DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.002

文章编号:1000-5404(2000)03-0207-03

论著

烧伤合并内毒素血症早期肠粘膜损害机制的研究

王水明,刘友生 (第三军医大学附属西南医院病理研究所,重庆 400038)

提 要 目的:探讨烧伤合并内毒素血症早期肠粘膜损害的发生机制。方法:采用20%Ⅲ度体表烧伤合并小剂量内毒素(LPS 1 mg/kg)注射的大鼠模型,动态检测了肠组织血小板激活因子(PAF)、黄嘌呤氧化酶(XO)、丙二醛(MDA)等的变化。结果:烧伤合并内毒素注射后肠组织PAF升高较XO出现早,0.5 h即显著高于正常对照组,6 h达高峰,肠组织XO和MDA分别与PAF呈显著正相关($P<0.005$; $P<0.001$),MDA与XO呈显著正相关($P<0.01$),在PAF及MDA的高峰期,肠粘膜损害更明显。结论:烧伤合并内毒素血症早期肠粘膜损害的发生是由于包括PAF等炎症介质的释放,导致肠上皮细胞XO及巨噬细胞活化、自由基的产生,其后中性粒细胞的浸润,协同促进肠粘膜损害的发展。

关键词 烧伤;内毒素血症;肠粘膜损害;大鼠
中图法分类号 R574.02;R631.102;R644 文献标识码 A

A study on mechanism of early intestinal mucosal damage after burns combined with endotoxemia in rats

WANG Shui-ming, LIU You-sheng (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract **Objective**: To explore the mechanism of early intestinal mucosal damage after burns combined with endotoxemia in rats. **Methods**: After the rats were inflicted with 20%TBSA full-thickness skin burns and injected with LPS at a dosage of 1 mg/kg B.M. The dynamic changes of platelet-activating factor (PAF), xanthine oxidase (XO) and melondialdehyde (MDA) in the intestinal tissue were observed. **Results**: The increase of PAF level in the intestinal tissue in burns combined with endoxin group (BCEG) was earlier than that of XO level, and its level was higher than that in normal control group (NCG) at the 0.5th h and peaked at the 6th h after burns. Both XO activity and MDA content in the intestinal tissue were positively correlated with PAF level respectively ($P<0.001$ and 0.005). Meanwhile, the former 2 parameters were also positively correlated with each other ($P<0.01$). During the peak phase of PAF and MDA, intestinal mucosal damage was most evident. **Conclusion**: The early intestinal mucosal damage is due to activation of intestinal epithelial XO and macrophages and production of free radicals induced by release of PAF and other inflammatory mediators. Together with the infiltration of neutrophils, all of these results in the intestinal mucosal damage after burns combined with endotoxemia.

Key words burns; endotoxemia; intestinal mucosal damage; rat

肠源性内毒素血症是严重烧伤病人早期常见的合并症,也常常是引起严重烧伤后多器官功能衰竭的重要原因之一,而肠粘膜屏障功能损害是其发生的关键[1]。近年来,一些作者在不同的动物模型及临床研究中观察到,黄嘌呤氧化酶活化、中性粒细胞的浸润、PAF及脂质过氧化等均参与了肠粘膜损害[2]。在烧伤合并内毒素血症条件下上述因素在肠粘膜损害中的作用如何?尚未见文献报道。为此我们以大鼠20%Ⅲ度体表烧伤合并小剂量内毒素注射的大鼠模型,探讨这些因素在肠粘膜损害发生中的作用。

作者简介:王水明(1970.11),男,四川省仁寿县人,硕士,助教,主要从事烧伤病理方面研究。电话:(023)68752249

收稿日期:1999-09-22;修回日期:1999-12-26

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组

选用健康 Wistar 大鼠 154 只，雌雄各半，体重(225±25)g，按随机数字表法分为烧注组(BCEG)、单烧组(SBG)、单注组(SEG)和正常对照组(NCG)。大鼠致伤按本室的方法[3]进行，大鼠背部脱毛后，以3%凝固性汽油均匀涂布于脱毛皮肤，燃烧30s，造成20% TBSA Ⅲ度烧伤。烧注组于烧伤后一次性腹腔注射 *E. Coli* $O_{111}B_4$ 纯化脂多糖(Lipopolysaccharide，LPS，Sigma 按1 mg/kg 体重，用 2 ml 无菌生理盐水稀释)；单烧组仅造成20%TBSA Ⅲ度烧伤，并于伤后腹腔注射 2 ml 无菌生理盐水；单注组除不造成体表烧伤外，余同烧注组；正常对照组大鼠脱毛后腹腔注射 2 ml 无菌生理盐水。前3组均于烧伤和/或内毒素注射后 0.25、0.5、1、3、6、12、24、72h 活杀取材，每组各时相点均为6只动物。另以10只大鼠作为总体正常对照。

1.2 观察指标与方法

1.2.1 光镜观察　取距盲肠 5 cm 处回肠，经10%福尔马林固定，常规石蜡包埋、切片、HE 染色后，光镜观察组织学改变。

1.2.2 肠组织 PAF 生物法测定　取 0.2 g 肠组织，加0.25%牛血清白蛋白 2 ml 充分匀浆后，加预冷丙酮 2 ml，振荡后离心，取上清液加氯仿 2 ml，振荡后再离心，取下层氯仿相，37℃水浴至微量。根据影响兔血小板聚集有3条途径，用消炎痛和ATP酶分别阻断 TXA_2 和 ADP 途径，而测定第3条途径 PAF，以 PAF 标准品引起兔血小板聚集程度的标准曲线方程，计算出样品中 PAF 的含量。

1.2.3 肠组织 XO 活性测定　采用吴晓生等[4]的比色法。

1.2.4 肠组织 MDA 含量测定　采用荧光法测定。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 Excel 5.0 版专用统计分析程序包对各组数据进行单因素方差分析和相关性检验。

2 结果

2.1 光镜观察

烧注后 0.5～1 h，回肠粘膜固有层毛细血管充血，中央乳糜管扩张，间质水肿，绒毛顶端出现上皮下间隙。烧注后6 h 上述病变更明显，上皮下间隙不断扩大，绒毛顶端上皮剥脱，固有层裸露，毛细血管广泛性充血，间质大量中性粒细胞浸润。烧注后 12～72 h 粘膜病变逐渐缓解。单烧后 6～12 h，固有层水肿，中央乳糜管明显扩张，毛细血管充血，中性粒细胞浸润。单注后 12 h 肠绒顶端上皮下间隙形成，固有层水肿及中性粒细胞浸润。

2.2 肠组织 PAF 含量变化

烧注后 0.5 h 肠组织 PAF 含量即较正常组明显升高，6 h 达高峰．持续至 24 h 仍显著高于正常组。单烧后 6～24 h 肠组织 PAF 显著高于正常对照组，高峰值在伤后 12 h。单注后 12 h 肠组织 PAF 含量与正常组差异显著，见表 1。

表1 肠组织 PAF 含量变化($\bar{x}\pm s$，ω_B/ng·g^{-1})

Tab 1 Dynamic changes of PAF content in the intestinal tissue ($\bar{x}\pm s$，ω_B/ng·g^{-1})

Group	BCEG	SBG	SEG	NCG
0.25 h	0.83±0.26	0.71±0.29	0.71±0.14	0.69±0.16
0.5 h	1.43±0.32*	0.74±0.22	0.74±0.24	
1 h	2.31±0.22*	0.74±0.26	0.76±0.24	
3 h	2.19±0.23*	0.82±0.26	0.84±0.20	
6 h	3.13±0.36**	1.81±0.35*	1.34±0.24	
12 h	2.63±0.51*	2.43±0.27*	2.28±0.23*	
24 h	2.30±0.23*	2.08±0.16*	0.83±0.22	
72 h	1.23±0.26	0.78±0.23	0.73±0.14	

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* NCG

表2 组织 XO 活性变化($\bar{x}\pm s$，mu/g)

Tab 2 Dynamic changes of XO activity in the intestinal tissue ($\bar{x}\pm s$，mu/g)

Group	BCEG	SBG	SEG	NCG
0.25 h	80.01±16.64	8.52±25.18	80.04±18.63	76.07±14.82
0.5 h	96.98±21.17	81.75±19.20	89.80±19.67	
1 h	237.93±26.71**	89.30±24.04	98.54±21.66	
3 h	302.08±24.84**	108 22±27 57	101.74±17.84	
6 h	259.30±31.26**	182 97±28 36*	161.86±23.64*	
12 h	247 93±36 03**	238 93±20 87**	209.68±22.80*	
24 h	214.05±27.80*	184.22±26.97*	181.48±22.42*	
72 h	114.30±21.47	101.45±18.45	82.52±20.18	

*：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* NCG

2.3 肠组织 XO 活性变化

烧注后 1 h 肠组织 XO 活性较正常组明显升高，3 h 达高峰，持续至 24 h 仍显著高于正常组。单烧、单注后 6～24 h 肠组织 XO 活性显著高于正常对照组，高峰值在伤后 12 h，见表2。烧注组肠组织 XO 活性与 PAF 含量呈显著正相关，$r=0.917$，$P<0.005$。

2.4 肠组织 MDA 含量变化

烧注后 1 h 肠组织 MDA 含量较正常组明显升高，6 h 达高峰，持续至 72 h 仍显著高于正常组。单烧后 6～24 h 肠组织 MDA 含量显著高于正常对照组，高峰值在伤后 12 h。单注后 12 h 肠组织 MDA 含量与正常组有显著差异，见表3。烧注组肠组织 MDA 含量与 XO 活性呈显著正相关，$r=0.887$，$P<0.01$，肠组织 MDA 含量与 PAF 含量呈显著正相关，$r=0.981$，$P<0.001$。

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

表 3　肠组织 MDA 含量变化 ($\bar{x} \pm s$, m_B/mol·kg^{-1})

Tab 3　Dynamic changes of MDA content in the intestinal tissue ($\bar{x} \pm s$, m_B/mol·kg^{-1})

Group	BCEG	SBG	SEG	NCG
0.25 h	1.64 ± 0.45	1.53 ± 0.55	1.54 ± 0.42	1.56 ± 0.35
0.5 h	2.15 ± 0.37	1.63 ± 0.55	1.55 ± 0.62	
1 h	3.36 ± 0.47**	1.62 ± 0.51	1.60 ± 0.58	
3 h	3.27 ± 0.54**	1.76 ± 0.58	1.64 ± 0.66	
6 h	4.51 ± 0.94**	2.39 ± 0.47*	1.92 ± 0.59	
12 h	4.08 ± 0.72**	3.59 ± 0.54**	2.69 ± 0.69*	
24 h	3.44 ± 0.70**	2.53 ± 0.42*	1.79 ± 0.72	
72 h	2.46 ± 0.71*	1.64 ± 0.60	1.64 ± 0.68	

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* NCG

3　讨论

以往研究认为, 一定时限内休克引起的肠粘膜损害是由于 XO 激活产生的氧化物所致[1-5]。为探讨烧伤合并内毒素血症早期肠粘膜损害的发生机制, 我们在对肠组织 PAF、XO、MDA 的变化及肠粘膜病理改变进行动态观察的同时, 对其相互关系进行了分析, 结果发现, 烧注后 1 h 肠组织 XO 活性显著高于正常对照组, 3 h 达高峰, 肠组织 MDA 与 XO 呈显著相关, 而肠粘膜病理变化与 MDA 变化趋势一致。表明 XO 活化产生的自由基在肠粘膜损害中起着重要作用。至于肠组织 XO、MDA 高峰与严重病变的出现存在时间差, 可能在于 XO 活化、自由基产生引起脂质过氧化及形态学改变需要一定的时间。值得注意的是, 肠组织 PAF 的升高较 XO 出现早, 0.5 h 即显著高于正常对照组, XO、MDA 随 PAF 的增高而升高, 且分别与 PAF 呈显著正相关, 在肠组织 PAF 及 MDA 的高峰期, 肠粘膜损害更明显。我们认为烧伤合并内毒素注射后循环中的内毒素能引起肠粘膜中形成大量 PAF[6], PAF 通过诱导缩血管物质如多肽类白细胞介导因子和前列腺素等扩血管物质的释放造成肠粘膜局部缺血-再灌注和/或直接通过 PAF 受体引起肠上皮细胞 XO 活化[7]; 与此同时, 内毒素和肠粘膜产生的 PAF 刺激巨噬细胞产生和释放 PAF、TNFα 和自由基等参与肠粘膜损害过程[8]。

中性粒细胞的作用被认为是组织损伤的主要机制。本实验发现, 烧注后 0.25 ~ 3 h 中性粒细胞浸润并不明显, 但肠粘膜损害已发生, 提示中性粒细胞在肠粘膜最初的损害中的作用可能不大。但伴随 PAF 的升高, 中性粒细胞浸润明显增加, 肠粘膜损害亦明显加重, 表明中性粒细胞浸润促进了肠粘膜损害的发展。由于中性粒细胞浸润需要内皮细胞激活并表达粘附分子配体及各种趋化因子如 PAF、IL-8、氧自由基[9] 等的释放, 这都需要一定的时间。因此对中性粒细胞在创伤后各脏器损害中的作用及时效性还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Swank G M, Deitch E A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability[J]. World JSurg, 1996, 20(4): 411－417.

[2] Unno N, Fink M P. Intestinal epithelial hyperpermeability: Mechanisms and relevancs to disease[J]. Clin Nutrition, 1998, 27(2): 289－307.

[3] 刘友生, 晏良遂. 烧伤复合内毒素血症对肝脏的损害及其意义的研究[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1994, 10(2): 142－145.

[4] 吴晓生, 李龙官. 比色法测定黄嘌呤氧化酶[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 5(1): 65－67.

[5] Kong S E, Blennerhassett I R, Heel K A, *et al*. Ischemiareperfusion injury to the intestine[J]. Aust N Z J Surg, 1998, 68(8): 554－561.

[6] Qu X, Huang L, Burthart T, *et al*. Endotoxin induces PAF production in the rat ileum quantiation of tissue PAF by an improved method[J]. Prostaglandins, 1996, 51(4): 249－262.

[7] Qu W M, Rozenfeld R A, Huang W, *et al*. The role of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat[J]. Gut, 1999, 44(2): 203－211.

[8] Sun X M, Mackendrick W, Tien J, *et al*. Endogenous bacterial toxins are required for the injurious action of plateletactivating factor in rats[J]. Gastroenterology, 1995, 109(1): 83－88.

[9] Beyer A J, Smalley D M, Shyr Y M, *et al*. PAF and CD18 mediate neutrophil infiltration in upper gastrointestinal tract during intra-abdominal sepsis[J]. Am J Physiol, 1998, 275(3 pt 1): G467－G472.

(编辑　潘式文)

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