DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.022

表达和细胞定位,应用ET受体拮抗剂和NO供体于烧伤大鼠观察其防治早期损害的效果,以验证ET/一氧化氮(NO)在烧伤早期脏器损害发病中的作用,结合体外实验,观察内皮素对多种组织细胞的影响,希望通过此研究可以阐明内皮素及受体、NO在烧伤早期损害中的作用及机制。主要结果如下:

(1)大鼠30%Ⅲ度体表烧伤不单血浆内皮素含量增加,而且心、肝、肺、肾脏ET含量及ET-1基因表达均明显增多、增强;表达阳性细胞种类增多,主要有血管内皮细胞、肺脏和支气管上皮细胞、肝细胞、枯否氏细胞、粒细胞、心肌细胞、肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞。烧伤后内皮素1基因表达及释放量的改变在各器官又有所差异,按其较伤前增幅顺序为肾>肝>肺>心。

(2)严重烧伤早期,主要脏器内皮素受体A、B(ETA、ETB)基因表达明显增强,烧伤后ETAmRNA除主要分布于血管平滑肌细胞,ETB受体主要分布在血管内皮细胞外,各脏器多种组织细胞由伤前的不表达或弱表达而成为ETA或ETBmRNA表达阳性细胞,烧伤后ET-1、ETA、ETB的基因表达可出现在同一种细胞上,说明内皮素是以自分泌/旁分泌形式发挥生物学效应。

(3)大鼠烧伤后主要脏器cAMP含量下降、cGMP增加,$[Ca^{2+}]i$明显增加,而且肺肝组织磷酸肌醇(IP_1、IP_2、IP_3)相对含量增加,这些改变与烧伤后ET及其受体、NO的变化有明显的统计相关性。

(4)正常内皮素与NO比值保持稳定,伤后NO也明显增高,但其幅度低于内皮素,因而,ET/NO比值增加,使血管收缩。

(5)内皮素及其受体、NO的改变与烧伤早期损害多种指标存在明显相关性;使用ET受体拮抗剂和NO供体可有效纠正烧伤后肝肾血流下降、改善PaO_2、降低酸中毒,提高组织超氧化物歧化酶(SOD)活性、减少丙二醛(MDA)生成,一定程度逆转主要脏器ATP、ADP、能荷水平(EC)及$Na^+-K^+-ATPase$活性下降和AMP含量增加,减少循环内皮细胞、降低脏器水肿,光、电镜检查也证实可减轻心、肝、肺、肾损害。两种受体亚型同时阻滞较单独阻滞ETA受体效果好,配合使用NO供体较单独拮抗ET受体效果好。

(6)体外实验证实,内皮素可直接损伤心、肝、肺、肾组织细胞及血管内皮细胞,表现为内皮素作用后培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性增加,细胞活力下降,细胞MDA含量增加而SOD活性下降,内皮细胞分泌NO增加,细胞内ATP、ADP及EC下降,AMP增加;内皮单层对Hanks液或白蛋白灌注液的滤过流量、滤过系数明显增加,而对蛋白渗透压反射系数明显减少,且存在剂量依赖性。

综上所述,大鼠烧伤早期ET及其受体、NO呈规律性变化,并且这种异常改变参与了烧伤早期脏器损害,其主要途径是血管持续收缩,组织缺血缺氧,从而导致细胞能量代谢紊乱及脂质过氧化损害,而这些作用的实现与受体后信息传导途径的异常改变有关,内皮素在靶细胞局部浓集所造成的直接损伤作用也是不容忽视的因素。

关键词 烧伤;内皮素;内皮素受体;一氧化氮;血管内皮;斑点杂交;原位杂交

中图法分类号 R644

(收稿:1995-12-02;修回:1995-12-13)

脉冲电磁场刺激对神经、小血管和肌腱的修复作用及其机理的研究*

Effect and mechanism of pulsed electromagnetic fields stimulation on the repairment of peripheral nerve, microvessels and tendon

王爱民 (第三军医大学附属大坪医院骨科)重庆,630042

李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科)重庆,630038

电刺激方法中非侵入式脉冲电磁场(PEMF)的优点越来越受到重视。国外虽有PEMF刺激促进神经、肌腱修复的报道,但仍有一些重要领域尚未涉及,诸如PEMF刺激对吻合后小动、静脉愈合有无帮助,PEMF刺激对多种组织中胶原蛋白和蛋白质合成是否有益,PEMF刺激效应与碱性成纤维细胞生长因子(b FGF)的生物效应间有否内在联系等。国内迄今也未见此方面报道。深入研究这些问题将有重要的理论和实践意义。

以328只Wistar大白鼠及34只新西兰大白兔为材料,在建立坐骨神经自体移植,小动、静脉端端吻合及肌腱内、外源性愈合模型的基础上,从病理、免疫组化、生化、生物力学及分子生物学等方面,探讨了刺激波形为锯齿状,频率1.67Hz,中心磁场强度为0.4 mT,每日6 h,共7~14 d的PEMF刺激,对周围神经、小血管和肌腱修复的促进作用及其机理,并观察治疗部分临床病人,主要结果如下:(1)PEMF刺激后能够提高脊髓神经元的活力,有利于轴突的再生;能够加速损伤神经远侧段的Wallerian变性,刺激雪旺氏细胞较早增殖、成熟;可较早、较快、较多地促进周围神经损伤后再生;减缓失神经支配肌肉的萎缩和加快其功能的恢复;当电磁力线呈水平状,即与鼠坐骨神经平行时,更有利于神经的再生;(2)PEMF刺激吻合后股动、静脉,使其远期通畅率非常显著地高于对照组($P<0.01$);组织学检查发现,PEMF刺激组血管内膜肿胀、炎症程度及吻合口纤维蛋白沉积均少于对照组,新生内皮细胞较早、

* 全军"八五"攻关项目

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

较多于对照组，排列也较对照组整齐；临床初步治疗17例病人(83个吻合口)均获成功。表明PEMF显著地提高了血管吻合的远期通畅率；(3) PEMF刺激后2、4、6周，骸腱断裂强度非常显著地高于对照侧($P<0.01$)；组织学观察到治疗侧较对照侧粘连轻、瘢痕少、成纤维细胞和胶原原纤维、胶原纤维均提前出现，数量增多，成熟快，排列整齐，方向与正常纤维方向接近；临床初步应用于20例屈、伸肌腱损伤修复手术后的病人，其疗效也优于对照组。说明PEMF刺激能够明显提高肌腱的修复能力，增加成纤维细胞增殖的能力，并减少了传统肌腱愈合的中间塑形，重新排列等复杂环节，使成纤维细胞、胶原等成分较早期就直接按肌腱的纵轴方向排列；(4) 组织创伤后，只有在保持良好血液循环的状态下，组织愈合中不可缺少的氨基酸含量才能明显增加；PEMF刺激后4周，鼠移植的坐骨神经、吻合后股动、静脉和肌腱中多种氨基酸及胶原蛋白合成增加；PEMF主要通过促进肌腱内源性愈合而发挥作用，对其它组织很可能也是激活细胞内在活力发挥其促进组织愈合的生物学效应；PEMF促进组织的愈合能力与不同组织的内在再生能力新陈代谢快慢的关系密切；(5) 正常脊髓组织中含少量bFGF mRNA，主要位于脊髓前角神经元中，其余外周组织(坐骨神经、股动、静和肌腱组织)中bFGF mRNA含量未能测出；组织损伤后一周，移植的神经及其相应的脊髓组织中，吻合后股动、静脉，内、外源性愈合模型之肌腱组织中bFGF mRNA含量明显增高；PEMF刺激可使鼠术后4周中上述各组织中bFGF mRNA仍维持较高的水平，而对照组已明显下降($P<0.001$)；PEMF刺激可能兴奋CNS，促进bFGF合成增加，从而加速了多种中胚层和神经外胚层组织创伤的修复。

关键词 脉冲电磁场；周围神经；小血管；肌腱；创伤；氨基酸；碱性成纤维细胞生长因子；斑点杂交；分子原位杂交法

中图法分类号 R642；R68

(收稿：1995-12-01；修回：1995-12-12)

急性肺损伤早期一氧化氮的变化、意义及分子机制研究

Alterations of NO, its significance and molecular mechanisms at the early stage of acute lung injury

杨自力 王正国 朱佩芳 (第三军医大学野战外科研究所第四研究室) 重庆，630042

内源性一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种活性很强的自由基，具有广泛的生物学作用，既是细胞信使分子，又是细胞毒性分子。NO作用的多样性决定了其在肺损伤发病机理中的复杂性。因此，NO的自由基活性对肺损伤的影响越来越多的受到重视。为了进一步阐明NO在急性肺损伤中的作用、地位，本课题从以下三个方面进行研究：(1)探讨肺损伤早期内源性NO及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的变化、调控及作用；(2)研究急性肺损伤早期诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA转录调控机理、基因表达细胞定位以及肺内NADPH组化分布；(3)在排除了体内因素的情况下，研究NO对内皮细胞的损伤，包括：①NO在内毒素损伤内皮细胞中的作用；②不同浓度的一氧化氮供体SIN-1(3-morpholinosydnonine)对内皮细胞的直接损伤作用及SOD的保护作用。通过从生化、分子生物学、细胞培养等不同方面的研究，以期进一步揭示NO自由基与急性肺损伤的内在联系。

主要结果与结论如下：采用油酸肺损伤模型，研究急性肺损伤早期内源性NO的变化及意义。结果表明，肺损伤早期，内源性NO急剧上升，它的变化和iNOS的诱导密切相关；iNOS除了诱导NO的产生外，还能促使氧自由基的产生，因此，选择性抑制iNOS活性，对早期急性肺损伤有一定治疗作用；肺损伤过程中产生的NO自由基和氧自由基互相作用生成过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)从而介导NO自由基的更大毒性作用；过量生成的NO增加中性粒细胞的肺内扣压，从而加重组织损伤；正常情况下，iNOS基因是不表达的，急性肺损伤后，iNOS mRNA的转录是一个持续的过程；LNNA、地塞米松对iNOS基因表达的影响在于对iNOS mRNA转录的负向调节。

运用mRNA狭线杂交、原位杂交技术研究了急性肺损伤肺组织iNOS mRNA转录及LNNA、地塞米松对其的调控机理，并对iNOS基因表达进行了细胞定位。结果表明：正常情况下肺组织内无iNOS基因表达，伤后早期致炎因子启动iNOS mRNA转录。其基因表达的特点为突然启动、持续时间较长；伤后iNOS mRNA阳性细胞分别为肺泡巨噬细胞、粒细胞、支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、内皮细胞；LNNA、地塞米松抑制NO产生与其下调iNOS mRNA转录水平有关。

NADPH是反映cNOS的组化标志。结果表明，伤后早期结构型一氧化氮合酶(constitute nitric oxide synthase, cNOS)变化不明显，这和生化方法测得的cNOS活性变化一致。

探讨了LPS对内皮细胞的损伤机理及LNNA的保护作用；不同浓度SIN-1(NO供体)对内皮细胞的损伤及SOD的保护作用；并初步研究了NO与O_2^-在内皮细胞损伤中的关系。主要结果为：LPS损伤内皮细胞过程中，NO合成急剧增加，LNNA下调NO的产生，减轻LPS对内皮细胞的损伤；低浓度NO供体不损伤内皮细胞，中、高浓度NO供体可严重损伤内皮细胞，其机理可能是通过$ONOO^-$的形成；SOD对内皮细胞的保护作用要强于CAT；SOD清除O_2^-，使$ONOO^-$生成减少，从而减轻内皮细胞的损伤。

关键词 急性肺损伤；一氧化氮；一氧化氮合酶；地塞米松；自由基；内皮细胞；基因表达

中图法分类号 R563.8

(收稿：1995-12-01；修回：1995-12-12)

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