DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.001
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0123-03

论著

放烧复合伤对小鼠巨噬细胞IL-12表达影响的实验研究

王延江,粟永萍,艾国平,胡川闽,冉新泽,刘晓宏,郭朝华,袁良平,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨放烧复合伤对小鼠腹腔巨噬细胞数量、生长状态和IL-12基因表达影响的时效特点。方法 于不同时相点分离、计数放烧复合伤小鼠(5 Gy γ射线全身照射+15% Ⅲ度烧伤)腹腔巨噬细胞,并观察其生长状态,RT-PCR法检测其IL-12 p35和p40的基因表达水平。结果 ①伤后巨噬细胞数量早期减少,后期恢复;②伤后IL-12 p35表达量降低,而p40表达量增加;③伤后3 d是巨噬细胞数量及其IL-12基因表达变动最剧烈的时期。结论 放烧复合伤后IL-12 p35基因表达的降低和IL-12 p40基因表达的增强必将导致IL-12 p70的减少和拮抗剂$(p40)_2$的增加。伤后3 d是放烧复合伤救治的关键时期。只有同时检测IL-12 p35和p40才能正确反映放烧复合伤后IL-12的基因表达状况。

关键词:放烧复合伤;巨噬细胞;IL-12;基因表达
中图法分类号:R392.11;R644;R818.74 文献标识码:A

Influences of radiation-burn combined injury on IL-12 expression and survival of macrophages in mice

WANG Yan-jiang, SU Yong-ping, AI Guo-ping, HU Chuan-min, RAN Xin-ze, LIU Xiao-hong, GUO Chao-hua, YUAN Liang-ping, CHENG Tian-min (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the influences of radiation-burn combined injury on cell number and IL-12 expression of peritoneal MΦs (pMΦs). Methods At different timepoints after injury, pMΦs were purified and counted, and their IL-12 expression was detected with RT-PCR. Results ①pMΦs were reduced markedly after injury; ②IL-12 p35 expression was lowered while p40 expression was elevated after injury; ③Great changes in cell number and IL-12 transcription of pMΦs were found on the 3rd day after injury. Conclusion Reduction of pMΦs, decrease of IL-12 p70, and increase of $(p40)_2$ are important factors to the suppressed immunity after irradiation-burn combined injury. The critical time of treatment for radiation-burn combined injury is on the 3rd day after injury. Only the combination of p35 expression with p40 expression can be used to appropriately evaluate the state of IL-12 expression after radiation-burn combined injury.

Key words: radiation-burn combined injury; peritoneal macrophage; interleukin-12; gene expression

放烧复合伤是核战争条件下的一类重要和难愈性伤类,死亡率极高。免疫低下是放烧复合伤救治的一个重要环节。巨噬细胞是参与免疫活动的主要细胞。IL-12主要由巨噬细胞分泌,它不但能诱导Th0细胞分化为Th1,而且还能促进CTL的增殖反应,激活其细胞毒活性,在机体细胞免疫的调控中发挥关键性的作用,被认为是连结天然免疫和获得性免疫的桥梁[1]。目前尚未见IL-12与放烧复合伤后免疫功能障碍关系的报道。本实验主要目的是探讨放烧复合伤对小鼠腹腔巨噬细胞数量和IL-12基因表达水平影响的时效特点。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

选用成年健康雄性昆明种小鼠,参照随机数字表并考虑到伤后小鼠存活情况及是否满足标本采集等因素,将70只小鼠随机分为正常对照组(Control,5只)、放烧复合伤后3(15只)、9(15只)、14(15只)、26(20只)d组。^{60}Co γ射线一次性全身照射5 Gy后0.5 h内完成背部皮肤15%体表面积Ⅲ度烧伤。每组取材动物数为5~10只。

1.2 腹腔巨噬细胞的分离、鉴定、计数和总RNA提取

股动脉放血处死小鼠。用5 ml含20 mmol/L EDTA的RPMI1640培养基灌洗腹腔。收集腹腔灌洗液,1 200× g离心3 min,弃上清。以5~10 ml含10%胎牛血清的RPMI1640培养基重悬细胞。于5% CO_2、饱和湿度和37 ℃条件下孵育2 h。收集贴壁细胞作涂片,经酸性α醋酸萘酯酶(ANAE)染色和HE染色证实腹腔巨噬细胞比例大于90%。

用细胞计数板按常规计数,以细胞总数与小鼠体重之比来代表该小鼠的巨噬细胞水平。用1 μg/ml LPS刺激巨噬细胞6 h后收集细胞,参照Tripure Isolation Reagent(Roche, USA)说明书,提取细胞总RNA。

1.3 逆转录酶反应(RT)

按照1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV)(Roche, USA)说明书进行。冰上配制反应体系:10× reaction buffer 2.0 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 4.0 μl,Deoxynucleotide Mix 2.0 μl,Oligo-$p(dT)_{15}$ 2.0 μl,RNase inhibitor 1.0 μl,AMV reverse transcriptase 20 U(1 μl),Sterile water 4 μl,RNA样本于65 ℃变性5 min,冰浴5 min后加入4 μl(4 μg)至反应体系中,混匀。于25 ℃反应10 min后置42 ℃水浴60 min,随后于99 ℃变性5 min,冰浴5 min,置-20 ℃保存备用。

基金项目:全军"九五"医药卫生攻关课题(96L045)
作者简介:王延江(1971-),男,四川省邛崃县人,硕士,讲师,主要从事放烧复合伤机体免疫功能障碍与调控方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68757181
收稿日期:2001-03-12;修回日期:2001-05-20

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

1.4 多聚酶链式反应(PCR)

按照 AmpliTaq Golden™ Polymerase Chain Reaction Kit(PE, USA)反应体系: 10× reaction buffer Ⅱ ($MgCl_2$ containing) 3 μl, 25 mmol/L dNTP Mix 0.24 μl, AmpliTaqase 0.15 μl(0.75 U), Sense primer 3.0 μl(30 pmol), Antisense primer 3.0 μl(30 pmol), cDNA 模板 0.6 μl, H_2O 18.8 μl, 总体积 30 μl。PCR 循环参数为: 94 ℃, 1 min, 58 ℃, 1 min, 72 ℃, 1 min。HPRT、IL-12 p35 和 p40 均扩增 35 个循环。HPRT 引物序列: sense 5′-GTC GGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′, antisense 5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-3′, 产物长度 256 bp; IL-12 p35 引物序列: sense 5′-CTT TGA TGA TGA CCC TGT GC-3′, antisense 5′-TTT GGG GAG ATG AGA TGT GA-3′, 产物长度 451 bp; IL-12 p40 引物序列: sense 5′-GAA GTA TTC AGT GTC CTG CC-3′, antisense 5′-TGT CTT CTC TAC GAG GAA CGC-3′, 产物长度 343 bp。

以 HPRT 作为内参照, 将目的基因与 GAPDH 之间 D_λ 值的比值作为该样本目的基因的表达量。

1.5 统计学分析

采用第四军医大学 SPLM 2.3 软件包对结果进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 放烧复合伤后腹腔巨噬细胞数量的动态变化

伤后各时相点小鼠腹腔巨噬细胞数与对照组相比均显著减少。其中伤后 3 d 最低($P<0.01$), 9 d 以后逐步增加, 但到伤后 26 d 时仍未恢复到正常水平($P<0.05$), 见图 1。

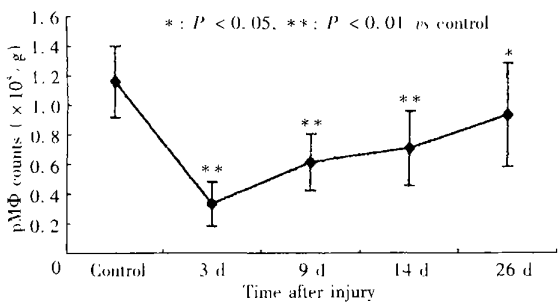


图 1 放烧复合伤后小鼠腹腔巨噬细胞数量的动态变化影响

Fig 1 Influence of radiation-burn combined injury on population of pMΦs

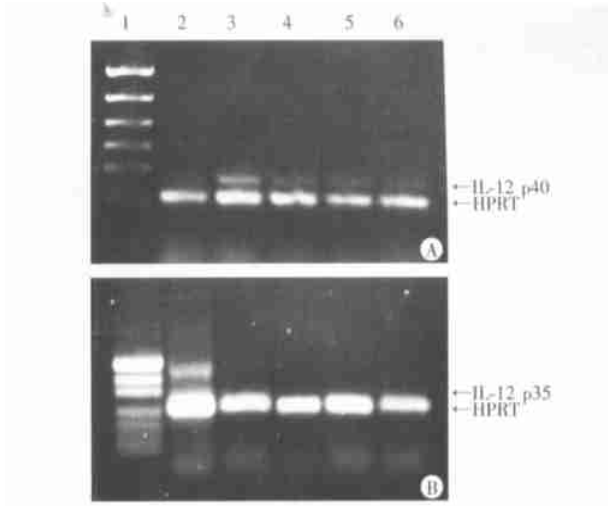
2.2 放烧复合伤后腹腔巨噬细胞 IL-12 p35 和 p40 表达量的动态变化

伤后 IL-12 p40 表达水平明显增加, 于 3 d 时达到最高, 此后逐渐下降, 但伤后 26 d 时仍高于正常水平; IL-12 p35 的表达则于照后严重抑制, 各时相点未见恢复迹象, 见表 1, 图 2。

表 1 放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞 **IL-12 p35** 和 **p40** 亚基的基因表达

Tab 1 Expression of IL-12 p35 and p40 in pMΦs of mice after radiation-burn combined injury

IL-12 subunits	Control(n=5)	Time after injury			
		3 d (n=10)	9 d (n=10)	14 d (n=7)	26 d (n=8)
p35[D_λ(p35)/D_λ(HPRT)]	0.20	0.08	0.01	0.02	0.01
p40[D_λ(p40)/D_λ(HPRT)]	0.06	0.32	0.25	0.21	0.13



1: Marker(A: 237, 377, 515, 695, 994, 1 542 bp; B: 111/110, 147, 190, 242, 331, 404, 501/498 bp); 2: Control; 3~6: 3, 9, 14, 26 d after injury

图 2 放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞 **IL-12 p35** 和 **p40** 亚基的基因表达

Fig 2 Expression of IL-12 p35 and p40 in pMΦs of mice after radiation-burn combined injury

3 讨论

一般来讲, IL-12 两亚基的表达变化趋势是一致的, 因而多通过检测 p40 的表达量来反映 IL-12 p70 的水平[2]。但从本实验观测到, 放烧复合伤后 IL-12 两亚基表达的变化规律是相反的, 即 p40 表达增强, 而 p35 表达受抑。这提示在今后复合伤的研究中, 必须同时检测 p35 和 p40 才能准确反应 IL-12 的表达状况。

关于放烧复合伤后 IL-12 两亚基反向表达的机制尚不清楚, 根据文献[3, 4]报道, 重度烧伤后 IL-12 两亚基的表达受到严重抑制, 尤其是 p40 亚基。因此可能存在 γ 射线全身照射对 IL-12 p40 亚基表达的上调作用。我们将进一步分别研究放射损伤和烧伤对 IL-12 两亚基表达的影响方式及其机制。

IL-12 由 p35 和 p40 两个亚基组成。由 p35 和 p40 构成的异二聚体 IL-12 p70 具有 IL-12 的生物活性, 而由两个 p40 构成的同二聚体$(p40)_2$是 IL-12 p70 的竞争性拮抗剂[5~7]。放烧复合伤后巨噬细胞 IL-12 p35 表达的严重抑制和 p40 表达的显著增强, 必然导致具有生物活性的 IL-12 p70 减少和拮抗剂$(p40)_2$增加进而影响机体细胞免疫功能。因在伤后 26 d 时 IL-12 p35 的表达仍未见恢复, 故 IL-12 基因表达的抑制可能是长期性的。所以提高伤后巨噬细胞 IL-12 p35 的表达对于放烧复合伤的救治具有重要的现实意义。

放射损伤后腹腔巨噬细胞的存活数量显著减少, 尤以 3 d 时为重。这在时间上与 IL-12 基因表达的变化一致, 表明伤后 3 d 可能是巨噬细胞的免疫功能受损最重的时相点, 同时伤后 3 d 内也是受伤动物休克死亡的高峰期, 因此提示伤后 3 d 是放烧复合伤救治的关键时期。

综上所述, 放烧复合伤后 IL-12 p35 基因表达的降低和 IL-12 p40 基因表达水平的增强必将导致 IL-12

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

p70 的减少和$(p40)_2$的增加。伤后 3 d 是放烧复合伤救治的关键时期。只有同时检测 IL-12 p35 和 p40 才能正确反映放烧复合伤后 IL-12 的基因表达状况。

参考文献：

[1] Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells[J]. Immunol Today, 1993, 14(7): 335—338.
[2] Sutterwala F S, Noel G J, Clynes R, *et al*. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation[J]. J Exp Med, 1997, 185(11): 1 977—1 985.
[3] Goebel A, Kavanagh E, Lyons A, *et al*. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interlaukin-12 therapy after injury restores resistance to injection[J]. Ann Surg, 2000, 23(2): 253—261.
[4] O' Sullivan S T, Lederer J A, Horgan A F, *et al*. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection[J]. Ann Surg 1995, 222(4): 482—492.
[5] Gillessen S, Carvajal D, Ling P, *et al*. Mouse interleukin-12(IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(1): 200—206.
[6] Gubler U, Chua A O, Shoenhaut D S, *et al*. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(10): 4 143—4 147.
[7] Snijders A, Hilkens C M, van der Pouw Kraan T C, *et al*. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit[J]. J Immunol, 1996, 153(3): 1 207—1 212.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2002)02-0125-01

个案与短篇

前臂残端弃指异位再植 1 例

Heterotopic transplantafion of severed digites to forearm stump for restoring partial hand function: A case report

孙红振，王爱民，蒋祖言，吴思宇，杜全印　（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所手足显微外科，重庆 400042）

患者，男性，12 岁，左手绞肉机绞伤，嵌顿 1.5 h 而于 1998-10-01 急诊入院，见图 1。臂丛麻醉下，将各指分别离断取出，倒转机器，解脱嵌顿。手掌腕部、拇指毁损，2～5 指也毁损至近节指骨中段，见图 2。选择损伤较轻的食、中指，分别用克氏针固定在前臂尺桡骨上，两指之间成 30° 角，修复指屈伸肌腱；指动脉与尺桡动脉，指背静脉与手背静脉端侧吻合，修复指神经，重建指蹼。术后抗感染、解痉、扩张微血管处理。再植指成活，伤口一期愈合。术后 6 月，感觉恢复 S4 级，前臂旋后时两指分开 6.5 cm，旋前时两指可对指，抓捏小物件，功能满意，见图 3、4。



图 1　手在机器中嵌压情况

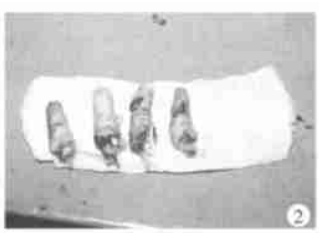


图 2　手指损伤严重



图 3　前臂旋后时两指张开

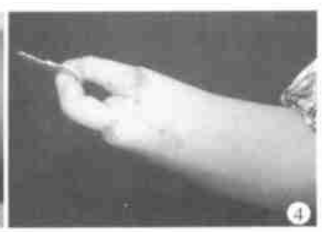


图 4　再造手的功能

讨论

掌腕部毁损性损伤的患者，后期功能重建难度大。我国于仲嘉首先应用人工掌骨假体支架，种植于前臂残端，在此支架上移植足趾，以此进行重建手的尝试。对初次就诊残肢已经没有手指可利用的患者，急诊取同侧第二足趾游离移植来重建拇指，与残端桡骨形成“新手”，也获得满意的效果[1]。程国良[2]首先采用将废弃手指异位再植于前臂来重建手功能，取得很大成功。

该病例有以下特点：①患者年龄小，损伤已累及手指近段，重建难度大。②手仍被绞肉机嵌压，取出稍有不慎，损伤将进一步加重，使重建完全丧失条件。③手指再植于前臂，其解剖结构相差较大，一般将一指重建于尺骨，另一指建于桡骨，两指之间有一定角度。这样手指随着前臂的旋转，两指可分合，从而完成抓捏功能。手指再植的数量不宜多，以 2～3 指为宜，手指太多，显得拥挤，手指活动相互受到影响。④解剖结构上手指血管与前臂血管管径悬殊，缝合难度大，需要过硬的显微外科技术。

关键词：手再造；再植
中图法分类号：R658.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Yu Z J, Huang Y C, Yu S, *et al*. Thumb reconstruction in a bilateral upper extremity amputee: an alternative to the Krukenburg procedure[J]. J Hand Surg Am, 1999, 24(1): 194—197.
[2] 程国良，潘达德. 手指再植与再造[M]. 北京：人民出版社，1997. 413—443.

（编辑　薛国文）

作者简介：孙红振(1966—)，河北省临漳县人，硕士，主治医师，主要从事手的修复与重建方面的研究。电话：(023)68757274

收稿日期：2000-02-18；修回日期：2001-06-28

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