DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.022
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

文章编号:1000-5404(2003)22-2015-03

论著

严重烫伤后大鼠外周血中性粒细胞和淋巴细胞 TNF-α 的表达

夏培元[1],秦孝建[2],潘文东[3],肖 光夏[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]药学部临床药理基地;[2]全军烧伤研究所,重庆 400038;[3]云南开远中国人民解放军第59中心医院外科,开远 661000)

提 要:目的 研究大鼠烫伤后外周血中性粒细胞和淋巴细胞的TNF-α mRNA表达的动态变化,以了解严重烫伤对外周血中性粒细胞和淋巴细胞表达TNF-α的影响。方法 复制30%体表面积Ⅲ度烫伤大鼠模型;分离外周血中性粒细胞和淋巴细胞;提取总RNA,采用RT-PCR分析TNF-α mRNA的表达。结果 PMN中TNF-α mRNA的表达在伤后的6~24 h内较伤前明显上调,而淋巴细胞在伤前未发现TNF-α mRNA的明显表达,但伤后3~48 h表达急剧上升;两者均于伤后12 h达高峰,以后缓慢下降,至48 h仍维持较高水平。结论 大鼠烫伤早期外周血中性粒细胞和淋巴细胞TNF-α mRNA的表达明显上调,表明严重烫伤可显著影响血中性粒细胞和淋巴细胞TNF-α的表达。

关键词:烧伤;中性粒细胞;淋巴细胞;TNF-α
中图法分类号:R392.11;R392.12;R644 文献标识码:A

TNF-α mRNA expression in the peripheral blood neutrophils and lymphocytes of severely burned rats

XIA Pei-yuan, QIN Xiao-jian, PAN Wen-dong, XIAO Guang-xia (Department of Pharmacy, Base for Clinical Drug Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the dynamic changes of TNF-α mRNA expression in the peripheral blood neutrophils and lymphocytes in postburn rats. **Methods** Wistar rats inflicted with 30% total body surface area (TBSA) Ⅲ degree scald were employed as the model. The peripheral blood neutrophils and lymphocytes were isolated by density gradient centrifugation using Percoll-hypaque and Ficoll-hypaque, respectively. Total RNA of the cells was obtained and purified with Tripure Isolation Reagent. The TNF-α mRNA expression was analyzed by Titan One Tube RT-PCR Kit. **Results** The up-regulation of TNF-α mRNA expression was found in peripheral blood neutrophils and lymphocytes at 6, 12, 24, 48 h and at 3, 6, 12, 24 and 48 h after burn, respectively. TNF-α mRNA expression in both cells reached the peak at 12 h after burn and decreased gradually but remained at a high level at 48 h after burn. **Conclusion** The up-regulation of TNF-α mRNA expression in peripheral blood neutrophils and lymphocytes of postburn rats suggests that severe burn injury may have significant effect on TNF-αexpression in peripheral blood neutrophils and lymphocytes.

Key words: burn; neutrophil; lymphocyte; TNF-α

TNF-α是严重创(烧)伤后体内被激活的单核巨噬细胞等炎性细胞最早释放的细胞因子之一,血TNF-α水平在创伤早期可出现持续升高,并是伤后全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)发生中的重要因素。我们在前期对严重烫伤大鼠的研究中发现,烫伤可致动物外周血中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil, PMN)凋亡延迟和淋巴细胞的大量凋亡[1,2],为了解这种凋亡异常是否会影响细胞产生和释放TNF-α,本研究采用RT-PCR方法对大鼠烫伤前后中性粒细胞和淋巴细胞的TNF-α mRNA表达进行分析,为进一步揭示创伤后炎症反应失控的发生机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器具处理

Percoll液、ficoll-hypaque (d=1.077)液、Tris和Triton X-100均为Sigma产品;RPMI1640培养液(无LPS)购自美国Gibco公司;一步法RT-PCR试剂盒(Titan One Tube RT-PCR Kit)及总RNA提取试剂(Tripure Isolation Reagent)均购自德国Roche公司;PCR分子量标准购自华美公司。试验所用塑料容器均经^{60}Co辐照、玻璃器皿清洁干燥后250 ℃、1.5 h处理以除去LPS污染。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G199905403)
Supported by Projects of National Key Basic Research and Development Plan("973" Projects)(G199905403)
作者简介:夏培元(1963-),男,重庆市人,博士,教授,主要从事细菌感染及其防治、新药方面的临床研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754438, E-mail:xiapy63@163.com
收稿日期:2003-06-24;修回日期:2003-08-30

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

1.2 动物分组及处理

36只Wistar大鼠，2级，体质量(250±15)g，雌雄各半，由本校附属大坪医院实验动物中心提供。随机分为对照组和5个烫伤处理组(伤后3、6、12、24、48 h)，每组6只。烫伤模型复制按我所常规进行[3]，30 mg/kg戊巴比妥腹腔注射麻醉后，剪去背部自肩至髋30%体表面积(Total body surface area，TBSA)毛发，置98 ℃沸水18 s造成Ⅲ度烫伤。在伤后不同时相点经相同方法麻醉后：抽取腔静脉血，分离PMN和淋巴细胞。对照组动物除不复制烫伤外，其余处理同烫伤组。

1.2 外周血PMN和淋巴细胞的分离处理

肝素化腔静脉血以63%(63% Percoll，7 ml 10× PBS，30 ml 1×PBS)和72%(72% Percoll，8 ml 10× PBS，20 ml 1× PBS)Percoll液密度梯度离心收集PMN，残留红细胞以冰冷等渗氯化铵溶液(NH_4Cl 155 mmol/L，$KHCO_3$ 10 mmol/L，EDTA 0.1 mmol/L)按9∶1溶解[4]。苏木素(Merk，Germany)染色后光镜观察证实分离所得细胞中PMN占98%以上，台盼蓝试验显示活细胞超过97%。PMN以1×10^6 cells/ml悬浮于无血清RPMI1640培养液，5% CO_2、37 ℃孵育2 h，离心收集细胞，PBS冲洗两次后待检验。

淋巴细胞以Ficoll-hypaque(d=1.077)密度梯度离心，并于玻璃培养皿中悬浮于无血清RPMI 1640培养液孵育2 h，离心收集外，其余过程同PMN。

1.3 细胞总RNA提取

按试剂盒说明书进行，主要操作步骤为：2×10^6/ml细胞离心收集后，加入1 ml TriPure分离液，置室温5 min；加入0.2 ml氯仿振摇15 s，室温放置15 min，取无色水相部分，加入异丙醇0.5 ml并上下颠倒数次，室温放置10 min后4 ℃，12 000× g离心10 min，去上清；加入75%乙醇振荡冲洗1次，晾干后溶于100 μl DEPC处理的无菌双蒸水中。取2 μl RNA溶液，用DEPC处理的无菌双蒸水稀释至1 ml，于751分光光度计测定OD_{260}/OD_{280}比值，结果＞2表示所得RNA纯净，分装后置－70 ℃备用。

1.4 细胞TNF-α mRNA表达的RT-PCR分析

采用一步法RT-PCR试剂盒对细胞TNF-α的表达进行了分析。引物按文献[5]报道的TNF-α序列设计，并参照文献[6,7]以大鼠核糖体蛋白L28基因表达为内参对照，所有引物均由北京赛百盛生物工程公司合成：

Gene	Sequence of primers used in RT-PCR	Product
TNF-α	Sense: 5′-AGT GAC AAG CCC GTA GCC-3′	489 bp
	Antisense: 5′-TGG GTG AGG AGC ACA TAG-3′	
L28	Sense: 5′-TCT GAA GGC CCG AAA CTC-3′	142 bp
	Antisense: 5′-TCA CGT AGG AAG TGG CAG-3′	

RT-PCR反应的模板RNA临用前50 ℃，30 min孵育处理。PCR扩增条件为：94 ℃，2 min，变性1次；94 ℃，变性30 s；56 ℃，退火1 min；68 ℃，延伸2 min，共35次循环；末次循环后68 ℃，延伸7 min。扩增产物2%琼脂糖电泳分析，结果摄像，TNF-α的表达以TNF-α/L28的光密度比值表示。

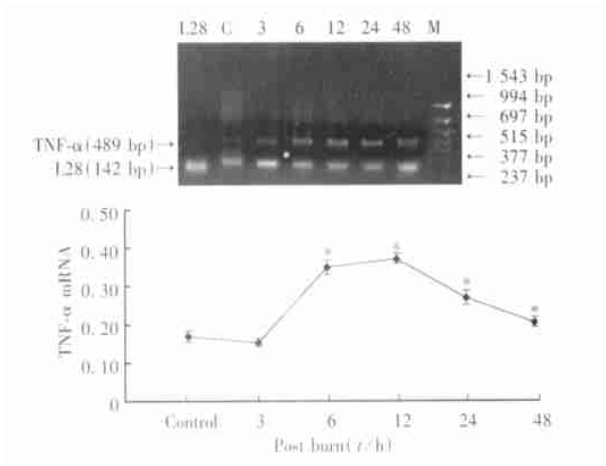
1.5 统计学分析

各组动物RT-PCR结果的TNF-α/L28的比值均计算均数和标准差，并进行Student′ t检验。

2 结果

2.1 烫伤大鼠外周血PMN TNF-α mRNA的表达

PMN中TNF-αmRNA在伤前即有一定程度的表达，在伤后3 h略有下调，6～24 h表达明显增加，伤后12 h达峰，至48 h仍未正常，见图1。



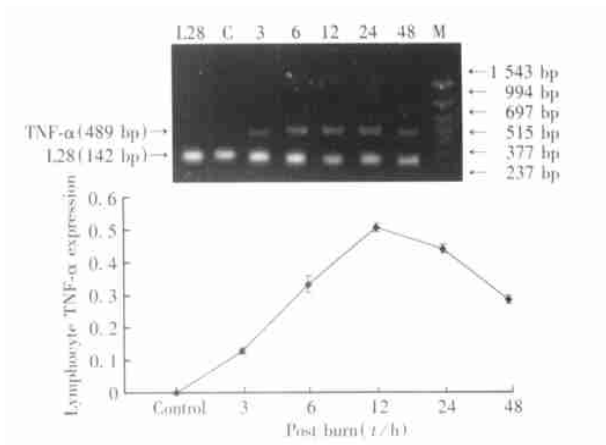
L28, C, 3, 6, 12, 24 and 48: RT-PCR results of blood PMN ribosome protein L28 and TNF-α mRNA expression in one rat at 3, 6, 12, 24 and 48 h before and after burn, respectively; M: Molecular weight marker. *: $P<0.01$ *vs* control

图1 烫伤后血PMN TNF-α mRNA表达

Fig 1 TNF-α mRNA expression in peripheral blood neutrophils after burn

2.2 烫伤大鼠外周血淋巴细胞TNF-α mRNA的表达

TNF-α mRNA在伤前淋巴细胞未发现明显表达，在伤后观察的48 h内表达急剧上升，于伤后12 h达高峰，以后缓慢下降，至48 h仍维持较高水平，见图2。



L28, C, 3, 6, 12, 24 and 48: RT-PCR results of blood lymphocyte ribosome protein L28 and TNF-α mRNA expression in one rat at 3, 6, 12, 24 and 48 h before and after burn, respectively; M: Molecular weight marker. *: $P<0.01$ *vs* control

图2 烫伤后血淋巴细胞TNF-α mRNA表达

Fig 2 TNF-α mRNA expression in peripheral blood lymphocytes after burn

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

3　讨论

较早的研究显示部分临床创(烧)伤患者血液循环中 PMN 的凋亡受到明显抑制[8,9], 并被认为是创伤后局部炎症反应持续存在并加重的关键原因[10]。而我们采用大鼠烧伤模型的研究显示, 在伤后 PMN 凋亡延长的同时, 外周血中的淋巴细胞大量凋亡, 且与伤后机体的免疫低下密切相关[1,2]。循环血液中的 PMN 和淋巴细胞是严重烫伤后参与全身性炎症反应的主要细胞, 由其活化后产生释放的 TNF-α 等细胞介质是导致炎症反应发生的重要因素。由于严重烧伤后早期血 TNF-α 水平即可出现增高, 已有大量研究注意到在伤后脓毒症和多器官功能衰竭的发生发展中, TNF-α 的作用尤为显著[11,12]; 体外研究表明 TNF-α 尚是引起伤后出现这种细胞凋亡异常的诱因之一[13], 因此了解伤后这些凋亡异常细胞中的 TNF-α 表达具有重要意义。

本研究结果表明, 大鼠烫伤前外周血淋巴细胞无 TNF-α 的表达或表达甚少, 而 PMN 存在一定程度的表达, 但在伤后所观察的 48 h 内两种细胞 TNF-α 的表达均持续上调。该时相也是血 PMN 和淋巴细胞凋亡异常发生的时间[1,2], 表明在严重烫伤早期, 不论是延迟凋亡的 PMN 或是有明显凋亡的淋巴细胞, TNF-α 的表达均显著上调, 其机制和意义值得进一步探讨。

参考文献:

[1] Xia P Y, Zheng J, Zhou H, *et al*. Relationship between lymphocyte apoptosis and gut-origin LPS translocation after thermal injury in rats[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 546—550.

[2] 郑　江, 夏培元, 秦孝建, 等. 烫伤后 IL-6 和 IL-1α 对大鼠外周血中性粒细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(5): 608—611.

[3] Yuan J C, Xiao G X, Zhou L X, *et al*. Expression of TNF mRNA in the internal organs after severe burn injury in rats[J]. J Med Coll PLA, 1995, 10(1): 14—17.

[4] Ertel W, Keel M, Infanger M, *et al*. Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation[J]. J Trauma, 1998, 44(5): 767—775.

[5] Furuya T, Joe B, Salstrom J L, *et al*. Polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha locus among autoimmune disease susceptible and resistant inbred rat strains[J]. Genes Immunol, 2001, 2(4): 229—232.

[6] Telleria C M, Sugino J O N, Ferguson S, *et al*. The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid[J]. Endo, 1998, 139(8): 3597—3605.

[7] Wool I G, Chan Y L, Paz V, *et al*. The primary structure of rat ribosomal proteins: the amino acid sequences of L27a and L28 and corrections in the sequences of S4 and S12[J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1050(1-3): 69—73.

[8] Chitnis D, Dickerson C, Munster A M, *et al*. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients[J]. J Leukoc Biol, 1996, 59(6): 835—839.

[9] Nolan B, Collette H, Baker S, *et al*. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NFkappa beta dependent[J]. J Trauma, 2000, 48(4): 599—605.

[10] Biffl W L, Moore E E, Zallen G, *et al*. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure[J]. Surgery, 1999, 126(2): 198—202

[11] 翟红霞, 姚咏明, 陆连荣, 等. 烫伤大鼠组织肿瘤坏死因子 mRNA 表达与内毒素血症的关系[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 15(6): 424—427.

[12] Hadjiminas D J, McMasters K M, Peyton J C, *et al*. Tissue tumor necrosis factor mRNA expression following cecal ligation and puncture or intraperitoneal injection of endotoxin[J]. J Surg Res, 1994, 56(6): 549—555.

[13] Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, *et al*. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and down regulation of reactive oxygen production[J]. Blood, 1999, 93(2): 674—685.

(编辑　张　宁)

欢迎订阅《中国临床康复》杂志

《中国临床康复》(原《现代康复》)杂志是由卫生部主管, 中国康复医学会主办的国家级医学期刊。本刊 2001 年影响因子为 1.373, 论文基金比 0.15。系中国科技论文统计源期刊, 中国医学核心期刊, 百种中国杰出学术期刊, ISSN 1671—5926, CN 21—1470/R。

本刊为临床康复医学医疗、教学、科研服务。及时报道国内外临床康复医学的新理论、新技术、新经验和新进展, 重点组发省部级以上基金项目及各类重点科研课题及优秀博、硕士答辩论文的中文及全英文稿件, 可以"快通道"发稿。

本刊邮发代号: 8—94, A4 开本, 160 页, 12 元/册, 全年 36 册。可分册订阅上、中、下, 144 元/12 册。

地　址: 辽宁省沈阳市和平区十纬路 16 号《中国临床康复》杂志　　邮　编: 110003

联系人: 吕明超

网　址: http://www.zglckf.com　　E-mail: chaoren47@yahoo.com.cn

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