

自由基在高速投射物压力波 致伤机制中的作用

陈林 王正国 刘荫秋 安波 王大田

(第三军医大学野战外科研究所 重庆 630042)

摘要 已发现高速投射物(High Velocity Projectile, HVP)压力波可致培养的内皮细胞等损伤。但到目前为止,压力波引起细胞损伤的机理还不清楚。旨在用压力波于体外致伤培养肝细胞,并用自由基清除剂 SOD 处理受损细胞,以观察自由基在 HVP 压力波致伤机制中的作用。试验结果表明 HVP 压力波可引起培养肝细胞明显损伤,压力波损伤培养细胞的机制与其引起细胞自由基反应等有一定关系,预防性地给予自由基清除剂 SOD 可在一定程度上减轻压力波所引起的细胞损伤。

关键词 高速投射物 压力波 肝细胞 脂质过氧化反应

1 引言

国外已有研究发现高速投射物(High Velocity Projectile, HVP)压力波可致培养的神经细胞,内皮细胞损伤^[1]。但到目前为止,压力波引起细胞损伤的机理还远没有弄清楚,依本室以前的试验结果和碎石激波损伤组织细胞的机理,作者认为自由基在 HVP 压力波致伤机制中可能起一定作用。我们用压力波于体外致伤培养肝细胞,用自由基清除剂 SOD 处理受损细胞,以观察了解自由基在 HVP 压力波致伤机制中的作用,为 HVP 致伤机理,特别是压力波致伤机制的了解提供新线索。

2 材料及方法

2.1 试剂

胶原酶(I型);Sigma, RPMI-1640; Gibco, TEP(四乙氧基丙烷,瑞典产), SOD 为上海生化所产品,其余为国产分析纯试剂。

2.2 致伤模型的建立及致伤方法

参考 Suneson^[1]的方法加以修改,所用水箱长×宽×高为100 cm×60 cm×80 cm,在箱的前壁正中挖一圆孔,弹丸经此孔射入水箱,水表面距弹径18 cm,把肝细胞装入消毒的洁净乳胶薄膜内成水囊状并缚绑固定于有机玻棒上,调整有机玻棒位置使胶囊定位于水中相应位置,本实验每次分别布放两袋细胞于 A, B 两个点(即 A, B 两小组), A, B 点均与子弹弹道等高(即距箱底40 cm),距其水平距离为10 cm; A, B 两点分别距水箱前壁17, 47 cm

(图1)。致伤武器为美制 M-16 步枪, M193 直径 5.56 mm 制式弹, 射距 4 m, 致伤时测 A, B 两点的压力(压力传感器由北京生物医学工程所研制)。

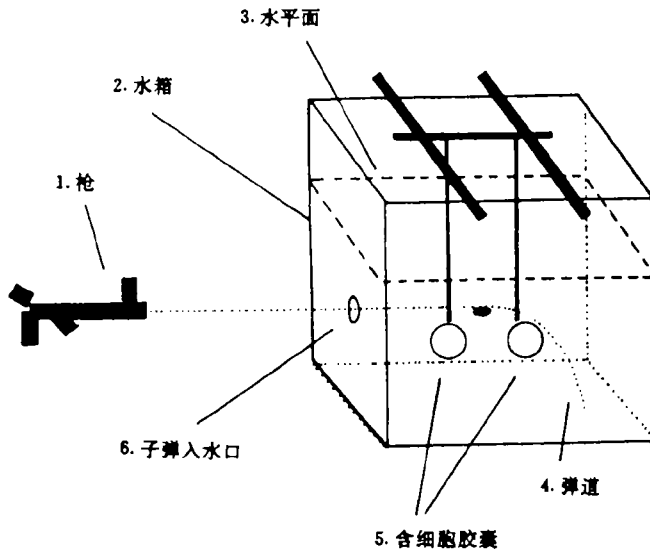


图1 玻璃试管试验布置图

Fig. 1 Sketch of the in vitro test

1. Gun; 2. Water tank; 3. Water level; 4. The bullet's trajectory;

5. The capsules containing cells; 6. Hole for passing bullets

3 大鼠原代肝细胞的分离及培养^[2]

用胶原酶灌注消化法分离肝细胞, 苔盼蓝染色计数细胞存活率为 90% 以上, 最后用 RPMI-1640 (含青, 链霉素各 100/ml, 胰岛素 0.4 U/ml, 氢可 0.1 μg/ml, 小牛血清 0.1 ml/ml) 接种培养于培养板或培养瓶中, 37℃, 5%CO₂ 条件下培养。

3.1 分组

分对照组(C), SOD 给药组, 致伤组, 其中致伤组分 A, B 两小组(见上), SOD 给药组分 SOD_A, SOD_B 两组(即对应于致伤组的 A, B 两组), SOD 均在致伤前加入, 对照组除不致伤外, 其余处理同致伤组。

3.2 观测指标

1. 光镜: 用姬姆沙染色;
2. 细胞存活率: 用苔盼蓝染料拒染法;
3. 上清液 ALT 按常规方法测定;
4. 细胞悬液内二醛(MDA)含量用 TBA 荧光法测定, Lowry 法定蛋白;
5. 细胞悬液 ATP 含量(虫荧光素酶法)。

3.3 统计处理

用本校数学教研室数理统计包进行数据处理, 结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, *t* 检验分析差异显

著性, $P < 0.05$ 为相差显著。

4 结果

4.1 压力测定

典型的压力波特点为双峰形, 第一波较第二波压力大。A、B 两处最高压力峰值(即第一波峰值)分别为 1489 kPa, 1117 kPa, 相差显著($P < 0.05$); 第二波压力值 A 点也明显地比 B 点高, 表明 A 处压力较 B 处大。

4.2 光镜观察

致伤后见细胞有脱落, 存活细胞间隙增宽, 存活率下降(表 1), 细胞轮廓增加, 脱落细胞缩成圆形, 部分细胞可见胞浆空化或破裂。受压力高的细胞(A 组)比低的(B 组)出现上述变化更早, 变性死亡的细胞也更多。而在 SOD_A、SOD_B 两组, 肝细胞存活率明显地比 A、B 组高(但低于对应的 C 组, 表 1)。

表 1 伤后各组肝细胞有关指标变化($n=8$)

Table 1 Parameter changes of hepatic cells after wounding

指标	组别	时间(伤后 h)		
		1/3	6	24
存活率%	A	77.1 ± 7.3 * * †	68.5 ± 8.4 * * †	54.5 ± 5.2 * * †
	B	84.5 ± 6.5 * *	79.9 ± 8.9 * *	63.3 ± 6.4 * *
	SOD _A	81.6 ± 6.7 * *	71.3 ± 5.3 * *	62.9 ± 6.5 # * *
	SOD _B	84.9 ± 6.8 *	80.3 ± 6.5 * *	73.0 ± 5.7 # # * *
	C	93.2 ± 5.2	93.6 ± 3.7	92.6 ± 4.7
ALT(U/dl)	A	230.4 ± 35.7 * * †	259.4 ± 52.7 * * †	288.3 ± 45.4 * * †
	B	194.3 ± 22.5 *	213.9 ± 23.3 * *	237.7 ± 26.1 * *
	SOD _A	216.3 ± 22.2 * *	230.1 ± 22.5 * *	224.3 ± 21.6 # * *
	SOD _B	179.2 ± 18.5 * *	161.3 ± 21.6 # #	193.2 ± 27.4 # * *
	C	141.4 ± 15.8	144.6 ± 14.6	153.1 ± 16.5
MDA (nmol/ /mg · prot)	A	0.24 ± 0.04 * * †	0.27 ± 0.05 * * †	0.31 ± 0.04 * * †
	B	0.19 ± 0.03	0.22 ± 0.04 *	0.25 ± 0.06 *
	SOD _A	0.21 ± 0.02 * *	0.19 ± 0.03 # *	0.26 ± 0.02 # # * *
	SOD _B	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.03 #	0.20 ± 0.03 # *
	C	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02
ATP ($\mu\text{mol}/10^6$)	A	12.6 ± 2.3 * * †	9.76 ± 1.3 * * †	6.46 ± 1.5 * * † †
	B	16.5 ± 3.3 *	13.4 ± 1.9 * *	10.0 ± 1.5 * *
	SOD _A	14.3 ± 1.50 * *	14.2 ± 3.31 # # * *	10.9 ± 2.26 # # * *
	SOD _B	16.4 ± 2.55 * *	17.9 ± 2.73 # # *	14.7 ± 2.05 # # * *
	C	23.1 ± 4.6	21.8 ± 2.9	20.9 ± 3.0

* : 与对照组(C)比 $P < 0.05$;

* * : $P < 0.01$ 。

† : 与低压组(B)比 $P < 0.05$;

† † : $P < 0.01$ 。

: SOD_A(SOD_B)与 A(B)组比 $P < 0.05$;

: $P < 0.01$ 。

4.2 其它指标:

从表1可见,伤后20 min 细胞即有明显损伤,表现为ALT漏出增多,MDA含量上升等,且随时间延长,肝细胞的损伤愈重,A组细胞损伤较B组更明显。使用SOD组的肝细胞的损伤程度有显著减轻,细胞存活率升高,特别是在B组更明显。

5 讨论

压力波的直接作用已引起有关学者注意,并得到不少佐证,如:肢体伤时可有股骨间接骨折(3);腹壁贯通伤(不入腹腔)后可见脑,心,肠,肝等器官有以组织撕裂,出血及血肿为特征的病理变化,而致伤时测压发现上腹腔平均最大正,负压差值可达3242.4 kPa,总持续时间150~200 ms;在射击动物后肢后0.35 ms在脑实质内可记录到峰值为80~170 kPa的压力波,动物同时还有血脑屏障渗漏,轴索变性及髓鞘扭曲^[4]。这一切均表明压力波确可损伤组织器官。压力波引起细胞损伤的机制可能与压力波对细胞的直接破坏作用及引发自由基反应有关。本实验中,肝细胞在受压力波作用后有明显损伤,如细胞MDA水平上升,ATP含量下降等。而使用自由基清除剂SOD后肝细胞损伤程度有明显减轻,如MDA含量降低,存活率上升等,特别是损伤相对轻些的B组恢复更明显一些(这可能与该组细胞损伤较轻,许多细胞还没有进入不可恢复阶段,从而为治疗恢复创造了条件有关),表明自由基在压力波所致细胞损伤的发生机制中起有重要作用。本研究中自由基产生的原因还不清楚。国内外在研究体外震波碎石激波(高速投射物压力波也呈一种激波,其压力值比碎石激波低,但持续时间长一个数量级)致组织损伤机制时发现碎石激波可损坏微循环、引发自由基水平升高等^[5,6]。Kaver认为碎石激波可经机械及化学作用损伤细胞,前者冲击波在基质中传播时产生的快速压力/张力变化引起细胞的破坏和解体,后者指冲击波在水中传播时空穴作用导致自由基产生,同时空穴作用也可能引起液体微喷射造成细胞损伤^[7]。本研究中,伤后20 min即可见肝细胞MDA水平升高,且使用SOD可缓减肝细胞损伤程度,提示自由基在高速枪弹伤致伤机制中起有较重要的作用。压力波引致自由基水平升高的原因不太清楚。力化学(Mechanochemistry)原理表明:机械能如剪切力,冲击波,快速振荡等可引发物质化学变化,如结构、流变性改变、高分子自由基形成等^[8],即机械能的输入可引起化学反应。本试验中肝细胞MDA升高可能与压力波的力化学作用有关。自由基主要可损伤生物膜系统,当肝细胞膜受损时,出现酶外泄,而线粒体膜损伤时则引致能量生成障碍、ATP合成减少,引发一系列功能障碍,最终导致细胞死亡。但是,从实验结果可看到,和C组比,加SOD组的各项肝细胞损伤指标并没有完全恢复,表明SOD的作用是不完全的,即自由基的作用不是压力波致伤的唯一机制。作者认为这很可能与压力波和空腔作用对细胞的直接破坏损伤有关(不妨把这种直接打击作用称之为压力波对细胞的“第一次打击作用”),这种直接打击作用可能在致伤瞬间就完成了,而自由基从增高到发挥损伤作用还需要一个过程,它们可能是在“第一次打击作用”的基础之上发挥损伤作用的,SOD不大可能对这种“第一次打击作用”所引起的损伤有治疗作用。压力波对细胞的挤压与震荡直接引起细胞及亚细胞结构的损伤,使体内正常存在的自由基漏出或使细胞内分子吸收能量后电子跃迁而形成自由基^[9],特别是泄漏于细胞内部的自由基很难为SOD所清除,因为SOD的分子量较大,不大能进入细胞内,这可能也是SOD效果有

限的原因之一。自由基清除剂于在体情况下能否起到防治压力波所致损害的作用还需要进一步研究。

6 结 论

我们从试验中发现了高速投射物压力波损伤培养细胞的机制与其引起细胞自由基反应等有一定关系,预防性地给予自由基清除 SOD 均可在一定程度上减轻压力波所引起的细胞损伤。

参 考 文 献

- 1 Suneson A, Hansson H-A, Seeman T, *et al.* Studies on Effects on Cell Cultures of Pressure Waves Generated by High Energy Missile Impact. *J Trauma*, 1990, 6(2): 124
- 2 黄俊勇, 冷欣夫. 大鼠肝细胞的分离技术. *细胞生物学杂志*, 1991, 13(1): 42
- 3 M Li, Y Ma, R Fu, *et al.* The Characteristics of the Pressure Wave Generated in the Soft Target by Impact and Its Contribution to Indirect Bone Fracture. *J Trauma*, 1988, 28(1): S 104
- 4 Suneson A, Hansson H-A, Seeman T, *et al.* Peripheral High Energy Missile Hits Cause Pressure Changes and Damage to the Nervous System. Experimental Studies on Pigs. *J Trauma*, 1987, 27: 782
- 5 Dellian M, Walenta S, Gamarra F *et al.* Changes in Blood Flow, Energy Status and Growth of Tumors Following Treatment with Focussed High energy Shock waves. *Eur Surg Res*, 1991, 21, Suppl: 11
- 6 孙 庭, 彭毓平. 高能冲击波对肾脏及其它器官功能及形态学的影响. *中华泌尿外科杂志*, 1989, 10(6): 369
- 7 Issac Kaver, Warren W, Koontz J R, John D, *et al.* The in Vitro Effects of High Energy Shock Wave Resulted from Lithotripsy on Animal Cells. *J Urol*, 1992, 147: 215
- 8 邝生鲁. 力化学的应用. *自然杂志*, 1991, 14(9): 684
- 9 付小兵, 田惠民, 颜光涛, 等. 高速枪弹对多脏器的损伤实验研究. *中华外科杂志*, 1991, 28(6): 371

ROLE OF FREE RADICALS IN DAMAGE MECHANISM DUE TO PRESSURE WAVE CAUSED BY HIGH VELOCITY PROJECTILES

Chen Lin, Wang Zhengguo, Liu Yinqiu, An Bo, Wang Datian

(Field-Battle Surgeon Institute, PLA's Third Army Medical University, Chongqing 630042)

ABSTRACT It was known that the pressure waves derived from high velocity projectiles can injure the cultured endothelium. The mechanism of the injury due to pressure waves is still in need of clarification. This paper aims to know the role of free radicals in the occurrence of the damage caused by pressure waves by pre-treated the cultured cells with free radical scavenger SOD. The results show that the cultured rat hepatic cells can be injured by the pressure waves, the stronger the pressure waves result in more severe damage, and that the injury severity of the cells can be lowered by SOD pretreatment.

KEY WORDS high velocity projectiles, pressure wave, hepatic cells, lipidoxidation