

• 论著 •

颅脑伤合并吸入性肺损伤患者肺组织细胞凋亡的研究

黎檀实 殷迪成 吴旭辉 宋杨莉 尹明 沈洪 何权瀛

【摘要】 目的 探讨肺组织细胞凋亡在颅脑伤合并吸入性肺损伤患者病理过程中的作用。**方法** 重型闭合性颅脑外伤死亡患者 11 例,格拉斯哥昏迷评分(GCS)为 3~8 分。明确诊断后归入并发吸入性肺损伤组(AILI 组,5 例)和无吸入性肺损伤组(NAILI 组,6 例),采用放射免疫方法检测患者血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-8(IL-8)水平,并对其尸体肺组织进行病理观察及细胞凋亡原位检测。**结果** NAILI 组及 AILI 组血浆 TNF- α 水平分别为 $(2.17 \pm 0.41) \mu\text{g/L}$ 与 $(3.14 \pm 0.28) \mu\text{g/L}$;血浆 IL-8 水平分别为 $(0.42 \pm 0.05) \mu\text{g/L}$ 与 $(0.91 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$ (P 均 < 0.05);与 NAILI 组相比,AILI 组肺组织细胞凋亡率明显增高($P < 0.01$)。**结论** 肺组织细胞凋亡在颅脑伤合并吸入性肺损伤患者病理过程中可能具有重要作用。

【关键词】 颅脑损伤; 肺损伤,吸入性; 细胞凋亡

中图分类号: R651.1; R563; Q255 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)02-0097-04

Study on apoptosis of lung tissue cells in patients with severe brain injury complicated with aspiration-induced lung injury LI Tan-shi*, YIN Di-cheng, WU Xu-hui, SONG Yang-li, YIN Ming, SHEN Hong, HE Quan-ying. * Department of Emergency, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of apoptosis of pulmonary cells in aspiration induced lung injury in patients with severe brain injury with or without aspiration-induced lung injury. **Methods** The Glasgow scale(GCS) of 11 dead patients with severe closed brain injury was 3-8. There 11 cases were divided into aspiration-induced lung injury (AILI) and non-aspiration-induced lung injury (NAILI) groups. The plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-8(IL-8) were measured, and the ratio of apoptosis in lung tissue cells was also determined. **Results** The plasma levels of TNF- α and IL-8 in NAILI and AILI groups were $(2.17 \pm 0.41) \mu\text{g/L}$ vs. $(3.14 \pm 0.28) \mu\text{g/L}$ and $(0.42 \pm 0.05) \mu\text{g/L}$ vs. $(0.91 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$) respectively. Lung tissue cell apoptosis ratio was significantly higher in AILI group than NAILI group ($P < 0.01$). **Conclusion** TNF- α and IL-8 may induce apoptosis in lung tissues through different signaling pathway. During the early phase of aspiration-induced lung injury complicating severe closed brain injury, apoptosis in cells of lung tissue may play a role in the pathogenesis.

【Key words】 brain injury; aspiration-induced lung injury; apoptosis

CLC number: R651.1; R563; Q255 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)02-0097-04

重型颅脑损伤后并发的吸入性急性肺损伤(aspiration-induced lung injury, AILI)是患者伤后病死率居高不下的主要原因之一^[1],是急诊救治过程中常见且预后凶险的并发症。AILI 的发病机制与其它致病因素导致的急性肺损害(ALI)一样,亦由肺内过度的炎症反应所致,以弥漫性肺泡-毛细血管膜损伤导致的肺水肿和微肺不张为特征。近年来,有关细胞凋亡在 ALI 和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中的作用日益引起人们的重视。目前认为:在 ALI 发生、发展中自始至终存在肺组织细胞凋亡;但是在 ALI 的不同病理阶段,细胞凋亡的作用可能不同^[2]。

基金项目:全军“十五”课题基金资助项目(01MA098)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科(黎檀实,殷迪成,宋杨莉,尹明,沈洪);海军总医院心内科(吴旭辉);北京大学第二临床医院呼吸科(何权瀛)

作者简介:黎檀实(1963-),男(汉族),吉林省人,医学博士,副教授,硕士生导师,副主任医师,从事急诊危重病临床及基础研究,获军队科技成果奖 3 项,发表论文 20 余篇。

本研究拟通过对 11 例重型颅脑损伤死亡患者尸检肺组织细胞凋亡进行初步观察,探讨炎性介质和细胞凋亡在重型颅脑损伤后并发 AILI 中的作用。

1 资料及方法

1.1 病例选择: 11 例患者均为解放军总医院急诊科收治的重型闭合性颅脑外伤患者,其中男 9 例,女 2 例;平均年龄 (36.0 ± 6.3) 岁;均在伤后 1 h 内入院;脑挫裂伤伴颅内出血 4 例,急性硬膜外血肿 4 例,急性硬膜下血肿 3 例;脑疝 5 例;来诊时格拉斯哥昏迷评分(GCS):6~8 分者 7 例,3~5 分者 4 例。11 例患者 5 例明确诊断并发 AILI(AILI 组),吸入物为胃内容物,其余 6 例患者明确无吸入性肺损伤(NAILI 组),两组年龄、GCS 差异无统计学意义。所有患者来诊后均行气管插管,急诊行开颅止血、血肿清除减压手术,并在手术后早期死亡,肺组织病理切片均来自尸检肺组织蜡块。死亡原因:AILI 组直接死于脑疝 2 例,ARDS 2 例,多器官功

能障碍综合征(MODS)1例;NAILI组脑疝3例,MODS2例,急性肾衰竭1例。

1.2 实验方法:

1.2.1 血浆 TNF- α 和 IL-8 检测:全部患者均在气管插管完成 10 min 后留取静脉血 2 ml,迅速置入含有 100 g/L 的 EDTA $\cdot$ Na₂ 20 μ l 和抑肽酶 20 μ l 的试管中混匀,血液在 4 $^{\circ}$ C 下经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液置-20 $^{\circ}$ C 贮存待测。血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-8(IL-8)含量采用放射免疫法测定,操作按说明书要求进行。IL-8 试剂盒、TNF- α 、单克隆抗体试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。用 FJ20D8 自动免疫计数器及数据处理仪测定结果。

1.2.2 肺组织切片病理观察:尸检肺组织切片经常规苏木精-伊红(HE)染色后,观察病理改变。

1.2.3 肺组织细胞凋亡的原位检测及凋亡率:尸检肺组织切片用原位细胞凋亡检测方法(TUNEL法)。链酶卵白素(SP)染色试剂盒由北京华美生物工程公司提供,细胞凋亡原位检测试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit,POD)为德国 Boehringer Mannheim 公司产品,同一切片分别由 3 人同时在光镜下观察,高倍镜下取 3 个不同视野,每个视野数 100 个细胞,并记录其中凋亡细胞数量,取 3 次平均值,计算凋亡率(%)。

1.3 统计学方法:数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 重型颅脑损伤患者血浆 TNF- α 及 IL-8 水平的变化:AILI 组血浆 TNF- α 及 IL-8 水平均明显高于 NAILI 组(P 均 <0.05)。见表 1。

表 1 重型颅脑损伤患者血浆 TNF- α 和 IL-8 水平的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Changes of plasma TNF- α and IL-8

in brain injury($\bar{x}\pm s$)

μ g/L

组别	例数(例)	TNF- α	IL-8
NAILI 组	6	2.17 $\pm$ 0.41	0.42 $\pm$ 0.05
AILI 组	5	3.14 $\pm$ 0.28*	0.91 $\pm$ 0.08*

注:与 NAILI 组比较,* $P<0.05$

2.2 肺组织切片原位细胞凋亡率检测(TUNEL法):NAILI 组凋亡率为(1.19 $\pm$ 0.06)%,AILI 组为(5.39 $\pm$ 0.67)%,AILI 组肺组织凋亡率显著高于 NAILI 组($P<0.01$)。

2.3 重型颅脑损伤 AILI 患者肺组织病理改变:NAILI 患者的肺组织病理切片可见肺泡结构正常

(插页图 1);AILI 组肺组织病理切片可见肺泡内异物吸入,大量炎性细胞浸润,肺泡间隔增厚,弥漫性肺水肿(插页图 2)。AILI 组肺组织 TUNEL 染色显示细胞凋亡明显高于 NAILI 组(插页图 3 和 4)。

3 讨论

自 1972 年 Kerr 等提出细胞凋亡的概念以来,已证实细胞凋亡在机体的许多病理生理过程中起着重要调节作用。既往认为 ALI 肺泡上皮和肺血管内皮细胞的死亡方式是坏死。近年来,随着细胞凋亡在炎症性疾病领域研究的不断深入,人们观察到 ALI 细胞死亡同样可以通过凋亡的途径进行,并可能在 ALI 发病中起一定的作用^[3]。但目前有关 ALI 发病机制的研究多数都是在体外和动物模型中进行,对于 ALI 患者肺组织进行细胞凋亡的在体临床研究较少,尤其对重型颅脑损伤并发 AILI 患者肺组织细胞凋亡的作用研究目前未见报道。本实验通过对 11 例重型颅脑损伤(5 例并发 AILI)患者尸检肺组织细胞凋亡进行初步观察,结果显示:AILI 组患者血浆 TNF- α 及 IL-8 水平均明显高于 NAILI 组;AILI 组患者肺组织细胞凋亡率较 NAILI 组明显增加,且主要表现为肺泡上皮和肺血管内皮细胞凋亡增加,提示肺泡上皮和肺血管内皮细胞凋亡可能参与重型颅脑损伤并发 AILI 的发病。

以往认为,AILI 的发病机制主要是胃液内酸性物质和消化酶对肺组织的直接损伤,但随着对有关 AILI 形成机制的不断深入研究,目前认为此种 ALI 与其它致病因素导致的 ALI 殊途同归,亦由肺内过度的炎症反应所致^[4]。研究已证实 TNF- α 是 AILI 发病的启动因子。酸吸入气道后增强了 TNF- α 基因转录,15 min 即可上调 TNF- α 在肺组织的表达。TNF- α 主要来源于单核-巨噬细胞、NK 细胞、淋巴细胞等^[5]。ALI 时 TNF- α 的主要作用包括:①直接损伤肺血管内皮细胞;②与其它细胞因子相互作用引起细胞损伤;③损伤肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II cell,AT-II),抑制表面活性物质合成;④诱导其它细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8 的释放,这些炎症介质的释放,可直接造成机体肺组织损伤,更重要的是,它们可再激活炎性细胞,释放更多的炎性介质或细胞因子,使损伤信号进一步放大和加强;⑤此外,TNF- α 还可通过启动补体系统和凝血系统促进肺内炎症反应的扩大和加剧^[6,7]。IL-8 是单核细胞产生的中性粒细胞趋化因子,是与中性粒细胞聚集最为密切的细胞因子。粒细胞是 IL-8 作用的主要靶细胞,它使粒细胞脱颗粒,产生

氧自由基、蛋白酶等介质;增加粒细胞对内皮细胞层的穿透力和血管内皮层的通透性;通过直接或间接的途径趋化粒细胞进入组织间隙和炎症区域^[8]。

有关细胞凋亡在 ALI 中的作用机制还不清楚,但大量的临床和动物实验已证实在 ALI 病理过程中,肺组织细胞凋亡是一种相当普遍的现象。体外实验表明:一些致病因素如脂多糖(LPS)、缺氧/复氧、炎性细胞因子(如 TNF- α 等)可诱导肺血管内皮细胞和 AT-Ⅱ 细胞凋亡^[9]。重型颅脑损伤患者并发 ALI 肺组织细胞凋亡的作用可能有:①导致肺泡上皮细胞的 AT-Ⅰ、AT-Ⅱ 大量死亡(包括坏死与凋亡),其中尤以 AT-Ⅱ 的损伤更为主要,因为它既是肺泡上皮细胞的干细胞,又是肺表面活性物质合成和释放的场所;②肺血管内皮细胞不仅作为被动的靶细胞,而且还可通过对其屏障和分泌功能,影响 ALI 的病理过程;③气管旁淋巴组织内淋巴细胞凋亡导致局部抵抗力下降,易致感染发生;④巨噬细胞增生,大量中性粒细胞浸润并凋亡,一方面巨噬细胞激活后细胞因子释放增多,另一方面巨噬细胞于创伤后吞噬能力下降,大量凋亡的中性粒细胞可能因得不到及时的吞噬清除而最终破裂放出毒性内容物,进一步损害肺泡壁^[10]。

本研究的局限性在于由于病例来源及时间的受限,未能对患者肺组织细胞凋亡进行动态观察,有待进一步深入研究。

参考文献:

- 1 Brower R G, Ware L B, Berthiaume Y. Treatment of ARDS[J]. Chest, 2001, 120(4): 1347 - 1367.
- 2 Bardales R H, Su - Su X, Bobert F, et al. Apoptosis is a pathway responsible for the resolution of type Ⅰ pneumocyte in acute lung injury[J]. J Am Pathol, 1996, 149(3): 845 - 851.
- 3 黎檀实, 沈洪, 尹明. 生长激素对肺泡 Ⅰ 型上皮细胞凋亡抑制作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(5): 290 - 293.
- 4 Nader - Dialal N, Knight P R, Bacon M F, et al. Alterations in the course of acid - induced lung injury in rats after general anesthesia: volatile anesthetics versus ketamine[J]. Anesth Analg, 1998, 86(1): 141 - 146.
- 5 Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, et al. Tumor necrosis factors - α mediates acid aspiration - induced systemic organ injury[J]. Ann Surg, 1990, 212: 513 - 519.
- 6 Davidson B A, Knight P R, Helinski J D, et al. The role of tumor necrosis factor - α in the pathogenesis of aspiration pneumonia in rats[J]. Anesthesiology, 1999, 91(2): 486 - 499.
- 7 Nagase T, Uozumi N, Kume K, et al. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A₂[J]. Nat Immunol, 2000, 1(1): 42 - 46.
- 8 Donnelly S C, Strieter R M, Kunkel S L, et al. Interleukin - 8 and development of adult respiratory distress syndrome in risk patient group[J]. Lancet, 1993, 341: 643 - 649.
- 9 Fine A, Janssen - Heininger Y, Soultanakis R P, et al. Apoptosis in lung pathophysiology [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279: L423 - L427.
- 10 Lazarov S, Balutsov M, Janav E. Pulmonary repair after adult respiratory distress syndrome [J]. Vutr Boles, 2000, 32(4): 41 - 47.

(收稿日期: 2003 - 10 - 14 修回日期: 2003 - 11 - 20)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国危重病急救医学》杂志第四届编委会名单

主 编: 王今达

副 主 编: 黄志强(中国工程院院士) 盛志勇(中国工程院院士) 王士雯(中国工程院院士) 王正国(中国工程院院士) 祝兆林 陈士奎 王宝恩 沈 洪 付小兵 姚咏明 李宗浩 雪 林 李银平(常务)

编辑部主任: 李银平

编 委: (按姓氏笔划为序)

于汉力 马 遂 方 楨 火树华 王 左 王 辰 王佩显 王佩燕 王其芳 王家良
王鲁宁 朱元珏 任新生 匡调元 吴 仪 吴恩惠 张 宏 张人华 张文智 张淑文
李天德 李忠诚 李春盛 杨国栋 杨涵铭 杨瑞和 邱明才 邱海波 陈文彬 陈树勋
陈德昌 周宝桐 周荣斌 金丽娟 侯 灿 俞森洋 胡 森 费 舟 贺石林 郝希山
钟南山 郭 仓 郭大任 高长青 崔玉芳 黄体钢 黄邦汉 黄敬孚 景炳文 蔡映云
樊寻梅 黎占良

特邀审稿编委: 罗 涛 黎宝莲 张宪文 翟德佩 王凤楼 王维力 陈乃生 陈宝元 王学谦
金鸿宾 张久山 杨士琨 任 群 孙根义 钱绍诚 高企贤 张望云 秦英智
王家泰 刘克强 张 赛 黎檀实

颅脑伤合并吸入性肺损伤患者肺组织细胞凋亡的研究 (正文见 97 页)



图1 NAILI 患者肺泡结构正常(HE, ×40)
Fig.1 Normal alveolar struture in NAILI patients(HE, ×40)

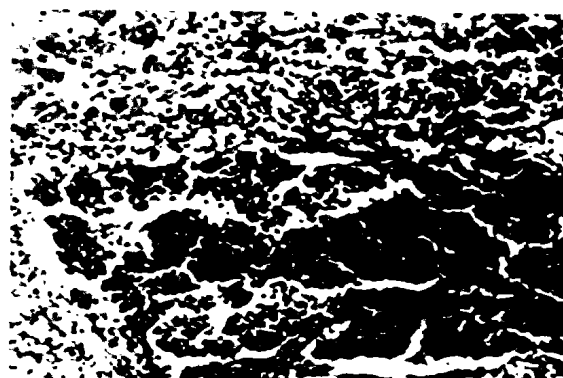


图2 AILI 患者肺组织炎症变化(HE, ×100)
Fig.2 Inflammatory changes of lung tissue in AILI patients(HE, ×100)

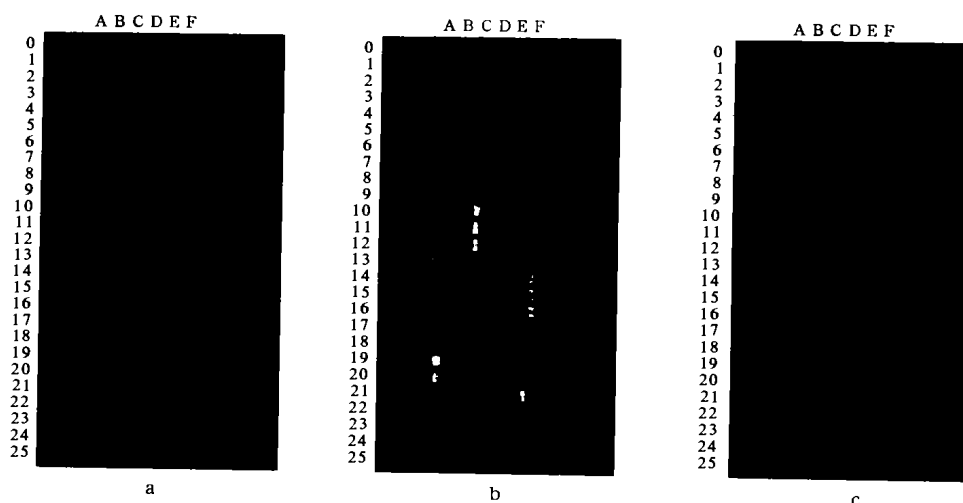


图3 NAILI 患者肺组织凋亡细胞(TUNEL, ×200)
Fig.3 Apoptosis cells of lung tissue in NAILI patients(TUNEL, ×200)



图4 AILI 患者肺组织凋亡细胞(TUNEL, ×400)
Fig.4 Apoptosis cells of lung tissue in AILI patients(TUNEL, ×400)

脂多糖刺激前后小鼠肺肝脾组织中Toll样等受体基因表达情况 (正文见 73 页)



注: 0、25为Marker, 1~4依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的TLR2, 5~8依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的TLR4, 9~12依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的CD₁₄, 13~16依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的LBP, 17~20依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的TNF- α , 21~24依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的GAPDH; A、B、C、D、E、F分别为100 bp、300 bp、500 bp、700 bp、900 bp、1 200 bp

图1 正常及注射LPS后的肺组织 (a, L-030121a3)、肝组织 (b, H-030121c2) 和脾组织 (c, S-030122a3) 基因表达情况

Fig.1 Target gene expressions in lung, liver and spleen tissue challenged by LPS