DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.008
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1631-04

论著

大鼠烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡及其相关调控因子变化的研究

赵 云,王凤君,王 裴,汪仕良 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡情况及相关调控因子变化的关系。方法 Wistar大鼠按随机数字表法分为烧伤组与正常对照组。动物于伤后6、12 h、1、3、5 d处死,流式细胞仪检测肠粘膜上皮细胞凋亡数,TUNEL法检测细胞凋亡形态学变化,RT-PCR法检测肠粘膜 *bcl*-2 mRNA表达的变化,荧光法检测肠上皮细胞caspase-3酶活性。结果 烧伤后6 h至5 d肠上皮凋亡细胞数较正常组明显增加;TUNNEL检测显示:烧伤后6 h阳性细胞数较正常组即有增加,伤后1 d表达最强,以后稍有减弱,但仍强于伤前;肠粘膜 *bcl*-2 mRNA表达在伤后12 h开始低于正常,至伤后5 d仍低于正常,烧伤后大鼠肠上皮细胞caspase-3的活性在伤后1 d明显升高,伤后3 d到峰值,然后迅速下降至正常范围内。caspase-3活性变化与细胞凋亡数呈显著的正相关($r=0.56$, $P<0.05$);烧伤后 *bcl*-2 mRNA的表达与细胞凋亡数呈显著负相关($r=-0.72$, $P<0.05$)。结论 烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡增加,尤以伤后1、3 d最为明显,caspase-3,bcl-2参与了烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡的调控。

关键词:烧伤;肠上皮细胞;细胞凋亡;天冬氨酸半胱氨酸酶-3;*bcl*-2
中图法分类号:R322.45;R329.28;R644.02 文献标识码:A

Apoptosis of intestinal epithelial cells and changes of the related regulatory factors in severely burned rats

ZHAO Yun, WANG Feng-jun, WANG Pei, WANG Shi-liang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the apoptosis of intestinal epithelial cells and changes of the related regulatory factors in severely burned rats. Methods Wistar rats, randomly divided into burn group and normal control group, were sacrificed at 0, 6, and 12 h, and 1, 3, and 5 d after burn. The apoptosis of intestinal epithelial cells, morphological changes of apoptotic cells, changes of *bcl*-2 mRNA expression, and activity of caspase-3 were detected by flow cytometry, TUNEL, RT-PCR, and fluorescence method, respectively. Results Significantly increased apoptotic intestinal epithelial cells were found in severely burned rats. TUNEL test revealed that expression of positive cells increased at 6 h after burn, and the strongest expression was found at 1 d after burn, and decreased thereafter, but was till stronger than that before burn. *Bcl*-2 mRNA expression in intestinal epithelial cells was lower at 12 h after burn than the normal level and remained lower at 5 d after burn. The activity of caspase-3 significantly increased at 1 d after burn, reached the peak at 3 d after burn, and then dropped to the normal range in the burn group. The changes of the activity of caspase-3 were positively correlated with apoptotic cells ($r=0.56$, $P<0.05$), but postburn *bcl*-2 mRNA was negatively correlated with apoptotic cells ($r=-0.72$, $P<0.05$). Conclusion The apoptosis rate of intestinal epithelial cells increases after severe burn, particularly at 1 and 3 d after burn. caspase-3 and bcl-2 are involved in the regulation of apoptosis after severe burn.

Key words: burn; intestinal epithelial cell; apoptosis; caspase-3; *bcl*-2

严重烧伤后肠道是最先受累和损伤较重的内脏器官,近年的研究表明它还是烧伤后高代谢、失控性炎症反应、多器官功能障碍综合征的始动器官之一[1]。以往认为严重烧伤后肠上皮细胞坏死是造成肠粘膜结构破坏,屏障功能受损的细胞学基础,但最近的研究表明,细胞凋亡在维持肠粘膜上皮细胞稳态中起着重要的作用[2],而目前对于细胞凋亡在烧伤后肠道损伤中的作用及调控研究甚少。本研究旨在通过观察大鼠烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡情况及凋亡相关因子caspases-3及bcl-2 mRNA表达的变化,探讨伤后肠粘膜上皮细胞凋亡的可能机制。

作者简介:赵 云(1972—),男,天津市人,博士研究生,技师,主要从事烧伤后肠道损伤及修复方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754670

收稿日期:2003-05-07;修回日期:2004-03-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

1.1.1 健康Wistar大鼠30只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量(200±20) g;按文献[3]方法致背部30% TBSAⅢ度烧伤。动物按随机数字表法随机分为烧伤组(25只)和正常组(5只)。烧伤组动物分别于伤后6、12 h,1、3、5 d处死,每个时相点5只。

1.1.2 肠粘膜上皮细胞的提取 参照文献[4]方法加以改进。取大鼠小肠段约8 cm,用D-Hanks液冲洗后剖开,用滤纸轻轻吸去粘液及杂质。将肠段剪成小块,放入10 mmol/L的二硫苏糖醇(DTT) 30 min。将DTT倒掉,加入含1 mmol/L EDTA的D-Hanks液,4 ℃静置1 h。振荡数下,用滤网粗滤,收集滤液,再用180目滤膜过滤,弃滤液,用5 ml DMEM培养液反冲180目滤膜,由于肠上皮细胞大于180目,将留置于滤膜上,收集反冲液。4 ℃,500 r/min离心10 min。弃上清,加入1 ml胰酶,37 ℃,水浴5 min。加入1 ml DMEM培养液。4 ℃,500 r/min离心10 min,弃上清,视情况加入1或2 ml DMEM培养液,镜下细胞记数。取10^6个细胞进行流式细胞检测。

1.2 检测指标

1.2.1 流式细胞仪细胞凋亡数 Anneix V-Flous试剂盒购自Boehringer Mannheim公司,取106个肠上皮细胞,PBS冲洗两次,1 000 r/min离心5 min沉淀后,加入100 μl Anneix V-Flous标记液,室温孵育15 min,上流式细胞仪记数10 000个细胞,检测凋亡细胞数。

1.2.2 凋亡细胞原位缺口末端标记法(TUNEL)检测 试剂盒购自Boehringer Mannheim公司,取10%甲醛固定空肠组织,常规石蜡包埋、切片。标本用二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,蛋白酶K(20 μg/ml,用10 mmol/L,pH 7.4的Tris/HCl配制)37 ℃孵育30 min,PBS冲洗2次,0.3% H_2O_2甲醇室温封闭30 min,Triton×100冰上孵育2 min,PBS洗片后加入TUNEL反应液50 μl/张切片,37 ℃避光孵育1 h,PBS洗片3次,加入POD 50 μl,7 ℃孵育30 min,PBS洗片,二氨基联苯胺(DAB)-H_2O_2显色10 min,直接用光学显微镜观察并照相,阳性细胞呈棕黄色。以正常组及0.01 mol/L的PBS作为正常及阴性对照,阴性对照无棕黄色颗粒。

1.2.3 RT-PCR检测肠粘膜*bcl*-2的表达 根据引物设计原则,在Gen Bank中找到大鼠*bcl*-2基因全长序列,采用http://www.genome.wi.mit.edu提供的软件进行引物设计。由上海生工公司合成,序列为:上游:5′-CCTGTGCCACCATGTGTCCAT-3′下游:5′-GCTGAGAACAGGGTCTTCAGAGAC-3′,片段长度为430 bp。采用一步法提取肠粘膜总RNA,试剂盒购自华舜公司,所用器材均经0.1%DEPC水做无RNA酶处理,操作过程均在超净工作台中完成。

RT-PCR采用Promega公司提供的一步法扩增试剂盒,扩增条件为:48 ℃逆转录45 min,95 ℃变性2 min,PCR循环94 ℃变性30 s,50 ℃退火1 min,68 ℃延伸1 min,共40个循环,68 ℃7 min后4 ℃保存,用于电泳检测。结果以灰度值表示,以正常组为对照。

1.2.4 肠上皮细胞caspases-3酶活性检测 1×10^6个肠上皮细胞1 000 r/min离心10 min,弃上清,加入50 μl细胞裂解液,冰浴10 min,15 000 r/min,4 ℃离心3 min,取上清加入50 μl反应缓冲液,5 μl 1 mmol/L的酶作用底物DEVD-AFC,37 ℃水浴1 h,荧光分光光度计激发波长400 nm,发射波长505 nm测定caspases-3,以荧光强度(*F*)表示。

1.3 统计学方法

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,行单因素方差分析,计数资料采用χ^2检验。

2 结果

2.1 肠粘膜上皮细胞凋亡的变化

烧伤后6 h肠上皮凋亡细胞数较正常组就有明显升高,伤后1 d达到高峰,以后逐渐下降,但各时相点与正常组相比均显著升高($P<0.01$),见表1。

2.2 肠上皮细胞凋亡形态学的变化

利用TUNNEL技术对肠粘膜上皮细胞凋亡进行检测,结果显示:正常组肠粘膜凋亡细胞阳性率较低,主要集中于绒毛顶端,烧伤后6 h阳性细胞数即有增加,伤后1 d表达最强,且隐窝至绒毛顶端部位皆有凋亡阳性细胞分布。伤后3 d稍有减弱,但仍强于伤前(图1)。



A: Fewer apoptoic cells in normal intestinal mucosal cells; B: Apoptoic cells with strong expression in intestinal mucosal cells of 1 d after burn

图1 肠粘膜上皮细胞 (TUNNEL×200)

Fig 1 Intestinal epithelial cells (TUNNEL,×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　烧伤后大鼠肠粘膜上皮凋亡细胞数的变化(个/ 10^5 细胞, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of apoptotic intestinal epithelial cells after burn (Number/10^5 cells, $\bar{x}\pm s$)

Group		Time after burned				
		6 h	12 h	1 d	3 d	5 d
Normal	367±15	—	—	—	—	—
Burned	—	1 280±76 ##	1 610±110 ##	2 344±163 ##	1 994±151 ##	1 230±98 ##

##: $P<0.01$, *vs* normal

2.3　凋亡调控因子 *bcl*-2 mRNA 表达的变化

烧伤后大鼠肠粘膜 *bcl*-2 mRNA 表达在伤后 6 h 即有升高, 但在伤后 12 h 开始低于正常, 伤后 1 d 最低, 只有伤前的 35%, 至伤后 5 d 仍低于正常(图 2)。

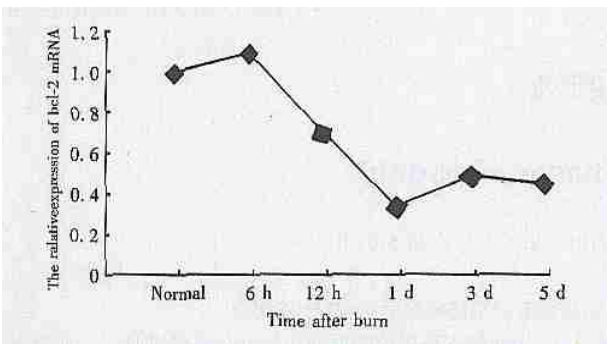


图 2　烧伤后大鼠肠粘膜 ***bcl*-2 mRNA** 相对表达量的变化

Fig 2　Changes of the relative expression of *bcl*-2 mRNA in rat intestinal mucosa after burn

2.4　烧伤后肠上皮细胞 caspase-3 活性的变化

烧伤后大鼠肠上皮细胞 caspase-3 的活性在伤后 1 d 明显升高, 伤后 3 d 到峰值, 然后迅速下降至正常范围内(表 2)。

表 2　烧伤后大鼠肠上皮细胞 **caspase-3** 酶活性的改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of activity of caspase-3 in intestinal epithelial cells after burn ($\bar{x}\pm s$)

Group		Time after burn				
		6 h	12 h	1 d	3 d	5 d
Normal	293.08±39.54	—	—	—	—	—
Burned	—	313.9±18.58	296.76±25.19	460.52±123.29 #	1152.85±224.59 ##	279.31±29.79

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

2.5　对有关数据进行相关分析

结果显示: 伤后 1~5 d, caspase-3 活性变化与细胞凋亡数呈显著的正相关($r=0.56$, $P<0.05$); 烧伤后 *bcl*-2 mRNA 的表达与细胞凋亡数呈显著负相关($r=-0.72$, $P<0.05$)。

3　讨论

烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡的情况: 探讨烧伤后肠粘膜损伤机制对于全身的综合治疗是一个重要的课题。以往的研究表明烧伤后肠道损伤主要有两方面的原因: 一是严重缺血缺氧造成肠粘膜的直接损伤, 二是伤后肠道细菌移位、炎症介质释放、细胞因子级联放大效应等造成的继发性损伤。其最终结果是肠粘膜上皮细胞稳态破坏即生长与丢失的动态平衡被打破, 细胞丢失、萎缩, 粘膜屏障受损, 功能障碍, 如未得到纠正, 则进入恶性循环。最近的研究表明, 细胞凋亡在维持肠粘膜上皮细胞稳态中起着重要的作用[5]。

正常肠粘膜是人体内更新最快的组织之一, 具有增殖能力的肠上皮干细胞从隐窝基底部沿隐窝-绒毛轴向绒毛顶端移行, 并逐渐分化成熟, 最终在绒毛顶端呈现出一系列凋亡特征, 脱落入肠腔[6]。以往对细胞凋亡的研究主要集中于肿瘤病因学与体外实验上。而对烧伤后肠道细胞凋亡涉及不多, 但近年来, 一些学者已逐渐发现在严重缺血缺氧、烧伤等病理条件下, 肠道粘膜存在细胞凋亡[5,7]。烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡是多基因调控的结果, 从本研究结果可看出, 烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡增加, 尤以伤后 1、3 d 最为明显, 烧伤后肠上皮细胞 caspase-3 活性增加, 且变化与细胞凋亡数呈显著的正相关($r=0.56$, $P<0.05$); 烧伤后 *bcl*-2 mRNA 的表达减少且与细胞凋亡数呈显著负相关($r=-0.72$, $P<0.05$), 说明 caspase-3、*bcl*-2 参与了烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡的调控。以往我们的研究证实, 烧伤后 6~24 h, 肠道血流量、氧摄取率、细胞能荷下降最为显著, 这种时间顺序说明烧伤后严重的缺血缺氧可能是引起细胞凋亡的外界刺激信号, 严重缺氧的后果之一是可引起细胞线粒体损伤, 而线粒体肿胀、内膜通透性改变可使细胞色素 C 和凋亡诱导因子(apoptosis induce factor, AIF)释放, 细胞色素 C 可激活 caspases, 进入凋亡级联反应, 而 AIF 可直接快速诱导凋亡[8,9]。另外, 烧伤后氧自由基、炎症介质的大量产生, 可通过以下途径诱导凋亡: ①直接损伤 DNA 引起凋亡; ②与细胞膜上的死亡因子 Fas/TNFR 上的死亡域相结合, 改变其构相, 从而激活天冬氨酸半胱氨酸酶(caspases)级联反应, 诱导凋亡; ③可通过调节凋亡相关基因如 *p*53、*bcl*-2 等诱导凋亡[10,11]。但其机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Willmore D W, Smith R J, O' Dwyer S T, *et al*. The gut: a central organ after surgical stress[J]. Surgery, 1988, 104(5): 917-923.

[2] Zhang C, Sheng Z Y, Hu S, *et al*. The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats[J]. Burns, 2002, 28(8): 731-737.

[3] 黎　鳌, 杨宗城, 肖光夏, 等. 实验烧伤外科学[M]. 重庆: 重庆大

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

学出版社, 1997. 204－206.
[4] Grossmann J, Maxson J M, Whitacre C M, *et al*. New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells[J]. Am J Pathol, 1998, 153(1): 53－62.
[5] Grossmann J, Walther K, Artinger M, *et al*. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(6): 1421－1428.
[6] Potten C S, Booth C, Pritchard D M. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor[J]. Int J Exp Pathol, 1997, 78(4): 219－243.
[7] Shah K A, Shndra S, Green C J. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. Transplantation, 1997, 64(10): 1393－1397.
[8] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, *et al*. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis[J]. FEBS Lett, 2000, 476(1): 118－123.
[9] Oopersmith C M, O' Donnell D, Gordon J I. Bcl-2 inhibits ischemia-reperfusion-induced apoptosis in the intestinal epithelium of transgenic mice [J]. Am J Physiol, 1999, 276(3 Pt 1): G677－686.
[10] Schmitz H, Fromm M, Bentzel C J, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6[J]. J Cell Sci, 1999, 112(1): 137－146.
[11] Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, *et al*. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis[J]. J Exp Med, 1998, 16(4): 587－600.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)18-1634-01

应用分段式腮腺切除术治疗腮腺良性肿瘤的疗效

Segmental parotidectomy for treating benign tumor of parotid

廖 伟, 金 君, 高 军, 杨 磊 （中国人民解放军海军第 421 医院口腔科, 广州 510318）

由于多数涎腺肿瘤, 即使是良性肿瘤其包膜都不完整, 采用单纯沿包膜剥离方法常有复发, 故手术原则应从包膜外正常组织中同时切除部分或整个腺体[1]。我科遵循这一基本原则, 自 1996－2002 年采用分段式腮腺切除术治疗腮腺良性肿瘤取得了满意的临床治疗效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1996 年 1 月至 2002 年 5 月, 我科手术治疗腮腺良性肿瘤 94 例, 均经病理检查证实。全部病例均在神经安定＋局麻下完成手术。其中采用保留面神经(面神经主干寻找法)传统腮浅叶切除术 51 例, 采用分段式腮腺切除术 43 例。43 例新术式组中, 男性 19 例, 女性 24 例, 年龄 17～65 岁, 平均年龄 43.7 岁; 腺淋巴瘤 24 例, 多形性腺瘤 16 例, 嗜酸性腺瘤 1 例, 基底细胞腺瘤 2 例; 肿瘤位于耳垂下颌后凹内 22 例, 位于腮腺导管体表投影水平以下下颌骨升支后缘前 19 例, 位于耳屏前上区域 2 例; 肿瘤最大直径 3.2 cm, 最小直径 1.2 cm。

1.2 手术方法

采用分段式腮腺切除术。

1.2.1 切口设计的改进 由耳屏游离缘内侧面向下至耳垂下, 在乳突尖前方经下颌支后缘后方至下颌角下 1.5 cm 转向前平行于下颌骨下缘往前约 3 cm。根据肿瘤位置的高低可向上延长耳屏游离缘切口。

1.2.2 皮瓣制备 沿切口切开皮肤、皮下组织, 于腮腺咬肌筋膜的浅面将皮瓣往前翻起, 然后再在腮腺组织浅面锐性分离翻起腮腺咬肌筋膜至腮腺腺组织前缘。

1.2.3 腮腺切除段定位与面神经解剖分支的选择 根据肿瘤的位置设计腮腺切除段及选择面神经分支, 面神经分支的走行大致可将腮腺表面分为 3 段。如肿瘤位于耳垂下颌后凹内, 则腮腺切除段称为第 1 段, 仅需解剖面神经下颌缘支, 由外围向主干方向锐钝性分离相结合, 向外下方掀起腮腺浅叶部分与肿瘤一并切除; 如肿瘤腮腺瘤导管水平以下下颌骨下缘水平以上, 则腮腺切除段称为第 2 段, 仅需解剖面神经上颊支及面神经下颌缘支, 亦是由外围向主干边解剖边掀起腮腺浅叶部分至离肿瘤有足够安全边界 0.5～1.0 cm 即将之一并切除; 如肿瘤位于耳屏前上区域则腮腺切除段称为第 3 段, 需解剖面神经颧支及颞支。对于少数肿瘤直径较大且侵犯部分腮腺深叶的可采用解剖面神经主干与外围支相向进行的双会师法切除部分浅叶段及深叶, 同样适合此法定位。

简易面神经外围支寻找法: 下颌缘支于下颌角上 1 cm 和下颌角前 1 cm 所成的三角区域内寻找, 颊支于腮腺主导管体表投影处寻找, 颧支于耳垂至眼角连线与腮腺前上缘交界处寻找, 颞支于耳屏前 1～1.5 cm 区域寻找。

保留腮腺主导管。

1.2.4 腮腺残端处理 腮腺段切除后暴露的残余腮腺组织面先予以"8"字缝扎, 缝扎时需注意切勿损及面神经各分支, 再缝合腮腺咬肌筋膜覆盖于腮腺组织面上。

1.2.5 引流物的放置和伤口的处理 创腔内置胶管行持续负压引流, 术后 48 h 拔除。伤口行加压包扎 5 d, 拆线后不需加压。

1.3 随访

91 例手术病例术后随访 0.5～5 年, 平均 3.1 年。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验。

作者简介: 廖 伟(1967－), 男, 重庆市人, 副主任医师, 主要从事颌面外科方面的研究, 发表论文 13 篇。电话: (020) 84220652

收稿日期: 2003-09-19; 修回日期: 2004-03-29

（下转 1638 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net