介质的作用[8]。本研究中,CRBI + GHR组血清中乙酰胆碱含量降低,提示Ghrelin可能并不能提高迷走神经兴奋性,但也不排除Ghrelin可促进乙酰胆碱向组织内转移的可能。因此Ghrelin通过对交感神经和迷走神经兴奋性产生的不同影响发挥了抗炎作用,与Cheyuo等[9]的结论相印证。③对HPA轴的影响。过度应激的另一个表现是HPA轴的过度激活,导致糖皮质激素(GC)如皮质醇(酮)的过度增加。正常情况下,一定量的GC可发挥强大的抗炎作用,而当GC过多时则会抑制免疫,丧失抗炎功能。原因之一是GC的过度分泌会使糖皮质激素受体(GR)表达下调,从而导致GC-GR复合物对NF-κB的正常抑制功能减弱,后者核转位增加,导致促炎介质分泌增加[10]。通过本研究发现Ghrelin对皮质醇有一定的降低作用,说明Ghrelin也可通过抑制HPA轴来间接发挥抗炎作用。

综上所述,Ghrelin可能通过减轻放烧复合伤大鼠早期的造血功能抑制,并影响植物神经系统的兴奋性,抑制炎性反应,最终提高了放烧复合伤动物的存活率。当然,由于Ghrelin靶组织(细胞)众多,如果能使其按需集中结合到期望靶组织(细胞),其作用将会更加特异,因此纳米技术有望得到使用。另外Ghrelin方便易得,给药安全,在临床上的研究也日渐增多[11],为放烧复合伤的治疗提供了新的方向。

参考文献:

[1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al*. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660.

[2] Jacob A, Shah K G, Wu R, *et al*. Ghrelin as a novel therapy for radiation combined injury[J]. Mol Med, 2010, 16(3/4): 137-143.

[3] Zhang C, Lin J, Cui J G, *et al*. Radioprotection of bone marrow hematopoiesis by CpG-oligodeoxynucleotides administered to mice after total-body irradiation[J]. J Radiat Res, 2011, 52(6): 828-833.

[4] 罗成基, 粟永萍. 复合伤[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006: 1-10.

[5] Zou Z, Sun H, Su Y, *et al*. Progress in research on radiation combined injury in China[J]. Radiat Res, 2008, 169(6): 722-729.

[6] Dixit V D, Schaffer E M, Pyle R S, *et al*. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells[J]. J Clin Invest, 2004, 114(1): 57-66.

[7] Baatar D, Patel K, Taub D D. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 340(1): 44-58.

[8] Rosas-Ballina M, Tracey K J. Cholinergic control of inflammation[J]. J Intern Med, 2009, 265(6): 663-679.

[9] Cheyuo C, Jacob A, Wang P. Ghrelin-mediated sympathoinhibition and suppression of inflammation in sepsis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(3): E265-E272.

[10] Webster J C, Oakley R H, Jewell C M, *et al*. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(12): 6865-6870.

[11] Garin M C, Burns C M, Kaul S, *et al*. Clinical review: The human experience with ghrelin administration[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(5): 1826-1837.

(**收稿**:2013-07-09;**修回**:2013-09-09)

(编辑 吴培红)