DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.008


# 烧冲复合伤早期肺组织 ET-1及 ETAR转录表达的研究*

周继红** 朱佩芳 王正国 刘大维 李晓炎 刘宝华 (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, 630042

提 要 目的: 探讨内皮素-1(ET-1)、内皮素 A型受体 (ETAR)及肿瘤坏死因子 α(TNFα)在烧冲复合伤病理生理过程中的作用和地位。方法: 应用放射免疫及原位杂交和斑点杂交等核酸分子生物学技术,观测大鼠烧伤和烧冲复合伤后肺组织 ET-1、ETR及 TNFα的转录表达变化、相互关系及与组织细胞损伤的关系。结果: 伤后早期肺组织 TNFα及 ET-1的 mRNA转录及其产生分泌均显著增加,血浆一氧化氮 (NO)也有所增加,肺组织中的内皮素 A型受体 (ETAR) mRNA升高,但 ETR却"下调",各项指标变化均以烧冲复合伤组为显著,并与肺组织病理变化相关。结论: ET-1及其受体 ETAR等在烧冲复合伤后肺的病理生理过程中可能起着重要作用。

关键词 烧冲复合伤;内皮素;内皮素受体;肿瘤坏死因子;基因表达

中图法分类号 R818.02

烧冲复合伤后机体主要的病理变化包括: 肺及皮肤等组织器官的原发性损伤、呼吸功能障碍和随后发生的循环功能障碍。循环功能障碍的发生与伤后血浆持续丧失、血液浓缩、血管舒/缩功能障碍等有密切关系。内皮素-1(ET-1)是近几年发现的一种强血管活性多肽,它与内皮素 A型受体 (ETAR)结合产生极强的收缩血管和支气管的作用[1-3]。我们推测 ET-1和 ETAR可能在烧冲复合伤后肺功能障碍中有一定作用。但它们在烧冲复合伤后肺组织中的变化与组织损伤、以及与 TNF和 NO间的关系如何尚未见有文献报导。

## 1 材料和方法

健康 Wistar大鼠 145只,体重 (202.4± 26.8) g,随机分为正常对照组 (10只)、单纯烧伤组 (B组, 56只)和烧冲复合伤组 (CI组, 79只)。剪去动物背部毛,致动物背部 25% 总体表面积 (TBSA)全层皮肤烫伤 (90℃水 20 s) (病理解剖证实), CI组动物在烧伤后立即用 BST-I型生物激波管致中度冲击伤。致伤大鼠分别于伤后 2、2.5、3、5、8和 24 h分批活杀。心脏穿刺抽血,肝素抗凝,加入不同的酶抑制剂后离心取血浆,冻存于 -70℃超低温冰箱备用。肺组织分别留做组织匀浆、提取组织总 RNA原位杂交和光镜标本。

血浆和组织匀浆 ET-1用放射免疫法测定、TNFα含量用酶联免疫法测定、组织中 ETR的最大结合率 (Bmax)和 Kd值用受体放射分析法测定分析,用地高辛标记的 ET-1、ETAR和 TNFα cDNA探针分别进行狭缝式斑点杂交和原位杂交观测肺组织中 ET-1、ETAR和 TNFα的 mRNA转录及分布,斑点杂交结果扫描入计算机进行半定量分析;测定血浆中 NO含量。

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 Student's $t$ 检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 肺组织中 ET-1、ETAR和 TNFα mRNA的分布及变化

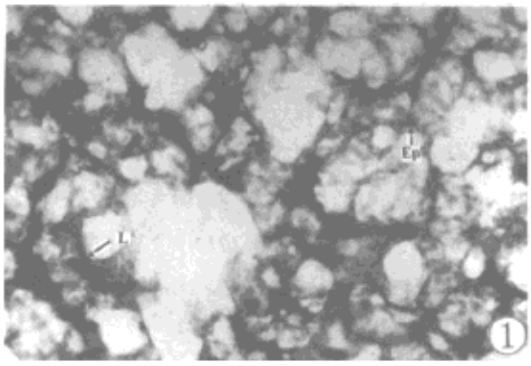
核酸原位杂交结果显示: ET-1 mRNA阳性反应产物主要分布于支气管上皮细胞和血管内皮细胞、肺泡壁上皮细胞、巨噬细胞及其它一些肺间隔细胞; ETAR mRNA阳性反应产物主要分布于支气管和小血管的平滑肌细胞、肺泡壁上皮细胞、内皮细胞及一些肺间隔细胞内; TNFα mRNA的阳性反应产物主要分布于肺泡腔的肺泡巨噬细胞、支气管及肺泡间隔的一些组织细胞等。伤后它们的密度变化均有不同程度的增加。见图 1、2

斑点杂交结果见表 1。

* 全军"九五"攻关项目

** 周继红,男, 32岁,副研究员,博士

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



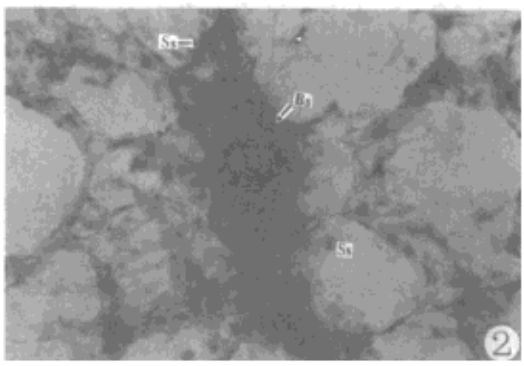




图 1 CI组伤后 2.5 h肺 ET-1原位杂交(甲基绿复染,× 400)
蓝色反应产物主要分布于肺泡上皮细胞(Ep)和肺泡壁上的细胞(L)

**Fig 1 Pulmonary ET-1 *in situ* hybridization in CI group at 2.5 h after injury, (methyl green counter stained, × 400)**
The blue products mainly distributed in the epithelium (Ep), and cells in the alveolar septum (L)

图 2 B组伤后 3 h肺 ETAR原位杂交(甲基绿复染,× 400)
蓝色反应产物主要分布于支气管平滑肌细胞(Bs)和小血管平滑肌细胞(Ss)等

**Fig 2 Pulmonary ETAR *in situ* hybridization in B group at 3 h after injury (methyl green counter stained, × 400)**
The blue products mainly deposited in the smooth muscles of bronchus (Bs) and small pulmonary vessel(Ss)

表 1 肺组织 ET-1、ETAR和 TNFα mRNA(μgDNA/gRNA)变化($\bar{x}\pm s$)

**Tab 1 The changes of ET-1, ETAR and TNFα mRNA in lung tissue (μgDNA/gRNA) ($\bar{x}\pm s$)**

| | Control | After injury ($t$/h) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | 2.5 | 3 | 5 | 8 | 24 |
| ET-1 | | | | | | | |
| B | 19.72± 4.72 | 45.14± 8.14*## | 52.74± 5.97*## | 103.69± 3.53** | 114.34± 3.25** | 79.83± 15.66* | 86.40± 8.51** |
| CI | 19.72± 4.72 | 115.37± 5.93** | 109.19± 13.35** | 102.45± 12.91** | 117.68± 9.40** | 85.92± 11.15* | 85.09± 12.17* |
| ETAR | | | | | | | |
| B | 38.41± 3.35 | 48.31± 13.85 | 71.61± 20.66 | 111.54± 12.43** | 117.14± 7.79**# | 114.75± 15.57** | 88.26± 13.97** |
| CI | 38.41± 3.35 | 68.41± 9.81* | 108.81± 13.26** | 154.33± 19.88** | 140.91± 17.17** | 150.48± 23.05** | 100.47± 13.30** |
| TNFα | | | | | | | |
| B | 18.88± 2.91 | 40.55± 12.49 | 70.46± 14.44*## | 82.85± 15.73* | 102.69± 9.22** | 94.43± 20.28* | 88.97± 21.59* |
| CI | 18.88± 2.91 | 125.28± 14.18** | 144.42± 17.99** | 101.89± 7.35** | 96.24± 21.68* | 86.01± 30.53* | 91.17± 23.02* |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* CI group

### 2.2 血浆 ET-1、TNFα和 $NO_2^-/NO_3^-$含量变化

伤后各组血浆 ET-1量有所波动,但较正常无明显变化。B组和 CI组血浆 TNFα伤后均有升高的趋势,但与正常比差异不明显。正常血浆 $NO_2^-/NO_3^-$为(28.5± 5.9)μmol·$L^{-1}$,致伤后 B组和 CI组均呈逐渐上升趋势,但上升较缓,伤后 5 h明显高于正常($P<0.05$),伤后 8 h~ 24 h升高更为显著($P<0.01$),B组和 CI组间差异不显著。

### 2.3 肺组织 ET-1和 TNFα含量的变化

B组及 CI组肺组织匀浆中 ET-1含量在伤后的变化及两组肺组织 TNFα伤后改变见表 2

表 2 肺匀浆 ET-1和 TNFα(ng·$g^{-1}$Pr)的变化($\bar{x}\pm s$)

**Tab 2 Change of ET-1 and TNFα in pulmonary homogenate (ng·$g^{-1}$Pr) ($\bar{x}\pm s$)**

| | Control | After injury ($t$/h) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 | 2.5 | 3 | 5 | 8 | 24 |
| ET-1 | | | | | | | |
| B | 102.7± 20.7 | 129.9± 59.8 | 127.9± 47.5## | 115.0± 53.5## | 282.0± 57.4** | 236.4± 101.6** | 190.9± 55.9**# |
| CI | 102.7± 20.7 | 191.9± 97.4* | 306.1± 123.7** | 290.1± 58.8** | 279.3± 83.4** | 314.6± 141** | 300.1± 121.5** |
| TNFα | | | | | | | |
| B | 433± 225 | 552± 245## | 565± 105## | 516± 198## | 477± 271# | 617± 224 | 1113± 633* |
| CI | 433± 225 | 1082± 349** | 1339± 434** | 1258± 677** | 895± 436* | 790± 334* | 833± 285** |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* CI group

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

### 2.4 肺组织中 ETAR的变化

正常肺组织 ETAR的 Kd值为(130.9± 18.3) pmol,烧冲复合伤后无明显改变;正常肺组织中 ETR的 Bmax为 1.695± 0.197 pmol·mg$^{-1}$Pr,烧冲复合伤后其值明显降低( $P<0.05$~ 0.01),伤后 5 h达最低值,24 h时略有回升,但仍明显低于正常,见表 3

表 3　CI组肺组织 ETAR的 Kd值(pmol)和 Bmax(pmol·mg$^{-1}$Pr)变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of Kd (pmol) and Bmax (pmol·mg$^{-1}$Pr) of ETR in lung tissue in CI group($\bar{x}\pm s$)

| | Control | After injury ($t$/h) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 | 5 | 8 | 24 |
| Kd | 130.9± 18.3 | 124.4± 12.0 | 125.1± 25.4 | 128.1± 17.3 | 126.0± 18.9 |
| Bmax | 1.695± 0.197 | 1.281± 0.092* | 1.037± 0.210** | 1.099± 0.226** | 1.120± 0.221** |

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

### 2.5 肺组织学观察

伤后在光镜下可见:B组伤后 2 h就有明显的肺血流淤滞现象,并有红细胞漏出进入肺泡腔,24 h血流淤滞更为严重。在 CI组有明显的肺泡出血,有的部位红细胞充满肺泡腔、肺泡隔断裂、甚至有小支气破裂,肺泡内有明显渗出液,有的部位有明显肺泡萎陷、肺循环明显淤滞现象,伤后 8 h后有明显的炎症细胞浸润。

## 3 讨论

本实验应用核酸原位杂交技术证实,在大鼠肺组织中的血管内皮细胞、支气管上皮细胞、肺泡壁上皮细胞、巨噬细胞及其它一些肺泡间隔细胞均有很强的 ET-1 mRNA的转录,在支气管和小血管的平滑肌细胞有很强的 ETAR mRNA转录能力,肺泡壁上皮细胞及一些肺泡间隔细胞也有 ETAR mRNA的转录能力。证明肺组织中有丰富的 ET-1的来源及其受体,表明肺是机体内皮素最重要的合成、代谢及作用的靶器官之一[3-5]。

本实验中,致伤后动物血浆中 ET-1变化不明显,这可能是因为 ET-1是一种主要通过细胞自分泌和细胞旁分泌起作用的多肽,在循环中很快就被清除的缘故[6,7]。但烧伤和烧冲复合伤动物肺组织匀浆中的 ET-1含量在伤后却都非常显著地增加,其中复合伤组动物的 ET-1增加尤为显著,在 2.5 h~ 3 h就达到峰值,较正常增加近 2倍,并持续到伤后 24 h,而单纯烧伤组的增加相对迟缓。组织匀浆中的浓度增加表明局部组织中 ET-1的产生和分泌增加,其效应也必然增强。

烧伤和烧冲复合伤后组织中 ET-1的增加,主要是由于组织中 ET-1 mRNA的转录增强所致。本实验结果显示,烧伤和烧冲复合伤后肺组织中 ET-1 mRNA的量都明显增加,其增加峰值均略超前于肺组织中 ET-1量的峰时;复合伤组 ET-1和 ET-1 mRNA的峰时明显早于烧伤组,同时复合伤组的峰值也略高,为伤前的 5.7倍。这可能是因为冲击伤可致明显的肺损伤,损伤的肺组织可产生释放大量的细胞因子,如白细胞介素 1、TNFα等,它们和缺血缺氧以及细菌脂多糖等因素均是 ET-1 mRNA表达和 ET-1释放的强效激动因素[8,9],可刺激组织细胞转录 ET-1 mRNA,使组织内 ET-1大量增加。本实验结果也同时表明,虽然伤后血浆中 TNFα水平无明显升高,但是肺组织中 TNFα mRNA量及 TNFα量均迅速显著升高,而且其峰值均在 ET-1之前,提示在烧冲复合伤后肺内 TNFα的表达分泌可能参予刺激 ET-1转录表达的过程。

在肺组织 ET-1增加的同时,肺组织中的 ETAR mRNA的转录也明显增加,它的变化过程类似 ET-1 mRNA的转录过程,但是其峰时均后延,而肺组织中 ETR的量(Bmax)却是很快降低,5h左右达低谷,虽然随后逐渐有所回升,但伤后 24 h仍明显低于正常,而其与 ET-1的亲合力(Kd值)却无明显变化。这可能与伤后肺组织中 ET-1产生分泌大量增加致使 ET-1与 ETR结合增多、受体发生内趋化、以及 G蛋白失偶联的发生等有关[3,10,11],ETAR下调作用在保护机体以免发生过度反应方面可能起着重要的作用。而 ET-1的增加及 ETR的下降等因素又同时促使 ETAR mRNA转录,以维持和恢复正常的 ETAR量。但 ETAR恢复过程较慢,伤后 24h仍明显低于正常水平,这可能是因为 ET-1产生的量较大,消耗大于生成和再循环,提示机体存在自我调节机制,这可能有利于防止 ET-1产生过强的收缩作用,以减轻组织器官的损伤。

在伤后初期机体血管以收缩作用为主,此时可能产生和释放的 NO较少,故血浆中 NO增加不明显;但到伤后 5 h后血浆 NO逐渐明显增加,在 8 h最高,这可能与机体组织器官较长时缺血缺氧反应及 ET-1明显增多有关,因 ET-1在与平滑肌细胞等的 ETAR作

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

用收缩平滑肌的同时,它也作用于内皮细胞等的 ETB 型受体,导致内皮细胞等释放 NO 等舒血管物质[12,13]。

## 参考文献


1 White S R, Hathaway D P, Umans J G *et al*. Epithelial modulation of airway smooth muscle response to endothelin-1. Am Rev Respir Dis, 1991; 144(2): 373

2 Grunstenin M M, Rosenggerg S A M, Schramm C M *et al*. Mechanisms of action of endothelin 1 in maturing rabbit airway smooth muscle. Am J Physiol, 1991; 260(Pt 6): L434

3 汤 健,唐朝枢,杨 军等主编.内皮素.北京:北京大学联合出版社, 1994 101~102

4 Filep J G. Endothelin peptides: biololgical actions and pathophysiological significance in the lung. Life Sci, 1993; 52(2): 119

5 Pons F, Loquet I, Touvay C *et al*. Comparison of the bronchopulmonary and pressor activities of endothelin isoforms ET-1, ET-2, and ET-3 and characterization of their binding sites in guinea pig lung. Am Rev Respir Dis, 1991; 143(2) 294

6 Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S *et al*. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. Biochem Biophys Res Comun, 1994; 199(3); 1461

7 Sen N, Grunstein M M, Chander A. Stimulation of lung surfactant secretion by endothelin-1 from rat alveolar type II cells. Am J Physiol, 1994; 266 (3 Pt 1): L255

8 Li H, Elton T S, Dhen Y E *et al*. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. Am J Physiol, 1994; 266(5Pt 1): L553

9 Markewitz B A, Kohan D E, Michael J R. Endothelin-1 synthesis, receptors and signal transduction in alveolar epithelium: evidence for an autocrine role. Am J Physiol, 1995; 268(2 Pt 1): L192

10 Takemoto F, Uchida S, Katagiri H *et al*. Desensitization of endothelin-1 binding by vasopressin via a cAMP-mediated pathway in rat CCD. Am J Physiol, 1995; 268(3Pt 2): F385

11 Hayzer D J, Cicila G, Cockerham C *et al*. Endothelin A and B receptors are down-regulated in the hearts of hypertensive rats. Am J Med Sci, 1994; 307(3)222

12 Roberts T P, McRitchie R J, Chalmers J P. Experimental hypertension produces diverse changes in the regional vascular responses to endothelin-1 in the rabbit and the rat. J Hypertens, 1994; 12(11): 1225

13 Lippton H L, Hauth T A, cohen G A *et al*. Functional evidence for different endothelin receptors in the lung. J Appl Physiol, 1993; 75(1): 38


(收稿: 1996-12-07;修回: 1997-04-15)

(编辑 张大春)

# A study of transcription and expression of endothelin-1 and endothelin A receptor in lung at the early stage after combined burn-blast injury

Zhou Jihong, Zhu Peifang, Wang Zhengguo, Liu Dawei, Li Xiaoyan, Liu Baohua (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

**Abstract** Objective: The role of endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor (ETR) and tumor necrosis factor (TNF) in pathophysiology of the lung after combined burn-blast injury was explored. Methods: The changes of transcription and expression of ET-1, ETR and TNF( in the lung and their relationship with the tissue damage were studied with *in situ* hybridization, dot hybridization and radioimmunoassay. Results: The transcription and expression of TNF and ET-1 and the level of nitric oxide (NO) in the plasma were significantly increased at the early stage after injury. mRNA of endothelin A receptor was significantly increased while ETR was down-regulated. The changes were more significant in the group of combined burn-blast injury than in other groups and consistent with the pathological changes of the lung. Conclusion: ET-1 and its receptors may play important roles in the pathophysiological process of the lung after combined burn-blast injury.

**Key words** trauma; combined injury, endothelin; endothelin receptor; lung

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