DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.011

双后肢投射物致伤脑组织和血浆中内皮素-1释放表达实验研究

王庆松* 陈曼娥 琚亚非 (第三军医大学附属大坪医院神经内科) 重庆, 630042

提 要 借助犬双后肢高速、低速投射物致伤应激模型,对内皮素-1(ET_1)在神经-体液中的表达与释放进行动态观察和定量分析,旨在进一步探索非颅脑致伤中枢神经系统(CNS)应变内环境紊乱的某些病理生理基础。结果发现伤后体液、脑组织匀浆 ET_1较伤前及对照组显著升高,尤以高速组明显;低速组下丘脑,高速组下丘脑、海马区 ET_1-mRNA表达较对照组显著增强。提示虽未直接伤及大脑,但对 CNS可有不同范围、不同程度的间接损害作用;且不同应激强度,对 CNS产生不同程度的影响。表明 CNS在全身应激反应基础上有其自身特殊规律。

关键词 投射物致伤;脑; ET_1; ET_1-mRNA;斑点杂交

中图法分类号 R651.1+3

在创伤患者中,常见患者虽未直接伤及大脑,却出现了某种程度的神经、精神异常,推测这一现象可能与中枢神经系统(CNS)间接受损有关[1,2]。鉴于目前在远离大脑的局部肢体致伤特定应激条件下,深层次探索 CNS应变内环境紊乱病理生理基础的报道甚少,故本实验借助犬双后肢低、高速投射物致伤模型,选用具有强效缩血管作用的内源性致伤因子内皮素-1(ET_1),从不同层次对其在神经-体液中的表达与释放进行动态观察和定量分析,为创伤后神经、精神异常等 CNS反应的研究,以及提高创伤应急救治整体防治水平提供一定的实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康家犬 20只,雌雄不拘,体重 10.5~14.0 kg 伤前随机分为假致伤组(对照组,4只)、低速钢珠致伤组(低速组,8只)、高速钢珠致伤组(高速组,8只)。

1.2 模型制备

3%戊巴比妥钠静脉持续麻醉。1.03 g钢珠室内靶道致伤,低、高速组撞击速度分别为 625 m/s 1368 m/s 瞄准点在犬双后肢大腿肌肉丰满处,尽量避免伤及股骨、大血管及神经干。伤后局部加压包扎止血。

1.3 标本采集

分别于伤前、后两次行小脑延髓池穿刺,并于第二次穿刺后留置穿刺针。每组动物分别于伤前及伤后 10 min 1 2 6 8 h 等时相取颈静脉血、脑脊液(CSF),并同期记录 CSF压力、血压、呼吸、肛温等。标本处理按操作说明进行。各组动物均于伤后 8 h活杀,取下丘脑、海马区、颞顶叶灰质、白质等处脑组织,分装,液氮保存。

1.4 实验方法

用解放军总医院提供的 ET_1放免测定试剂盒测定血浆、CSF 脑组织 ET_1含量。以地高辛配基随机引物法标记 ET_1-cDNA探针(800 bp),采用一步快速热酚抽提法提取脑组织总 RNA,变性后点于硝酸纤维素膜上,固定,在严格条件下进行预杂交、杂交、洗膜及显色反应,用图像分析系统测定各点平均光密度,求其积分光密度值,以反映各点 ET_1-mRNA相对含量。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Welch t 检验、双因素方差分析、相关分析及相关系数显著性检验。

2 结果

2.1 一般情况

低速组伤后 1 h内、高速组伤后 6 h内肛温均较伤前及对照组明显降低($P<0.01$);伤后 8 h动态观察心率、呼吸、血压、CSF压力等变化均较平稳($P>0.05$)。

2.2 能量吸收与局部伤情

高速组在投射物撞击速度、撞击能量、组织吸收能量等方面明显高于低速组($P<0.01$)。致伤组动物伤肢入口明显大于出口,入口皮肤多呈星状撕裂。高速组伤道内肌组织缺损坏死较多,挫伤范围较广;低速组相对较轻。

2.3 ET_1应变活性

2.3.1 体液 ET_1变化 低速组伤后 6 h CSF-ET_1明显高于伤前及对照组($P<0.01$);高速组伤后 2h 后明显高于伤前及其它两组($P<0.01$)(表 1)。低速组伤后 2h血浆 ET_1较伤前增高($P<0.05$),伤后 6 h明显高于伤前及对照组($P<0.01$);高速组伤后 1 h较伤前明显增高($P<0.05$),伤后 2 h明显高于伤前及其它两组($P<0.01$)(表 2)。比较正常 CSF 血浆 ET_1,前者明显高于后者($P<0.01$),伤后各时相二者无显著差异($P>0.05$)。

* 现在成都军区总医院神经内科 成都, 610083

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

2.3.2 脑组织 ET_1变化 低速组下丘脑 ET_1明显高于对照组($P < 0.01$);高速组下丘脑、海马区较对照组明显升高($P < 0.01$),较低速组分别相差非常显著($P < 0.01$)、显著($P < 0.05$)(表3)。

2.3.3 相关分析 CSF血浆 ET_1与各脑区含量呈显著正相关($P < 0.05$),且 CSF-ET_1与各脑区相关系数较血浆高,其中尤以与下丘脑、海马区相关系数最大。

2.4 脑组织 ET_1-mRNA斑点杂交

斑点杂交结果经图像分析表明低速组下丘脑 ET_1-mRNA表达高于对照组($P < 0.01$);高速组下丘脑、海马区明显高于其它两组(分别 $P < 0.01$, $P < 0.05$)(表4)。

表 1 三组动物各时相 CSF-ET_1变化(单位: pg/ml)($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Alterations of CSF-ET_1 at each phase among three groups (pg/ml) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Pretrauma	Post-trauma				
			10 min	1 h	2 h	6 h	8 h
Control	4	99.432± 10.470	98.558± 11.050	100.228± 11.075	98.335± 10.834	106.077± 11.304	117.732± 12.564
Low speed	8	101.498± 7.156	86.897± 6.731	93.181± 7.164	115.097± 9.087	150.678± 11.920★★	176.239± 13.572▲▲
High speed	8	98.251± 7.567	76.425± 6.277	123.979± 10.068	187.330± 14.879★★▲▲■■	259.135± 19.617★★▲▲■■	282.546± 21.707★★▲▲■■

★★: $P < 0.01$ *vs* pretrauma; ▲▲: $P < 0.01$ *vs* control; ■■: $P < 0.01$ *vs* low speed

表 2 三组动物各时相血浆 ET_1 变化(单位: pg/ml)($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Alterations of plasma ET_1 at each phase among three groups (pg/ml) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Pretrauma	Post-trauma				
			10 min	1 h	2 h	6 h	8 h
Control	4	80.792± 8.811	83.433± 8.464	79.957± 8.999	82.231± 9.355	86.041± 9.542	89.847± 9.946
Low speed	8	79.344± 6.196	86.537± 6.697	94.460± 7.234	109.688± 8.412★	145.086± 11.542★★▲▲	151.566± 11.958★★▲▲
High speed	8	79.735± 6.122	93.919± 7.405	111.846± 8.744★	161.375± 12.494★★▲▲■■	223.173± 16.840★★▲▲■■	248.463± 18.404★★▲▲■■

★: $P < 0.05$, ★★: $P < 0.01$ *vs* pretrauma; ▲▲: $P < 0.01$ *vs* control; ■■: $P < 0.01$ *vs* low speed

表 3 三组动物各脑组织 ET_1 含量(单位: pg/mg蛋白)($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Contents of ET_1 in brain tissues among three groups (pg/mg protein) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Hypothalamus	Hippocampus	Grey matter	White matter
Control	4	19.539± 2.239★★	5.444± 0.083	8.75± 1.034	6.736± 0.950
Low speed	8	31.997± 2.231▲▲	7.575± 0.670	9.83± 0.836	7.944± 0.693
High speed	8	53.28± 3.840▲▲■■	13.477± 1.151▲▲■	12.799± 0.948	9.997± 0.948

★★: $P < 0.01$ *vs* other brain tissues; ▲: $P < 0.01$ *vs* control; ■■: $P < 0.01$ *vs* low speed

表 4 三组动物各脑组织 ET_1-mRNA斑点杂交信号积分光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Integral optical density of ET_1-mRNA dot blot hybridization signal among three groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Hypothalamus	Hippocampus	Grey matter	White matter
Control	4	2.898± 0.8399★	0.249± 0.0681	0.1669± 0.0471	0.1248± 0.0334
Low speed	6	5.1532± 0.9593▲	0.6679± 0.1202	0.3780± 0.0721	0.2204± 0.0421
High speed	6	8.135± 0.6107▲▲■■	2.6548± 0.5204▲■	0.665± 0.1221	0.347± 0.0649

★: $P < 0.05$ *vs* other brain tissues; ■: $P < 0.05$, ■■: $P < 0.01$ *vs* low speed; ▲: $P < 0.05$, ▲▲: $P < 0.01$ *vs* control

3 讨论

ET_1 是迄今所知的作用最强的长效缩血管物质[3]。ET_1 及其受体广泛分布于 CNS神经元、神经胶质及血管内皮细胞中,CNS具有自身合成、释放 ET_1 的能力[4]。作为一种重要的内源性致伤因子,ET_1 在CNS损害发生发展中起着重要作用[5]。

本实验采用 1.03 g钢珠标准致伤模型,实验效应较稳定;选用高、低两种致伤速度,产生两种不同强度的应激模型。实验结果显示正常犬 CSF-ET_1明显高于血浆,与文献[6]报道相符,但与文献[7]报道结果有别,我们强调可能系 CNS具有自身合成、释放 ET_1 能力之故。伤后 CSF-ET_1 过高可能对脑循环产生一定影响,导致 CNS血管舒缩功能障碍,引起内环境紊乱;血浆 ET_1 同步增高,提示伤后体内亦存在一定程度的血

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

管舒缩功能调节障碍,显示 ET_1 在伤后并发症发生发展中可能有重要意义[8]。

比较 CSF 血浆 ET_1 变化提示二者来源可能不完全相同。一方面 CNS有自身合成、释放 ET_1 能力;另一方面由相关分析揭示,CSF-ET_1 与受损明显的下丘脑、海马区 ET_1 含量的相关系数明显大于其它脑区及血浆;提示其可能主要来自受损神经组织之故;而血浆 ET_1 则不然。因此,CSF-ET_1 测定是一项能较早期、较敏感反映应激状态 CNS血管舒缩功能障碍的辅助诊断指标。

伤后下丘脑、海马区 ET_1 明显增高,揭示此二脑区可能为大脑应激易损区;斑点杂交结果进一步显示易损区脑组织 ET_1-mRNA启动调控活跃,且随所施应激强度不同,基因表达水平亦相应不同,提示所致 CNS应变效应不同。

本实验结果提示:在远离大脑局部肢体致伤、非颅脑直接损伤特定条件下,CNS确有不同范围、不同程度的应激受损,不同的应激强度对 CNS产生不同的影响,导致不同的应变效应;通过对双后肢投射物致脑组织、血浆中 ET_1 释放表达的研究,进一步显示了 CNS应变内环境紊乱的某些内在联系和病理生理基础,是 CNS应激受损的一个重要致伤物质基础。因此,我们强调,一旦严重致伤,无论大脑本身有无直接受损,务必注意 CNS在全身应激反应基础上有其自身特殊规律,值得重视。

(本实验得到附属大坪医院野战外科研究所第六研究室刘荫秋教授及全体同志大力帮助,特此致谢!)

参考文献

1 Suneson A, Hansson HA, Seeman T. Pressure wave injuries to the nervous system caused by high-energy missile extremity impact: part Ⅱ. Distant effects on the central nervous system—— a light and electron microscopic study on pigs. J Trauma, 1990; 30(3): 295

2 陈曼娥,许民辉,谢仁厚.非颅脑创伤早期脑肽与中枢神经系统超微结构的变化.中华实验外科杂志, 1991; 8(增刊): 29

3 Haynes WG, Webb DJ. Endothelin: a long-acting local constrictor hormone. Br J Hosp Med, 1992; 47(5): 340

4 Bacic F, Uematsu S, McCarron RM *et al*. Secretion of immunoreactive endothelium of human brain. Neurochem Res, 1992; 17(7): 699

5 王庆松,陈曼娥.中枢神经系统内皮素与缺血性脑损害.脑与神经疾病杂志, 1994; 2(3): 185

6 Mosqueda-Garcia R, Imagami T, Appalsamy M *et al*. Endothelin as a neuropeptide cardiovascular effects in the brain stem of neurotensive rats. Circ Res, 1993; 72(1): 20

7 Yamaji T, Johshita H, Ishibashi M *et al*. Endothelin family in human plasma and cerebrospinal fluid. J Clin Endocrinol Metab, 1990; 71(6): 1611

8 李开龙,刘荫秋,赖西南等.高速投射物所致血液扰动对培养血管内皮细胞的影响.解放军医学杂志, 1995; 20(3): 203

(收稿: 1995-12-07;修回: 1996-06-14)

(编辑　冯崇英)

Study of endothelin-1 release and expression in brain tissue and plasma after projectile wounding of the hind limbs in dogs

Wang Qingsong, Chen Man′e, Ju Yafei (Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract The pathophysiological basis of the disturbance of the internal environment of the central nervous system after noncerebral injury was observed on the stress model of dogs after the animals were inflicted with different velocity steel bullet injury of the 2 hind limbs by quantitative analysis of the expression of neurohumoral endothelin-1 (ET_1) in brain tissue and plasma. It was found that the ET_1 level in the homogenate of brain tissue and plasma was significantly increased especially in the high velocity group in which the expression of ET_1 in the hypothalamus and hippocampal formation was significantly increased. The findings suggest that under the condition of noncerebral injury, the central nervous system can be damaged indirectly in different severity and regions and different intensity of the traumatic impact can result in different intensity of stress reaction and affect the central nervous system in diverse levels. It is believed that the central nervous system possesses its own patterns of reaction under the stress reaction of the whole body.

Key words projectile wounding; brain; endothelin 1; mRNA; dot blot hybridization

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