

大鼠烟雾吸入性损伤肺组织浸润出血和渗出的变化

罗奇志 杨天德 杨宗城

【摘要】 目的 探讨烟雾吸入性损伤大鼠红细胞(RBC)、中性粒细胞(PMN)和白蛋白从血管进入肺组织的不同机制。**方法** 采用 Wistar 大鼠烟雾吸入性损伤模型,分别于伤后 1、3、6、12、24 h 处死,处死前 1 h 分别注射¹³¹I-牛血清白蛋白(BSA)、^{99m}Tc-PMN、^{99m}Tc-RBC。经等渗盐水灌洗,去除体循环内血液,取肺组织进行 γ 计数并称重,计算单位时间内单位重量肺组织中¹³¹I-BSA、RBC 的渗出量和 PMN 的浸润量;应用磷酸邻联茴香胺法测定髓过氧化物酶(MPO)含量。**结果** 伤后 1 h 大鼠 RBC 渗出量达高峰期,为 $(3.57 \pm 0.63) \times 10^6$ 个/g,后逐步下降,伤后 24 h 恢复正常;PMN 浸润量在伤后 3 h 明显升高,伤后 6 h 略有降低,但仍高于正常,伤后 12 h 再度升高;伤后 1 h 起大鼠肺组织 MPO 的含量逐渐升高,直到伤后 24 h;伤后 1 h 肺组织中¹³¹I-BSA 渗出明显增高,6 h 达高峰期,为 (164.1 ± 51.7) 放射性荧光闪烁计数 $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,24 h 时仍高于正常。**结论** 伤后大鼠肺组织中出血、PMN 的浸润和 BSA 渗出均升高,但峰值时间不同。炎症不是红细胞渗出的前提,但继发性炎症反应可能是肺水肿的主要原因。

【关键词】 烧伤,吸入性; 炎症; 出血; 肺水肿

Changes in the polymorphonuclear neutrophil infiltration, hemorrhage and plasma exudation in the pulmonary tissue in rats with smoke inhalation injury LUO Qi-zhi, YANG Tian-de, YANG Zong-cheng. Institution of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the different velocity of polymorphonuclear neutrophil (PMN) infiltration, erythrocyte diapedesis and plasma exudation into the pulmonary tissue of the rats inflicted with smoke inhalation injury, so as to explore the different mechanisms of their existence in rat pulmonary tissue after inhalation injury. **Methods** The rat smoke inhalation injury model was employed in the study. Wistar rats were inflicted with smoke inhalation injury, and then sacrificed at 1, 3, 6, 12 and 24 post injury hours (PIH). ¹³¹I-BSA, ^{99m}Tc-PMN or ^{99m}Tc-erythrocytes (RBC) were injected into rat pulmonary tissue 1 hour before sacrifice. Isotonic saline was infused into blood vessel to wash out circulation blood. Then the pulmonary tissue samples were harvested for γ -value counting and then weighed. The infiltration of ¹³¹I-BSA, ^{99m}Tc-PMN or ^{99m}Tc-RBC in pulmonary tissue per gram and per minute was calculated, and MPO content was measured by phosphate T-tolidine method. **Results** The amount of RBC diapedesis in rat lung tissue peaked at 1 PIH, decreased thereafter and approached to normal level at 24 PIH. The amount of PMN infiltration increased at 3 PIH, slightly decreased at 6 PIH but still higher than that in normal tissue, and increased again at 24 PIH. The pulmonary tissue content of MPO gradually increased from 1 PIH to 24 PIH. The pulmonary tissue content of ¹³¹I-BSA began to increase at 1 PIH and peaked at 6 PIH, and remained higher than that in normal tissue till 24 PIH. **Conclusion** Even though there was remarkable postburn increase in the erythrocyte diapedesis, neutrophil infiltration and albumin exudation with different peak time points (1, 3 and 6 PIH, respectively), Inflammation seemed not to be the premise of erythrocyte diapedesis, while the secondary inflammatory reaction might be the main cause of pulmonary edema.

【Key words】 Burn, inhalation; Inflammation; Hemorrhage; Pulmonary edema

犬一侧肺吸入烟雾可造成另一侧肺损伤^[1],提示机体肺组织在伴随烟雾直接损伤的同时发生了炎症反应,炎症造成的肺继发性损伤是肺功能衰竭的基础^[2]。中性粒细胞(polymorph nuclear neutrophils, PMN)在炎症反应中起重要作用。当病原微

生物入侵时,大量的 PMN 在入侵部位聚集并释放的毒性产物如反应性氧自由基、阴离子蛋白和蛋白酶能杀伤病原体。吸入性损伤后 PMN 向肺组织浸润聚集,其释放的毒性产物极易造成或加重自身组织的损伤^[2-4],此时给予抗 PMN 血清和白细胞消耗能减轻肺组织的炎症,抑制肺血管通透性增强^[3,4]。本实验拟通过观察大鼠烟雾吸入性损伤后 PMN 浸润、出血和蛋白渗出的规律,探讨吸入性损伤后 PMN 游出血管外的方式,为进一步研究奠定基础。

基金项目:全军“十五”指令性课题资助项目(01L066)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室

材 料 与 方 法

一、动物来源与分组

健康 Wistar 大鼠 284 只, 体重 190 ~ 240 g, 由四川省中药研究所实验动物中心提供。实验前在笔者单位动物室适应性喂养 1 ~ 2 周, 室温 20 ~ 26 °C。随机将动物分为正常对照组 (48 只)、烟雾致伤组 (236 只)。烟雾致伤组按时相点分为伤后 1、3、6、12、24 h 组, 每组鼠数分别为 48、48、44、48、48 只。检测每项指标时平均分配各时相点的动物。

二、制作大鼠烟雾吸入性损伤模型

参照文献[3], 发烟材料为 150 g 烤干的松木屑 + 15 ml 煤油拌匀。向烟箱充烟 10 min, 充烟量为 800 ml, 箱内温度至 (35 ± 2) °C 时, 将大鼠放入烟箱吸烟 5 min, 间隔 5 min, 反复 3 次。

三、检测指标

1. 测定肺血管通透性(白蛋白渗出量): 参照文献[4]以 ¹³¹I 标记牛血清白蛋白(¹³¹I-bovine serum albumin, ¹³¹I-BSA) 备用, 大鼠于处死前 1 h 股静脉内注射 0.1 ml (2.5 μg) ¹³¹I-BSA [(5.7 ± 0.5) × 10⁴ 放射性荧光闪烁计数 · min⁻¹]。巴比妥钠麻醉, 肝素(100 U/g) 抗凝, 取 1 ml 血测 γ 值。在大鼠股动脉放血、腹主静脉滴注等渗盐水, 至流出液无血色为止。取肺右下叶组织放入已称重的塑料试管中, γ 计数并称量, ¹³¹I-BSA 渗出量(放射性荧光闪烁计数 · min⁻¹ · g⁻¹) = 组织 γ / 组织湿重。

2. 测定肺组织中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) 活力: 参照文献[5], 取肺组织 100 mg, 加入 50 mmol/L 匀浆缓冲液(pH 6.0, 含质量浓度 0.5% 溴化十六烷基三甲胺) 2 ml 匀浆, 4 °C、3000 × g 离心 30 min, 取 0.1 ml 上清置入 25 °C 水浴。加同样温度的反应液 2.9 ml (磷酸邻联茴香胺 167 mg/L、H₂O₂ 5 mg/L 及磷酸盐缓冲液 50 mmol/L) 混入该上清液, 立即在紫外分光光度计下进行 2 min

的扫描, 测波长 460 nm 下吸光度(A) 值的变化(30 ~ 90 s), 计算 MPO 活力。MPO 最小活力单位相当于 25 °C 时每分钟分解 1 μmol H₂O₂, MPO 活力值实为一个相对最小活力单位而言的比值, MPO = ΔA (460 nm 下每分钟变化值) × 反应液体积 / (11.3 × 所取组织重量)。

3. 测定肺组织中 PMN 浸润量: 按常规用 ^{99m}Tc 标记 PMN^[6], 大鼠处死前 1 h 注射 0.2 ml ^{99m}Tc-PMN。测定每毫升 γ 计数, 方式同肺血管通透性测定。PMN 浸润量 = (组织 γ / 血 γ) × 平均白细胞计数 / 组织湿重。

4. 测定肺组织红细胞(RBC) 渗出量: 于各检测时相点前 2 h 用 ^{99m}Tc 标记 RBC^[7], 大鼠处死前 1 h 注射 0.2 ml ^{99m}Tc-RBC, γ 计数方法同肺血管通透性测定。RBC 渗出量 = (组织 γ / 血 γ) × 平均红细胞计数 / 组织湿重。

四、统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用华西医科大学 PEMS 2.0 医用统计程序包, 进行 t 检验。

结 果

烟雾致伤组大鼠肺组织 ¹³¹I-BSA 渗出量在伤后 1 h 明显增高, 6 h 为高峰, 24 h 仍高于正常对照组 (P < 0.01)。肺组织 MPO 伤后 1 h 起逐渐增高, 直至伤后 24 h (P < 0.05 ~ 0.01)。PMN 浸润量在大鼠伤后 3 h 明显增高, 伤后 6 h 略有降低, 但仍高于正常, 继而再度升高, 至伤后 24 h 仍高于正常 (P < 0.01)。伤后 1 h 大鼠肺组织 RBC 渗出量达高峰, 后逐步下降 (P < 0.01), 于伤后 24 h 恢复正常。见表 1。

讨 论

大鼠吸入烟雾致伤后, 表现为呼吸增快, 鼻孔有白色泡沫状分泌物, 病理观察见伤后 3 h 大鼠肺部

表 1 大鼠吸入性损伤后不同时相点肺组织中 ¹³¹I-BSA、MPO、PMN、RBC 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Changes in ¹³¹I-BSA, MPO, PMN and RBC in the rat pulmonary tissue after inhalation injury ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | ¹³¹ I-BSA 渗出 (放射性荧光闪烁计数 · min ⁻¹ · g ⁻¹) | MPO 活力 (U/g) | PMN 浸润 (×10 ³ 个/g) | RBC 渗出 (×10 ⁶ 个/g) |
|-----------|----|---|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组 | 48 | 60.2 ± 11.4 | 1.51 ± 0.31 | 0.48 ± 0.15 | 0.21 ± 0.09 |
| 伤后 1 h 组 | 48 | 126.3 ± 17.6** | 2.03 ± 0.10* | 0.74 ± 0.16 | 3.57 ± 0.63** |
| 伤后 3 h 组 | 48 | 119.3 ± 14.2** | 2.22 ± 0.40** | 2.61 ± 0.63** | 3.00 ± 0.76** |
| 伤后 6 h 组 | 44 | 164.1 ± 51.7** | 2.30 ± 0.53** | 1.83 ± 0.46** | 1.60 ± 0.30** |
| 伤后 12 h 组 | 48 | 148.1 ± 29.4** | 3.10 ± 0.20** | 2.29 ± 0.63** | 1.55 ± 0.14** |
| 伤后 24 h 组 | 48 | 106.2 ± 18.1** | 3.00 ± 0.11** | 2.20 ± 1.14** | 0.43 ± 0.20 |

注: ¹³¹I-BSA 为 ¹³¹I 标记牛血清白蛋白, MPO 为髓过氧化物酶, PMN 为中性粒细胞, RBC 为红细胞; 与正常对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

细支气管周围有出血、水肿套^[1], 伤后 6 h 可见气管黏膜坏死脱落, 易导致通气功能障碍。实验中笔者观察到的烟雾致伤后肺不张、肺顺应性下降是造成通气功能障碍的主要因素。

烟雾吸入造成肺损伤除热力和烟雾等直接原因外, 炎症和应激是肺实质继发性损伤的主要因素。炎症过程中 PMN 起着十分重要的作用, 促 PMN 浸润的因素能加重肺损伤, 抗 PMN 的血清和减少血 PMN 的量可减轻炎症, 抑制血管通透性的增加, 减轻肺损伤^[3,8,9]。本实验结果显示, 大鼠伤后肺组织中 PMN 浸润速率显著增加, 伤后 3 h 最高浸润速率达正常值的 5.43 倍, 为 $(2.61 \pm 0.63) \times 10^3$ 个/g, 说明吸入性损伤后有大量 PMN 向肺组织浸润。

PMN 的标志酶 MPO 反映 PMN 在肺组织累积的量^[5], 因 MPO 存在于 PMN 的嗜天青颗粒中, PMN 激活时可以释放部分 MPO, 特别是当某些被吞噬物(如沉积在基底膜上的免疫复合物或坏死组织等)没被包入吞噬小泡时, PMN 颗粒中大量有害物质如 H_2O_2 、蛋白酶、阴离子蛋白等均能造成细胞损伤, 在吸入性肺损伤中起重要作用。本实验中吸入性损伤大鼠组织匀浆中 MPO 活性明显升高, 12~24 h 达高峰, 约为正常对照组的 2 倍, 提示肺组织中有大量 PMN 聚集。但 PMN 浸润速率的高峰与 MPO 活性的高峰出现时间并不一致, 前者早于后者, 且有 2 个峰值出现。第 1 峰现象可能是烟雾直接作用导致 PMN 浸润, 第 2 峰为继发性炎症过程中 PMN 的浸润, 相对较晚出现的 MPO 高峰提示先前有 PMN 在肺中积聚。

比较 RBC、PMN 和 BSA 从血管进入肺组织的速度变化, RBC 渗出高峰在伤后 1 h, 随后逐渐下降, 伤后 24 h 基本回复至正常水平。肺组织 PMN 浸润有 2 个高峰, 伤后 3 h 为第 1 峰, 伤后 12 h 为第 2 峰。RBC 渗出高峰早提示肺出血发生时间早, 显然与 PMN 的浸润无关, 而是烟雾直接损伤所致。

但 ^{131}I -BSA 的渗出高峰却在 PMN 出现第 1 高峰之后, 提示 PMN 的肺组织浸润对内皮细胞的损伤及 BSA 渗出有促进作用。PMN、RBC 和 BSA 三者出血管的方式各不相同, PMN 被激活后能与内皮细胞黏附, 在内皮细胞的协同作用下主动迁移出血管^[10], 而 BSA 和 RBC 渗出是被动过程, 但二者间也有所不同, 出血往往是在血管破裂时发生, 当内皮细胞被激活后出现收缩, 其间隙增大时, BSA 渗出就可发生。

本实验结果中 PMN 浸润、RBC 和 BSA 渗出的高峰时间不同, 表明它们进出肺组织的机制各异, 并且继发性炎症反应可能对 BSA 的渗出有影响。

参 考 文 献

- 1 李晓辉, 杨宗城, 刘志远, 等. 烟雾吸入致伤犬右侧肺引发左侧肺损伤的实验研究. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 718-720.
- 2 Alarie Y. Toxicity of fire smoke. Crit Rev Toxicol, 2002, 32: 259-289.
- 3 李文军, 杨宗城, 杨晓东, 等. 烟雾吸入性损伤大鼠肺组织细胞凋亡与增殖的变化. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 139-141.
- 4 夏宗勤, 朱桐, 肖祥熊, 等. 实验核医学与核药理学. 上海: 同济大学出版社, 1989. 110-111.
- 5 罗武生, 郭兆贵. 用髓过氧化物酶法测定心肌组织中的中性粒细胞. 中国药理学通报, 1990, 6: 264-266.
- 6 Henning, Kelbaek, Jan Fogh. Technetium- 99m labing of polymorphonuclear leukocytes preparation with two different stannous agents. J Nucl Med, 1986, 26: 68-71.
- 7 章净霞. 核素稀释法. 见: 夏宗勤, 主编. 实验核医学与核药理学. 上海: 同济大学出版社, 1989. 167.
- 8 Schmalstieg FC, Chow J, Savage C, et al. Interleukin-8, aquaporin-1, and inducible nitric oxide synthase in smoke and burn injured sheep treated with percutaneous carbon dioxide removal. ASAIO J, 2001, 47: 365-371.
- 9 Murakami K, McGuire R, Cox RA, et al. Recombinant antithrombin attenuates pulmonary inflammation following smoke inhalation and pneumonia in sheep. Crit Care Med, 2003, 31: 577-583.
- 10 罗奇志, 杨宗城, 杨天德. 烟雾吸入性损伤血清对中性粒细胞粘附及迁移作用的体外研究. 中华整形烧伤外科杂志, 1998, 14: 414.

(收稿日期: 2003-04-17)

(本文编辑: 赵敏 王旭)

· 消息 ·

广东省烧伤外科分会召开换届会议

2004 年 4 月 1 日第二届广东省烧伤外科分会换届选举在广州市举行, 到会新老委员共计 43 人, 由广东省医学会学术会务部丰捷主任代表广东省医学会组织了换届选举。全体委员经无记名投票选举陈华德为新一届主任委员, 荣新洲、李叶扬和祁少海为副主任委员, 并选举了 13 名常务委员, 分别是: 陈华德、祁少海、王甲汉、肖能坎、冯祥生、荣新洲、李叶扬、李孝建、谭新东、朱志祥、陈晓武、梁履华、何国。会后新老委员合影留念, 并召开了第二届广东省烧伤外科分会第一次委员会会议, 会议由陈华德主任委员主持, 广东省医学会学术会务部丰捷主任亲临指导。会上对如何加强学术活动进行了热烈讨论。并决定今年 8 月底在广州市召开第二届广东省烧伤外科学术会议, 将邀请省内外及国外知名专家做学术专题报告。