DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.021
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1361-04

论著

内皮素和一氧化氮在烧冲复合伤肺损伤中的作用

屈纪富,郑怀恩,林 远,闫国和,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内皮素(Endothelin, ET)和一氧化氮(NO)在烧冲复合伤肺损伤中的作用及可能机制。方法 制作大鼠烧冲复合伤模型,用 $^{99}Tc^{m}$-人聚巨蛋白($^{99}Tc^{m}$-macro-aggregated albumin, $^{99}Tc^{m}$-MAA)标记方法观察肺部血液循环状况和肺血管通透性,并检测血液流变学和动脉血气变化;分别用ET受体(ETR)拮抗剂PD-142893和NO合酶(NOS)抑制剂硝基左旋精氨甲酯(Nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)干预,观察其对上述与肺损伤密切相关的指标变化。结果 烧冲复合伤大鼠全血粘度、动脉血气分析、支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)放射性活性和肺部血液循环状况均出现了显著变化($P<0.05$),给予PD-142893和L-NAME分别可减轻和加重这些指标的变化($P<0.05$)。结论 烧冲复合伤大鼠可出现明显肺损伤,ET和NO通过多种途径影响烧冲复合伤肺损伤的发生和发展。

关键词:内皮素;一氧化氮;烧冲复合伤;肺脏
中图法分类号:R446.1;R563.02;R642;R644 文献标识码:A

Roles of endothelin and nitric oxide in pulmonary tissue damage after combined burn-blast injury

QU Ji-fu, ZHENG Huai-en, LIN Yuan, YAN Guo-he, CHENG Tian-min (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the roles of endothelin (ET) and nitric oxide (NO) in pulmonary tissue damage after combined burn-blast injury and the mechanisms. Methods After establishment of animal model of combined burn-blast injury in rats, blood circulation in pulmonary tissues and the permeability of pulmonary vessels were observed by $^{99}Tc^{m}$-macro-aggregated albumin labeling assay. Hemorheological changes were determined and arterial blood gas analysis was performed. After administration of ET receptor (ETR) antagonist PD-142893 and NO synthase (NOS) inhibitor (nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME), the above parameters were also detected. Results There were significant changes in blood viscosity, blood gas analysis, radioactivity in bronchoalveolar lavage fluid and blood circulation in pulmonary tissues in rats with combined burn-blast injury ($P<0.05$). PD-142893 ameliorated the pulmonary injury but L-NAME deteriorated the changes ($P<0.05$). Conclusion Combined burn-blast injury can lead to pulmonary tissue damage. ET and NO participate in the damages *via* different pathways.

Key words: endothelin; nitric oxide; combined burn-blast injury; pulmonary

烧冲复合伤是平战时均较常见的一种伤类,肺脏是烧冲复合伤作用的主要靶器官,肺损伤是烧冲复合伤后最为常见病变之一,也是其致死的重要原因,但有关烧冲复合伤肺损伤的发生及其影响因素仍未完全阐明。内皮素(Endothelin, ET)和一氧化氮(Nitric oxide, NO)是近来发现的重要的调节血管收缩和舒张的血管活性物质[1,2]。我们以前研究显示,大鼠烧冲复合伤后ET和NO含量可出现显著变化[3],ET受体(ET receptor, ETR)拮抗剂和NO合酶(NO sythase, NOS)抑制剂分别可减轻和加重肺损伤[4],但ET和NO影响肺损伤的作用途径仍有待于进一步研究,因此,我们对烧冲复合伤大鼠分别用ETR拮抗剂PD-142893和NOS抑制剂硝基左旋精氨甲酯(Nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)进行干预,观察它们对与肺损伤密切相关的指标的影响,以了解ET和NO在烧冲复合伤肺损伤中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及致伤

健康Wistar大鼠80只(由本校实验动物中心提供),体质量150~250 g,雌雄各半。随机分为:①正常对照组(Control);②烧冲复合伤加L-NAME组(L-NAME);③烧冲复合伤加生理盐水对

作者简介:屈纪富(1969-),男,四川省乐至县人,博士,主治医师,讲师,主要从事创伤,特别是难愈性创伤发病机制及防治方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752355

收稿日期:2002-07-31;修回日期:2003-05-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

照组(NS)；④烧冲复合伤加 PD-142893 组(PD-142893)，每组 20 只大鼠。烧冲复合伤大鼠先用 5 kW 溴钨灯致 15% 体表面积 Ⅲ 度(病理检查证实)光辐射烧伤，再用 BST-1 型生物激波管致冲击伤[超压峰值(429.3±11.5)kPa]，两伤间隔时间 40～60 min。正常对照组大鼠不致伤，PD-142893 组、NS 组和 L-NAME 组大鼠分别在烧冲复合伤后立即每只腹腔注入 PD-142893(0.5 μmol/L 2 ml)、生理盐水(2 ml)和 L-NAME(10 mg/kg)，给药后 4 h 处死取材。PD-142893 和 L-NAME 均购自 Sigma 公司。

1.2 血气分析

抽取各组大鼠腹主动脉血，用 AVL-990 型全自动血气分析仪常规进行动脉血气分析。

1.3 血液流变学检测

抽取各组大鼠腹主动脉血，用 FASCO-92 型全自动粘度快测仪常规进行血液流变学检测。

1.4 肺血管通透性和肺脏血液循环状况的观察

用 $^{99}Tc^m$-人聚巨蛋白($^{99}Tc^m$-macro-aggregated albumin，$^{99}Tc^m$-MAA)标记方法进行检测。

每次标记前用 $^{99}Tc^m$ 同位素发生器淋洗，获得高纯度的 $^{99}Tc^m$，将刚淋洗的 $^{99}Tc^m$ 按比例与 MAA 混合，用力摇匀，即得到 $^{99}Tc^m$-MAA 标记物。用前测量每 0.1 ml 放射性活性。大鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉，根据标记物的放射性活性由股静脉注入 $^{99}Tc^m$-MAA 0.3～0.5 ml，同位素量为 1.17×10^6 Bq。注后约 5 min 放于 Gz-B 型 γ 照相机针孔探头下，观察并拍摄肺部显影照片。每次拍摄条件保持一致，成像辉度 2.5，总采集数 200 万。尔后处死标记大鼠，取出心肺，气管插管，每只用 5 ml 生理盐水灌洗支气管肺泡腔，共灌洗 3 次，收集支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid，BALF)，用 γ 计数器测量其放射性活性(Bq)，以此反映肺血管通透性。将肺部 γ 线片输入 TECBIAS-6803 真彩色生物医学图像分析系统，测量其灰度和面积，以此来表示肺部血液循环状况。

1.5 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPMR 统计程序包中的 PDA-2 程序进行单因素方差分析及均数间的 t 检验。

2 结果

2.1 血液流变学指标变化

烧冲复合伤大鼠全血高切粘度、全血中切粘度和全血低切粘度均较正常对照组显著增加，PD-142893 和 L-NAME 分别可减轻和加重这些指标的变化，见表 1。

表 1 大鼠伤后血液流变学指标变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes in hemorheological parameters in rats after injury($\bar{x}\pm s$)

	n	Control	L-NAME	NS	PD-142893
High shear ratio	5	4.638±0.083	8.052±0.260*	6.800±0.079*#	6.294±0.086*#
Medium shear ratio	5	5.594±0.104	9.680±0.071*	8.300±0.079*#	7.602±0.081*#
Low shear ratio	5	13.320±0.796	21.812±1.710*	20.070±0.085*#	17.274±0.204*#

*: $P<0.05$ *vs* control group; #: $P<0.05$ *vs* L-NAME group

2.2 动脉血气分析

烧冲复合伤大鼠动脉血 pH 值和 PO_2 较正常对照组显著降低，PCO_2 则显著升高，PD-142893 可改善动脉血气变化，而 L-NAME 则进一步加重动脉血气紊乱，见表 2。

表 2 大鼠伤后动脉血气变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes in arterial blood gas in rats after injury($\bar{x}\pm s$)

	n	Control	L-NAME	NS	PD-142893
pH	5	7.375±0.044	7.277±0.010*	7.170±0.010*△	7.254±0.012*
PO_2(kP)	5	13.120±0.890	9.450±0.620*	10.210±1.060*	12.380±0.770
PCO_2(kP)	5	4.930±0.510	8.170±0.810*	7.980±1.080*	5.470±0.380#

*: $P<0.05$ *vs* control group; △: $P<0.05$ *vs* L-NAME and PD-142893 group; #: $P<0.05$ *vs* L-NAME group

2.3 肺脏血液循环和肺血管通透性变化

烧冲复合伤大鼠 BALF 放射性活性较正常对照组显著升高，γ 照相见肺脏显影不全或显影稀疏，PD-142893 显著减少烧冲复合伤大鼠 BALF 放射性活性，γ 照相明显改善，仅见显影稀疏；而 L-NAME 进一步增加 BALF 放射性活性，γ 照相显示肺脏显影不全和显影稀疏更严重，图 1～3，见表 3。

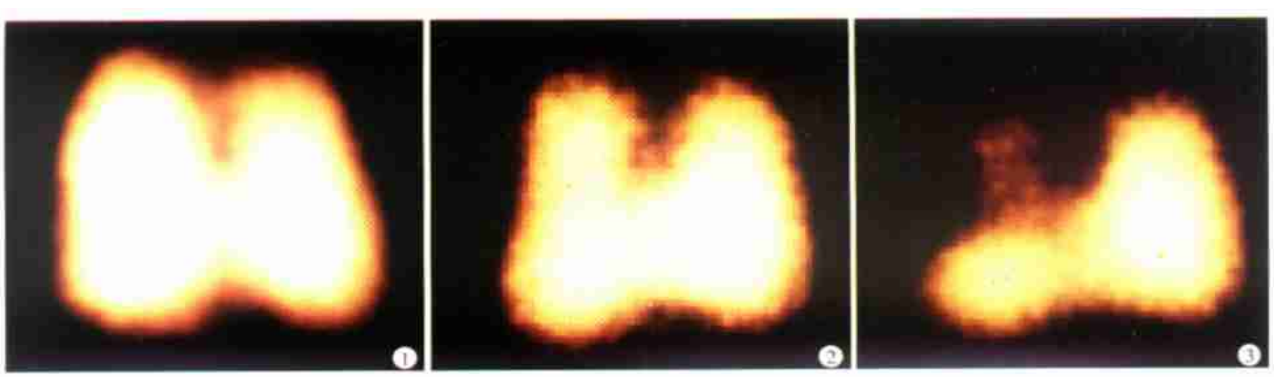


图 1 正常大鼠肺脏 γ 照相(肺脏显影完全)

Fig 1 Gamma photography of pulmonary tissues in normal rats(complete imaging of the lung)

图 2 PD-142893 组大鼠肺脏 γ 照相(肺脏显影稀疏)

Fig 2 Gamma photography of pulmonary tissues in rats of PD—142893 group(sparse imaging of the lung)

图 3 L-NAME 组大鼠肺脏 γ 照相(肺脏显影不全)

Fig 3 Gamma photography of pulmonary tissues in rats of L—NAME group(incomplete imaging of the lung)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　大鼠伤后肺脏血液循环和血管通透性变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes in pulmonary blood circulation and the permeability of pulmonary vessels in rats after injury($\bar{x}\pm s$)

	n	Control	L-NAME	NS	PD-142893
γ photography					
Area(mm^2)	10	254.68±24.21	106.57±14.26*	127.52±13.69*	217.42±18.53*#
Gray density	10	5048.21±165.36	1457.64±42.16*△	3646.87±83.49*	20775.58±105.67*#
Radiation activities in BALF(Bq)	10	19.45±6.81	277.94±126.40*△	217.86±38.74*	40.32±9.91△

*: $P<0.05$ *vs* control group; △: $P<0.05$ *vs* NS group;
#: $P<0.05$ *vs* L-NAME and NS groups

3　讨论

烧冲复合伤的直接作用及由此发生的一系列神经内分泌系统反应, 将导致复杂的病理生理过程, 其中血管的过度收缩是其重要表现之一, 同时可能又是伤后病变发展的重要因素[1-5]。烧冲复合伤后肺脏发生了明显病变, ET 和 NO 含量及其比值(ET/NO)也出现了显著变化, 因此, 推测烧冲复合伤肺组织 ET 和 NO 含量异常可能是肺损伤的重要原因[3,6]。本实验结果显示, 烧冲复合伤后肺脏血液循环显著减少, 即出现了肺缺血现象; 血气分析结果显示烧冲复合伤后机体还伴有缺氧性改变; 给以 ETR 拮抗剂治疗可使烧冲复合伤肺组织缺血缺氧性损伤显著减轻, 而给以 NOS 抑制剂则显著加重烧冲复合伤后的这种损害。这些结果证实, 烧冲复合伤肺脏出现了明显的缺血缺氧性损伤, 烧冲复合伤后 ET 和 NO 异常可进一步减少肺组织血流灌注, 加重缺血缺氧性损伤, 这是由于 ET、NO 是调节血管收缩和舒张最重要的活性物质, ET/NO 比值升高必将使血管收缩绝对或相对增强, 血流灌注减少, 同时由于伤后氧耗增加, 氧供也出现绝对或相对不足, 因而出现缺血缺氧性损伤加重现象[7]。烧冲复合伤出现的缺血缺氧性损伤是氧自由基增多和脂质过氧化损伤的重要原因, 这也与我们以前的研究结果一致[4]。

血管内皮细胞(Vascular endothelial cell, VEC)完整性是维持血管通透性的关键。烧冲复合伤肺血管内皮细胞(Vessel endothelial cell, VEC)表达血管性假血友病因子(Von Willebrand Factor, vWF)显著减少, 提示烧冲复合伤后肺 VEC 出现了损伤[6]。本实验结果显示, 烧冲复合伤后肺血管通透性显著增加, ETR 拮抗剂可以显著逆转烧冲复合伤肺血管通透性增加, 而 NOS 抑制剂则可使烧冲复合伤肺血管通透性增加明显加重, 提示烧冲复合伤后 ET 和 NO 异常是肺血管通透性增加的重要原因。烧冲复合伤后肺血管通透性增高一方面是由于 VEC 损伤的结果, 另一方面也是伤后 ET 含量升高的直接作用所致[8]。

血液粘度是血液流变学的重要指标, 其变化可代表血液凝集状态的改变, 特别是全血低切粘度增加是各种高粘滞血症和血液凝固性增高时的重要指标[9]。本实验发现, 烧冲复合伤后全血粘度均明显增加, 给以 PD-142893 治疗可减轻全血粘度增加情况, 而给以 L-NAME 处理者, 全血粘度增加更为明显, 表明烧冲复合伤后 ET 和 NO 异常可促使血液高凝状态形成。其原因可能为: ET 具有促凝活性[10], 而 NO 具有抑制血小板粘附和聚集的功能, 是一种重要的抗凝物质[11], ET/NO 比值升高可使凝血系统作用增强, 抗凝系统作用减弱; ET/NO 比值升高又可使血管收缩作用增强, 血管收缩本身也有利于高凝状态形成。另外, ET/NO 系统异常变化可加重 VEC 损伤, 使其中 vWF 释放入血明显增多, 也可使凝血系统功能增强[12], 加之 VEC 受损后血小板与内皮间的粘附能力增强, 这些都使血液呈高凝状态。烧冲复合伤后 ET 和 NO 异常及血液粘度变化为弥漫性血管内凝血(Disseminated intravascular coagulation, DIC)的发生和发展提供了条件, 这可能是伤后 DIC 及其他严重并发症发生的原因。

综上所述, 烧冲复合伤大鼠可出现明显肺损伤, ET 和 NO 可通过多种途径影响烧冲复合伤肺损伤的发生和发展。

参考文献:

[1] 屈纪富, 郑怀恩. 内皮素受体研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1996, 16(3): 152-154.

[2] Peralta C, Rull R, Rimola A, *et al*. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat[J]. Transplantation, 2001, 71(4): 529-536.

[3] 屈纪富, 郑怀恩, 林　远, 等. 烧冲复合伤后内皮素和一氧化氮的变化及其意义[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(4): 314-316.

[4] 屈纪富, 郑怀恩, 林　远, 等. 内皮素和一氧化氮在烧冲复合伤肺损伤中作用机理的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 376-378.

[5] Cao Z, Cooper M E, Wu L L, *et al*. Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury[J]. Hypertension, 2000, 36(4): 561-568.

[6] 屈纪富, 郑怀恩, 林　远, 等. 烧伤、冲击伤和烧冲复合伤后内皮素和血管性假血友病因子含量的变化及其意义[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(6): 525-527.

[7] Taniai H, Suematsu M, Suzuki T, *et al*. Endothelin B receptor-mediated protection against anoxia-reoxygenation injury in perfused rat liver: nitric oxide-dependent and -independent mechanisms[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 894-901.

[8] Wang G, Cai S, Deng X, *et al*. Secretory response of endothelin-1 in cultured human glomerular microvascular endothelial cells to shear stress[J]. Biorheology, 2000, 37(4): 291-299.

[9] BCann A D, Lip G Y. Virchow's triad revisited: the importance of soluble

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

coagulation factors, the endothelium, and platelets[J]. Thromb Res, 2001, 101(4): 321—327.
[10] Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, *et al*. The endothelin system in septic and endotoxin shock[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 407(1—2): 1—15.
[11] Tevaearai H T, Mueller X M, Tepic S, *et al*. Nitric oxide added to the sweep gas infusion reduces local clotting formation in adult blood oxygenators[J]. ASAIO J, 2000, 46(6): 719—722.
[12] Sarafanov A G, Ananyeva N M, Shima M, *et al*. Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor Ⅷ catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein[J]. J Biol Chem, 2001, 276(15): 11970—11979.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)15-1364-02

关节炎性银屑病 HLA-B27 的检测

Detection of HLA-B27 in psoriatic arthritis

李 维，王 芳，王蓉感，府伟灵 （第三军医大学附属西南医院检验科，重庆 400038）

HLA 抗原是人类主要组织相容性复合体(Major histocompatibity complex, MHC)的表达产物，在免疫系统中主要负责细胞之间的相互识别和诱导免疫反应，调节免疫应答的功能。HLA-B27 基因属于Ⅰ型 MHC 基因，基本上表达在机体中所有含核的细胞上，尤其是淋巴细胞的表面有丰富的含量。除了强直性脊柱炎以外，还有许多其它疾病与 HLA-B27 抗原的表达有着或多或少的相关性。比如 Reiter′s 综合征，HLA-B27 阳性率为 70%～90%；关节炎性银屑病，HLA-B27 阳性率为 50%～60%；葡萄膜炎(眼色素层炎)，HLA-B27 阳性率为 40%～50%；溃疡性结肠炎伴有关节病，HLA-B27 阳性率为 5%～10%等，因此 HLA-B27 的检测在这些疾病的诊断中是一个非常有价值的指标。我们在运用流式细胞术检测 HLA-B27 的过程中发现了 1 例 B27 为阴性的疑为关节炎性银屑病(Psoriatic arthritis, PA)的患者，因其 SampleFL1 Median 值与 Beads Marker 值极其接近，同时作了微量淋巴细胞毒实验核实，结果与流式细胞术一致，提示流式细胞术可作为临床检测 HLA-B27 的主要方法；同时跟踪临床，结合其他实验室指标及临床表现最后确诊为 PA。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 该例患者，女，35 岁，病程 9 个月以上，实验室检查类风湿因子阴性(滴度：1∶16)，血沉偏高(121 mm/h)，抗 O(滴度：1∶164)。因全身银屑病皮损(腿，头皮，背等多部位)伴多发性关节炎，疑 PA，到重庆医科大学附属一院就诊，抽取外周血 1 ml，以 EDTA-Na 抗凝。

1.1.2 试剂 美国 Becton Dickinson 公司 HLA-B27 kit(HLA-B27 FITC/CD3 PE)，Cat No. & Kat Nr. 为 340183，Lot ID 为 26370；143；HLA-B27 Calibration Beads(标准)，Lot ID 为 26371/141；溶血剂(Lysing solution, lys S)，批号为 340183；鞘液为 BD 公司，批号为 342003。

1.1.3 仪器 国 BD 公司 FACS Calibur 双激光四色分选流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 处理标本前先将 10× lys S 用蒸馏水稀释成 1× lys S，然后用 50μl 的外周血＋15～30μl 的单抗，室温反应 15～30 s，加 2 ml 1× lys，室温反应(10±2) s，300× *g* 离心5 s，弃上清液，以 2 ml PBS 洗涤 2 遍，最后加鞘液 1 ml，2～8 ℃保存，上机获取细胞 15 000 个检测。

1.2.2 检测与结果判断 以直接标记双色荧光的方法检测红细胞已溶解的血细胞上 HLA-B27 的表达，使用 HLA-B27 专用自动分析软件进行分析，以 CD3-PE 标记的 T 淋巴细胞设门，并检测这群细胞 HLA-B27＋的平均荧光强度(Sample FL1 Median)，与标准物道数值(FL1 Marker)比较，大于或等于此值为阳性，否则为阴性。

2 结果及讨论

流式细胞术检查结果显示该患者 HLA-B27 为阴性，但与 Beads Marker 值及其接近：Sample FL1 Median 为 141，Preset FL1 Marker 为 143，重复做了一次，结果仍然为阴性，我们同时做了微量淋巴毒实验，结果与流式细胞术一致。血清阴性脊柱关节病是一大组相互关联的多系统炎性疾病，常常累及脊柱、关节和关节周围组织，强直性脊柱炎(AS)是本组疾病的原型[1,2]。PA 又名关节病型银屑病，作为一种与银屑病相关的炎性关节疾病，因其也存在与 AS 相似的脊柱、骶髂关节的受累，并与 HLA-B27 相关的特点而被归类为血清阴性脊柱关节病。其复杂多样的临床表现常与其他关节疾病相混淆，可发生于 7%～34%的银屑病患者[4]。从风湿病学的角度看，PA 已不是作为银屑病的一个类型，而是作为一种独立疾病，在国外这一观点已被广泛接受[3]，而在国内因为详细、深入的研究报道较少，对 PA 的认识尚不普及，而导致误诊、误治相当普遍，本例患者曾到成都华西医科大学附属一院，重庆医科大学附属二院等医院就诊，被误诊为类风湿性关节炎，其临床表现为 PA 最常见的不

（下转 1367 页）

作者简介：李 维(1971—)，女，重庆市人，博士研究生，主管检验师，主要从事基因诊断方面的研究，发表论文 10 余篇。电话：(023)65460802
收稿日期：2002-12-13；修回日期：2003-06-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net