DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.032

利于生长与在其它载体上培养情况不一致。如前所述，选择滤膜为载体具有优越性。这种模型可直接用于:① 单层内皮细胞的通透性研究。② 内皮细胞分泌的物质可通过滤膜微孔，故可做联合培养，以同时观察两种细胞的相互作用。③ 因滤膜较玻片软，电镜制样中可直接用于包埋、切片，便于原位观察细胞间的相互关系。本室已采用这种模型进行了一些研究。如缺氧对肺动脉内皮细胞的通透性影响；缺氧时肺动脉内皮细胞与平滑细胞的相互作用机制等。这些实验稳定性较好。本方法适用于不同孔径需要的滤膜内皮单层培养，也可作为其它细胞滤膜培养的基础。

关键词 血管内皮细胞；细胞培养

中图法分类号 R329.2

参考文献

1 杨映波.血管内皮细胞研究的一些进展.见:孙秉庸主编.病理生理学进展.第3册.北京:科学技术文献出版社，1993.99~101

2 A. E. Postlethwaite, R. Snyderman. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte derived factor. J of Exp Med, 1976; 144(2): 1188

(收稿: 1996-03-08;修回: 1997-10-09)

(编辑 张大春)

内皮素-1在内毒素对肝血流量影响中的作用

Effect of endothelin-1 on endotoxin influenced hepatic blood flow

刘宝华* 陈惠孙** 王代科 胡德耀** 杨恒文** (第三军医大学附属大坪医院普通外科) 重庆，630042

提 要 目的:观察内皮素-1(ET-1)在内毒素对肝血流量影响中的作用。方法:选用 Wistar大鼠 20只，分为对照组；ET-1组: 4 μg·kg⁻¹；内毒素组: 10 mg·kg⁻¹内毒素；内毒素+ ET-1抗体组: 10 mg·kg⁻¹内毒素和 1∶2000 ET-1抗体 0.4 ml·只⁻¹。采用氢气清除法观察肝血流量。结果:内毒素和 ET-1均能使肝血流量降低，其中 ET-1作用较强，持续时间较长。ET-1抗体能部分拮抗内毒素所致肝血流量降低作用。结论:ET-1参与了内毒素所致的肝血流量降低作用。

机体对致炎物质的反应十分复杂，涉及神经、体液、内分泌等许多系统，目前认为最重要的是免疫系统和血管内皮细胞系统[1]。内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)是血管内皮细胞分泌的最强的缩血管因子，以自分泌、旁分泌的方式调节局部血管紧张度，参与局部循环稳定的维持[2]。本实验采用氢清除法观察内毒素对肝血流量的影响，以及 ET-1在内毒素对肝血流量影响中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌内毒素($O_{111}B_4$)、内皮素-1(Endothelin-1, porcine sequence)购自美国 Sigma公司。内皮素-1抗体(ET-1 antibody)购自英国皇家医学院。末梢组织血流仪(PHC-300日本)。

1.2 动物的准备及分组

取 Wistar大鼠 20只，体重 250 g~280 g雌雄不拘，每组 5只。实验前禁食过夜，自由饮水。1.5%戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹腹腔注射。动物麻醉后，分组如下:① 生理盐水对照组(C组)；② 单纯内皮素-1组(ET-1组): 4 μg·kg⁻¹；③ 单纯内毒素组(LPS组): 10 mg·kg⁻¹内毒素；④ 内毒素+ ET-1抗体组(LEA组): 10 mg·kg⁻¹内毒素和 1∶2000 ET-1抗体 0.4 ml·只⁻¹。

1.3 实验方法[3]

麻醉后动物仰卧位固定于实验架上，行气管切开插管。腹部正中切口，长约 3 cm，显露右侧肝脏。参考电板置于腹部切口左侧皮下。记录电极针于距肝右叶下缘的 0.5 cm，斜行 45°，插入约 1 cm 电极固定稳定 10 min后，经气管插管进行人工呼吸，控制频率为 40 beat/min 开始吸入氢气进行肝血流量(Hepatic blood flow, HBF)测定，氢气浓度为 20%。用末梢组织血流仪记录氢气清除曲线。根据该仪器提供的血流量计算方法，将记录氢气清除曲线，经半对数转换，求出半衰期($t_{\frac{1}{2}}$)。根据下列公式计算 HBF:

$$HBF = 0.693 \div t_{\frac{1}{2}} \times 100/100(ml \cdot 100g^{-1} \cdot min^{-1})$$

肝血流量测定的时间点:给药前、给药后 5、15、30、45、60 min。给药方法:自肠系膜小静脉头皮针穿刺，后接三通管，给以

* 刘宝华，男，37岁，副教授、副主任医师，博士

** 野战外科研究所 重庆，630042

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

不同药物。

2 结果

2.1 给予 ET-1后 HBF迅速降低，5 min达到最低点，较对照组降低 52.2%。此后 HBF逐渐回升，60 min后仍低于对照组（$P<0.05$），见附表。ET组肝组织氢气清除曲线与对照组相比下降缓慢。

2.2 自肠系膜静脉及给内毒素后，HBF于给药后 15 min开始降低（$P<0.05$），30、45 min降低更加明显（$P<0.01$）（附表）。HBF氢气清除曲线下降变缓，尤 45 min时最明显。内毒素与 ET-1抗体一起给予时，与 LPS组相比，HBF于 15、30、45 min有所增加（$P<0.05$~0.01）；HBF氢气清除曲线下降相对较快（附表）。

附表 ET-1和内毒素对肝血流量的影响（ml·100 mg^{-1}·min^{-1}）（$\bar{x}\pm s$）

分组	给药前	给药后时间（min）				
		5	15	30	45	60
C	63.9±6.9	59.2±2.3	66.9±10.8	62.7±8.3	64.4±9.4	68.2±10.2
ET	78.9±14.8	28.3±6.0**	41.4±8.8**	41.4±6.5**	47.5±8.9*	49.9±9.7*
LPS	86.1±3.7	65.2±5.1	51.6±11.8*	42.7±6.8**	41.0±3.4**	58.2±4.9
LEA	82.4±4.7	66.7±10.6	70.8±3.1△	63.4±7.9△△	65.9±6.5△△	68.1±10.6

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ 与 C组比较；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ 与 LPS组比较

3 讨论

内毒素血症时对 HBF影响因素较多，包括内毒素，多种细胞因子和一些激素作用等。本实验自肠系膜上静脉给予 10 mg·kg^{-1}内毒素 15 min后，HBF较对照组明显降低，45min达到最低点。内毒素和 ET-1抗体同时给予时，15 min~45 min HBF下降程度较单纯内毒素低，间接表明 ET-1参与了内毒素所致的 HBF降低。4μg·kg^{-1} ET-1给予后，HBF迅速降低，5 min已明显低于对照组，1 h后仍明显降低。说明 ET-1缩肝血管作用较强，持续时间较久。

目前研究表明，肝脏内皮细胞、贮脂细胞和 Kupffers细胞均能合成和释放 ET-1[4,5]。给予内毒素后，主要是内毒素直接作用于上述细胞合成和释放 ET-1[6]。另外，内毒素还可激活单核巨噬细胞释放肿瘤坏死因子（TNF）、白介素-1、6（IL-1、6）和γ-干扰素（γ-IFN），上述细胞因子也能引起 ET-1的合成和释放[7]。上述因素主要通过影响内皮素前体原 mRNA转录和翻译调节 ET-1释放量。

ET-1对肝脏血流量的影响通过与肝血管平滑肌细胞膜内皮素 A型受体结合，激活细胞膜上信号传递系统，引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，导致血管平滑肌细胞收缩，使肝血流量减少[8]。另外，ET-1通过与肝血窦周围贮脂细胞内皮素 A型受体结合，使贮脂细胞发生收缩反应，导致肝血窦变窄、肝血流变慢，肝组织缺血缺氧[9]。从而 ET-1通过调节肝脏微循环，使内毒素血症时肝组织缺血缺氧的程度加重。

关键词 肝血流量；内皮素；内毒素
中图法分类号 R575

参考文献

1 林远洪，盛志勇．脓毒症的概念、本质及体液介质的作用．解放军医学杂志，1993；18(1)：73
2 Yanagisawa M，Kurihara H，Kimura S *et al*．A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells．Nature，1988；332(34)：411
3 杨恒文，胡文辉，丁珍明等．大鼠脊髓腹侧鼠损伤脊髓组织血流量的变化，中华神经外科杂志，1991；7(27)：87
4 Housset C，Rockey D C，Bissell M *et al*．Endothelin receptor in rat liver：Lipocytes as a contractile target for endothelin-1．Proc Natl Acad Sci USA，1993；90(10)：9266
5 Gondo K，Ueno T，Sakamoto M，*et al*．The enodthelin-1 binding site in rat liver tissue：light and electro-microscopic autoradiographic studies．Gastroenterology，1993；104(6)：1745
6 Pernow J，Hemsen A，Halien A *et al*．Release of endothelin-like immunoreactivity in relation to neuropeptide Y and catecholamines during endotoxin shock and asphyxia in the pig．Acta Physiol Scand 1990；140(3)：311
7 Kanse S M，Takanaihi K，Lam H C *et al*．Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells．Life Sci 1991；48(14)：1379
8 Luscher T F，Oemar B S，Boulanger C M *et al*．Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors PartⅡ．J Hypertension 1993；11(2)：121
9 Rockey D C．Characterization of endothelin receptors mediating rat hepatic stellate cell contraction．Biochem Biophys Res Commun，1995；207(2)：725

(收稿：1996-09-28；修回：1996-12-30)
(编辑 张大春)

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