DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.015
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1626 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1626-03

HSP70基因静脉注射对严重烧伤大鼠肠粘膜保护作用的实验研究

李晓鲁,彭毅志,袁志强,黄跃生,杨宗城 (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)

提 要:目的 为严重烧伤后肠粘膜损伤的防治提供可行性的基因治疗途径。方法 大鼠静脉注射含HSP70基因的重组腺病毒载体,通过严重烧伤后肠粘膜病理形态学改变、损伤指数统计及血清中乳酸脱氢酶含量的变化观察基因转染后保护效应。结果 静脉转染HSP70基因的大鼠烧伤后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。结论 大鼠静脉注射含HSP70基因的重组腺病毒载体可保护严重烧伤后肠粘膜的缺血缺氧性损伤。为严重烧伤早期缺血缺氧性损伤的防治提供可行性的基因治疗途径。

关键词:烧伤;缺血缺氧;热休克蛋白质类70;腺病毒;
中图法分类号:R452;R459.9;R644 文献标识码:A

Protective effect of HSP70 gene transfection on intestinal mucosa injury in rats following severe burn

LI Xiao-lu, PENG Yi-zhi, YUAN Zhi-qiang, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effectiveness of heat shock protein 70(HSP70) gene transfection in intestinal mucosa against hypoxic/ischemic injury following severe burn. Methods The recombinant adenovirus Ad-HSP70 containing HSP70 gene was transfected into the severely burned rats through venal injection. The protective effect after gene transfection was observed by determination of the morphological changes of intestinal mucosa, injury indices and serum lactate dehydrogenase(LDH) following severe burn. Results Alleviated injury and significantly decreased injury indices and serum LDH were found in the transfected rats. Conclusion The Ad-HSP70 transfection in rats can successfully induce HSP70 overexpression in intestinal mucosa and protect the rats against the hypoxic/ischemic injury in intestinal mucosa after severe burn.

Key words: burn; hypoxia/ischemia; heat shock protein 70; adenovirus

脏器功能衰竭已成为当前烧伤病人死亡的主要原因,而烧伤早期脏器损害的本质是缺血缺氧性损害[1]。系列研究证实用基因转染的方法诱导热休克蛋白70(Heat shock protein 70, HSP70)的高度表达可拮抗心肌[2]、肺[3]、肠[4]等器官的缺血缺氧性损伤。我们在成功构建含全长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再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,观察腺病毒介导的HSP70过度表达对严重烧伤大鼠肠粘膜缺血缺氧性损伤的保护效应,可望为严重烧伤的防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 含HSP70基因的重组腺病毒载体Ad-HSP70的制备[4]

全长HSP70 cDNA与pAxCAwt粘粒DNA以20∶1摩尔数比混合后16 ℃连接过夜。酚-氯仿抽提后用DNA包装蛋白包装,转化DH5α细菌,涂布加有氨苄西林的TB固体培养基,37 ℃培养过夜,挑取菌落扩增,抽提粘粒。根据腺病毒载体与目的基因的引物片段PCR扩增以鉴定目的基因正向插入克隆。挑选正向插入克隆扩增粘粒。采用磷酸钙共沉淀法转染293细胞。同源重组后挑选无野生病毒株的克隆扩增病毒液后转染肠上皮细胞进行目的基因、蛋白表达的鉴定工作。

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(3012504);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);军队临床高新技术重大项目(2002)

作者简介:李晓鲁(1973-),女,河南省南阳市人,博士,主治医师,主要从事严重烧伤脏器损害的防治方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754175
通信作者:彭毅志,电话:(023)68754175

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

1.2　动物准备与分组

18 只健康 Wistar 大鼠, 体质量 180~220 g, 雌雄不拘, 由第三军医大学实验动物中心提供。称重后, 随机将动物分为正常对照组(除不予烧伤外, 其余处理均与烧伤组相同), 单纯烧伤组, Ad-HSP70 静脉注射转染烧伤组。每组 6 只大鼠。

1.3　烧伤模型的制作

1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 背部剃毛, 20%硫化钠脱毛并清洁皮肤, 将脱毛区置于(92±1) ℃水浴中 18 s, 造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤(病理切片证实, 本研究通称烧伤), 伤后立即按 40 ml/kg 腹腔注入生理盐水抗休克, 烧伤后动物分笼饲养, 自由进食饮水。伤后 6 h 取组织观察。

1.4　组织取材

大鼠烧伤后 6 h 距回盲部 5 cm 截取部分回肠肠段, 置 10%福尔马林中保存。经腹主动脉取血约 5 ml, 肝素抗凝, 1 000 r/min 离心 5 min, 分离血浆, 置－20 ℃冰箱保存待测。

1.5　肠粘膜损伤程度

病理形态学检查: 取各处理组动物部分回肠(距回盲部 5 cm), 置 10%福尔马林中固定, 常规石蜡包埋切片 HE 染色, 光镜下观察。

1.6　肠粘膜损伤计分

粘膜损害指数计分标准的确定[5]。计分方法: 0 分: 肠粘膜绒毛正常; 1 分: 绒毛顶端上皮下出现囊状间隙, 并伴有毛细血管充血; 2 分: 上皮下间隙扩大, 中度固有层水肿, 中央乳糜管扩张; 3 分: 固有层明显水肿, 肠粘膜上皮层细胞变性、坏死, 少数绒毛顶端脱落; 4 分: 上皮细胞层变性、坏死、脱落, 部分绒毛脱落, 固有层裸露, 毛细血管扩张、充血; 5 分: 绒毛脱落, 固有层崩解, 出血或溃疡形成。光镜下每个样本随机计数 20 个视野。

1.7　血清中 LDH 活力检测

取各组动物血清, 按 LDH 活力检测试剂盒(南京建成)说明书操作。

1.8　统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件对实验数据进行 t 检验。

2　结果

2.1　严重烧伤后肠粘膜病理形态学改变

常规石蜡包埋切片 HE 染色后光镜下观察可见正常大鼠回肠粘膜结构完整, 绒毛排列紧密、规则, 见图 1。大鼠烧伤后 6 h 肠粘膜损伤明显, 表现为固有层明显水肿, 肠粘膜上皮层细胞变性、坏死, 少数绒毛顶端脱落, 见图 2。静脉注射转染 Ad-HSP70 48 h 后烧伤大鼠肠粘膜损伤主要表现为绒毛顶端上皮下出现囊状间隙, 并伴有毛细血管充血, 但肠粘膜上皮层细胞完整, 见图 3。

2.2　重组腺病毒 Ad-HSP70 转染对烧伤大鼠肠粘膜损伤指数变化的影响

严重烧伤后大鼠肠粘膜损伤指数(2.20±0.83)与正常对照组比较明显升高($P<0.01$), 静脉转染 Ad-HSP70 48 h 后烧伤大鼠肠粘膜损伤指数(1.15±0.67)较单纯烧伤组明显降低($P<0.01$), 但与正常对照组比较升高明显($P<0.01$)。

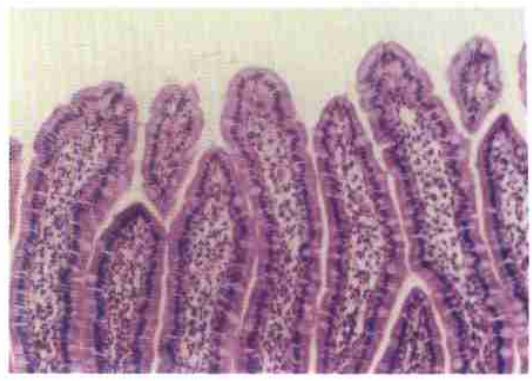


图 1　正常大鼠回肠粘膜结构完整, 绒毛排列紧密、规则　(HE× 200)

Fig 1　Integral construction of the ileal mucosa, tight and regular arrangement of villi in normal rats　(HE× 200)

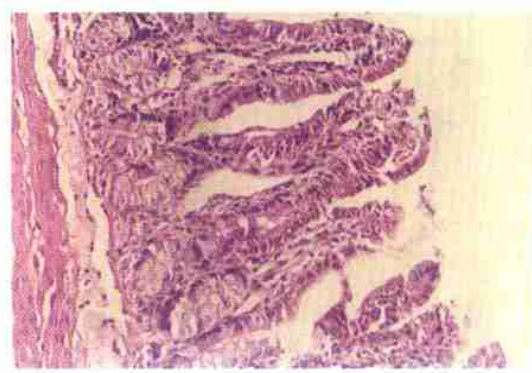


图 2　严重烧伤后 6 h 大鼠回肠绒毛间质血管扩张, 部分绒毛顶端上皮细胞脱落　(HE× 200)

Fig 2　Dilation of interstitial blood vessel of ileal vili and drop of epithelial cells at the top of some villi in rat 6 h after severe burn　(HE× 200)

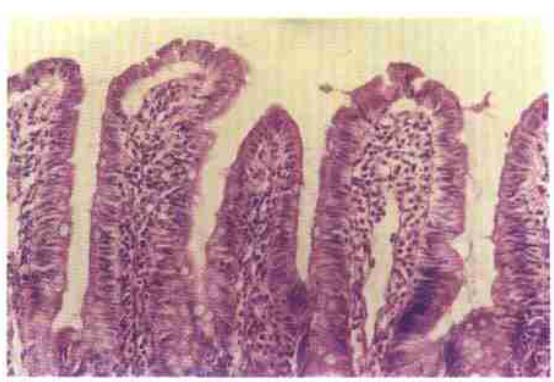


图 3　静脉转染 Ad-HSP70 大鼠烧伤后 6 h 回肠绒毛结构完整, 排列基本整齐, 绒毛顶端上皮下出现囊状间隙　(HE× 200)

Fig 3　Integral construction of the ileal mucosa, tight villi with cystic detachment at the top of the villus, 6 h following burn in the rats transfected with Ad-HSP70　(HE× 200)

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

2.3 重组腺病毒 Ad-HSP70 转染对烧伤大鼠血清中 LDH 活力的影响

大鼠烧伤后血清中 LDH 活力(4 053±495.37)U/L 较对照组(236±172.41)U/L 明显升高($P<0.01$),而静脉转染组大鼠烧伤后血清中 LDH 活力(2 476.17±729.36)U/L 较烧伤组下降明显($P<0.01$)。

3 讨论

大量动物实验和临床资料表明严重烧伤可导致胃肠道粘膜损伤,造成肠粘膜屏障功能降低,肠腔内细菌和(或)内毒素移位,并最终导致菌血症、脓毒症、全身性炎症反应及多器官功能衰竭的发生[6]。由肠粘膜上皮细胞和附着其表面的粘液层组成的屏障对沟通机体内外环境具有重要作用,但此屏障对生理、病理条件的变化较为敏感,烧伤可导致粘膜生理功能和组织结构的改变[7]。本实验对 30%体表面积 III度烫伤大鼠回肠病理切片观察结果表明严重烧伤后 6 h 大鼠回肠粘膜受损明显。正常大鼠肠粘膜绒毛排列整齐,上皮细胞完整,伤后 6 h 即出现上皮细胞变性、坏死、脱落等现象。

烧伤应激导致的粘膜血液灌流不足是造成粘膜损伤的重要原因,严重的皮肤烧伤导致肠系膜血管收缩从而损伤肠粘膜屏障的完整性[8]。烧伤可引起小肠上皮细胞凋亡增加,屏障功能破坏[9]。研究表明在烧伤等生理应激下,大鼠脑、肠组织的 HSP70 表达增高,提高应激脆弱器官抗损伤的能力。HSP70 对各器官的保护效应与其在该器官中的表达上调有关[10]。肝的缺血预处理可诱导大量 HSP70 表达,对抗随后的缺血再灌注损伤。采用腺病毒载体介导过度表达的 HSP70 亦可对抗心肌的缺血性损伤[11]。

基于前述肠粘膜损伤在严重烧伤中的重要性和必然性,我们首次在实验中观察了腺病毒静脉注射介导 HSP70 过度表达对烧伤后肠粘膜的保护效应。结果显示利用重组腺病毒 Ad-HSP70 预处理大鼠(在此实验中我们选择预处理 2 d 时间,该结论是建立在体外实验的基础上,因为体外实验发现在转染 48 h 时 HSP70 过度表达对细胞的保护效应最明显),经严重烧伤处理后,肠粘膜病理观察尽管有绒毛顶端上皮下囊状间隙形成,但绒毛排列基本整齐有序,损伤指数较单纯烧伤组明显减轻,乳酸脱氢酶活性较单纯烧伤组降低明显,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。

参考文献:

[1] 杨宗城. 烧伤早期脏器损害发病机制的探讨[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23(2): 84—87.

[2] Jayakumar J, Suzuki K, Khan M, *et al*. Gene therapy for myocardial protection: transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2000, 102(19 Suppl 3): III302—306.

[3] Masafumi H, Bassem N M, Motoki Y, *et al*. Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury[J]. Ann Thorac surg, 1999, 67(5): 1421—1427.

[4] 李晓鲁, 袁志强, 彭毅志. 重组腺病毒介导的 HSP70 转染对肠上皮细胞缺氧再复氧损伤的防护作用[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(16), 1102—1104.

[5] Chu J C, Alice H, Mcardle P, *et al*. Intestinal mucosal lesion in lowflow state[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478—483.

[6] Deith E A. Multiple organ failure: Pathophysiology and potential future therapy[J]. Ann Surg, 1992, 216(2): 117—134.

[7] Bijlsma P B, Peeters R A, Groot J A, *et al*. Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis[J]. Gastroenterology, 1995, 108(3): 687—696.

[8] Ramzy P I, Wolf S E, Irtun O, *et al*. Gut epithelial apoptosis after severe burn: effect of gut hypoperfusion[J]. J Am Coll Surg, 2000, 190(3): 281—287.

[9] Lightfoot E Jr, Horton J W, Maass D L, *et al*. Major burn trauma in rats promotes cardiac and gastrointestinal apoptosis[J]. Shock, 1999, 11(1): 29—34.

[10] Hutter M M, Sievers R E, Barbosa V, *et al*. Heat-shock protein induction in rat hearts: A direct correlation between the amount of heat shock protein induced and the degree of myocardial protection[J]. Circulation, 1994, 89(1): 355—359.

[11] Jayakumar J, Suzuki K, Khan M, *et al*. Gene therapy for myocardial protection: Transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2000, 102(19 Suppl 3): III302—306.

(编辑 张 宁)

(上接 1625 页)

本例患者以皮肤及骨关节结核到某医院就诊,由于医师的误诊,采用长达 38 d 的激素疗法,导致严重的全身炎固醇性结核病,给病人造成痛苦和损伤,教训极为深刻。故应严格掌握应用激素的适应证,在用激素的基础疾病未确诊前,不宜使用激素作试验性治疗。

关键词:皮肤及骨关节结核病;全身类固醇结核病

中图法分类号:R520.4 文献标识码:B

参考文献:

[1] 谢惠安, 阳国太. 现代结核病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 379—410.

[2] 张敦熔. 结核病新概念[M]. 北京:中国农业科技出版社, 1995. 198—201.

(编辑 张 宁)

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