

脓毒症小鼠肝肺损伤机制的研究

臧传波*, 吴荣谦, 宋旭华, 徐迎新, 李 荣

(解放军总医院普通外科, 北京 100853)

[摘要] **目的:** 利用盲肠结扎穿孔伴严重腹腔感染造成的脓毒症模型, 探讨脓毒症肝、肺损伤的机制。**方法:** 24 只雄性昆明小鼠随机分为 2 组, 盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)组和假手术对照组。术后 3 h 和 12 h 检测肝、肺微血管通透性改变、组织含水量以及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性的改变, 并检测肝窦内皮细胞和肺微血管内皮细胞的凋亡情况。**结果:** 肝、肺微血管的通透性在 CLP 后 12 h 明显高于对照组($P < 0.01$)。CLP 同时造成肝、肺组织的含水量和 MPO 活性明显高于对照组。另外, 在 CLP 组 12 h 肺微血管内皮细胞的凋亡率为 $(5.03 \pm 0.92)\%$, 对照组为 $(3.48 \pm 1.21)\%$, 两者比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。**结论:** 脓毒症可引起严重的肝、肺组织损伤, 肺微血管内皮细胞凋亡可能是导致脓毒症肺微血管通透性增高并引起肺损伤的重要原因。

[关键词] 脓毒症; 肝损伤; 肺损伤; 细胞凋亡

[中图分类号] R 631 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0616-04

Mechanism of liver and lung injury in septic mice

ZANG Chuan-bo*, WU Rong-qian, SONG Xu-hua, XU Ying-xin, LI Rong (Department of General Surgery, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the mechanism of liver and lung injury in mouse septic models. **Methods:** Twenty-four male Kunming mice were subjected to cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation. The permeability of microvasculature, water contents, activities of myeloperoxidase (MPO) and the apoptosis of microvascular endothelial cells in lung microvasculature and liver sinus were examined 3 h and 12 h after operation. **Results:** Both the liver and lung showed a significant increase in microvessel permeability at 12 h in CLP group compared with sham operation group. MPO activity and water content in CLP group were obviously higher than those in the sham operation group. The apoptosis of lung microvascular endothelial cells at 12 h in CLP group $(5.03 \pm 0.92)\%$ was significantly higher than that of control group $(3.48 \pm 1.21)\%$ ($P < 0.01$). **Conclusion:** Sepsis can lead to severe injury to the liver and lung. Apoptosis in lung microvascular endothelial cells might cause alteration of microvascular permeability, finally resulting in the injury of lung.

[KEY WORDS] sepsis; liver injury; lung injury; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6): 616-619]

脓毒症是外科临床常见的一种危重症,除了可以引起剧烈的全身炎症反应外,还常导致肝、肺、肾、肠道和脑等多个器官的功能失常^[1],其中肺损伤发生早、病情重,常是患者死亡的直接原因,但是肺损伤的发生机制目前尚不完全清楚。一般认为肺微血管通透性增高是造成肺损伤的病理基础,其中内皮细胞损伤可能起着关键性作用。本研究以盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)造成的脓毒症小鼠为模型,研究肝、肺组织的损伤以及内皮细胞在脓毒症微血管损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 选用雄性昆明小鼠 24 只,体质量 18~22 g(由解放军总医院实验动物中心提供),随机分为 2 组,CLP 组(以 CLP 方法制作脓毒症小鼠模型)和假手术对照组,每组再分为术后 3 h

和 12 h 两个亚组($n=6$)。

1.2 肝、肺微血管通透性检测^[3] 经小鼠尾静脉注射 1.5%伊文思蓝 0.1 ml/10 g 体质量,1 h 后脱颈法处死小鼠,取出肝、肺组织称质量,然后加入 4 ml 甲酰胺,于 56℃ 孵育 72 h 以提取组织中的伊文思蓝,离心取上清用分光光度计 625 nm 处比色,以每 1 mg 组织所含伊文思蓝的 μg 数表示微血管通透性的高低。

1.3 肝、肺组织含水量检测 处死动物后,立即取出肝、肺组织,称取其湿质量,70℃ 烤干 72 h 后称取其干质量,并按下列公式计算其含水量百分比:含水

[基金项目] 国家自然科学基金(39870796,30000161). Supported by National Natural Science Foundation of China(39870796,30000161).

[作者简介] 臧传波,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: zangcb@gmail.com

量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量。

1.4 肝、肺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性检测^[4] 取肝或肺组织约100 mg,加0.5% HTAB 2 ml制备匀浆,反复冻融3次并超声粉碎(10 s 3次),4℃ 40 000×g离心30 min,取上清0.1 ml加反应液2.9 ml,保持温度于25℃,立即在分光光度计460 nm波长下进行2 min的扫描,记录第30秒和第90秒的光密度差值,以此1 min内光密度的变化表示酶活力的改变。MPO活力(U/g) = $\Delta D_{460} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (11.3 \times \text{所加组织量 g/L 反应液})^{-1}$ 。

1.5 内皮细胞凋亡的检测

1.5.1 流式细胞仪检测肝、肺微血管内皮细胞的凋亡 按文献^[5]的方法分离肝窦内皮细胞,按Grau等^[6]的方法分离肺微血管内皮细胞,经锥虫蓝染色检测其存活率。取 1×10^6 个细胞,进行第八因子相关抗原(间接免疫荧光法、FITC标记)与PI双重染色,以流式细胞仪分析第八因子相关抗原阳性细胞的细胞周期,计算第八因子相关抗原阳性细胞的凋

亡比例。

1.5.2 原位检测细胞凋亡 取适量肝、肺组织,用10%中性甲醛溶液固定,常规石蜡切片,以凋亡原位检测试剂盒(ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon)进行凋亡染色,光学显微镜下分析肝、肺微血管内皮细胞凋亡的改变。

1.6 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组设计的两样本均数比较(双侧t检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,数据均经SAS 8.0统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 脓毒症小鼠肝、肺微血管通透性改变 CLP后3 h肝、肺微血管通透性即开始有所升高但与对照组比较尚无显著性差异,至CLP后12 h肝、肺微血管通透性明显增高,与对照组相比差异显著($P < 0.01$),且肺微血管通透性增高的程度明显高于肝($P < 0.01$,表1)。

表1 肝、肺微血管通透性改变

Tab 1 Changes of microvascular permeability in the liver and lung

Group	Liver		Lung	
	3 h after CLP	12 h after CLP	3 h after CLP	12 h after CLP
Control	0.039 ± 0.004	0.034 ± 0.004	0.052 ± 0.007	0.047 ± 0.003
CLP	0.041 ± 0.006	0.049 ± 0.007**	0.055 ± 0.006	0.106 ± 0.008**△△

(n=6, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g}/\text{mg}$)

** $P < 0.01$ vs control group; △△ $P < 0.01$ vs liver; CLP: Cecal ligation and puncture

2.2 肝、肺组织含水量 CLP后3 h肺组织含水量即明显增高($P < 0.05$),至12 h升高更为明显

($P < 0.01$),而肝组织含水量CLP后3 h无明显升高,至12 h才显著高于对照组($P < 0.05$,表2)。

表2 肝、肺组织含水量变化

Tab 2 Changes of water contents in the liver and lung

Group	Liver		Lung	
	3 h after CLP	12 h after CLP	3 h after CLP	12 h after CLP
Control	68.77 ± 0.64	69.09 ± 0.49	73.87 ± 1.48	74.45 ± 1.32
CLP	69.89 ± 0.76	71.35 ± 1.44*	76.37 ± 0.78*	77.86 ± 1.62**

(n=6, $\bar{x} \pm s$, %)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; CLP: Cecal ligation and puncture

2.3 肝、肺组织MPO活性 肝肺组织中MPO活性的差异虽然很大,但CLP后的变化规律却基本一致,即均于CLP后3 h MPO活性明显增高,与对照组相比差异有显著意义($P < 0.01$),至12 h时虽明显降低($P < 0.01$),但与对照组相比差异仍有显著意义($P < 0.01$,表3)。

2.4 肝、肺微血管内皮细胞凋亡检测

2.4.1 肝、肺微血管内皮细胞纯度及存活率的鉴定 分离所得的肝、肺微血管内皮细胞经锥虫蓝染色,显示存活率大于90%,经第八因子相关抗原染色,流式细胞仪检测,显示第八因子相关抗原阳性细胞比例大于85%。

表3 肝、肺组织 MPO 活性改变

Tab 3 Changes of MPO activities in the liver and lung

(n=6, $\bar{x} \pm s$, U/g)

Group	Liver		Lung	
	3 h after CLP	12 h after CLP	3 h after CLP	12 h after CLP
Control	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.02	1.97 ± 0.40	1.83 ± 0.56
CLP	0.59 ± 0.12**	0.27 ± 0.04** $\Delta\Delta$	6.34 ± 0.31**	4.59 ± 0.90** $\Delta\Delta$

** P < 0.01 vs control group; $\Delta\Delta$ P < 0.01 vs 3 h after CLP group; CLP: Cecal ligation and puncture

2.4.2 肝、肺微血管内皮细胞凋亡的检测结果 (1)流式细胞仪检测结果:选择第八因子相关抗原阳性细胞对其进行细胞周期分析。结果如表4所示;3 h时,CLP组与对照组肺微血管内皮细胞凋亡没有明显差异;12 h时,CLP组凋亡明显增强(P < 0.05)。但肝窦内皮细胞凋亡,无论是3 h还是

12 h 各组间比较无显著性差异。(2)原位凋亡检测:对照组小鼠肝、肺组织中均可检测到少量的微血管内皮细胞凋亡。CLP后肝组织切片内凋亡的血管内皮细胞数未见明显增加,但12 h肺组织切片内凋亡的微血管内皮细胞数明显增加(图1)。

表4 肝、肺微血管内皮细胞凋亡比例的改变

Tab 4 Apoptosis rate of microvascular endothelial cells in the liver and lung

(n=6, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Liver		Lung	
	3 h after CLP	12 h after CLP	3 h after CLP	12 h after CLP
Control	3.72 ± 0.94	3.33 ± 0.88	3.38 ± 0.31	3.48 ± 1.21
CLP	3.72 ± 1.18	3.86 ± 0.93	3.22 ± 0.69	5.03 ± 0.92*

* P < 0.05 vs control group; CLP: Cecal ligation and puncture

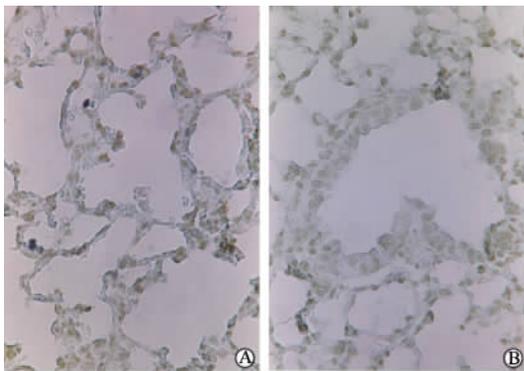


图1 肺组织切片凋亡原位染色

Fig 1 Apoptosis detected by *in situ* staining of lung tissue sections(×400)

A: Lung tissue 12 h after CLP, apoptotic microvascular cells with brown staining; B: Lung tissue of control group, negative staining

3 讨论

微血管通透性增高是器官功能受损的重要特征之一。血管通透性增高,一方面使大量液体渗入组织间隙,增加毛细血管与细胞间的距离,加重组织细胞的缺氧;另一方面还使炎症细胞过多聚集于局部组织,通过释放蛋白酶及氧自由基等,直接造成组织细胞的损伤^[7]。我们用尾静脉注射伊文思蓝的方法

检测了肺微血管的通透性,结果显示 CLP 12 h 后肝、肺微血管通透性明显增加。与其相一致,CLP 小鼠肝、肺组织的含水量也明显高于对照组小鼠,其中肺组织含水量的增加发生早、程度重。

中性粒细胞含有 MPO,且每个细胞所含的酶量是一定的,约占细胞干质量的 5%。因此可以通过测定 MPO 活力来推算中性粒细胞的数量。我们的实验结果显示,在脓毒症早期肝、肺组织中 MPO 活性即明显增高,到脓毒症晚期虽有所降低但仍明显高于对照组。这表明脓毒症时中性粒细胞在肝、肺组织中的浸润明显增加。中性粒细胞到达组织细胞周围后可通过释放氧自由基、胶原酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶、蛋白水解酶及脂类代谢产物等造成组织细胞损伤。因此,肝、肺组织微血管通透性的增加,造成组织含水量的增加和炎症细胞的聚集,这是多器官功能失常综合征时导致器官功能损伤的重要步骤。

CLP 小鼠肝组织的微血管通透性和组织含水量均明显高于假手术对照组,但内皮细胞的凋亡并不明显,MPO 活性所显示的中性粒细胞在肝组织中的聚集虽高于对照组,但低于肺组织。这表明肝组织的损伤程度不如肺组织严重,也提示肝窦内皮细胞

凋亡在肝组织损伤中不起主要作用,而是由其他因素如中性粒细胞聚集所造成的。另外,研究结果也证实不同器官来源的内皮细胞具有异质性;肝窦内皮细胞与肺微血管内皮细胞在形态、脓毒症时的凋亡反应、细胞因子和趋化因子表达(结果未给出)方面均存在很大的差异。

关于微血管通透性增加的原因,一般认为是由于内皮细胞内 Ca^{2+} 浓度增高后导致内皮细胞收缩、分离或内皮细胞内的细胞骨架重组所引起的。而细胞凋亡所呈现的典型形态学改变如细胞收缩、细胞器浓缩、核仁裂解等实质上代表了细胞骨架的改变^[8-9]。本研究中小鼠在 CLP 后 12 h 流式细胞仪和原位检测都发现了肺微血管内皮细胞凋亡的增加,同时肺微血管通透性明显增高,表明凋亡增加的程度与微血管通透性增高的程度存在一定的相关性。因此有理由相信内皮细胞的凋亡可以直接导致微血管完整性的破坏,进而导致微血管通透性增高。既然内皮细胞凋亡增加是微血管通透性增高的原因之一,那么对内皮细胞凋亡的调控可能是阻止通透性增高的一种措施。细胞凋亡是一种“主动”的死亡,它的发生有赖于相关基因的表达和蛋白质的合成,因而有着加以调控的可能。通过在基因或蛋白质水平阻止内皮细胞凋亡的方法来阻止或减少微血管通透性的增加,将是一种值得深入研究的治疗途径。

[参考文献]

- [1] Patel G P, Gurka D P, Balk R A. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2003, 9: 390-396.
- [2] Howell G, Tisherman S A. Management of sepsis[J]. *Surg Clin North Am*, 2006, 86: 1523-1539.
- [3] Saria A, Lundberg J M, Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues[J]. *J Neurosci Methods*, 1983, 8: 41-49.
- [4] 罗武生, 郭兆贵. 用髓过氧化酶法定量测定心肌组织中的中性粒细胞[J]. *中国药理学通报*, 1990, 6: 264-266.
- [5] Wang X, Kanel G C, DeLeve L D. Support of sinusoidal endothelial cell glutathione prevents hepatic veno-occlusive disease in the rat[J]. *Hepatology*, 2000, 31: 428-434.
- [6] Grau G E, Mili N, Lou J N, et al. Phenotypic and functional analysis of pulmonary microvascular endothelial cells from patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *Lab Invest*, 1996, 74: 761-770.
- [7] Bateman R M, Sharpe M D, Ellis C G. Bench-to bedside review: microvascular dysfunction in sepsis-hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide[J]. *Crit Care*, 2003, 7: 359-373.
- [8] Bannerman D D, Goldblum S E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284: L899-L914.
- [9] Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, et al. Endothelial cell apoptosis in sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(5 Suppl): S225-S228.

[收稿日期] 2007-04-09

[修回日期] 2007-05-14

[本文编辑] 孙岩

《超声诊断学》已出版

《超声诊断学》是超声医师实践技能培训丛书之一,由人民军医出版社 2007 年 2 月出版,小 16 开,平装。ISBN: 978-7-5091-0653-2,定价:45.00 元。

本书由著名超声医学专家钱蕴秋教授组织国内近 30 位超声医学专家,以中华医学会编写的《临床技术操作规范——超声医学分册》为基础,参考国内外最新相关文献,结合多年临床实践经验编写而成。旨在规范超声诊断思路和操作,指导临床实践工作。全书共分为 31 章,包括:超声诊断基础知识及相关疾病的诊断参考依据,其中有颅脑疾病,眼球及眼眶疾病,颌面颈部疾病,甲状腺疾病,乳腺疾病,胸部疾病,心脏瓣膜病、非发绀型先天性心脏病、发绀型先天性心脏病,冠心病,心包疾病,心脏肿瘤、血栓,心脏创伤,原发性心肌病,继发性心脏病,肝脏和胆系疾病,胰腺疾病,脾脏、食管和胃肠疾病,肾脏、输尿管、肾上腺和膀胱疾病,男性生殖系统疾病,腹部脏器闭合性创伤,腹壁、腹腔、腹膜后肿物膜后大血管疾病,妇科、产科、胎儿畸形,胎儿超声心动图以及周围血管疾病等。本书适合中、低年资的超声科医师和临床相关专业医师阅读。同时可以作为高年资超声科医师的临床参考书。

由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市 100036 信箱 188 分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168 E-mail:wanglan@pmpm.com.cn