论著

文章编号:1000-5404(2005)18-1844-04

遗传背景在创伤反应异状性中的作用

黄 文,朱佩芳,王正国,冯 刚,杨志焕 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 观察BALB/c和C57BL/6小鼠间的创伤反应差异现象。**方法** 以BALB/c和C57BL/6两近交系小鼠为研究对象,采用冲击波所致全身冲击伤模型,观察伤后即刻、1、6、24、72 h的动物死亡率和肺损伤严重度的病理形态学。**结果** 在相同的冲击伤条件下,BALB/c和C57BL/6小鼠伤后72 h内的死亡率和肺损伤严重度的病理形态学有明显差异,BALB/c和C57BL/6小鼠的死亡率主要发生在伤后1 h内,但在同系动物内雌雄之间的死亡率和肺损伤程度并无明显差异。**结论** BALB/c和C57BL/6两系小鼠间存在对冲击伤的创伤反应差异现象,这当中异质性可能与两系小鼠在遗传背景上的差异有关。

关键词:创伤反应差异;小鼠;遗传背景

中图法分类号:R363.25;R642.02 **文献标识码**:A

Preliminary study on the posttrauma-response heterogeneity between BALB/c and C57BL/6 inbred mice

HUANG Wen, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-Guo, FENG Gang, YANG Zhi-Huan (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Research Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the posttrauma-response heterogeneity between BALB/c and C57BL/6 inbred mice. Methods The BALB/c and C57BL/6 inbred mice were injured by the same blast wave, and the mortality rates and pathomorphological changes in the lung tissues were compared at 0, 1, 6, 24 and 72 h after injury. Results There were significant differences of the mortality rates and the severity of lung injury between BALB/c and C57BL/6 inbred mice within 72 h after blast injury. The C57BL/6 showed greater resistance ability to the blast injury. Furthermore, the death of the mice almost occurred within 1 h after blast injury, but there were no significant differences in mortality and the severity of lung injury between the male and the female mice of the same strain. Conclusion This study indicates there is significant heterogeneity of posttrauma-response between BALB/c and C57BL/6 mice, and this change may be induced by the differences of their genetic background.

Key words: heterogeneity of traumatic responses; mouse; genetic background

对于各种生命现象的研究,目前一个常用的研究思路,就是首先必须反复验证这种生命现象是否存在,这是整个研究的基石。鉴于以人为研究对象在伦理学上的争议性和在时间上的局限性,这就需要建立可比性好和重复性高的动物模型,即建立研究该现象的技术平台,然后根据该现象提出可能的设想和假说,通过大量实验去验证,不断修改,最终提出对该现象的合理解释。本研究室此前报道了BALB/c和C57BL/6两近交系小鼠在相同致伤条件下存在明显的反应差异[1],鉴于该现象是否客观存在对于后续研究的决定意义,本研究首先对这一现象进行了验证,在此基础上,对遗传因素在其中的作用进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备和试剂

BST-Ⅰ型生物激波管(第三军医大学野战外科研究所研制);激波数据分析软件(DASYlab5.0);光学显微镜(Leica,德国);荧光分光光度计(F-2500 FL Spectrophotometer, 日本日立公司);台式低温高速离心机(Beckman,美国);电动玻璃匀浆

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,G1999054203) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054203)

作者简介:黄 文(1972-),男,重庆市垫江县人,博士,主治医师,主要从事缺血性脑血管病方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68757474

收稿日期:2004-09-29;**修回日期**:2005-06-11

器(宁波新芝科器厂);4% 甲醛(国产);3% 戊二醛(学校电镜室配制);示踪剂 0.5% 荧光素钠(FINa,自配)。

1.2　动物模型及致伤条件

实验动物为 8 ~ 9 周龄无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级近交系 BALB/c 60 只和 C57BL/6 59 只小鼠(中科院上海实验动物中心提供)。体质量(20.78 ± 1.25)g,同一批实验动物体质量相差小于 1.00 g。实验前动物在本研究所实验动物中心无菌条件下饲养至少 4 d,以适应环境。实验按动物品系不同分为 2 组:BALB/c 小鼠组(BG)、C57BL/6 小鼠组(CG)。实验动物均不麻醉,每次雌雄各 15 只,交错放入自制的 60 个实验笼中,每格 1 只,动物均处于同一垂直平面上。采用 BST-Ⅰ型生物激波管所致全身冲击伤(systemic Blast Injury, SBI)模型,驱动压力 6.0 MPa,实验时用压力传感器测定受试动物所处垂直平面的超压峰值和正压作用时间。

1.3　观察指标

死亡率:分别于伤后 1、6、24、72 h 观察动物的死亡率,期间动物可以自由饮水和进食;病理形态学:大体观察,断头活杀动物,解剖观察肺组织出血和水肿情况;腹腔和胸腔是否有积血等。常规 HE 染色,普通光学显微镜观察。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,组间死亡率比较行 χ^2 检验;肺损伤严重度比较行 H 检验。

2　结果

2.1　伤后 72 h 内死亡率比较

用 BALB/c 小鼠 60 只和 C57BL/6 小鼠 59 只致伤,分别于伤后 1、6、24、72 h 观察小鼠创伤应激后死亡率(表 1),可见两种品系小鼠在伤后 72 h 内总死亡率具有显著的差异($P < 0.01$)。C57BL/6 品系小鼠表现出较强的创伤耐受能力,伤后存活率较高,而 BALB/c 小鼠则对 SBI 较敏感,其创伤耐受能力相对较弱。冲击伤后动物的死亡大部分发生在伤后 1 h 以内。同系小鼠雌雄之间比较则无明显差异($P > 0.05$)(表 2)。

表 1　两系小鼠伤后 72 h 内死亡率的比较

Tab 1　Comparison of mortality between BALB/c and C57BL/6 mice within 72 h after injury

After injury (h)	BALB/c mouse (n =60)		C57BL/6 mouse (n =59)	
	Number of death	Mortality(%)	Number of death	Mortality(%)
1	12	20.00	3	5.08
6	5	8.33	0	0.00
24	1	1.67	0	0.00
72	0	0.00	0	0.00
Total	18	30.00 **	3	5.08

** : $P < 0.01$, *vs* C57BL/6 mouse

表 2　两系小鼠雌雄间死亡率比较

Tab 2　Comparison of mortality between male and female mice in both strains within 72 h after injury

Time(h)	Male BALB/c mouse (n =30)		Female BALB/c mouse (n =30)		Male C57BL/6 mouse (n =29)		Female C57BL/6 mouse (n =30)	
	Number of death	mortality(%)	Number of death	mortality(%)	Number of death	mortality(%)	Number of death	mortality(%)
1	5	16.67	7	23.33	1	3.45	2	6.67
6	3	10.00	2	6.67	0	0	0	0
24	0	0	1	3.33	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	8	26.67	10	33.33	1	3.45	2	6.67

行为观察:创伤后即刻观察,总体上,可发现 BALB/c 小鼠的活跃程度较 C57BL/6 小鼠明显降低,进食及饮水次数也明显减少,与伤前相比有明显的变化,而 C57BL/6 小鼠与伤前相比无明显变化。

2.2　肺损伤病理形态学比较

2.2.1　大体观察　　创伤后,死亡动物肺损伤出血较为明显。活杀动物中,BALB/c 小鼠肺脏组织损伤程度普遍较重,主要表现为片状出血,分布于一个或数个肺叶,严重的外观可呈典型的"肝样变",气管和支气管腔内有粉红色泡沫样渗出液。而 C57BL/6 小鼠伤后肺脏组织总体损伤相对较轻,多表现为肺有散在的点状出血,偶有小片状出血,气管和支气管管腔内渗出液也较少见。

2.2.2　伤后 72 h 存活小鼠损伤严重度比较　　每组随机抽取 15 只进行比较,主要根据肺出血和水肿情况将肺脏伤情分为极重度、重度、中度、轻度和无损伤 5 级。结果表明:各品系小鼠内雌雄之间肺损伤严重度无明显差别,而两品系之间肺损伤程度有显著性差异,其中 BALB/c 小鼠肺损伤程度明显重于 C57BL/6 小鼠(表 3)。

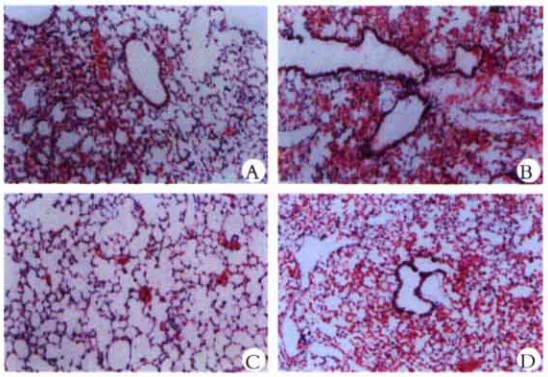
表 3　两系小鼠伤后 72 h 肺损伤严重度比较

Tab 3　Comparison of severity of lung injury between BALB/c and C57BL/6 mice within 72h after injury

Group	Severity of lung injury				
	Normal	Slight	Mild	Severe	Severest
Male C57BL/6	6	7	1	1	0
Female C57BL/6	7	5	2	1	0
Male BALB/c	0	2	1	7	5
Female BALB/c	0	1	2	6	6
C57BL/6	13	12	3	2	0
BALB/c **	0	3	3	13	11

** : $P < 0.01$, *vs* C57BL/6

2.2.3　光镜观察　　从冲击伤发生到 72 h 以内都可以观察到急性肺损伤的病理表现,主要的变化有:肺泡腔内可见大量红细胞和水肿液、肺泡间隙增宽、炎症细胞浸润、支气管上皮细胞脱落、正常的肺组织结构被破坏。但总的来说,C57BL/6 小鼠(图 1 A、C)伤后肺脏病理改变明显轻于 BALB/c 小鼠(图 1 B、D)。



A: C57BL/6 mouse, 1 h after injury; B: BALB/c mouse, 1 h after injury; C: C57BL/6 mouse, 72 h after injury; D: BALB/c mouse, 72 h after injury

图1 SBI伤后C57BL/6小鼠和BALB/c小鼠肺组织病理 (HE×100)

Fig 1 Pathological changes of lung in C57BL/6 and BALB/c mice after injury (HE×100)

3 讨论

"创伤反应差异性"这一生命现象早以被人们所注意并熟悉,例如:不同的人种(群)对寒冷或高温的抵抗能力明显不同,但对这一现象进行系统的研究尚处于起步阶段,因而对其进行实验室研究尚涉及一些基本问题需要解决。在实验动物的选择上,我们认为必须满足多个条件:一是实验动物之间必须存在创伤反应差异性这一现象;二是便于对遗传背景进行研究。在可比性方面还必须考虑到种系、个体差异(如:应当选择体重相近)、避免感染、应激等非实验因素的影响,此外在可操作性方面还需考虑到实验周期等因素。根据以上的考虑,我们最终选择了BALB/c和C57BL/6两系近交系小鼠为实验动物,这两系小鼠体重相近,其同系小鼠间近交系数可以达到98.6%,杂合基因仅仅剩余1.4%[2]。因此,在避免其它非实验因素的影响下,如果这两系小鼠对创伤的反应表现为明显不同。则极有可能是由于遗传背景的不同。已有的研究提示BALB/c和C57BL/6在多种病理因素刺激中有明显不同的表现,而且这些不同反应的原因可能与遗传背景的差异密切相关[3~5]。虽然这些病理因素与创伤有所区别,但无疑它们都是受多因素影响调控的,且具有一些共有的生理病理基础。在致伤模型的选择上,我们认为应该满足以下一些条件:致伤因素单一(最好是物理因素)、对动物无需麻醉、适合同时大批致伤、条件稳定易于控制、重复性好。以往大量的研究表明:由生物激波管产生的激波对动物造成的全身性冲击伤可以实现对致伤压力的稳定控制,尤其是本研究所研制的BST-Ⅰ型生物激波管可以产生稳定的垂直平面波,只要在其盲端固定好动物的体位和位置,同一批次的动物伤情比较均一[6]。所以本研究选择了BST-Ⅰ型生物激波管致伤的小鼠全身冲击伤模型。建立起一个稳定好、重复性可靠、可比性强的动物模型后,选择具有较强说服力的可用于量化不同动物对创伤易感性的指标也非常重要,这种指标的选择还必须客观可靠,有利于减少整个实验的系统误差,但不管选择什么样的指标,这些指标都应尽可能的容易进行量化和应尽可能的便于客观的比较,以避免由于研究者主观判断失误造成的误差对实验结果的影响。考虑到我们选择的是一个全身冲击伤模型,全身性冲击伤后机体各器官系统都可受到不同程度的影响,但是不论这些反应的形式如何,其最终效应都是对机体的生存产生直接影响,所以我们认为选用死亡率来综合评价创伤后机体的反应能力应该是一个可靠和容易量化的指标。考虑到肺和血管损伤及其继发的病理改变在各种疾病和创伤后病理改变中的基础作用,所以我们对全身性冲击伤后两系小鼠肺的病理变化进行了观察。

本实验结果提示BALB/c和C57BL/6小鼠在全身性重度冲击伤后早期,存在对创伤反应的明显差异,其中C57BL/6小鼠表现出较强的创伤耐受能力。由于我们尽可能的最大限度上减少了非实验因素对实验结果的影响,因此,我们认为它们在相同致伤条件下创伤反应能力的特点表明:这两系小鼠遗传背景的差异极有可能是造成它们对相同创伤早期反应能力异质性的原因,而这种遗传背景的差异与性别差异无关,这也与有关报道[7~9]认为不同品系小鼠对急性肺损伤易感性的差异是一种常染色体遗传特征的提示相一致。我们感兴趣的是在相同的外力作用下,为什么会出现这种差异?一个最有可能的原因是这两种小鼠肺血管的结构与功能之间存在差异,因为出血和水肿的发生是肺血管破裂或内皮细胞间隙增宽的必然后果,目前作者未查到表明这两种品系小鼠肺血管结构和功能具有异质性的相关研究报道,但已有研究[10]显示3种近交系小鼠脑缺血损伤差异性与其脑血管的异质性相关。

如果的确存在"创伤反应差异性"现象,遗传背景也在其中发挥了重要的作用,那么这种遗传背景是通过什么样的蛋白以什么样的功能体现出来的?这正是我们为达到预防和治疗创伤的目的所首先要解决的问题。基于肺损伤在创伤后机体转归中的重要作用和枢纽地位及我们前期的研究结果,我们有理由将肺损伤差异和创伤反应差异相联系,所以下一步工作我们拟将选择肺损伤差异为切入点,对创伤后肺反应差异的肺血管结构基础进行初步探讨。

参考文献:

[1] 冯 刚,王正国,杨志焕,等. C57BL/6和BALB/C小鼠创伤反应

差异性初步探讨[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(5): 301-303.
[2] 魏 泓. 医用实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998. 25-26.
[3] Willott J F, Erway L C, Archer J R, *et al*. Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds[J]. Hear Res, 1995, 88(1-2): 143-155.
[4] Kennedy B P, Payette P, Mudgett J, *et al*. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains[J]. J Biol Chem, 1995, 270(38): 22378-22385.
[5] Sato S, Takizawa H, Inui N. Mouse strain differences in induction of micronuclei by base analogues and nucleosides[J]. Mutat Res, 1993, 301(1): 45-49.
[6] 王正国, 孙立英, 杨志焕, 等. 系列生物激波管的研制与应用[J]. 爆炸与冲击, 1993, 13(1): 77-83.
[7] Goldstein B D, Lai L Y, Ross S R, *et al*. Susceptibility of inbred mouse strains to ozone[J]. Arch Environ Health, 1973, 27(6): 412-413.
[8] Kleeberger S R, Levitt R C, Zhang L Y. Susceptibility to ozone-induced inflammation. I. Genetic control of the response to subacute exposure[J]. Am J Physiol, 1993, 264(1 Pt 1): L15-L20.
[9] Kleeberger S R, Levitt R C, Zhang L Y. Susceptibility to ozone-induced inflammation. II. Separate loci control responses to acute and subacute exposures[J]. Am J Physiol, 1993, 264(1 Pt 1): L21-L26.
[10] Barone F C, Knudsen D J, Nelson A H, *et al*. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1993, 13(4): 683-692.

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2005)18-1847-01

个案与短篇

紫杉醇和铂剂联合治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察

Paclitaxel and carboplatin regimen versus paclitaxel and cisplatin regimen in treating patients with advanced non-small cell lung cancer

刘鹏辉,廖国清,王红梅,曲怡梅 (解放军总医院第309临床部肿瘤科,北京 100091)

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占据肺癌发病率的80%,其预后较差。尽管针对化疗药物和多种治疗方法的研究广泛展开,NSCLC远期预后仍很差[1]。以铂类为基础的联合化疗已证实对晚期NSCLC有益[2]。本研究观察紫杉醇与不同铂剂搭配的疗效和副反应,现将其结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料

65例患者均经细胞学或组织学证实的晚期NSCLC患者。年龄31~71岁,平均年龄56岁,男47例,女18例。其中鳞癌15例,腺癌50例;连续化疗至少两个周期以上。Karnofsky评分≥60分。有可测量的临床或X线观察指标,预计生存期在2个月以上。血常规、肝、肾功能正常,心电图正常。65例晚期NSCLC患者非随机分为TAX+CBP组(31例)和TAX+DDP组(34例)。两组病人特征具有可比性($P>0.05$)。

1.2 治疗方法

TAX+CBP组:TAX 175 mg/m^2,VD,d1,CBP 350 mg/m^2,VD,d1;TAX+DDP组:TAX 175 mg/m^2,VD,d1,DDP 40 mg/m^2,VD,d1-3。21~28 d为1周期。至少进行2周期才可评价疗效。用顺铂时需进行水化利尿,用紫杉醇时需预处理。

1.3 疗效评估

按照WHO(1991)统一评价标准,疗效分为完全缓解(CR),部分缓解(PR),稳定(SD),进展(PD)。有效率(RR)=(CR+PR)/总例数×100%。生存期:从开始化疗至死亡或末次随诊时间。

1.4 统计学分析

采用χ^2检验,Wilcoxon rank检验,秩和检验。

2 结果

2.1 近期疗效

每例患者治疗前后均经胸片或胸部CT对肺内肿块或纵膈淋巴结进行对比,疗效评价。TAX+CBP组(31例),无CR,PR 10例,SD 16例,PD 5例,RR 32.3%(10/31)。其中初治组PR 7例,SD 8例,PD 2例,RR 41.2%(7/17),复治组PR 3例,SD 8例,PD 3例,RR 21.4%(3/14)。TAX+DDP组(34例),无CR,PR 12例,SD 15例,PD 7例,RR 35.3%(12/34)。其中初治组PR 8例,SD 9例,PD 3例,RR 40.0%(8/20),复治组PR 4例,SD 6例,PD 4例,RR 28.6%(4/14)。卡铂组RR 32.3%,顺铂组RR 35.3%,两组无统计差异($P>0.05$,χ^2检验)。

2.2 生存期

两组病例均定期随访,存活患者随访12个月。卡铂组1年生存率为35.5%,顺铂组1年生存率为35.3%,两组无显著差异。中位生存期卡铂组(11.4个月)高于顺铂组(9.5个月),两组有显著差异($P<0.05$,Wilcoxon rank检验)。

2.3 不良反应

顺铂组血液学毒性低于卡铂组,其中白细胞及血红蛋白减少,两组差异有统计意义($P<0.05$,秩和检验),血小板减少

(下转1852页)

作者简介:刘鹏辉(1968-),女,辽宁省沈阳市人,硕士,主治医师,主要从事晚期肺癌临床治疗方面的研究。电话:(010)66775052

收稿日期:2005-04-04;修回日期:2005-05-28