DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.025
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1188 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1188-03

大鼠内毒素血症时外周血及肺泡内PMN死亡方式及呼吸爆发的检测

肖 南,刘 韧,田昆仑,刁有芳,汪志文 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 观察大鼠内毒素血症时肺组织中及外周血中性粒细胞(PMN)凋亡、坏死及功能改变的差异。方法 Wistar大鼠25只,腹腔注射内毒素(LPS)(O55:B5,5 mg/kg)造成内毒素血症,分别在给予LPS前(对照)及给予LPS后2、4、8、12 h(每组5只动物)取血及支气管肺泡灌洗,密度梯度法分离PMN,用流式细胞仪测定凋亡和坏死比例以及呼吸爆发功能的改变。结果 内毒素血症时,外周血和支气管肺泡灌洗液中PMN凋亡细胞比例相似。但与对照相比,外周血PMN坏死比例明显增加,呼吸爆发能力明显受抑,而支气管肺泡灌洗液PMN坏死比例显著减少,呼吸爆发能力显著增强。结论 在内毒素血症时,扣押于肺组织中的PMN在凋亡和坏死上表现出与外周血PMN不同的改变,其结果是组织中PMN存活PMN增加,并持续处于活化状态,这与PMN造成组织损伤有关。

关键词:中性粒细胞;凋亡;坏死;呼吸爆发;内毒素血症
中图法分类号:R329.28;R331.14;R515.3 文献标识码:A

Apoptotic pattern of polymorphonuclear neutrophils in peripheral blood and alveolus and detection for respiratory burst in endotoxemia rats

XIAO Nan, LIU Ren, TIAN Kun-lun, DIAO You-fang, WANG Zhi-wen (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the differences of the peripheral polymorphonuclear neutrophils (PMN) and the PMN extravasated into pulmonary tissues in apoptosis, necrosis and respiratory burst following endotoxemia. Methods Twenty-five Wistar rats were subjected to endotoxemia induced by intraperitoneal injection of LPS (O55:B5, 5 mg/kg). Blood samples were collected and the bronchoalveoli were lavaged pre-LPS and 2, 4, 8 and 12 h after LPS injection. After PMN was isolated with density gradient centrifugation, the apoptosis, necrosis of and respiratory burst of PMN were determined with flowcytometry. Results The apoptotic rate of PMN in peripheral blood was similar with that in bronchoalveoli lavage fluid (BLF). But compared with control, the PMN necrosis was increased and respiratory burst was suppressed significantly in peripheral blood after endotoxemia. While, for the PMN in BLF, the necrosis was decreased and respiratory burst was increased significantly. Conclusion Out results indicate that the PMN extravasted into the pulmonary tissue has different characters in apoptosis, necrosis and respiratory burst compared with peripheral PMN. The apoptosis of tissue PMN is delayed and the cytotoxicity increased. Thus, the retention of PMN in tissues and the abnormality in apoptotic pathway inevitably generate persistent activation of PMN and excessive release of toxic substances, which might result in tissue injury.

Key words: polymorphonuclear neutrophils; apoptosis; necrosis; respiratory burst; endotoxemia

多形核粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil,PMN),又称中性粒细胞,在炎症的发生发展,消退及组织损伤中具有非常重要的作用。在一般的炎症过程中,游入组织的PMN在完成吞噬、灭菌作用后即发生凋亡,而不引起组织细胞的损伤[1]。那么,在创伤或感染时,游出血管到达组织的PMN其转归如何,与循环血中PMN有何区别,目前研究尚少。本实验通过大鼠内毒素血症模型,动态观察肺组织中和循环血中PMN凋亡、坏死及功能改变的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

内毒素(Lipopolysaccharide,LPS)O_{55}:B_5(Sigma),血细胞分离液Histopaque 1119及1083(Sigma),Annexin-V-FLUOS,B.M.,碘化丙啶(Propidium iodide,PI,Sigma),二氢罗得明123(Di-hydrorhodamine 123,DHR123,Sigma),佛波酯(Phorbol 12-myristate-13-acetate,PMA,Sigma)。

1.2 模型制备及处理

健康Wistar大鼠25只,雌雄不拘,190~260 g,腹腔注射5 mg/kg LPS造成内毒素血症,分别在给予LPS前(对照)及给予LPS后2、4、8、12 h行颈动脉插管取血(每时相点5只大鼠),3.8%柠檬酸钠1:4~1:9抗凝,用于分离PMN;另用10 ml DMEM行支气管肺泡灌洗2次,收集灌洗液用于PMN分离及通透指数测定。

1.3 大鼠外周血及支气管肺泡灌洗液PMN的分离[2]

大鼠抗凝血2.5 ml,支气管肺泡灌洗液离心后沉淀用2.5 ml DMED重悬,分别与Histopaque 1119及Histopaque 1083(Sigma)进行密度梯度离心,700× g,离心30 min,取PMN富集层。用0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)洗2遍,低渗法溶解红细胞,0.01 mol/L PBS洗1遍。瑞氏-姬姆萨染色,外周血PMN纯度>95%,灌洗液PMN纯度>88%,并计数PMN数量。

1.4 大鼠PMN凋亡和坏死细胞比例测定[3]

Annexin V和PI双标法,流式细胞仪双通道检测5 000个细胞,激发波长488 nm,发射波长515、610 nm。Annexin V阳性为凋亡细胞,PI阳性为坏死细胞,Annexin V、PI双阳性为凋亡晚

作者简介:肖 南(1963-),男,四川省南充市人,博士,副研究员,主要从事战创伤休克、血液代用品、战救器材方面的研究,发表论文24篇。电话:(023)68757452

收稿日期:2000-07-28;修回日期:2001-02-09

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

期/ 坏死细胞。

1.5　大鼠 PMN 呼吸爆发的测定[4]

80μl PMN 悬液中加入 20μl 10μmol/ L DHR123, 37 ℃标记 5 min, 加入 2μl PMA 溶液(500 nmol/ L)刺激 10 min, 然后在流式细胞仪上检测 5 000 个细胞, 激发波长 488 nm, 发射波长 510～550 nm, 结果以 LnMCF 表示。

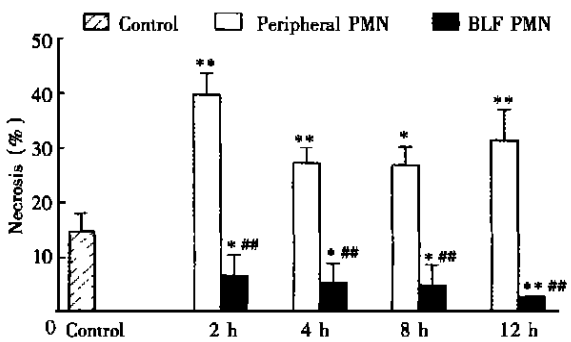
1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　外周血及肺泡灌洗液中 PMN 凋亡和坏死改变

正常时外周血 PMN 凋亡和坏死比例分别为 65.7% 和 14.83%, 而支气管肺泡灌洗液正常时 PMN 极少, 故未能检出。给予 LPS 后, 外周血中 PMN 的凋亡在 2 h 有一过性降低($P<0.05$), 随后恢复到伤前水平; 灌洗液中 PMN 的凋亡与外周血相比各时相点差异均无显著性, 见表 1。外周血 PMN 坏死在给予 LPS 后 2 h 即显著升高($P<0.01$), 各时相点均显著高于对照, 分别为对照的 2.68、1.84、1.82 和 2.13 倍; 与此相反, 灌洗液 PMN 坏死在给予 LPS 后 2 h 即显著降低($P<0.05$), 以后降低更为明显直至 12 h($P<0.01$), 与同时相外周血 PMN 坏死相比, 其坏死比例分别为外周血的 16.87%、20.05%、18.63% 和 9.27%, 见图 1。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* peripheral PMN

图 1　内毒素血症不同时间外周血和支气管肺泡灌洗液 PMN 坏死比例(%)改变

Fig 1　Necrosis (%) PMN in peripheral and brochoalveoli lavaged fluid (BLF) following endotoxmia

表 1　内毒素血症不同时间外周血和支气管肺泡灌洗液 PMN 凋亡比例的改变(%, $\bar{x}\pm s$)

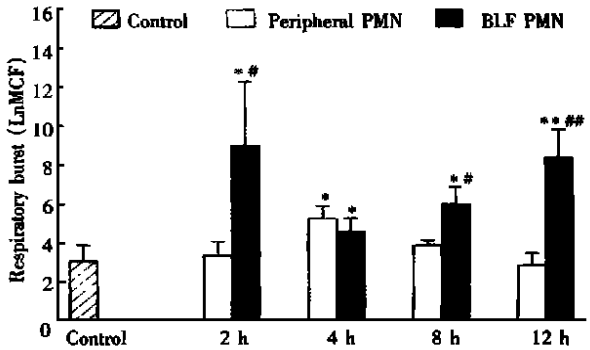
Tab 1　Apoptosis of peripheral and bronchoalveolar lavage fluid PMN following endotoxemia in rat (%, $\bar{x}\pm s$)

	Control ($n=5$)	Time after LPS(5 mg/ kg) injection ($n=5$)			
		2 h	4 h	8 h	12 h
Peripheral PMN	65.70±10.40	42.70±4.21 *	58.00±7.20	64.00±10.32	52.35±11.82
BLF PMN		53.33±17.97	57.10±13.33	44.60±1.13	64.95±3.01

*: $P<0.05$ *vs* control

2.2　外周血及肺泡灌洗液 PMN 呼吸爆发的变化

伤后 4 h 外周血 PMN 呼吸爆发与对照相比显著增强($P<0.05$), 8 h 恢复至对照水平; 而灌洗液 PMN 呼吸爆发从 2 h 即显著增强($P<0.05$), 随后稍有降低, 但仍较对照差异显著($P<0.05$), 8 h 后又明显升高, 12 h 为对照的 2.72 倍($P<0.01$)。灌洗液 PMN 呼吸爆发在 2、8、12 h 均明显高于同时相外周血 PMN, 见图 2。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* peripheral PMN

图 2　内毒素血症不同时间外周血和支气管肺泡灌洗液 PMN 呼吸爆发(LnMCF)改变

Fig 2　Respiratory burst (LnMCF) of PMN in peripheral and brochoalveoli lavaged fluid (BLF) following endotoxmia

3　讨论

循环血 PMN 的生存周期很短, 生理条件下主要以凋亡的形式被清除。但在炎症反应时, PMN 大量游出血管进入炎症部位。进入组织中的 PMN 转归如何, 如是发生凋亡还是坏死, 是迅速被清除还是持续存在于组织中, 以及其功能改变等, 对炎症的发展、消退和组织损伤都具有重要的影响。本实验结果显示, 大鼠内毒素血症后, 外周血 PMN 凋亡比例无明显变化, 但坏死比例明显升高, 其结果必然是存活的细胞比例降低; 而肺泡中 PMN 凋亡比例亦无明显变化, 但坏死比例却明显降低, 其结果是存活的细胞比例升高。提示内毒素血症时, 循环血 PMN 和肺泡内 PMN 的最终转归有所不同。循环血 PMN 主要以坏死为主, 而 PMN 游出血管到达肺组织后, 在肺中大量聚集并长时间存活, 这一现象也被称为凋亡延迟。我们还发现, 内毒素血症时, 外周血 PMN 呼吸爆发在 4 h 明显增强, 8 h 已降到伤前水平; 而肺灌洗液 PMN 的呼吸爆发表现为 2 h 时显著增强, 4 h 虽有所降低, 但以后又逐渐升高并显著高于循环 PMN。说明循环 PMN 和组织 PMN 在功能表现上也不相同, 前者呼吸爆发功能受到抑制, 而后者则明显增强, 一直处于高度活化状态。由于 PMN 大量扣押于肺组织中, 一方面存活时间延长, 凋亡延迟, 另一方面呼吸爆发增强, 处于持续激活状态, 其结果势必造成大量炎症内容物的持续释放, 从而导致肺组织细胞的损伤。

凋亡区别于坏死的重要之处是凋亡的细胞能被巨噬细胞或周围组织细胞平稳识别、清除而不引发炎症反应[1]。通过调亡方式清除炎症局部的 PMN 是限制组织损伤, 促进炎症吸收的重要机制[5]。油酸导致的

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

急性肺损伤及其炎症吸收过程即与 PMN 的凋亡有密切关系[6]。目前已经明确多器官功能不全综合征(MODS)是过度炎症反应的结果,在创伤或感染后 MODS 高风险的病人中即存在 PMN 凋亡延迟[7],PMN 凋亡的异常在 MODS 的发生发展中可能具有重要的作用。内毒素等许多因素均可造成 PMN 凋亡延迟[8,9]。本实验结果与上述基本一致,并进一步证实,游出血管到达肺泡的的 PMN 凋亡延迟,存活时间处长,大量产生和释放炎症介质,造成周围组织细胞的损伤。因此,进一步研究 PMN 凋亡的调控,对改善 PMN 的转归,限制过度炎症反应,促进炎症吸收具有重要的意义。

参考文献:

[1] Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation[J]. J Leukoc Biol, 1997, 61(4): 375-380.
[2] Szucs S, Varga C, Ember I, *et al*. The separation of the granulocytes from different rat strains. A comparative study[J]. J Immunol Methods, 1994, 167(2): 245-251.
[3] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, *et al*. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V[J]. J Immunol Methods, 1995, 184(1): 39-51.
[4] Smith J A, Weidemann M J. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1993, 162(2): 261-268.
[5] Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes[J]. Clin Sci, 1992, 83(6): 639-648.
[6] Hussain N, Wu F, Zhu L, *et al*. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 19(6): 867-874.
[7] Biffl W L, Moore E E, Zallen G, *et al*. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in the injured patients at risk for multiple organ failure[J]. Surgery, 1999, 126(2): 198-202.
[8] Sweeney J F, Nguyen P K, Omann G M, *et al*. Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways[J]. J Surg, 1998, 74(1): 64-70.
[9] Matute B G, Liles W C, Radella F, *et al*. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2000, 28(1): 1-7.

(编辑 郭建秀)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)10-1190-01

异位胰腺 18 例临床分析

Clinical analysis of 18 cases with heterotopic pancreas

张红宾[1], 房殿春[2], 刘海峰[2], 张翼军[1] (第三军医大学附属西南医院: [1] 血液内科; [2] 全军消化专科中心; 重庆 400038)

异位胰腺是一种先天性异常,可引起消化道出血、溃疡、梗阻、炎症等并发症。我院自 1970-2000 年共收治 18 例,现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

男性 11 例,女性 7 例,年龄 13~59 岁,平均 36.6 岁。上腹部疼痛 14 例(其中 1 例有腰部放射痛),黑便 6 例,返酸、嗳气 4 例,恶心、呕吐 3 例,发热 2 例。上腹部压痛 10 例,扪及腹部包块 4 例。16 例患者病程 2~192 月,平均 45 月,另 2 例为外伤后急诊手术时意外发现。其中异位胰腺位于胃部 7 例,十二指肠 4 例,小肠 7 例。

1.2 辅助检查

胃镜下 3 例患者可见圆形、半球形、乳头状隆起,可有脐样凹陷。6 例患者行 B 超检查 4 例见胰头增大。17 例患者行手术治疗。1 例行高频电凝切除治疗。病理检查结果均提示异位胰腺。3 例为术前确诊,4 例术前均误诊为胃、十二指肠、空肠的慢性炎症,1 例误诊为胃息肉,4 例误诊为胰腺包块,4 例误诊为肠道肿瘤。术前确诊率为 16.7%,误诊率达 72.2%。

2 讨论

胃异位胰腺组织(Ectopic pancreas)也称迷路胰腺(Aberrant pancreas)、胰腺残余(Panreas rest),是一种先天性疾病,是不在胰腺床上的无血管、神经及解剖连续性的异位聚集。多数学者认为其产生和胰腺原基与胚胎肠粘连或穿透原肠壁,并随原肠旋转而分布于各种异常部位。临床上比较少见,其发生率约 0.6%~13.7%,可发生于任何年龄组,男性是女性的 2~5 倍[1]。可见于十二指肠、胃、空肠及 Meckel 憩室、胆囊、肠系膜、大网膜、肝脾胆管、横结肠等部位。

异位胰腺可分为两型: ①完全型: 具有所有内外分泌结构的异位胰腺; ②不完全型: 缺乏导管结构的异位胰腺。前者分泌的各种消化酶可通过导管排入消化道并刺激其黏膜细胞,从而引起上腹部疼痛,甚至破坏消化道粘膜的结构引起糜烂、出血、溃疡、梗阻及消瘦、食欲减退、恶心、呕吐等临床症状[2]。后者多无临床表现,而在上消化道 X 线检查、内镜检查或腹部手术时偶尔发现。本组 14 例有上腹部疼痛,4 例伴返酸、嗳气。2 例为右下腹疼痛。2 例为外伤时手术中发现。由于异位胰腺位置多变,临床表现复杂,诊断较为困难,术前误诊率很高,本组 18 例患者中 13 例误诊,误诊率达 72.2%。上消化道钡餐造影发现幽门前区充盈缺损,加压后出现脐样征,切线位有导管征常提示胃异位胰腺。但对于消化道造影缺乏特异征象者,常很

(下转 1196 页)

作者简介: 张红宾(1973-),男,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事血液病方面的研究,发表论文 10 篇。电话: (023)65321062

收稿日期: 2001-05-15; 修回日期: 2001-07-18

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