DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.001
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)18-1593-03

专家论坛

烧伤早期损害防治研究近况

Advances in the researches of the prevention and treatment of postburn early damage

黄跃生 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

烧伤早期损害是影响大面积烧伤治愈率的关键因素,是烧伤防治研究的重大课题[1,2]。近年来,国内外对此进行了深入广泛的研究。我室在国家"973"创伤基础研究项目和国家杰出青年基金等项目的资助下,就烧伤早期损害的分子机制与防治进行了较深入的研究,提出了一些新的认识和见解,拓宽了临床防治的思路。

1 缺血缺氧是严重烧伤后多种因素造成组织细胞损害的交汇点

严重烧伤后,由于血管通透性增加,大量血管内液外渗导致有效循环血量减少,全身组织器官发生缺血缺氧;严重烧伤应激反应时大量血管收缩物质释放,为保障心、脑等重要生命器官的血供,体内血流再分配,使肠道、肾脏等外周组织器官处于缺血缺氧状态;缺血缺氧和炎症时,血管内皮细胞受损,粒细胞-内皮细胞粘附增强,内皮细胞肿胀,均可使微血管管腔变窄,血流受阻,加重组织细胞的缺血缺氧。因此可以认为,缺血缺氧是严重烧伤后多种因素造成组织细胞损害的交汇点或共同途径。

缺血缺氧导致组织细胞损害的途径较多,能量是细胞赖以维持正常结构与功能以及生命活动的基础。研究证明[3~5],线粒体是细胞缺血缺氧损害的核心靶细胞器,线粒体损害是全身性缺血缺氧损害的最关键环节。烧伤后,心肌细胞线粒体细胞色素c氧化酶活性显著降低、F0F1-ATP酶(F0F1-ATPase)合成活性于烧伤初期显著升高,3 h后则显著降低;而F0F1-ATP酶水解活性于烧伤初期显著降低,3 h后则显著升高。心肌线粒体呼吸控制率(Respiratory control ratio, RCR)初期显著升高,3 h后显著降低。线粒体Ⅲ态呼吸的变化与RCR基本一致,Ⅳ态呼吸仅于伤后6 h明显升高。RCR是反映线粒体结构完整性和功能状态的灵敏指标,Ⅲ态呼吸是代表ADP对线粒体氧化磷酸化刺激效应的指标,Ⅳ态呼吸代表ADP耗尽后线粒体维持自身形态、结构所必需的基础氧耗。烧伤3 h后,RCR和Ⅲ态呼吸下降表明氧化磷酸化过程在一定程度上脱偶联;伤后6 h Ⅳ态呼吸明显升高,提示线粒体消耗较多的氧以维持其自身形态与结构,抗御外来因素的损害。能量产生减少,使心肌细胞线粒体Ca^{2+}释放障碍,导致Ca^{2+}严重超载,引起细胞凋亡或死亡。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);全军"十五"指令性课题(01L066);教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000);军队首批临床高新技术重大项目(2002)

作者简介:黄跃生(1958-),男,湖南省耒阳市人,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事烧伤早期损害防治方面的研究,发表论文120余篇。电话:(023)68754173;E-mail:yshuang@cta.cq.cn

收稿日期:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

Ca^{2+}超载可通过激活mtPLA2(Mitochondrial phospholipase A2),降解线粒体磷脂;激活mtNOS(Mitochondrial nitric oxide synthases)使线粒体NO(Nitric oxide)生成增加;或直接/间接损害线粒体呼吸酶活性,进一步加重能量代谢障碍。Ca^{2+}转运阻断剂和K^+-ATP通道开放剂可显著减轻烧伤后心肌细胞和线粒体损害。我们还发现,严重烧伤后大鼠肝细胞糖酵解增强、细胞有氧氧化严重受抑和葡萄糖转运功能增强可能与烧伤后缺氧诱导因子-1(Hypoxia induction factor-1, HIF-1)表达明显增加有关。提出了以线粒体为中心研究严重烧伤后缺血缺氧损害发生机制与防治策略的新思路,初步形成了烧伤后"休克心"的新观点[2,6]。

生理条件下,线粒体通透性转换孔(Permeability transition pore, PTP)处于关闭或亚通透状态,只允许分子量$< 0.3\times 10^3$的物质自由进出,不导致线粒体肿胀,可能与线粒体内外离子转运有关。在缺血缺氧等病理情况下,PTP开放使线粒体氧化磷酸化出现障碍并释放细胞色素c进入胞浆,导致细胞坏死与凋亡。PTP的实质是一种通道复合体,由线粒体内膜上的腺苷酸转运酶(Adenine nucleotide translocator, ANT)和外膜的电压依赖性离子通道(Voltage-dependent anion channel, VDAC)蛋白以及基质中的亲环素D(Cyclophilin D, CyP-D)构成。梁晚益等[7]以[^{3}H]DOG([^{3}H]-deoxyglucose)直接检测烧伤后心肌细胞线粒体PTP开闭特性。研究结果显示,烧伤后心肌线粒体PTP开放增加,线粒体cyt c(Cytochrome c)通过开放的PTP漏出,使线粒体cyt c含量减少。线粒体Ca^{2+}超载及自由基增加可能是烧伤后PTP开放的重要原因。烧伤后心肌细胞线粒体PTP开放可产生以下两个后果:①线粒体氧化磷酸化出现障碍;②线粒体cyt c释放进入胞浆。前者使心肌细胞不能获得足够的能量;后者cyt c激活胞浆capase-3(凋亡蛋白-3),诱发心肌细胞凋亡。提示烧伤后及早应用抗氧化药物并设法减轻线粒体Ca^{2+}超载,抑制心肌细胞线粒体PTP开放,可能是防治烧伤"休克心"的有效手段。ATP敏感的线粒体K^+通道(Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, mitoKATP,)是细胞能量代谢的重要调节器,mitoKATP开放剂可促进K^+与H_2O进入线粒体,使其体积增大,加强线粒体呼吸功能。本研究结果表明,mitoKATP开放剂二氮嗪治疗后血清CK(Creatinine kinase)、LDH(Lactate dehydrogenase)均显著降低。这说明其可有效减轻烧伤后心肌细胞损伤。本研究烧伤二氮嗪处理组大鼠线粒体K^+内流速率及线粒体呼吸功能均明显高于烧伤组,说明线粒体K^+内流增加导致呼吸功能加强是二氮嗪保护烧伤后心肌细胞的具体机制之一。实验结果也证实二氮嗪处理组心肌线粒体MDA含量显著低于烧伤组。提示抑制自由基产生也是二氮嗪保护细胞的机制之一。

缺氧对糖酵解的激活远远超过了细胞内可利用的葡萄糖浓度,葡萄糖是由膜上的葡萄糖载体转运到胞内的。因此,葡

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

葡萄糖的跨膜转运是缺氧和缺血时能量代谢的重要限速步骤。研究表明[8]，缺氧条件下培养的正常大鼠肝细胞中膜糖蛋白GLUT-1（Glucose transport-1）的表达增加，并随缺氧时间的延长而变得明显，烧伤导致GLUT-1 mRNA和蛋白水平增加，与烧伤后机体损伤修复需要大量能量相适应。对细胞膜上GLUT-1数量的调节可能是组织对缺氧、缺血应激适应的一个重要机制。除缺氧外，多种环境和内在因素可在多个环节参与对GLUT-1蛋白表达的调控。利用体外培养的大鼠正常肝细胞，转染含有大鼠GLUT-1基因全长调控序列的荧光素酶报告基因载体（构建体A），显示缺氧明显诱导了报告基因的表达，随着缺氧时间的延长，其表达一直高于诱导前的水平。GLUT-1是目前已知惟一的受缺氧双重诱导的基因，即受缺氧本身和缺氧导致的氧化磷酸化抑制的诱导，这可能是由GLUT-1介导的葡萄糖转运是缺氧和缺血时能量供应的限速步骤所决定的。缺氧和缺氧导致的氧化磷酸化本身对GLUT-1 mRNA表达水平的双控制，使得不论是缺氧导致的线粒体氧化磷酸化水平降低，还是由于氰化物等中毒导致氧化磷酸化受抑所致的线粒体ATP生成减少，细胞均能维持较高的糖原分解和ATP合成速率，满足机体的需要。这些研究结果对于深入揭示严重烧伤后缺血缺氧损害的分子机制，寻找其防治措施具有重要的理论和临床意义。

2 炎症反应失控与缺血缺氧相互关联、互为因果加重早期损害

炎症反应也是创伤后机体的早期变化之一。适度的炎症反应对机体具有保护作用，但是过度的炎症反应（如全身炎症反应综合征、代偿性抗炎症反应综合征、混合拮抗反应综合征）则是严重创伤后发生多种并发症（如休克、脓毒症、脏器损害等）的重要机制。研究证明[9,10]，缺血缺氧时，炎性细胞尤其PMN（Polymorphonuclear leukocytes）与内皮细胞活化，使PMN粘附、聚集于脏器组织微血管内，可阻碍微血管血流，加剧微循环障碍和组织缺血缺氧。烧伤后心肌组织中PMN标志物MPO（Myeloperoxidase）显著增加，表明烧伤后PMN在心肌组织聚集增多。更为重要的是，活化的PMN可产生大量MPO、弹性蛋白酶、氧自由基及TNFα等细胞因子，造成组织细胞损害。因此，缺血缺氧与失控性炎症反应之间存在一定的内在联系，见图1。

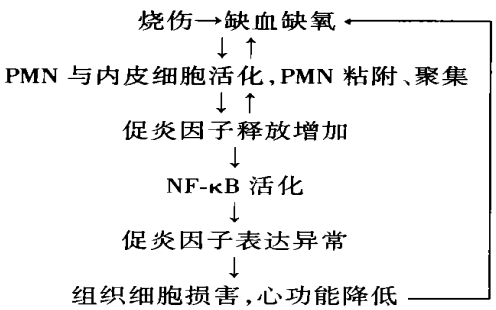


图1 炎症反应失控与缺血缺氧相互关联、互为因果加重早期损害

研究表明，NF-κB（Nuclear factor κB）活化是机体效应细胞大量释放促炎细胞因子，导致组织炎症反应和组织损伤的关键步骤。正常情况下，NF-κB（主要为P50/P65二聚体）与其抑制蛋白IκB结合成无活性的三聚体存在于细胞浆中，在某些因素的刺激下，IκB与NF-κB解离，NF-κB核定位序列暴露，NF-κB由胞浆移位至胞核。在胞核内NF-κB与相应基因启动子或增强子中κB结合，启动细胞因子等的转录。NF-κB被TNFα等促炎性细胞因子激活的同时，又促进这些细胞因子的表达，导致失控性炎症反应。烧伤后1 h，心肌组织NF-κB活性即明显升高，伤后3 h达峰值，24 h内均维持于高水平。NF-κB活化在通常情况下是一快速、短暂的反应，但烧伤后心肌组织NF-κB活化持续时间较长，可能与烧伤后多种刺激因素持续存在有关。如严重烧伤后，尽管按公式及时进行补液治疗，但组织器官在较长一段时间内仍处于缺血缺氧状态；烧伤后缺血缺氧使肠粘膜屏障受损，肠道细菌和毒素不断入血，不断刺激机体效应细胞。这种情况也从一个侧面说明缺血缺氧与失控性炎症反应之间是相互关联的。

NF-κB活化后，可促使多种促炎细胞因子的表达和分泌，TNFα则是目前被公认的具有多种重要生物学活性的促炎细胞因子之一，心肌细胞也产生大量的TNFα。研究显示烧伤后3 h，心肌组织TNFα mRNA表达即增强。原位杂交染色结果显示，烧伤后心肌细胞内TNFα mRNA表达也明显增强，提示心肌细胞是烧伤后TNFα的重要来源。TNFα可直接抑制心肌收缩和诱导心肌细胞凋亡，从而导致心功能受损。TNFα对心脏血流动力学影响以降低心肌收缩速度、射血分数、血压、全身血管阻力及心室舒张功能为特征。TNFα可介导内毒素所致的心功能抑制，给犬注射不同剂量的TNFα后2 h，左室平均射血分数明显降低，剂量越大，左室平均射血分数和心肌收缩功能降低越明显，动物死亡数也随之增多。心肌局部产生TNFα是导致心功能下降的重要因素之一。烧伤后LVSP（Left ventricular systolic pressure）、dp/dt_{max}均显著降低，而LVEDP（Left ventricular end-diastolic pressure）上升，表明心肌收缩功能和舒张功能均减退。而心肌收缩功能降低发生在TNFα mRNA表达增强之后，提示心肌组织表达的TNFα参与了烧伤早期心肌收缩和舒张功能降低的过程[9]。

血管内皮细胞不仅仅具有血管内表面的屏障作用，还能分泌多种细胞因子参与凝血、血管舒缩、炎症等多种病理生理过程，它在烧创伤后多器官功能不全的发生发展中具有重要作用。内毒素是创伤、感染后血管内皮细胞损伤的主要触发因素之一，应用内毒素体外刺激人脐静脉内皮细胞株ECV-304，采用抑制性消减杂交方法筛选内皮细胞上与内毒素相关的基因，其中一个基因全长序列在Genebank登录，并命名为内皮细胞高表达脂多糖相关因子1[11]。根据实验结果显示，内皮细胞高表达脂多糖相关因子1存在不同的mRNA剪接型，并且表达的丰度以及对内毒素刺激的反应性上存在明显的差异，其生物学意义目前尚不清楚，正在应用RNA干扰技术进行深入研究。

3 信号通路和内源性保护机制的阐明将为早期损害防治提供新策略

已知多数刺激因素诱导细胞效应经过信号识别/与膜受体结合—信号转导—胞浆/核反应—细胞效应等这一过程。在此过程中，信号转导是刺激因素诱导细胞效应产生的关键中间环节。细胞内存在多条信号途径以行驶信号转导职能，阻断某些刺激因素的主要信号途径，有可能消除或消减刺激因素诱导的细胞效应。我们发现[12]，p38激酶（Mitogen-activated protein kinase p38）、JNK（C-Jun-NH2-terminal kinases）两条主要应激活化的

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

信号途径中，p38 激酶途径是严重烧伤早期心肌组织细胞主要被激化途径。烧伤早期心肌细胞 p38 激酶途径迅速被激活，在伤后 24 h 内呈持续高活化状态，p38 激酶核转位伴随其活化全过程。同时烧伤早期心肌组织 ERK（Extracellular signal-regulated kinases）途径也迅速被激活，ERK 途径的活化可能与细胞自身抗损伤机制启动有关，提示 p38 激酶与 ERK 途径活化的强弱对比或失衡可能是决定烧伤早期心肌细胞损害的重要细胞内机制。p38 激酶抑制剂 SB203580 能有效抑制缺氧、烧伤血清刺激条件下心肌细胞 p38 激酶活化，减轻心肌细胞 LDH 漏出，减少心肌细胞凋亡，改善心肌细胞活力，表明 p38 激酶途径是烧伤早期主要致病因素导致心肌细胞损害的信号转导途径。p38 激酶抑制剂 SB203580 能下调缺氧、烧伤血清刺激条件下心肌细胞 TNFα、iNOS 及 cPLA2（Cytosolic phospholipase A2）表达，抑制 caspase-3 活化，从而降低心肌细胞 MDA 含量，延缓心肌细胞膜磷脂降解，减少细胞凋亡，提示 p38 激酶途径参与炎症相关基因表达和促进 caspase-3 活化是其介导缺氧、烧伤血清刺激条件下心肌细胞损害的重要机制。体内给予 SB203580 也能有效抑制烧伤早期心肌组织 p38 激酶活化，下调心肌组织炎症相关基因表达和降低 caspase-3 活性，减少心肌细胞 CK-MB（MB isoenzyme of creatine kinase）丢失，降低心肌细胞凋亡程度，改善左心功能。从信号转导水平探讨了烧伤早期心肌损害及“休克心”的发生机制及防治策略。

缺氧和炎症因子等刺激因素可使细胞大量表达 c-fos，c-jun，表达增加的 c-fos，c-jun 通过对下游基因表达的调控来引起体内细胞的一系列形态结构和功能代谢变化。本研究通过转染 *c-fos* 和 *c-jun* 反义基因重组体观察缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞的保护作用研究。结果显示[13]，加入烧伤血清并造成缺氧的非转染心肌细胞，细胞形态明显改变，细胞骨架网状结构紊乱，有的细胞骨架甚至全部断裂，呈颗粒状，散布在核周围；细胞微管结构明显溶解和断裂。但转染了反义基因重组体后，心肌细胞胞浆丝与丝之间互相连接呈网状，由核向周边放射状分布，完整清晰，电镜下微管结构基本保持完好，偶见断裂和溶解现象。转染了反义基因重组体后，c-fos、c-jun mRNA 表达和蛋白表达显著减少，β-Tubulin 和肌钙蛋白表达水平显著升高。表明 *c-fos*、*c-jun* 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞具有保护作用。由于该研究采用的体外研究模型基本模拟了在体烧伤缺血缺氧时的主要损伤因素，可为寻求烧伤早期休克心的防治新策略提供了有价值的实验依据。

近年来研究 HSP70（Heat shock proteins 70）作为一种细胞内源性保护蛋白，在防止应激引起的细胞损害或者使受损的细胞恢复方面起着重要作用[14]。该实验结果显示，腹腔注射 HSP70 诱导剂亚砷酸钠 24 h 后大鼠小肠组织 HSP70 表达明显增强，显著减轻严重烫伤后早期的肠粘膜屏障破坏。HSP70 可能在烧伤后早期心肌损害中发挥其内源性抗损伤作用。袁志强等[15]大鼠烧伤后心肌组织 HSP70 蛋白表达显著升高，腹腔注射亚砷酸钠（6 mg/kg）可以显著诱导心肌组织 HSP70 的表达。亚砷酸钠预处理组血清 cTnI（Cytosolic troponin I）含量明显低于单纯烧伤组，且波动幅度较小，伤后 48 h 已经恢复正常水平。表明亚砷酸钠预处理诱导的热休克反应对烧伤后早期心肌损伤有一定的保护作用。该研究在成功构建含全长 HSP70 基因重组腺病毒载体并在体外实验中观察到对肠上皮细胞缺氧复氧损伤保护作用的基础上，将构建的重组腺病毒载体通过静脉注射转染严重烧伤大鼠，发现肠粘膜组织病理改变较单纯烧伤组减轻，损伤指数明显降低，血清中乳酸脱氢酶含量明显下降。表明静脉注射转染含 HSP70 基因的重组腺病毒载体可成功介导 HSP70 在大鼠肠粘膜的过度表达，从而拮抗严重烧伤大鼠的肠粘膜损伤，减轻细胞损伤，对严重烧伤大鼠肠粘膜缺血缺氧性损伤有确切保护作用，为严重烧伤后肠粘膜的防治提供了基因治疗的可能途径。

烧伤早期损害发生机制的研究还有待深入，对缺血缺氧和感染时细胞各种信号通路的交汇和内源性保护机制的研究、缺氧时细胞糖代谢和脂肪酸代谢的分子机制与调理研究、线粒体损害在缺血缺氧细胞坏死和凋亡中的作用及其地位研究等，将有助于进一步从细胞与分子水平阐明烧伤早期损害的机制，寻求分子和基因水平的防治新方法，减少烧伤早期损害的发生。

关键词：烧伤；早期损害；缺血缺氧；炎症反应；内源性保护机制

中图法分类号：R644　　文献标识码：A

参考文献：

[1] 黄跃生. 烧伤休克与早期损害[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(5)：265－267.

[2] 黄跃生，杨宗城，迟路湘，等. 烧伤后“休克心”的研究[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(5)：275－278.

[3] 梁晚益，唐卫新，杨宗城，等. 严重烧伤早期心肌线粒体 F0F1-ATPase 活性变化及其对能量代谢的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：780－782.

[4] Liang W Y，Tang L X，Yang Z，*et al*. Calcium induced the damage of myocardial mitochondrial respiratory function in the early stage after severe burns[J]. Burns，2002，28(2)：134－136(IF 0.856).

[5] Liang Wanyi，Yang Zongcheng，Huang Yuesheng. Changes of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport and mechanism in the early stage after severe burns[J]. Burns，2002，28(5)：431－434(IF 0.856).

[6] 黄跃生. 重视缺血缺氧与细胞因子在“休克心”发生机制中的作用[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(5)：261－262.

[7] 梁晚益，黄跃生，杨宗城. 严重烧伤早期心肌线粒体通透性转换孔状态改变及其机制[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1606－1608.

[8] 戚华兵，王凤君，汪仕良. 严重烧伤大鼠肝脏葡萄糖转运体 1 蛋白表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1613－1616.

[9] 黄跃生，李志清，吴庆云，等. 缺血缺氧在烧伤后休克心中的作用及其机理探讨[J]. 中华创伤杂志 2002，18(4)：205－209.

[10] 李志清，黄跃生，杨宗城. 烧伤血清对内皮细胞核因子-kB 核移位的影响[J]. 中华烧伤杂志，2002，18(5)：265－267.

[11] 梁自文，杨宗城，罗向东，等. 人类内皮活化相关新基因 EOLA1 的发现与初步研究[J]. 解放军医学杂志，2003，28(5)：422－424.

[12] 张家平，黄跃生，刘　敬，等. 烫伤大鼠心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶的活化及胞内分布规律的研究[J]. 中华烧伤杂志，2003，19(3)：137－140.

[13] 胡安根，黄跃生. *c-fos* 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞保护作用的研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1599－1601.

[14] 李晓鲁，彭毅志，袁志强，等. HSP70 基因静脉转染对严重烧伤大鼠肠粘膜保护作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1626－1628.

[15] 袁志强，彭毅志，李晓鲁，等. HSP70 在严重烧伤大鼠心肌细胞中的表达及其保护作用的研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1620－1622.

（编辑　张　宁）

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