DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.004
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1602 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1602-04

烫伤诱导大鼠心肌细胞缺氧诱导因子-1α定位表达的研究

党永明[1],黄跃生[1],陈丽峰[2] (第三军医大学:[1]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;[2]高原军事医学系病理生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨40%Ⅲ度烫伤大鼠早期心肌组织中缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)的蛋白表达的变化规律及其定位分布意义。方法 采用40%TBSAⅢ度烫伤大鼠模型,蛋白免疫印迹法(Western-blot)测定HIF-1α蛋白水平表达,免疫组化法定位显示HIF-1α表达。结果 烫伤后大鼠心肌组织内HIF-1α蛋白表达量明显升高。左、右心室HIF-1α蛋白表达不同,HIF-1α蛋白表达增加主要定位于细胞核。结论 严重烧伤可以诱导心肌组织HIF-1α蛋白表达增加。左心室对照组HIF-1蛋白含量明显高于右心室。HIF-1α蛋白表达增加主要分布于心肌细胞核内,诱导下游因子表达。

关键词:烧伤;心肌缺血;缺氧诱导因子-1α;免疫印迹;免疫组化
中图法分类号:R322.1+1;R394.3;R644 文献标识码:A

Hypoxia inducible factor-1α expression in myocardial tissues of rats following severe burn injury

DANG Yong-ming, HUANG Yue-sheng, CHEN Li-feng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes and roles of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) expression in myocardial tissues in rats following severe scald. **Methods** Male Wistar rats inflicted with 40% TBSA Ⅲdegree scald were used as animal models. HIF-1α protein in myocardial tissues was detected by Western blot and immunohistochemical technique. **Results** HIF-1α protein expression in rat myocardial tissues increased significantly in the early stage following scald. The difference in HIF-1α level between the left and right ventricles was significant. The increased HIF-1α protein was mainly located in the nucleus. **Conclusion** HIF-1α protein expression in myocardial tissues of rats can be induced by severe scald and HIF-1α protein expression in the left ventricle is significantly higher than that in the right ventricle. The increased HIF-1α protein in the nucleus can induce downstream cytokine expression.

Key words: burn; myocardial injury; hypoxia induction factor-1α; Western blot; immunohistochemistry

心肌是严重创(烧)伤早期缺血缺氧损害的重要靶器官之一,严重烧伤后很早即发生心肌损害,缺血缺氧损害不仅可引起心功能不全,而且还可诱发或加重休克,导致或加重全身其它组织器官的缺血缺氧损害和炎症反应,我们把这一现象称为"休克心"[1]。严重烧伤引发的早期病理生理变化主要以缺血缺氧为主,缺氧应答反应是一个非常复杂的过程。缺氧时,有许多应激基因表达,如促红细胞生成素(EPO)、血管内皮生长因子(VEGF)和糖酵解有关的酶类[2]。Semenza[3]对促红细胞生成素的深入研究证实在EPO基因3′端Flanking区域存在一顺式DNA序列,在低氧应答时具有转录活性,将与此增强子结合的反式作用元件命名为缺氧诱导因子1(HypoxiaInducibleFactor1,HIF-1)。HIF-1的发现使我们对缺氧调节的分子机制有了更进一步的了解,有关HIF-1的研究已成为相关领域的热点。本研究旨在探讨严重烫伤后HIF-1α在大鼠心肌组织中的表达变化规律。

1 材料和方法

1.1 实验材料

兔抗大鼠HIF-1α多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology);碱性磷酸酶标记的山羊抗兔IgG(北京中山公司);其他试剂及聚

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);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:党永明(1975-),男,河北省宁晋县人,硕士研究生,主治医师,主要从事烧伤后心脏损害方面的研究。电话:(023)68754148-8090;Email:dym5241@hotmail.com
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173

收稿日期:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

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

偏二氟乙烯(PVDF)膜等购自上海生工生物工程公司。SP-9002 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒及 PBS 缓冲液购于北京中山生物技术有限公司。

1.2　实验动物与分组

采用雄性清洁级 Sprague Dawley(SD)大鼠 36 只, 体质量(280±20) g(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供), 随机分为对照组、40% Ⅲ度烫伤 1、3、6、12、24 h 组, 每组 6 只。烫伤组大鼠背部以质量浓度 20 g/L 的硫化钠脱毛, 正常饲养 48 h 后, 1%戊巴比妥钠麻醉下行 40%TBSA 烫伤, 水温(95±1) ℃, 时间(18±2) s, 病理切片证实为Ⅲ度烫伤。烫伤后立即一次性腹腔注射乳酸林格液(50 ml/kg)抗休克, 单笼饲养, 自由进食饮水。不同时相点(1、3、6、12、24 h)取心脏, 以预冷的等渗盐水灌洗 2 次, 解剖左、右心室, 分别置液氮中速冻保存。取对照组、40% Ⅲ度烫伤 6、12、24 h 组心肌行免疫组化实验。

1.3　实验方法

1.3.1　HIF-1α 蛋白免疫杂交分析　　各组 6 只大鼠分别进行左、右心室分析。心肌组织总蛋白的粗提用 Lowry's 法测蛋白含量。凝胶由4%的浓缩胶和 13%的分离胶所组成, 凝胶总长 10.5 cm, 其中浓缩胶 1.5 cm, 分离胶 9 cm, 尿素终浓度为 8 mol/L。取 40 μg 线粒体蛋白或组织总蛋白与上样缓冲液混合至终体积为 20 μl, 于 100 ℃加热 7 min, 冰上冷却, 加 2 μl β-巯基乙醇混匀, 于 4 ℃, 12 500× g 离心 10 min 后上样。以浓缩胶 80 V, 分离胶 135 V 电泳 4 h。电泳结束后, 切下蛋白质 Marker 所在的胶条, 行考马斯亮蓝染色, 拍照。样品所在的凝胶部分做蛋白质转印。采用湿式转印法, 用孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜, 依照文献[4]中介绍的方法制作"三明治"夹心, 做好样品加样顺序的标记, 于稳流 64 mA, 4 ℃转印 20 h。转印结束后, 取出 PVDF 膜, 置于含 1%BSA 的 PBS 中振摇 2 h, 于 4 ℃封闭过夜。依次与 HIF-1α 多克隆抗体混合液(1∶200)、碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶500)杂交, 常规显色、拍照。对转印膜进行薄层密度扫描。用 Quantity one Version 4.4 软件分析, 测定产物条带的积分光密度(IOD)。

1.3.2　免疫组化实验步骤　　HIF-1α 多克隆抗体免疫组化按免疫组织化学超敏 S-P 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)说明书进行操作。心肌组织经中性缓冲福尔马林液固定 12 h, 常规石蜡包埋切片, 0.125%胰蛋白酶 37 ℃消化 20 min 行抗原修复, 加一抗兔抗大鼠 HIF-1α 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology)1∶100, 4 ℃孵育过夜, 然后依次加入生物素标记的第二抗体(抗兔)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 再利用二氨基联苯胺(DAB)进行显色, 苏木素复染后封片观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

结果定性分析: 普通光学显微镜下观察, 每张切片随机选取 10 个具有代表性的视野(×400 倍), 按染色强度的不同分为五级: 无着色(－)、淡黄色(±)、棕黄色(＋)、深棕黄色(＋＋)、棕褐色(＋＋＋)。阳性细胞计数: 每组标本随机 10 张切片, 每张切片选择 10 个高倍视野, 计数每个高倍视野中的阳性细胞, 取其均值。

结果定量分析: 采用德国 LEICA 图像分析系统, 每张切片随机选取 10 个具有代表性的视野(×400 倍), 自动选取阳性区域并计算平均光密度值。

1.4　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示; 采用 SPSS10.0 统计软件的单因数方差分析, 各组均值的多重比较采用 LSD 法。

2　结果

2.1　左、右心室组织 HIF-1α 蛋白表达

烫伤后 1 h, 大鼠左心室组 HIF-1α 蛋白含量无明显变化; 3～12 h 持续进行性增加, 烫伤 3 h 组 HIF-1α 蛋白含量显高于对照组、1 h 组($P<0.01$); 烫伤 6 h 组 HIF-1α 蛋白含量与对照组、1、3 h 组相比明显增加, 有非常显著意义($P<0.01$); 烫伤 12 h 组 HIF-1α 蛋白含量与对照组、烫伤 1、3、6 h 组相比明显增加($P<0.01$), 烫伤 24 h 组较 12 h 组明显减少, 有非常显著意义($P<0.01$), 仍明显高于对照组、烫伤 1、3 h 组, 有非常显著意义($P<0.01$), 见图 1。

烫伤 1 h, 右心室组 HIF-1α 蛋白含量与对照组相比无明显差异; 3 h 后显著增加, 至 12 h 达高限($P<0.01$), 24 h 后略下降, 但仍显著高于对照组和伤后 1、3、6 h 组($P<0.01$), 见图 1。

左心室组与右心室组同一时相点间 HIF-1α 蛋白含量比较: 对照组、1、3 h 组左心室 HIF-1α 蛋白含量明显高于右心室($P<0.01$); 6、12、24 h 组无显著差别($P>0.05$)。

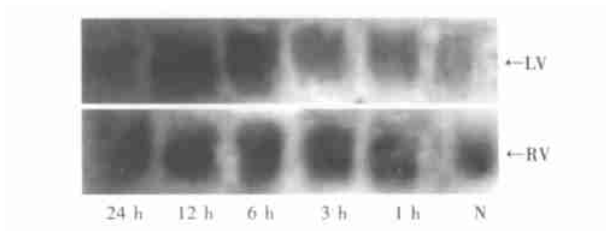


图 1　烫伤大鼠左、右心室 HIF-1α 的 Western-Blotlng 显色结果

Fig 1　Results of Western blot of HIF-1α in the left and right ventricles of rats inflicted with 40% TBSA Ⅲ degree scald at different time points after scald. N stands for control

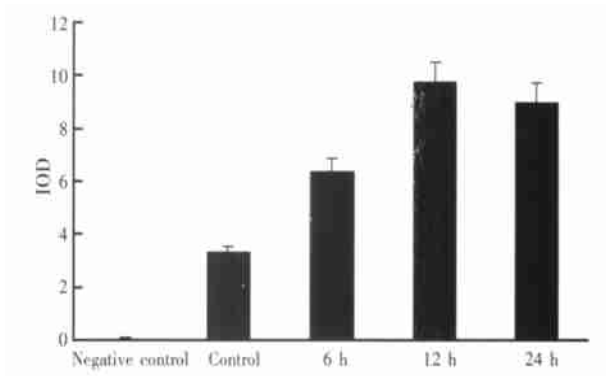


图 2　40% Ⅲ度烫伤大鼠心肌 HIF-1α 各时相点免疫组化积分光密度分析结果　(IOD, $\bar{x}\pm s$)

Fig 2　Results of HIF-1α in cardiomyocytes of rats inflicted with 40% TBSA Ⅲ degree scald at different time points after scald　(IOD, $\bar{x}\pm s$)

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

2.2 免疫组化结果

定量结果：正常大鼠心肌组织中有微量 HIF-1α 表达，伤后心肌 HIF-1α 表达量增加，12 h 为高峰，其后持续一段时间呈高表达，见图 2。

定性结果：HIF-1α 免疫组化显色正常对照组为(±/+)，烫伤后6 h为(+/++)，12，24 h 为(++/+++)，HIF-1α 主要表达于细胞核，见图 3。

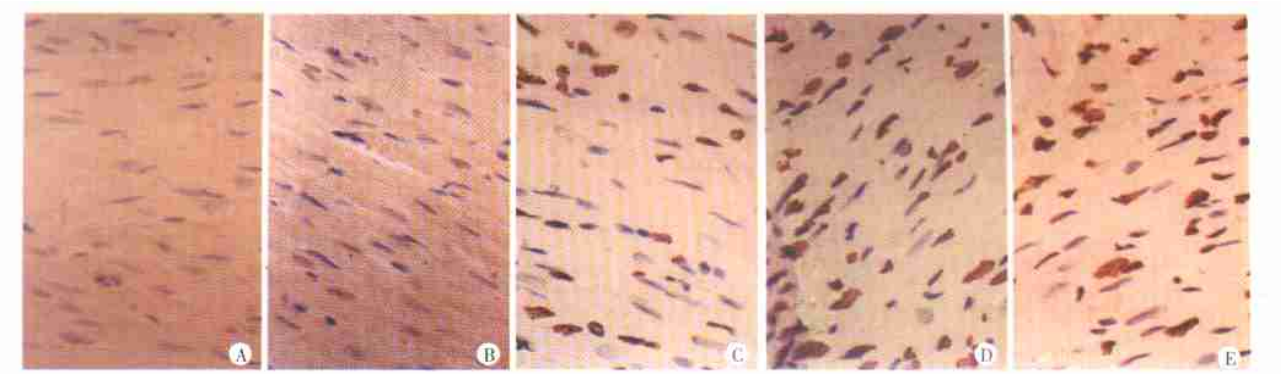
阳性细胞记数结果：烫伤后 HIF-1α 阳性细胞数持续进行性增加，12、24 h 组无明显变化，见表 1。

表 1 HIF-1α 在各组中阳性细胞记数结果比较(个数/400 倍视野，$n=10$)

Tab 1 Comparison of the results of HIF-1α-positive cells in each group(Number/400 High power field, $n=10$)

Group	Number										$\bar{x}\pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	12.4	13.1	11.8	12.5	11.1	14.0	12.4	11.9	10.9	10.7	12.08±1.03
6 h	64.4	62.1	61.8	63.2	67.8	69.4	60.2	68.6	69.3	63.2	65.00±3.45 *
12 h	92.3	93.1	95.4	91.6	98.6	96.4	97.6	95.2	94.3	96.7	95.12±2.30 *△
24 h	94.3	96.2	98.4	97.5	92.5	96.1	97.6	98.2	92.8	93.6	95.72±2.26 *△

*：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.01$ *vs* 6 h



A, B: Negative control, normal control; C, D, E: 6, 12 and 24 h group respectively. Expression of HIF-1α protein in the nucleus. The number and density of nuclei increase in a time-dependent manner

图 3 40% Ⅲ度烫伤大鼠心肌 HIF-1α 免疫组化结果 (S-P×400)

Fig 3 Results of rat HIF-1α immunohiseochemistry with Ⅲ degree 40% TBSA scald according to different time after scald (S-P×400)

3 讨论

心肌对缺血缺氧性损害十分敏感。心脏是人体内最活跃的器官，心肌的血流量大，摄氧量高。心肌需氧量高，是全身组织平均需氧量的10倍，是骨骼肌的4.5倍。血液流经心脏后动脉血氧容量中约 70%的氧被心肌摄取，是机体诸器官中动静脉氧差最大的，而一般组织只摄取动脉血中 22%的氧量。这是因为心脏活动所需要的能量，几乎完全依靠有氧代谢来提供，即使在静息状态下，心肌也差不多最大限度地从动脉血中摄取氧。另外，由于心肌细胞中肌红蛋白结合氧的容积小，加上心肌氧耗高，因此心肌组织内的氧储备能力非常小，氧张力很低。心肌一旦缺血(或缺氧)，或心肌耗氧有所增加，只能靠增加冠状动脉血流量来满足心肌对氧的需求。在正常情况下，冠脉循环有很大的储备能力，其血流量可随身体的生理情况而有显著的变化，剧烈运动时，冠脉血流量是休息时的 6～7 倍；缺氧时，冠脉扩张，血流量可增加 4～5 倍。严重烧伤早期机体血容量不足，加上疼痛刺激、应激反应、创面感染等因素而致冠状动脉发生痉挛，冠状动脉不能发生代偿性扩张，则心肌血流供求之间发生矛盾，遂引起心肌缺血缺氧性损害。

HIF-1 是一种核转录因子，它在低氧状况下诱导产生，具有多方面的效应[6]。HIF-1 是机体急性或慢性缺氧反应中重要的调控因子，在缺血缺氧性疾病中起重要保护作用。正常氧浓度条件下，HIF-1α 泛素化后迅速降解[7,8]。缺氧时，HIF-1α 蛋白降解减少，在组织和细胞中广泛表达，与 HIF-1β 形成二聚体入核，结合靶基因调控序列的缺氧反应元件(HRE)，诱导大量基因的表达[9]。HIF-1β 是芳香烃受体核转运蛋白(ARNT)基因的产物，属组成性表达，不受缺氧的诱导。HIF-1α 的生物学活性由 HIF-1α 亚基的表达和活性决定。HIF-1 启动下游基因表达上调，其相关调控基因目前发现有 40 余种，其生物学效应有促进糖酵解有效利用氧，红细胞增生、葡萄糖转运体增加，从而增加氧运输能力，促进细胞增殖、抗凋亡，促进血管再生等，所有这些功能都围绕着“维持低氧状态下的氧稳态，改善微循环”展开，提示 HIF-1 可能参与了缺氧细胞的能量代谢及氧利用障碍发生机制[10]。除了缺氧应激以外，LPS 等炎症应激能否诱导 HIF-1α 蛋白表达，目前尚不肯定，但对细胞具有明确的保护效应。HIF-1 在严重烧伤早期心肌损害中的意义及相关问题的研究尚未见报道[11]。本实验结果提示：严重烧伤可诱导心肌组织 HIF-1α 蛋白表达增加。烫伤后 1 h，大鼠 HIF-1 蛋白变

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

化不明显，随着时间延长，体液渗出增加，缺血缺氧加重，诱导 HIF-1 表达增强。本研究显示，左、右心室 HIF-1 蛋白表达不同，左心室对照组 HIF-1 蛋白含量明显高于右心室，提示左心室对缺血缺氧耐受能力较强。烫伤后右心室 HIF-1 蛋白量增长快速，对缺氧反应性强。另外，正常心肌组织内也有少量 HIF-1 表达。提示大面积重度烧伤使心肌组织发生缺血、缺氧性损害，缺氧诱导 HIF-1α 增加，从而提高心肌对缺氧的耐受能力，以减轻损害。本实验为今后进一步研究烧伤后“休克心”的分子机制，及其内源性细胞保护机制奠定了基础。

参考文献：

[1] 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.
[2] Ramesh Natarajan, Bernard J F, Alpha A. Fowler III. Regulation of hypoxia inducible factor-1 by nitric oxide in contrast to hypoxia in microvascular endothelium[J]. FEBS Lett, 2003, 54(9): 99－104.
[3] Semenza G L. Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 551－578.
[4] Joseph S, David W, Rinssell. Molecnlar cloning: A laboratory Mannal, 3 rd ed[M]. 北京：科学出版社，2002. 1752－1753.
[5] 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.
[6] Semenza G L. Expression of hypoxia-inducible factor-1: mechanisms and consequences[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(1): 47－53.
[7] Huang L E, Gu J, Schau M, *et al*. Regulation of hypoxia-inducible factor 1α is mediated by an O_2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(14): 7987－7892.
[8] Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteosome system under normoxic conditions: Its stabilization by hypoxia depends pon redox-induced changes[J]. J Biol Chem, 1997, 272(36): 22642－22647.
[9] Piacentini L, Karliner J S. Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart[J]. Pharmacol Ther, 1999, 83(1): 21－37.
[10] Robyn J Kewley, Murray L. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators[J], Internal J Bioch Cell Biol, 2003, 5(1): 11－27.
[11] Lee S H, Wolf P L, Escudero R, *et al*. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction[J]. N Engl J Med, 2000, 342(9): 626－633.

（编辑 张 宁）

文章编号：1000-5404(2003)18-1605-01

个案与短篇

儿童眼球摘除的病因分析及护理

Analysis of the etiology of the enucleation of eyeballs in children and the nursing measures

陆 萌[1]，陆 坷[2]（第三军医大学：[1] 附属西南医院眼科，重庆 400038；[2] 附属大坪医院野战外科研究所普通外科，重庆 400042）

我院在 1997 至 2002 年期间，行儿童眼球摘除 87 例，现将其主要病因分析如下。

1 病因分析

1.1 疾病分布

在 87 例眼球摘除的临床病例中，视网膜母细胞瘤为 27 例（占 31%），眼球破裂伤 20 例（23%），眼内炎 11 例（13%），角巩膜葡萄肿 7 例（8%），Coat 病 8 例（9%），先天性青光眼 5 例（6%），其他 9 例（10%）。

1.2 年龄的分布

儿童眼球摘除最多见于 1～5 岁儿童（47 例，占 54%），视网膜母细胞瘤高发于 3 岁以内（15 例，占 55.6%），眼球破裂伤多在 4～10 岁组（15 例，占 75%）。

由于非手术疗法限于早期肿瘤，而患儿来就诊时多较为晚期，不能取代手术治疗。因此早期诊断、及时治疗及加强眼外伤的预防宣传教育对于挽救儿童视力具有十分重要的意义[1]。

2 护理

当人在自己的生命历程中遇到丧失健康、丧失正常的生理功能等不幸时，会产生各种各样心理失衡及挫折感，使人经历各种心身应激及不同形式的心理危机，其精神、心理的创伤远远超过器官功能的损伤。眼球摘除术后，可能导致一系列生理、心理变化。因此，加强对该类患儿的护理有特殊临床意义。

心理护理：①患儿入院后，家长的紧张和忧虑，成为心理护理首先面临的问题。家长担心孩子今后的生活、工作不能与正常人相同，所以他们急切地想知道患儿的伤情和预后，护士应实事求是地根据伤情予以介绍，取得家长的理解和信任，一起鼓励患儿增强战胜伤痛的勇气，共同完成手术治疗和施行正确的护理计划。②对病人进行全面的整体护理，从而在心、身两方面达到康复，并且在功能受限的情况下有良好的生活质量。患儿行眼球摘除术后，由于身体自我形象的改变，造成沉默寡言，性格变得孤僻、易怒。我们对年龄稍大的患儿，通过正反理由的说明，讲解注射治疗的好处，启发激励他们学习英雄人物的勇敢精神；对小儿通过游戏、讲故事、玩玩具等形式来分散其注意力，取得患儿的信任和配合。

（下转 1608 页）

作者简介：陆 萌（1977－），女，重庆市梁平县人，护师，主要从事小儿眼底病护理方面的研究。电话：(023)68773097

收稿日期：2003-06-09；修回日期：2003-09-02

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