DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.012

内毒素诱导的肺脏病变及中性粒细胞在其损伤过程中的作用

汪盛贤* 陈意生 陈志远* 谯怡然 郭德玉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 重庆,630038

提 要 应用光镜、电镜、图像分析仪观测了大鼠注射内毒素(L组)和氮芥+内毒素(NL组)后1、3、5、12、24、48、72 h 7个时相点的肺脏病理变化。发现L组肺组织充血、出血、水肿、肺萎陷;毛细血管内大量中性粒细胞(PMN)和血小板滞留、嵌塞、崩解脱粒,内皮细胞肿胀、坏死;肺泡上皮退变,继而II型肺泡上皮细胞增生等。病变过程表现为循环障碍、变性坏死和损伤修复3个阶段。先注射氮芥使大鼠外周血PMN减少,再注射内毒素,发现肺脏病变延迟发生,且程度较L组明显减轻。表明PMN在内毒素引起的肺损伤发展过程中起着重要作用。

关键词 肺损伤;内毒素;中性粒细胞;大鼠
中图法分类号 R563.02 R655.02

内毒素是革兰氏阴性细菌外膜的一种大分子物质,脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)为其主要致病成份,与成人呼吸窘迫综合征和某些慢性肺部疾患的发生有密切关系[1~3]。本研究通过给大鼠注射LPS和氮芥+LPS后肺脏的形态学观察,探讨LPS引起的肺脏病变特点及中性粒细胞(PMN)在其损伤过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物实验

健康Wistar大鼠(本校动物所提供)140只,雌雄不限,体重210 g~230 g,随机分为LPS组(简称L组,n=84)、氮芥+LPS组(简称NL组,n=42)和生理盐水对照组(简称对照组,n=14)。L组自大鼠尾静脉注入LPS(E. Coli O111 B4,美国Sigma公司)250 μg/kg体重;NL组注射盐酸氮芥(上海海普制药厂)1.5 mg/kg体重,于注射后72 h外周血白细胞降至(2~3)×10^9个/L[对照组为(2.3~2.6)×10^{10}个/L],注射LPS 250 μg/kg体重,两组动物于注射LPS后1、3、5、12、24、48、72 h活杀取材。对照组注射与LPS等量的生理盐水,于注射后5 h活杀动物取材,作为总体正常对照。

1.2 观察方法

1.2.1 形态学观察 肺组织行常规石蜡包埋、切片,HE、AB/PAS染色,光镜观察。超薄切片用JEM-100 SX电镜观察。

1.2.2 肺泡隔PMN计量 石蜡切片经我们改良的PAS染色法标记后,网格目镜(重庆光学仪器厂)下每例随机计数15个高倍视野下肺泡隔中PMN,求其均数。

1.2.3 肺泡隔面积密度图像分析 应用MAS-1图像分析系统测定每例HE染色切片肺泡隔面积密度。每例随机测定6个测视点,放大倍率15×10,以分析肺萎陷的程度。

1.3 统计学处理

应用第四军医大学编辑的线性拟合数理统计软件(SPLM)进行数据处理,结果以 $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$ 表示。

2 结果

2.1 光镜观察

L组大鼠注射LPS后1 h见肺小动脉充血,肺泡隔、肺泡腔水肿。3、5 h后病变明显加重,表现为毛细血管扩张充血、PMN滞留,有的小动脉内有血栓形成;肺泡隔大量PMN浸润、巨噬细胞聚集。肺萎陷较为明显,有的区域呈实体团状。12 h和24 h后除上述病变外,肺萎陷更为广泛,出血区含有大量含铁血黄素及橙色血晶。48 h肺泡隔PMN较前有所减少,肺萎陷明显减轻。72 h肺泡腔内水肿液已有消散。组化染色显示3 h~48 h支气管粘膜上皮内中性粘多糖明显增多,有的支气管腔内有积血。

NL组注射LPS后于5 h和12 h毛细血管显轻度充血,肺泡隔偶见PMN浸润。24 h毛细血管充血明显,灶性肺萎陷。48 h和72 h上述病变加重,但与L组相比其改变明显减轻。

对照组大鼠肺组织结构清楚,肺泡腔内可见少许形态正常的红细胞,余无特殊改变。

2.2 电镜观察

L组大鼠注射LPS后1 h肺毛细血管内PMN嵌塞,内皮细胞(EC)肿胀。3 h和5 h毛细血管内充满红细胞,PMN嵌塞更为易见,有的伸出伪足与EC粘附,有的崩解脱粒,见图1。EC肿胀,胞质电子密度降低,饮泡增多;有的EC薄部呈串珠状或断裂缺失,连接增宽,有的区域基底膜呈节段性增厚。II型肺泡上皮细胞(PII)微绒毛减少,线粒体肿胀、空化,板层体排空或融合。肺泡隔和肺泡腔水肿、出血,PMN浸润、渗出,见图2、3。于12 h,EC损伤明显加重,有的胞质过度肿胀致质膜破裂形成大的空泡;并见较多血小板聚集,与EC粘附,见图4。24 h和48 h时病变与12 h基本相似,但肺泡腔易见退变脱落的肺泡上皮及泡沫状的表面活性物质(surfactant, ST)并有较多增生的P

* 现在成都军区总医院病理科 成都,610083

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

Ⅱ,见图 5 至 72 h各种病变明显减轻。

NL组与 L组相比,上述超微结构明显减轻。注射 LPS后 3 h见肺组织轻度充血、水肿。5 12 24 h肺泡隔灶性出血,肺泡上皮轻度肿胀。48 h和 72 h毛细血管扩张,EC肿胀,肺泡隔和肺泡腔均有水肿、出血,肺泡上皮不同程度肿胀,见图 6

对照组大鼠肺组织未见明显超微结构改变。

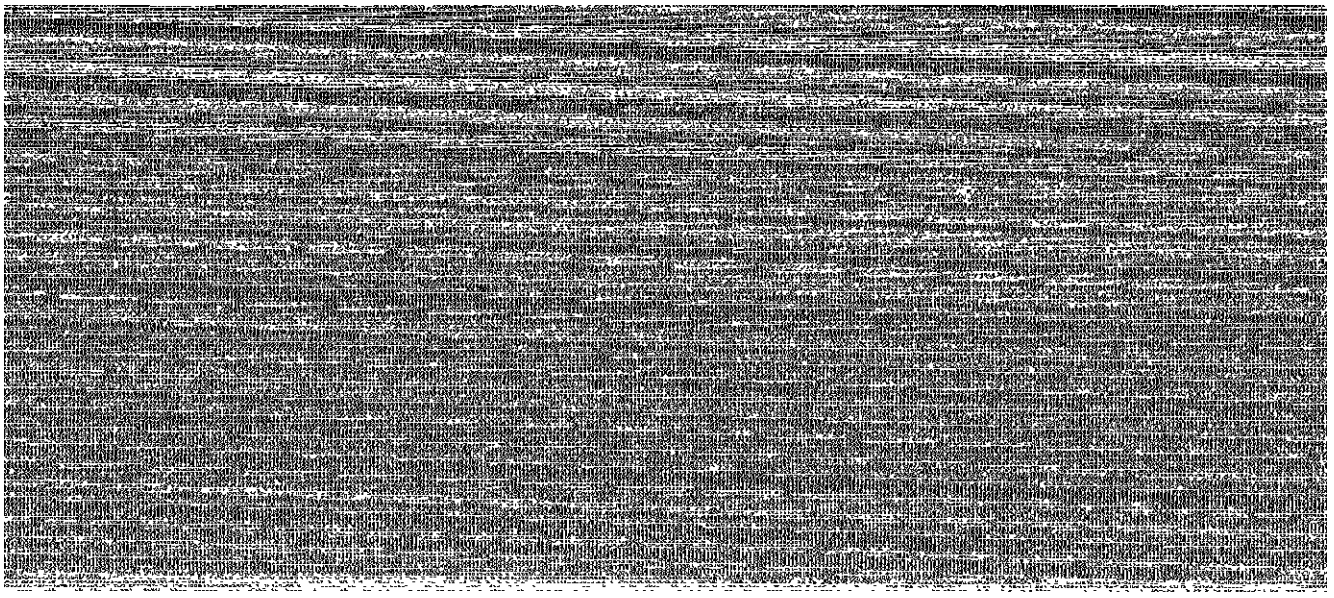


图 1 肺毛细血管内 PMN聚集、崩解、脱粒(↑) 注射 LPS后 3 h(TEM× 6 000)

Fig 1 Accumulation, degeneration and degranulation of PMN (↑) in the pulmonary capillaries 3 h after injection of LPS (TEM× 6 000)

图 2 肺泡隔水肿,空泡(V)形成,成纤维细胞内质网(ER)高度扩张 注射 LPS后 5 h(TEM× 8 000)

Fig 2 Edema of pulmonary alveolar septa and vacuole formation (V); endoplasmic reticulum (ER) of fibroblast markedly dilated 5 h after injection of LPS (TEM× 8 000)

图 3 肺泡隔及肺泡腔水肿(E),肺泡腔内含有 PMN 注射 LPS后 5 h(TEM× 6 000)

Fig 3 Edema (E) of pulmonary alveolar septa and pulmonary space, with PMN in alveoli 5 h after injection of LPS (TEM× 6 000)

图 4 肺毛细管内血小板(P)聚集,EC肿胀 注射 LPS后 12 h(TEM× 10 000)

Fig 4 Platelets (P) accumulation in the pulmonary capilaries, swelling of endothelial cells (EC) 12 h after injection of LPS (TEM× 10 000)

图 5 Ⅱ型肺泡上皮细胞增生 注射 LPS后 48 h(TEM× 6 000)

Fig 5 Proliferation of type Ⅱ alveolar epithelial cell (PⅡ) 48 h after injection of LPS (TEM× 6 000)

图 6 Ⅰ型、Ⅱ型肺泡上皮细胞肿胀,胞质内空泡(V)形成 注射氮芥+ LPS后 72 h(TEM× 8 000)

Fig 6 Swelling and vacuole formation (V) of type Ⅰ and type Ⅱ pulmonary alveolar epithelial cell (PⅠ, PⅡ) 72 h after injection of nitrogen mustard+ LPS (TEM× 8 000)

2.3 肺泡隔 PMN计量结果见表 1

表 1 肺泡隔 PMN计量结果($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

Tab 1 The result of PMN counting in pulmonary alveolar septa ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

Groups	Number of PMN after injection of LPS or mustard+ LPS (h)						
	1	3	5	12	24	48	72
L	371.85± 12.27**	401.74± 17.04**	540.76± 29.21**	358.35± 19.06**	234.78± 20.64**	120.45± 10.15**	93.65± 3.72**
NL	23.72± 3.26△△	21.35± 3.43△△	27.63± 3.14△△	34.22± 5.74△△	71.15± 6.43**△△	89.07± 3.53**	57.13± 3.91**

No. of PMN in control group (n= 8) was 37.95± 0.44; **: $P<0.01$ *vs* control; △△: $P<0.01$ *vs* group L

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

2.4　肺泡隔面积密度图像分析结果见表 2

表 2　肺泡隔面积密度图像分析结果(a/a, $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

Tab 2　The area density of the pulmonary alveolar septa (a/a, $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

Groups	The value of a/a, after injection of LPS or mustard+ LPS (h)					
	1	5	12	24	48	72
L	39.41± 2.27**	43.35± 3.42**	53.52± 4.44**	43.79± 1.43**	34.00± 2.64**	34.07± 1.45**
NL	18.76± 1.31△△	19.92± 1.67△△	19.47± 1.20△△	22.93± 2.23△△	23.63± 1.02△	30.75± 1.65**

The value of a/a in control group (n = 8) was 20.56± 1.94; **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* group L

3　讨论

LPS引起的肺脏病变迄今尚缺乏深入研究,对其致病机理亦无统一认识。本实验结果表明,大鼠注射 LPS后能引起肺脏一系列形态变化,如毛细血管内 PMN和血小板滞留、嵌塞,与 EC粘附;肺泡隔和肺泡腔出血、水肿; EC和肺泡上皮肿胀、退变,继而 PⅡ增生等。病变具有一定的阶段性,其过程可分为:① 循环障碍期;② 变性坏死期;③ 损伤修复期。但各期之间病变存在交叉重迭现象。循环障碍期的变化在注射 LPS后 1 h即已可见,至 3～5 h较为明显。其形态学主要表现为肺组织充血、出血、水肿,血管内 PMN嵌塞。变性坏死期的变化于 12 h明显,至 24 h和 48 h最为突出;其特点为 EC、肺泡上皮细胞肿胀、退变坏死。至 72 h上述病变明显减轻,且在 48～72 h已见较多增生的 PⅡ。表明本实验条件下存活动物肺脏病变是可复性的,故称之为损伤修复期。

LPS引起的组织损伤机理较为复杂,一般认为 LPS可通过直接和间接两种途径损伤肺组织。体外实验证明, LPS对细胞有直接毒性作用[4,5]。其机理可能与细胞内 Ca的增加和结合 Ca(Ca-CaM)降低有关。正常情况下,细胞内 Ca^{2+} 浓度维持在一定范围。当内毒素或其它致伤因素作用下,细胞兴奋, Ca^{2+} 浓度增高,致细胞损伤或死亡[6]。

LPS间接肺损伤的过程与多种炎性细胞、细胞因子的参与有关[2,7]。本实验 L组大鼠注射 LPS后早期即出现肺微血管内大量 PMN滞留、嵌塞或崩解脱粒;而 NL组大鼠先注射氮芥致外周血白细胞减少后,再注射 LPS,发现肺泡隔 PMN数量显著少于 L组,且病变延迟发生,病变程度亦较 L组明显减轻。表明 PMN在 LPS诱导的肺脏病变发生发展过程中起着重要的始动作用。其作用环节可能与注射 LPS后 PMN被激活,释放蛋白酶类、氧自由基和多种活性物质增加有密切关系。弹性蛋白酶是 PMN释放的主要酶之一,正常情况下以有活性酶的形式存在于 PMN溶酶体中。当 PMN被激活、崩解脱粒时,弹性蛋白酶被释放,从而消化 EC表面和内皮下基质内的纤维连接蛋白,使 EC形态和基底膜结构发生改变,毛细血管通透性增加[8]。被激活的 PMN在毛细血管内"扣押"、与 EC粘附的同时,转移单电子的还原型辅酶Ⅱ氧化酶浓度升高而引起"呼吸爆炸",产生氧自由基增加[3,7,9],通过其较强的氧化作用引起细胞膜和膜性结构受损、功能障碍、胶原溶解、蛋白变性和多糖凝集等一系列组织损伤的变化[4]。

本实验肺泡隔面积密度图像分析结果表明, L组大鼠注射 LPS后各时相肺泡隔面积密度明显增加,即肺萎陷,肺泡腔有效气体交换面积缩小,且萎陷的程度与 PⅡ损伤、 ST含量及活性下降(另文报道)密切相关。这一改变除上述因素外可能与 PMN释放的磷脂酶 A_2 (PLA_2)增加有关[2]。 ST的主要成份为卵磷脂,是 PLA_2的最适底物;内毒素血症时,激活的 PMN和肺巨噬细胞释放 PLA_2增加,并进入肺泡腔,降解 ST,使 ST含量及活性下降,肺泡表面张力失常,从而促进肺水肿、肺萎陷的发生,加重肺组织损伤。

参考文献

1 Harkema J R, Hotchkiss J A. *In vivo* effects of endotoxin on intraepithelial mucosubstances in rat pulmonary airways. Am J Pathol, 1992; 141(2): 307

2 Tighe D, Moss R, Hynd J *et al*. A phospholipase inhibitor modifies the pulmonary damage associated with peritonitis in rabbits. Intensive Care Med, 1987; 13: 284

3 汪建新,黄念秋,李维华等.前列腺素 E_1对内毒素所致家兔急性肺损伤保护作用的实验研究.解放军医学杂志, 1995; 20(1): 36

4 Bloom R J, Simon L M, Benitz W E *et al*. Endotoxin and

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

pulmonary cells injury. Surg Gynecol Obstet, 1988; 167: 92
5 Goldblum S E, Brann T W, Ding X. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function. J Clin Invest, 1994; 93(2): 692
6 王 毅,朱佩芳,王正国.内毒素对内皮细胞钙-钙调蛋白复合物的影响.第三军医大学学报,1992; 14(4): 355
7 Wenger A, Pape H C, Banter C *et al*. Ascorbic acid reduces the endotoxin-induced lung injury in awake sheep. Eur J Clin Invest, 1994; 24(4): 229
8 Sawhney R S, Bone R C. Endotoxin alters the expression of extracellular matrix proteins by cultured endothelial cells. Cellular Mol Biol Res, 1993; 39(6): 589
9 Supinski G, Nethey D, Dimarco A. Effect of free radical scavengers on endotoxin-induced respiratory muscle dysfunction. Am Rev Respir Dis, 1993; 148(5): 1318

(收稿: 1995-12-08;修回: 1996-08-10)
(编辑 王 红、沈锡庚)

Endotoxin-induced pulmonary pathological changes and the role of polymorphonuclear neutrophils in the process of injury

Wang Shengxian, Chen Yisheng, Chen Zhiyuan, Qiao Yiran, Guo Deyu (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The pulmonary pathological changes in rats in the 1 h, 3 h, 5 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after the injection of lipopolysaccharide (LPS, group L) or nitrogen mustard and LPS (group NL) were observed with optical microscope, electron microscope and image analysis. The pathological changes in the lungs in group L were as follows: (1) Congestion, hemorrhage, edema and atelectasis of the pulmonary tissue; (2) Accumulation and degranulation of polymorphonuclear neutrophils (PMN) and platelets; (3) Swelling and necrosis of endothelial cells; (4) Degeneration of alveolar epithelial cells and the subsequent proliferation of type Ⅱ alveolar epithelial cells. These changes could be divided into circulatory disturbance phase, degeneration-necrosis phase and injury-repairing phase. The pulmonary pathological changes occurred more slowly and less severely in group NL than those in group L. Our findings suggest that PMN plays an important role in the process of pulmonary injury induced with LPS.

Key words pulmonary damage; endotoxin; polymorphonuclear neutrophil; rat

(上接 383页)

过程,及胚胎脊髓在损伤脊髓病理改变中除起到减轻了神经元和神经纤维的坏死变性程度,对损伤的神经元实施挽救作用外,还具有有效抑制病理囊腔的形成,可填补原发损伤造成的大块组织缺损,此外还防止了增生胶质细胞形成疤痕屏障,使之以一个较为理想的数量出现在损伤脊髓的修复过程中,明显地增加了再生神经纤维的数目。

3 讨论

本实验研究方法可用于观察胎鼠脊髓植入成鼠急性脊髓损伤的组织修复作用效果的研究,并能观察到胚胎植入脊髓后的不同时间的病理改变作用。

脊髓植入的全过程必须严格无菌操作,手术中应谨慎细心。

胚胎脊髓组织应分离纯净,结缔组织、骨组织等应剔除干净,否则会影响移植效果。

手术后作好抗感染、实验动物的饮食喂养等。

关键词 胚胎;脊髓损伤;髓腔
中图法分类号 R651.2

参考文献

1 韩风岳.脊髓神经组织移植研究.中国脊柱脊髓杂志,1992; (2): 4
2 李兵仓,李应玉,伍亚民等.胚胎脊髓对成鼠急性脊髓损伤的修复作用、光镜 CB-HRP示踪与还原银染法.中国脊柱脊髓杂志,1992; (4): 160
3 李兵仓,李应玉.大鼠胚胎脊髓植入对成鼠急性脊髓损伤的修复作用.第三军医大学学报,1993; 15(3): 203

(收稿: 1995-12-27;修回: 1996-08-13)
(编辑 汪勤俭)

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