DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.034
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0193-03

论著

胸部撞击后肺组织细胞凋亡的变化及其意义

董 蕨,刘宝松,汪志文 (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 探讨胸部撞击后肺损伤特点、肺组织细胞凋亡分布特征及其在肺损伤发生中的作用。方法 建立大鼠重度肺撞击伤模型,采用流式细胞术、免疫组化和形态学方法观察肺病理变化和细胞凋亡情况。结果 撞击侧肺(右肺)发生明显的出血、充血、水肿,光镜下可见肺组织较广泛的出血和结构破坏。对侧肺(左肺)伤情明显轻于右肺。伤后24 h双侧肺组织中细胞凋亡率均显著高于伤前水平($P<0.05$)。右肺伤后48 h迅速升高,72 h达峰值,之后逐渐下降,伤后1周接近伤前水平。左肺组织细胞凋亡率显著低于右肺($P<0.05$),在伤后48 h达高峰,72 h明显降低并接近伤前水平。右肺伤后24 h细胞凋亡以支气管、血管内皮和肺泡上皮为主,72 h以炎性细胞为主。结论 支气管、血管内皮和肺泡上皮是应力波作用的主要部位,该区域发生的细胞凋亡是肺水肿及继发性肺损伤的发生的重要原因之一。

关键词:肺;撞击伤;细胞凋亡
中图法分类:R322.35;R329.25;R642 文献标识码:A

Changes and significance of lung cell apoptosis in rat after chest impact

DONG Hong, LIU Bao-song, WANG Zhi-wen (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the characteristics of lung injury, lung cell apoptosis and its significance in the injury. Methods An animal model of severe lung impact injury was established in Wistar rat by impacting the right chest. The pathological changes and cell apoptosis were observed with flow cytometry, immunochemical and other morphological methods. Results The right lung showed obvious hyperaemia, congestion and edema and with extensive blood extravasation and destruction of tissues, but only edema was seen in the left lung. The apoptotic rate in bilateral lung was significantly higher at 24th h post-injury than that in pre-injury ($P<0.01$). The apoptotic rate in right lung rose rapidly at hour 48, reached a peak at hour 72 after the injury and then declined. It came to the normal level 1 week after injury. The rate of apoptosis in left lung reached a peak 48 h after injury and recovered obviously at 72 h, which was closed to pre-injury level. Significant difference was found in the apoptosis between right lung and left lung ($P<0.05$). The apoptotic cells in right lung were mainly bronchial, vascular endothelial and alveolar epithelial cells 24 h after the injury, and were inflammatory cells at the 72 nd h. Conclusion The stress wave mainly affects bronchial, vascular endothelia and alveolar epithelia, so the apoptosis in these regions is one of major causes of lung edema and secondary injury after impact.

Key words: lung; impact injury; apoptosis

肺撞击伤是平时交通事故和意外事故中的常见伤类,肺创伤所致的呼吸功能异常和继发的炎性反应过程在全身炎性反应综合征和MODS的发生中起着重要作用[1]。胸部受到撞击时,应力直接作用和应力波间接作用一方面导致肺组织结构的破坏,即原发损伤;另一方面还可引起原发损伤区域周围发生肉眼不可见的细胞结构损伤,并进一步引起细胞的不可逆死亡,这种损伤过程可能在伤后肺水肿和继发性损伤的发生过程中起重要作用。本研究在肺原发损伤特点研究的基础上,观察应力波所致的支气管、血管内皮和肺泡上皮等部位细胞结构损伤的特点,以及继发的细胞凋亡变化,探讨其在伤后肺水肿和继发性损伤发生中作用及可能机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39630330)
作者简介:董 蕨(1971-),男,湖北省宜城市人,硕士,实习研究员,主要从事交通伤、撞击伤方面的研究。电话:(023)68757474
收稿日期:2000-02-21;修回日期:2000-07-27

1 材料与方法

1.1 动物分组及致伤

健康成年Wistar大鼠42只,雌雄不限,体重(220.71±20)g,随机分为伤前组和伤后6、24、48、72 h和1周组,每组7只。以质量浓度为15 g/L的戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉,选择右锁骨中线与第5、6肋间交界处为撞击点,去毛后平卧固定于撞击台上,以小型生物撞击机(本室自行研制)致伤,驱动气压为185 kPa,撞击管出口距撞击处约1.5 cm,撞击头重4.59 g,撞击面积为38.47 mm^2。

1.2 一般情况监测

用多功能监护仪(HP M1166A型,美国)连续监测致伤前后的心率、呼吸、体温(肛温)及动脉血压。

1.3 病理观察

在相应时相点将动物麻醉后放血活杀,仔细观察腹、胸腔损伤分布情况,用表1所示肺损伤评分方法对损伤严重程度进行评分。于损伤边缘部位取材做光镜观察,残留左右肺组织分别称量湿重后,放入烤箱内80 ℃烤72 h,称量干重,依据公式:肺干湿重比=(湿重-干重)/湿重×100%计算左右肺干湿重比。

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

表 1 伤情评分

Tab 1 Scoring of lung impacted injury

Score	Injury
1	Petechia, without pneumonedema
2	Area of pneumorrhagia< 20%, mild pneumonedema
3	Area of pneumorrhagia< 40%, medium pneumonedema
4	Area of pneumorrhagia< 60%, serious pneumonedema
5	Area of pneumorrhagia> 60%
6	Laceration

1.4 细胞分离

分别取左、右肺，置于无菌培养皿中，剪碎，置于过滤离心管（滤过直径 35 μm，Becton Dickinson，New Jersey）中，4 ℃，300× g 离心 1 min，去上清后加入 PBS，混匀成细胞悬液。

1.5 左、右肺组织细胞凋亡率检测

使用 Annexin V/PI 试剂盒，将细胞悬液计数调整成 1×10^6/ml 的浓度，用 Binding buffer 液冲洗，4 ℃，300× g 离心 1 min，去上清后依次加入 250 μl Binding buffer、5 μl FITC-AnnexinV 和 5 μl PI，混匀，冰浴反应 10 min 后，上流式细胞仪（Coulter，美国）检测。激发光波长为 488 nm，FITC 发射波长为 525 nm，PI 发射波长为 610 nm。正常细胞 FITC 及 PI 均低染（$FITC^-PI^-$），凋亡细胞 FITC 高染而 PI 低染（$FITC^+PI^-$），死亡细胞 FITC 及 PI 均高染（$FITC^+PI^-$）。

1.6 TUNEL 法检测凋亡细胞分布

使用细胞凋亡检测试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司，编号 MK1020）检测肺撞击伤后不同时间肺组织中凋亡细胞的类型，方法参照试剂盒说明书进行。阳性结果判定：细胞核染色为黄褐色者为阳性细胞（凋亡细胞）。

1.7 统计学处理

各参数以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 8.0 for Windows 进行 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况

所有动物伤后均出现呼吸暂停，持续约 5 s，之后出现浅、快呼吸，频率由伤前的（67±9）次/min 迅速增加至（123±14）次/min，伴呼气性水泡音；心率由伤前的（340±21）次/min 降为（246±20）次/min，24 h 后逐渐恢复至正常水平；动脉血压由正常的（18.1±2.8）kPa 迅速降到（10.7±2.5）kPa，之后逐渐升高，伤后 24 h 接近正常水平。体温变化不明显。5 只（14.3%）于伤后 30 min 从鼻孔溢出少量稀薄的血性分泌物。

2.2 大体观察

致伤大鼠中，20 只（57.14%）发生撞处肋骨骨折，骨折断端未伤及胸壁血管或肺组织。腹腔、胸腔内未见积血、积液，右肺受撞区域出血、充血、水肿，伤情评分为 3.25±0.73，伤后 72 h 出血、充血区实变。左肺略饱满，仅 2 例出现出血点，伤情评分为 0.03±0.05。伤后 24～48 h 左、右肺均较饱满，干湿重比显著高于伤前（$P< 0.05$），见表 2。

表 2 左、右肺干湿重比（%）

Tab 2 Dry/Wet of left and right lung after impacting right chest (%)

	Pre-injury	Post-injury				
		6 h	24 h	48 h	72 h	1 week
Left	72.00±4.33	73.10±5.90	78.57±3.42 *	80.52±5.77 *	66.67±4.24	70.20±2.39
Right	71.46±3.88	73.14±5.17	80.13±4.10 *	77.00±4.05 *	80.00±6.76 *	71.07±3.55

*：$P< 0.05$ *vs* pre-injury

2.3 光镜观察

2.3.1 HE 染色 右肺组织结构破坏明显，主要表现广泛的肺水肿和出血，见图 1，伤后 6 h 中性粒细胞开始渗出，24～72 h 肺泡腔内充满粉红色水肿液，同时可见大量渗出的中性粒细胞，1 周后肺泡腔内水肿液消失。左肺组织结构清晰，肺泡腔内未见红细胞聚积，伤后 6 h 少量中性粒细胞渗出，24～48 h 渗出较多，肺泡中可见大量水肿液，72 h 后基本恢复正常。

2.3.2 TUNEL 法染色 伤后 24 h 可见肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞及血管内皮细胞等发生凋亡，这部分细胞胞核为梭形，呈黄褐色深染，见图 2。右肺伤后 72 h 染色阳性细胞以渗出到组织或肺泡中的炎性细胞为主，而上述细胞及巨噬细胞少见。

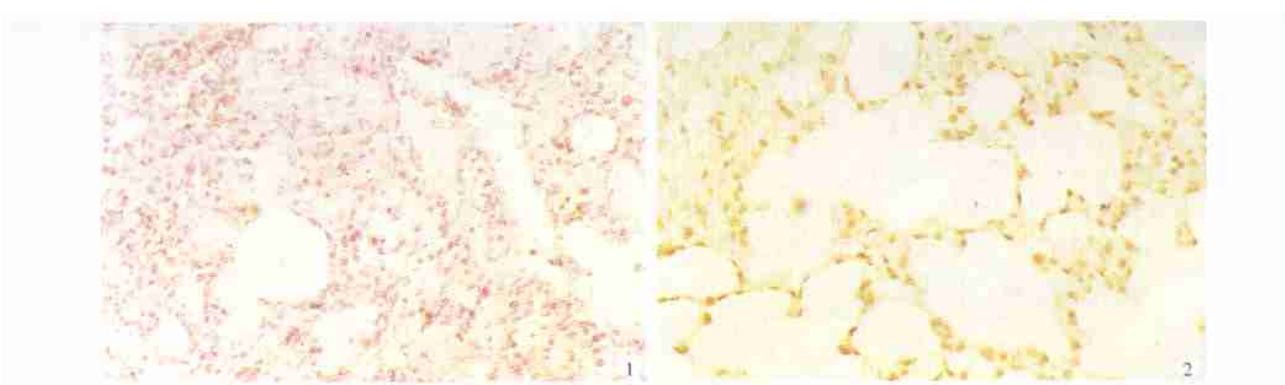


图 1 右侧胸部撞击后 48 h 右肺出血及水肿 （HE× 200）

Fig 1 Hemorrhage and edema of right lung at 48 h post-injury (HE× 200)

图 2 右侧胸部撞击后 24 h 右肺凋亡细胞分布 （TUNEL× 200）

Fig 2 Distribution of apoptotic cell in right lung 24 h after injury (TUNEL× 200)

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

2.4　细胞凋亡率的改变

伤后 24 h 双侧肺组织中细胞凋亡率均显著高于伤前水平($P<0.01$)。48 h 右肺组织中细胞凋亡率低于 24 h, 之后迅速升高, 72 h 再次达到峰值, 1 周后降至伤前水平。左肺组织伤后细胞凋亡率持续增高, 48 h 达峰值, 72 h 已接近伤前水平。与右肺相比, 左肺组织细胞凋亡出现峰值早, 但 24、48 和 72 h 显著低于右肺($P<0.05$), 见表 3。

表 3　肺组织细胞凋亡率(%)

Tab 3　Rate of apoptosis in lung (%)

	Pre-injury	Post-injury				
		6 h	24 h	48 h	72 h	One week
Left	3.40±0.14	4.04±0.41	9.61±1.30 *	15.96±0.29 *	6.39±0.51	4.40±1.76
Right	3.46±0.28	3.14±0.52	23.69±1.21 *△	21.11±0.14 *△	28.06±0.83 *△	4.57±2.59

*: $P<0.05$ *vs* pre-injury; △: $P<0.05$ *vs* left

3　讨论

本研究采用小型生物撞击机致伤大鼠单侧胸部, 造成单侧胸壁骨折、肺重度损伤, 模拟了临床胸部钝挫伤的发生过程。伤后呼吸、血压都发生了不同程度的变化。病理观察结果表明, 在撞击力直接作用下, 撞击局部肺组织发生了明显的出血、撕裂。周围区域和对侧肺组织在应力波的作用下, 也发生不同程度的损伤, 但损伤程度明显轻于撞击局部或撞击侧肺组织, 光镜下可见小血管袖套样损伤。伤前和伤后肺干湿重比的显著差异提示伤后出现了明显的肺水肿, 本实验模型结果与文献[2]报道相似。

流式细胞仪检测结果显示, 撞击伤后左、右肺组织细胞凋亡率均明显高于伤前, 提示伤后肺组织发生了继发性的损伤过程。该过程可能包含了两个方面: ①撞击瞬间外力作用(撞击局部除外)不足以引起肺组织肉眼可见的结构破坏, 但可引起细胞亚微结构的损伤, 启动细胞凋亡过程; 其检测结果对应于双侧肺组织伤后 24 h 出现的第 1 次细胞凋亡峰。免疫组化染色可见, 伤后早期凋亡细胞主要为支气管、肺泡上皮和血管内皮。该区域为组织-液体或组织-气体的交界面, 依据生物力学"剥落效应"原理[3], 该区域是应力波作用的"应力集中"部位, 因此发生了细胞结构损伤和凋亡。②伤后大量炎性细胞浸润, 释放多种酶和炎性介质, 损伤肺组织, 渗出的炎性细胞最终发生凋亡, 从而成为第 2 次凋亡峰中的主要细胞成分, 伤后 72 h 的免疫组化结果显示, 凋亡染色阳性细胞主要为渗出的炎性细胞。

比较两侧肺组织的细胞凋亡过程, 可以看出, 左侧肺组织细胞凋亡率明显低于右侧, 并只出现 1 次凋亡峰, 提示细胞凋亡的发生与肺组织受力大小密切相关。左侧肺组织远离撞击部位, 应力波强度较低, 因而组织损伤程度较轻。右侧(撞击侧)肺组织受力作用大, 损伤较重, 并可继发较严重的炎性反应, 出现第 2 次凋亡过程。血管内皮和肺泡上皮细胞的凋亡可引起血气屏障通透性增高, 导致肺水肿[4,5]。因此, 细胞凋亡是肺水肿和继发性损伤发生过程中一个值得重视的因素, 预防和控制伤后细胞凋亡的发生过程对肺撞击伤后继发性损伤的防治具有积极意义。

参考文献:

[1] 刘宝松, 王正国, 翁格文, 等. 胸部撞击时胸壁的动力学响应与胸部损伤[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(6): 338－341.

[2] Liu B S, Wang Z G, Weng G W, *et al*. Mechanisms of heart injury involving a chest impact[J]. J Traf Med, 1999, 27(1): 48－61.

[3] 王正国. 交通医学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1998. 140－182.

[4] 宋　勇, 毛宝龄, 钱桂生, 等. 急性肺损伤大鼠肺组织细胞凋亡和 Fas/FasL 表达的改变及其意义[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(3): 230－232.

[5] Biffl W L, Moore E E, Zallen G, *et al*. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure[J]. Surgery, 1999, 126(2): 198－202.

(编辑　潘式文)

(上接 192 页)

2.4　诊断思路和诊断方法

诊断思路: 对于中老年上腹痛的患者, 合并有贫血、黄疸、持续大便隐血阳性, 均要考虑本病。

诊断方法: 原发性十二指肠肿瘤的检查方法较多, 多数作者[2,3]认为最有效的检查是十二指肠镜、活检和十二指肠低张造影, 晚近 Whitfill 等[4]发现用核磁共振显像可发现小于 1 cm 的原发性十二指肠肿瘤。国内许国铭等[5]应用超声内镜检查十二指肠隆起病灶获也得满意效果。本组病人十二指肠镜和胃镜检查的阳性率为 100%, 十二指肠低张造影、B 超、CT 和有创的 ERCP、PCT 亦均能提供有价值的诊断。

关键词: 十二指肠肿瘤; 误诊

中图法分类号: R735.31　　文献标识码: B

参考文献:

[1] James R D, Thomas H, Jameson F. Improving resectability and survival in patients with primary duedenal carcinoma[J]. Am J Surg, 1993, 186(2): 626－627.

[2] 阳崇德, 刘宝华. 原发性十二指肠肿瘤 28 例临床分析: 附 710 例国内文献复习[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(6): 571－572.

[3] 逯云山, 宗修锟, 陈源光, 等. 原发性十二指肠肿瘤的诊断与治疗: 附 22 例报告[J]. 中国普通外科杂志, 1999, 8(1): 26－27.

[4] Whitfill C H, Siegelman E S, Rosato E F, *et al*. Primary carcinoid of the duodenum: detection and characterization by magnetic resonance imaging [J]. J Magn Reson Imaging, 1998, 8(5): 1 175－1 177.

[5] 许国铭, 金震东, 邹多武, 等. 超声内镜对十二指肠隆起病灶的诊断价值[J]. 中国内镜杂志, 1997, 3(1): 1.

(编辑　潘式文)

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