DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.005

实验兔急性肺损伤血管内皮标记物的变化*

李 琦** 钱桂生 陈正堂 高广正 官正华*** (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 观察实验兔急性肺损伤中血管内皮标记物的变化。方法: 采用同种骨髓提取液 (BME)经兔颈静脉缓慢恒流注入致伤的方法,复制兔骨髓型急性肺损伤 (ALI)模型,连续 6 h多时相点观察血中循环内皮细胞 (CEC)、血浆颗粒膜蛋白-140(GMP-140)和内皮素 (ET-1)以及肺组织 GMP-140含量,并行常规病理及电镜检查。结果: 致伤后 0.5 h, CEC、血浆 GMP-140和 ET-1均显著升高,持续 6 h仍显著高于伤前和对照; 其中,血浆 GMP-140升高达 3.25倍, 1 h时达到高峰,而肺组织 GMP-140含量降低。血浆 GMP-140早期升高,幅度较大,与 PaO_2负相关,与其它指标亦有较好的相关性。结论: 经兔颈静脉缓慢恒流速注射 BME (0.35 ml/kg, 2 ml/h)能复制出较理想的 ALI模型。检测血浆 GMP-140可能为临床 ALI的早期诊断、病情监测和评估提供依据。

关键词 急性肺损伤;肺血管内皮;循环内皮细胞;颗粒膜蛋白-140;内皮素-1
中图法分类号 R563.8

急性肺损伤 (Acute lung injury, ALI)是肺脏炎症和通透性增加的急性缺氧性呼吸衰竭,其最终阶段即急性成人呼吸窘迫综合征 (Acute/Adult respiratory distress syndrome, ARDS)[1]。在 ALI中,肺血管内皮细胞 (Pulmonary vascular endothelial cell, PVEC)的改变尤为引人注目。循环内皮细胞 (Circulating endothelial cells, CECs)、颗粒膜蛋白-140 (Granule membrane protein-140, GMP-140)和内皮素 (Endothelin-1, ET-1)是血管内皮细胞 (Vascular endothelial cell, VEC)损伤的标记物[2~4]。本研究采用同种骨髓提取液 (Bone marrow extract, BME)经兔颈静脉缓慢恒流注入的方法,复制兔骨髓型 ALI模型,连续 6 h多时相点观察循环血中上述指标的动态变化,并行肺组织 GMP-140含量的组织学测定,对肺脏进行常规及超微病理检查,将功能改变与形态异常相结合,进一步阐明 ALI的发病机制,为 ALI的早期发现和病情评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

健康成年家兔 31只,雌雄不拘,平均体重 2.8 kg(2.4~3.5 kg),随机分为致伤组 (n=21)和对照组 (n=10)。BME的制备、兔骨髓型 ALI模型复制及对照组设立参照陈正堂[5]介绍的方法加以改良,经颈静脉缓慢恒流速注射 BME生理盐水 (0.35 ml/kg, 2 ml/h)。

1.2 观察指标

观察 6个时相点: 致伤前 (0)、致伤后 0.5、1、2、4、6 h。观察呼吸和肺部体征,检测 PaO_2; 按杨映波[6]的 Percoll密度梯度分层一步法分离并计数 CEC,以及 PAP法鉴定 CEC,外周血涂片采用瑞氏染色法显示 CEC; 参照吴国新等[7]介绍的免疫放射分析法 (IRMA),采用双抗夹心免疫放射测定试剂盒 (苏州医学院提供),测定血浆 GMP-140; 采用 ET-1放射免疫分析试剂盒 (北京东亚免疫技术研究所提供),运用均相竞争法,直接测定血浆中 ET-1含量[8]。6 h后活杀动物,取左肺作病理检查,包括光镜、透射电镜、苏丹III脂肪染色检查。采用过氧化物酶标记链霉卵白素 (Streptavidin/Peroxidase)系统免疫组化染色试剂盒 (SP™ Kit ZYMED)作肺血管 GMP-140含量的免疫组化 (IHC)半定量检测。肺血管内皮层 GMP-140含量判定,参照魏树均等[9]的方法进行: 取对照组和 ALI组各 5例肺组织标本,每一标本选切片一张,每张切片观察小动脉、小静脉及毛细胞血管各 5个切面。按血管内皮显示棕褐色颗粒占血管内壁周长多少划分 0~IV级 (分别记作 0~4分): 0级为血管内皮未显示阳性颗粒 (0分); I级为阳性颗粒少于 25% (1分); II级为 25%~50% (2分); III级为 50%~75% (3分); IV级为 75%以上 (4分)。取右肺用干湿称重法作肺含水量测定,以 (湿重-干重)/湿重的百分比表示肺含水量。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$表示,用 SPMR统计程序 PDA-2和 PDA-3作单因素方差分析、多元相关分析和相关系数显著性检验。

* 全军"九五"重点课题, No. 96Z040
** 李 琦,男, 33岁,主治医师,博士研究生,现在成都军区 324医院呼吸内科 重庆, 400020
*** 成都军区 324医院呼吸内科 重庆, 400020
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 呼吸频率变化

注射 BME致伤后,呼吸频率各时点较伤前(38.10±3.48)次/min及对照组显著增加($P<0.01$);其中0.5 h时增加最明显,达(130.86±19.97)次/min。

2.2 PaO_2变化

致伤组 PaO_2伤后0.5 h即明显下降($P<0.01$),仅(7.69±1.02)kPa 持续6 h,保持在低水平。

2.3 CEC鉴定和计数

血涂片经瑞氏染色偶而可见体积大而扁平的内皮细胞,核可有可无。外周血经分离处理后,所见CEC形态与正常血涂片中内皮细胞相似,经姬姆萨染色可清晰显示CEC形态。经PAP法标记vWF的CEC胞浆显示棕褐色,证实为VEC。CEC计数:致伤组0.5 h较伤前(4.75±1.65)个/0.9μl显著升高($P<0.01$),达到(7.28±2.05)个/0.9μl,6 h内均保持在同一高水平,显著高于对照组($P<0.01$)。

2.4 血浆 GMP-140变化

致伤组伤后0.5 h即较伤前显著升高,达3.25倍,1 h时达到高峰(56.32±13.43)μg/L,持续6 h仍显著增高,见表1。

2.5 血浆 ET-1变化

致伤组伤后0.5 h即显著增高,并高于对照组,1 h时达到高峰(225.52±31.75)ng/L,到6 h仍持续在高水平,见表2。

表1 兔血浆 GMP-140含量变化(ρ_B/μg·L^{-1})

Tab 1 The changes of sGMP-140 levels in rabbits (ρ_B/μg·L^{-1})

Groups	Pre-injection	Post-injection				
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
BME(n=21)	16.18±4.33	52.57±10.25*△	56.32±12.43*△	54.82±10.73*△	50.25±11.04*△	48.45±9.84*△
C(n=10)	15.91±3.94	18.80±4.31	18.09±4.41	17.82±4.11	16.69±3.79	16.00±4.22

*: $P<0.01$ *vs* Pre-injection; △: $P<0.01$ *vs* C

表2 兔血浆 ET-1含量变化(ρ_B/ng·L^{-1})

Tab 2 The changes of sET-1 in rabbits (ρ_B/ng·L^{-1})

Groups	Pre-injection	Post-injection				
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
BME(n=21)	90.1±21.26	157.76±35.15*△	225.52±31.75*△	216.93±35.45*△	197.82±32.82*△	193.55±30.73*△
C(n=10)	92.43±28.42	106.16±30.47	95.36±30.47	99.84±26.78	97.92±27.46	93.86±28.31

*: $P<0.01$ *vs* Pre-injection; △: $P<0.01$ *vs* C

2.6 肺血管 GMP-140含量积分

对照组(n=5)PVEC层的 GMP-140含量积分为(1.98±0.27);致伤组(n=5)为(0.89±0.21),显著低于对照组($P<0.01$)。总积分分布情况:致伤组高积分值的血管数减少,低积分值血管数增加,即致伤后6 h,PVEC层的 GMP-140阳性信号强度下降,并伴有 PVEC脱落性损伤,见表3。

表3 肺血管内皮 GMP-140积分分布情况

Tab 3 The distribution of GMP-140 on PVEC in rabbits

Groups	Small artery					Small vein					Capillary				
	0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
C(n=5)	0	5	10	18	24	0	5	12	18	16	0	3	18	12	8
BME(n=5)	0	3	4	9	8	0	4	6	6	8	0	6	10	3	0

2.7 肺含水量变化

致伤组肺含水量为79.70%±1.48%,显著高于对照组的75.46%±1.30%($P<0.01$)。

2.8 病理检查

与血管有关的病变主要表现为小血管周围水肿套形成,管壁坏死及肺出血,偶见有小血管内微血栓形成;苏丹Ⅲ染色见致伤兔肺小血管、肺间质和部分肺泡内均有脂肪滴阳性染色;透射电镜下肺毛细血管内皮细胞肿胀、胞浆突形成,胞质内吞饮小泡增加,髓鞘样结构形成,胞核肿胀增大,染色质疏松或染色质边集,内皮细胞间连接有分离现象。

2.9 致伤组各指标间相关分析

PaO_2与 CEC之间呈负相关($r=-0.8957$, $P<0.05$);6 h点血浆 GMP-140与肺组织 GMP-140含量积分呈负相关($r=-0.98$, $P<0.01$);PaO_2与 GMP-140呈负相关($r=-0.97$, $P<0.01$),与 ET-1亦呈负相关($r=-0.85$, $P<0.05$);GMP-140与 ET-1呈正相关($r=0.91$, $P<0.01$)。

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

3　讨论

采用一次性经颈静脉缓慢恒流速(2 ml/h)注射同种 BME0.35 ml/kg的方法复制模型。结果表明,兔致伤后迅速出现呼吸窘迫,PaO_2多低于 8 kPa,肺含水量显著高于对照,肺病理改变呈典型 ARDS样肺损伤,符合 ALI纳入标准。用 BME致伤,从病因上模拟了严重创伤尤其是多发性骨折并发 ALI的临床情况,是较理想的 ALI模型。

PVEC是整个肺循环的内衬,面积大,数量多,代谢活跃,功能复杂,是 ALI中重要的靶细胞和效应器。ALI过程中,PVEC受损最早。CEC是指在生理或病理情况下,从循环血中获得的 VEC。动物和人在生理情况下,循环血中存在一定数量的 CEC。在病理情况下,CEC常明显增加。研究发现,导致 VEC损伤的因素均可使外周血 CEC增多,CEC可以直接而特异地反映活体内 VEC损伤情况,且主要反映了 VEC的脱落性损伤[2]。本研究结果显示:致伤组 CEC计数伤后 0.5 h即显著升高,在观察时限 6 h内保持在高水平,与对照组各时相点相差显著,且与 PaO_2呈显著负相关。提示 ALI时存在 PVEC严重脱落性损伤,CEC计数有助于早期诊断和监测 ALI,并对 PVEV损伤程度具有一定评估价值。

GMP-140首先在血小板 α颗粒中发现并由此得名[10]。它是一种整合膜糖蛋白,分子量 140× 10^3u,属选择素家族粘附分子(P-Selectin)。有报道,VEC受损早期即表达 GMP-140,GMP-140在白细胞-内皮细胞粘附的起始阶段即有重要作用,与白细胞迅速定位于急性炎症部位有关[2]。本研究观察发现,血浆 GMP-140伤后 0.5 h即接近峰值,高于伤前 3.25倍,6 h内均处于高水平;而在 PVEC层 GMP-140染色明显变浅;提示 ALI伴有严重的 PVEC损伤,使 GMP-140快速大量释放入血,血浆浓度升高,相关分析血浆 GMP-140与肺组织 GMP-140含量呈显著负相关也证实了这一点。由于 GMP-140在 ALI时早期升高,幅度较大且与 PaO_2显著负相关,与其它指标相关性亦较好。因此,我们认为 GMP-140对 ALI早期监测和病情评估有较好的临床应用价值。

ET-1主要来源于 VEC,肺血管床是 ET-1产生和灭活的重要和主要场所。ET-1有强烈而持久的缩血管活性,清除较慢。VEC受损时,首先是胞内贮存 ET-1的快速释放(在 10~20 min以内开始),继而出现 ET-1 mRNA表达增高,转录增强,在 4~6 h出现继发性释放[4]。在整体水平血浆 ET-1受多种代谢因素影响,尤其是 ALI时,缺氧、细胞因子等因素诱导 VEC合成释放 ET-1增加,同时伴有肺组织降解 ET-1的能力显著下降,本研究在整体水平发现,实验兔 ALI时,ET-1血浆水平 0.5 h呈显著升高,1 h达高峰,6 h内始终高于伤前和对照,提示 ET-1在 ALI早期病情监测中也有一定作用。

本研究 ALI时,反映 PVEC功能改变的一些指标均有明显异常,并且发现 PVEC有脱落现象,导致 CEC升高。结合病理学观察,PVEC胞浆突起增多、胞浆内出现典型的髓鞘样结构,提示 PVEC呈严重的退行性变。表明 PVEC的功能异常有其病理形态学基础。

参考文献

1　John M L, F U N. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med, 1998, 26(2): 369

2　Davis J W, Shelton L, Eigenberg D A, *et al*. Effects of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets. Clin Pharmacol Ther, 1985, 37(5): 529

3　Kaplanski G, Farnarier C, Benoliel A M, *et al*. A novel role for E-and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 9): 2449

4　Macarthur H, Warner T D, Wood E G, *et al*. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical streth. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200(1): 395

5　陈正堂.犬骨髓型呼吸窘迫综合征模型及其病理观察.中华病理学杂志, 1988, 17(3): 188

6　杨映波,王正国.创伤时血管内皮损伤机制的实验和临床研究.第三军医大学学报, 1992, 14(1): 102

7　吴国新,阮长耿.^{125}I标记单抗夹心法测定血浆 GMP-140及其临床应用.中华核医学杂志, 1993, 13(4): 232

8　曾　强,李振用,余霞君,等.内皮素的放射免疫分析.解放军医学杂志, 1991, 16(6): 403

9　魏树均,柳大昌,张　莉,等.实验性多器官衰竭肺微血管内皮细胞因子Ⅷ相关抗原的检测.中华结核和呼吸杂志, 1990, 13(6): 346

10　McEver R P, Martin M N. A monoclonal antibody to a membrane glcopprotein binds only to activated platelets. J Biol Chem, 1984, 259(15): 9799

(收稿: 1998-12-14;修回: 1999-03-22)

(编辑　王　红)

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

A preliminary study of the markers of pulmonary endothelial cells in acute lung injury in rabbits*

Li Qi, Qian Guisheng, Chen Zhengtang, Gao Guangzheng, Guan Zhenghua (Reseaech Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To study the changes of the markers of pulmonary vascular endothelial cells (PVEC) in acute lung injury (ALI) in rabbits. Methods: 31 rabbits were randomized into the control group (n= 10) and the bone marrow extract group (n= 21, BME). The animals of BME group received an injection of 0.35 ml/kg of BME in an injection speed of 2 ml/hour. All rabbits were killed 6 hours later. Granular membrane protein 140 (GMP-140), endothelin-1 (ET-1) and circulating endothelial cells (CECs) were measured with immunoradiometric assay (IRMA), radioimmunoassay (RIA), and immunohistochemistry (IHC) respectively. Results: GMP-140, ET-1 and CEC began to increased in the first 0.5 hour and the increase lasted for 6 hours. The drammatical elevation of plasma level of GMP-140 (3.25 times) was negatively correlated to PaO_2 but positively correlated to other parameters. The GMP-140 on the surface of PVECs was weakly revealed with IHC staining. Conclusion: Slow-rate injection of BME can establish and acceptable model of ALI and the determination of GMP-140 might beaa satisfactory criterion for early surveillance and for the prognosis of ALI in clinical practice.

Key words acute lung injury; endothelial cell; pulmonary vasculature; granular membrane protein-140; endothelin-1; rabbit

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96Z040

立体定向放射治疗下腔静脉癌栓 1例报告

One case report of inferior vena cave cancer embolus treated with stereotactic radiotherapy

庞学利* 谭崇富 王 希 肖 红 (第三军医大学附属西南医院放射肿瘤科) 重庆, 400038

患者男性, 55岁, 因腹泻 1月, 1997年 12月腹部 B超和CT检查发现肝右叶巨大占位, AFP> 1 000 ng/ml, 确诊为原发性肝癌, 行二疗程介入治疗后肝右叶肿块有较明显缩小, 由约 12 cm× 7 cm大小缩小至约 8 cm× 6 cm大小。 1998年 3月初无明显原因出现胸闷、气促、腹胀、双下肢浮肿等, B超检查提示腹水阳性, MRI检查发现肝段下腔静脉增粗, 流空效应消失, 其中充满软组织块影, 诊断下腔静脉内癌栓形成。于 1998年 3月 26日至 4月 2日采用北京大恒公司 Star-1000型体部立体定向放射治疗系统进行治疗。在 CT增强影像上能清晰地显示肝段下腔静脉及其内之癌栓, 应用 Star-1000型立体定向治疗计划进行三维重建和治疗计划设计, 采用 6 MV-X线、直径 30.3 mm限光筒, 单平面 360度旋转照射, 两个靶点纵向排列, 治疗长度约 5 cm, 处方剂量 10 GY/次, 下腔静脉边缘剂量≥ 80%, 隔日 1次, 共 3次。治疗 2次后患者胸闷、气促等症状即有所缓解。治疗结束后进一步改善, 双下肢水肿、腹水等消失。 2月后患者病情稳定, 复查 MRI显示下腔静脉内癌栓已完全消失。 3月后胸片检查发现双肺广泛转移。治疗后 5月患者死于全身衰竭。

讨论

下腔静脉内癌栓在肝癌和其他恶性肿瘤患者中并非少见, 以往治疗方法不多, 主要为手术切除和下腔静脉内置入金属支架[1,2], 这两种方法创伤大、死亡率和并发症发生率高, 大多数患者无法耐受。立体定向放射治疗具有定位准确、靶区剂量分布集中、周围组织剂量低损伤小等特点, 采用若干次大剂量照射, 可产生较强的生物效应, 从而能取得较为迅速而充分的治疗效果。本文首次将立体定向放射治疗用于下腔静脉癌栓的治疗, 并取得了良好的治疗效果。提示立体定向放射治疗是治疗下腔静脉癌栓的有效方法, 值得应用推广。

关键词 癌栓; 下腔静脉; 立体定向放射治疗
中图法分类号 R735.7

参考文献

1 Sarkar R, Eilber F K, Gelabert H A, *et al*. Prosthetic replacement of the inferior vena cava for malignacy. J Vasc Surg, 1998, 28(1): 75

2 Fletcher W S, Lakin P C, Pommier R F, *et al*. Results of treatment of inferior vena cava syndrom with expandable metallic stents. Arch Surg, 1998, 133(9): 935

(收稿: 1998-11-06; 修回: 1999-03-18)
(编辑 汪勤俭)

* 庞学利, 男, 36岁, 副主任医师, 副教授, 硕士

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