DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.005

烧冲复合伤早期肝组织 ET-1及 ETR转录表达的研究*

周继红** 王正国 朱佩芳 刘大维 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: 探讨烧冲复合伤后早期肝组织内皮素-1(ET-1)、内皮素受体(ETR)及肿瘤坏死因子(TNF-α)的变化和意义。方法: 采用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肝组织 ET-1 ETR及肿瘤坏死因子(TNF-α)的转录表达变化及相互关系。结果: 致伤后早期肝组织 TNF-α及 ET-1的 mRNA转录及合成均显著增加, TNF-α的峰时早于 ET-1,虽内皮素 A型受体(ETAR) mRNA也升高,但 ETR却"下调"。各指标变化均以烧冲复合伤组尤为显著,并与肝组织病理变化相关。结论: 表明 ET-1和 ETAR等在烧冲复合伤后肝的病理生理过程中可能起着重要作用。

关键词 创伤;烧冲复合伤;内皮素;内皮素受体;肝
中图法分类号 R644

内皮素-1(ET-1)是近几年发现的一种强血管活性多肽。它通过内皮素 A型受体(ETAR)致极强的收缩血管作用,是目前已知作用最强、持续时间最长的收缩血管的活性多肽[1]。本实验旨在观测烧冲复合伤后肝组织中 ET-1、ETAR及 TNF-α的转录合成变化情况,以探讨它们在创伤后肝组织损伤中的作用、地位及其关系。

1 材料与方法

健康 Wistar大鼠145只,体重202.4± 26.8 g,随机分为正常组(N组,10只)、单纯烧伤组(B组,56只)和烧冲复合伤组(CI组,79只)。致 B组和 CI组动物背部25%总体表面积(TBSA)全层皮肤烫伤(90℃水浴20 s,病理解剖证实)。CI组在烧伤后立即用 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,肝素抗凝分装,加入不同的酶抑制剂后分离血浆,-70℃冻存备测;肝组织分别留做组织匀浆、提取组织总 RNA 原位杂交和光镜观察。用解放军总医院的 ET-1放射免疫药盒测定血浆和组织匀浆的 ET-1,用军事医学科学院的肿瘤坏死因子酶联免疫检测盒测定血浆和组织 TNF-α含量,用放射受体测定法测定肝组织 ETR的 Bmax和 Kd值[2],分别用地高辛标记的 cDNA探针做斑点杂交和原位杂交观测肝组织中 ET-1、ETAR和 TNF-α的 mRNA转录及分布,斑点杂交结果经计算机扫描进行半定量分析;肝组织作光镜观察。本实验所有数据资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 t 检验进行统计学分析。

2 结果

核酸原位杂交结果显示: ET-1 mRNA主要分布于肝血窦和中央静脉的内皮细胞、贮脂细胞和枯否氏细胞等,肝细胞索上的细胞偶也有少量着色; ETAR mRNA主要分布于肝内血管壁平滑肌细胞、贮脂细胞及肝细胞索上的部分细胞等; TNF-α mRNA主要分布在枯否氏细胞及肝血窦周围的一些细胞。

斑点杂交结果见表1伤后各指标均显著升高($P<0.05$),肝 ET-1 mRNA量在伤后5 h达峰值, ETAR mRNA峰值在伤后8~ 24h, TNF-α mRNA峰值在2~ 3h前后。CI组各指标均较B组高,但无显著统计学意义。

表1 肝组织 ET-1、ETAR和 TNF-α mRNA量(μg DNA/g RNA)变化

Tab 1 Changes of ET-1, ETAR and TNF-α mRNA(μg DNA/g RNA) in liver

Groups		Control	After injury(h)					
			2	2.5	3	5	8	24
ET-1	B	23.4± 4.12	50.48± 10.76*	61.86± 9.91*	107.79± 3.38**	128.74± 13.17**	106.60± 6.27**	98.85± 7.93**
	CI	23.4± 4.12	43.79± 13.02	69.58± 12.22*	107.92± 13.79**	147.91± 26.90*	125.45± 15.41**	93.92± 20.49*
ETAR	B	15.96± 2.11	36.61± 4.13**	40.43± 1.81**	57.81± 11.51*	86.65± 16.31*	102.60± 12.24**	100.58± 13.95**
	CI	15.96± 2.11	40.10± 7.31*	56.30± 9.41*	71.77± 13.37*	90.03± 13.14**	102.80± 10.13**	130.70± 19.99
TNF-α	B	19.1± 1.33	106.07± 23.04*	116.60± 22.93*	99.19± 28.91*	101.54± 22.63*	65.57± 21.01*	63.36± 10.20*
	CI	19.1± 1.33	131.78± 21.63**	130.87± 12.94**	113.91± 30.30*	98.57± 32.90*	54.22± 16.53*	79.49± 25.84*

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

* 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

伤后各组血浆 ET-1量有所波动,但较伤前均无明显变化。二组肝组织 ET-1伤后均逐渐增加,于伤后3 h后明显高于正常($P<0.05$),8h后较正常增加非常显著($P<0.01$),CI组的值略高于 B组,但无统计学差异($P>0.05$),见表2

表2 ET-1含量的变化

Tab 2 Changes of ET-1

Groups	Control	After injury (h)					
		2	2.5	3	5	8	24
Plasma (ng·L^{-1})							
B	253.1±46.2	260.3±49.2	268.3±36.3	279.8±65.6	246.0±46.1	259.5±44.1	271.7±45.3#
CI	253.1±46.2	244.4±51.5	228.7±56.0	230.1±38.0	257.7±66.6	271.4±37	223.0±31.8
Liver Homogenate(ng·gPr^{-1})							
B	125.4±46.2	137.5±58.2	159.7±62.4	186.0±69.4*	164.1±29.8*	184.9±35.1**	227.8±104.7*
CI	125.4±46.2	146.8±59.9	173.8±103.2	207.7±93.5*	210.3±90.2*	224.9±90.5**	292.2±112.6**

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

正常大鼠肝组织 ETR的 Kd和 Bmax值分别为33.5±4.9 pmol和1.102±0.104 pmol·mg^{-1} Pr,CI组伤后 Kd无明显改变,Bmax值伤后明显降低($P<0.05$),伤后24 h为0.687±0.110 pmol·mg Pr^{-1}($P<0.01$)。

伤后各组血浆 TNF-α均有升高的趋势,但与伤前无统计学差异($P>0.05$)。两致伤组伤后肝 TNF均迅速显著增加,伤后3 h达峰值($P<0.01$),随后逐渐回落;CI组值增加快且高于 B组,见表3

表3 各组 TNF-α的变化

Tab 3 Changes of TNF-α

Groups	Control	After injury(h)					
		2	2.5	3	5	8	24
Plasma (ng·L^{-1})							
B	234±119	256±77	274±113	278±171	265±112	279±107	241±87
CI	234±119	249±70	302±85	274±94	258±97	269±134	252±118
Liver Homogenate(ng·gPr^{-1})							
B	71.3±21.9	80.0±19.3	112.5±36.1**#	248.6±138.4**#	140.0±50.0**	95.7±27.2*	104.0±34.8*
CI	71.3±21.9	105.7±37.7*	144.0±32.1**	274.2±92.5**	160.4±81.3*	106.1±31.1*	109.7±34.0*

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

光镜下可见:B组和 CI组肝组织的变化相似,伤后很快出现肝血窦扩张、肝细胞淡染、胞浆疏松、出现大量空泡、界线不清,肝窦有出血;伤后5~8 h后尤为严重,肝细胞索紊乱,肝细胞内出现大小不等的空泡,细胞核被挤向细胞一侧,呈半月形,有的肝细胞出现变性坏死,细胞核消失,胞浆稀疏淡染,呈泡沫状;在8 h后出现明显炎细胞浸润,甚至出现大小不等的局灶性细胞坏死。以 CI组变化稍重于 B组。

3 讨论

肝脏是 ET-1产生和代谢的主要器官之一[3]。ET-1具有调节肝脏循环的功能。ET-1可升高门静脉压,引起肝血窦收缩,肝血流量下降,致肝脏损伤[4,5],同时 ET-1可明显加重缺氧致肝脏损伤作用,导致弥漫性肿胀、胞浆疏松、或空泡状[4]。

本实验经核酸原位杂交证实肝内有丰富的 ET-1及其受体 ETAR的分布。烧伤和烧冲复合伤后肝组织中 TNF-α mRNA迅速增加,2h已达峰值,达正常的6~7倍,组织中 TNF-α浓度在伤后3h也达峰值;ET-1 mRNA量在伤后5h达峰值,ET-1含量则是在伤后8~12h最高;肝细胞损伤高峰时间与肝组织中 ET-1峰值一致,其中烧冲复合伤组的变化较单纯烧伤组更为明显。提示肝组织中 ET-1和 TNF-α的增加主要是 mRNA转录增强所致。虽然肝不是烧伤和烧冲复合伤直接作用和损伤的原始器官,但是严重机体损伤所产生的大量白细胞介素1 TNF-α加压素,以及创伤后肠源性菌群移位和感染致使细菌和内毒素首先进入肝脏、器官低灌流缺氧等都可作用于全身最大的代谢器官肝

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

脏,生成大量 TNF-α等,进而促进 ET-1等的转录合成,最终加重肝组织细胞的损伤[6,7]。同时胃肠道也是冲击波作用的靶器官之一[8],烧冲复合伤后胃肠道原发损伤将加重肠源性菌群移位和感染,这也将加重对肝的损害作用。

致伤后血浆中 ET-1变化不明显,这可能是因为它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[9]。伤后尽管 ETAR的 mRNA也明显增加,但 ETR却迅速下调,这可能与 ET-1产生的量较大,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[1,10],消耗大于生成和再循环。提示机体存在自我调节机理,这种受体的下调作用可能有利于防止 ET-1产生过强的收缩作用,以减轻组织器官的损伤。

总之,在烧冲复合伤后早期肝组织 ET-1及 ETAR的 mRNA转录及产生分泌均显著增加。ET-1的增加与机体创伤后应激、缺氧、及应激激素和包括 TNF-α等细胞因子的释放有密切的关系,这可能是机体全身反应的一部分。一方面,ET-1等血管收缩物质收缩外周血管,以保证重要器官的血氧供给;另一方面,过度血管的收缩将加重机体及组织细胞的缺血缺氧,因而加重器官组织的损害。在 ET-1大量增加的同时,肝组织中的 ETAR发生"下调"现象,这可能有利于防止机体发生过度的反应。因而提示 ET-1和 ETAR等在烧冲复合伤后肺和肝的病理生理过程中可能起着重要作用。

参考文献

1 汤　健,唐朝枢,杨　军等 主编.内皮素.北京:大学联合出版社,1994.101~102

2 Liu J, Chen R, Casley D J *et al*. Ischemia and reperfusion increase I^{125}-labeled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes. Am J Physiol, 1990, 258(3 Pt 2): H829

3 Rockey D C. Characterization of endothelin recepters mediating rat hepatic stellate cell contraction. Biochem Biophs Res Commun, 1995, 207(2): 725

4 Gandhi C K, Stephenson K, Olson M. Endothelin, a potent peptide agonist in the liver. J Biol Chem, 1990, 265(29): 17432

5 Bauer M, Zhang J X, Bauer I B *et al*. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: Sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. Am J Physiol, 1994, 267(1Pt 1): G143

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

7 陈　霞,黄丽英,曾　强等.缺氧性肺动脉高压大鼠内皮素的变化.中华医学杂志,1993,73:400

8 王正国 主编.冲击伤.北京:人民军医出版社,1983

9 Frelin C, Guedin D. Why are circulating concentrations of endothelin-1 so low? Cardiovasc Res, 1994, 28(11): 1613

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(3 Pt 2): F385

(收稿:1996-12-15;修回:1997-03-10)
(编辑　冷怀明)

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

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

Abstract Objective: To study the changes of endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor (ETR) and tumor necrosis factor (TNF-α) in the liver after combined burn-blast injury and their significance. Methods: The changes of transcription and expression of ET-1, ETR and TNF-α in the liver after combined burn-blast injury and the relationship among them were determined with in situ hybridization, dot hybridization and radioimmunoassay. Results: The transcription and expression of ET-1 and TNF-α were significantly increased and the peak time of TNF-α was earlier than that of ET-1 after injury. The mRNA of endothelin A receptor was significantly increased but ETR decreased after injury. 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 liver. Conclusion: ET-1 and ETR may play important roles in the pathophysiological process of the liver after combined burn-blast injury.

Key words trauma; combined injury; endothelin; endothelin receptor; liver

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