文章编号:1000-5404(2005)21-2099-04

论著

轻度肠型放-烧复合伤救治的实验研究

王 涛,艾国平,杜智勇,谭 虎,粟永萍 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨颈交感阻滞、壳聚糖包裹的pVITRO3-HD5-GLP2纳米粒联合L203对轻度肠型放-烧复合伤小鼠的治疗作用,探索救治肠型放-烧复合伤的综合措施。**方法** TBSA15% Ⅲ度烧伤合并10 Gy放射损伤小鼠分为综合救治组及复合伤对照组,观察两组动物的平均存活时间以及小肠湿重、小肠隐窝细胞早期凋亡、恢复期增殖和肠道细菌移位等相关指标。**结果** 综合救治可以使放-烧复合伤后动物平均存活时间延长;减轻小肠湿重的降低程度,减少肠隐窝细胞凋亡,促进恢复期肠上皮的增殖以及减少肠道细菌移位的发生。**结论** 综合救治措施可以改善肠型放-烧复合伤肠道的损伤,延迟小鼠的死亡时间。

关键词: 放-烧复合伤;小肠;颈交感阻滞;GLP-2;HD-5;壳聚糖

中图法分类号: R574; R644; R818.74 **文献标识码:** A

Treatment for mice with minor gastrointestinal type combined radiation and burn injury

WANG Tao, AI Guo-ping, DU Zhi-yong, TAN Hu, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutical effect of combined therapy of chitosan pVITRO3-HD5-GLP2 nanoparticles, cervical sympathetic ganglia block and L203 on the mice with combined radiation and burn injury. Methods A total of 120 BALB/c mice inflicted with 10 Gy irradiation and 15% TBSA full thickness burn injury were randomly assigned into control group and combined therapy group, 30 mice of each group employed to combined therapy or no treatment and 30 of each group for observing the survival time. The therapeutical effect were evaluated by comparing mean survival time and small intestine related indices such as intestinal wet weight, early apoptosis, late proliferation of crypt cells and bacterial translocation from intestine. Results As compared with the control group, mean survival time after combined radiation and burn injury prolonged, and less decrease of intestine wet weight, fewer number of early apoptotic crypt cells, higher percentage of BrdU positive intestinal crypt cells and diminishing incidence rate of bacterial translocation from intestine were observed in combined therapy group. Conclusion The combined therapy mentioned above could improve the damage of intestine and increase mean survival time after gastro intestinal type combine radiation and burn injury.

Key words: combined radiation and burn injury; small intestine; blockage of cervical sympathetic ganglia; GLP-2; HD-5; chitosan

放射损伤合并烧伤,即放-烧复合伤是战时核爆炸与平时核事故所发生的主要伤类之一。基于对放-烧复合伤的基本病理、病生以及群体效应等规律的认识,我们认为极、重度骨髓型和肠型放-烧复合伤的主要矛盾是早期的内稳态失衡、后续的小肠机械屏障与免疫屏障的丧失和严重的造血抑制等3个方面。既往工作表明,针对中重度骨髓型放-烧复合伤的关键环节,采

基金项目: 国家自然科学基金资助重点项目(30230360),国家自然科学基金资助面上项目(30470527)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230360, 30470527)

作者简介: 王 涛(1978-),男,河北省定州市人,硕士研究生,助教,主要从事复合伤复合效应方面的研究。电话:(023)68771720

通讯作者: 粟永萍,电话:(023)68752009,E-mail:suyping@yahoo.com

收稿日期: 2005-09-23;**修回日期:** 2005-10-18

用我所自主研发的生物制剂 L203、壳聚糖包裹的防御素 5 与 GLP2 双基因表达质粒和颈交感阻滞[1]等措施分别进行救治取得了较好的效果。我们认为对于肠型放-烧复合伤而言,及时纠正早期内稳态失衡,防治休克是关键,重建肠道机械与免疫的双重屏障是根本。因此,着眼于调节内稳态,减轻早期的休克,加速肠上皮的修复,防治肠源性感染就有可能为后续的救治赢得时间。我们针对性地进行了颈交感阻滞、双基因转染质粒壳聚糖纳米粒和 L203 的综合救治,希望找到救治肠型放-烧复合伤的较为理想的新措施。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

L203 针剂 200 μg/ml(本所自制),用生理盐水稀释成 40 μg/ml 应用;盐酸罗哌卡因注射液(上海),用生理盐水稀释成 0.1% 应用;壳聚糖(Fluka, USA);BrdU(Roche, USA);*in situ* cell death detection kit, POD(Roche);BrdU 检测试剂盒(BD Pharmingen);多基因表达质粒 pVITR03-HD5-GLP2 由谭虎硕士惠增;其他实验用试剂均为国产分析纯。

1.2 动物致伤方法

实验组动物以 ^{60}Co γ 射线一次性全身照射 10 Gy,照后立即于背部剪毛区涂 3% 凝固汽油,燃烧 7 s,致 15% Ⅲ度烧伤(病理切片证实)。致伤后立即进行生理盐水腹腔注射(2 ml/只),以抗休克。

1.3 动物分组及处理

BALB/c 小鼠 115 只(第三军医大学实验动物中心提供),雄性,体质量 20~25 g,分为 3 组:放-烧复合伤综合救治组(T 组,55 只);放-烧复合伤对照组(C 组,55 只);空白对照组(N 组,5 只)。T 组和 C 组实验组分别设 6、24、48、72、96 h 等 5 个时相点取材(每时相点 5 只);其余 30 只动物用于观察平均存活时间。

T 组致伤后立即行腹腔 L203 给药(40 μg/ml,500 μg/kg),然后给予颈交感神经局部麻醉阻滞[1],方法为左右双侧颈丛分别给予 0.01% 罗哌卡因 0.1 ml;伤后 1 h 内灌胃,给予复凝聚法制备的壳聚糖纳米粒包裹重组质粒 pVITR03-HD5-GLP2(50 mg/ml)1 ml[2]。L203 和颈交感神经阻滞持续进行 4 d,每天 1 次。而后给予正常条件喂饲。

C 组致伤后立即左右双侧颈交感神经给予生理盐水 0.1 ml;伤后 1 h 内给予空纳米粒 pVITR03(50 mg/ml)1 ml。而后给予正常条件喂饲。作为对照,给予相同的操作和对应量的生理盐水。

N 组不做致伤处理,直接取材。

1.4 小肠湿重

颈椎脱臼处死动物,迅速剖开腹腔,取屈氏韧带下 5 cm 处空肠 10 cm,用生理盐水冲洗干净内容物,纵行剪开肠管,滤纸浸干水分,用电子天平称重,计算单位长度空肠的湿重。

1.5 细菌移位检测实验

无菌条件下,取外周血、肝、脾、肠系膜淋巴结,后三者称重后匀浆,取 200 μl 涂布麦康凯培养基平板行细菌培养,37 ℃孵育 24 h 计数菌落数量。不同组别不同时相点的细菌移位情况以细菌检出阳性器官数占总的检测器官数目的百分比表示。

1.6 TUNEL 法原位检测损伤后肠上皮早期细胞凋亡

损伤后 6 h 的新鲜切片按照 *in situ* cell death detection kit, POD(Roche)的说明书行肠上皮早期细胞凋亡的原位检测。在常规显微镜低倍镜下,每组 5 张切片随机数 30 个隐窝,核染棕黄色或棕褐色记为凋亡细胞,求平均值计算每个隐窝平均凋亡细胞数目。

1.7 Brdu 掺入法检测损伤后小肠上皮再生情况

第 72、96 小时的实验动物处死前腹腔注射 BrdU(50 mg/kg),2 h 后颈椎脱臼处死动物,迅速剖开腹腔,取屈氏韧带下 2 cm 处空肠 2 cm,carnoy's 固定液固定,按常规方法进行脱水、浸蜡包埋,5 μm 厚切片,制作石蜡切片。免疫组织化学染色 BrdU 检测试剂盒说明书进行。光学显微镜下,随机选取 10 个完整的隐窝,计数每个隐窝中的阳性细胞(棕褐色细胞),计算阳性细胞百分率。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件对数据进行统计学处理,动物平均存活时间、小肠湿重、细胞凋亡及 Brdu 掺入的阳性细胞数目百分比等用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,细菌阳性器官百分比采用 Fisher 检验进行统计。

2 结果

2.1 综合救治对放-烧复合伤小鼠死亡率的影响

放-烧复合伤(10 Gy + 15% Ⅲ度 TBSA)小鼠的平均存活时间为(3.85 ± 1.32) d;而综合救治组动物死亡高峰延迟,平均存活时间为(4.9 ± 1.45) d,较复合伤对照组显著延长($P < 0.05$)。

2.2 综合救治对放-烧复合伤小肠湿重的影响

放-烧复合伤后 24 h 时对照组小肠湿重无明显降低,48 h 时即显著降低[$C_{48\,h}$:(28.5 ± 0.8) mg/cm, Normal:(36.4 ± 0.8) mg/cm;$P < 0.05$],72 h 时降至最低,96 h 时有所恢复,但仍低于正常。综合救治组 48、72 h 较同一时相点的对照组小肠湿重减少显著减轻[$C_{48\,h}$:(28.5 ± 0.8) mg/cm, $T_{48\,h}$:(31.8 ± 0.7) mg/cm, $P < 0.05$];[$C_{72\,h}$:(22.3 ± 0.8) mg/cm, $T_{72\,h}$:(26.9 ± 0.6) mg/cm, $P < 0.05$],表明综合救治后,可减少放-烧复合伤对小肠的损伤,促进放烧损伤后肠重量恢复。

2.3 综合救治对放-烧复合伤小鼠肠道细菌移位的影响

从实验中我们可以看出放-烧复合伤后 24 h 时对照组有明显的细菌移位,以肠系膜淋巴结最为突出,肝、脾次之,血中最少;48、72、96 h 依次呈现细菌移位减轻的趋势。综合治疗组的细菌移位自第 48 小时始较同一时相点的对照组显著减少($P < 0.05$),表明综合救治可显著减少复合伤肠道细菌移位(表 1)。

表 1　综合救治对放-烧复合伤小鼠肠道细菌移位的影响

Tab 1　Effects of combined therapy on bacterial translocation from intestine of mice after combined radiation and burn injury

Items	Control				Combined therapy			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Total number of detected organs	20	20	20	20	20	20	20	20
Positive number of MLNs	4	3	2	2	4	3	1	2
Positive number of livers	3	3	3	2	3	1	2	2
Positive number of spleen	3	2	2	1	2	1	1	0
Positive number of PB	3	2	2	2	3	1	0	1
Total number of bacterial positive organs	13	10	9	7	12	6	4	5
Percentage of bacterial positive organs(%)	65	50	45	35	60	30★	20★	25★

★: $P<0.05$, *vs* control group

2.4　综合救治对放-烧复合伤小肠上皮早期凋亡的影响

TUNEL 法检测放-烧复合伤后 6 h 肠上皮凋亡,凋亡细胞胞核呈棕黄色或棕褐色染色,主要集中在隐窝。计数后统计结果($n=5$, $P<0.05$)表明隐窝细胞在损伤的早期即出现凋亡,对照组的早期隐窝凋亡细胞是综合救治组的 1.76 倍,综合救治组可明显降低早期隐窝细胞的凋亡[C_{6h}:(4.33 ± 0.57) apoptosis cells/crypt, T_{6h}:(2.46 ± 0.42) apoptosis cells/crypt, $P<0.05$]。

2.5　综合救治对放-烧复合伤小肠再生的影响

损伤后第 72 小时,对照组残存的小肠隐窝干细胞开始增殖再生,第 96 小时增殖再生较为明显;综合救治组小肠隐窝干细胞增殖再生比对照组更为明显,Brdu 掺入的阳性细胞数目的比例明显高于复合伤对照组[$T_{72\,h}$ = (30.7 ± 1.2)%, $C_{72\,h}$ = (19.9 ± 1.2)%; $T_{96\,h}$ = (43.5 ± 1.9)%, $C_{96\,h}$ = (36.4 ± 2.1)%, $P<0.05$],表明综合救治的措施有利于损伤后隐窝干细胞的存活与增殖。

3　讨论

放-烧复合伤是烧伤与放射损伤的复合,其结果是较单伤而言整个病理生理过程更加复杂,难于救治。为此我们尝试探索对轻度肠型放-烧复合伤(10 Gy + 15% Ⅲ度 TBSA)进行颈交感阻滞、双基因转染质粒壳聚糖纳米粒联合 L203 的综合救治,主要通过小肠病理和动物的平均存活时间的变化等两个方面对其效果进行了评价,以期找到有效救治的新措施。

放射损伤合并烧伤后,由于烧伤应急导致严重的早期休克,是引发放-烧复合伤早期死亡的重要原因,因此,如何尽快渡过休克期,为后续治疗赢得时间是放-烧复合伤早期治疗的关键环节。颈交感神经节阻滞通过局麻醉药对颈交感神经及其附近组织进行区域性阻滞,进而循神经-内分泌-免疫网络实现对机体内稳态的调控[3],其可以有效降低骨髓型放-烧复合伤(5 Gy + 15% Ⅲ度 TBSA)动物的死亡率,改善造血[1],是严重创伤简单有效的治疗手段。

肠道损害是肠型放射病的主要矛盾,由于对射线高度敏感的肠隐窝干细胞和黏膜淋巴细胞均受到严重损伤,使肠道的机械屏障和免疫屏障遭到破坏,导致病菌入血、肠源性感染[4]。因此,有效促进肠上皮细胞结构和功能恢复,同时改善肠道黏膜免疫功能是很好的治疗策略。国内外诸多研究表明,GLP-不仅能促进肠上皮结构修复,还具有促进肠上皮功能恢复的作用[5,6];而防御素-5 作为小鼠肠道天然免疫防线的重要抗菌肽,具有明显的杀菌抑菌作用,并有抗真菌和中和内毒素的作用,是理想的抗肠源性感染的活性抗菌肽[7]。而应用壳聚糖纳米粒技术,使得口服基因转染进行肠道放射损伤的治疗途径成为可能[2]。我们应用包括壳聚糖包裹的 GLP-2 和 HD-5 双基因表达质粒转染肠上皮的综合救治措施之后,通过小肠湿重、损伤早期的凋亡、恢复期隐窝细胞 Brdu 掺入和肠道细菌移位等指标对救治效果进行了评价。小肠湿重是较为直观的反映小肠损伤与修复的指标,放-烧复合伤时由于隐窝干细胞受到损伤,肠上皮绒毛大量脱落,隐窝消失,导致肠壁菲薄,湿重减轻严重;综合救治后小肠湿重减轻在第 2、3 天显著减少。在小肠放射生物效应中,早期克隆形成能力细胞的凋亡与晚期的隐窝存活增殖具有明显相关性[4],因此放射损伤早期小肠隐窝细胞的凋亡和恢复期的增殖是评价小肠放射损伤严重程度的常用指标。为此我们检测了损伤后 6 h 两组肠隐窝的细胞凋亡和 72、96 h 隐窝细胞增殖的情况。结果表明,放射诱导的凋亡细胞主要位于隐窝,胞核呈棕黄色或棕褐色染色,计数比较两组每个隐窝平均凋亡细胞数表明,复合伤对照组隐窝凋亡细胞是综合救治组的 1.76 倍;与之对应,损伤后第 3、4 天,救治组 Brdu 标记的隐窝阳性细胞百分比明显高于对照。这些结果表明,综合救治后可以减轻肠隐窝的放射损伤,保留较多的干细胞。同时,肠道细菌移位这一指标表明救治组肠源性感染的程度得到了明显减轻,表现为淋巴结、肝、脾和血细菌培养,细菌阳性器官所占百分比明显减少。在趋势上综合救治组与复合伤对照组基本一致,但在后期救治组的细菌移位明显减少,这一点与肠道湿重等指标的改变是一致的。

同时我们对放-烧复合伤动物给予了我所自主研发的新型生血小板因子 L203,外周血血象和骨髓病理提示其可以改善肠型放-烧复合伤的造血功能(结果未列出),提示综合救治能为后续的救治打下良好的基础。

总之,我们的实验结果表明,针对肠型放-烧复合伤发生发展中的关键环节,给予颈交感阻滞、双基因转染质粒壳聚糖纳米粒联合 L203 的综合救治,对肠型放

-烧复合伤的小肠损伤有较好的改善效果，能够一定程度上延长动物的平均存活时间。然而，3种措施效能的发挥有赖于较为合理优化的组合，因此有待于进一步摸索治疗的时机和给药的剂量等因素，以期达到更好的治疗效果。

参考文献：

[1] 陆建华，粟永萍，程天民，等. 颈交感神经阻滞对放-烧复合伤小鼠的治疗作用[J]. 第三军医大学学报，2005，27(12)：1253－1255.

[2] Chen J, Yang W L, Li G, *et al*. Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium *in vivo* mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(1):112－116.

[3] Marples I L, Atkinson R E. Stellate ganglion block[J]. Pain Rev, 2001, 8(1): 3－11.

[4] Potten C S. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine[J]. Int J Radiat Biol, 1990, 58(6): 925－973.

[5] 朱俊东，粟永萍，程天民. 胰高血糖素样肽-2对放射损伤小鼠肠上皮恢复的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(3)：293－295.

[6] Benjamin M A, McKay D M, Yang P C, *et al*. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse[J]. Gut, 2000, 47(1):112－119.

[7] 李广阔，李 旭，田伏洲，等. 重组防御素5对6株肠道常驻细菌的杀菌效果观察[J]. 中华医院感染学杂志，2004，14(5)：485－488.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)21-2102-01

乳腺黏膜相关淋巴瘤1例

A case report of mucosa associated lymphoma in mammary gland

冯怡墨，李义兵 （武警重庆市总队医院外一科，重庆 400061）

患者，女性，57岁。因右乳房无痛性肿物1个月入院。查体：右乳房外上象限与外下象限间可扪及一肿块，约4 cm×5 cm×2 cm大小，质硬，形状不规则，边界欠清，与周围组织粘连固定，轻压痛。肿块表面皮肤正常。右侧腋窝扪及1枚直径2 cm淋巴结，质硬，可推动。肿块穿刺活检示：(右)乳腺组织显示纤维组织增生并见有散在不典型细胞。诊断考虑乳癌可能性大。行右乳癌改良根治+胸大肌开窗、锁骨下淋巴清扫术。术后病检：(右乳腺)黏膜相关淋巴瘤(B细胞型)，累及右腋窝、锁骨下淋巴结(6/6)，免疫组化染色：CK(－)，syn(－)，NSE(－)，LCA(++)，CD20(+++)，CD79a(+++)，CD3(－)，CD45RO(－)。

讨论

黏膜相关淋巴瘤的概念最初由Lsaacson等[1]1983年提出，该瘤作为淋巴瘤新分类中一种类型称之为黏膜相关淋巴组织(macosa associated lymphoma tissue，MALT)型边缘区B细胞淋巴瘤[2]。其免疫学标记为B细胞源性，恶性度低，常见于呼吸道黏膜和胃，小肠黏膜[3]，也可见于正常不存在MALT的黏膜组织，如唾腺、甲状腺、胸腺、宫颈、乳腺、肾脏、脑、皮肤和皮下组织等处。早期病情进展缓慢，后期可转化为高恶性大B细胞淋巴瘤。

乳腺发生本病几率很低，以中年妇女多见，早期为乳腺单侧无痛性肿块，生长较快，乳头不回缩，表皮无橘皮样改变，质地韧，与乳腺纤维腺瘤或早期乳腺癌相似，同侧腋下淋巴结一般不肿大，也可双侧发病。

治疗上，乳腺黏膜相关淋巴瘤病变局限单侧者主张外科手术切除肿块，辅以化疗放疗。双侧并累及淋巴结已明确播散者，应以化疗为首选，辅助放疗及中药等综合治疗。本病预后较好，文献[4]报道乳腺黏膜相关淋巴瘤9例，治疗采用单纯手术切除，随访1例复发，组织学转变成为大B细胞淋巴瘤。本例患者术后用"表阿霉素+5氟尿嘧啶"方案化疗3个疗程，右锁骨上和右腋下放疗1个疗程，随访至今已3年，未见复发。

关键词：乳腺；肿瘤；手术

中图法分类号：R737.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] Lsaacson P G, Wright D H. Malignant lymphoma of mucosa—associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma[J]. Cancer, 1983, 52(8): 1410－1416.

[2] Jaffe E S, Harris N L, Diebold J, *et al*. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report[J]. Am J Clin Pathol, 1999, 111(1 Suppl1): S8－S12.

[3] 张雅洁，李玉林，宋桂彬，等. 胃肠道黏膜相关淋巴组织原发淋巴瘤病理学研究[J]. 临床与实验病理学杂志，1994，10(2)：119－122.

[4] 陈建洁. 原发于乳腺的黏膜相关淋巴瘤一例[J]. 河南肿瘤学杂志，2000，13(5)：342.

（编辑 周 芳）

作者简介：冯怡墨(1977－)，男，重庆市南岸区人，医师，主要从事胃肠及乳腺疾病外科诊治方面的研究。电话：(023)66776155

收稿日期：2005-08-13；修回日期：2005-10-03