DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.029
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)03-0255-03

GR和HSP70在大鼠严重多发伤后肝组织中的变化及其意义

罗东林,周继红,刘宝华,黄显凯,熊仁平,张云东,陈金萍 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 从组织细胞受体水平探讨糖皮质激素受体(GR)、热休克蛋白70(HSP70)在严重多发伤后肝脏中的变化及其作用。方法 采用严重胸部撞击伤伴单侧股骨骨折模型,肝组织GR采用放射配体结合分析法测定最大结合容量、免疫印迹法测定其蛋白含量,HSP70采用免疫印迹法测定其蛋白含量,并进行计算机图像分析。结果 严重多发伤后肝组织GR的最大结合容量及蛋白含量均显著下降,12 h降至最低,24 h有所恢复;HSP70在伤后迅速增加,8 h达到峰值,24 h仍持续在较高水平。但肝脏病理无明显改变;血清生化指标ALT、TB的改变虽呈逐渐增高的趋势,但无显著意义。结论 GR在严重多发伤后肝组织细胞的抗损伤机制方面可能起着重要作用,HSP70可能参与了肝组织细胞抗损伤机制的启动。

关键词:多发伤;糖皮质激素受体;热休克蛋白;肝脏;抗损伤
中图法分类号:R322.47;R392.11;R64 文献标识码:A

Changes and significance of GR and HSP70 in liver tissue in rats after severe multiple injury

LUO Dong-lin, ZHOU Ji-hong, LIU Bao-hua, HUANG Xian-kai, XIONG Ren-ping, ZHANG Yun-dong, CHEN Jin-ping
(Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes and functions of GR and HSP70 at the level of tissue cell receptor in liver after severe multiple injury. **Methods** Rat model was established by adopting severe thoracic impact injury accompaning mono-side femur fracture. Maximum binding volume of glucocorticoid receptor (GR) was determined by radioligand binding in hepatic tissue. The expression of GR and heat shock protein 70 (HSP70) in hepatic tissue was determined by Western blot and analyzed with computer imaging system. **Results** Maximum binding volume and protein content of GR gradually decreased in hepatic tissue after severe trauma, reaching the lowest at 12 h after trauma, and gradually recovered at 24 h after trauma. HSP70 gradually increased in hepatic tissue after severe trauma and peaked at 8 h after trauma, and maintained at a rather high level at 24 h after trauma. No remarkable pathological changes in the liver and significance of blood serum ALT and TB were found after trauma. **Conclusions** GR may play an important role in anti-injury mechanism of hepatic tissue cell after severe multiple injury. HSP70 may participate in the start of anti-injury mechanism of hepatic tissue cell.

Key words: multiple injury; glucocorticoid receptor; heat shock protein; liver; anti-injury

严重创伤与多脏器功能衰竭的关系十分密切,肝脏在多脏器功能衰竭的发生中起着重要作用,肝功能的改变必将影响机体的应激调节功能,进而影响机体的预后和转归。创伤后引起肝损害的因素很多,但由于肝脏有较强的代偿能力,创伤后早期肝脏损害并不明显。糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)和热休克蛋白70(Heat shock protein70, HSP 70)是应激状态下较重要的指标之一,它们在严重多发伤后肝脏中的变化及其作用机制如何,文献报道不多。为此,我们复制了严重胸部撞击伤伴单侧股骨骨折多发伤模型,观察GR和HSP70在这一应激过程中肝组织的变化及其作用。

1 材料与方法

1.1 严重多发伤模型

实验动物:雄性健康Wistar大鼠48只,体重(250±30) g,实验前禁食,自由饮水。严重多发伤模型:采用小型生物撞击机[1],以500 kPa驱动压,伤距2 cm,弹头重量7.28 g,长度25.5 mm,撞伤面积40.7 mm^2,撞击大鼠右胸壁第4、5肋间与腋中线交界处,造成右上、中肺出血、水肿,同时折断右侧股骨中段,造成严重多发伤。ISS评分法为18分。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200)
作者简介:罗东林(1967-),男,重庆市垫江县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事消化系疾病方面的研究,发表论文17篇,现在普通外科工作。电话:(023)68757248
收稿日期:2001-10-18;修回日期:2002-01-10

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

1.2 观察指标

随机分成正常对照组(8 只)、严重多发伤组(40 只)。分别于创伤后 1、4、8、12、24 h 处死动物,每个时相点 8 只动物,取股动脉血,采用全自动生化分析仪测定血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TB);解剖观察肝脏的大体病理变化及光镜下改变;取肝组织,采用放射配体结合分析法测定 GR 的最大结合容量(B_{max})及其平衡解离常数(Kd);采用 Western blot 印迹分析法测定 GR 和 HSP70 的蛋白含量,在 PECBIAS-6803 图像分析仪上测定表达产物的吸光度值。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验、t 检验以及相关分析。

2 结 果

2.1 肝组织 GR 的 B_{max} 及其 Kd 值变化

创伤后 Kd 值无明显变化,GR B_{max} 即开始逐渐下降,伤后 4 h 明显低于正常对照($P<0.05$),12 h 降至最低,仅为正常对照的 12.9%($P<0.01$);伤后 24 h,B_{max} 有所回升,但仍明显低于正常对照($P<0.05$),见表 1。

表 1 伤后大鼠肝组织 GR B_{max} 和 Kd 值的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of GR B_{max} and Kd in hepatic tissue in rats after severe trauma ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Marker	Control	Time after trauma (h)				
		1	4	8	12	24
B_{max} (mol/mg)	208.5±12.5	180.2±10.2	159.8±9.4 *	84.8±6.8 **	26.8±3.4 **	124.5±8.3 *
Kd(mol/L)	0.148±0.02	0.165±0.03	0.170±0.02	0.174±0.03	0.243±0.02	0.154±0.02

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

2.2 肝组织 GR、HSP 的蛋白含量(吸光度值)变化

2.2.1 GR 的变化 创伤后 GR 即开始减少,随着伤后时间延长,呈进行性下降,12 h 降至最低,24 h 有所恢复。

2.2.2 HSP70 的变化 HSP70 在正常对照肝组织中表达极低,创伤后即刻开始表达,随伤后时间延长,表达逐渐增加,8 h 达到峰值,24 h 仍持续在较高水平,见表 2。

表 2 肝组织 GR、HSP70 蛋白含量(吸光度值)的变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of the protein content of GR and HSP70 in hepatic tissue($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Marker	Control	Time after trauma (h)				
		1	4	8	12	24
GR	20.8±3.5	18.9±3.3	12.8±2.4 *	8.93±1.5 **	4.56±0.8 **	11.7±2.2 *
HSP70	4.08±0.42	8.38±1.07 **	20.8±1.87 **	21.7±2.10 **	6.56±0.75 *	13.3±1.23 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

2.3 肝脏的病理变化

肝脏的大体改变:严重多发伤组与正常对照组无显著差异;光镜改变:严重多发伤后,肝细胞结构正常,排列整齐,至伤后 24 h,肝细胞出现轻微浊肿,排列轻微紊乱,肝窦内无明显炎性细胞浸润,见图 1。

2.4 肝功能生化指标

严重多发伤后,ALT、TB 随着时间延长,有逐渐增高的趋势,虽然在伤后 12、24 h 与正常对照相比,有一定差异,但均在正常范围之内,见表 3。

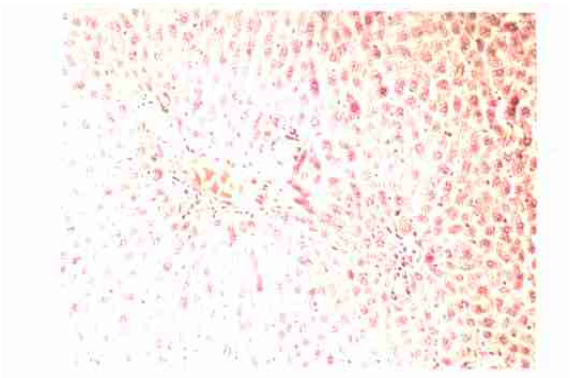


图 1 创伤后 24 h,肝细胞结构基本正常,部分肝细胞索排列紊乱,未见明显炎性细胞浸润 (HE× 200)

Fig 1 The formation of hepatic cells was basically normal, the arrangement of a portion of hepatic cells cords was in disorder, and no obvious infiltrated inflammatory cells were found in hepatic sinusoid after severe trauma (HE× 200)

表 3 肝功能生化指标 ALT、TB 变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes of the hepatic function markers of ALT and TB($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Marker	Control	Time after trauma (h)				
		1	4	8	12	24
ALT(IU/L)	32.2±3.6	34.6±4.2	38.4±4.8	42.6±5.2	48.2±6.3 *	52.4±7.2 *
TB(mol/L)	1.8±0.2	1.9±0.2	2.0±0.3	2.0±0.3	2.1±0.4 *	2.1±0.4 *

*: $P<0.05$ *vs* Control

3 讨论

本实验建立的胸部撞击伤伴单侧股骨骨折模型具有撞击设备先进,操作简便,致伤参数易控制,撞击部位准确,重复性好等特点[1],创伤后肺损伤主要表现为片状与弥漫性出血、水肿,股骨中段骨折处淤血及血肿形成,伤情与临床较为接近,参照人多发伤,按 ISS 评分法,达 18 分,为重度多发伤。在此模型下,虽然机体受到严重多发伤,但早期肝脏功能并没有明显改变,由于肝脏有很强的代偿能力,这并不能说明严重创伤后早期没有肝损害的发生。因此,研究创伤后早期肝脏抗损伤的较为敏感的指标具有重要意义。

本实验结果表明,在严重创伤应激条件下,肝组织糖皮质激素受体(GR)的最大结合容量及其蛋白含量均显著减少,这可能是由于糖皮质激素(GC)效应是机体最为重要的应激反应之一,其中 GR 是 GC 效应发挥的关键环节,GC 需要与 GR 结合后才能发挥作用。表明机体在严重创伤后,通过 GR 的下调,以缓解过度增高的糖皮质激素引起的应激效应。研究表明,GR 和 GC 结合后具有重要的抗炎和抗免疫作用[2,3],当受到严重创伤等强烈刺激时,机体产生以炎症反应为主的

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

防御反应,为防止炎症反应过度,作为应激反应机体又会释放大量 GC,通过 GC 激活 GR 来发挥其抗炎作用[4]。亦有人提出 GC 与其受体 GR 的复合物是体内最重要的抗炎机制,并在内毒素血症中得到证实[5]。我们的实验结果进一步提示,GR 在严重创伤后早期肝组织细胞抗损伤机制方面发挥着重要作用。

热休克蛋白是细胞受应激原刺激后诱导产生的一组应激蛋白,一般认为 HSP70 可以提高细胞的应激能力,抵御各种损害因素的影响,起到保护细胞的作用。研究表明,HSP70 能够参与免疫反应,能保护细胞对抗肿瘤坏死因子和内毒素的损伤。本实验结果 HSP70 在创伤后即开始在肝组织中表达,创伤后 24 h 仍持续在较高水平,提示 HSP70 亦可能是创伤后早期参与肝组织细胞抗损伤机制的一个重要因素,并可能参与了肝组织细胞抗损伤机制的启动。Buchman 等[6] 报道 HSP70 对肝细胞的保护作用主要通过抗过氧化损害,防止肝细胞受损;缺血肝细胞上调 HSP 表达基因,在蛋白和 mRNA 水平均有显著性升高;阻止 TNF-α 诱导的培养大鼠肝细胞凋亡等途径。

本实验显示,严重多发伤后,肝组织 GR 明显减少,HSP70 增加,但没有明显的肝功能损害,提示 GR 与 HSP70 在创伤应激过程中在肝组织细胞损伤与抗损伤方面存在某种联系,但它们在严重创伤应激过程中,究竟是独立发生的生物学效应,抑或相互作用,则有待进一步研究。

参考文献:

[1] 王正国,孙立英,刘宝松,等. 生物撞击机的研制及撞击伤发生的研究[J]. 中华创伤杂志, 1999, 15(4): 293-297.
[2] Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, *et al*. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids[J]. Mol Endocrinol, 1995, 9(4): 401-412.
[3] De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors[J]. J Neuroimmunol, 2000, 109(1): 16-22.
[4] Munck A, Naray Fejes Toth A. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions[J]. Ann N Y Acad Sci, 1994, 746: 115-130.
[5] 徐仁宝. 体内的抗炎机制及其意义[J]. 生理科学进展, 1994, 25(4): 305-308.
[6] Buchman T G, Abello P A, Smith E H, *et al*. Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin [J]. Am J Physiol, 1993, 265(1 Pt 2): H165-170.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2003)03-0257-01

个案与短篇

球结膜下注射庆大霉素致视网膜中毒性改变 1 例

A case report of retinal toxicity due to subconjunctival gentamicin injection

郑 莎,谢汉平,阴正勤,江文珊 (第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038)

患者,男性,26 岁,于 2001 年 11 月 4 日因患左眼角膜炎于某院治疗,结膜下注射庆大霉素 2 万 U。注射前视力 1.0,注射后即感头痛,左眼突然视物不见,予以硝酸甘油 1.0 mg 含服 30 min,低分子右旋糖酐 500 ml 静滴,1/d,阿司匹林肠溶片 25 mg 口服,3/d,维生素 B_{12} 1.0 ml、胞二磷胆碱 0.4 g 肌注,1/d,治疗 3 d 后未见明显好转,故 2001 年 11 月 14 日入我科门诊求治。查体:左眼无光感,结膜充血,角膜鼻下方见一小圆形瘢痕,前房、虹膜、晶状体(-),玻璃体混浊(++),眼底:视乳头苍白,水肿,界限不清,全视网膜苍白、水肿、坏死,可见片状陈旧性出血,静脉细,动脉呈现白线样,黄斑区见樱桃红色,中心凹反射消失。荧光血管造影显示:视网膜中央动脉未见充盈,伴行静脉均未见荧光充盈,视网膜后极部及中央部均未见荧光充盈,隐约可见脉络膜背景荧光,视盘上方,视网膜下大片高荧光,视盘侧未见荧光充盈。左眼眼底荧光造影诊断:① 左眼视网膜中央动脉完全阻塞;② 视网膜急性中毒性缺血坏死。予以:葛根素 100 mg 静滴,1/d,地塞米松注射液 15 mg 静滴,1/d,维生素 B_1、B_2 肌注,1/d,用药 5 d 后,因经济困难,停药出院,患者视网膜坏死未见明显好转,视力丧失已不可挽回。

讨论

球结膜下注射庆大霉素后,药物直接透入眼前段,消炎、抗感染效果明显,是内眼术后及眼前段疾病的常规治疗手段。如果误将大剂量注入眼球内,超过视网膜组织的耐受限度(100 μg[1]),可导致视网膜急性中毒性改变,严重者引起视力丧失。视网膜毒性反应机制的研究表明:庆大霉素可选择性的聚集在溶酶体中,通过降低神经磷脂酶及磷酸脂酶的活性导致磷脂分解代谢紊乱[2],药物 pH 值及所含防腐成分也可能参与毒性反应[3]。一般认为人眼眼底所表现出的广泛血管改变继发于神经毒性作用,但也不排除药物直接破坏毛细血管的可能[4]。庆大霉素对视网膜损伤程度随注入剂量增加而加重;全层视网膜

(下转 259 页)

作者简介:郑 莎(1979-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事角膜病变方面的研究。电话:(023)68754000-73180

收稿日期:2002-03-04;修回日期:2002-06-06

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