

200 mmol/LHS 对严重烫伤大鼠肠组织氧化应激及 PBMCs 中 p38MAPK 活性的影响

高 智¹ 吴雪生² 孙业祥¹ 陈旭林¹ 王 飞¹

摘要 目的 探讨 200 mmol/L 高渗盐液(HS)对严重烫伤大鼠肠组织的氧化应激以及外周血单个核细胞(PBMCs)中的 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)活性的影响。方法

按照随机抽样法将 SD 大鼠划分为 3 组:对照组(8 只)、乳酸钠林格液组(LR 组,24 只)以及高渗盐液组(HS 组,24 只)。烫伤前 48 h 3 组大鼠均予以颈静脉置管,对照组的大鼠直接处死取材。LR 组和 HS 组的大鼠在经过 30% 体表面积烫伤(TBSA)后分别予补充 LR 与 HS 进行复苏治疗,并分别于烫伤补液后 2、8、24 h 处死取材。检测 3 组大鼠肠组织中髓过氧化物酶(MPO)的活性与丙二醛(MDA)的含量,分离各组的 PBMCs 并采用 Western blot 法检测细胞中 p38MAPK 的活性,将所得数据进行统计学分析。结果 与对照组相比,HS 组及 LR 组肠组织中 MPO 活性和 MDA 含量明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),HS 组与 LR 组相比伤后各时间点上肠组织 MPO 活性与 MDA 含量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 HS 组和对照组相比伤后 3 个时间点上肠组织 MPO 活性与 MDA 含量无明显区别,差异无统计学意义($P > 0.05$)。HS 组与 LR 组复苏后各时间点 PBMCs 中的 p38MAPK 活性表达与对照组比较显著增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),但 LR 组和 HS 组进行比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 使用 200 mmol/L 的 HS 进行液体复苏较 LR 能明显减轻严重烫伤大鼠肠组织的氧化应激反应,两组对 PBMCs 中的 p38MAPK 活性表达无差异。

关键词 烧伤休克;高渗盐;髓过氧化物酶;丙二醛;p38 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号 R 644; R 605.971; R 392.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0439-04

适量的液体复苏对于严重烧伤患者的存活十分重要,尤其是烧伤体表面积超过 50% 的患者^[1]。乳酸钠林格液(lactate Ringer's solution, LR)由于其各

种电解质含量均接近细胞外液,在临床上被广泛使用。然而,有研究^[2]显示,使用 LR 对严重烧伤进行复苏治疗,经常会导致补液过度,并由此引发一系列并发症。为此,有研究者开始单独或者联合胶体使用高渗盐液(hypertonic sodium solution, HS)对烧伤进行复苏治疗,发现能减少因为补液导致的并发症^[3]。肠道是严重烧伤早期最易受伤的脏器之一,该文通过比较 200 mmol/L 的 HS 和 LR 对严重烫伤大鼠进行液体复苏治疗,观察其对严重烫伤大鼠肠组织氧化应激反应以及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中的 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 56 只 SD 大鼠,普通级,性别无限制,体重 250 ~ 350 g。动物均购于安徽医科大学动物实验中心,购置后正常饲养 1 周。

1.1.2 HS 的制作 配置 1 L 的 200 mmol/L HS 需要 LR 955.41 ml 与 10% NaCl 44.59 ml。溶液中含钠量为 200 mmol/L,氯 180 mmol/L,钾 3.8 mmol/L,钙 2.9 mmol/L。

1.1.3 试剂盒 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 烫伤模型制作 所有大鼠在烫伤前 2 d,均给予全麻并颈外静脉置管(全麻药物:戊巴比妥 30 mg/kg)。烫伤时先将大鼠全麻,剃除背部毛发,暴露背部皮肤并放入 98 °C 的热水中浸浴 12 s,以此制造出大鼠 30% 总体表面积(total body surface area, TBSA) III 度烫伤模型。

1.2.2 实验分组与补液 所有大鼠的颈静脉置管 2 d 后,随机分为 3 组:对照组(8 只,未予烫伤直接解剖)、LR 组(24 只,烫伤后给予 LR 补液)、HS 组(24 只,烫伤后给予 HS 补液)。补液参照 Pruitt 公

2014-01-05 接收

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学基金(编号: KJ2008B298);
国家自然科学基金(编号: 81272092)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 烧伤科、² 急诊外科,合肥
230022

作者简介:高 智,男,硕士研究生;

孙业祥,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: sunyexiang@163.com

式^[4]进行。

1.3 标本收集 将对照组 8 只大鼠于颈静脉置管后 2 d 处死,LR 组和 HS 组分别在烫伤后 2、8、24 h 各取 8 只大鼠进行解剖。收集 3 组大鼠腹主动脉血以及小肠组织(距离胃幽门 4 cm)。于腹主动脉血中提取出血单个核细胞并置于 -80 °C 低温冰箱中储存。将取出的小肠组织迅速液氮冷冻置于 -80 °C 低温冰箱中储存。

1.4 观测指标

1.4.1 肠组织 MPO 活性的检测 将冷冻的肠组织取出,在生理盐水中按照重量体积比 1 : 10 进行解冻混匀,匀浆按照 1 : 1 进行稀释。之后将得到的样本按照厂家说明,使用中国上海生产的 721 分光光度计进行检测 MPO 分析盒样本在 460 nm 的吸光度。根据在 37 °C 下分解每克肠组织消耗了 1 μmol 的过氧化氢所需的 MPO 量得出一个单位的 MPO 活性。

1.4.2 肠组织 MDA 含量的检测 使用 MDA 试剂盒测定肠组织 MDA 含量。将冷冻的肠组织置于冰浴器内在生理盐水中按照重量体积比 1 : 10 进行混匀。均浆在 4 °C 下按照 900 r/min 离心 10 min。严格按照制造商的说明测量上清液中的 MDA 含量并使用分光光度计测量标本在 532 nm 下的吸光度。上清液中的蛋白浓度使用染色法进行测量,MDA 含量用每毫克蛋白所含 MDA 纳米摩尔数进行描述。

1.4.3 PBMCs 的分离与 p38 MAPK 活性的检测 将冷冻的 PBMCs 取出后复苏并用冷的细胞裂解缓冲液进行细胞溶解。溶解产物在冰上孵育 15 min,在 1 400 r/min 下离心 15 min,收集上清液用于分析。蛋白提取物(40 μg)通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,并电泳转移至硝酸纤维素膜上。该膜在程序阻止后,先使用 p38 和 p-p38 的初级抗体(美国圣克鲁斯生物工程公司)进行免疫印迹,后在 4 °C 的温度下放置一夜,后加入第二抗体孵育。免疫反应阳性的条带用 ECL 免疫印迹检测系统(英国安玛西亚公司)进行检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,所得资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验中 3 组间的数据按照单因素方差法(ANOVA)进行分析,LR 组与 HS 组各时相点间比较采用 *t* 检验进行处理。

2 结果

2.1 200 mmol/L 的 HS 能减低严重烫伤大鼠肠组织的 MPO 活性 LR 组各时间点肠组织的 MPO 活

性与对照组比较有显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);而对照组中肠组织 MPO 活性与对应的 HS 组相比,差异无统计学意义;HS 组各时间点 MPO 活性与 LR 组比较有显著减低,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。ANOVA 的 *F* 值为 7.833 *t* 检验的 2、8 及 24 h 的 *t* 值分别为 7.155、2.417 及 2.441,见图 1。

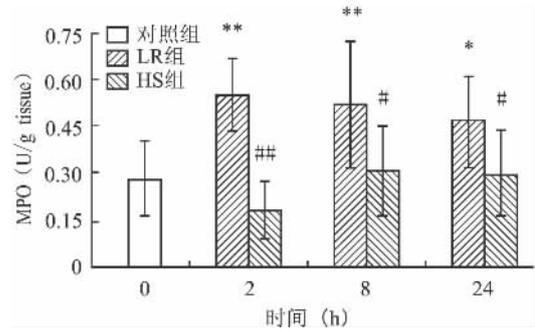


图1 200 mmol/L HS 对严重烫伤大鼠肠组织 MPO 活性的影响 与对照组比较: * $P < 0.05, ** P < 0.01$; 与 LR 组比较: # $P < 0.05, ## P < 0.01$

2.2 200 mmol/L 的 HS 能减少严重烫伤大鼠肠组织的 MDA 含量 LR 组各时间点肠组织的 MDA 含量与对照组比较有显著性增高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);而对照组中肠组织 MPO 活性与对应的 HS 组相比,差异无统计学意义;HS 组各时间点 MDA 含量与 LR 组比较有显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。ANOVA 的 *F* 值为 6.025 *t* 检验的 2、8 及 24 h 的 *t* 值分别为 2.522、2.678 及 3.161,见图 2。

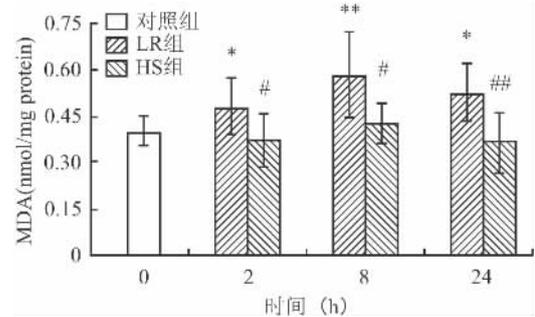


图2 200 mmol/L HS 对严重烫伤大鼠肠组织 MDA 含量的影响 与对照组比较: * $P < 0.05, ** P < 0.01$; 与 LR 组比较: # $P < 0.05, ## P < 0.01$

2.3 200 mmol/L 的 HS 对严重烫伤大鼠 PBMCs 中 p38MAPK 活性的影响 烧伤后 PBMCs 中的 p38MAPK 活性明显增强,LR 组与 HS 组在相应的 3

个时间点上与对照组相比 p38MAPK 活性表达均明显增强 ($P < 0.01$) ,而对比 HS 组与 LR 组 3 个时间点上的 PBMCs 中 p38MAPK 活性含量比较差异无统计学意义。ANOVA 的 F 值为 13.901 , t 检验的 2、8 及 24 h 的 t 值分别为 0.037、1.100 及 -1.239 ,见图 3。

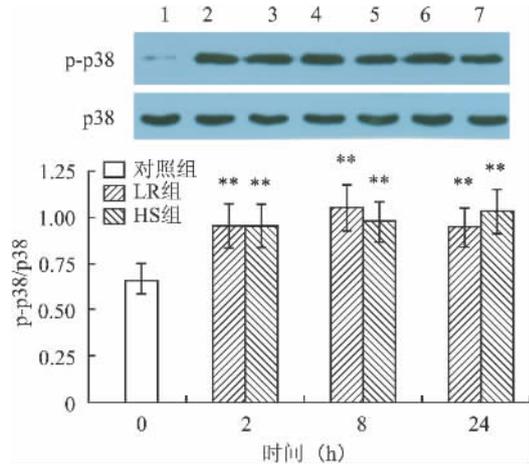


图3 200 mmol/L HS 对严重烫伤大鼠 PBMCs 中 p38MAPK 活性的影响

1: 对照组; 2: LR 2 h 组; 3: HS 2 h 组; 4: LR 8 h 组; 5: HS 8 h 组; 6: LR 24 h 组; 7: HS 24 h 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

严重烧伤后,由于大面积皮肤组织的坏死以及毛细血管通透性的增加使大量体液丢失,导致患者较早发生休克。烧伤休克能引发组织缺氧并影响钠 ATP 酶泵的功能,这使得大量的钠离子进入到细胞内,降低了细胞外的晶体渗透压,细胞水肿明显,进一步加重了低血容量^[5]。钠离子内移引起的低钠血症将进一步加重组织细胞水肿,甚至导致器官功能障碍。因此,适当地使用 HS 有助于减轻组织细胞水肿,防止医源性并发症。前期的研究^[4]显示使用 200 mmol/L 的 HS 复苏休克较 LR 能明显减轻肺水肿以及阻止低钠血症的发生。

严重烧伤后,机体迅速发生应激反应,中性粒细胞聚集,氧自由基的产生增加,并通过脂质过氧化反应,引发细胞膜的氧化损伤最终致使细胞坏死^[6]。对于肠组织主要表现为组织缺血缺氧,黏膜屏障受损,大量的中性粒细胞被激活聚集到肠组织中,由此大量产生的 MPO 打破了氧化与抗氧化物质平衡引起肠道损伤。国外相关研究^[7]表明与 LR 比较,使用 HS 复苏休克可降低组织中 MPO 的含量,提高患

者的生存率。严重烧伤后体内氧自由基含量增加,各组织器官中的 MDA 的含量也明显升高^[8]。因此,肠组织均浆中 MDA 的浓度可以评估肠组织中氧自由基释放所引发的细胞损伤程度。在比较 LR 组和 HS 组数据后,发现 200 mmol/L 的 HS 能明显降低严重烧伤后大鼠肠组织中的 MPO 活性以及 MDA 浓度,表明使用 200 mmol/L 的 HS 复苏能减轻肠组织缺血缺氧后的中性粒细胞浸润、氧化应激反应与细胞损伤。最近研究^[9]显示输注适量的 HS (365 mOsm/L) 较等渗盐溶液能明显减轻大鼠肠缺血后的缺血再灌注损伤。

PBMCs 是产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6 (IL-6) 等细胞因子的主要免疫细胞,在烧伤与创伤后早期的全身炎症反应中发挥重要的作用。p38MAPK 是人体内 MAPK 通道中的最重要的分支之一,激活 p38 信号转导通路是许多蛋白质诱导炎症过程以及调控细胞因子分泌的关键因素^[10]。因此,测定 PBMCs 中的 p38MAPK 可以了解严重烫伤后大鼠的早期全身炎症反应的关键环节。薛丽等^[11]研究发现,HS (719 mmol/L) 对失血性休克大鼠复苏与等渗盐水比较,T 淋巴细胞的 p38MAPK 表达显著降低。通过使用 200 mmol/L 的 HS 对严重烫伤大鼠复苏与 LR 复苏比较,发现两者 PBMCs 中的 p38MAPK 活性表达无显著差异,这可能与所使用的 HS 浓度 (200 mmol/L) 有关。

总之,与 LR 比较,使用 200 mmol/L 的 HS 复苏能有效减轻严重烫伤大鼠肠组织的氧化应激反应,其保护作用主要是通过减少中性粒细胞在肠组织的聚集和有效减缓肠组织中氧自由基的大量释放。对于烧伤后 PBMCs 中的 p38MAPK 活性表达的影响,两者没有显著差异,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Samuel J C, Campbell E L, Mjuweni S, et al. The epidemiology, management, outcomes and areas for improvement of burn care in central Malawi: an observational study [J]. J Int Med Res, 2011, 39(3): 873-9.
- [2] Greenhalgh D G. Burn resuscitation [J]. J Burn Care Res, 2007, 28(4): 555-65.
- [3] Riha G M, Kunio N R, Van P Y, et al. Hextend and 7.5% hypertonic saline with Dextran are equivalent to Lactated Ringer's in a swine model of initial resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock [J]. J Trauma, 2011, 71(6): 1755-60.
- [4] 吴雪生, 孙业祥, 陈旭林. 高渗盐复苏液对严重烫伤大鼠早期血钠及细胞因子的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47

- (6): 631-3.
- [5] Pham T N, Cancio L C, Gibran N S, et al. Association American Burn. American Burn Association practice guidelines burn shock resuscitation[J]. *J Burn Care Res*, 2008, 29(1): 257-66.
- [6] Fang Y, Fu X J, Gu C, et al. Hydrogen-rich saline protects against acute lung injury induced by extensive burn in rat model [J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32(3): 82-91.
- [7] Junger W G, Rhind S G, Rizoli S B, et al. Resuscitation of traumatic hemorrhagic shock patients with hypertonic saline-without dextran-Inhibits neutrophil and endothelial cell activation [J]. *Shock*, 2012, 38(4): 341-50.
- [8] Bekyarova G, Tancheva S, Hristova M. The effects of melatonin on burn-induced inflammatory responses and coagulation disorders in rats[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2010, 32(5): 299-303.
- [9] Korniyushin O, Galagudza M, Kotslova A, et al. Intestinal injury can be reduced by intra-arterial postischemic perfusion with hypertonic saline[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(2): 209-18.
- [10] Saito H. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(6): 677-83.
- [11] 薛丽, 薛荣亮. 高渗氯化钠羟乙基淀粉40注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤后凋亡细胞及对 p38 MAPK 和 Ref-1 表达的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2009, 30(1): 8-11.

Effect of 200 mmol/L Na⁺ hypertonic saline resuscitation on oxidative stress of intestinal tissue and p38MAPK expression of PBMCs in severely burned rats

Gao Zhi¹, Wu Xuesheng², Sun Yexiang¹, et al

(¹Dept of Burns, ²Dept of Emergency Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effect of 200 mmol/L Na⁺ hypertonic saline resuscitation on oxidative stress of intestinal tissue and p38MAPK expression of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in severely burned rats.

Methods Fifty-six SD rats were randomly divided into three groups: control group, sodium lactate Ringer's solution group (LR group) and hypertonic sodium solution group (HS group). Neck vein catheterization was used on all rats, and burn resuscitation therapy was adopted in the rats of LR group and HS group. The myeloperoxidase (MPO) activity and malondialdehyde (MDA) content of intestinal tissue were measured in three groups. PBMCs were isolated and the p38MAPK expression was determined by Western blot analysis. The data drawn from the test were statistically analyzed.

Results The MPO activity and MDA content of intestinal tissue at each time point after resuscitation between HS group and LR group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The MPO activity and MDA content of intestinal tissue at each time point after resuscitation in HS group were significantly lower than those of the LR group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which compared with the control group, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The p38MAPK expressions of PBMCs at 2, 8, 24 h after fluid resuscitation between LR group and HS group were significantly expressed in comparison with the control group ($P < 0.01$). They had no obvious difference between LR group and HS group ($P > 0.05$).

Conclusion Compared with sodium lactate Ringer's solution, 200 mmol/L Na⁺ hypertonic saline resuscitation can attenuate oxidative stress of intestinal tissue in severely burned rats, but not affect the p38MAPK expression of PBMCs in severely burned rats.

Key words burns shock; hypertonic saline; MPO; MDA; p38MAPK