DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.030
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
182 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0182-03

大鼠烫伤后脏器血管内皮细胞损伤及蜕皮甾酮对其保护作用的研究

石富胜[1],杨正国[1],马福云[1],狄桂萍[1],罗向东[2],杨宗城[2],吴 旭[3] ([1]解放军322医院烧伤科,大同 037006;[2]第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038;[3]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

提 要:目的 研究大鼠烫伤后脏器血管内皮细胞通透性变化及机制,蜕皮甾酮(EDS)对脏器损伤的保护作用。方法 将健康Wistar大鼠随机分成4组:正常对照组(NOM);烫伤组(S);药物对照组(EDS);药物治疗组(S+EDS)。测定指标:心肺肾血管通透性;组织VE-钙粘附分子表达;组织血管内皮细胞间连接超微结构变化。结果 鼠烫伤后烫伤组脏器血管内皮细胞通透性增加,VE-钙粘附分子表达减少,组织血管内皮细胞间连接损伤;EDS治疗后上述各指标损伤减轻。结论 鼠烫伤后血管内皮细胞通透性增加,内皮细胞连接损伤可能是通透性增加的原因之一,EDS对烫伤鼠血管内皮细胞损伤可能有一定的保护作用。

关键词:烫伤鼠;VEC损伤;VE-钙粘附分子;内皮细胞连接;蜕皮甾酮
中图法分类号:R644 文献标识码:A

Study on the injury of vascular endothelial cells in scalded rats and the protective effect of ecdysterone

SHI Fu-sheng, YANG Zheng-guo, MA Fu-yun, DI Gui-ping, LUO Xiang-dong, YANG Zhong-cheng, WU Xu (Department of Burns, No. 322 Hospital of PLA, Datong 037006, China)

Abstract: Objective To study the changes of permeability of intracellular junction among the VECs and the protective effect of ecdysterone (EDS) on VECs injury in rat after scalding. Methods Healthy Wistar rats were randomized into 4 groups: ①Normal control group (NOM); ②Scalded group (S): the animals were inflicted with 30% TBSA full-thickness scald injury; ③EDS control group (EDS): the non-scalded rats with EDS (20 mg/rat); ④EDS-treated group (S+EDS): the scald rats were treated with EDS (20 mg/rat). The vascular permeability and expression of VE-calcium adhesion molecules in various organs were measured. Results In S group the permeability of VECs increased, expression of VE-calcium adhesion molecules decreased, intracellular junction of VECs injured. After EDS treatment all the changes alleviated. Conclusion The permeability of VECs increases after scalding. Intracellular junction injury may be one of the reason for the increasing of permeability. EDS may have certain protective effect on the injury of VECs in scalded rat.

Key words: scalded rats; vascular permeability; VE-calcium adhesion molecules; vascular endothelial cells junction; ecdysterone

烧伤后多脏器功能损害是当前严重烧伤的主要死亡原因之一,研究发现,血管内皮细胞损伤在烧伤后脏器损害的发生、发展中具有重要的作用,而且是导致"缺血再灌注"损伤、最终引起全身多脏器功能损害的重要原因。正常情况下,内皮细胞在血管与组织之间构筑起了一道半通透屏障。半通透屏障选择性允许某物质通过血管内皮进入组织;脏器血管内皮细胞只有1%~10%的血浆蛋白通过血管进入周围组织,内皮细胞能有效地防止各种血液成分的漏出。烧伤后微血管内皮细胞通透性增加,大量体液渗入组织间隙最终引起全身多脏器功能损害,因此如何防治烧伤后微血管内皮细胞通透性增加,对烧伤休克期治疗具有非常重要的意义。

基金项目:国家自然科学基金重大资助项目(39830400)
作者简介:石富胜(1964-),男,山西省大同市人,硕士,副主任医师,主要从事烧伤后血管内皮细胞损伤及防治方面的研究,发表论文20篇。电话:(0352)2014198
收稿日期:2000-05-09;修回日期:2000-08-20

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组

健康Wistar大鼠60只,体重180~220 g,雌雄不拘(由第三军医大学实验动物中心提供);单笼喂养1周后随机分成4组:正常对照组(NOM):戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔麻醉后背部剃毛,10%硫化钠常规脱毛后假烫伤,腹腔注射平衡液40 ml/kg;烫伤组(S):同上麻醉后,92 ℃开水烫伤18 s,造成背部30% Ⅲ度烧伤(病理切片证实)。伤后立即腹腔注射平衡液40 ml/kg并保温;药物对照组(EDS):麻醉、脱毛同前,但不致伤,腹腔内注射平衡液同时注入蜕皮甾酮(Ecdysterone, EDS)20 mg/只;药物治疗组(S+EDS):其他处理同烫伤组,补液抗休克的同时给EDS 20 mg/只。

1.2 测定指标和方法

1.2.1 烫伤鼠各脏器血管通透性 各组大鼠分别于处理后3、6、12、24 h各时相点前30 min再次麻醉,分离股静脉并注入0.2 ml ^{99}锝标记的亚锡喷替白蛋白(中国原子能科学院提供)约(2.96~3.70)×10^6 Bq,30 min后断头处死放血,取出脏器组织,吸干净组织残存的积血,称重后在γ-记数仪上记数30 s,记录其cpm值。每组测定前后均检测总注入量的cpm值(理论值),取其平均数,记算每100 mg脏器组织的cpm值。用100 mg组

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

织中测定的 cpm 值与总注入量的比值来反映渗出的蛋白质量, 即微血管通透性程度。计算公式: 实测 cpm 值/总注入量的 cpm 值(理论值)。

1.2.2　肺、肝、肾组织 VE-钙粘附分子(VE-Cadhesion)表达　免疫组化染色法: 组织切片经微波炉抗原修复后以 S-P 方法进行 DAB 染色, S-P 试剂盒购自中山公司, 以 PBS 代替一抗作为空白对照, 正常组织作为正常对照, 细胞染成棕色为阳性判断标准。

1.2.3　心、肾组织血管内皮细胞超微结构变化　大鼠活杀后立即取组织标本, 3% 戊二醛磷酸缓冲液(pH 7.4)固定。漂洗后用 1% 锇酸固定 2 h, 丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋, 超薄(600 nm)切片, 透射电镜扫描观察、照相、记录。

1.3　统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用华西医科大学医学统计程序包 PEMS 进行样本均数 t 检验。

2　结果

2.1　EDS 对烫伤鼠各脏器血管通透性的影响

鼠烫伤后各脏器血管通透性显著增加, 心、肺、肾、肝脏器组织的 cpm 值伤后 6~12 h 之间达到高峰, 部分延迟到 24 h, 而肝脏组织 cpm 值伤后 3 h 就可达到高峰; 表明烧伤后各脏器组织血管通透性增加显著; EDS 治疗后各脏器血管通透性均明显下降($P<0.05$), 见表 1。

表 1　鼠烫伤后心、肺、肝、肾血管通透性变化(每 100 g 组织的实测 cpm/总注入 cpm)及 EDS 的治疗作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of permeability in heart, lung, liver and kidney after scalding and treated with EDS($\bar{x} \pm s$)

	0 h ($n=6$)	3 h ($n=6$)	6 h ($n=6$)	12 h ($n=6$)	24 h ($n=6$)
Heart					
S	0.91±0.08	3.70±1.30	5.70±1.50	6.22±0.20	6.88±0.23
S+EDS	0.97±0.13	3.50±1.40	4.60±1.20 *	3.51±0.36 **	3.37±0.20 **
Lung					
S	1.95±0.32	4.90±0.25	6.70±0.90	9.07±0.41	9.87±1.45
S+EDS	1.71±0.31	4.30±0.28	5.20±1.30 *	7.88±0.59 **	6.20±0.69 **
Liver					
S	2.47±0.21	8.10±0.25	8.50±0.65	9.71±0.83	8.50±0.84
S+EDS	2.43±0.29	7.60±0.49	7.30±0.80 *	6.37±0.65 **	6.37±1.09 **
Kidney					
S	30.10±0.48	50.0±2.30	73.0±3.60	87.60±4.41	68.87±10.92
S+EDS	30.19±0.69	55.0±1.80	65.0±3.10 *	49.91±0.61 **	45.77±0.32 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* S

2.2　肺、肾、肝组织 VE-钙粘附分子表达

烫伤后组织脏器表达明显降低, EDS 治疗后则表达增强, 见表 2、图 1。

表 2　鼠烫伤后 24 h 肺、肝、肾 VE-钙粘附分子表达($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Expression of VE-cadhesion molecules in lung, liver and kidney in scalding rats after 24 h($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Area (μm^2)			IOD		
		Lung	Liver	Kidney	Lung	Liver	Kidney
NOM	6	520.10±10.3	420.1±10.3	620.1±10.3	258.30±11.2	242.3±12.2	252.3±10.2
EDS	6	511.10±17.1	406.1±16.1	601.1±18.1	259.20±11.6	232.2±11.6	229.2±12.6
S	6	211.20±16.1 *	219.2±13.1 *	200.2±16.1 *	120.10±10.1 *	108.1±12.1 *	103.1±11.1 *
S+EDS	6	412.30±13.5 #	307.3±23.5 #	327.3±33.5 #	227.10±12.5 #	200.1±13.5 #	217.1±10.5 #

*: $P<0.05$ *vs* NOM; #: $P<0.05$ *vs* S

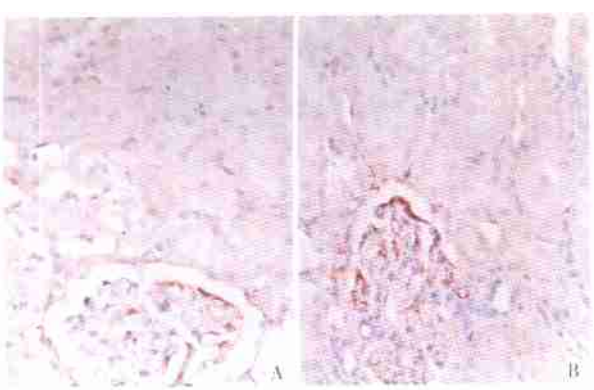


图 1　肾小球血管内皮细胞 VE-钙粘附分子表达　(S-P×400)

A: 烫伤组: 表达弱; B: 治疗组: 表达增强

Fig 1　Expression of VE-calcium adhesion molecules in glomerular VECs　(S-P×400)

A: Group S, significantly decreased; B: Group S+EDS, significantly increased

2.3　脏器血管内皮细胞连接电镜观察

正常结构为心肌肌丝排列整齐, 心肌内皮细胞扁平状, 微血管腔明显, 线粒体、内质网无水肿; 烫伤鼠心肌结构心肌肌丝排列紊乱、水肿, 部分溶解; 心肌内皮细胞水肿, 细胞核固缩, 核周间隙增宽, 异染色质边集, 线粒体、内质网水肿, 微血管腔明显狭窄。肾小球血管内皮窗部分消失, 血管内皮连续, 肾小管上皮细胞坏死。脏器血管内皮细胞连接增宽, 见图 2。

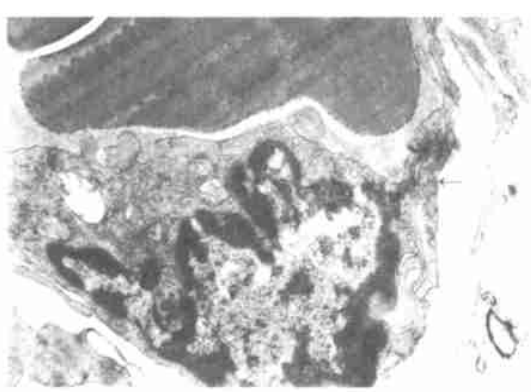


图 2　烫伤鼠心肌血管内皮细胞连接明显增宽　(TEM× 10 000)

Fig 2　Intercellular junction among VECs widened after scalding in rats　(TEM× 10 000)

3　讨论

本实验对烫伤鼠各脏器血管通透性及各脏器血管内皮细胞 VE-钙粘附分子的表达进行了观察, 结果发现烫伤鼠各脏器血管通透性比正常组明显增高, 尤其

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

心脏、肺脏、肝脏、肾脏通透性增高明显，肝脏、肾脏伤后6 h 其通透性达到高峰，EDS 治疗后烫伤鼠各脏器血管通透性较单纯烫伤组比较均有所下降。烫伤鼠各脏器血管内皮细胞通透性增加，其机制与脏器血管内皮细胞间连接降低有关；EDS 在一定程度上降低烫伤鼠各脏器血管内皮细胞通透性，对烫伤鼠脏器血管内皮细胞间连接损伤有一定保护作用。正常情况下，内皮细胞在血管与组织之间构筑起了一道半通透屏障，内皮细胞能有效地防止各种血液成分的漏出。传统观点认为微血管通透性升高是由于内皮细胞胞饮运输加速的结果。近年来认为病理情况下微血管通透性升高主要原因是内皮细胞连接损伤，某些致病因子作用使血管内皮细胞损伤，连接破坏是通透性升高的原因之一[1]。本实验证明，EDS 治疗后脏器血管内皮细胞 VE-钙粘附分子表达比烫伤组增强。说明 EDS 对血管内皮细胞连接成分有一定的作用。内皮细胞间的连接和大多数细胞连接一样，有紧密连接、粘附连接、缝隙连接和韧带连接。其中，粘附连接(Adherents junction)或小带附着(Zonular adherents)是内皮细胞间最重要的一种连接方式[2]，它是由钙粘附分子介导的一种细胞膜的连接，是细胞膜和细胞内的细胞浆蛋白及肌动蛋白微丝构成的网状结构连接，它的结构变化可引起细胞骨架结构的变化，使内皮细胞变形，从而调控大分子物质和血细胞渗出。在内皮细胞粘附连接和细胞骨架结构蛋白之间起重要作用的是钙粘附分子，其特性是同原性细胞间粘附。其中 VE-钙粘附分子(Catherine 或 B412)是内皮细胞特有的一种粘附分子，也是内皮细胞间所必需的。其超微结构显示烫伤组脏器血管内皮细胞水肿或溶解，核周间隙分离增宽，细胞核固缩，异染色质边集；肾小球内皮细胞窗孔界限不清，或内皮细胞出现连续窗口消失；内皮细胞间连接增宽。EDS 治疗组，上述损伤结构明显减轻，内皮细胞间连接较紧密。脏器组织 VE-钙粘附分子免疫组化证明：正常组织脏器 VE-钙粘附分子表达较强，烫伤组脏器 VE-钙粘附分子表达则明显减弱，EDS 治疗组脏器 VE-钙粘附分子表达较正常减弱，但较烫伤组明显增强。王小军等[1]实验证明烧伤血清刺激培养的 VEC，其 VE-钙粘附分子表达降低，细胞间连接分离，甚至出现细胞脱落。内皮细胞损伤一方面使大量液体渗入组织间隙，增加毛细血管与组织间的距离，加重组织细胞的缺氧，另一方面性使炎症细胞过多聚集于局部组织，直接造成组织细胞的损伤。研究证明[3~6]应用抗氧化物可以保护 VEC 坏死和凋亡。本实验显示 EDS 治疗后，内皮细胞连接损伤减轻，对内皮细胞有一定的保护作用，与文献[6]报道相一致，推测其保护机制可能与其抗氧化作用及其对 VEC 细胞的发育生长的调节作用有关。

参考文献：

[1] 王小军，杨宗城. 内皮细胞连接的研究进展[J]. 生理科学进展，1998，29(4)：314－318.

[3] Abello P A，Fidler S A，Bulkley G B，*et al*. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin[J]. Arch Surg，1994，129(1)：134－141.

[3] Wang J H，Redmond H P，Watson R W G，*et al*. Human endothelial cell apoptosis requires both heat shock and oxidative stress responses[J]. J Leukocyte Biol，1995(abstract)，58(Suppl)：8－9.

[4] Hardy V M，Flicking A G，Riley D P，*et al*. Superoxidative dismutase mimetics inhibit neutrophil-mediates human aortic endothelial cell injury *in vitro*[J]. J Biol Chem，1994，269(37)：18 535－18 545.

[5] Wang J H，Redmond H P，Waston R W S，*et al*. Mechanisms involved in the induction of human endothelial cell necrosis[J]. Cell Immunol，1996，(1)：168－199.

[6] 吴 旭，林水金，杨映波 等. 蜕皮甾酮对肿瘤坏死因子致人脐静脉内皮细胞损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志，1998，14(1)：58－62.

(编辑 陈聪连)

(上接181页)

心、呕吐1例(4.16%)，失眠2例(8.3%)。副作用发生率为20.8%。停药后24 h，上述症状消失，本组病例未出现其它副作用。

对照组24例中，显效7例，有效13例，无效4例，有效率83.3%。24例患者中输液后出现心悸3例(12.5%)，恶心、呕吐1例(4.16%)，失眠2例(8.3%)，副作用发生率为25%。停药后24 h，上述症状消失，本组病例未出现其它副作用。

3 讨论

茶碱作为一种平喘药物用于 COPD 的治疗已有数十年历史[2]。但由于其有效浓度与中毒浓度较为接近，超过治疗浓度时，副作用明显增加，甚至引起严重毒性反应[3]，因此，茶碱剂型的研制、给药途径与方法，一直是药物与临床研究的重要课题之一。

葆乐辉是近年用于临床的一种茶碱控释制剂，其临床疗效与安全性均在研究之中。本研究结果显示葆乐辉对COPD患者平喘作用有效率为87.5%，副作用发生率为20.8%，包括心悸、恶心、呕吐及失眠。文献报道血浆茶碱浓度大于5 μg/ml即有治疗作用，大于20 μg/ml副作用明显增加[4]。本研究结果显示，口服葆乐辉400 mg后血中茶碱浓度为(7.27±2.48)μg/ml，表明这种给药方法能使血浆茶碱保持在较为稳定的治疗浓度范围内，临床结果亦与之相吻合。两组病例中有3例无效，其血中茶碱浓度亦低于有效浓度，因而认为，这些病人临床症状未控制，与血浆茶碱浓度不足是其原因之一。本研究结果表明，口服葆乐辉既能达到有效的治疗浓度，又不致引起严重副作用，对COPD患者平喘作用效果较好，使用安全。但若同时要静脉点滴茶碱类制剂，则应密切监测血中茶碱浓度。

关键词：血药浓度；慢性阻塞性肺疾病
中图法分类号：R974.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李淑萍，杨晓静，陈维中 等. 毛细管电泳监测茶碱血浓度方法[J]. 第三军医大学学报，1998，20(2)：32.

[2] 林耀广. 茶碱临床应用的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志，1998，21(4)：196－199.

[3] Milavetz G，Vaughan L M，Weinberger M M，*et al*. Evaluation of scheme for establishing and maintaining dosage of theophylline in ambulatory patients with chronic asthma[J]. J Pediatr，1986，109(2)：351－354.

[4] Weinberger M D，Hendeles L，Pharm D. Theophylline in asthma[J]. N Eng J Med，1996，334(2S)：1 380－1 382.

(编辑 薛国文)

(C)1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net