

# II°烧烫伤模型大鼠体内TGF-β、p38 MAPK、IL-1β的表达分析

林小凤\*, 石鹤坤, 郑健生, 林秀丽, 陈秋红, 陈锦珊#(解放军第175医院/厦门大学附属东南医院, 福建漳州 363000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1577-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.13

**摘要** 目的:探讨II°烧烫伤模型大鼠体内转化生长因子β(TGF-β)、p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和白细胞介素1β(IL-1β)的表达情况。方法:取大鼠分为4组,每组14只,分别为正常对照组、NaOH烧伤组、水烫伤组和乙醇烧伤组,分别建立相应的II°烧烫伤模型,24h后观察各组大鼠病理变化,酶联免疫吸附剂测定法检测各组大鼠建模后第1、4、7天血清中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β的水平。结果:与正常对照组比较,其余3组大鼠均可见表皮及真皮有不同程度的缺损或坏死,炎症细胞向肌层组织浸润,其中水烫伤组和乙醇烧伤组大鼠皮下水肿明显;NaOH烧伤组大鼠血清中TGF-β和p38 MAPK水平在第4、7天均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),IL-1β表达无明显变化;水烫伤组大鼠血清中TGF-β水平在第1、4、7天均明显升高( $P<0.05$ ),p38 MAPK和IL-1β水平在第4、7天明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );乙醇烧伤组大鼠血清中TGF-β水平在第4天明显升高( $P<0.05$ ),p38 MAPK和IL-1β水平在第1、4、7天均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:水烫伤和乙醇烧伤可致大鼠II°烧烫伤模型中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β水平均有不同程度的升高,并可能激发TGF-β、p38 MAPK和IL-1β参与的炎症信号通路。

**关键词** 烧烫伤;大鼠;转化生长因子β;p38丝裂原活化蛋白激酶;白细胞介素1β

## Analysis of the Expressions of TGF-β, p38 MAPK and IL-1β in II° Burn and Scald Model Rats

LIN Xiao-feng, SHI He-kun, ZHENG Jian-sheng, LIN Xiu-li, CHEN Qiu-hong, CHEN Jin-shan (No. 175 Hospital of PLA/The Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Fujian Zhangzhou 363000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To explore the expressions of TGF-β, p38 MAPK and IL-1β in II° burn and scald injury model rats. METHODS: Rats were divided into 4 groups with 14 rats in each group, such as normal control group, NaOH burn group, water scald group and ethanol burn group. II° burn and scald models were established, and the pathological changes of rats were observed 24 h later; the expression of serum TGF-β, p38 MAPK and IL-1β were determined with ELISA 1, 4 and 7 days after modeling. RESULTS: Compared with normal control group, there were varying degrees of impairment or necrosis in epidermis and dermis, inflammatory cell infiltration to the muscle tissue in three burn and scald groups, and water scald and ethanol burns groups showed obvious tissue edema. The serum levels of TGF-β and p38 MAPK increased significantly in NaOH burn group on the 4th and 7th day ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); the expression of IL-1β had no significantly change. The serum levels of TGF-β increased significantly in water scald group on the 1st, 4th and 7th day ( $P<0.05$ ); the serum levels of p38 MAPK and IL-1β increased significantly on the 4th and 7th day ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The level of serum TGF-β increased significantly in ethanol burn group on the 4th day ( $P<0.05$ ); the serum levels of p38 MAPK and IL-1β increased significantly on the 4th and 7th day ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: Water scald and ethanol burn can cause different degree of the increase of TGF-β, p38 MAPK and IL-1β in II° scald and burn injury model rat, which may stimulate the inflammation signaling pathways associated with TGF-β, p38 MAPK and IL-1β.

**KEYWORDS** Burn and scald injury; Rats; TGF-β; p38 MAPK; IL-1β

- 2003,1 653(1):1.
- [10] Birchmeier W. Cell adhesion and signal transduction in cancer: *conference on cadherins, catenins and cancer*[C]. EMBO Rep, 2005, 6(5):413.
- [11] Kaneyuki U, Ueda S, Yamagishi S, *et al.* Pitavastatin inhibits lysophosphatidic acid-induced proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic smooth muscle cells by suppressing rac-1-mediated reactive oxygen species generation[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 46(4):286.
- [12] Krum H, Bailey M, Meyer W, *et al.* Impact of statin therapy on clinical outcomes in chronic heart failure patients according to beta-blocker use: results of CIBIS II [J]. *Cardiology*, 2007, 108(1):28.
- [13] Leung WH, Lau CP, Wong CK, *et al.* Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients[J]. *Lancet*, 1993, 41(8 859):1 496.
- [14] Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in romocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species[J]. *Hypertension*, 2001, 37(6): 1 450.

(收稿日期:2013-12-18 修回日期:2014-01-31)

烧烫伤是指由物理高温或化学试剂引起的皮肤组织损伤,是常见的创伤;其按照病变程度可分为Ⅰ°、Ⅱ°(包括浅Ⅱ°和深Ⅱ°)和Ⅲ°烧烫伤。目前多种烧烫伤动物模型已被建立<sup>[1-2]</sup>,但其模型指标过于单一,且缺乏相关细胞因子的研究,从而限制了烧烫伤分子损伤机制的深入研究和治疗药物的研发。本课题组拟自制复方镰形棘豆凝胶剂用于大鼠烧烫伤模型的研究,为更针对地探索该制剂的药物作用机制。本研究在参考相关文献的基础上,建立了3种大鼠Ⅱ°烧烫伤模型,并对比评价其伤口愈合相关因子转化生长因子β(Transforming growth factor-β, TGF-β)、炎症反应因子p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和白细胞介素1β(Interleukin-1β, IL-1β)蛋白表达含量,初步探讨其可能激发的炎症损伤机制,旨在进一步深化应用,同时为其治疗药物的作用机制和疗效评价提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Multiskan MS 352型酶标仪(芬兰雷勃公司);80-Z电动离心机(金坛市江南仪器厂);LEICA ST5020切片机(德国莱卡公司);OLYMPUS CX31生物显微镜(日本奥林巴斯公司)。

### 1.2 药品与试剂

NaOH(分析纯,广东光华化学厂有限公司,批号:20100113);无水乙醇和硫化钠(分析纯,广州市西陇化工股份有限公司,批号:20120322,20120508);大鼠TGF-β酶联免疫吸附剂(ELISA)试剂盒、大鼠p38 ELISA试剂盒和大鼠IL-1β ELISA试剂盒(美国R&D公司,批号:201305,规格:每盒96T)。

### 1.3 动物

清洁级Wistar大鼠56只,♀♂各半,8~10周龄,体质量为200~250 g,均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物生产许可证号为:SCXK(沪)2012-0002。实验动物环境及设施符合《中华人民共和国实验动物规范》(GB14925-95),动物实验在厦门大学附属东南医院中心实验室(SYXK(军)2007-032)进行,符合中国动物实验的福利伦理准则,获得厦门大学附属东南医院实验动物伦理委员会批准,并按实验动物使用的“3R”原则给予人道的关怀。实验前适应性饲养1周后,自由摄食饮水,并给予普通饲料。

## 2 方法

### 2.1 分组与建模

按体质量随机分为4组,分别为正常对照组、NaOH烧伤组、水烫伤组和乙醇烧伤组,♀♂各半,每组14只。烫伤前1 d,用小电推子在大鼠背部剃毛5 cm×5 cm,并用10%硫化钠脱毛,清水洗净,擦干。实验前大鼠禁食12 h,自由饮水。自制直径为4 cm的圆形镂空的硬纸板,在乙醚麻醉下进行分别建立相应的Ⅱ°烧烫伤模型。NaOH烧伤组:先固定好硬纸板,用棉签蘸取2 mol/L的NaOH溶液,均匀地涂抹在预烧伤部位;水烫伤组:将灌满水的50 ml小烧杯预先完全浸没于(90±0.5)℃水中30 min,取出后迅速置于大鼠背部,持续15 s;乙醇烧伤组:先固定好硬纸板,在预烧伤部位用滴管均匀地滴加无水乙醇3滴,迅速用打火机点燃,持续15 s后迅速用湿抹布扑灭,中间如火势变小再补充无水乙醇1滴。

### 2.2 指标测定

烧烫伤24 h后,从各组大鼠中随机取4只脱白处死,迅速

剥离烧烫伤区域皮肤,切取梭形切口皮肤创面用4%甲醛固定后按常规方法石蜡包埋、石蜡切片,进行苏木精-伊红(HE)染色。普通光镜下观察是否存在Ⅱ°烧烫伤的病理变化<sup>[1]</sup>,如表皮及皮下组织坏死,肌层炎性细胞浸润及肉芽组织增生,表皮细胞及毛囊上皮细胞核固缩、水疱等。

大鼠烧烫伤后第1、4、7天,乙醚麻醉大鼠,用玻璃毛细管进行眦内静脉采血约2 ml,室温下血液自然凝固15 min,3 000 r/min(离心半径8 cm)离心15 min,收集上清液200 μl,保存过程中如出现沉淀则再次离心。按试剂盒要求检测血清中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β蛋白水平。

### 2.3 统计学方法

计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS 17.0统计分析软件分析。组间显著性差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐者采用LSD法,方差不齐者采用Tamhane分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 病理学变化

正常对照组大鼠皮肤组织结构完整,层次清晰,毛囊及汗腺丰富。NaOH烧伤组、水烫伤组和乙醇烧伤组大鼠均显示为Ⅱ°烧烫伤模型:NaOH烧伤组大鼠疮疡面角质层及表皮缺损,真皮层可见炎症细胞,并向肌层浸润;水烫伤组大鼠可见明显皮下组织水肿,真皮、皮下组织中可见急性慢性炎性细胞并延伸向肌层;乙醇烧伤组大鼠可见表皮及皮下组织坏死明显,真皮层大量炎性细胞聚集,并向肌层浸润,皮下深部有残余毛囊。各组大鼠皮肤病理变化的显微镜图见图1。

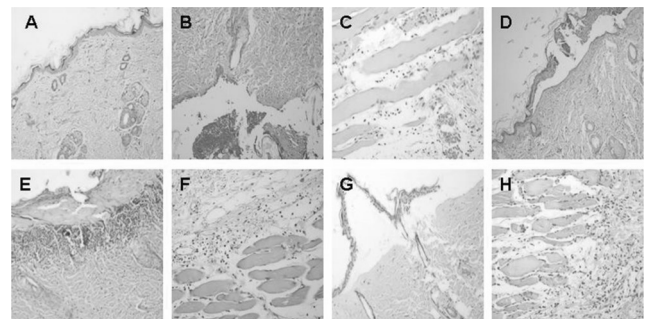


图1 各组大鼠皮肤病理变化的显微镜图(HE, C、F、H:×200,其余:×100)

A.正常对照组;B、C、D.乙醇烧伤组;E、F.NaOH烧伤组;G、H.水烫伤组

Tab 1 Micrograph of pathological changes of skin in rats (HE, C, F, H: ×200, other groups: ×100)

A. normal control group; B, C, D. ethanol burn group; E, F. NaOH burn group; G, H. water scald group

### 3.2 血清中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β蛋白水平

与正常对照组比较,NaOH烧伤组大鼠血清中TGF-β和p38 MAPK蛋白水平在第4、7日均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),IL-1β蛋白表达无明显变化;水烫伤组大鼠血清中TGF-β蛋白水平在第1、4、7日均明显升高( $P<0.05$ ),p38 MAPK和IL-1β蛋白水平在第4、7天明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );乙醇烧伤组大鼠血清中TGF-β蛋白水平在第4天明显升高( $P<0.05$ ),p38 MAPK和IL-1β蛋白水平在第1、4、7日均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组大鼠血清中TGF-β、p38 MAPK、IL-1β蛋白水平见表1。

表1 各组大鼠血清中TGF-β、p38 MAPK、IL-1β蛋白水平( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Tab 1 The content of TGF-β, p38 MAPK, IL-1β in the serum of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	TGF-β, pg/ml			p38 MAPK, pg/ml			IL-1β, ng/L		
	第1天	第4天	第7天	第1天	第4天	第7天	第1天	第4天	第7天
正常对照组	239.54 ± 11.69	238.39 ± 10.03	239.82 ± 10.09	76.90 ± 4.14	77.05 ± 3.62	77.12 ± 2.83	24.41 ± 1.09	23.96 ± 1.20	24.52 ± 1.14
NaOH烧伤组	247.34 ± 14.64	258.69 ± 10.51**	251.93 ± 6.12*	77.27 ± 4.86	83.77 ± 4.95**	82.29 ± 3.53*	25.44 ± 1.39	25.16 ± 1.37	25.16 ± 1.37
水烫伤组	253.06 ± 8.15*	252.54 ± 13.35*	253.06 ± 8.05*	76.57 ± 5.06	82.56 ± 4.84*	83.06 ± 3.19**	25.46 ± 1.60	26.50 ± 1.49*	27.76 ± 1.41**
乙醇烧伤组	248.81 ± 13.09	251.07 ± 13.95*	244.76 ± 9.56	81.64 ± 3.78*	82.48 ± 5.03*	82.98 ± 4.16*	25.94 ± 1.52*	26.88 ± 1.77**	26.19 ± 1.87*

与正常对照组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

vs. normal control group: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

#### 4 讨论

烧烫伤后临床需解决的首要任务是促进伤口愈合修复。创伤修复是一系列复杂的过程,主要包括炎症反应期、纤维组织增殖期和组织重构期。研究这三个阶段中相关因子的表达变化,不仅有助于深入探讨烧烫伤模型的病理机制,还可筛选出更符合药物治疗的动物模型。

TGF-β几乎分布在人体所有的组织器官,多项研究表明TGF-β及其信号通路在创伤修复和瘢痕形成中起关键作用<sup>[9-11]</sup>。本研究中烧烫伤后第1天,仅水烫伤组大鼠TGF-β表达升高比较明显;而在第4天,NaOH烧伤组、水烫伤组和乙醇烧伤组则均明显升高,表明第4天时3个模型组的创伤修复已全面启动。另有研究表明,TGF-β预处理后,可在人类造血细胞和鼠血管组织中检测到p38和p44/p42 MAPK的激活,并推测在炎症条件下TGF-β通过p38介导的途径参与了血管的生长与构建<sup>[6]</sup>。p38相关信号通路是当前关于炎症疼痛研究的热门领域。p38是MAPK家族的四大分类之一,p38静息状态主要散在分布于细胞浆,氧化应激、细胞因子和紫外刺激等多种细胞外信号可激发p38上游因子,启动后p38转移至细胞核内,通过级联反应的磷酸化转录因子来调节效应基因的转录与表达。相关研究表明,抑制p38蛋白的表达可改善烧伤休克,其主要机制是p38作为烧伤血清内皮障碍异常的关键因子通过纤维状肌动蛋白(F-actin)细胞骨架和L-钙调素结合蛋白的磷酸化而发挥作用<sup>[6]</sup>。可见,p38可能在烧伤病理变化中发挥一定的功能。目前认为,炎症介质是导致烧伤高代谢的核心因素,且在烧伤中后期发挥主导作用。IL-1等前炎症介质值得关注,是启动炎症反应的关键分子<sup>[7-8]</sup>。烧伤也可以引起p38的活化。烧伤后血清通过p38信号转导通路增强内皮细胞(EC)血管细胞黏附分子1(VCAM-1)的表达以及外周血单核细胞(PBMC)和EC之间的黏附<sup>[9]</sup>。

本研究中,在水烫伤组和乙醇烧伤组大鼠血清中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β均存在不同程度的升高。因此,笔者推测Ⅱ°水烫伤和乙醇烧伤的大鼠模型,可能是启动了TGF-β触发、p38介导的IL-1β表达的炎症信号通路。本研究的实验结果和推测与Pittet JF等<sup>[10]</sup>关于肺泡上皮细胞上TGF-β1信号通路的报道相符合。然而,TGF-β具有TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3不同亚型,尽管体外研究显示这三种亚型有60%~80%的同源性,其结构和功能非常相似,但3种亚型在创伤愈合的过程中存在时间和空间的差异性。类似地,p38也存在p38α、p38β、p38γ和p38δ4种亚型,不同亚型在细胞信号转导中也具有一

定的特异性。因此,该烧烫伤信号通路后续的相关研究还需考虑蛋白亚型的差异,以获得更清晰的级联反应,为烧烫伤药物治疗机制和疗效评价提供依据。

#### 参考文献

- [1] 黄跃生.烧伤外科学[M].北京:科技文献出版社,2010:775-792.
- [2] 孙倩,马守栋,李明春.纳米银乳膏在烧伤模型大鼠血浆及组织中银的分布[J].中国药房,2013,24(5):405.
- [3] Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, et al. Wnt5a potentiates TGF-β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury[J]. *Science*, 2012, 338(6 103):108.
- [4] Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, et al. Effects of TGF-β and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model[J]. *Inflammation*, 2012, 35(1):138.
- [5] Fang S, Pentimikko N, Ilmonen M, et al. Dual action of TGF-β induces vascular growth in vivo through recruitment of angiogenic VEGF-producing hematopoietic effector cells[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(3):511.
- [6] Chu ZG, Zhang JP, Song HP, et al. p38 Map Kinase mediates burn serum-induced endothelial barrier dysfunction: involvement of F-actin rearrangement and L-caldesmon phosphorylation[J]. *Shock*, 2010, 34(3):222.
- [7] 彭曦.烧伤高代谢机制的再认识及调控策略[J].中华烧伤杂志,2013,29(2):139.
- [8] Shi CS, Shenderov K, Huang NN, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3):255.
- [9] 陈旭林,夏照帆,韦多,等.烧伤血清激活p38丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路和核因子κB诱导血管内皮细胞血管细胞黏附分子1的表达[J].中华烧伤杂志,2005,21(6):426.
- [10] Pittet JF, Koh H, Fang X, et al. HMGB1 accelerates alveolar epithelial repair via an IL-1β-and αvβ6 integrin-dependent activation of TGF-β1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):63 907.

(收稿日期:2013-12-02 修回日期:2014-01-25)