DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.010
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
1442 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)16-1442-04

两系创伤反应明显差异小鼠肺血管通透性及Scyb15基因基础表达量的比较研究

黄 文,朱佩芳,王正国,李晓炎,宁 心,杨志焕 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 通过对两系创伤反应明显差异小鼠伤前、伤后肺血管通透性的及生理状态下Scyb15基因的比较研究,初步探讨创伤反应差异的相关解剖结构基础,为创伤相关基因背景的研究提供实验和理论依据。方法 以对创伤反应有明显差异的两系近交系小鼠为研究对象,采用BST-Ⅰ型生物激波管致伤模型,利用荧光分光光度计测定肺组织在伤前伤后荧光素钠的含量,以此定量反映肺血管通透性的变化;采用荧光定量PCR技术,对Scyb15基因在生理状态下的表达进行定量。结果 两系小鼠间比较,在伤后1 h及伤后4 h,肺血管通透性有显著性差异($P<0.05$);同系小鼠伤前和伤后比较,BALB/c在伤后30 min,其血管通透性已显示出明显差异($P<0.05$),而C57BL/6在伤后1 h才显示出差异($P<0.05$);不管是伤前伤后,在同一时间点,BALB/c小鼠的血管通透性均有较C57BL/6增高的趋势;伤后4 h内,两系小鼠的血管通透性呈现持续升高;生理状态下,Scyb15基因在C57BL/6小鼠中的表达量较在BALB/c小鼠中的表达量低,且二者相比有显著性差异($P<0.05$)。结论 BALB/c小鼠和C57BL/6小鼠间Scyb15基因基础状态下及创伤后肺通透性变化的显著性不同可能是创伤反应差异的重要原因,这两系小鼠可能存在先天性(遗传性)肺血管结构上的差异,这也可能是创伤反应差异性的根本原因之一。

关键词:创伤反应差异;肺血管通透性;解剖结构基础;荧光定量PCR;Scyb15基因
中图法分类号:R331.32;R394.2;R641 文献标识码:A

Comparison of lung microvascular permeability and Scyb15 gene expression between BALB/c and C57BL/6 mice

HUANG-Wen, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-guo, LI Xiao-yan, NING Xin, YANG Zhi-huan (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the physiological structure base of heterogeneity of traumatic responses by means of comparison of lung microvascular permeability and expression of Scyb15 (small inducible cytokine B subfamily, member 15) in physiological state between BALB/c and C57BL/6 mice. Methods BALB/c (BG) and C57BL/6 (CG) mice were employed in this study. After the establishment of the animal injury model using BST-Ⅰ Bioshock Tube, the concentrations of fluorescein sodium (FINa) in the lungs in each group were measured with fluorospectrophotometer respectively before injury and at 0.5, 1, and 4 h after injury. The expression of Scyb15 in physiological state in each group was measured by quantitative fluorescent PCR. The results from the two groups were compared by using Student, *t*-test. Results At 1 and 4 h after injury, the level of FINa in BG was higher than that in CG. Compared with that in CG, the distinct change of the level of FINa in BG was earlier; the level of Scyb15 in BG was higher than that in CG. There was significant difference between BG and CG ($P<0.05$). Conclusion The difference in microvascular permeability and Scyb15 expression between BALB/c and C57BL/6 mice may possibly be the reason for heterogeneity of traumatic responses, which might be resulted from the difference in the physiological structure base of lung microvascular permeability in the two lines of mice.

Key words: heterogeneity of traumatic response; lung microvascular permeability; physiological structure base; quantitative fluorescent PCR; Scyb15

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203)
作者简介:黄 文(1972-),男,重庆市垫江县人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤反应差异的遗传机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68757464
通信作者:朱佩芳,电话:(023)68757864
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-11-29

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

人们很早就注意到个体对创伤的耐受和创伤后修复能力存在显著性差异[1,2], 但大多用营养状况、体质或精神状态的差异去解释, 其分子生物学机制尚不清楚。越来越多的证据表明个体遗传背景的差异可能是上述现象的重要原因之一。本研究室前期的研究工作已经观察到以下现象[3]: 创伤后肺是反应最早、最明显的器官之一, 而且随机解剖伤后 72 h 存活的小鼠, 肉眼可见 BALB/c 小鼠的肺损伤程度普遍较 C57BL/6 重, 且镜下观察病理切片进一步证明了 BALB/c 小鼠的肺损伤程度普遍较 C57BL/6 重, 基因芯片结果提示 Scyb15 基因在 C57BL/6 小鼠肺组织中表达上调, 在 BALB/c 小鼠肺组织中表达则相反。基于上述的研究背景和本室已有的研究提示和基础, 考虑到创伤后肺损伤及其继发的病理改变在各种疾病和创伤后病理改变中的基础作用, 而微血管通透性的改变是损伤后机体最早的病理改变之一, 我们推测: 可能存在与微血管通透性相关解剖结构基础(如: 血管的管径、顺应性、细胞间连接的多少和紧密程度的差异等)的差异, 与其它因素一起导致了创伤反应差异现象, 所以我们对两系创伤反应明显差异的小鼠在创伤前后的肺血管通透性进行了观察, 并选择了在肺中特异性表达 Scyb15 基因作为遗传背景研究的候选基因, 初步探讨创伤反应差异性中肺的遗传背景。

1　材料与方法

1.1　试验动物

8 ~ 9 周龄的 SPF 级近交系 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠各 25 只, 体质量均为(20.78±1.25) g, 由中国科学院上海实验动物中心提供。实验前, 动物在第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心无菌条件下饲养至少 4 d, 以适应环境。

1.2　实验分组

实验按动物品系不同分为 2 组: BALB/c 小鼠组(BG)和 C57BL/6 小鼠组(CG)。雌雄不限。分别于伤前、伤后 0.5、1、4 h 取样, 每时相点各取 5 只小鼠。

1.3　主要仪器和试剂

荧光分光光度计(F-2500 FL Spectrophotometer, 日本日立公司); 千分之一电子天平(上海天平厂); 示踪剂 0.5% 荧光素钠(FINa); 电动玻璃匀浆器(宁波新芝科器厂); 离心机(Beckman); Trizol. RNA 提取试剂盒(上海正谷生物技术公司); 荧光定量 PCR 仪(PE7000 型, 美国 ABI 公司)。

1.4　实验方法

1.4.1　两系小鼠通透性的比较[4]

1.4.1.1　伤前处理　　伤前 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠各 5 只, 经尾静脉注射 0.2 ml 0.5% 荧光素钠(FINa)示踪剂, 注射后 10 min, 采用心脏放血处死, 取肺组织约 0.2 g, 加 4 ml 解剖盐水匀浆。样本在室温避光静置 2 h, 4 000 r/min, 离心 20 min, 取上清在日立荧光分光光度计上测定荧光强度。激发光波长 437 nm, 发射光波长 518 nm, 狭缝 5 mm。以注射解剖盐水的小鼠脏器的解剖盐水匀浆上清为空白对照。依据 FINa 荧光强度标准曲线换算出对应 FINa 量, 并以单位组织重量含 FINa 量表示脏器血管通透性。

1.4.1.2　伤后处理　　BALB/c 和 C57BL/6 小鼠各 5 只, 于伤后 0.5、1、4 h 立即注射 0.2 ml 0.5% 荧光素钠(FINa)示踪剂, 注射后 10 min, 采用心脏放血处死, 取肺组织约 0.2 g, 加 4 ml 解剖盐水匀浆。操作条件及顺序同前。

1.4.1.3　致伤条件　　实验动物均不麻醉, 放入自制的 60 格实验动物笼中, 动物均处在同一垂直平面上。采用 BST-Ⅰ型生物激波管致伤, 高压段压力 5.88 MPa, 实验时用压力传感器测定受试动物所处垂直平面的激波管的超压峰值(5.88 MPa)和正压作用时间(58.94 ms)。

1.4.1.4　FINa-荧光强度标准曲线　　根据配制标准浓度的 FINa 溶液制定标准曲线。

1.4.2　两系小鼠 Scyb15 基因基础表达量的比较

1.4.2.1　总 RNA 抽提　　取小鼠肺约 100 mg, 共 10 例样品(BALB/c, C57/6 各 5 例), 在液氮中研磨成极细粉末后转移到一个经 DEPC 和 180 ℃高温处理的匀浆器中, 加入 1 ml 的 Trizol 溶液, 反复打匀。然后转移至 1.5 ml 的离心管中, 用移液器反复吹打直至无明显大颗粒, 加入等体积的氯仿, 剧烈震荡 1 min 后, 室温 11 000 r/min, 离心 5 min。将上清转移到一个新的 RNase-free 的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 室温放置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 去上清。70% 的 RNase-free 乙醇洗 2 次, 离心, 吸去残留的水分。加 20 μl 的 RNase-free 水溶解沉淀。

1.4.2.2　RNA 的转录加样体积　　模板 3 μl; Buffer 2 μl; 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl; 10 mmol/L dNTP 2 μl; 40 U/μl RNase Inhibtor 0.5 μl; 5 U/μl RNase Trascriptase 1 μl; 2.5 pmol/μl Oligo dT-Adaptor primer 1 μl; RNase-free H_2O 6.5 μl; 反应体系共 20 μl。反应条件: 72 ℃ 2 min 30 s; 42 ℃ 40 min; 95 ℃ 5 min; 4 ℃保存。

1.4.2.3　荧光定量加样体积　　模板 1 μl; Buffer 5 μl; 25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μl; 10 mmol/L dNTP 1 μl; 20 pmol/μl Primer F 0.8 μl; 20 pmol/μl Primer R 0.8 μl; 20 pmol/μl Probe 0.4 μl; 5 U/μl *Taq* 酶 0.5 μl; 加蒸馏水调整反应体系到 50 μl。反应条件: 94℃ 2 min; (94 ℃ 10 s, 53 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s)45 个循环; 72 ℃ 10 min。

1.4.2.4　实验所用的引物序列　　上游: 5′-ACGTCTGACGCTGAGTTGG-3′; 下游: 5′-CATCTCTGACAGGCTGTAAG-3′; 探针: 5′-FAM-AAGTCAGCTTGACAGGCAGTGATGC-TAMRA-3′; 小鼠 GAPDH-F: 5′-TGCACCACCAACTGCTTAG-3′; 小鼠 GAPDH-R: 5′-GGATGCAGGGATGATGTTC-3′; 小鼠 GAPDH-P: 5′-FAM-CAGAAGACTGTGGATGGCCCCTC-TAMRA-3′。扩增的目的片段长度为 221 bp, PCR 产物送上海申友公司测序, 到 NCBI 中 BLAST, 证明是所需目的片段。

1.5　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS8.0 统计软件, 行相关分析; 方差分析及同时相不同组比较; 独立样本 t 检验。

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

2 结果

2.1 两系小鼠肺血管通透性的比较

2.1.1 FINa-荧光强度标准曲线 据FINa含量与荧光强度，回归方程 Y=551.135X+3.2491（Y：荧光强度；X：FINa mg，F=8 785.786，P=0.000；r=0.999，t=91 266.6，P=0.000）（图1）

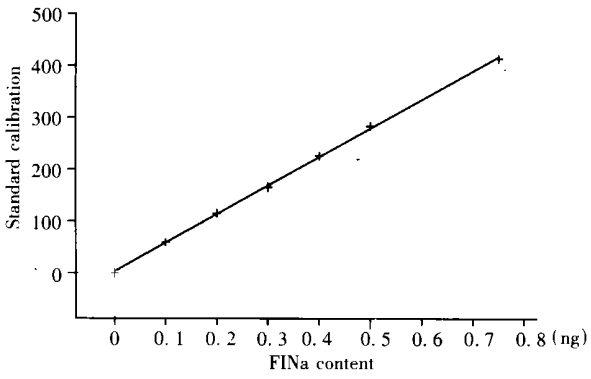


图1 荧光素钠-荧光强度的标准曲线

Fig 1 Standard curve for FINa content-fluorescence intensity

2.1.2 两系小鼠伤前、伤后肺通透性比较 根据回归方程，换算出单位组织中FINa含量（μg），以表示血管通透性大小结果如表1所示。两系小鼠间比较，在伤后1 h及伤后4 h，肺血管通透性有显著性差异（P<0.05）同系小鼠伤前和伤后比较BALB/c在伤后30 min，其血管通透性已显示出明显差异（P<0.05），而C57BL/6在伤后1 h才显示出差异（P<0.05）。同时，我们通过表中数据还可观察到，不管是伤前伤后，在同1时间点，伤前和伤后30 min，两者没有显著性差异，但BALB/c小鼠的血管通透性均有较C57BL/6高的趋势。此外，我们还可观察到伤后4 h内，两系小鼠的血管通透性是持续升高的，似乎还没达到高峰。

表1 伤前和伤后各时间点荧光素钠强度（n=5，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 FINa contents (μg) at different time points (n=5，$\bar{x}\pm s$)

Group	Time			
	Before injury	0.5 h after injury	1 h after injury	4 h after injury
CG FINa (μg)	0.800±0.504	1.658±0.682	2.742±1.205★	4.950±1.090★
BG FINa (μg)	1.026±0.251	1.846±0.361★	5.686±0.954★	11.974±5.782★

*：P<0.05，*vs* BG FINa；★：P<0.05，*vs* before injury

2.2 两系小鼠Scyb15基因基础表达量的比较

2.2.1 标准曲线的制定 标准曲线通过小鼠管家基因GAPDH的标准品（起始模板数为10^8、10^7、10^6、10^5和10^4，由上海申友公司提供）进行构建，结果见图2。

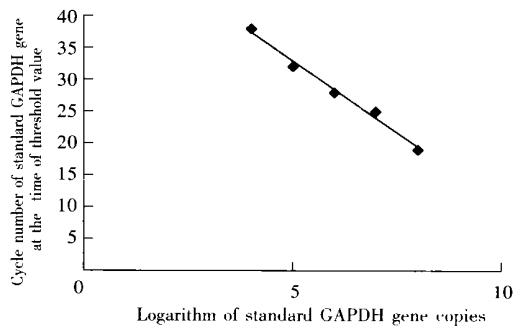


图2 标准品拷贝数的对数-标准品到达循环阈值的循环数的标准曲线

Fig 2 Standard curve of LogGC-Cycle number

2.2.2 荧光定量PCR结果 在生理状态下，Scyb15基因在C57BL/6小鼠中的表达量较在BALB/c小鼠中的表达量低且二者表达量有显著性差异（P=0.005）（表2）。

表2 荧光定量PCR检测两系小鼠Scyb15基础表达量结果（n=5，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Results of quantitative fluorescent PCR (n=5，$\bar{x}\pm s$)

Group	GAPDH		SCYB15		SCYB15/GAPDH	t	P
	CT	Copies	CT	Copies			
BG	29.024±1.646	493 362.380±345 203.905	28.836±1.137	484 599.980±268 622.314	1.163±0.424**	3.837	0.005
CG	26.628±3.181	4 207 156.480±6 244 036.264	28.448±2.454	97 823.386±1 089 432.324	0.394±0.145		

**：P<0.01，*vs* CT

3 讨论

研究已经表明，任何生命相关现象都是环境因素与机体相互作用的结果，而遗传因素在决定机体对环境因素的反应中起决定作用，因此，在认识上，有“表象（表型）”，就有“本质（基因）”的观点已越来越多的被人们所接受。正是基于上述的观点，我们对本研究室前期研究工作中观察到的现象的肺解剖结构基础及与Scyb15基因的关系进行了初步探讨，可望为创伤相关基因背景的研究提供实验和理论依据。

选择最佳的实验动物和实验模型是能否说明问题的关键。我们选择C57BL/6和BALB/c两系近交系小鼠为研究对象是基于如下考虑：小鼠是迄今为止发现与人类同源性最高的物种，而近交系小鼠可以保证同系中各个体遗传背景的高度一致，有利于遗传背景的研究，更重要的是，本实验室前期的研究和其它一些报道均提示C57BL/6和BALB/c两系小鼠对创伤的反应明显有差异[2,3]。此外，我们认为理想的实验模型应当满足以下条件：致伤因素单一（最好是物理因素）、动物不需麻醉、适合同时大批致伤、条件稳定易于控制、重复性好。以往大量的研究表明：由生物激波对动物造成的全身性冲击伤可以实现控制稳定的致伤压力。尤其是我所研制的BST-Ⅰ型生物激波管可以产生稳定的垂直平面波，只要在其盲端固定好动物的体位和位

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

置, 同一批次的动物伤情比较均一[5]。通过连续测定相同高压段压力情况下选定盲端位置的激波超压峰值和正压作用时间, 结果能保持在一个稳定的范围, 所以本研究选择了 BST-Ⅰ型生物激波管致伤的小鼠全身冲击伤模型。

国内外类似的研究已经表明[6~8], 创伤、感染等都可致肺部血管通透性不同程度的增高, 其原因在于创伤、感染的直接损伤以及继发于各种致伤因素的内源性炎症介质的作用, 这也是创伤后肺部水肿的病理解剖基础, 但类似于我们对两系小鼠在相同致伤条件下肺血管通透性的比较研究, 报道较少。本研究表明: 两系小鼠间比较, 在伤后 1 h 及伤后 4 h, 肺血管通透性有显著性差异($P<0.05$)同系小鼠伤前和伤后比较 BALB/c 在伤后 30 min, 其血管通透性已显示出明显差异($P<0.05$), 而 C57BL/6 在伤后 1 h 才显示出差异($P<0.05$)。同时, 我们通过表中数据还可观察到, 虽然伤前和伤后 30 min 比较, 二者没有显著性差异, 但不管是伤前或伤后, 在同一时间点, BALB/c 小鼠的血管通透性均有较 C57BL/6 增高的趋势。此外, 我们还可观察到伤后 4 h 内, 两系小鼠的血管通透性是持续升高的。似乎还没达到高峰。本研究结果给予如下一些提示: 创伤后, BALB/c 小鼠肺血管通透性的变化较 C57BL/6 小鼠出现早, 且变化程度较 C57BL/6 小鼠明显, 这种肺通透性变化的显著性不同可能是我们前期实验中观察到的现象的重要原因之一。此外, 虽然伤前和伤后 30 min 比较, 二者没有显著性差异, 但不管是伤前伤后, 在同一时间点, BALB/c 小鼠的血管通透性均有较 C57BL/6 高的趋势, 提示我们: 这两系小鼠可能存在先天性(遗传性)肺血管结构上的差异, 从而导致两系小鼠肺血管通透性在生理状态下和创伤后的差异, 这也可能是创伤反应差异性的根本原因之一。当然, 样本量较少和致伤因素不具普遍性限制了本研究结果的客观性, 但那也正是我们需要进一步改进和完善的地方。

由于创伤具有偶然性、多有明确的致伤因素、不可预测等特点, 人们很难将创伤与遗传联系起来, 目前也缺乏相关研究较为成熟的理论和方法。我们选择 Scyb15 基因作为切入点是基于如下的考虑: 该基因在炎症中发挥重要作用[9], 而无论是无菌炎症反应还是创伤后继发于感染的炎症反应在创伤中的重要作用毋庸置疑; 研究还表明该基因是一种新的新的造血调控因子[10], 从而提示该基因可能在血管的形成及血管内皮细胞的形成中发挥重要的作用, 这就与前面对肺的血管结构基础进行研究相联系; 我们前期的实验基础也支持该基因的确参与了创伤反应差异现象; 我们籍此可以对研究创伤反应差异现象的方法和理论进行探讨。本研究观察到: 在生理状态下, Scyb15 基因在 C57BL/6 小鼠中的表达量较在 BALB/c 小鼠中的表达量低且二者表达量有显著性差异, 这个现象可能给我们以下提示: 如果的确存在这种生理状态下的基因表达差异, 这可能反应了这两系小鼠之间存在的种系差异, 这种先天的差异可能导致在相同的致伤条件下, 创伤后的级联反应发展方向的差异, 从而导致创伤反应和转归的差异。当然, 创伤反应差异必然是多因素、多基因作用的结果, 目前的证据使我们有理由相信 Scyb15 的确参与了创伤后的病理生理过程, 这也给我们带来了一些思索, 如: Scyb15 是一个主效基因还是一个次效基因? Scyb15 是一个保护因素还是一个损伤因素? 造成 Scyb15 表达差异的原因是它本身结构的差异还是它的上游效应物的差异所致? 无疑 Scyb15 基因在创伤后的病理生理过程中的作用和地位还有待于进一步研究加以确定。

总之, 虽然组织形态水平的变化并不能一定代表分子水平的变化, 但这种变化至少给我们重要的提示: 基于肺血管结构差异(如: 血管的管径、顺应性、通透性、细胞间连接的多少和紧密程度的差异等)的肺损伤后转归的差异可能在创伤反应差异现象中发挥重要的作用, 这也正是我们下一步研究工作方向和基础之一。

参考文献:

[1] Lyons M J, Goldberg J, Eisen S A, *et al*. Do genes influence exposure to trauma: A twin study of combat[J]. Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetic), 1993, 48(1): 22-27.

[2] Radojicic C, Andric B, Simovic M, *et al*. Genetic basis of resistance to trauma in inbred strains of mice[J]. J Trauma, 1990, 30(2): 211-213.

[3] 冯　刚, 王正国, 杨志焕, 等. C57BL/6 和 BLAB/C 小鼠创伤反应差异性初步探讨[J]. 中华创伤杂志, 2001, 15(5): 301-303.

[4] 宋　欣, 胡金麟, 李向红, 等. 脏器微血管通透性的测定方法[J]. 微循环学杂志, 1996, 6(4): 25-27.

[5] 王正国, 孙立英, 杨志焕, 等. 系列生物激波管的研制与应用[J]. 爆炸与冲击, 1993, 13(1): 77-83.

[6] 廖克龙, 朱佩芳, 王正国, 等. 胸部撞击伤、内毒素血症及其复合损伤对大鼠肺血管通透性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(2): 199-200.

[7] Groeneveld A B. Treatment of increased microvascular permeability following inflammation[J]? Crit Care Med, 1999, 27(1): 23-24.

[8] Davis K A, Fabian T C, Croce M A, *et al*. Prostanoids: early mediators in the secondary injury that develops after unilateral pulmonary contusion[J]. J Trauma, 1999, 46(5): 824-831, discussion 831-832.

[9] Devora L, Stephen D, Yuming Xu, *et al*. Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells[J]. J of Immunol, 1999, 162(9): 5490-5497.

[10] Ohneda O, Ohneda K, Nomiyama H, *et al*. WECHE: a novel hematopoietic regulatory factor[J]. Immunity, 2000, 12(2): 141-150.

(编辑　陈聪连)

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