DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.12.015
1062 第25卷第12期 2003年6月 第三军医大学学报 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Vol. 25, No. 12 Jun. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)12-1062-03

大鼠烧伤复合内毒素血症致肝脏细胞凋亡实验研究

孙素群,许霖水,何凤田 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠烧伤复合内毒素血症早期肝细胞的凋亡规律,并初步探讨其机制。方法 烧注组以大鼠体表面积20%Ⅲ度烧伤复合内毒素血症为模型,与正常对照、单烧组、单注组比较,观察其肝脏病理变化、TUNEL检测、DNA凝胶电泳的改变,并测量血浆MDA浓度和SOD活性。结果 烧注组凋亡细胞的数量明显比后两组多且发生时间早,于伤后6 h达到峰值。血浆MDA含量升高趋势和SOD活性降低趋势与肝细胞凋亡发生相一致。结论 烧伤复合内毒素血症大鼠早期肝细胞损伤以凋亡为主,脂质过氧化是其发生机制之一。

关键词:内毒素血症;肝脏;凋亡;脂质过氧化
中图法分类号:R644;R329.28;R631.+1 文献标识码:A

Liver cell apoptosis due to burn injury combined with endotoxemia

SUN Su-qun, XU Lin-shui, HE Feng-tian (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the pathological changes of liver cells in the early periods of burn injury combined with endotoxemia and to explore its mechanisms preliminarily. Methods Rats were inflicted with 20% TBSA Ⅲdegree burn combined with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (burn injury combined with endotoxemia, combined group) or simply burned or simply injected. Each group included 25 rats, with 5 rats left for control. Rats in the former 3 groups were sacrificed and sampled at 1, 3, 6, 12 and 24 h after injury, 5 rats for each time point. The results were observed by HE staining, TUNEL and DNA gel electrophoresis, and the concentrations of plasma MDA and the activity of plasma SOD were assessed and analyzed. Results Apoptosis of liver cells was found in each of the 3 groups but its regularity was different from one another. Much more apoptotic cells in the combined group were found than the other 2 groups and apoptosis happened earlier with its maximum at 6 h postinjury and declined thereafter. Much less apoptotic cells were found in the simply burned group and reached the maximum at 12 h postburn. There were only a few apoptotic cells at 6 h postinjection in the simply injected group in which there were the fewest apoptotic cells in the three groups. The concentration of plasma MDA and the activity of SOD always moved in the opposite way at the same time. In the combined group, the maximum of MDA concentration and the minimum of SOD activity happened at the same time point, which was just before the one of the maximum of liver cell apoptosis. Conclusion During the early period of burn injury combined with endotoxemia, rat liver cells die mainly in the apoptotic way, with lots of apoptotic cells at 6 h and 12 h postinjury, combined with necrosis at 24 h. Lipid peroxidation may partly account for the apoptosis of liver cells.

Key words: endotoxemia; liver; apoptosis; lipid peroxidation

本实验以烧伤复合内毒素血症大鼠为模型,研究烧伤复合内毒素创伤后大鼠肝细胞的早期损伤,并测定其血浆中丙二醛(MDA)浓度和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,以探讨烧伤复合内毒素血症早期肝细胞的病变及其规律。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康Wistar大鼠80只,体质量190~220 g,雌雄不拘,分为正常对照5只、单纯体表烧伤对照组25只(单烧组)、单纯内毒素注射对照组25只(单注组)、烧伤复合注射内毒素实验组25只(烧注组)。除正常组外,各组观察时相点为相应处理后1、3、6、12、24 h,每时相点5只动物。

1.2 方法

采用向德兵等[1]的方法。实验前1 d用8% 硫化钠将大鼠

作者简介:孙素群(1974-),女,湖南省宁乡县人,助教,主要从事细胞损伤机制方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:2002-11-04;修回日期:2003-01-29

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

背部脱毛, 第 2 天实验时用 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 3% 凝固汽油涂抹背部, 覆盖面积占体表总面积的 20%, 燃烧 25 s 后扑灭, 随后以 1 mg/ml 的内毒素(Sigma 公司, 美国)生理盐水溶液按 1 mg/kg 的剂量腹腔注射, 造成 20% III度烧伤复合内毒素血症的烧注组模型; 单烧组仅造成 20% III度烧伤; 单注组仅注射同样剂量的内毒素。正常组于脱毛后腹腔注射等量的生理盐水。

1.3　观察指标与方法

1.3.1　病理组织学光镜观察　　各时相点取肝组织, 经 4% 多聚甲醛缓冲液固定, 按常规包埋、切片(5 μm)、HE 染色, 光镜下观察并照相。

1.3.2　凋亡细胞原位末端标记检测　　肝组织经常规包埋切片(5 μm), 按细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司, 德国)的说明书进行操作。10×40 倍显微镜下选择 5 处视野, 观察每视野的平均阳性细胞数。

1.3.3　DNA 凝胶电泳分析　　根据文献[2] 的方法进行。

1.3.4　生化指标测定　　各时相点经大鼠颈动脉取血, 肝素抗凝, 离心后取血浆置－40 ℃冰箱保存, 待测。MDA 含量和 SOD 活性测定按试剂盒(北京邦定泰克生物公司)说明书进行。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计程序进行 t 检验。

2　结果

2.1　病理组织学变化

正常大鼠肝组织结构正常, 细胞染色清晰, 肝细胞组成的肝板呈放射状。烧注组伤后 1、3 h, 可见肝窦内中性粒细胞聚集, 库普弗细胞肿胀, 肝细胞染色稍浅。烧注后 6、12 h, 肝窦内充满中性粒细胞, 部分肝细胞质疏松。烧注后 24 h, 肝小叶内可见灶性坏死, 其内大量中性粒细胞浸润。单烧组伤后 1、3 h, 肝小叶呈充血性变化, 库普弗细胞轻度肿大, 细胞质中见有较多红细胞碎片。伤后 6、12 h, 肝窦明显充血并见散在中性粒细胞。伤后 24 h, 肝小叶内可见灶性坏死, 但数量显著少于烧注组。单注组注射后 1、3、6 h, 肝窦内中性粒细胞聚集, 库普弗细胞增生肿胀, 以 3 h 明显。注射后 12、24 h, 部分库普弗细胞退变, 肝细胞变性坏死不明显。

2.2　原位末端标记(TUNEL)检测结果

正常对照偶见 TUNEL 阳性细胞。单烧组和单注组阳性细胞数量显著少于烧注组, 见表 1。烧注组 1、3 h 时相点可观察到阳性细胞, 阳性细胞出现高峰为伤后 6 h, 见图 1。

表 1　TUNEL 阳性细胞计数结果　(个, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The statistical results of TUNEL positive cells(cells　$n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Postinjury(h)	Simply injected	Simply burned	Combined
1	—	—	1.2±0.5
3	—	1.6±0.6	5.8±1.3 *
6	2.4±0.6	3.8±0.8	25.4±3.7 *#
12	3.4±1.4	8.8±1.9	21.2±2.8 *#
24	3.2±1.5	6.6±1.1	20.2±2.7 *#

*: $P<0.01$ *vs* simply burned group; #: $P<0.01$ *vs* simply injected group

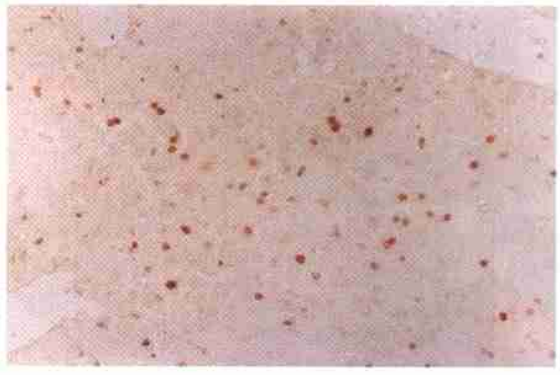
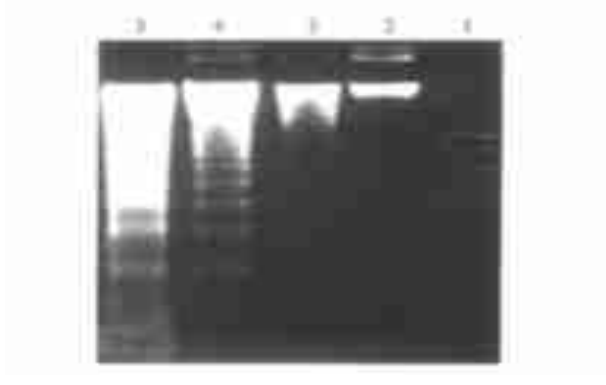


图 1　烧注组伤后 6 h, 肝组织中出现较多的凋亡细胞　(TUNEL× 200)

Fig 1　Many apoptotic liver cells appear at 6 h postinjury in the combined group　(TUNEL× 200)

2.3　DNA 凝胶电泳分析结果

正常对照无 DNA 梯形带出现。烧注组伤后 6、12 h 见明确梯形带, 24 h 时梯形带和坏死带混合出现, 见图 2。



1: marker; 2: the control; 3－5: 6 h, 12 h, 24 h postinjury in the combined group

图 2　DNA 凝胶电泳分析结果

Fig 2　Gel-electrophoretic analysis of the DNA of liver cells in the combined group

2.4　血浆 MDA 含量变化结果

烧注组伤后 3 h 血浆 MDA 含量达到峰值。单烧组和单注组血浆 MDA 含量伤后上升幅度小于烧注组, 见表 2。

表 2　血浆 MDA 含量变化(μmol/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of plasma MDA concentration(μmol/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Postinjury(h)	Simply injected	Simply burned	Combined
1	9.07±0.80	10.92±0.75▲	15.42±1.99▲▲*#
3	9.59±0.86	12.54±0.70▲▲	24.08±1.47▲▲*#
6	10.17±1.16	14.38±1.27▲▲	20.33±1.97▲▲*#
12	10.72±1.18▲	15.29±1.24▲▲	18.49±1.26▲▲*#
24	11.50±0.85▲▲	14.96±1.62▲▲	18.23±1.24▲▲*#

The control concentration of MDA is (8.94±1.19) μmol/L. ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* control; *: $P<0.01$ *vs* simply burned group; #: $P<0.01$ *vs* simply injected group

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

2.5 血浆 SOD 活性变化结果

烧注组伤后 3 h 血浆 SOD 活性达到最低，随后有所恢复，至 24 h 再次降低。单烧组和单注组血浆 SOD 活性变化幅度不如烧注组明显，见表 3。

表 3 血浆 SOD 活性变化（U/ml，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Changes of plasma SOD activity（U/ml，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Postinjury (h)	Simply injected	Simply burned	Combined
1	85.4±10.6	81.5±5.1	71.0±6.6 ▲▲*#
3	81.5±6.9	78.5±5.7 ▲	56.1±6.4 ▲▲** ##
6	77.6±7.9	76.6±5.7 ▲	58.7±5.7 ▲▲** ##
12	74.6±8.3 ▲	69.1±6.0 ▲▲	61.9±8.7 ▲▲##
24	72.0±8.2 ▲▲	70.1±7.7 ▲▲	58.0±5.5 ▲▲* ##

The control activity of SOD is (89.6±8.7) U/ml. ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* control; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* simply burned group; #: $P<0.01$ *vs* simply injected group

3 讨论

单注组细胞凋亡的发生数量较少，且无发生时间上的集中性；单烧组肝脏细胞的凋亡在伤后 12 h 较为集中；而烧注组的细胞凋亡发生不但数量上是前两组的数倍，且其发生时间也集中在伤后 6 h 后。凝胶电泳结果也说明，烧注组伤后 6、12、24 h 确有大量细胞凋亡发生，在伤后 24 h 的凝胶电泳上可以看出，不但有凋亡梯形带，而且其中混有弥漫性的坏死 DNA 片段，光镜观察结果也证实，此时肝脏出现多发性坏死细胞团。在光镜下并未观察到明确的凋亡小体，这和凋亡小体的发生时间有关。一般认为，凋亡小体的出现是细胞凋亡的终末表现，其发生时限很短，往往很快被吞噬。TUNEL 染色和凝胶电泳检测的则是早中期的凋亡细胞[3,4]，其时限较长，这使后两者的检测结果更为可靠。烧注组的细胞凋亡发生程度较其余两个单因素处理组重，说明烧伤和内毒素复合具有加重肝细胞凋亡的作用。烧伤复合内毒素血症可导致肝缺血-再灌注损伤[5,6]。烧伤复合内毒素血症时，1 h 内肝血流急剧下降，之后的 6～12 h 肝血流逐步上升并达到正常水平的 150%，造成缺血再灌注损伤。而单纯烧伤时，仅有缺血过程，而超过正常流量的再灌注不太明显。这可能是本实验中烧注组比单烧组或单注组的肝细胞凋亡程度明显加重的原因之一。缺血再灌注可诱导机体产生大量的氧自由基，烧伤创面产生的大量毒素吸收入血后也可引发机体产生大量氧自由基[7,8]，氧自由基与细胞内物质反应，介导 DNA 损伤，使细胞膜脂质过氧化等[9]。前者可使 ATP 储存迅速耗竭，从而介导细胞凋亡；后者可使细胞内电解质紊乱，特别是细胞内 Ca^{2+} 浓度显著增加，从而激活促使细胞凋亡的各种信号转导途径，诱导细胞凋亡[10]。

SOD 活性和 MDA 含量可反应机体的脂质过氧化水平。烧注组血浆 MDA 含量在伤后 3 h 即达到峰值，而单烧组血浆 MDA 含量在伤后 12 h 才逐渐达到较高水平。结合血浆 SOD 活性变化，可以看出在 MDA 含量上升的同时，血浆 SOD 活性几乎在同时相点呈现相反的变化。就烧注组而言，其血浆 SOD 活性达最低值和 MDA 含量升高达最高值的发生时间都恰好在肝细胞凋亡高峰发生的前一时相点，这说明烧注组动物整体脂质过氧化水平的升高和机体抗氧化能力的降低可能是导致肝细胞凋亡的直接因素。

参考文献：

[1] 向德兵，刘友生，王水明，等. TGF-β_1 在烧伤合并内毒素血症骨髓粒单系；造血变化中的作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(10)：1157－1160

[2] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 660－661.

[3] Gressner A M, Polzar B, Lahme B, *et al*. Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts *via* transforming growth factor beta[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 571－581.

[4] Mori Y, Hashimoto K, Tanaka K, *et al*. A study of apoptosis in Merkel cell carcinoma: an immunohistochemical, ultra-structural, DNA ladder, and TUNEL labeling study[J]. Am J Dermatopathol, 2001, 23(1): 16－23.

[5] Tadros T, Traber D L, Herndon D N. Hepatic blood flow and oxygen consumption after burn and sepsis[J]. J Trauma, 2000, 49(1): 101－108.

[6] Tadros T, Traber D L, Herndon D N. Trauma-and sepsis-induced hepatic ischemia and reperfusion injury[J]. Arch Surg, 2000, 135(7): 766－772.

[7] Youn Y K, Lalonde C, Demling R. Oxidants and the pathophysiology of burn and smoke inhalation injury[J]. Free Radic Biol Med, 1992, 12(5): 409－415.

[8] Nguyen T T, Cox C S, Traber D L, *et al*. Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: the 1993 Moyer Award[J]. J Burn Care Rehabil, 1993, 14(6): 602－609.

[9] 田晓华，顾景范，孙存普. 氧化应激与细胞凋亡[J]. 军事医学科学院院刊，1996，20(4)：302－305.

[10] Trump B J, Berezesky L R. Calcium-mediated cell injury and cell death [J]. FASEB J, 1995, 9(2): 219.

（编辑 陈聪连）

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