

文章编号 1006-8147(2016)05-0406-03

论著

补充维生素 D 对严重烫伤小鼠血清炎性因子浓度变化的影响

韩夏¹, 张明谏², 李小兵², 刘红杰², 王玉亮³, 刘子健²

(1.天津医科大学一中心临床学院整形与烧伤外科, 天津 300192; 2.天津市第一中心医院整形与烧伤外科, 天津 300192; 3.卫生部危重病急救医学重点实验室, 天津 300384)

摘要 目的:观察补充维生素 D 对严重烫伤小鼠血清炎性因子浓度变化的影响。方法:(1)随机将 88 只小鼠分为实验组和对照组各 40 只,空白对照组 8 只。(2)实验组小鼠烫伤后即刻给予 1,25(OH)₂D₃ 4 μg/kg+0.6 mL 花生油灌胃,每日 1 次,至处死前;对照组烫伤小鼠 0.6 mL 花生油灌胃,每日 1 次,至处死前。(3)于伤后 6、12、24、48、96 h 各组分别随机选择 8 只小鼠,用 ELISA 法检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-4、IL-10 含量。(4)于伤后 96 h 取两组小鼠肠系膜、肝和脾淋巴结组织分别制成匀浆,做 48 h 细菌培养计算菌落形成单位数量。**结果:**(1)烫伤后 12、24、48、96 h,实验组和对照组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-4、IL-10 浓度分别高于空白对照组水平($P<0.05$)。(2)烫伤后 24、48、96 h,实验组小鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 浓度分别低于对照组水平($P<0.05$);烫伤后 12、24、48、96 h,实验组小鼠血清 IL-4 和 IL-10 浓度分别高于对照组水平($P<0.05$)。(3)伤后 96 h 实验组小鼠肠系膜、肝和脾淋巴结组织菌落形成单位量分别低于对照组($P<0.05$)。**结论:**严重烫伤小鼠伤后补充维生素 D 能够降低 TNF-α 和 IL-1β 浓度,提高 IL-4 和 IL-10 浓度,并减少肠系膜、肝和脾淋巴结组织菌落形成单位数量。

关键词 维生素 D; 烫伤; 炎性因子; 小鼠

中图分类号 R644

文献标志码 A

Effect of vitamin D supplementation on the changes of serum inflammatory cytokines in severely scalded mice

HAN Xia¹, ZHANG Ming-jian², LI Xiao-bing², LIU Hong-jie², WANG Yu-liang³, LIU Zi-jian²

(1. Department of Burns and Plastic Surgery, The First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of Burns and Plastic Surgery, The First Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China; 3. The Key Laboratory of Critical Care of Medical Ministry of Health, Tianjin 300384, China)

Abstract Objective: To explore the effect of vitamin D supplementation on the changes of serum inflammatory cytokines in severely scalded mice. **Methods:** (1) Eighty-eight mice were assigned into 3 groups randomly: treatment group (40), control group (40) and blank group (8). (2) Mice in treatment group were immediately fed 0.6 mL peanut oil with 1,25(OH)₂D₃ (4 μg/kg) once a day post-burn, and mice in control group received only 0.6 mL peanut oil without 1,25(OH)₂D₃. (3) The levels of serum TNF-α, IL-1β, IL-4 and IL-10 were determined respectively by ELISA at the time of 6, 12, 24, 48 h and 96 h post-scald. (4) The colony-forming units of liver, spleen and mesenteric lymph nodes of mice in two groups were calculated respectively at 96 h post-scald. **Results:** (1) The serum TNF-α, IL-1β, IL-4 and IL-10 levels in treatment and control group were significantly higher than those in blank group at the time of 12, 24, 48 h and 96 h post-scald ($P<0.05$). (2) The serum TNF-α and IL-1β levels in treatment group were lower than those in control group at the time of 24, 48 and 96 h post-scald ($P<0.05$), and the serum IL-4 and IL-10 levels in treatment group were higher than those in control group at the time of 12, 24, 48 h and 96 h post-scald ($P<0.05$). (3) The numbers of colony-forming units of liver, spleen and mesenteric lymph nodes of mice in treatment group were lower than those in control group at 96 h post-scald ($P<0.05$). **Conclusion:** Supplementing vitamin D could reduce the levels of serum TNF-α and IL-1β, and increase the level of serum IL-4 and IL-10 in severely scalded mice. And it could reduce the numbers of colony-forming units of liver, spleen and mesenteric lymph nodes of mice post-scald.

Key words vitamin D; scald; inflammatory cytokines; mice

流行病学资料显示,维生素 D 缺乏已经成为一种全球性健康问题^[1]。中国人群中维生素 D 缺乏很普遍,北方较南方严重^[2]。维生素 D 缺乏程度与疾病

的严重程度和预后密切相关^[3]。维生素 D 主要来源于膳食摄入,经皮肤合成的维生素 D 量约占总量的 20%。严重烧伤后机体超高代谢、皮肤大面积损伤、膳食营养摄入不足等原因,容易引起维生素 D 缺乏。严重烧伤后机体处于应激状态,免疫细胞释放

作者简介 韩夏(1990-),男,硕士在读,研究方向:外科学(烧伤);通信作者:张明谏, E-mail: zhangmingjian@hotmail.com。

大量炎症介质,如果抑炎因子与促炎因子失衡,机体会产生全身性炎症反应综合征^[4]。活性维生素D($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)可以抑制CD40L诱导的促炎因子,并能调节免疫细胞功能^[5]。本文对比观察补充维生素D对严重烫伤小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-4和IL-10浓度变化的影响,为烧伤临床应用维生素D减轻烧伤后炎症反应提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 健康清洁级昆明小鼠88只(军事医学科学院放射研究所),雌雄各半,鼠龄6周,体质量27~33 g,动物质量合格证号为0005858。按随机数字表法将小鼠分成3组,实验组(烫伤后给予维生素D)和对照组(烫伤后不给予维生素D)各40只,空白对照组(不予烫伤,不补充维生素D)8只。各组小鼠单笼清洁级饲养,自由进食常规小鼠饲料。饲养室温度22~23℃,环境湿度50%,环境照明20Lx。

1.2 小鼠烫伤模型的建立 实验组和对照组小鼠腹腔注射4%水合氯醛(40 mg/kg)麻醉,背部用6%硫化钠脱毛,脱毛区置于100℃水中12 s,造成背部20%体表面积(total body surface area, TBSA)Ⅲ度烫伤^[6]。烫伤后立即经腹腔注射乳酸林格氏液(40 mg/kg)复苏,第2天给予半量。创面涂20%磺胺嘧啶银霜抗感染,1次/d。

1.3 主要试剂和仪器 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma公司,美国),花生油(Spectrum公司,美国),小鼠常规饲料(苏州大学动物实验中心),ELISA试剂盒(上海劲马生物科技有限公司),麦康凯琼脂培养基(上海劲马生物科技有限公司)。

1.4 药物干预方法 实验组小鼠烫伤后即刻给予 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 4 $\mu\text{g}/\text{kg}+0.6$ mL花生油灌胃,1次/d,至处死前;对照组小鼠伤后不补充 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$,给予0.6 mL花生油灌胃,1次/d,至处死前^[7]。

1.5 小鼠血清的制备和检测指标 分别于烫伤后6、12、24、48、96 h,每个时相点随机选取实验组和对照组小鼠各8只,将小鼠断头处死取血。用ELISA法检测血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-10含量。

1.6 小鼠内脏淋巴组织匀浆的制备和48 h细菌培养检测 于伤后96 h无菌分离实验组和对照组小鼠的肝、脾及肠系膜淋巴结组织,称重、剪碎后制成组织匀浆做细菌培养,经37℃孵育48 h,计算每克组织的菌落形成单位数量(CFU/g)^[8]。

1.7 空白对照组小鼠处理 空白对照组小鼠与烫伤后96 h的小鼠同时处死取血,检测血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-10含量,并无菌分离肝、脾及肠系

膜淋巴结组织进行细菌培养。

1.8 统计学方法 用SPSS19.0软件进行数据的统计和处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(one-wayANOVA)、 q 检验和两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验各组小鼠一般情况 实验组、对照组和空白对照组小鼠体质量分别为(29.6 \pm 2.7)g、(28.7 \pm 2.9)g、(30.8 \pm 2.5)g,3组体质量均数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组和对照组小鼠烫伤后比空白对照组小鼠活动量减少、精神萎靡、反应迟钝、懒动、竖毛等。

2.2 空白对照组小鼠血清炎症因子浓度和组织细菌培养结果 空白对照组小鼠血清TNF- α 浓度为(0.18 \pm 0.05) ng/mL、IL-1 β 浓度为(0.19 \pm 0.07)ng/mL、血清IL-4浓度为(0.78 \pm 0.13)ng/mL、IL-10浓度为(19.85 \pm 3.60)ng/mL。空白对照组小鼠肝、脾及肠系膜淋巴结组织匀浆细菌培养均未检出菌落。

2.3 严重烫伤小鼠伤后不同时间血清TNF- α 和IL-1 β 浓度的变化 烫伤后6、12、24、48 h和96 h,实验组和对照组小鼠血清TNF- α 和IL-1 β 浓度分别高于空白对照组水平($P<0.05$)。由表1和表2可见,实验组和对照组小鼠烫伤后24 h血清TNF- α 和IL-1 β 浓度达峰值。烫伤后24、48、96 h,实验组小鼠血清TNF- α 和IL-1 β 浓度分别显著低于对照组水平($P<0.05$)。

表1 严重烫伤小鼠伤后不同时间血清TNF- α 含量变化($n=8, \bar{x}\pm s$, ng/mL)

Tab 1 The concentrations of serum TNF- α in mice at different times post-scald($n=8, \bar{x}\pm s$, ng/mL)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h	F	P
实验组	2.04 \pm 0.47	3.13 \pm 0.55	3.53 \pm 0.63	3.32 \pm 0.47	3.12 \pm 0.51	9.507	<0.05
对照组	2.16 \pm 0.56	3.74 \pm 0.66	5.42 \pm 0.45	4.89 \pm 0.53	4.47 \pm 0.56	41.328	<0.05
t	0.464	2.008	6.905	6.269	5.041	—	—
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	—	—

表2 严重烫伤小鼠伤后不同时间血清IL-1 β 含量变化($n=8, \bar{x}\pm s$, ng/mL)

Tab 2 The concentrations of serum IL-1 β in mice at different times post-scald($n=8, \bar{x}\pm s$, ng/mL)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h	F	P
实验组	0.31 \pm 0.10	0.31 \pm 0.05	0.33 \pm 0.07	0.29 \pm 0.07	0.21 \pm 0.09	2.895	<0.05
对照组	0.29 \pm 0.07	0.32 \pm 0.09	0.48 \pm 0.12	0.44 \pm 0.09	0.36 \pm 0.06	6.568	<0.05
t	0.463	0.275	3.054	3.721	3.922	—	—
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	—	—

2.4 严重烫伤小鼠伤后不同时间血清 IL-4 和 IL-10 浓度的变化 烫伤后 12、24、48 h 和 96 h, 实验组和对照组小鼠血清 IL-4 和 IL-10 浓度分别高于空白对照组水平($P<0.05$)。见表 3、表 4。

表 3 严重烫伤小鼠伤后不同时间血清 IL-4 含量变化($n=8, \bar{x} \pm s$, ng/mL)

Tab 3 The concentrations of serum IL-4 in mice at different times post-scald($n=8, \bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h	F	P
实验组	1.05±0.35	2.69±0.41	4.32±0.45	4.85±0.34	5.75±0.18	301.502	<0.05
对照组	0.92±0.27	2.04±0.34	2.88±0.43	2.92±0.47	3.42±0.15	88.306	<0.05
t	0.832	3.452	6.544	9.410	28.126	—	—
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	—	—

表 4 严重烫伤小鼠伤后不同时间血清 IL-10 含量变化($n=8, \bar{x} \pm s$, ng/mL)

Tab 4 The concentrations of serum IL-10 in mice at different times post-scald($n=8, \bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	6 h	12h	24 h	48 h	96 h	F	P
实验组	20.1±4.2	81.4±6.7	142.5±10.4	195.2±11.6	239.7±11.9	687.336	<0.05
对照组	20.5±4.0	41.2±5.3	90.2±9.7	138.1±9.6	150.9±9.1	422.085	<0.05
t	0.244	13.310	10.402	10.726	16.766	—	—
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	—	—

2.5 严重烫伤小鼠伤后 96 h 不同脏器淋巴结组织细菌培养结果 由表 5 显示, 烫伤后 96 h, 同组严重烫伤小鼠不同脏器淋巴结菌落形成单位数量比较, 肠系膜淋巴结菌落数高于肝和脾淋巴结菌落数($P<0.05$)。实验组小鼠平均每克肠系膜、肝和脾淋巴结菌落形成单位数量分别低于对照组($P<0.05$)。

表 5 严重烫伤小鼠伤后 96 h 肠系膜、肝和脾淋巴结组织菌落形成单位数量($n=8, \bar{x} \pm s$, CFU/g)

Tab 5 The ranges of colony-forming units of liver, spleen and mesenteric lymph nodes of mice at 96 h post-scald($n=8, \bar{x} \pm s$, CFU/g)

组别	肠系膜	肝	脾	F	P
实验组	780±28.7	147±15.3	254±18.7	*1957.595	<0.05
对照组	850±32.8	180±17.5	295±28.2	*1414.852	<0.05
t	4.543	4.015	3.427	—	—
P	<0.05	<0.05	<0.05	—	—

* $P<0.05$ 为同一组内不同脏器淋巴结组织细菌移位量两两比较

3 讨论

活性维生素 D 的主要形式是 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 具有免疫调节作用, 能够抑制 T、B 淋巴细胞的增殖、促进分化, 调节细胞因子的产生^[9]。辅助型 T 细胞(Th)是 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的重要靶细胞。Th1 细胞主要分

泌 IL-1 β 、IL-12 和 TNF- α 等促炎因子, Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-10 等抑炎因子^[10]。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能抑制 Th1 细胞因子释放, 促进 Th2 细胞因子释放, 表现出以 Th2 细胞因子释放为优势的免疫偏移现象^[11]。

烧伤后 TNF- α 和 IL-1 β 水平的升高被看作是 SIRS 过程中细胞因子级联反应的启动者和反映病情严重程度的指标, 在烧伤的病理生理过程中发挥重要的作用^[12]。本文结果显示烫伤后 24、48、96 h, 实验组小鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 浓度分别低于对照组水平($P<0.05$), 说明补充维生素 D 能够减轻烫伤后小鼠血清促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的生成。

全身炎症反应发生的同时, IL-4、IL-10、IL-13 等细胞因子通过下调抗原递呈活动进而抑制多种炎症介质的产生和释放。本文结果显示, 烫伤后 12、24、48 h 和 96 h, 实验组小鼠血清 IL-4 和 IL-10 浓度分别高于对照组水平($P<0.05$), 说明补充维生素 D 能够促进烫伤后小鼠血清抑炎因子 IL-4 和 IL-10 的生成。

文献报道 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可诱导免疫细胞及分布在天然屏障部位的黏膜上皮细胞分泌抗菌肽(活性形式为 IL-37), 具有良好的抗菌活性^[13-14]。严重烧伤后由于应激反应、中毒和感染等因素影响, 引起胃肠道黏膜严重的缺血缺氧, 加上缺血再灌注损伤等因素, 导致肠道机械屏障损坏和肠道菌群失调, 促使肠道细菌发生移位, 进入体循环和脏器淋巴结, 形成肠源性感染。本文对烫伤后 96 h 小鼠肝、脾和肠系膜淋巴结组织细菌培养结果显示, 烫伤后 96 h 实验组小鼠平均每克肝、脾及肠系膜淋巴结菌落形成单位数量明显低于对照组($P<0.05$), 说明补充维生素 D 可减少严重烫伤小鼠肠系膜、肝和脾淋巴结组织菌落形成单位数量。

总之, 严重烫伤小鼠伤后补充维生素 D 可以减轻炎症反应过程中促炎因子的生成, 并促进抑炎因子的生成。

参考文献:

- [1] 陈悦, 周建烈. 维生素 D 缺乏的流行病学研究进展[J]. 中华临床营养杂志, 2009, 17(05): 316
- [2] 高倩, 刘扬. 中国人群维生素 D 缺乏研究进展[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(12): 1670
- [3] 胡杰好, 陈朝彦, 覃桦, 等. 危重患者维生素 D 缺乏及其对预后的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(10): 827
- [4] Peng D, Huang W, Ai S, et al. Clinical significance of leukocyte infiltrative response in deep wound of patients with major burns[J]. Burns, 2006, 32(8): 946
- [5] Almerighi C, Sinistro A, Cavazza A, et al. $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory

(下转第 416 页)

- [2] 方琼英, 吴琼, 张秀玲, 等. 乳腺癌的流行现状分析[J]. 中国社会学杂志, 2012, 29(5):333
- [3] 刘伟先, 赵伟珠. 基因多态性与胃癌个体化治疗的研究进展[J]. 临床荟萃, 2012, 27(17):1549
- [4] 陶昀璐. 结直肠癌中 DPYD 基因变异的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2014, 26(3):206
- [5] 蔡讯, 方珏敏, 薛鹏, 等. 二氢嘧啶脱氢酶基因 IVS14+1 多态性联合氟尿嘧啶血药浓度检测在预测及减少结直肠癌氟尿嘧啶为基础化疗不良反应中的作用[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(2):130
- [6] 王勇, 徐曦, 王慧. 结直肠癌患者 DPYD 基因多态性与 5-FU 毒性反应相关的 Meta 分析[J]. 山东医药, 2014, 54(41):18
- [7] Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(4):1105
- [8] Terashima M, Irinoda T, Fujiwara H, et al. Roles of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in tumor progression and sensitivity to 5-fluorouracil in human gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2002, 22(2A):761
- [9] 徐雅莉, 孙强, 周易冬, 等. 二氢嘧啶脱氢酶编码基因 DPYD* 5 及 *9A 突变频率的研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2009, 16(6):499
- [10] van Kuilenburg A B, Haasjes J, Richel D J, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(12):4705
- [11] Vreken P A, Meinsma R. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H and R235W[J]. Hum Genet, 1997, 101(3):333
- [12] Collie-Duguid E S, Etienne M C, Milano G, et al. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients[J]. Pharmacogenetics, 2000, 10(3):217
- [13] 蔡乐, 朱珠. 二氢嘧啶脱氢酶基因多态性的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(9):644
- [14] 王磊, 胡冰. 二氢嘧啶脱氢酶在结直肠癌中的研究现状及进展[J]. 安徽医药, 2010, 14(4):373
- [15] 武月, 赵葳, 闫兆鹏, 等. TS、DPD 与 5-FU 的关系及在消化道肿瘤个体化治疗中的意义[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(7):1656

(2016-01-04 收稿)

+-----+

(上接第 408 页)

- activity in human monocytes[J]. Cytokine, 2009, 45(3):190
- [6] Tan Y, Peng X, Wang F, et al. Effects of tumor necrosis factor- α on the 26S proteasome and 19S regulator in skeletal muscle of severely scalded mice[J]. J Burn Care Res, 2006, 27(2):226
- [7] 刘曼, 张明谏, 李小兵, 等. 1,25-二羟维生素 D₃ 对严重烫伤小鼠应激反应的影响[J]. 天津医药, 2014, 42(5):451
- [8] 谭虎, 杨天德, 粟永萍, 等. 氯胺酮对放烧复合伤小鼠肠源性感染影响的实验研究[J]. 重庆医学, 2004, 33(11):1604
- [9] 胡杰好, 罗佐杰. 维生素 D 缺乏与危重症[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(10):908
- [10] 彭霄, 贺宏丽, 邱海波. 维生素 D 在脓毒症免疫调节中的作用研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(03):206
- [11] Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010, 39(2):365
- [12] Wang Y, Peng D, Huang W, et al. Mechanism of altered TNF- α expression by macrophage and the modulatory effect of Panax notoginseng saponins in scald mice[J]. Burns, 2006, 32(7):846
- [13] Liu P T, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response[J]. Science, 2006, 311(5768):1170
- [14] Yim S, Dhawan P, Rangunath C, et al. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃[J]. J Cyst Fibros, 2007, 6(6):403

(2016-01-22 收稿)