

中性粒细胞在大鼠深 II 度烧伤创面早期进行性损伤中的作用

王世筠 方培耀 许伟石 花兰女 金再敏 史济湘

【摘要】 目的 探讨中性粒细胞(PMNs)在大鼠深 II 度烧伤创面早期进行性损伤中的作用。方法 采用 SD 大鼠深 II 度烫伤模型,检测烧伤后大鼠外周血 PMNs 数量、创面组织中髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)含量,Masson's 三色染色及抗 Vimentin 免疫组化染色显示创面坏死组织。结果 外周血 PMNs 伤后即刻增加,4 h 达高峰;创面组织 MPO 活性伤后 24 h 达高峰;MDA 含量伤后 0.5 h 达最低,至 48 h 才高于正常;组织学观察伤后 48 h 坏死组织量显著多于伤后 24 h。结论 PMNs 导致的创面损伤集中发生在伤后 24 h 后。提示阻断 PMNs 粘附以减轻深 II 度烧伤创面早期进行性损伤,需在伤后 4 h 内进行,而使用抗氧化剂则应在伤后 24 h 内进行。

【关键词】 烧伤;中性粒细胞;髓过氧化物酶;丙二醛

The role of PMNs in early progressive injury of deep partial-thickness burn wound WANG Shijun, FANG Peiyao, XU Weishi, et al. Institute of Burn, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025

【Abstract】 Objective To examine the role of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in early progressive injury of deep partial-thickness burn wound. **Methods** After deep partial-thickness burn, the count of PMNs in beripheral circulation, activity of myeloperoxidase(MPO) and content of MDA in wound tissue of Spaque Dawley rats, were measured. Sections of wound biopsies were stained with Masson's trichromatic staining and anti-vimentin immunohistopathologic staining for identifying the injured tissue. **Results** PMNs counts increased immediately and reached a peak at 4 h postburn, and MPO activity peaked at 24 h postburn. MDA content was lowe at 0.5 h and higher at 48 h postburn than that of normal control. Histologic analysis showed that there was more necrotic tissue at 48 hr postburn than that at 24 h. **Conclusion** It was after 24 h postburn that PMNs induced tissue damage. The results suggest that intervention of PMNs adhesion should be under taken in about 4 h after thermal injury and anti-oxidizing agent should be given before 24 h postburn in order to prevent early progressive injury to the wound.

【Key words】 Burns; Neutrophils; Myeloperoxidase; Malondialdehyde

烧伤创面早期存在进行性损伤过程,多种因素参与了这一过程。其中激活的 PMNs 在参与机体应急反应和免疫防御的同时,可释放氧自由基、蛋白水解酶等,造成组织新的损伤。我们检测了大鼠深 II 度烧伤后外周血 PMNs 数量,创面组织中髓过氧化物酶(MPO)活性及丙二醛(MDA)含量,并对创面作了组织学观察。试图探讨 PMNs 在深 II 度烧伤早期创面组织进行性损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及烧伤模型制作^[1]

清洁级 SD 大鼠 50 只(上海瑞金医院动物所),雌雄不拘,体重 170~250 g。大鼠腹腔麻醉(戊巴比妥钠 35 mg/kg 体重),以硫化钠脱毛剂脱去背部体毛。24 h 后,水浴法(水温 80 ℃,时间为 6 s)造成背部 10% TB-SA 深 II 度烧伤(病理学检查证明),腹腔立即注射林格

液 5 ml 复苏。

1.2 分组及取材

伤前(0 h)、伤后 0.5、4、24、48 h 各取 10 只动物,采取外周血测定 PMNs 数量;取创面组织作 MPO 活性、MDA 含量测定,并作 Masson's 三色染色及抗 Vimentin 免疫组织化学检查。

1.3 大鼠深 II 度烧伤创面组织 MPO 活性测定

按文献[2]方法测定。

1.4 创面组织中 MDA 含量的测定

按南京建成生物技术研究所提供的试剂盒检测^[3]。

1.5 Masson's 三色染色^[4]

正常情况下,胶原在 Masson's 三色染色中染成亮绿色,胶原受热变性后,则被染成红色。

1.6 抗 Vimentin 免疫组化染色^[5]

Vimentin 抗原是分布于间质细胞,黑色素细胞,郎罕氏细胞中的一种膜表面抗原,利用特异的抗 Vimentin 抗体与之结合,并通过 ABC-AP 显色系统予以显示。

作者单位:200025 上海第二医科大学瑞金医院上海市烧伤研究所

表1 深Ⅱ度烧伤后大鼠外周血 PMNs 数量、创面 MPO 活性、MDA 含量变化

Tab 1 PMNs count in rats' peripheral blood, MPO activity and MDA content in rats' wound after deep partial-thickness burn

检测指标	伤前	伤后时间(h)			
		0.5	4	24	48
PMNs(× 10 ⁹)	0.0917 ± 0.0588	0.7700 ± 0.4688 *	1.7100 ± 0.7894 **##	0.8222 ± 0.6515 **##	0.4778 ± 0.2048
MPO(10 U/L)	0.2019 ± 0.0413	0.1748 ± 0.0518	0.1899 ± 0.0137	2.2089 ± 0.0463 **##	0.9480 ± 0.0710 **##
MDA(nmol/ml)	53.3722 ± 16.0244	28.9358 ± 3.8717 **	59.1341 ± 19.8679 ##	59.6113 ± 12.2733	65.9556 ± 17.0104 *

与伤前比较, * : P < 0.05, ** : P < 0.01; 与前一时间点比较, # : P < 0.05, ## : P < 0.01

1.7 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析, 两两比较作 *q* 检验。

2 结果

2.1 烧伤后外周血中 PMNs 数量的变化

伤后 0.5 h, 外周血中 PMNs 显著增加, 伤后 4 h 达高峰, 48 h 与正常水平无显著差异, 见表 1。

2.2 烧伤创面组织中 MPO 活性测定

伤后 0.5 h 比正常略有下降, 但无显著差异, 继而升高, 伤后 24 h 达高峰, 48 h 虽有下降, 但仍维持在较高水平, 见表 1。

2.3 深Ⅱ度烧伤创面 MDA 含量

伤后 0.5 h 创面组织 MDA 含量显著下降, 伤后 4 h 恢复至正常水平, 伤后 48 h 显著高于正常, 见表 1。

2.4 烧伤创面组织病理检查

Masson's 三色染色可见伤后 4 h 创面组织中有散在变性坏死的胶原, 见图 1。伤后 24 h, 创面组织中变性坏死的胶原融合成片, 见图 2。伤后 48 h, 创面组织中变性坏死的胶原明显多于伤后 24 h, 见图 3。

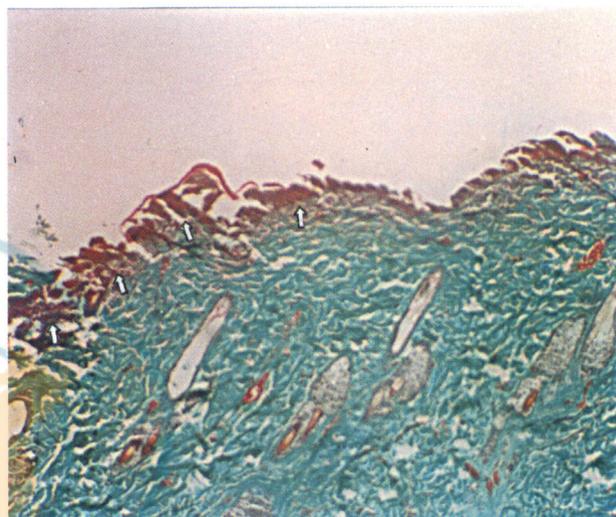


图2 大鼠伤后 24 h 创面组织中变性坏死的胶原纤维融合成片 Masson's 染色(× 10)

Fig 2 Denatured and necrosed collagen confuses in wound tissue of rats at 24 h postburn Masson's staining(× 10)

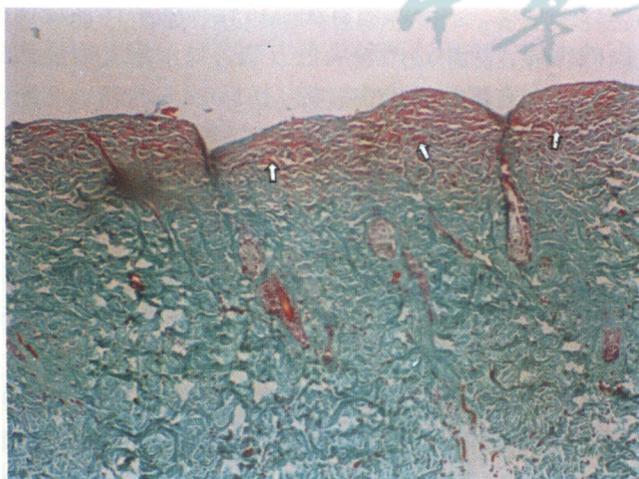


图1 大鼠伤后 4 h 创面组织中有散在变性坏死的胶原 Masson's 染色(× 10)

Fig 1 Collagen denaturation appears diffusely in wound tissue of rats at 4 h postburn Masson's staining(× 10)

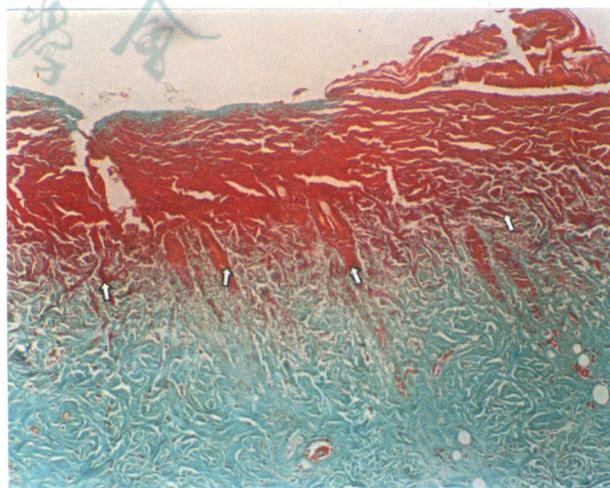


图3 大鼠伤后 48 h 创面组织中变性坏死的胶原纤维明显多于伤后 24 h Masson's 染色(× 10)

Fig 3 Collagen denaturation and necrosis in wound tissue of rats is more at 48 h than at 24 h postburn Masson's staining(× 10)

抗 Vimentin 免疫组化染色显示脱毛正常皮肤组织结构完整,成活组织被染成淡紫红色,表皮细胞因不具 Vimentin 抗原而呈本底色即土黄色。伤后 24 h,可见坏死组织不被染色,且融合成片(图 4)。伤后 48 h,坏死组织明显多于伤后 24 h(图 5)。

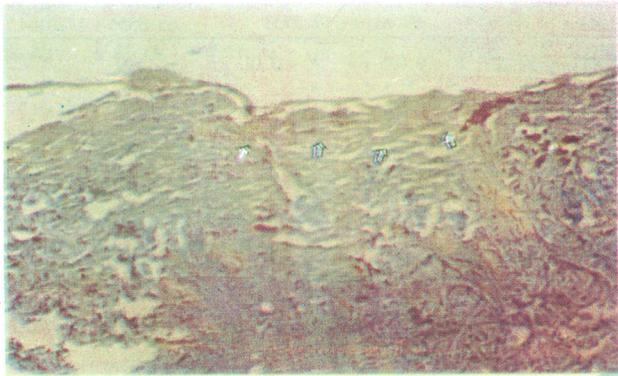


图 4 大鼠烧伤后 24 h 创面组织中可见坏死成份
抗 Vimentin 免疫组化染色 ($\times 10$)

Fig 4 Necrotic tissue in wound of rats is presented at
24 h postburn. Anti-Vimentin immuno-
histopathological staining ($\times 10$)

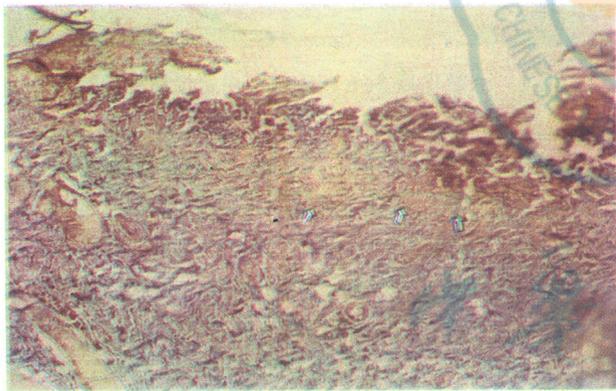


图 5 大鼠烧伤后 48 h 创面组织中变性坏死成份明显多
于伤后 24 h 抗 Vimentin 免疫组化染色 ($\times 10$)

Fig 5 Necrotic tissue in wound of rats is more at 48 h
than at 24 h postburn. Anti-Vimentin immuno-
histopathological staining ($\times 10$)

3 讨论

PMNs 在机体的防御反应和免疫反应中发挥着重要的作用。烧伤创面坏死物质、微循环障碍导致的缺血、缺氧、炎症介质(如 C5a)和细胞因子(如 IL-1)均可激活 PMNs,不但可使 PMNs 生成增加,也使外周血中成熟的 PMNs 游出血管,PMNs 到达创伤部位可释放出氧自由基、蛋白水解酶等起着抗感染作用的同时,也造成组织新的损伤,表现为创面的加深和扩大^[6],因而弄

清 PMNs 在创面组织致伤作用的规律,可为通过干预 PMNs 减轻组织的进行性损伤提供依据。

MPO 是 PMNs 特征性酶,组织中 MPO 活性间接反映了 PMNs 的含量^[7]。MDA 是氧自由基激发的脂质过氧化的中间产物,组织中 MDA 含量间接反映组织细胞膜氧化受损的程度^[3]。

我们的研究表明,动物经受烧伤打击后血循环中 PMNs 明显增加,且在伤后 4 h 达高峰,以后逐渐减少,伤后 48 h 恢复正常。创伤后循环中 PMNs 来源于边缘池和骨髓内成熟的 PMNs,以 $10^6/s$ 的速度向循环池释放。随着病情的演进,创面 PMNs 开始递增,表明血循环中 PMNs 被激活,向烧伤创面或向其它脏器聚集^[8],创面浸润的 PMNs 在伤后 24 h 达高峰,以后呈下降趋势,但仍高于正常,这些结果说明 PMNs 向创面浸润主要发生在伤后 4~48 h。

在正常生理状况下,细胞可自发产生氧自由基。本研究中,创面 MDA 含量在伤后 0.5 h 反而下降,可能的解释是烧伤早期皮肤上活细胞数目骤减,作为活细胞能量代谢过程产物的氧自由基生成也相应减少,因此创面组织中 MDA 含量亦降低。随着损伤发展,伤后早期以 PMNs 为主的炎症细胞向创面浸润并释放氧自由基,导致创面组织中 MDA 含量逐渐增加,伤后 48 h 显著高于正常。

Masson's 三色染色结果反映了胶原变性的程度^[4];而 Vimentin 抗原则是基质细胞,内皮细胞,白细胞,郎格细胞等的膜抗原,其染色脱失则反应了细胞受损变性的程度^[6],表明两者相互可作为客观评估烧伤深度的指标。应用这两种染色方法,显示深 II 度烧伤早期创面存在进行性损伤过程,伤后 24 h 内新增坏死组织融合成片,并且坏死继续进行,伤后 48 h 坏死组织明显多于伤后 24 h。应用巴曲酶改善机体凝血及纤溶状态后,仅能在伤后 24 h 内减轻创面进行性损伤,表明伤后 24 h 后尚有其它因素参与这一损伤过程^[9]。本研究结果提示在伤后 24 h 介导组织进行性损伤的因素中有中性粒细胞参与。

研究还表明,在伤后 4 h 内应用阻断 PMNs-ECs 间粘附的措施有可能减轻组织进行性损伤。PMNs 导致组织损伤由氧自由基、弹力蛋白酶等引起,因此针对 PMNs 介导的损伤,除干扰其与 ECs 间粘附的途径外,抗氧化剂与蛋白酶抑制剂联合应用也可能是一条有效的途径,且抑制剂应在伤后 24 h 内使用才可能有较理想的效果。

参 考 文 献

1 冯世杰, 花兰女, 严忠馥, 等. 大鼠烫伤模型制作. 上海第二医科大学学报, 1995, 15: 195 - 197.

2 罗向东, 杨宗城, 黎 鳌. 家兔烧伤早期内脏血管内皮细胞损伤的变化. 第三军医大学学报, 1995, 17: 279 - 282.

3 Ohkawa H, Chishi N, Yagik. Assay lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Ann Biol Chem, 1979, 95: 351 - 358.

4 Chavapil M, Speer DP, Owen JA, et al. Identification of the depth of burn injury by collagen stain ability. Plast Reconstr Surg, 1984, 73: 438 - 441.

5 Nanney LB, Wenczak BA, Lynch JB. Progressive burn injury documented

with vimentin immunostaining. J Burn Care Rehabil, 1996, 17: 191 - 198.

6 Arturson G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. The Rudi Hermans Lecture, 1995. Burns, 1996, 22: 255 - 274.

7 Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol, 1982, 78: 206 - 209.

8 Stengle J, Meyers R, Pyle J, et al. Neutrophil recruitment after remote scald injury. J Burn Care Rehabil, 1996, 17: 14 - 18.

9 方培耀, 杨丽英, 丁 韧, 等. 巴曲酶对大鼠深Ⅱ度烫伤创面加深的治疗作用. 上海第二医科大学学报, 1998, 18: 186 - 188.

(收稿日期: 1999-11-20; 编辑: 赵云)

· 病例报告 ·

应用包皮带蒂皮瓣修复全阴囊Ⅲ度烧伤 1例

沙力木江 冯德华 亚森 马强

病例 患者,男,36岁,1998年9月8日因电瓶内硫酸不幸倒在阴囊处致阴囊Ⅲ度烧伤,伤后第2天入院治疗。

查全阴囊可见皮革样变,颜色发黑,形成焦痂,无痛觉,肿胀明显,总面积约1%TBSA,为Ⅲ度。入院后,全身应用抗生素和局部换药,创面焦痂脱落缓慢,炎性分泌物多,有臭味。伤后18d在连续硬膜外麻醉下,行全阴囊焦痂切除阴茎包皮带蒂皮瓣移植修复术。探查中见烧伤损害已深达全阴囊皮肤及内筋膜,左侧睾丸比右侧大,质硬,左提睾肌坏死,故切除全部坏死组织,止血,多次冲洗。切痂后创面为9cm×11cm,游离伤口周围皮下组织进行拉拢缝合,伤口缩小为7cm×9cm。

手术及皮瓣设计:选择常规包皮环切切口,先在阴茎包皮背面纵行切(剪)口,长约3.5cm,切口止点向左右两侧横向剪开各长约3.5cm,见图1、2。阴茎背面冠状沟边缘皮肤切口与阴茎皮肤切口对合,间断缝合5~6针,见图2、3。然后阴茎腹面持续环切(保留系带部分),再用血管钳钝性分离,张开阴茎腹面皮瓣。带蒂皮瓣大小为7cm×9cm。估计足够覆盖全阴囊皮肤的缺损。术中观察皮瓣血循环良好,将阴茎腹面皮肤切口边缘与阴囊皮肤缺损处上缘对合缝合,再张开阴茎包皮皮瓣覆盖于阴囊缺损之处缝合。术后第10天行皮瓣断蒂,伤口甲级愈合。

讨论 用包皮带蒂皮瓣修复阴囊Ⅲ度烧伤是一种新的尝试。本皮瓣未损伤创面周围的正常组织,且皮瓣皮下组织少,柔软而薄,皮瓣离伤口近,其组织的生理特点和外观相似,伸缩性好,耐磨。皮瓣具有取材方便、血循环丰富、手术简单、成活率高、极易推广的优点。

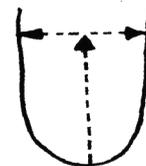


图1 切口设计

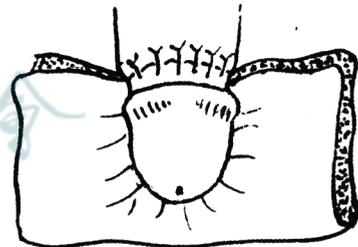


图2 包皮背面瓣切开后

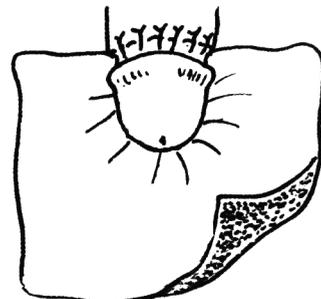


图3 包皮瓣全张开后

(收稿日期: 1999-02-10; 编辑: 冷怀明)

作者单位: 830054 乌鲁木齐 新疆医科大学第一附属医院烧伤整形科