DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.029

大鼠严重烧伤后急性胃粘膜损害及早期肠道喂养对其防治的意义

Experimental studies on acute gastric mucosal lesions after severe burns and the significance of early enteral feeding for their prevention and cure

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

急性胃粘膜损害(AGML)是严重烧伤后最常见的内脏并发症之一,对处于危重状态的临床病员有着潜在的致命性威胁。危重状态下的胃粘膜酸化不仅与 AGML发生有关,而且还敏感地反映着腹部多内脏的缺血及氧合不良,提示 AGML与腹部多内脏缺血之间存在着某种特殊联系,后者在多脏器功能障碍(MOD)发生中具有重要意义。近年来的研究表明,早期肠道喂养(EEF)在增加肠道血流量、防治肠源性感染、降低创伤后高代谢等方面有着诸多综合的有益效应。早期肠道喂养能否有效地改善烧伤后腹部多内脏的缺血缺氧,在整体水平上发挥胃粘膜的保护作用,以至成为 MOD防治的重要手段,是一具有重要理论与实践意义的研究课题。本实验采用 Wistar大鼠 30% TBSAIII度烧伤模型,通过对腹部多内脏血流量、血浆应激激素与炎性介质水平、胃粘膜功能与肝肾功能、胃粘膜能量代谢、胃粘膜损伤指数等多项指标的检测,并借助于光镜、电子显微镜等手段,在整体与局部的结合上,动态观察了严重烧伤早期胃粘膜损害及其与腹部多内脏缺血的关系、早期肠道喂养对 AGML的防治作用及其对多内脏缺血的复苏效果。结果表明:① 严重烧伤后胃粘膜可出现显著的病理与病理生理变化,主要表现为胃粘膜屏障功能破坏、能量代谢紊乱和大量粘膜细胞的变性坏死。这种病变发生早、进展快、程度重,是烧伤早期内脏损害的高发病变。② 胃粘膜血流减少是烧伤早期胃粘膜损害的首要发病因素;不仅如此,严重烧伤后还存在着腹部多内脏的血液灌流障碍,即创伤后腹部多内脏缺血;这是烧伤早期多器官功能损害的重要病理生理基础。由烧伤诱发的急性胃粘膜损害既是创伤后 MOD的组成部分,也是腹部多内脏缺血的重要表现形式。③ 胃粘膜内 pH(胃 pHi)能敏感反映严重烧伤后腹部多内脏的血液灌流及其功能状况;胃 pHi测定对于了解严重烧伤早期是否存在腹部内脏缺血以及复苏中内脏灌流恢复的效果,是一简单、精确、实用的判定指标。④ 早期肠道喂养对烧伤早期急性胃粘膜损害具有显著的防治作用。它不仅可增加胃粘膜血流量、增强粘膜的抗损伤能力,而且还在烧伤治疗的全局上发挥着整体的有益效应。⑤ 早期肠道喂养具有良好的内脏复苏作用。烧伤后早期肠道喂养能有效增加内脏血流量、保护脏器功能、减少内脏源性炎性介质释放、减轻内脏组织水肿、降低全身性的应激与高代谢反应,提供良好的营养基质,维持机体内环境的稳定。⑥ 严重烧伤早期胃酸分泌出现显著抑制,这是胃粘膜功能障碍和机体防御功能受损的重要表现;实施早期肠道喂养,可明显改善烧伤后胃酸分泌功能,提示肠道喂养过程中出现的胃腔 pH升高及细菌定植与早期肠道喂养本身无关,也表明早期肠道喂养对于维持和加强伤后机体抵抗力,是一有效途径。

作者认为,现今常规的创伤复苏模式在腹部内脏区存在明显的复苏死角,这是严重烧、创伤后 MOD发生的主要原因之一;早期肠道喂养的临床重要性,既远远超出了单纯营养的范围,也不限于其对 AGML的防治作用;早期肠道喂养在严重烧伤后机体复苏及 MOD的防治上还有其意义独特的内涵。本研究提示,严重烧伤后在常规复苏的基础上,实施以早期肠道喂养为主要内容的内脏循环复苏,有可能对烧伤早期腹部多内脏缺血,以及常规复苏后存在的隐性休克产生显著的防治作用,从而阻断 MOD的发生和发展。从这一意义出发,烧伤后 EEF应该成为烧伤早期复苏计划中一个重要的不可缺少的组成部分。

关键词 灼伤;胃粘膜 损伤;胃酸;能量代谢;肠道喂养
中图法分类号 R644
(收稿: 1996-12-07;修回: 1997-01-10)
(编辑 王 红、沈锡庚)

人的细胞介素-3突变体的构建及其在大肠杆菌中表达的研究

Construction and expression of mutant of human interleukin-3 cDNA in E. coli

王 燕 朱锡华 (第三军医大学基础部免疫学教研室) 重庆, 630038

人白细胞介素-3是与造血有关的细胞因子中最重要的细胞因子。可直接诱导人骨髓和外周血干细胞的集落形成和增殖。IL-3几乎对所有干细胞亚类都具有刺激作用。与其它骨髓造血生长因子相比,人 IL-3在维持早期祖细胞集落的形成或

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

增殖更为有效。IL-3可通过高亲合力的结合位点对成熟骨髓效应细胞(巨噬细胞,嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞)发挥作用,可促进巨噬细胞,嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的活力,延长存活期并抑制其死亡。而且,rhIL-3还提高巨噬细胞和/或嗜酸性粒细胞的细胞毒、杀菌以及杀癌细胞的能力。IL-3除以上的生物学活性外,还能使造血系统对 EPO, GM-CSF更敏感。通过对 hIL-3结构与功能关系的深入研究,将会有助于进一步从分子水平阐明其多种生物学功能以及作用机理。同时,在深入理解 hIL-3结构与功能关系的基础上,研制高活性,低毒副作用的 hIL-3突变体,由于 hIL-3自身结构, IL-3很难以非融合型蛋白在大肠杆菌中高效表达。本室应用遗传工程技术构建了 pBV220 hIL-3表达质粒,但在大肠杆菌中未见表达。在此基础上,本研究用 PCR定点突变技术,将人 IL-3 N末端第 3位蛋氨酸(Met3)突变成缬氨酸(Val3), N末端第 116位赖氨酸(Lys116)突变成缬氨酸(Val116),以分析蛋白质在改造前后的活性变化,其后,在大肠杆菌表达系统中表达了 hIL-3突变体。用 hIL-3细胞依赖株检测活性,结果表明: 在大肠杆菌 TAP106中表达的 pSM53MV hIL-3突变体的活性明显高于在相同宿主菌中表达的 pSM53N hIL-3天然型。

将 Lys116突变为 Val116取代了野生型 Lys116后,经用 EMBL Seguens程序进行 IL-3突变体蛋白质二级结构分析,其 D螺旋的参数变化不大。实验中所采用的大引物 PCR定点突变方法,突变率可达 100%。PCR扩增产物,经 Sanger双脱氧法测序证实 NhIL-cDNA与野生型的 hIL-3 cDNA完全一致, MhIL-3 cDNA和 MVh IL-3 cDNA突变体与我们预期设计的结果一致,均无因 Taq DNA多聚酶的自然错配而发生非预期的突变,这说明当目的 DNA序列不是很长,同时严格优化 PCR反应的各种条件,是可以得到理想的点突变的结果。使我们可以在基因任何位置引入点突变,为基因的修饰,蛋白质工程的研究提供了简单、稳定的方法。

利用原核细胞表达真核基因因一系列的原因,要获得高效表达是比较困难的。因细菌 RNA聚合酶不能识别真核基因的启动子,真核基因转录的 mRNA缺乏 Shine Dalgarno(SD)序列,因而不能结合到核糖核蛋白体(Ribosome)上,不能启动翻译过程,表达的真核蛋白质在原核细胞中不稳定,容易被细胞蛋白酶破坏,另外由于原核细胞缺乏转录后加工体系。用于表达的真核基因,必须删除信号肽编码序列,而且是 mRNA的反转录产物即 cDNA,才能使表达产物为成熟蛋白形式。所构建的两个表达载体, pKK233-2 hIL-3经 IPTG诱导培养后 SDS-PAGE未见特异性表达带,而 pSM53 hIL-3经温度诱导培养后 SDS-PAGE在 Mr 15× 10^3 u(15 KD)处可见特异性表达带,诱导表达的条带经免疫印迹证实为 hIL-3蛋白分子。仅是 pSM53 hIL-3 SDS-DAGE在 Mr 15× 10^3 u(15 KD)处可见特异性表达带。这可能与 hIL-3cDNA ATG与载体 SD序列之间的距离有关, pKK233-2 hIL-3的 pKK233-2为载体,利用载体上带有起始密码子 NcoI 酶切位点将 hIL-3 cDNA与载体相连, ATG与 SD序列间距离为 8bp,而 pSM53 hIL-3同样以 NcoI 酶切位点上的 ATG为起始密码子,其 ATG距 SD序列为 10 bp,是将 pSM53以 EcoRI 酶切,填平后连接。从此结果表明,虽然转录水平是决定外源基因表达蛋白产率的重要因素,但仅将外源基因置于强启动子之下远不能轻易获得高效表达,启动子的选择, SD序列与起始密码子之间的距离是相当重要的。没有一定的固定模式。将天然型 pSM53 NhIL-3与突变型 pSM53 MhIL-3, pSM53 MV hIL-3在相同条件下培养诱导的包含体经变性,复性制备的粗纯化 hIL-3待测上清与 pSM53质粒, hIL-3标准品同时用 TF-1细胞株进行体外测活。突变型 pSM53 MV hIL-3活性比相同条件下表达的天然型 pSM53 N hIL-3和突变型 pSM53 MhIL-3提高了 3~4倍。

关键词 PCR定点突变; hIL-3; cDNA突变体;高效表达; PL启动子; hIL-3突变体

中图法分类号 R392.12

(收稿: 1996-11-29;修回: 1997-12-20)

(编辑 汪勤俭)

骨外固定治疗长骨缺损不连接的实验研究

An experimental study on the treatment of long tubular bone defect and nonunion with external fixation

杨 柳 李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科) 重庆, 630038

长骨干缺损不连接伴肢体短缩,一直是骨科临床治疗中最为棘手的难题之一。它常见于严重开放粉碎性骨折、骨折手术感染和先天性胫骨假关节等反复多次手术失败,以及骨髓炎大块死骨切除和长骨肿瘤段切除后等。传统的治疗方法,如游离植骨和带血管骨移植因受诸多病理条件的限制,疗效难以满意。本研究应用 X线照片、血管造影、墨汁灌注透明切片和图像分析、微血管铸型 SEM观察、放射微球法局部血流量测定,组织学光镜观察, BMD和 CTD测定、力学强度测试、TGFβ1 cDNA探针原位杂交等多种技术手段,通过 107只山羊和 68只日本大耳白兔建立的不同实验模型,较为系统地研究了长骨缺损不连的骨外固定治疗及方法的合理选择,初步探讨了如何促进延长区骨愈合的方法(PEMF,延迟延长, TGFβ1)和可能机制,

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