DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.020


# 严重烧伤早期肾组织内皮素-1及其基因表达的动态变化*

吴雄飞 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,630038

提 要 目的: 探索大鼠严重烧伤早期肾脏内皮素-1(ET-1)动态变化的规律。方法: 凝固汽油烧伤 Wistar大鼠背部皮肤制成 30% TBSAIII度烧伤模型,观察正常对照、烧伤后 1 3 6 12 24 h共 6组动物肾静脉血浆、肾皮质、外髓、内髓 ET-1浓度变化,肾组织 ET-1免疫组织化学变化,肾组织 ET-1 mRNA斑点杂交和原位杂交变化。结果: 烧伤后 1 h肾静脉血及肾组织各层 ET-1较对照组明显上升,6 h达到高峰,24 h仍明显高于正常。免疫组化显示 ET-1增强部位主要在血管内皮细胞、平滑肌细胞、系膜细胞及肾小管上皮细胞。斑点杂交及原位杂交均显示烧伤后 1 h ET-1 mRNA明显升高,3 h达高峰,24 h仍高于正常,主要分布与免疫组化结果一致。结论: 严重烧伤早期肾脏 ET-1的水平升高基因表达明显增强。

关键词 烧伤;肾;内皮素-1;基因表达
中图法分类号 R644

内皮素-1(Endothelin-1 ET-1)是目前已知的作用最强和最持久的内源性缩血管活性肽,在生理状态下肾脏许多部位都有 ET-1分泌和 ET受体(ETR)分布,参与肾血流量(RBF)、肾小球滤过率(GFR)、系膜细胞生物学、尿液浓缩稀释、$Na^+$ 的排泄和重吸收等肾脏重要生理功能的调节[1]。这种调节机理一旦紊乱,例如缺血缺氧和许多炎症介质刺激 ET-1分泌使循环 ET-1或肾内分泌大量 ET-1,这时 ET-1将作为一种致病因子引发或参与肾脏病理生理学改变[2]。目前已知 ET-1在急性肾衰、肾中毒、肾炎等肾脏疾病的发生发展过程中充当重要角色。虽然已注意到严重烧伤后全身血液循环中 ET-1浓度升高 10~20倍,并推测与多脏器损害有关[3],但烧伤后肾脏 ET-1动态变化以及是否以自分泌/旁分泌方式作用尚未见文献报告。为此,本实验在大鼠烧伤模型上观察各时相点肾脏 ET-1浓度及分布、基因表达及定位,旨在阐明烧伤后肾脏 ET-1变化规律及分泌方式。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂来源

ET放免测定药盒购于 301医院长城免疫技术研究所。ET-1多克隆抗体来自英国皇家医院研究生院。ET-1质粒为日本 Sakurai惠赠。地高辛标记及检测试剂盒购于德国宝灵曼公司。

### 1.2 动物模型

Wistar大鼠 150只,体重 230 g±30 g 随机分为正常对照组、烧伤后 1 3 6 12 24 h共 6组,每组动物 25只。其中肾静脉血及肾组织 ET-1测定用动物 10只,免疫组化、斑点杂交、原位杂交各用动物 5只。1%戊巴比妥钠(30 mg·kg$^{-1}$)腹腔注射麻醉,背部剪毛,20%硫化钠脱毛,3%凝固汽油涂布脱毛皮肤,燃烧 20 s扑灭,造成 30% TBSAIII度烧伤,伤后腹腔注射 4 ml·100g$^{-1}$等渗盐水。对照组除不烧伤外,其余处理相同。

### 1.3 测定指标及方法

1.3.1 肾静脉血浆及肾组织 ET-1含量测定 于相应时相点取肾静脉血 1 ml 然后取双肾,解剖分离为皮质、外髓、内髓三层,分别称取 100 100 50 mg匀浆。采用放射免疫法测定 ET-1含量[4]。

1.3.2 肾组织 ET-1免疫组化 以 Zamboni氏液内固定双肾,冰冻切片,按常规免疫组化染色,光镜观察并行图像分析[5]。阴性对照不加一抗,其它步骤相同。

1.3.3 肾组织 ET-1斑点杂交及原位杂交 将含有 ET-1质粒转入 JM109大肠杆菌后大量扩增、纯化、酶切、回收 cDNA片段,随机引入法地高辛标记制备成特异性探针。斑点杂交采用异硫氰酸胍一步法提取肾组织总 RNA[6],经点样、晾干、干烤、预杂交、加入特异性 cDNA探针杂交、显色、薄层层析扫描仪(岛津)500 nm半定量 mRNA,以斑点与该组总表达量百分率表示。原位杂交采用改良漂浮法[7],无菌条件下取肾,冰冻切片、固定、消化、杂交,按宝灵曼地高辛标记及检测药盒说明书进行 NBT显示、铺片、烘片、脱水、封片,细胞内紫蓝色颗粒为阳性,光镜 200倍下任选 10个视野对阳性细胞计数。阴性对照不加探针,其它步骤相同。

### 1.4 统计学处理

采用华西医科大学医用统计程序在电子计算机上行数据分析。

## 2 结果

### 2.1 肾静脉血浆及肾组织 ET-1含量明显上升

烧伤后 1 h肾静脉血、外髓、内髓 ET-1较对照组显著升高,烧伤后 3 h皮质 ET-1也显著升高,烧伤后 6 h肾静脉血及肾组织三层 ET-1均达高峰,烧伤后 24 h仍高于正常。三层肾组织中,以内髓、外髓升高更为显著、持久,见表 1

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39290700-03

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

表 1　大鼠严重烧伤肾静脉血浆及肾组织 ET-1含量变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

**Tab 1　Changes of rat renal venous plasma and tissue ET-1 level after burns ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)**

| | Renal venous plasma ($P_B$ /pg·ml$^{-1}$) | Renal tissue ($W_B$ /ng·g$^{-1}$ wet renal tissue) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Cortex | Outer medulla | Inner medulla |
| Control | 146.3± 31.2 | 7.06± 1.04 | 6.13± 0.68 | 7.92± 0.99 |
| PBH 1 | 191.7± 39.6 | 7.51± 1.21 | 9.12± 1.11* | 10.95± 1.07* |
| PBH 3 | 213.5± 41.2** | 11.01± 1.14* | 11.22± 1.71* | 11.94± 1.43* |
| PBH 6 | 281.1± 49.7** | 12.62± 1.58** | 14.21± 2.37** | 14.31± 1.91** |
| PBH 12 | 211.5± 44.2** | 10.26± 1.16* | 11.82± 1.37** | 12.18± 1.78** |
| PBH 24 | 194.8± 34.9* | 9.24± 1.21 | 10.72± 1.57** | 11.33± 1.73* |

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

## 2.2　肾组织免疫组化改变

烧伤后 1 h肾脏各层组织 ET-1阳性染色增多,6 h达高峰,24 h仍有较强染色,见图 1　ET-1阳性主要分布肾小球内皮细胞,中小血管平滑肌细胞,肾小球血管极或球旁器,近端小管及集合管,见图 2　烧伤后 12　24 h可发现肾小管变性即将脱落的上皮细胞或已脱落上皮细胞深染,见图 3　从总体上看,阳性染色髓质强于皮质。阴性对照无阳性染色。图像分析结果,见表 2



图 1　烧伤后 6 h肾小球内皮细胞 ET-1免疫活力明显增强　(免疫组化× 400)

**Fig 1　Immunoreactivity of ET-1 was significantly increased in glomerular endothelial cells in the 6th PBH** (Immunochemical assay× 400)

图 2　烧伤 6 h肾小血管内皮、平滑肌细胞以及肾小管上皮 ET-1免疫活力明显增强　(免疫组化× 400)

**Fig 2　Immunoreactivity of ET-1 was significantly increased in renal small vascular endothelial cells, smooth muscle cells and tubular epithelium in the 6th PBH** (Immunochemical assay× 400)

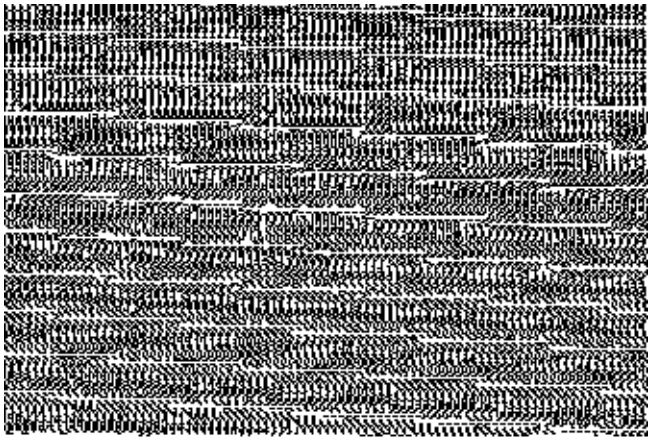


图 3　烧伤后 24 h变性脱落的肾小管上皮细胞大量 ET-1聚积　(免疫组化× 400)

**Fig 3　(Massive accumulation of ET-1 in the degenerative and exfoliative tubular epithelial cells in the 24th PBH** (immunochemical assay× 400)

表 2　大鼠严重烧伤肾 ET-1免疫活性图像分析分光密度值

**Tab 2　Immunohistochemical activity of ET-1 in rat renal tissue postburn (Integrating optical density of image analysis $\bar{x}\pm s$, $n=5$)**

| | Cortex | Outer medulla | Inner medulla |
|---|---|---|---|
| Control | 978.2± 213.6 | 2106.2± 355.2 | 2231.2± 426.1 |
| PBH 1 | 1378.9± 421.9* | 3321.5± 552.5 | 2765.3± 467.8* |
| PBH 3 | 2246.7± 528.3* | 3879.7± 601.4* | 3918.7± 527.4** |
| PBH 6 | 3561.8± 618.8** | 5548.4± 689.4** | 5439.5± 625.2** |
| PBH 12 | 2987.9± 472.9* | 4274.5± 618.6** | 4722.7± 527.8** |
| PBH 24 | 2018.3± 415.2* | 3959.3± 571.9** | 3348.9± 428.6* |

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

## 2.3　肾组织 ET-1 mRNA斑点杂交和原位杂交结果

斑点杂交显示烧伤后 1 h ET-1 mRNA明显增强,3 h达高峰,24 h仍高于正常,见图 4

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

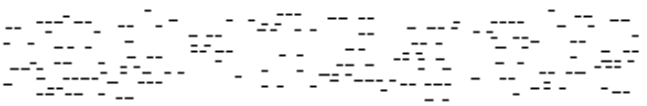


图 4 烧伤后肾脏 **ET-1 mRNA**变化 (斑点杂交)
1:正常 2~ 6烧伤后 1h, 3h, 6h, 12h, 24h
**Fig 4 Renal ET-1 mRNA expression postburn** (Northern blot hybridization)
1: normal 2~ 6 1h, 3h, 6h, 12h, 24h after burn

原位杂交结果显示烧伤后 3 h肾脏 ET-1 mRNA杂交信号达高峰见图 5 6,24 h仍较强,主要分布与免疫组化一致,唯变性脱落肾小管上皮细胞无 ET-1 mRNA分布。阴性对照无阳性染色。分别在皮质、髓质进行阳性细胞计数,见表 3

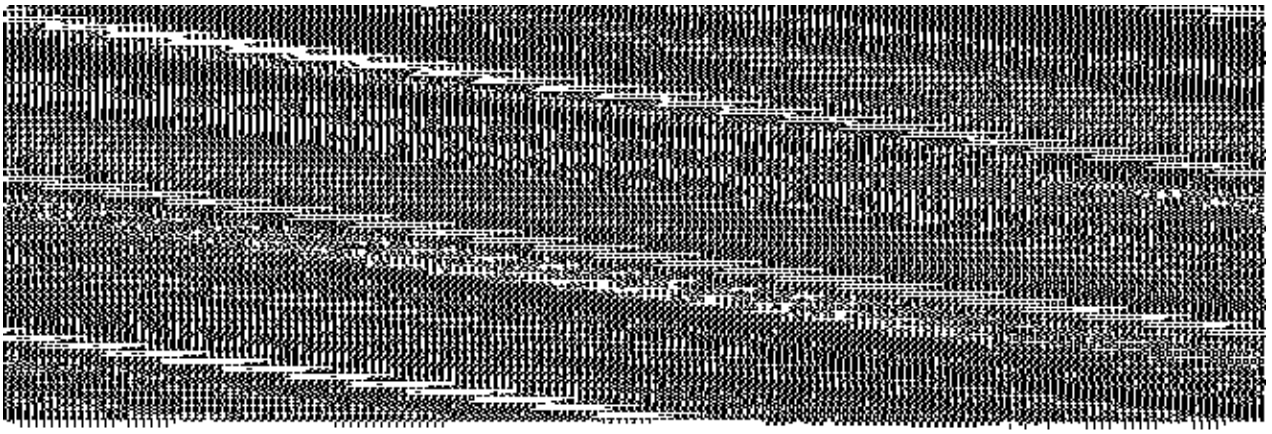


图 5 烧伤后 **3 h**肾小球毛细血管内皮及系膜细胞,肾小管管腔面及基底面 **ET-1 mRNA**表达明显增强 (原位杂交× **400**)
**Fig 5 ET-1 mRNA expression was significantly increased on glomerular endothelial cells, glomerular mesangial cells, both apical and basal surfaces of tubular epithelium in the 3rd PBH.** (*in situ* hybridization× 400)

图 6 烧伤后 **6 h**肾曲小管上皮细胞内缘大量 **ET-1 mRNA**分布 (原位杂交× 400)
**Fig 6 ET-1 mRNA expression was significantly increased on the surface of inner lumen of renal convoluted tubular epithelium in the 6 th PBH.** (*in situ* hybridization× 400)

表 3 大鼠严重烧伤肾脏 **ET-1 mRNA**阳性细胞 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

**Tab 3 Number of ET-1 mRNA positive cells by *in situ* hybridization in rat renal tissue postburn**
**(positive cells/200× visual field,** $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

| | Control | PBH 1 | PBH 3 | PBH 6 | PBH 12 | PBH 24 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cortex | 38.8± 6.8 | 51.3± 14.5 | 108.0± 34.7** | 88.6± 28.4* | 74.5± 24.3* | 66.9± 20.2* |
| Medulla | 41.3± 8.5 | 58.6± 14.6 | 123.2± 41.1** | 91.4± 26.7* | 86.6± 24.5* | 50.8± 17.6* |

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

## 3 讨论

本实验发现髓质的 ET-1水平和免疫组化显示的 ET-1免疫活性均比皮质显著增高,这种可能是:① 皮质血管丰富,对 ET-1极为敏感, ET-1升高迅速引起血管收缩,对内皮细胞分泌 ET-1反馈调节[1];② 皮质小管产生的 ET-1经过皮质近曲小管被中性肽链内切酶大量降解,而髓质直小管及集合管产生的 ET-1较少被降解[8]。

正常小鼠肾脏有 ET-1 mRNA表达和 ET-1的分泌,说明基础状态下 ET-1参与了肾血管和肾功能的调节。而烧伤后 ET-1及 ET-1 mRNA均显著增高,其中肾静脉血、肾组织 ET-1及免疫组化显示的 ET-1免疫活性高峰在烧伤后 6 h,而 ET-1 mRNA阳性信号于烧伤后 3 h达高峰。这种 ET-1基因表达高峰与滞后的肾组织成熟 ET-1肽的分泌高峰正好吻合,为 ET-1

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

mRNA转录、ET-1前体的翻译表达、肽链内切酶蛋白水解形成 ET前体,ET转化酶作用产生成熟 ET-1的分泌等一系列复杂生化过程提供了时间基础[9],因而可证实肾脏主要系 ET-1自身分泌释放(即自分泌),而非循环中 ET-1作用于肾脏。

烧伤后 12、24 h肾脏近端小管变性即将脱落或已脱落位于管腔的上皮细胞群有 ET-1较强的阳性染色,而原位杂交未发现此类 ET-1 mRNA的阳性信号,此现象未见文献报告,其可能原因:① 小管上皮细胞是 ET-1主要效应器,ET-1结合 G蛋白偶联的内皮素受体,导致细胞外钙内流,损害细胞骨架结构,降低细胞与基底膜粘附力,促进细胞脱落。② ET-1导致上皮细胞损害后,ET-1基因表达消失,而积聚的 ET-1尚未降解,抗原决定簇存在,因而免疫组化染色阳性而 mRNA原位杂交阴性。

烧伤后肾脏 ET-1 mRNA分布有所变化,除正常分布部位阳性明显增强以外,系膜细胞、近端小管也呈强阳性,提示烧伤后肾缺血缺氧导致正常分布的 ET-1基因表达增强,同时促使原来不表达或低丰度表达 ET-1基因的组织细胞快速大量表达和分泌 ET-1。这些部位 ET-1基因表达或分泌增强可能与引发或参与肾血流动力学改变和肾功能损害有关。例如弓状动脉、叶间动脉、肾小球动脉内皮细胞 ET-1 mRNA表达增强,平滑肌上大量成熟的 ET-1,必然导致这些血管收缩而致肾缺血;系膜细胞的 ET-1基因表达和 ET-1成熟肽的分布,提示 ET-1引起系膜细胞收缩而致肾小管超滤过系数(kf)下降、GFR下降;肾小管的 ET-1基因表达及成熟 ET-1的分布增强,表明过多的 ET-1参与了水钠重吸收的异常调节。通过对烧伤后肾脏 ET-1的免疫组化和 ET-1 mRNA原位杂交的比较,发现其基因表达部位与成熟 ET-1分布部位非常一致或接近,提示 ET-1不仅是肾脏自分泌肽,而且是以旁分泌方式发挥其重要功能的。

## 参考文献


1 Simonson M S. Endothelins: Multifunction renal peptides. Physiol Rev, 1993; 73(2): 375

2 Perico N, Remuzzi G. Role of endothelin in glomerular injury, Kidney Int(suppl), 1993; 39: S76

3 Huribal M, Cuningham M E, D′Aiuto M L *et al*. Endothelin levels in patients with burns covering more than 20% body surface area. J Burn Care Rehabil, 1995; 16(1): 23

4 曾　强,李振甲,余霞君等.内皮素的放射免疫分析.解放军医学杂志, 1991; 16(6): 405

5 刘　宏,金锡御,吴雄飞.急性缺血性肾衰后肾脏内皮素免疫组化改变.中华泌尿外科杂志, 1996; 17(7): 296

6 沈　萍.二种简便分离 RNA的方法.生物化学与生物物理进展, 1990; 17(6): 481

7 蔡文琴,王伯　.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交.成都:四川科学技术出版社, 1994; 415~ 418

8 Abassi Z A, Klein H, Golomb E *et al*. Urinary endothelin: a possible biological ncelcer of renal damage. Am J Hypertens, 1993; 6(12): 1046

9 Marsen T A, Sehramek H, Dunn J. Renal action of endothelin: Linking cellular signaling pathways to kidney disease. kidney Int, 1994; 45(2): 336


(收稿: 1996-10-09;修回: 1997-01-06)

(编辑　王　红、沈锡庚)

# Changes of endothelin-1 and its mRNA expression in the kidneys in early severe burns in rats*

Wu Xiongfei, Yang Zongcheng, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

**Abstract** objective: To observe the changes of endothelin-1 (ET-1) level, its expression and its distribution in the kidneys in the early stage of burns in rats. Methods: Wistar rats sustained with 30% TBSA full-thickness burns were randomized into the normal control and the 1st, 3rd, 6th, 12th and 24th postburn hour (PBH) groups to observe the changes of ET-1 in renal venous plasma and renal cortex and outer and inner medulla. The distribution of ET-1 in the kidneys was determined with immunochemical assay and its mRNA expression with Northern blot hybridization and *in situ* hybridization. Results: ET-1 secretion and its mRNA expression were significantly increased in the 1st and 3rd PBH respectively as compared with the control. Immunocytochemistry showed the enhancement of ET-1 in the vascular endothelial, glomerular mesangial and tubular epithelial cells. Both Northern blot and *in situ* hybridization revealed marked increase of the expression of ET-1 mRNA in the 1st PBH, reached its peak in the 3rd PBH and remained higher than the normal even at the 24th PBH. Conclusion: The concentration and mRNA expression of ET-1 are significantly increased in the early stage of severe burns.

**Key words** burns; kidney; endothelin-1 mRNA expression

* Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39290700-30

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