参考文献:

[1] Birkenfeld S, Zaltsmam Y A, Krispin M, *et al*. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors[J]. Dis Colon Rectum, 1987, 30(1): 43-46.

[2] Wilson D E, DiGianfilippo A, Orey F G, *et al*. Effect of nordihydroguaiaretic acid on culture rat and human glioma cell proliferation[J]. J Neurosurg, 1989, 71(4): 551-557.

[3] 郭德玉, 陈意生, 卞修武, 等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系SHG-44增殖和分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 9-12.

[4] Tsujimoto Y, Croce C M. Analysis of the structure, transcription, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lyphoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(14): 5 214-5 218.

[5] 蔡文琴, 王伯[illegible]云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 404-409.

[6] 张四清, 郑德先, 刘士廉, 等. 8-氯腺苷诱导多种肿瘤细胞凋亡[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(2): 88-89.

[7] Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al*. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5 303): 1 129-1 132.

[8] Miyashita T, Reed J C. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line[J]. Blood, 1993, 81(1): 151-157.

[9] Stocker U, Schaefer A, Marquardt H. DMSO-like rapid decrease in c-myc and c-myb mRNA levels and induction of differentiation in HL-60 cells by the anthracycline antitumor antibiotic aclarubicin[J]. Leukemia, 1995, 9(1): 146-154.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2001)03-0263-01

经验与短篇

大鼠留置心导管术在抗菌抗内毒素多肽研究中的应用

Application of retention cardiac catheter method in the study of antibacterial/ anti-endotoxin peptides

秦孝建, 郑 江, 周 红, 夏培元, 刘晓禄, 肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所, 重庆 400038)

抗菌抗内毒素多肽是本室采用计算机技术模拟设计的具有强大的杀灭G^-细菌和中和LPS的多肽分子[1], 对其体内活性研究过去多组动物各时相点处死的方法缺点是试剂、药品, 尤其是动物用量多, 各时相点组间差异较大, 重复性较差。本研究采用大鼠经颈外静脉留置心导管术进行抗菌抗内毒素多肽体内生物活性的研究, 试图解决过去存在的实验动物方法学问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

LPS(O111:B4)为Sigma产品; 抗菌抗内毒素多肽由我室合成, 用生理盐水配制为浓度分别为1 mg/ml备用; Wistar大鼠80只, 清洁级, 雌雄各半, 体重180~220 g, 由附属大坪医院动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 留置心导管术的方法 动物经腹腔1%戊巴比妥钠4 mg/100 g体重注射麻醉后, 颈部皮肤经常规备皮、消毒后, 于颈外侧下颌至心脏的中点作一长约0.5 cm的横切口, 暴露颈外静脉后行静脉插管, 插管长度按颈部切口至心脏的距离确定, 导管固定后经皮下穿至颈后引出并固定, 管内注射12 500 u/100 ml肝素0.2 ml抗凝, 采用与导管内径大小的外置T形帽插入封闭导管。

1.2.2 留置心导管组大鼠的处理 8只大鼠随机分为2组, 每组4只, 称重编号后, 留置心导管; 24 h后, 于0 h经心导管注射抗菌抗内毒素多肽5 mg/kg和LPS 10 mg/kg, 以后不同时相点经心导管采血1.0 ml, 并于采血后立即补液: 0~4 h内时相点经心导管注入采血量1.5倍的林格氏液, 6~24 h注入2倍量林格氏液。同时做血培养, 以观察术后导管有无感染发生。

1.2.3 传统方法动物的处理 72只大鼠随机分为对照与治疗2组, 每组动物36只, 每组每个时相点活杀大鼠4只, 取血测定TNF-α浓度。

1.2.4 观察指标 观察大鼠留置心导管术对动物一般情况的影响, 并于注药后0、2、4、6、12、24、48 h采血测定TNF-α浓度。

1.3 统计学处理

采用t检验进行均数比较。

2 结果

心导管术后动物与未进行手术的大鼠相似, 活动、进食等一般情况良好, 注射药物后各组动物活动明显减少, 不进食。

留置心导管术动物一次可抽血约0.04~0.05 ml/g体重, 当抽血至5 ml时动物出现燥动, 至7~8 ml后变为呆滞不动, 抽血9~10 ml时动物出现四肢发白、昏迷, 2~3 min后若立即回输血液则动物恢复正常。注射药物的动物按传统方法取下腔静脉血, 一次可抽0.02 ml/g体重, 较留置心导管术动物取血量约少一半。

感染情况: 在整个实验过程中, 除72 h后血培养有细菌生长外(8只动物有一只出现大肠杆菌感染), 其它血培养均无细菌生长。

基金项目: 国家新药基金资助项目

作者简介: 秦孝建(1957-), 男, 四川省达县人, 主管技师, 主要从事烧伤细菌感染和内毒素拮抗方面的研究, 发表论文9篇。电话: (023)68753780

收稿日期: 2000-06-29; 修回日期: 2000-12-17

(下转267页)

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

胞呈 GFAP 阳性, 其中 SHG-44 阳性表达的细胞数更少, 荧光强度亦很低; 双重荧光标记结果更能显示这两种中间丝的表达具有显著差异。上述结果提示 CHG-5 和 SHG-44 细胞在这两种中间丝蛋白表达上的差异可能反映了二者分化状态的不同, CHG-5 的分化程度较 SHG-44 高。另一方面, Vimentin 在两种胶质瘤细胞内的高水平表达表明 Vimentin 是该类胶质瘤细胞中间丝的主要成份, 而 GFAP 的空间构筑、表达水平及功能状态是细胞分化状态的更敏感、更可靠的指标。这些特性也为进一步研究恶性胶质瘤分化和药物诱导分化作用以及研究细胞骨架体系变化, 特别是中间丝构筑、共存、表达状况与细胞恶性逆转的关系提供了必要的形态学依据。

此外, 本研究中 4%PFA 对中间丝特别是 Vimentin 免疫染色结果具有较大影响的观察, 提示 4%PFA 固定可能会遮蔽或破坏中间丝上部分抗原结合位点, 因而在进行中间丝免疫组织化学染色时, 应尽量避免使用。

参考文献:

[1] Gerharz C D, Mou R, Meister P, *et al*. Cytoskeletal heterogeneity of an epithelioid sarcoma with expression of vimentin, cytokeratin, and neurofilaments[J]. Am J Surg Pathol, 1990, 14(3): 274—282.

[2] 陈自强, 卞修武, 辛　榕, 等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(12): 880—883.

[3] 杜子威, 徐庚达, 王　尧, 等. 人脑恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 的建立及其特征[J]. 中华肿瘤杂志, 1984, 6(4): 241—243.

[4] 谢锦玉. 现代细胞化学技术及其在中西医药中的应用[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1998. 102—151.

[5] Hill P B, Dora K A, Hughes A D. The involvement of intracellular Ca^{2+} in 5-HT(1B/1D) receptor-mediated contraction of the rabbit isolated renal artery[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(4): 835—842.

[6] Sabine H, Patricia C, Laila S, *et al*. IL-2-dependent expression of genes involved in cytoskeleton organization, oncogene regulation, and transcriptional control[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3 280—3 288.

[7] Alsza M S, Shaban F, Narayan R K, *et al*. Human glioma associated intermediate filament proteins: over-expression, co-localization and cross—reactivity[J]. Anticancer Res, 1998, 18(2B): 1 333—1 340.

[8] 卞修武. 胶质纤维酸性蛋白基因调控及其在胶质瘤诱导分化中的作用[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 1—2.

[9] 卞修武, 史景泉, 辛　榕, 等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 生长和分化的影响[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(5): 285—288.

(编辑　王　红)

(上接 263 页)

血凝情况: 外置 T 形帽的封闭非常重要, T 形帽脱落易致血凝; 每次抽血后应用肝素冲洗导管, 才不易致血凝。

两种方法采血测定大鼠血浆的 TNF-α 浓度值并无明显差异, 但留置心导管术方法所得数值标准误较小, 见表 1。应用留置心导管术方法采血测定的 TNF-α 浓度值, 可见抗菌抗内毒素多肽对 LPS 攻击大鼠血液中 TNF-α 具有明显的降低作用。

表 1　两种实验方法的大鼠血浆 TNF-α 浓度比较(ρ_B/ ng·ml^{-1})

组别		0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
留置心导管	对照组	0.89±0.21	25.31±4.16	39.65±4.95	48.51±6.45	30.11±5.71	2.36±0.51	0.95±0.55	1.05±0.31
	治疗组	0.75±0.20	12.61±3.28	20.01±4.51	21.56±4.81	2.31±0.72	1.10±0.46	1.00±0.47	0.90±0.31
传统方法	对照组	0.86±0.36	24.35±7.31	35.41±18.96	46.61±18.97	28.61±17.96	2.16±1.84	1.75±0.94	1.05±0.41
	治疗组	0.87±0.38	13.46±5.47	19.25±12.01	20.03±8.15	0.16±1.04	0.18±0.79	1.06±1.01	1.00±0.72

3　讨论

在动物体内实验中存在给药次数、采血次数较多, 操作繁琐, 尤其是各时相点的采血既往一直是采用整组动物活杀, 存在动物及药品均大量消耗, 不仅工作量大并且各时相点间存在组间差及重复性不好的缺点, 这一直是动物体内实验中亟待解决的问题[2]。为解决这一问题, 本实验室开展了大鼠留置心导管术。初步结果表明大鼠留置心导管术克服了传统实验方法试剂、药品消耗大, 尤其是动物数量较多, 重复性也较差的缺点。在本研究中, 虽然需要采血 9 次, 由于开展了大鼠留置心导管术, 动物较传统方法(72 只)减少至 8 只, 而且通过导管采血, 极大减少了工作量, 缩短了操作时间, 证明留置心导管术操作简便, 重复性好。

我们的体会是严格无菌操作可有效避免留置导管的细菌感染, 外置 T 形帽的封闭可防止血液的凝固, 同时控制每次采血量对保证动物的一般情况非常重要。抗菌抗内毒素多肽对大鼠保护实验中 TNF-α 的检测结果表明大鼠留置心导管术可保证血液学检测指标结果的可靠性。

关键词: 大鼠留置心导管术; 内毒素; 抗菌抗内毒素多肽
中图法分类号: R645.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郑　江, 袁建成, 周　红, 等. 杀菌性/通透性增加蛋白功能区结构模拟肽小鼠体内拮抗内毒素作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(6): 520—523.

[2] 周　红, 郑　江, 肖光夏. 猪源杀菌性/通透性增加蛋白对大鼠烧伤脓毒症模型的治疗作用[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(Suppl): 16—18.

(编辑　冷怀明)

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