DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.027
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1191-03

论著

缺血再灌注损伤对再植肢体关节滑膜的早期影响

孙新君[1],王成琪[1],周继红[2],田青业[1],刘大维[2],初同伟[2] ([1]解放军89医院全军创伤骨科研究所,山东 潍坊 260012;[2]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨氧自由基在滑膜缺血再灌注(IR)过程中的变化规律及对血管内皮细胞、滑膜细胞的损伤。方法 65只健康新西兰大白兔随机分为正常对照组(5只),缺血组(20只)和IR组(40只);分别于缺血4、6、8、10 h及再灌注后1、3、6、12、24、72、168、336 h取滑膜组织进行光境观察,用硫代巴比妥法检测组织匀浆液中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的动态变化。结果 IR组滑膜MDA显著高于对照组及缺血组($P<0.01$),MDA呈双峰变化,第一个峰值与血管内皮细胞的损伤时间一致,第二个峰值与滑膜组织内粒细胞的聚集密切相关;缺血组与对照组MDA无显著性差异($P>0.05$)。SOD在缺血阶段即明显降低,IR早期持续在低水平。结论 滑膜组织IR损伤初期以血管内皮细胞的原发性再灌注损伤为主,12 h后的继发过氧化损伤与滑膜组织中大量的炎细胞浸润所产生的自由基及组织对自由基的清除能力降低密切相关。

关键词:缺血再灌注;自由基;滑膜;丙二醛
中图法分类号:R322.72;R619.9;R658.1 文献标识码:A

Experimental study on the early changes of ischemia-reperfusion to the synovium after digital replantation

SUN Xin-jun, WANG Cheng-qi, ZHOU Ji-hong, TIAN Qing-ye, LIU Da-wei, CHU Tong-wei (Institute of Traumatic Orthopedics, The 89th Hospital of PLA, Weifang 260012, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of ischemia-reperfusion injury of the synovium and its effect to endothelium and synocyte. Methods 65 rabbits were divided into normal group (5 rabbits), ischemia group (20 rabbits) and ischemia-reperfusion group (40 rabbits) randomly. Pathology of the synovium were observed and MDA of synovium were determined at 4, 6, 8, 10 h in ischemic group and 1, 3, 6, 12 h, 1, 3, 7, 14 d in IR group respectively. Results The MDA of synovium in IR group was significantly higher than that of other two groups ($P<0.05$). No significant difference was observed between normal and the ischemia group ($P>0.05$). Two peaks for MDA were found in IR group. The first peak was related with the damage of endothelium and the second peak to PMN aggregation in synovium. Conclusion The damage to the synovium mainly is primary endothelium injury at the very early stage, and the secondary IR injury is closely related to the abundant PMN aggregation and free radicals.

Key words: ischemia-reperfusion injury; free radicals; MDA; synovium

断(肢)指再植、再造术后常出现不同程度的功能障碍,尤其是缺血时间较长者。为探讨缺血再灌注(Ischemia-reperfusion, IR)过程中自由基对滑膜组织的作用及滑膜IR损伤与关节功能障碍的关系,我们设计了一种滑膜IR动物模型,并观察自由基与滑膜组织的动态变化。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康新西兰大白兔65只,体重2.5~3.5 kg,雌雄不限。实验动物随机分成正常对照组5只;缺血组20只(缺血时间分别为4、6、8、10 h,每个时间点5只);IR组40只(缺血8 h后再灌注,再灌注时间分别为1、3、6、12、24、72、168、336 h,每一时项点5只),IR组动物一侧后肢为实验侧,另一侧为实验对照侧,不做任何处理。

1.2 实验方法

滑膜IR模型的建立:3%的戊巴比妥钠(1 ml/kg)静脉注射麻醉,备皮后固定于手术台,常规消毒,无菌条件下自股骨中段至膝关节切开皮肤,切断除股骨、股动静脉、股神经及坐骨神经以外的所有结构。股骨开窗,明胶海绵填塞阻断髓腔血流;用血管夹夹闭股动、静脉。夹闭8 h后放松血管夹恢复血流,然后依次缝合各层组织,建立IR动物模型。

1.3 标本制备及指标的检测

连同髌骨切取髌上滑囊,取约0.2 g的滑膜置冰浴中用组织匀浆仪制成10%的匀浆液,-70 ℃保存,集中测定脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量[1];其余滑膜组织连同髌骨用4%的多聚甲醛固定,脱钙后制成石蜡切片,HE染色,光镜观察滑膜组织的病理变化并计每高倍视野白细胞数。

1.4 统计学方法

所有计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析进行数

作者简介:孙新君(1969-),男,安徽省涡阳县人,博士研究生,医师,主要从事创伤骨科、显微外科方面的研究。电话:(023)68757971

收稿日期:2000-11-17;修回日期:2001-01-10

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

据处理。

2 结果

2.1 滑膜组织匀浆MDA、SOD的测定结果

缺血后4、6、8、10 h滑膜组织中MDA的变化与正常对照组无显著性差异($P>0.05$)，再灌注后实验侧MDA含量明显高于实验对照侧、缺血组及正常对照组($P<0.05$)；其变化呈双峰，IR 1 h达第一个峰值，随后逐渐降低，IR 12 h再次升高，24 h达第二个峰值，然后又逐渐回落，但术后两周IR侧仍高于正常和对照组。组织匀浆中SOD随缺血时间的延长逐渐降低；再灌注后SOD进一步降低，IR 12 h达最低点，以后缓慢回升，IR后2周仍明显低于正常，见表1、2。

表1 不同缺血时间滑膜组织中MDA、SOD的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of MDA and SOD in normal and ischemic synovium($\bar{x}\pm s$)

	Normal control (n=5)	Ischemia group(n=5)			
		4 h	6 h	8 h	10 h
MDA(nmol/g)	71.89±6.36	73.75±13.23	73.22±5.14	72.81±3.22	76.88±10.83
SOD(U/ml)	77.37±12.44	73.08±12.89	55.33±15.43★	53.85±19.62★	45.73±8.92★

★: $P<0.05$ *vs* normal control

表2 IR与对照侧滑膜组织MDA的动态变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Dynamic changes of MDA in the synovium of IR and control group($\bar{x}\pm s$)

	Time after IR(n=5)							
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h
MDA(nmol/g)								
Test side	136.22±16.03*	98.44±10.52*	80.81±8.46	128.13±25.16*	184.60±33.54*	144.64±15.75*	119.33±5.78*	92.31±16.21*
Control side	73.78±7.51	73.40±7.89	73.25±3.22	79.74±15.82	125.73±23.60	110.04±15.44	73.41±15.80	72.02±15.36
SOD(U/ml)								
Test side	38.26±1.89*	34.64±3.81*	34.09±3.44*	37.82±3.81*	39.72±3.12*	41.23±2.68*	42.85±1.64*	43.34±2.43*
Control side	76.62±9.58	76.89±8.22	75.44±11.12	71.44±5.87	73.32±8.17	75.61±3.89	76.57±7.41	76.68±8.04

*: $P<0.05$ *vs* control side

2.2 病理学观察

正常滑膜由1～4层滑膜细胞及滑膜下层构成；滑膜下层富含大量的毛细血管、胶原纤维，其间有散在的成纤维细胞和少量的巨噬细胞。缺血4 h，滑膜组织轻度水肿，细胞未见明显改变；缺血6 h，可见表层滑膜细胞由梭型变为椭圆或圆形、间质成纤维细胞肿胀变大，此时，小血管内有红色血栓形成，组织间隙有大量的红细胞漏出，血管及组织间隙有少量炎细胞浸润；缺血8 h，除上述病变外，可见小动静脉内皮细胞肿胀，关节腔内可见淡红色渗出物，内含少量红细胞及粒细胞。缺血10 h即可见明显的细胞核碎裂、核溶解。缺血8 h后进行再灌注，再灌注1～3 h，滑膜组织淡染，结构完整；小血管内见红色血栓，内皮细胞脱落，管腔内见少量炎细胞，毛细血管呈缺血状。再灌注6 h，有少量滑膜细胞坏死，炎细胞除见于小血管及毛细血管外，并游出管腔达组织间隙；对照侧滑膜间质轻度肿胀。再灌注12 h，滑膜组织内可见程度不同的坏死灶；滑膜的完整性破坏，可见滑膜细胞脱落至关节腔。部分小动静脉内有红、白血栓，内皮细胞脱落；滑膜间质有大量的中性粒细胞(PMN)；关节腔内有淡红色渗出物，高倍镜下可见大量的红细胞和PMN，见图1A；对照侧滑膜间质轻度肿胀，亦有少量的PMN，但组织结构清晰。再灌注24 h，滑膜间质灶性出血加重并见大量淡红色物质；小血管腔内充满红细胞，内皮细胞脱落，毛细血管管腔消失，代之为出血灶；滑膜间质除PMN外，可见巨噬细胞增多。对照侧间质水肿，有少量PMN及巨噬细胞；小血管轻度充血。再灌注72 h，除上述改变外，尚可见间质小动静脉内皮脱落、管壁结构破裂，红细胞漏出。再灌注1周，关节腔仍有淡红色渗出物，滑膜细胞未见修复，组织呈贫血状，间质血管明显减少，巨噬细胞数增加。再灌注2周，滑膜组织残存细胞增生，间质可见大量的成纤维细胞及巨噬细胞，小血管内膜修复基本完成，出现新生毛细血管，整个视野类似肉芽组织，见图1B。

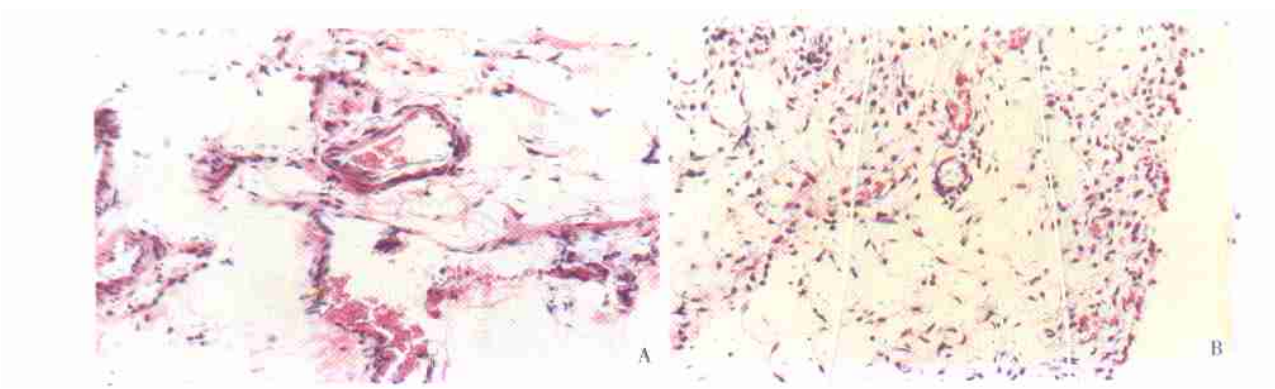


图1 缺血再灌注后滑膜组织的病理变化 (HE×200)

Fig 1 Pathological changes in synovium after ischemia-reperfusion injury (HE×200)

A: Reperfusion 12 h after ischemia for 8 h; B: Reperfusion 2 weeks after ischemia for 8 h

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

2.3　透射电镜结果

缺血 6~8 h 后, 滑膜细胞表现为基质电子密度降低, 线粒体嵴突排列紊乱、变短; 染色质出现凝块现象。缺血 10 h, 滑膜细胞及内皮细胞出现染色质边集, 毛细血管内皮细胞有空泡形成, 紧密连接变松弛。再灌注 72 h 内, 滑膜细胞、内皮细胞胞浆水肿, 并有弥漫性染色质结块、凝集; 出血灶处内皮细胞崩解。再灌注后 2 周, 突出表现为新生毛细血管出现, 但此时, 内皮细胞肿胀, 滑膜细胞胞浆粗面内质网、分泌颗粒减少(B 型); 间质成纤维细胞胞浆内含大量粗面内质网。

2.4　PMN 在 IR 过程中的动态变化

粒细胞在 IR 的最初 3 h 无明显变化, 自 IR 6 h 起急剧增高, 72 h 达峰值, 然后缓慢降低; 且在此阶段, 其变化与滑膜组织 MDA 的动态变化密切相关($r=0.69$, $P<0.05$), 见表 3。

表 3　PMN 在滑膜 IR 中的动态变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Dynamic changes of MDA and PMN in the synovium of IR group($\bar{x}\pm s$)

	Time after IR($n=5$)							
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h
PMN(/HPF)	4.23±1.24	4.87±0.84	5.02±1.34	19.45±2.81	21.36±2.13	24.72±3.51	21.05±1.49	18.30±3.54

3　讨论

断(肢)指再植后, 特别是缺血时间较长的肢体常发生不同程度的功能障碍。以往多注重关节外结构的损伤, 对关节内滑膜结构在此过程中的变化认识不够。为此, 我们模拟断肢再植过程, 建立了滑膜 IR 动物模型, 观察了 IR 对滑膜的损伤及关节功能的影响。

本研究结果显示, 缺血阶段滑膜组织 MDA、炎细胞变化不明显, 组织水肿随缺血时间延长而加重, 这可能是组织细胞 ATP 消耗后细胞内大量液体外渗的结果。再灌注早期(6 h 内)组织病理变化以血管内皮细胞出现明显的水肿及脱落为主, 此时滑膜组织 MDA 较对照侧及缺血组增高, 而炎细胞计数无统计学差异, 提示关节缺血再灌流早期的组织损伤可能与再灌注早期血管内皮细胞本身黄嘌呤氧化酶系统被激活, 产生大量自由基引起的组织脂质过氧化损伤有关[2,3]。

在 IR 6~72 h, 滑膜组织 MDA 含量进行性增加且与组织内的 PMN 数量增加成正相关。在此期间, 滑膜组织中的大量毛细血管消失、小血管破裂, 间质发生灶性出血, 因而进一步加重了组织缺血, 造成组织细胞的死亡、滑膜细胞脱落、关节腔渗液。这可能是因为缺血损伤的组织细胞在 IR 过程中释放出大量的前炎症因子和细胞因子等, 趋化循环血中的 PMN 前往缺血再灌流区, 这些 PMN 在与内皮细胞的粘附、向组织中游走和聚集的过程中, 同时被激活, 通过呼吸爆发可产生和释放大量的氧自由基[4~6]。而这种粒细胞在炎症反应中因呼吸爆发释放大量自由基造成的继发再灌注损伤可能比原发损伤更严重[7]。随着继发再灌注的进展, IR 24 h 自身对照侧 MDA 亦明显升高, 这种全身性反应还表现在其他器官, 我们观察到 IR 24 h 肺组织明显水, 甚至有休克肺的发生。因此, IR 不但对局部滑膜造成损伤, 也可损伤其它器官[8]。

自缺血 4 h, 滑膜组织中 SOD 开始下降; 再灌注阶段进一步降低, 且 2 周内一直持续在低水平。因此 IR 不但是自由基大量产生的结果, 也和组织对自由基的清除能力降低有关[9]。IR 后第 2 周, 因缺血内皮的修复和毛细血管的出现, 缺血状态得到缓解。残存滑膜细胞开始增生, 以间质成纤维细胞最为明显, 其间有大量的巨噬细胞侵入, 整个组织状似肉芽组织, 这可能是滑膜炎的病理基础; 滑膜的 IR 损伤是否继发创伤性关节炎值得进一步深入研究。在实验中, 我们观察到原发再灌注血管内皮损伤后通透性增加, 再加上随后的血管床大量破坏造成组织缺血-再灌注损伤-进一步缺血的恶性循环致使滑膜组织长时间处于缺血状态。这些可能是临床上缺血后"不再流"的病理基础。

综上所述, 滑膜组织 IR 损伤是组织中产生的自由基超过机体的清除能力引起的。初期以血管内皮细胞的原发性损伤为主, 是造成继发 IR 损伤的基础, 随后的继发性损伤与炎细胞的大量浸润和自由基的产生有密切的关系。如能采取一定措施延长缺血耐受时间或阻断再灌注的病理环节, 尤其是继发再灌注的发生和发展, 能否减轻组织的损伤有待进一步研究。

参考文献:

[1] Gutteridge J M, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems[J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15(4): 129—135.

[2] Hensel M, Volk T, Kox W J. The influence of cellular hypoxia and reactive oxygen species on the development of endothelial cell edema[J]. Int J Microcirc Clin Exp, 1997, 17(2): 67—74.

[3] Beetsch J W, Park T S, Dugan L L, *et al*. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells [J]. Brain Res, 1998, 786(1—2): 89—95.

[4] Fraticelli A, Serrano C V Jr. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1 310(3): 251—259.

[5] Formigli L, Manneschi L I, Adembri C. Expression of E-selectin in ischemic and reperfused human skeletal muscle[J]. Ultrastruct Pathol, 1995, 19(3): 193—200.

[6] Wyble C W, Desai T R. Physiologic concentrations of TNFalpha and IL-1 beta released from reperfused human intestine upregulate E-selectin and I-CAM-1[J]. J Surg Res, 1996, 63(1): 333—338.

[7] Xing X, Guo E, Xu F. Changes in surface microcirculation of extensor digitorum longus tendon after ischemia-reperfusion of rabbit hindlimbs[J]. Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih, 1995, 11(4): 270—273.

[8] Koike K, Yamaoto Y. Splanchnic hypoperfusion and distant organ injury [J]. Nippon Gekkai Zasshi, 1999, 100(5): 357—360.

[9] 赵世民. 医学自由基的基础与临床[M]. 济南: 山东大学出版社, 1993.58—130.

(编辑　薛国文)

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