DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.001

家兔烧伤早期内脏血管内皮细胞损伤的变化*

论著

罗向东 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

提 要 血管是烧伤早期受损最明显的器官之一,研究血管内皮细胞损伤对了解多器官功能衰竭(MOF)形成的机理,提高大面积烧伤的救治率都将具有指导意义。选本地雄性家兔26只,分正常、6 h、12 h、24 h、48 h五组,制成30%总体表面积(TBSA)Ⅱ度烧伤模型。观察了血浆胶体渗透压、循环内皮细胞(CEC)、血清血管紧张素转换酶(ACE)活性、血浆髓过氧化物酶(MPO)活性,以及心、肾、肠、肝、肺中ACE和MPO活性,常规病理、扫描电镜和镧示踪透射电镜观察了上述脏器中血管内皮细胞(VEC)的形态学改变。结果显示血浆胶体渗透压在伤后6 h就有显著下降,并持续到48 h。CEC含量在6 h明显升高,以后逐渐递增。血清ACE活性先升高后降低。血浆MPO活性也在6h先有一高峰,以后虽稍下降但仍明显高于伤前。脏器中MPO活性与VEC损伤有一定关系。这些充分说明VEC是烧伤早期损害的靶细胞。烧伤对VEC的损伤发生早、持续时间长、损伤范围广。并且中性粒细胞(PMN)在烧伤早期的器官损害中有着重要作用。

关键词 灼伤;血管内皮细胞;血管紧张素转换酶;髓过氧化物酶;循环内皮细胞

中图法分类号 R644

血管是严重烧伤早期受累最明显的器官之一。无论是烧伤后广泛的血管通透性增加,还是凝血、抗凝血功能紊乱和血管张力失调,目前均认为与血管损伤,特别是血管内皮细胞损伤有密切关系[1]。烧伤后血管内皮细胞(VEC)损伤是导致微循环功能障碍,最终产生多器官功能衰竭(MOF)的基础。我们认为研究烧伤后血管内皮细胞损伤机制,是降低严重烧伤并发症,提高大面积烧伤救治率的关键之一。

已有学者注意到烧伤对VEC的损伤作用,但对烧伤后VEC损伤的规律,以及各脏器VEC损伤的特点,缺乏认识。为此,本研究期于对此进行探讨,为防治烧伤后VEC损伤提供实验依据。

根据体液激活物刺激细胞活化,产生连锁效应诱导组织损伤,最后形成MOF的理论,中性粒细胞(PMN)与VEC在介导组织损伤中起重要作用。因此,笔者也对烧伤后PMN的激活和在脏器中的分布进行了研究。

1 材料与方法

1.1 家兔烧伤模型制作

选用本地雄性大白兔25只,体重2.5±0.5kg。随机分两组,正常对照组($n=5$)和烧伤组($n=20$),设4个时相点(6,12,24,48 h)每时相点5只。。烧伤组脱背毛,用1%凝固汽油烧伤25 s,制成30%Ⅱ度烧伤模型。伤后不限动物饮水和进食。伤后48 h,动物死亡率7.4%。

1.2 观察指标

1.2.1 血浆胶体渗透压 抽血2 ml,肝素抗凝,离心取血浆0.3 ml,在Weil Oncometer System 186上测定,单位:Pa。

1.2.2 循环内皮细胞(Circulating Endothelial Cell,CEC)抽血4.5 ml,用3.8%枸橼酸钠0.5 ml抗凝。由于CEC比重轻于其它血细胞,利用不同离心速度分离出CEC。详见参考文献[2],单位:CEC/0.9 μl。

1.2.3 血清血管紧张素转换酶(Angiotensin Coverting Enzyme,ACE)活性测定 干燥管抽血2 ml,取血清-20℃保存。利用ACE使马尿酸酰甘氨酰甘氨酸水解成马尿酸和甘氨酰酸的原理测定ACE活性,(详见ACE试剂盒说明书,海军总院提供)单位:$nmol \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$。

1.2.4 组织ACE测定 活杀动物后取心、肾、肠、肝、肺各0.1 g,加盐水2 ml匀浆,超声破碎细胞,40000×g离心15 min,取上清备用。测定方法同上,单位:$mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$。

1.2.5 血浆髓过氧化酶(Myeloperoxidase,MPO)测定 抽血2 ml,肝素抗凝,离心取血浆0.1 ml,加反应液(磷酸邻联回香胺16.7 mg,50 mmol/L PB pH6.0 10 ml,加水至100 ml)2.9 ml,在460 nm波长记录第30秒和第90秒光密度差值,按MPO=ΔA460/0.113/0.29计算MPO活性[3]。单位:10 U/L。

1.2.6 组织MPO测定 活杀动物立即取心、肾、肠、肝、肺各0.1 g,加0.5%溴化十六烷基三甲胺(HTAB)2 ml,制成匀浆,超声粉碎细胞,40000×g离心,取上清备用。以上步骤在0~4℃完成。测定方法同上。

1.2.7 光镜观察 在12 h、24 h两时相点取动物心、肾、肠、肝、肺各一块,常规固定、包埋、切片、HE染色后观察。

1.2.8 扫描电镜观察 在12 h、24 h两时相点取大血管(主动脉)和心、肾、肠、肝、肺各一块,3%戊二醛固定,液氮冷冻,断裂组织,镀膜观察断裂面。

1.2.9 透射电镜观察 标本用含1%硝酸镧的5%戊二醛固定,经锇酸后固定,常规包埋,超薄切片,铅复染后用Philips

* 国家自然科学基金资助项目,No.39290700-03

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

CM－10电镜观察。

1.3 数据处理

所用数据用 Master Library 58C/59 专用统计微机处理。

2 结果

2.1 烧伤家兔血浆胶体渗透压的变化

血浆胶体渗透压在伤后 6 h 下降最明显，以后稍有恢复，但仍明显低于伤前(见表 1)。

表 1 烧伤后的血浆胶体渗透压的变化

Tab 1 Changes of blood colloid osmotic pressure after burns ($\bar{x}\pm s$)

Control	Postburn hours			
	6	12	24	48
21.97±3.2	11.98±3.0*	13.35±2.0*	12.15±2.3*	15.9±2.1*

* $P<0.01$ *vs* control

2.2 烧伤后 CEC 的变化(见图1)

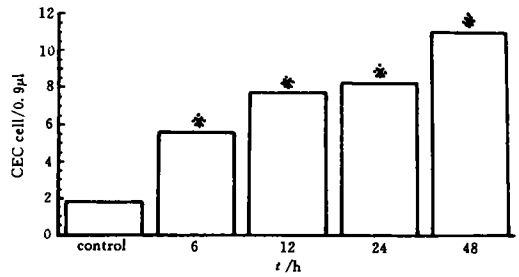


图1 烧伤后循环内皮细胞增多

Fig 1 The increase of circulating endothelial cells after burns

图中显示烧伤后 CEC 数量在6 h 就有非常显著的增加，并随时相点延长不断增多。

2.3 烧伤后血清中 ACE 活性的变化(见表2)

表2 烧伤后血浆和脏器中 ACE 活性的变化

Tab 2 Changes of ACE activity in plasma & organs after burns($\bar{x}\pm s$)

	Control	Postburn hours			
		6	12	24	48
Plasma	20.94±5.4	26.04±4.9*	22.32±3.8	18.01±4.1	14.27±3.7*
Heart	22.54±6.2	4.13±1.8**	33.82±47.3	17.01±6.6	15.98±6.7
Kidney	27.26±4.7	6.03±4.7**	63.89±30.4*	92.98±113.9	40.40±9.4*
Intestine	26.63±2.7	5.93±5.1**	33.92±8.3	45.53±51.1	14.85±7.3**
Liver	36.17±12.9	4.19±2.5**	10.39±4.3**	53.35±33.7	16.16±9.7**
Lung	25.94±8.4	24.5±18.4	47.73±8.8**	75.07±46.5*	85.73±34.1**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* control

从表中可以看到血清中 ACE 活性在伤后6 h 先有明显升高，然后在48 h 又有明显的降低。

2.4 烧伤后各脏器中 ACE 活性的变化(见表2)

从表中可以看出在伤后6 h，除肺脏外其余器官的 ACE 活性均有显著的降低。而在48 h，肾、肺中 ACE 活性明显高于正常，肠、肝中则明显低于正常。

2.5 血浆中 MPO 活性的变化(见表3)

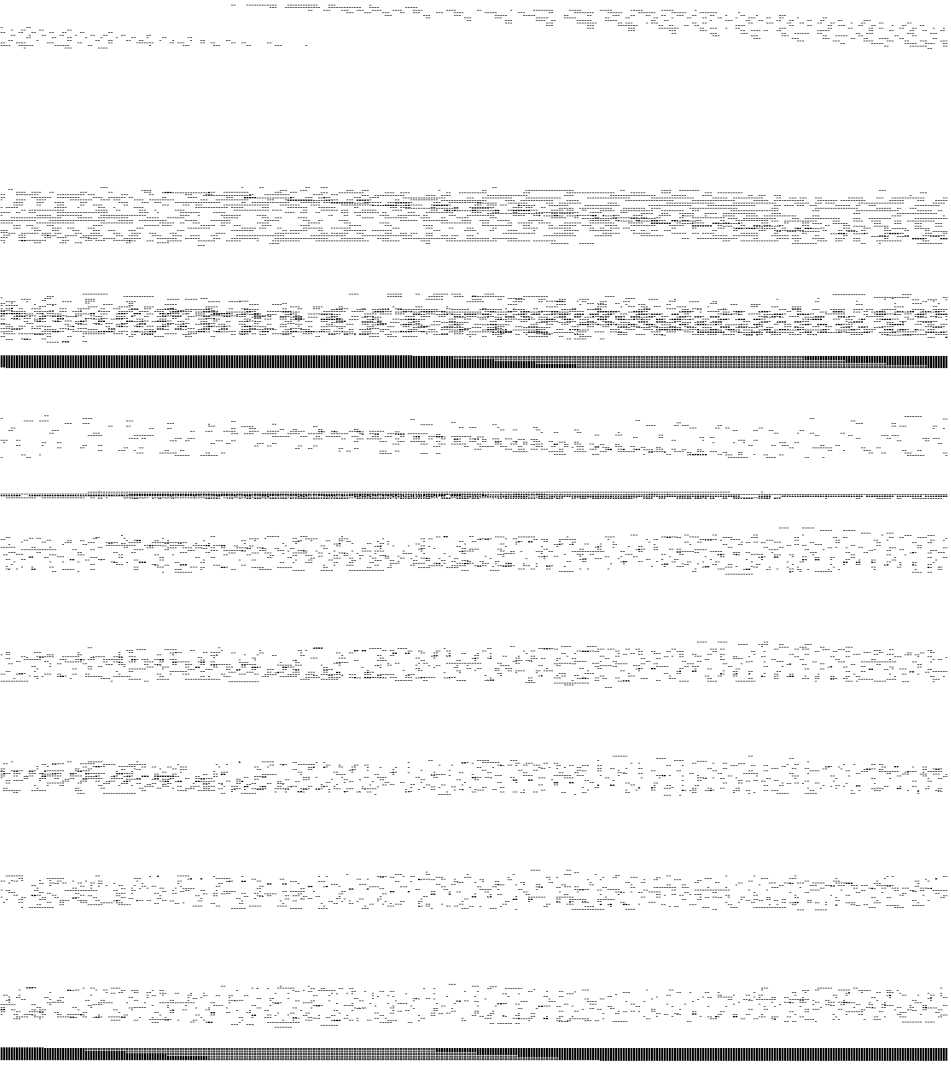
表3 烧伤后血浆和脏器中 MPO 活性的变化

Tab 3 Changes of MPO activity in plasma & organs after burns($\bar{x}\pm s$)

	Control	Postburn hours			
		6	12	24	48
Plasma	0.137±0.03	0.305±0.13**	0.231±0.06**	0.289±0.11**	0.275±0.11*
Heart	0.189±0.15	0.525±0.40	0.383±0.22	0.576±0.49	0.266±0.17
Kidney	0.250±0.23	0.296±0.10	0.237±0.14	0.755±0.33*	0.317±0.24
Intestine	0.109±0.06	0.215±0.09	0.227±0.10	0.568±0.18**	0.101±0.09
Liver	0.228±0.19	2.036±3.01	0.236±0.14	0.265±0.24	0.308±0.16
Lung	3.145±0.79	10.29±4.03**	9.957±7.07	5.840±1.85**	7.214±1.19**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* control

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



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

从表中可以看出，肠道 VEC 损伤的总评分在1.00以下，而肺、心、肾的 VEC 损伤明显很接近2或达到2以上。

3 讨论

近年来，VEC 生物学研究取得了较多新进展，其中最引人注目的就是 VEC 所具有的免疫功能、代谢功能、血管张力调节功能等[5]。由于 VEC 在体内分布广泛，并直接与血液有大面积接触，因此在许多全身性疾病（动脉粥样硬化、糖尿病、风湿、癌转移、创伤后与 MOF 等）的发生发展中起了一定作用[6,7]。引起了医学界的关注。

目前对严重烧伤后 VEC 损伤研究的报道不多，本文研究了烧伤后体内多个脏器的 VEC 损伤及中性粒细胞在伤后各器官中的潴留情况。

3.1 VEC 是烧伤早期易受损害的组织细胞之一

从本实验结果中可以看出，严重大面积烧伤后，体内 VEC 改变发生早，如伤后6 h，血浆胶体渗透压下降非常明显，反映了血管通透性在伤后的广泛增加，大量血浆蛋白丢失。大多数器官的 VEC 超微结构均在6 h 有了明显的变化，其中最有代表性的是 VEC 表面伸出长短不一的胞质突（见图2,3）。这种现象与粒细胞被激活后的改变相似。

伤后6 h，血中 ACE 活性明显增加（$P<0.05$），而大多数器官中（除肺以外）ACE 活性明显下降（$P<0.01$），提示有 VEC 细胞膜的早期损伤和 ACE 脱落迹象。Gross[8]也观察到烧伤后肺、肾 VEC 表面Ⅷ因子相关抗原大量落进入血循环的类似现象。

3.2 烧伤后 VEC 损伤的特点

大面积烧伤对 VEC 损伤的最大特点是它损伤涉及范围广和损伤呈进行性发展。如本实验结果所见，CEC 持续递增、各脏器 ACE 变化和 VEC 电镜观察，均说明 VEC 损伤的广泛（多器官）和进行性（逐渐加重）。这一特点本身，提示了 VEC 损伤在烧伤早期的病理和病理生理改变中应具有的重要意义，以及 VEC 损伤机理的错综复杂。

烧伤对 VEC 损伤的另一特点是 VEC 有激活和损伤并存的现象。而早期多表现为伪足增生、胞浆细胞器增多（图2,3），细胞体增厚等激活和增生性改变。

3.3 烧伤后中性粒细胞（PMN）与 VEC 损伤

MPO 是 PMN 嗜天青颗粒中含量较高的酶，它在血中的浓度标志着 PMN 颗粒释放情况。又由于每一个 PMN 中所含 MPO 的相对恒定，所以组织中 MPO 活性基本上反映了组织中 PMN 的数量[3]。

烧伤后血浆 MPO 活性在6 h 最高，以后虽有下降但仍明显高于伤前水平，提示伤后6 h 以内 PMN 开始大量激活释放颗粒，烧伤后的某些因素对 PMN 有持续刺激作用。

PMN 在脏器中的分布特点首先是其非均衡性。正常情况下 PMN 在各脏器中分布就不平衡，肺明显多于其它脏器。烧伤后分布的不平衡现象更加明显。

PMN 在烧伤后脏器分布的另一特点是时相性。从表3中可以看出，伤后6 h 首先在肺升高（$P<0.01$），而后在24 h，肾、肠中 MPO 也升高（$P<0.05$），表明烧伤后 PMN 在脏器聚集有明显的时间差异。提示烧伤后各脏器的特殊性对 PMN 的聚集有明显影响。如：各脏器内皮细胞激活并表达粘附分子配体的时间，血流速度、血管结构特点等多因素影响，要弄清楚 PMN 聚集的机制还需进一步研究。

参考文献

1 Saito H. Prothrombotic properties of endothelial cell and their abnormalities. Patho Clin Med,1991;9(1):80

2 杨映波，王正国，刘怀琼. 血循环中内皮细胞数量变化意义的初探. 第三军医大学学报,1990;12(3):209

3 罗武生，郭兆贵. 用髓过氧化酶法定量测定心肌组织中的中性白细胞. 中国药理学通报,1990;6(4):264

4 Marin ML, Gorden RE, Hardy MA et al. Immunondulation of vascular endothelium. 1. Ultrastructural changes following ultraviolet irradiation of peripheral veins. J Surg Res, 1990;48(2):134

5 渡辺照男，徳永蔵，下釜達朗等. 血管内皮細胞の構造と機能. 病理と臨床,1991;9(1):12

6 Clowell JA. Pathophysiology of vascular disease in diabetes: effects of gliclazide. Am J Med,1991;90(6A):689

7 DeFeudis FV. Coronary atherosclerosis: current therapeutic approaches and future trends. Life Sci,1991;49(10):689

8 Gross MA, Viders DE, Brown JM et al. Local skin burn causes systemic (lung and kidney) endothelial cell injury reflected by increased circulating and decreased tissue factor Ⅷ-related antigen. Surgery,1989;106(2):310

（收稿：1994-12-01；修回：1995-07-22）

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

Changes of visceral vascualr endothelia cells in early stage after burn injury in rabbits

Luo Xiangdong, Yang Zongcheng, Li Ao (Burn Research Institute, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract In order to investigate the patterns of the damages of vascular endothelial cells (VECs), bood colloid osmotic pressure (BCOP), circulating endothelial cells (CECs), angiotensin converting enzyme (ACE) and myeloperoxidase (MPO) were measured in 25 rabbits after they were randomized into control, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h groups and inflicted with 30% TBSA full thickness burns. Meanwhile, the pathological changes of the VECs of the heart, kidneys, intestines, liver and lungs were observed with optical and electron microscopy and the distribution of ACE and MPO in the organs determined. It was found that BCOP was markedly decreased from 6 h to increase afterwards. The activity of ACE was enhanced in 6 h and then decreased tradually in the serum but it was significantly decreased in 6 h and then elevated after that time in the organs except the lungs. The activity of MPO was higher in the burned than in the controll in plasma and was increased to the peak in 6 h; it was increased in 6 h in the lungs; and it was increased in 24 h in the kidneys and intestines. Pathologically, it was found that the VECs in many organs underwent cytoplasmic projection, as villous process and organelle enrichment in the early stage and then they became constricted and rounded. The degree of VEC damages was different among the organs. The separation of pullmonary VECs from the basement membrane occurred in the 6th hour and the damage of VECs was the most severe in the lungs among all the organs studied in the early stage postburn.

All these findings suggest that VECs are damaged extensivelly in the early stage after burn injury and contineus to be damaged extensively in the early play an important role in the damages of many organs in the early stage after burns.

Key words burns; vascular endothelial cell; angiotensin converting enzyme; myeloperoxidase

****

mdr1基因表达与肺癌多重抗药性关系的研究

论文摘要

Expression of mdr 1 gene and multidrug resistance of lung cancer

李 羲 郭先健 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,630037

多重抗药性(MDR)是肺癌化疗失败的主要原因之一。通过逐渐增加药物浓度的方法,以顺铂(CDDP)选择培养人肺腺癌细胞系 LC-3 8个月,建立了 MDR 细胞系 LC-3/CDDP。该细胞系对 CDDP 抗药性为亲代细胞的7.96倍,对 ADM、VCR、5-FU、VP-16具有交叉抗药性。LC-3/CDDP 细胞一般形态、倍增时间与亲代细胞无显著差异,但超微结构显示细胞具有异质性。对细胞内药物浓度测定发现,LC-3/CDDP 细胞内 ADM 聚集量较亲代细胞明显减少。细胞周期测定发现 S 期、G_2+M 比例升高,DNA 指数增加,DNA 合成速率明显上升,提示细胞对 DNA 损伤的修复功能增强。LC-3/CDDP 细胞的另一特征是染色体延长、双微体增多。二性霉素 B、芳香维甲酸乙酯使 LC-3/CDDP 细胞内 ADM 聚集量显著增加,相对抗药度(RR)下降,两者协同应用基本上可使 LC-3/CDDP 细胞的抗药性逆转。

斑点杂交结果显示,LC-3/CDDP 细胞 mdr1 mRNA 含量明显高于 LC-3细胞。原位杂交结果表明,LC-3细胞内未出现阳性杂交信号,而 LC-3/CDDP 细胞内显示紫蓝色颗粒状阳性杂交信号,主要分布于细胞浆内,部分阳性颗粒位于胞核内。抗 P-gp McAb 免疫细胞化学染色结果表明,LC-3细胞染色阴性,而经 CDDP 选择培养后 P-gp 表达由阴性转为阳性,致完全抗药表型产生时表达最强。这些结果表明,mdr1基因表达与 LC-3/CDDP 细胞抗药性产生密切相关。

对正常组织进行免疫细胞化学染色显示,正常肾高度表达 P-gp,脑、肺、肝、结肠、脾中度表达,胰腺弱表达,P-gp 在正常组织中可能具有分泌与防御功能。斑点杂交结果表明,肺腺癌组 mdr1 mRNA 含量明显高于磷癌组,腺癌组 P-gp 表达阳性率亦明显高于磷癌组。这些结果表明,mdr1基因表达可能为肺癌产生内在抗药性的重要原因。

关键词 肺肿瘤;多重抗药性;多重抗药基因;P-糖蛋白;顺铂;逆转;化学治疗

中图法分类号 R734.2

(收稿:1995-07-10;修回:1995-07-27)

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