

高温高湿环境犬肢体火器伤后肿瘤坏死因子 - 含量变化的实验研究

张旭辉,裴国献,魏宽海,周祥吉(第一军医大学南方医院创伤骨科,广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨高温高湿环境下肢体火器伤后肿瘤坏死因子 - (TNF-)含量变化的规律。方法 将犬随机分为常温常湿组、热习服组、高温高湿组,分别在致伤前及火器伤后 1、3、4、6、8、10、14、18、24h检测血浆和伤道骨骼肌中 TNF- 含量。结果 (1)伤道骨骼肌中 TNF- 含量较血浆中明显升高 ($P<0.05$);(2)常温常湿创伤组 TNF- 4h开始升高,14h达高峰;(3)高温高湿创伤组 1h升高,10h达到高峰,其峰值显著高于常温常湿组 ($P<0.05$);(4)热习服组 TNF- 变化基本和高温高湿组一致,只是升高幅度较低 ($P<0.05$)。结论 (1)TNF- 参与了高温高湿环境下肢体火器伤后机体的病理生理过程;(2)预示着 TNF- 是高温高湿环境下火器伤病程变化的指标。

关键词:高温高湿环境;火器伤;肿瘤坏死因子 -

中图分类号:R826.68 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2001)12-0913-04

Dynamic changes of TNF- content in dogs after gunshot wound in the limbs in hot and humid environment

ZHANGXu-hui, PEIGuo-xian, WEIKuan-hai, ZHOUXiang-ji

(Department of Orthopedics and Traumatology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Objective To investigate the dynamic changes of TNF- content in the plasma and body tissues of dogs after gunshot wound in the limbs in hot and humid environment. Methods Eighteen dogs with gunshot wound were divided into 3 groups (6 in each), one observed in normal environment (NE group) and the other two in hot and humid environment including a heat-acclimatized group (HA group) and a non-acclimatized group (NHA group). The contents of tumor necrosis factor- (TNF-) in the plasma and muscle tissues from the gunshot wound tract were measured at 0, 1, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24 h respectively after the injury. Results TNF- content in the muscular tissue from gunshot wound tract was significantly higher than that in the plasma ($P<0.05$). At 4h after injury, TNF- content started to rise in NE group, reaching the peak level at 14 h, the rise and peaking of which occurred at 3 and 10h respectively in NHE group with higher peak level than that in NE group ($P<0.05$). The changes of TNF- content in HA group was consistent with NHE group except for a significantly lower peak level ($P<0.05$). Conclusion TNF- participates in the pathophysiological process after gunshot wound in hot and humid environment and may play the role of an indicator for the pathological changes that take place after the injury.

Key words hot and humid environment; gunshot wound; tumor necrosis factor-

本实验拟在人工气候室模拟高温高湿环境下,以犬肢体火器伤为实验模型,观察高温高湿环境火器伤后伤道周围同一区域骨骼肌匀浆及血浆中肿瘤坏死因子 - (TNF-)含量变化,以及热适应对其变化的影响,以探讨高温高湿环境下 TNF- 在整体动物中的变化规律,了解火器伤组织损伤特点,判断组织损伤的程度及转归,为这一特殊环境下肢体战创伤的救治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

1.1.1 气象条件 高温高湿气象条件:干球温度(Tdb)

(36.0 ± 0.3),湿球温度(Twb)(33.3 ± 0.85),相对湿度(rh)(68 ± 3);常温常湿气象条件:Tdb(27.42 ± 1.37),Twb(20.01 ± 1.12),rh(50.25 ± 6.74)%。

1.1.2 热习服组动物的准备 6只杂种犬每日高温高湿条件下热适应2h,连续14d,测定热习服前后肛温变化不超过0.3即可。

1.1.3 动物分组 18只实验犬,体质量10~15kg,雌雄不拘,随机分为3组:高温高湿组(NHE)、常温常湿组(NE)和热习服组(HA),每组均为6只。脱毛、称体质量,3%戊巴比妥钠30mg/kg·b.w.静脉麻醉,仰卧位固定于致伤架,用五四式手枪、7.62mm子弹于单侧股部肌肉最丰满处致伤;射击距离1.0m,避开骨骼和大血管。伤后立即简单包扎止血,置入人工气候室舱。

1.2 方 法

1.2.1 肛温测定 使用肛温表,于伤前和伤后1、3、4、6、8、10、14、18、24h测定肛温。

收稿日期:2001-06-04

基金项目:全军九五医药卫生杰出中青年基金(98J004)

作者简介:张旭辉(1970-),男,云南巧家人,2001年毕业于第一军医大学,硕士,主治医师,电话:020-85141744

1.2.2 血浆提取 于伤前和伤后 1、3、4、6、8、10、14、18、24h 取抗凝静脉血 4ml, 4、3000r/min 离心 10 min, 取其上清液约 2ml, 置于 -20 冰箱内保存。

1.2.3 伤道周围肌肉组织匀浆的制备 取出震荡区湿质量约 0.3~0.5g 肌肉, PBS 漂洗 3 次, 粗剪, 放入冰浴的匀浆器中, 内含 2ml 10×细胞裂解液 (NewEnglandBiolabsInc) 制作匀浆, 取悬浮液于相差显微镜下观察细胞破裂程度, 要求至少 95% 的骨骼肌细胞破裂, 用 300 目无菌过滤器去除结缔组织, -20 保存待测。

1.2.4 Bradford 法测定总蛋白含量 用牛血清白蛋白绘制标准曲线, 根据标准方程求出各样品的蛋白含量。

1.2.5 TNF- α 测定 采用双抗夹心 ELISA 法, 试剂盒购于北京邦定公司。首先将标准品依次稀释为 10.000、5.000、2.500、1.250、0.625、0.312、0.156、0.078 mg/ml。待测血浆和组织匀浆液不稀释。将各浓度标准品及样品分别加入抗体已包被好的 ELISA 微孔板

内, 每孔 100ml, 室温闭光, 洗板 3 次拍干, 加入稀释好的酶标抗体, 每孔 100 ml, 37 孵育 1 h, 洗板 3 次后加入配好的 ABTS 显色液, 每孔 100ml, 待标准浓度各孔呈现颜色梯度后加终止液。酶联记数仪于 410nm 处测 D_{410} , 绘制标准曲线, 根据每个标本 D 值在标准曲线上查得相应的 TNF- α 浓度, 计算出相应的骨骼肌匀浆单位总蛋白和血浆中 TNF- α 数值。

1.3 统计学处理

实验资料采用 SPSS8.0 统计软件进行处理, 组内多个数据采用重复测量的方差分析。

2 结果

2.1 体温变化

伤前 3 组动物体温无差别, 伤后 4 h NHA 组和 HA 组动物体温明显升高达 (40.9±0.7)、(40.1±1.0), 此后持续高热, 14~24h 均达 42 以上。NE 组动物伤后轻度升高, 至 24h 达 (39.9±0.5)。在高温高湿环境下, 肛温较常温常湿环境普遍升高 2.3~3.5 (表 1)。

表 1 常温常湿组、热习服组和高湿高湿组肢体火器伤后肛温变化 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Anal temperature of NE HA and NHA groups after the injury ($\bar{x} \pm s$)

Group	0h	1h	3h	4h	6h	8h	10h	14h	18h	20h
NE	37.8±0.5	38.3±0.6	38.8±0.4	38.9±1.2	39.3±0.6	39.7±0.6	39.5±0.8	39.6±0.6	39.9±0.8	39.9±0.5
HA	37.5±0.9	39.9±0.5	40.1±0.5	40.9±0.7	41.6±0.9	41.5±0.6	41.9±0.7	42.3±0.7	42.2±0.9	42.5±0.6
NHA	37.6±0.8	40.3±0.5	40.1±0.4	40.7±1.0	41.4±0.9	41.8±0.6	41.9±0.8	42.0±0.7	42.4±0.9	42.6±0.9

NE:Normal environment group; HA:Heat-acclimatized group; HHA:Non-heat-acclimatized group

2.2 TNF- α 的含量变化

2.2.1 血浆中 TNF- α 的含量 (1)NE 创伤组火器伤后, TNF- α 的表达在 4h 开始升高, 14h 达到高峰, 后平稳下降。(2)NHA 组 TNF- α 表达在 1h 开始升高, 10h 达到高峰, 其峰值和常温常湿组相比有显著性差异, 说明创伤及 NE 均可增加 TNF- α 的表达, 二者复合素可以叠加升高的幅度。(3)HA 组 TNF- α 含量也是在 1h 升高, 10h 达到高峰。3 组曲线形状基本一

致, 3 组峰值比较都有显著性差异, $P < 0.05$, 只是 NHA 组最高, NE 组最低, NHA 环境下的损伤均是在伤后 10h 出现高峰, 伤后 18h 迅速下降, 24h 却高于 NE 组的含量 (图 1)。

2.2.2 伤道骨骼肌中 TNF- α 的含量 (1)基本变化趋势等同于血浆中 TNF- α 含量的表达, 但在骨骼肌中的含量明显高于血浆。(2)HA 组 8h 开始升高, 10h 开始下降, 但峰值较其它两组低 (图 2)。

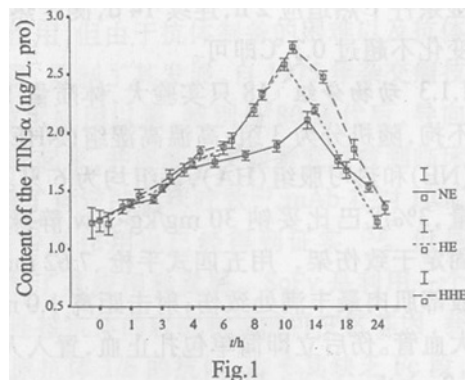


图 1 血浆中 TNF- α 随时间变化量

Fig.1 Changes of TNF- α content in the plasma in the 3 groups

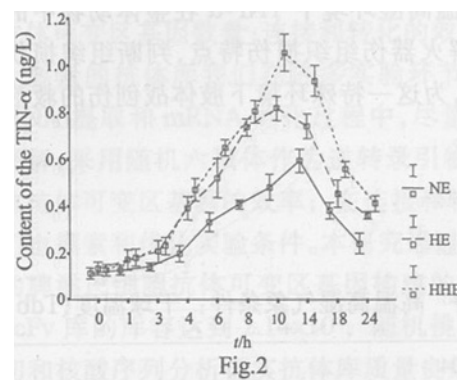


图 2 伤道骨骼肌中 TNF- α 随时间变化量

Fig.2 Changes of TNF- α content in the muscular tissues in the gunshotwound tract in the 3 groups

3 讨论

TNF 是能够引起肿瘤组织出血坏死,并具有多方面功能的细胞因子。以往人们认为内毒素、植物血凝素等是刺激机体产生 TNF- α 的主要原因。随着对 TNF- α 认识的加深,发现烧伤、创伤等状态下 TNF- α 也大量分泌。TNF- α 在免疫网络中起着较为重要的作用,TNF- α 在炎症反应中较早出现并迅速达到高峰,尽管半衰期很短,但却是激活细胞因子级联反应的主要介质之一,创伤后体内生成增加,可与广泛存在于组织细胞内的 TNF- α 受体以特异的高亲和力结合,诱发一系列的病理生理反应。TNF- α 多在局部组织产生,现已证明支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 含量与成人呼吸窘迫综合征 (ARDS) 之间存在相关性,TNF- α 平均含量明显高于脓毒症患者血浆 TNF- α 水平,提示高浓度的 TNF- α 在肺部产生而非来自体循环。Brown 等^[1]在犬的骨折创伤模型中发现,伤后 1~6 d 内局部伤道 TNF- α 和血浆中的含量相比升高 3~34 倍,7 d 后各组的含量基本一致。

Youn 等^[2]报道细胞因子在创伤后并发症的发生中起着极为重要的作用。严重创伤和感染常伴有威胁生命的休克,与炎性细胞因子尤其是 TNF- α 相关^[3]。TNF- α 是刺激免疫细胞增殖活化的重要因子,作为前炎性介质和调节因子参与炎症及免疫反应,在大鼠急性氯化镍中毒模型中发现,TNF- α 升高的同时过氧化脂质 (LPO) 的代谢产物 (MDA) 以及血清中 ALT、AST 均相应增高,予以抗氧化剂维生素 C 治疗后,TNF- α 、MDA、ALT 及 AST 均显著降低,故推断 LPO、TNF- α 的升高是氧自由基所诱导^[4]。Zhu 等^[5]在脑部毛细血管内皮细胞中发现,TNF- α 可以引起超氧化物的产生,也提示了 TNF- α 和氧自由基的相关性。在大鼠的脑损伤模型中发现 TNF- α 和细胞内活性氧族 (Reactive oxygen species, ROS) 大量产生,在小鼠闭合性脑损伤后数小时即出现 TNF- α 的高峰,直接注射 TNF- α 引起小鼠血脑屏障的破坏,提示其对脑的急性损伤。人工合成的硝基抗氧族可以保护血脑屏障,类似的现象在热适应以后也能观察到^[6]。Stover 等^[7]实验证实大鼠外伤性颅脑损伤模型中发现 CSF 中 TNF- α 在伤后 8 h 即有显著升高,24 h 达到高峰。Czako^[8]在小鼠胰腺炎模型中发现,TNF 在 12 h 显著升高,24 h 达到高峰,而 Mn-SOD 则显著降低,二者呈负相关性。田玉科等^[9]报道多发伤创伤后炎性细胞因子 TNF- α 的升高与严重感染密切相关,可能是机体发生一系列病理生理反应和组织损伤的重要介质,血清 TNF- α 水平的升高与严重感染的发生率呈正相关。有人提出 TNF- α 可以引起发热、炎症反应以及组织损伤,甚至于死亡,在超过 10000 病例的

双盲对照实验中,应用抗细胞因子抗体治疗来抑制 TNF- α 的活性,可以提高 2%~3% 的生存率^[10]。从而提示 TNF- α 在创伤中对机体的损伤作用。TNF- α 通过活化磷脂酶 A₂ 和促使 ROS 迅速增加,引起细胞的脂质过氧化作用,导致组织细胞炎症损伤。TNF- α 能引起血管内皮细胞损伤,广泛的凝血使生命器官坏死、毛细血管渗漏综合症使全身脱水和肺衰竭,导致全身性炎症综合症,而抗 TNF- α 抗体减轻这种炎症反应^[11]。在豚鼠局部平滑肌应用 TNF- α 2000U,可加重组织微血管的损伤,并引起白细胞迁移,血管大分子渗漏,而且还观察到 TNF- α 引起的细胞凋亡^[12]。

虽然有大量的实验现象佐证了 TNF- α 对组织的损伤作用,但 Riche 等^[13]曾发现在腹腔脓毒性休克病人中,血清中高 TNF- α 值常伴有生存率增高,提示 TNF- α 对抗脓毒症的腹膜炎炎症反应,其结果需进一步阐明。Adamik 等^[14]在败血症和多器官功能衰竭的病人中观察到生存组 TNF- α 开始的水平较非生存组高,而在 5 d 后出现下降,IL-6 高水平伴 TNF- α 升高在非败血症病人中亦可观察到相同的结果,提示 TNF- α 在血循环中的出现是组织重建和创伤愈合的关键。

本实验观察了 3 种不同条件下外周血淋巴细胞中和伤道骨骼肌中 TNF- α 含量的变化,以探讨高温高湿环境、创伤及其复合作用和 HA 对 TNF- α 表达量的影响。(1)NE 组的变化提示枪伤可以刺激机体 TNF- α 含量的升高,在伤道骨骼肌中的含量与外周淋巴细胞的表达基本一致,但局部伤道 TNF- α 含量的变化较血浆中的改变明显,开始升高和达到高峰的时间点提前,分别为 3、10 h,显示出局部创口的 TNF- α 变化较血浆中 TNF- α 的改变更能客观地反映局部火器伤的病理变化过程。(2)NHE 组的变化说明高温应激条件也可使 TNF- α 的表达量增加,枪伤加高温复合因素较单纯枪伤更能增加 TNF- α 的表达量,10 h 以后渐下降,此时不排除由于机体各组织器官功能衰竭对 TNF- α 表达量的影响以及其他细胞因子变化引起的免疫网络改变的影响。(3)HA 组变化提示经过热适应,在相同高温高湿应激条件下,TNF- α 的峰值下降,可能会降低机体炎症反应的程度,有利于保护机体。

本实验中显示 NHE 环境下损伤 4 h 以前升高的幅度均不明显,18 h 后含量迅速下降,24 h 后 TNF- α 含量均较常温常湿组为低,这些现象可能与机体内免疫网络中其他因子的变化或机体功能耗竭后 TNF- α 无法表达相关联。本实验中无论在 NHE 或者是 NE 的环境下,局部伤道 TNF- α 的含量明显高于外周血中的含量,利用局部 TNF- α 含量来评估整体的

TNF- 的表达更为灵敏。NHE 组 TNF- 含量 10h 达到高峰,提示仅就 TNF- 这一指标而言,NHE 环境下肢体火器伤后 10h 可能为一机体免疫变化的临界点,应当在此时限以前完成伤道的初步处理。热适应可以明显降低相应 TNF- 的含量,有利于机体组织的保护。

由此可见,TNF- 是机体免疫网络中重要的介质,参与了高温高湿环境下肢体火器伤后机体的病理生理过程,预示 TNF- 是高温高湿环境下火器伤病程变化的重要指标。

参考文献:

- [1] Brown SA, Mayberry AJ, Mathy JA, et al The effect of muscle flap transposition to the fracture site on TNF alpha levels during fracture healing [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 105(3):991-8.
- [2] Youn YK, Lalonde C, Demling R. The role of mediators in the response to thermal injury [J]. *World J Surg*, 1992, 16(1):30-8.
- [3] Dickerson C, Udem B, Bullock B, et al Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses [J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 63(5):602-5.
- [4] Chen CY, Huang YL, Lin TH. Association between oxidative stress and cytokine production in nickel-treated rats [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 356:127-32.
- [5] Zhu DY, Li R, Liu GQ, et al Tumor necrosis factor alpha enhance the cytotoxicity induced by nitric oxide in cultured cerebral endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2000, 66(14):1325-35.
- [6] Trembovler V, Beit Y, Annai E, Younis F, et al Antioxidants attenuate acute toxicity of tumor necrosis factor-alpha induced by brain injury in rat [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19(7):791-5.
- [7] Stover JF, Schoning B, Beyer TF, et al Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 288(1): 25-8.
- [8] Czako L, Takacs T, Varga IS, et al The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin [J]. *J Physiol Paris*, 2000, 94(1): 43-50.
- [9] 田玉科, 罗爱林, 金士翱. 重度创伤后血清肿瘤坏死因子及白细胞介素 6 水平变化与感染性并发症的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16:38.
- [10] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines [J]. *Chest*, 2000, 118(2): 503-8.
- [11] Yamauchi Ji, Vollmar B, Wolf B, et al Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction [J]. *Dig Surg*, 1999, 16(5):400-6.
- [12] Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, et al Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle [J]. *Surgery*, 1999, 126(5): 881-91.
- [13] Riche F, Panis Y, Laisne MJ, et al High tumor necrosis factor serum level is associated with increased survival in patients with abdominal septic shock: a prospective study in 59 patients [J]. *Surgery*, 1996, 120(5):801-7.
- [14] Adamik B, Zimecki M, Wlasczyka A, et al Immunological status of septic and trauma patients. I. High tumor necrosis factor alpha serum levels in septic and trauma patients are not responsible for increased mortality: a prognostic value of serum interleukin 6 [J]. *Arch Immunol Ther Exp Warsz*, 1997, 45(2-3): 169-75.

(上接 912 页)

重要意义。首先,经过进一步筛选可以挑选出许多用途不同的抗体克隆,如针对各种肝癌细胞功能蛋白质活性位点的抗体、特异性结合肝癌细胞的抗体;其次,利用 ScFv 分子量小、免疫原性低、组织穿透力强的特点,可以将其应用于临床肝癌的放射免疫显像和放射免疫导向治疗;还可以通过改造 ScFv 基因,进一步构建多功能抗体,更广泛深入地应用于肝癌的基础和临床研究。

参考文献:

- [1] 徐伟文. 噬菌体抗体库技术 [J]. *国外医学·分子生物学分册*, 1998, 20(5):71-5.
- [2] Drese IS, Kirsch CM, Tatsch K, et al Detection of hepatocellular carcinoma with a new alpha-fetoprotein antibody imaging kit [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(7):2683-90.
- [3] Zeng ZC, Tang ZY, Liu KD, et al Improved long-term survival for unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) with a combination of surgery and intrahepatic arterial infusion of ¹³¹I-anti-HCC mAb Phase I/II clinical trials [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1998, 124(5): 275-80.
- [4] Hoogenboom HR. Antibody phage display technology and its application [J]. *Immunotechnology*, 1998, 4(1):1-20.
- [5] 毕向军, 杨冬华, 李鹏, 等. 特异性抗肝癌噬菌体单链抗体的应用研究 [J]. *肿瘤*, 2001, 21(3):169-71.
- [6] Pavlinkova G, Booth BJ, Batra SK, et al Radioimmunotherapy of human colon cancer xenografts using a dimeric single-chain Fv antibody construct [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9):2613-9.
- [7] Bi XJ, Yang DH. Application of phage display ScFv library against HCC in vitro [J]. *IJMCT*, 2000, 3(2):78-82.