DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.019

烧伤复合内毒素血症早期纤维连接蛋白在肾脏分布的变化及其意义

冯俊明* 刘友生 王晓东 史景泉 (第三军医大学基础医学部病理学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨烧伤复合内毒素血症早期纤维连接蛋白(Fn)在肾组织的分布和血清浓度的变化规律及其意义。方法: 以大鼠20% Ⅲ度体表烧伤复合小剂量内毒素(1 mg/kg体重)腹腔注射为模型, 应用免疫组织化学方法、血清学测定及图像分析技术。结果: 体表烧伤复合内毒素注射组(烧注组)肾组织Fn积分光密度在0.5 h即开始下降且达最低点,以后逐渐恢复。烧注组各时相点显著高于单纯体表烧伤组(单烧组),但低于单纯内毒素注射组(单注组);烧注组血中Fn浓度在0.5 h即开始升高,随后上下小波动,但各处理组之间未见显著差异。结论:① 烧伤后小剂量内毒素能明显刺激肾组织Fn的合成和释放;② 组织Fn的降解和释放是血中Fn升高的主要原因;③ 组织Fn的降解和释放既能使血中Fn升高,又能通过Fn降解产物引起组织损伤。

关键词 灼伤;内毒素血症;纤维连接蛋白;免疫组织化学;图像分析;大鼠
中图法分类号 R644

烧伤复合内毒素血症早期,肝、肺均出现一系列损害效应,甚至引起多器官功能衰竭(MOF)[1],但关于烧伤状态下内毒素对肾脏的早期损害作用如何,目前尚缺乏这方面的资料。本实验以大鼠20% Ⅲ度体表烧伤复合小剂量内毒素(1 mg/kg体重)腹腔注射复制类似于人体多脏器早期损害实验动物模型,采用免疫组化、血清学测定相结合的手段,探讨烧伤复合内毒素血症早期纤维连接蛋白(Fn)的分布变化及其意义,为探讨影响肾脏早期损害的相关因素及烧伤后急性肾功能衰竭的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

选用健康Wistar大鼠(由四川省中药研究所动物中心提供)156只,雌雄各半,体重220± 30 g随机分为4组: 单纯内毒素注射组(简称单注组, SEG)、单纯体表烧伤组(简称单烧组, SBG)、体表烧伤复合内毒素注射组(简称烧注组, BCEG)和正常对照组(简称NCG)。致伤各组设伤后0.5、1、3、6、12、24、48、72 h 8个时相点,各时相点均为6只动物。正常对照组用12只动物作整体对照。

1.2 实验方法

1.2.1 动物处理及给药方法 参照文献[1]的方法进行。

1.2.2 取材方法及过程 于以上各组各时相点,取腹主动脉血4~5 ml,分离血清备Fn血清学检测之用。肾组织固定后用于Fn免疫组织化学染色和形态学观察。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 光镜与电镜观察 肾组织按常规光、电镜制样方法固定、包埋、切片,并在光镜(6只/时相点)和电镜(3只/时相点)下观察摄像。

1.3.2 血清Fn浓度的测定 用免疫透射比浊法测定。用Beckman 42型生化分析仪比浊(波长340nm, 温度30℃),以样品血清和Fn标准曲线比较,计算样品中Fn浓度。

1.3.3 Fn免疫组织化学染色 标本经4%多聚甲醛固定12 h, 4℃以下常规脱水包埋,石蜡切片(厚5μm),常规脱蜡水化。采用LSAB法染色;一抗、二抗及LSAB均购于Dako公司,滴度分别为1∶100、1∶300和1∶400,阴性对照片以0.1 mol PBS代替一抗。DAB显色,阳性部位显棕黄色。

1.3.4 Fn免疫组化染色图像分析 采用北京航空航天大学和空军总医院的CMIAS007真彩色图像分析系统,对肾组织切片中Fn免疫组化阳性肾小球时行积分光密度统计分析。

1.4 统计学处理

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示。以Excel 5.0版统计分析程序对各组数据进行单因素方差分析及显著性检验。

2 结果

2.1 肾脏形态学变化

2.1.1 烧注组 烧注后0.5~3 h,肾小球毛细血管明显扩张、充血,肾小管上皮细胞浊肿、坏死、脱落,部份远端小管中可见均匀红染的透明管型;电镜示内皮细胞肿胀,毛细血管腔内可见中性粒细胞和大量血小板聚集附壁,见图1。烧注后6~8 h,肾小球内细胞成分逐渐增多,肾小球(主要是浅表肾小球)缺血明显,甚至出现皱缩;电镜示内皮细胞和系膜细胞明显增生,见图2,足细胞增生、肿胀、足突增粗,部份足突融合。72 h大部分肾小球血供基本恢复正常。

2.1.2 单烧组 伤后12 h前多见肾小球充血,内皮细胞肿胀,但极少见到中性粒细胞和血小板聚集。12~72 h肾小球内细胞增生明显。

2.1.3 单注组 肾脏病变轻微,多见肾小球充血, 12 h前毛细血管腔内可见中性粒细胞和血小板集聚,细胞增生不明显。

2.1.4 正常对照组 光镜和电镜下均未见明显变化。

2.2 血清Fn浓度测定

血清Fn浓度在致伤各组于伤后0.5 h即开始升高, 以后

* 冯俊明, 男, 30岁, 助教, 硕士

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

上下波动,至 72 h仍高于正常水平, 烧注组在 0.5、1、6 h与正常对照组有非常显著的差异($P < 0.01$), 单烧组在 0.5、1、6 h与正常对照组有非常显著的差异($P < 0.01$),在 12、24 h与正常对照组有显著差异($P < 0.05$)。各单因素组(单烧组和单注组)与烧注组相比较,只在 1 h单注组与烧注组有非常显著的差异($P < 0.01$),见表 1。

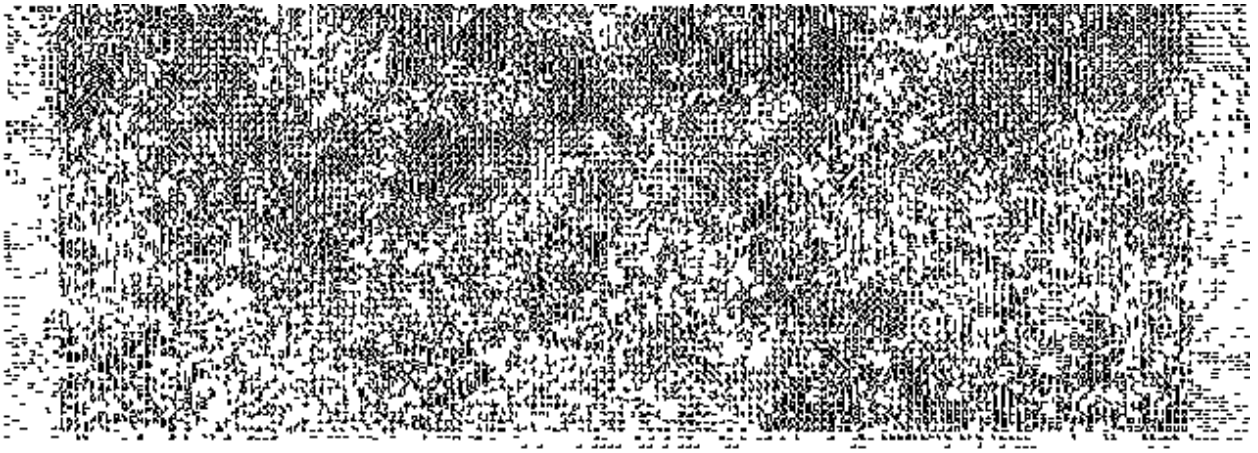


图 1　肾小球毛细血管腔内中性粒细胞(PMN)聚集　(TEM× 7000)

Fig 1　Leucocyte aggregated in the glomerular capillary lumen　(TEM× 7000)

图 2　肾小球毛细血管内皮细胞(End)肿胀、增生　(TEM× 3900)

Fig 2　Glomerular capillary endothelial cells swelled and proliferated　(TEM× 3900)

表 1　伤后各组血清 Fn的浓度变化 ($\bar{x}\pm s$, ρ_B /mg L^{-1})

Tab 1　The changes of sera Fn concentration after burn and/or endotoxin injection ($\bar{x}\pm s$, ρ_B /mg L^{-1})

Time(t /h)	BCEG	SBG	SEG
0.5	63.08± 12.25	68.6± 1.84**	58.22± 4.76
1	75.53± 6.80**	66.83± 7.71**	58.62± 6.67##
3	58.08± 10.1	58.78± 5.48	65.06± 8.80
6	67.60± 7.47**	66.48± 3.58**	61.18± 9.22
12	77.38± 14.17**	67.95± 15.53*	61.91± 23.90
24	63.80± 12.49**	65.7± 11.27*	56.23± 7.63
48	57.9± 8.72	61.6± 15.58	59.23± 5.99
72	52.28± 15.00	52.67± 15.47	51.23± 4.99

NCG: 50.72± 8.59 mg /L; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ *vs* NCG; ## : $P < 0.05$ *vs* SBG

2.3　Fn免疫组织化学染色及其图像分析

正常对照组 Fn免疫组化染色呈强阳性,阳性反应物主要分布于肾小球毛细血管内皮细胞基底膜、肾小管上皮细胞基膜,肾间质中染色呈弱阳性,见图 3。烧注组在 0.5 h染色呈阳性,以后逐步增强,分布同上,见图 4。图像分析结果表明: 烧注组 Fn积分光密度在 0.5 h即开始下降且达最低点,以后逐步恢复。除单注组 24、48、72 h外,其余各组各时相点 Fn积分光密度均显著低于正常水平($P < 0.01$)。烧注组高于单烧组且在 0.5、3、6、12和 24 h两者非常显著的差异($P < 0.01$),在 72 h有显著差异($P < 0.05$);而单注组则高于烧注组,除 12 h外,其余各时相点两者有非常显著的差异($P < 0.01$),见表 2。

表 2　肾脏中 Fn积分光密度 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The integral optical density of Fn in kidney ($\bar{x}\pm s$)

Time (t /h)	BCEG	SBG	SEG
0.5	10161.85± 628.93**	5099.7± 571.16**	16457.45± 982.94**##
1	11740.48± 796.25**	11409.54± 1046.87**	19691.1± 932.29**##
3	15672.66± 1139.78**	10624.82± 1384.725**	22474.18± 1720.63**##
6	15281.04± 1559.79**	11043.02± 935.72**	21987.88± 382.87**##
12	19510.49± 1523.09**	11693.9± 995.4**	21349.49± 860.75**
24	12817.56± 1034.79**	9040.27± 1131.14**	30713.7± 462.88##
48	15750.60± 1845.64**	16218.09± 677.07**	27782.80± 1882.67##
72	18402.43± 1919.56**	15194.56± 1264.77**	27553.13± 1180.46##

NCG: 28869.94± 2464.38; * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ *vs* NCG; ## : $P < 0.01$ *vs* SBG

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

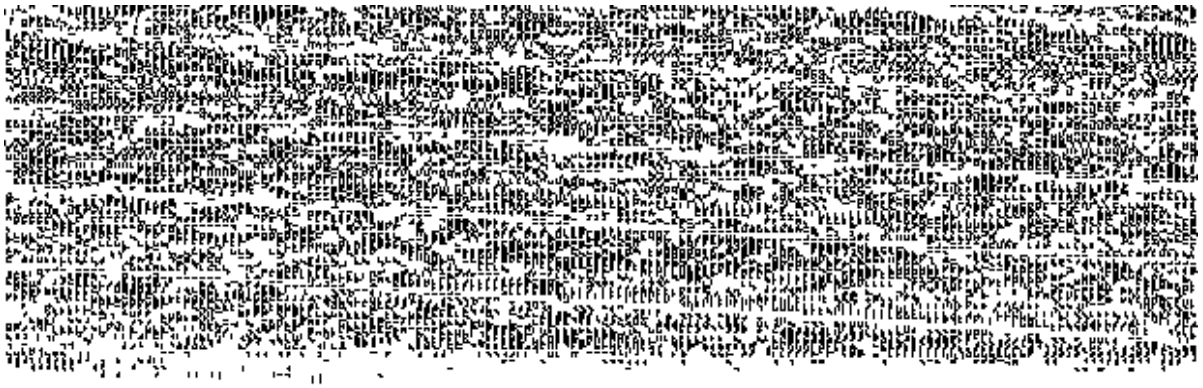


图 3 Fn免疫组化染色、阳性产物分布于肾小球毛细血管基底膜和肾小管基底膜
正常对照组 (LSAB× 200)

Fig 3 Fibronectin (Fn) immunohistochemical staining, the postive reaction mainly located at the basement-membrane of glomerular capillary and renal tubule
NCG (LSAB× 200)

图 4 Fn免疫组化染色,阳性产物分布于肾小球毛细血管基底膜
烧注组,0.5 h (LSAB× 200)

Fig 4 Fibronectin (Fn) immunohistochemical staining, the postive reaction mainly located at the glomerular capillary basement-membrane
BCEG 0.5 h (LSAB× 200)

3 讨论

Fn与单核细胞吞噬系统的廓清功能和内皮细胞间的亲和力关系密切[2,3]。Fn以两种基本形式存在,即血浆 Fn和组织 Fn,两者可相互转化[2]。本实验肾脏正常对照组 Fn主要分布于肾小球毛细血管和肾小管上皮细胞基底膜,表明 Fn在局部可介导肾小球血管内皮细胞和肾小管上皮细胞与其基底膜的粘附,并维持细胞的完整性。图像分析显示,烧注组 Fn积分光密度在伤后 0.5h即明显下降且达最低点,除单注组 24 48 72h外,其余各组各时相点 Fn积分光密度均显著低于正常水平,烧注组显著高于单烧组,但低于单注组。而血清 Fn浓度在各处理组均高于正常水平。说明烧伤后肾组织 Fn的大量消耗除了局部产生减少和降解外,还可能与 Fn大量释放入血有关;而在烧伤条件下小剂量内毒素则可明显刺激肾组织释放 Fn 由此可以推断,烧伤复合小剂量内毒素注射时血中 Fn的维持,除了与组织 Fn释放入血和小剂量内毒素反复刺激肝细胞、枯否细胞合成 Fn增加有关[2,3]外,也可能与小剂量内毒素直接刺激局部肾脏细胞释放组织 Fn有关。血中 Fn来源于何种细胞有待于进一步深入研究。从本实验免疫组化结果来看,至少部分来源于内皮细胞、肾小管上皮细胞以及肾间质中的纤维母细胞。

烧伤复合内毒素注射后肾脏主要病变特点为:① 早期肾小球毛细血管腔内出现大量血小板及中性细胞聚集、附壁,内皮细胞肿胀,肾小管上皮细胞肿胀、坏死、脱落,部分远端小管中可见蛋白管型;② 12h后内皮细胞、系膜细胞增生、肿胀,足细胞增生,足突增粗,部份足突融合。肾小球缺血明显,甚至出现皱缩。这些形态学改变与 Fn的变化关系密切。由于大量组织 Fn释放入血,细胞间粘附能力下降,可以引起肾小管上皮细胞的坏死、脱落,肾小球毛细血管内皮细胞受损,血管通透性增加,进而导致血浆蛋白渗出,引起肾小管中蛋白管型的出现。TNF等细胞因子可以降解 Fn,产生的 Fn片段可以诱导中性粒细胞及单核细胞的游走、脱颗粒,促进毛细血管腔内中性细胞的聚集[4-6],引起血管腔的狭窄,从而导致肾组织血供障碍。此外,中性粒细胞等受内毒素激活所产生的各种炎症介质和血小板脱颗粒时释放的血小板因子,均能进一步加重或促进肾组织的损伤。此后,由于组织 Fn的逐步恢复,内皮细胞、系膜细胞等得以在此基础上反应性增生,压迫毛细血管腔,进一步加重肾小球的缺血。由上可知,一方面由于局部肾组织 Fn释放入血,维持了血中 Fn水平,有利于单核吞噬系统发挥其非特异性调理功能,清除血中内毒素等有害物质,从而减轻肾组织损伤。另一方面,Fn的降解产物又能通过各种途径引起肾组织的损害。因此,其作用是双重的,对此确切机制有待于进一步深入研究。

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

参考文献

1 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.中华整形烧伤外科杂志,1994;10:142

2 Saba T M. Fibronectin: relevance to phagocytic host response to injury. Circ Shock, 1989; 29(4): 257

3 Zena W, Patrice M T, Ole B *et al*. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression, J Cell Biol, 1989; 109(2): 877

4 Nathan C, Srimal S, Farber C *et al*. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependnce on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. J Cell Biol, 1989; 109: 1341

5 Forsyth K D, Levrinsky R J. Fibronection degradation: An in-vitro model of neutrophil mediated endothlial cell damage. J Pathol, 1990; 161: 313

6 Hery P G, Dorothy A F, Lovettos C *et al*. Nonchemotactic translocation of phagocytic cells mediated by a fibronectin-related human lympholins. J Immunol, 1989; 143(11): 3691

(收稿: 1997-07-08;修回: 1998-03-18)

(编辑 冷怀明)

Changes in distribution of fibronectin in the kidneys after burns combined with endotoxemia in rats and their significance

Feng Junming, Liu Yousheng, Wang Xiaodong, Shi Jingquan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the changes in distribution of fibronectin (Fn) in the kidneys after burns combined with endotoxemia and their significance. Methods: The rats were randomized into four groups: ① Simple burn group (SBG); ② Simple endotoxin-injected group (SEG); ③ Burn and endotoxin-injected group (BCEG) and the normal control group (NCG). The changes of Fn in the serum and the expression of Fn in the kidneys were dynamically investigated at 0.5th, 1st, 3rd, 6th, 12th, 24th, 48th and 72nd h after burns and/or endotoxemia. Results: The serum contents of Fn were higher in all the first three groups than in the control. Image analysis showed that the integral optical density values of Fn in BCEG was lower than those in NCG or SEG but higher than those in SBG. Conclusion: ① Injection of endotoxin after burns significantly stimulate the synthesis and release of Fn in the renal tissue. ② The degradation and release of Fn in the tissue plays the most important role in the increase of Fn content in the blood and causes renal injury.

Key words burns; endotoxemia; fibronectin; immunohistochemistry; image analysis; rat

大肠癌患者手术前后检测胃液与血清 CEA的比较

Contrast of CEA in the gastric fluid and serum before and after operation in patients with colorectal carcinoma

甘 露* (第三军医大学附属西南医院普通外科) 重庆,400038

大肠癌患者手术前后测定血清 CEA以判定手术疗效、预后以及复发等情况已成为公认的传统方法,但血清 CEA的测定存在着敏感性不高及特异差等问题。我们对 28例大肠癌患者分别于手术前后同时测定了胃液及血清 CEA,表明胃液 CEA的敏感性及特异性均显著高于血清 CEA。

1 材料与方法

28例大肠癌患者,其中结肠癌 9例,直肠癌 19例,全部经病理确诊。男 20例,女 8例,年龄 28~ 68岁,平均 48岁。均在手术前及手术后 5~ 6 d空腹抽取胃液并抽血,同时送同位素科测定 CEA。取 8例胆囊切除及 4例粘连性肠梗阻患者的空腹胃液为对照组测定 CEA。血液 CEA值已有阳性判断标准,故不再设对照组。

2 结果

术前胃液及血清 CEA值均显著高于术后,见表 1。

(下转 148页)

* 甘 露,男,37岁,讲师,博士研究生

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