文章编号:1000-5404(2008)21-1969-03

专家述评

国家重点基础研究发展规划(973计划)创伤项目研究进展

王正国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

国家重点基础研究发展规划(973计划)是国家于1997年6月4日正式决定制定和实施的基础科学规划,其总体目标是面向21世纪初叶我国经济建设和科学技术发展的重大需求,开展多学科综合性研究,提出解决重大关键问题的理论依据和形成未来重大新技术的科学基础,提高科技持续创新能力,力争在国际上占有一定地位的重点领域取得突破性的进展。973计划的指导思想为"统观全局,突出重点,有所为有所不为","公平、公开、公正"和"客观、合理、科学"的原则。

1 研究进展

1999年,由第三军医大学牵头的全军第1个973计划项目——"严重创伤早期全身性损害与组织修复的基础研究"正式获得批准,首席科学家为王正国院士,参加的科技人员共100余人,分为6个课题,项目从启动至结束(2004年9月)共发表论文1 016篇,其中国外专业期刊110篇,被批准专利2个,验收总评优秀。

2005年,在原973计划项目圆满完成的基础上,我校又获准第2个973计划项目——"严重创伤救治与损伤组织修复的基础研究",首席科学家为蒋建新教授。2年来,课题组成员已撰写论文81篇,发表51篇,SCI收录期刊已刊登18篇(影响因子累计达40.034),返修6篇。

2 研究成果

2.1 第1个973计划项目(1999-2004年,已结题)

2.1.1 严重创伤早期应激反应及其调控的分子机制 证明严重创伤后早期血液中糖皮质激素(glucocorticoid,GC)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、核转录因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)均显著升高或活化,使炎症反应增强,而糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)的基因表达却显著降低,由此形成级联放大效应,从而加重创伤应激功能紊乱和全身损害。给予抗TNF-α或白细胞介素(interleukin,IL)-1β的中和抗体不仅可减少血液中炎性因子含量,还可提高组织细胞对GR的亲和性,有利于提高机体的应激功能。给小鼠安定-氯胺酮可降低其炎症介质增高的程度,提高存活率。

2.1.2 缺血缺氧在严重创伤早期全身性损害中的作用 缺血可促进缺氧诱导因子-α(hypoxia-inducible factor 1α,HIF-α)表达,后者可激活NF-κB,使炎症因子过度产生,进而启动炎症反应。研究显示,心肌损害是严重创伤后缺血缺氧的启动因素,因而首次提出了"休克心"概念。此外还证明,失血性休克时血管平滑肌细胞钙活化的钾通道[calcium-activated potassium (BKCa) channels]α亚基酪氨酸磷酸化是引起血管低反应性的重要原因。烧伤后早期组织内(心、肠)热休克蛋白70(heat shock protein 70,HSP70)的表达显著增强,对缺血缺氧性损害有保护作用;抑制p38激酶活化也可减轻烧伤后的心肌损害。

2.1.3 严重创伤后失控性炎症反应的发生机制 体内单核/巨噬细胞表面存在两类内毒素受体:清道夫受体(scavenger receptor,SR)与单核/巨噬细胞清除细菌有关,称为防御性受体;CD14、TLR2、TLR4与脂多糖(LPS)激活细胞有关,称为兴奋性受体。创伤感染时细胞表面防御性受体下调、兴奋性受体上调可能是LPS诱导细胞炎症级联反应的受体机制。高迁移率族蛋白B1(high mobility group box protein 1, HMGB1)是稍晚期增高的炎症因子,已证明腹腔感染可明显上调机体主要脏器中HMGB1 mRNA的表达。严重感染可通过JAK/STAT途径诱导HMGB1合成和释放,并造成多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS),抑制JAK/STAT途径可下调HMGB1的表达,减轻HMGB1的毒性作用。生物喋呤(BH4)参与了LPS介导HMGB1基因表达的调控,其抑制剂有治疗作用,己酮可可碱(pentoxifylline,PTX)能有效抑制体内生物喋呤的合成与释放,可明显减轻全身血流动力学紊乱。

2.1.4 创伤愈合与组织修复的分子基础 在创面微环境作用下,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)可分化为血管内皮细胞,参与创面修复过程中肉芽组织小血管的形成;用含表皮细胞生长因子(epidermal growth factor receptor,EGF)等不同介质诱导MSCs后,其中部分MSCs表达角蛋白,MSCs在体外诱导下可能分化为皮肤表皮细胞,参与皮脂腺导管细胞的构成。瘢痕增生挛缩与细胞骨架运动的相关基因存在密切关系,而肌钙蛋白起到十分重要的作用,抑制该基因的表达,可减轻瘢痕增生与挛缩。人胎儿期表皮基底层增殖细胞主要为表皮干细胞和短暂扩充细胞,随胎龄增加,终末分化细胞的比例明显增高,这可能与胚胎早期胎儿皮肤创面无瘢痕愈合有关。

2.1.5 创伤修复"失控"(难愈/过度增生)的发生机制 确认c-ski是成纤维细胞促增殖和抗凋亡因子,又是成纤维细胞胶原分泌的调节因子,可抑制Smad3转录活性,降低Ⅰ型胶原的表达,但不影响成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化过程。研究证明,糖尿病创面碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)表达要显著高于对照组,在bFGF大量表达

作者简介:王正国,男,安徽省合肥市人,中国工程院院士,研究员,为我国冲击伤、创伤弹道学、交通医学研究的主要创始人之一,发表论文210余篇,编著、主编专著28部,获国家科技进步奖8项(其中一等奖1项、二等奖3项)及国家发明奖1项,并获军队专业技术重大贡献奖,香港何梁何利基金医学科学技术奖,美国国际军事医学奖——Michael DeBakey国际军医奖,陈嘉庚医学科学奖,国际交通医学重大成就奖,光华工程科技奖,全军"十五"重大科技成果奖等奖项。E-mail: wangzg@public.cta.cq.cn

收稿日期:2008-06-10;修回日期:2008-06-23

的同一部位,出现大量的糖基化产物(advanced glycation end products,AGEs)堆积,形成 bFGF-AGEs 复合物,表明生长因子已被糖基化,失去促愈合功能。体外培养的真皮 MSCs 存在大体积和小体积细胞 2 种,两者直径比为 5∶1;小细胞比例低于 5%,真皮 MSCs 可调控毛囊上皮的生长,培养的真皮 MSCs 可表达毛囊生长的调控基因 VEGF、EGF 和 TGF-β 等,提示其具有支持毛囊生长的分子基础。联合应用 MSCs、表皮细胞和无细胞羊膜基质成功构建出全层皮肤替代物,获得较好的促愈效果。

2.1.6 周围神经损伤后的再生与修复 通过基因芯片检测,发现火器性周围神经损伤早期,存在明显基因调控的细胞凋亡与免疫功能降低,T 淋巴细胞的激活可促进神经的再生。在国际上首次发现在周围神经可表达神经趋化因子 Slit2 mRNA,幼鼠表达量较成鼠低,即幼鼠的趋化性较差,这在基因水平上揭示产瘫较成人臂丛损伤更易发生主动拮抗肌的同步收缩。睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor,CNTF)的促再生效果较神经生长因子(nerve growth factor,NGF)好得多。将大鼠坐骨神经切断,用硅胶管套接,硅胶管内给予嗅球成鞘细胞(olfactory ensheathing cells,OECs)悬液,结果显示 OECs 对损伤后神经功能的恢复有明显促进作用。应用可降解的生物材料制成的聚酸酐管桥接缺损神经后,再生神经周围无瘢痕和异物形成。

2.2 第 2 个 973 计划项目(2005 – 2007 年,在研)

该项目共 5 个课题,围绕严重创伤早期重要机体反应(细胞内源性保护反应、免疫系统反应)及其与并发症的关系、严重创伤并发症遗传学背景的预警判断和防治措施、重要组织修复机制和成体干细胞修复作用 4 个方面攻关,已取得的创新性成果如下。

(1)发现创伤早期细胞内不同内源性保护分子具有不同的生物学作用,证实 Rho 激酶、HIF-1α、肌内皮缝隙连接蛋白(Cx37、Cx40、Cx43)、PKC(α、ε)与休克血管反应性有关,而1-磷酸鞘氨醇、肌球蛋白轻链与血管通透性有关[1-3]。

(2)发现细胞微管损害是心肌细胞缺血缺氧损害的始动环节[4]。

(3)提出并初步证实创伤后神经内分泌反应过度、血清免疫抑制分子(HMGB1)的协同作用可能是导致创伤后免疫功能紊乱的重要机制[5,6]。

(4)发现并证实一些单核苷酸多态(single nucleotide polymorphisms,SNPs)具有重要的功能活性(CD14/G-1145A 和 MD2/C-1625G 为首次报道[7,8]),可作为严重创伤患者并发症(如脓毒症、MODS)风险性评价的重要指标[9]。

(5)提出创面肌成纤维细胞增多是创面过度纤维化修复的重要细胞基础,肌成纤维细胞过度增多与疤痕组织内血管紧张素Ⅱ、TGF-β 等促进成纤维细胞转分化有关[10-13]。

(6)进一步证实表皮细胞存在去分化现象,这种去分化细胞具有成体干细胞的特征,其机制可能与 Wnt 信号通路有关[14]。

(7)发现骨髓 MSCs 具有向创伤局部优势分布的特点,其趋化机制与干细胞表面 CD45 和局部创伤组织内基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1,SDF-1)高表达有关[15-17]。

(8)在体外培养成功将 MSCs 诱导成为汗腺样细胞,并利用 MSCs 再生汗腺取得初步成功[18]。

3 述评

严重创伤早期机制、救治和组织修复有关项目在众多申请的项目中,连续 2 次获得 973 计划资助,说明创伤问题已受到领导和专家的重视。参加项目组的同仁经过几年的努力,在这一领域中已取得了骄人的成绩,总体来说,已达到国际先进水平。而 MSCs 诱导成为汗腺样细胞等研究[14,19,20],也已居国际领先水平。

存在的主要问题:①课题仍显得不够集中。②重大的理论突破大体上还未形成。③在临床应用上尚未取得重大或突破性进展。

我希望并深信,在第 2 个 973 计划创伤项目结束时(2010 年),一定会在基础理论和临床应用上获得双丰收。

关键词:创伤救治;组织修复;国家重点基础研究发展规划(973 计划)

中图法分类号:R64 **文献标识码**:A

参考文献:

[1] Yang G, Liu L, Xu J, *et al*. Effect of arginine vasopressin on vascular reactivity and calcium sensitivity after hemorrhagic shock in rats and its relationship to Rho-kinase[J]. J Trauma, 2006, 61(6):1336 – 1342.

[2] Li T, Liu L, Liu J, *et al*. Mechanisms of Rho kinase regulation of vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2008, 29(1): 65 – 70.

[3] 赵明月,黄跃生,张 琼,等.缓激肽 B1 受体在严重烧伤大鼠内脏血管通透性变化中的作用[J].第三军医大学学报,2008,30(4):284 – 287.

[4] Huang Y, Zheng J, Fan P, *et al*. Transfection of antisense p38 alpha gene ameliorates myocardial cell injury mediated by hypoxia and burn serum[J]. Burns, 2007, 33(5): 599 – 605.

[5] 周建云,蒋建新,杨 策,等.皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(2):120 – 123.

[6] Zhang L T, Yao Y M, Lu J Q, *et al*. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein inhibits endotoxin-induced high-mobility group box 1 protein gene expression in sepsis[J]. Shock, 2008, 29(2): 278 – 284.

[7] Gu W, Dong H, Jiang D P, *et al*. Functional significance of CD14 promoter polymorphisms and their clinical relevance in a Chinese Han population[J]. Crit Care Med, 2008, 36(8): 2274 – 2280.

[8] Gu W, Shan Y A, Zhou J, *et al*. Functional significance of gene polymorphisms in the promoter of myeloid differentiation-2[J]. Ann Surg, 2007, 246(1): 151 – 158.

[9] Gu W, Du D Y, Huang J, *et al*. Identification of interleukin-6 promoter polymorphisms in Chinese Han population and their functional significance[J]. Crit Care Med, 2008, 36(5): 1437 – 1443.

[10] Liu H W, Cheng B, Fu X B, *et al*. Characterization of AT1 and AT2 receptor expression profiles in human skin during fetal life[J]. J Dermatol Sci, 2007, 46(3): 221 – 225.

[11] Liu H W, Cheng B, Yu W L, *et al*. Angiotensin Ⅱ regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade *via* a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars [J]. Life Sci, 2006, 79(5): 475 – 483.

[12] Fu X, Fang L, Li H, *et al*. Adipose tissue extract enhances skin wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(4): 540 - 548.
[13] 王 涛,艾国平,邹仲敏,等. 微小RNA分子miR-21和miR-22对C2C12细胞成肌分化影响的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(9):803 - 806
[14] Cai S, Fu X B, Sheng Z Y. Dedifferentiation: a new approach in stem cell research[J]. BioScience, 2007,57(8): 655 - 662.
[15] Fu X B, Fang L, Li X, *et al*. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury [J]. Wound Repair Regen, 2006,14(3): 325 - 335.
[16] Fu X B, Qu Z, Sheng Z. Potentiality of mesenchymal stem cells in regeneration of sweat glands[J]. J Surg Res, 2006, 136(2): 204 - 208.
[17] 李福兵,赵 玲,鲁秀敏,等. 成熟成骨细胞中敲除基因*fgfr*1小鼠的制备[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 280 - 283.
[18] Li H, Fu X, Ouyang Y, *et al*. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages[J]. Cell Tissue Res, 2006, 32(6): 725 - 736.
[19] Fu X B, Sun X, Li X, *et al*. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells *in vivo*[J]. Lancet, 2001, 358(9287): 1067 - 1068.
[20] Li H, Fu X B, Zhang L, *et al*. *In vivo* dedifferentiation of human epidermal cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(11): 1436 - 1441.

(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2008)21-1971-01

个案与短篇

抑制基质金属蛋白酶-9对尿激酶溶栓出血性转化的干预效果

蒋国会[1],李 鱼[1], 李光勤[2] ([1]重庆市涪陵中心医院神经内科,重庆 408000;[2]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

我国溶栓治疗主要使用尿激酶,关于尿激酶溶栓已被证实其主要并发症同样是溶栓后颅内出血,但尿激酶溶栓后颅内出血性转化与基质金属蛋白酶9(MMP-9)的关系及如何防治方面尚无定论[1]。本实验主要观察不同时间尿激酶溶栓对MMP-9表达的影响及溶栓后颅内出血情况,及MMPs抑制剂联合溶栓治疗对MMP-9的抑制效果和颅内出血性转化的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及给药方法

采用健康成年雄性SD大鼠132只,体质量230 ~ 280g,由重庆医科大学实验动物中心提供。将实验动物分为11组:假手术组、缺血组、不同时间尿激酶溶栓组(简称6 h UK组、9 h UK组、12 h UK组)、强力霉素联合溶栓组(简称6 h UK + Doxy组、9 h UK + Doxy组、12 h UK + Doxy组)和三七皂甙联合溶栓组(简称6 h UK + Sanqi组、9 h UK + Sanqi组、12 h UK + Sanqi组),每组12只,均在24 h后处死,分别测定MMP-9表达和脑出血量并计算各组大鼠的脑出血发生率。

缺血组及各治疗组均采用改良大鼠自体血栓大脑中动脉局灶性脑缺血(MCAO)模型[1],治疗的各组在相应时间点给予尿激酶40 000 U/kg(丽珠集团丽珠制药厂),用1 ml生理盐水稀释后经尾静脉缓慢注射;联合治疗各组强力霉素和三七皂甙均在缺血后2 h稀释后经尾静脉注射,强力霉素30 mg/kg(Sigma公司),三七皂甙240 mg/kg(昆明制药集团股份有限公司,商品名:血塞通)。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 MMP-9免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡后,用SABC法进行免疫组织化学染色,苏木精复染,中性树胶封片。用Image Pro Plus 4.5图像分析系统进行分析,MMP-9蛋白表达的强弱通过计算阳性细胞的平均光密度值来表示。

1.2.2 脑出血量的测定 采用分光光度计法[2],大鼠麻醉后生理盐水心脏灌流,断头取脑,取病灶侧半球置于匀浆器中,加入组织裂解液充分匀浆,将匀浆液移取到2 ml EP管内,4 ℃ 12 000 r/min离心30 min,取上清液0.6 ml加入到盛有2.4 ml Drabkin's试剂试管中,充分静置15 min,于540 nm处比色,根据脑出血量标准曲线得出脑出血量。

称取4.73 mg伊文思蓝置于一带刻度的容量瓶中,加入生理盐水稀释至25 ml,静置后取上清液0.3 ml加入5.7 ml甲酰胺混匀做为第1管,从第1管取出3 ml加入3 ml甲酰胺作为第2管,照此类推,共做5管,其浓度依次为:0.946、0.473、0.237、0.118、0.059 μg/L。将试管置于试管架上,放入37 ℃恒温水浴箱中水浴48 h,然后分别测得吸光度值,并制出伊文思蓝标准曲线。

1.2.3 脑出血发生率 观察每组12只大鼠的脑出血情况,采用确切概率法计算出各组大鼠的出血发生率。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件行确切概率法和t检验。

2 结果

2.1 MMP-9免疫组织化学结果

假手术组未见MMP-9免疫阳性细胞表达,脑缺血对照组主要在缺血区皮质神经元及血管内皮细胞有MMP-9表达,海马及纹状体也见少许MMP-9表达,与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。应用尿激酶溶栓后MMP-9表达进一步增加,和缺血对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随溶栓时间延迟,MMP-9表达增高更显著。在MCAO后2 h分别用强力霉素和三七皂甙干预组与相应时间点单用尿激酶溶栓组

(下转1979页)

基金项目:重庆市卫生局课题(04-2-144)
Supported by the Bureau Public Health of Chongqing (04-2-144)
作者简介:蒋国会,女,重庆市人,硕士,医师,主要从事脑血管病方面的研究。E-mail: jiangguohuisn@163.com
通信作者:李光勤, E-mail: liguangqin@tom.com
收稿日期:2008-06-03;修回日期:2008-07-17