DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.013

兔呼吸窘迫综合征肺泡隔纤维连接蛋白免疫组化观察

陈正堂 毛宝龄 姚玉泉* 耿建萌** 高广正* (第三军医大学新桥医院呼吸中心) 630037

提 要 用间接免疫过氧化酶法观察实验性呼吸窘迫综合征(RDS)兔肺泡隔纤维连接蛋白(Fn),发现其染色颗粒分布散乱无序,失去正常的"串珠样结构";沿肺泡上皮腔面排列的线条状Fn大段断裂。同时,血浆Fn持续低下,支气管肺泡灌洗液中的白蛋白及胶体渗透压升高,肺泡水肿液中发现较多Fn染色颗粒,后者可能是成人呼吸窘迫综合征(ARDS)晚期易发广泛肺纤维化的主要原因之一。以上结果提示,肺泡隔Fn的形态学异常在ARDS通透性肺水肿的发病中有重要作用;尽早保持肺泡-毛细血管膜的完整性,对于改善ARDS患者的最终预后有重要意义。

关键词 纤维连接素类;免疫组织化学;呼吸窘迫综合征;兔
中图法分类号 R563.8

成人呼吸窘迫综合征(ARDS)的特征之一是肺泡-毛细血管膜(ACM)通透性增加,致广泛的肺泡及间质水肿。这种变化是否与肺泡隔纤维连接蛋白(Fibronectin,Fn)的形态变化有关,尚未见文献报道。本实验用生物素标记的抗人Fn单克隆抗体(抗Fn-McAb),检测实验性RDS兔肺泡隔Fn形态学变化,探讨ACM通透性变化的机理。同时,检测血浆Fn水平,进一步探讨ARDS的发病机理。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型制作

健康成年家兔16只,平均体重2.82 kg,随机分成RDS(n=9)和生理盐水对照组(n=7)。用同种骨髓提取液0.5 ml/kg分次静脉注射的方法复制RDS模型[1],于致伤前,及伤后5、30 min、1、2、4、6 h抽血查动脉血气分析,检测血浆Fn。6 h后放血活杀,取材行下列观察。

1.2 观察指标

1.2.1 肺泡隔Fn免疫组化染色:抗Fn-McAb由解放军总医院免疫室提供,生物素标记的羊抗鼠IgG及ABC试剂均系美国Vector公司产品。参照Clemensen等的间接免疫过氧化酶法[2]进行染色,在Olympus显微镜下观察。

1.2.2 血浆Fn测定用免疫单扩散法[1]。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)白蛋白及胶体渗透压(胶渗压)的测定:动物活杀前抽取动脉血;活杀后以生理盐水20 ml/kg体重灌洗左肺,收取无血BALF。用溴甲酚绿法测定BALF白蛋白和血浆白蛋白浓度(分别以A_B和A_P表示),并求其比值(A_B/A_P);用IL-1303型胶体渗透压计测BALF和血浆的胶渗压(分别以C_B和C_P表示),并求其比值(C_B/C_P)。

1.2.4 用称重法测肺/体系数、肺/心系数。

1.3 统计分析

数据经微机单因素方差分析和t检验等处理,结果以$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 模型观察

RDS组兔静脉注入骨髓提取液后,呼吸明显增快,平均>80次/min,且呼吸窘迫。PaO_2立即从注射提取液前的11.29±1.21 kPa降至5.83±1.75kPa,至整个实验6 h结束,PaO_2持续<7.07 kPa。肺脏光镜病理观察,主要见肺间质及肺泡水肿,肺泡出血,多形核白细胞(PMN)浸润,微肺不张及代偿性肺气肿等病变,与临床ARDS尸检材料相符。

2.2 肺泡隔Fn免疫组化观察

用间接免疫过氧化酶法染色,对照组的肺泡隔,及支气管和小动脉的平滑肌细胞间,可见棕色的Fn染色颗粒,其颜色和大小与文献报道[2]相似。在肺泡隔,可见Fn染色颗粒在肺泡上皮下整齐排列,似在肺泡隔形成"串珠样"(图1)。还可见沿肺泡上皮腔面连续的Fn染色线(图2)。RDS组Fn染色线每见大段断裂而不连续(图3);肺泡隔Fn染色颗粒分布散乱无序,不见对照组的"串珠样结构"(图4)。在肺间质和肺泡水肿明显的区域,水肿液中可见较多的Fn染色颗粒(图5)。不加Fn-McAb的空白对照切片无染色颗粒或染色线条可见。

2.3 血浆Fn变化

RDS组致伤前血浆Fn为204.36±113.77 mg/L,伤后立即下降,30 min出现第一个低谷,为91.75±37.62 mg/L(P<0.01)。以后持续低于伤前,6h出现第二个低谷,为72.22±47.93 mg/L(P<0.05~0.01)。如图6所示。

2.4 BALF白蛋白及胶渗压的改变

RDS组BALF白蛋白及胶渗压显著高于对照组(P<0.05~0.01);BALF白蛋白与血浆白蛋白之比(A_B/A_P),BALF胶渗压与血浆胶渗压之比(C_B/C_P),RDS组均高于对照组(P<0.01)。如附表所示。

* 病理科 ** 化验科

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

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

2.5　肺水量的变化

RDS 组的肺体系数(0.63±0.05)和肺心系数(271.99±51.30)均高于对照组(分别为 0.39±0.09 和 180.34±33.24;$P<0.01$)。

3　讨论

本实验用分次静脉注射骨髓提取液的方法复制 ARDS 动物模型,从病因、动脉血气和肺脏病理改变等方面较好地模拟了严重创伤、多发性骨折,反复脂肪栓塞并发 ARDS 的临床情况,模型是稳定、可靠的,符合 ARDS 诊断标准[3]。

Fn 免疫原性很强,且有强烈的种属间交叉反应,抗人 Fn 抗血清可以与几乎所有哺乳动物的 Fn 产生沉淀反应[4]。故本实验可用抗人血浆 Fn－McAb 行兔肺组织 Fn 免疫组化染色,并取得阳性结果。Fn 除存在于血浆外,还分布于多种细胞的表面及基底膜等结缔组织,因而有血浆型和细胞型之分。在肺内,已发现其存在于肺泡上皮细胞及肺泡间隔[5],对于加强细胞间及细胞与基底膜之间的粘连,维持正常的 ACM 通透性可能有重要作用。本实验发现,RDS 模型兔肺泡上皮腔面线条状 Fn 染色线大段缺如;肺泡隔颗粒状 Fn 分布散乱,不成"串珠样结构"。提示实验性 RDS 时,肺泡隔细胞型 Fn 受到破坏,使肺泡上皮和肺泡毛细血管内皮细胞间的粘连,以及其与基底膜的粘附变得松散,ACM 通透性因而增加,大量血浆蛋白随之渗出,故 RDS 组 BALF 白蛋白和胶渗压显著升高。由于水分亦随之渗出,故反映肺水含量的肺/体、肺/心系数增加。因此,肺泡隔 Fn 免疫组化染色,有助于阐明 ACM 通透性增加的机理。

血浆型 Fn 是非抗体性调理素,可促进吞噬细胞吞噬功能[6]。RDS 组血浆 Fn 浓度显著低下,持续 6 h,其原因可能是大量脂肪微滴进入血循环,同时致伤后坏死组织及细胞碎片增加,吞噬这些颗粒使 Fn 消耗过多。严重的组织缺氧,Fn 合成亦可能下降。此外,肺水肿液中发现较多 Fn 颗粒,表明随着 ACM 通透性的增加,Fn 随血浆蛋白被渗出,并在肺内积聚。这也是血浆 Fn 严重低下的原因之一。血浆 Fn 低下,单核－吞噬细胞系统的吞噬功能障碍,大量异物颗粒得以进入肺循环,加重肺损伤,形成 ARDS 发病机制的恶性循环。因此,有人主张用富含 Fn 的冷沉淀剂治疗因血浆 Fn 低下而引起的各种并发症[7]。然而,在 ACM 结构的完整性被破坏,ACM 通透性增加的情况下,血浆 Fn 愈高,被渗出的就愈多,这种设想难能奏效。况且,被渗出到肺间质和肺泡的 Fn,对成纤维细胞是化学趋向物[8]。这可能是 ARDS 晚期易发生广泛肺纤维化的一个重要原因。因此,本实验结果提示,在 ARDS 早期,即应着力排除各种致病因子对 ACM 的损伤,保持 ACM 结构的完整性;在肺水肿发生后,输注外源性 Fn 制剂,有加重晚期肺纤维化的危险。

参考文献

1　陈正堂,毛宝龄,苟　俊等.氧自由基在实验性骨髓型呼吸窘迫综合征发病中的变化.中华内科杂志,1993;32:594

2　Clemmensen I, Holund B, Andersen RB. Fibrin and fibronectin in rheumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid. Arthritis Rheum,1983;26:479

3　ARDS 专题讨论会.成人呼吸窘迫综合征诊断标准(草案).解放军医学杂志;1989;14:326

4　吴培青,梁淑容,黄庭光.纤维粘连蛋白在小鼠肺腺癌中的分布.中华结核和呼吸杂志,1988;11:231

5　李玉瑞.细胞外间质的生物化学及研究方法.北京:人民卫生出版社,1982:140～146

6　Limper AH, Roamn J. Fibronection: A versatile martrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. Chest,1992;101:1663

7　汪为平,王云峰,综述,钱桐荪审校.纤维连接蛋白研究的若干进展.宁夏医学杂志,1988;10:175

8　Shoji S, Richard KA, Ertl RF et al. Bronchial epithelial cells produce lung fibroblast chemotactic factor: fibronectin. Am J Respir Cell Mol Biol,1989;1:13

(收稿:1994-06-20;修回:1994-12-08)

Immunohistochemical observation of alveolar septal fibronectin in respiratory distress syndrome in rabbits

Chen Zhengtang, Mao Baoling, Yao Yuquan, Gen Jianmeng, Gao Guangzheng (Clinical Center of Respiratory Disease, Xinqing Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract　The changes of alveolar septal fibronectin (Fn) in respiratory distress syndrome (RDS) were observed with indirect peroxidase method in rabbits. It was found that the scattered stained granules lost

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

their normal tourliform feature and the stained Fn lines lining the alveolar epithelium were broken. Albumin level and colloid osmotic pressure of the bonchoalveolar lavage fluid were markedly elevated. Plasma level of Fn was persistently low. Meanwhile, a lot of stained granules of Fn were found in the alveolar edema fluid. These findings suggest that the morphological abnormalities of alveolar septal Fn play an important role in the development of alveolar edema and early protection of the integrity of alveolar capillary wall may be of value to improve the prognosis of the patients with RDS.

Key words fibronectins; immunohistochemistry; respiratory distress syndrome; rabbit

肺癌眼转移三例

Three cases of metastatic optic lung cancer

王 一 伍宛苏 (第三军医大学西南医院眼科) 630038

眼部转移性癌肿较少见，而临床表现常呈多样性，易致误诊。我们收治了三例肺癌眼转移病人，各显其特点，现报告如下：

张××，男，72岁。左眼渐进性突出伴视力下降37天，加重10天，于87－3－6以"左眼眶肿瘤"诊断入院。发病以来无其它不适。检查：视力：右 0.7，左 0.04，左眼结膜充血(++)，水肿(+++)，角膜、前房、虹膜、眼底(－)。左眼球向正前方突出，各方运动受限，眼突出度为11>$\frac{101\ mm}{}$<17 mm。胸透未见异常。眼眶 CT 示：左眼眶内肿块，炎性假瘤可能性大。经抗菌素、皮质激素等治疗无效，眼突加重。于87－3－27行眶内容物剜除术，病理诊断为：左眼眶低分化腺癌(泪腺组织正常)，考虑为转移性腺癌。术后行胸片等检查，发现左上肺圆形阴影，呼吸科会诊，诊断为肺癌。

项××，男，52岁。左眼胀痛，视物变形，视力急剧下降二周。于91－4－3以"左眼球内肿瘤"诊断收入。查：视力：右 1.0，左无光感。左眼睫状充血(+)，角膜、前房、瞳孔(－)，眼底检查：见一实质性香菇状肿块突于玻璃体腔呈红黄色表面散在白色颗粒。视乳头、黄斑窥不清。眼压：右2.73 kPa，左 2.21 kPa。B 超示：左眼球内有一1.9×1.2 cm 大小边界不规则实性块影；肝内有实性占位块影。胸部 CT 示：左肺门癌(转移可能性大)。入院诊断：左眼脉络膜黑色素瘤。术后病理诊断：左眼球转移性腺癌(低分化)。最后诊断：1. 原发性肺癌；2. 肺癌眼、肝、腹股沟转移。术后行化疗。三个月后另一眼发生球内转移。

杨××，男，50岁。咳嗽、咳痰，胸背痛7年，伴不规则低热半年余，左眼视力下降一月。于94－3－8以"右肺中叶肺癌"诊断入胸外科。入院查：一般状况好，心、肺、腹部体检(－)。视力：右 1.2，左：手动，左眼结膜充血(+)，角膜、前房、虹膜(－)，眼底检查：左眼下方网膜球形隆起，呈灰白色，无波动感。视乳头，黄斑不能窥见。B 超示：左眼球内实质性团块影。胸部 CT 示：右肺中心型肺癌伴阻塞性肺炎。经纤维支气管镜检查，病理学及细胞学诊断为：小细胞肺癌。最后诊断：右中间支气管小细胞肺癌伴左眼球内转移。行化疗。

讨论

例一患者原发癌无明显临床表现，起病以眼部转移癌为主要表现，且术前常规胸透漏诊肺部病变，导致误诊。例二患者虽术前已发现肺部病变，因检查报告的误差及眼部临床表现的特殊性，使得原发灶与继发灶的诊断颠倒。例三患者因典型的临床表现及正确的辅助检查，诊断明确。从而可以看出肺癌眼转移的临床表现的多样性。因此我们认为：对于老年的眼眶或球内肿瘤，病程短，发展快，应注意追问病史及全身检查，常规行胸片检查，以防漏诊或误诊。

关键词 肺肿瘤；肿瘤转移；眼肿瘤

中图法分类号 R73－37

参考文献

1 Mikelberg FS, Rootman J, White VA. Metastatic small-cell carcinoma of the lung A photo essay. Can J Ophthalmol, 1994 Jun;29(3):141

2 Khawly JA, Shields MB. Metastatic carcinoma manifesting as angle-closure glaucoma. Am J Ophthalmol, 1994;118(1):116

(收稿：1994-05-30；修回：1994-10-18)

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