维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

MODSE 各脏器纤维连接蛋白免疫组织化学表达的研究

李艳容　竞花兰　成建定　罗思敏　姜富学　张宜骏

【摘要】 **目的**　通过观察老年多器官功能障碍综合征(MODSE)的纤维连接蛋白(FN)在各重要器官组织(心、脑、肺、肾和肝)的分布特点，探讨 MODSE 的内皮损伤特点及凝血功能失调机制。**方法**　建立盲肠结扎穿孔术(CLP)的 MODSE 模型，设立青年多器官功能障碍综合征(MODS)组及两组相应的假手术对照组，分别于术后 6、12、24、48 和 72 h 采用链霉素-卵白素-生物素的免疫组织化学技术(LSAB)对各重要器官进行研究。**结果**　MODSE 和青年 MODS 组 FN 表达强度主要为阴性和弱阳性，MODSE 组比青年 MODS 组 FN 降低得快且早，而老年假手术组(SOGE 组)也比青年假手术组(SOG)的 FN 表达强度要弱一些，各组织一般在 0.5～48.0 h 降低得比较显著。**结论**　MODSE、MODS 和 SOGE 均存在不同程度的内皮细胞损伤和凝血功能障碍，其中以 MODSE 最为严重。

【关键词】 老年多器官功能障碍综合征；　纤维连接蛋白；　内皮损伤；　凝血功能失调

中图分类号：R364.5；R365；Q591.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003－0603(2004)04－0202－05

Immunohistochemical study of fibronectin in multiple organ dysfunction syndrome in elderly rats

*LI Yan-rong**, *JING Hua-lan*, *CHENG Jian-ding*, *LUO Si-min*, *JIANG Fu-xue*, *ZHANG Yi-jun*.

**Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China*

【**Abstract**】 **Objective**　To study the characteristic of endothelial injuries and the mechanisms of coagulation disorder in multiple organ dysfunction syndrome in elderly rats by observing the distribution and the intensity of fibronectin(FN) expression in important viscerae including the heart, brain, lung, kidney, liver. **Methods**　Fifty Wistar rats(one half of them were 3 months old, another half 20 months old) were anaesthetized and cecal ligation puncture (CLP) was done. They were defined as MODS group and MODSE group. Forty Wistar rats (one half of them 3 months old, another half 20 months old) were anaesthetized and laparotomy was done as sham operation group(SOG) and sham operation group in elderly(SOGE). The heart, brain, lung, liver and kidney were harvested and were examined histologically at 6, 12, 24, 48 or 72 hours after operation. They were also stained immunohistochemically by using anti-FN as the first antibody. **Results**　The expression of FN on the surfaces of vascular endothelial cells in hearts, brains, lungs, livers, kidneys was weakly positive or positive in MODSE, MODS or SOGE group, but it was positive or strongly positive in SOG group. The differences were significant ($P<0.05$). **Conclusion**　The injury of endothelial cells and the disorders of coagulation system are observed in MODSE, MODS, SOGE groups, especially in MODSE.

【**Key words**】 multiple organ dysfunction syndrome in the elderly;　fibronectin;　endothelial injury;　coagulation disorder

CLC number：R364.5；R365；Q591.2　　**Document code**：A　　**Article ID**：1003－0603(2004)04－0202－05

老年人抗体有不同程度的老化，易产生多器官的慢性疾患，使相应器官功能衰退，甚至有的器官已达到功能障碍的临界状态，此时无需严重的感染、创伤和出血等打击，即可影响到某器官，进而发生连锁反应，并发展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome，MODS)。老年多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome in the elderly，MODSE)是指发生在 60 岁以上的 MODS。国外相关研究未见有别于 MODS 单独提出来，主要集中在研究老年感染性休克的发生和发展机制的报道。国内研究有学者将其单独提出来，1987 年国内首先由王士雯院士发表了老年多器官衰竭(multiple organ failure in the elderly，MOFE)临床分析报告，并对其病理生理、临床特征、诊断标准、分型分期及防治措施等进行了较系统的研究和报告，逐步引起了国内外老年医学界的重视。本研究中通过建立 MODSE 的大鼠动物模型，采用以纤维连接蛋白(fibronectin，FN)为一抗的链霉素-卵白素-生物素的免疫组织化学技术(LSAB)，对各重要器官的 FN 的分布特点及染色强度进行比较分析，

基金项目：卫生部科研基金资助项目(94－1－101)

作者单位：510080　广州，中山大学法医系法医病理教研室(李艳容，竞花兰，成建定，姜富学，张宜骏)；清远市公安局刑警支队(罗思敏)

作者简介：李艳容 (1975－)，女(汉族)，医学硕士，广东省佛山市人，主要从事内皮细胞损伤研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

以探讨 MODSE 的内皮损伤特点及凝血功能失调机制，为今后 MODSE 的临床诊疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物：中山大学医学院实验动物中心饲养的健康 Wistar 大鼠 100 只，雌雄不限，老年组（月龄为 18～24 个月）和青年组（3～4 个月）各半。

1.2 实验方法：

1.2.1 动物分组：MODSE 及青年 MODS 动物模型建立：Wistar 大鼠术前禁食 12 h，自由饮水，用盐酸氯胺酮溶液（0.15 ml/200 g）肌肉注射麻醉下腹正中切口，取出盲肠，行盲肠中远 1/3 结扎，并在盲肠末端戳孔，直径为 0.3 cm 左右，保留结扎盲肠的血供，将盲肠放回腹腔原位，双层缝合腹壁切口。术后经皮下注射质量分数为 5%的葡萄糖生理盐水 8 ml，苏醒后自由饮水进食的动物不需皮下注射液体。模型大鼠分为 MODSE 组和青年 MODS 组，每组 25 只。MODSE 和青年 MODS 假手术组（分别为 SOGE 组和 SOG 组）大鼠不结扎穿孔，其余处理同模型组，每组 25 只。

1.2.2 生物机能监测与生化指标的测定：分别于 6、12、24、48、72 h 用质量分数为 1%的戊巴比妥钠（0.15 ml/100 g）腹腔麻醉下，采用 BL－410 生物机能实验系统监测呼吸频率（RR）、心率（HR）和血压（BP），然后取模型组 5 只和假手术组 4 只，从股动脉或断颈取血活杀，各取血 5 ml 离心（1 500 r/min）10 min留血清；各分成两部分来测定血清蛋白和各种脏器功能的生化指标（该血清需避光保存，用牛皮纸来包装离心管）；再进行左肺支气管肺泡灌洗，灌洗液（BALF）离心（1 500 r/min）后留上清待测蛋白含量。用 Bradfords 法测定 BALF 及血清蛋白含量，肺通透指数＝BALF 蛋白含量/血清蛋白含量。然后将剩余血清用自动生化分析仪 Dimension AR 检测脏器功能指标：血清丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、总胆红素（TB）、肌酐（Cr）及尿素氮（BUN）。

1.2.3 标本收集、制片和染色：将各组处死后的大鼠解剖，分别取出心、肺、肾、脑和肝组织，用生理盐水清洗组织后置于体积分数为 1%的甲醛液中固定 24 h。常规石蜡切片，切片厚 5 μm，采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学染色超敏试剂盒（SP 试剂盒）对 FN 进行染色，普通光镜观察。免疫组织化学技术采用标记的 LSAB 法，一抗系即用型兔抗鼠 FN（Maxim 公司生产）。以磷酸盐缓冲液（PBS）代替一抗作为阴性对照。阳性结果为棕黄色，按其分布范围及特点分为阴性（－）：无棕黄色颗粒；弱阳性（±）：微量至少量棕黄色颗粒；阳性（+）：散在分布较多棕黄色颗粒；强阳性（++）：棕黄色颗粒呈小灶状分布。

2 结 果

2.1 模型有效的标准：有 2 个或 2 个以上脏器达到器官功能损伤标准[1]者即可判断为 MODSE 或 MODS（MOI 为多器官损害，MOF 为多器官衰竭）。

2.2 FN 在各器官组织的分布：FN 在心肌组织的阳性分布主要集中在血管内膜及间质纤维组织中（见彩色插页图 1，图 2），MODSE 和 MODS 组可见心肌细胞内亦有阳性表达；在肺组织主要见于肺间质、血管内膜及肺泡渗出液中（见彩色插页图 3，图 4）；肾主要分布于肾小球系膜基质、肾间质、肾小管基膜及血管内膜（见彩色插页图 5，图 6）；正常对照组和假手术对照组肝组织 FN 在肝小叶周边区增多，MODSE 和 MODS 组均显示 FN 聚集于肝小叶周边组织，中央区层显著减少（见彩色插页图 7，图 8），以 MODSE 组明显；脑组织 FN 分布于脑血管内皮表面和血管基底膜上（见彩色插页图 9，图 10）。

2.3 各组各器官血管内皮细胞（VEC）的 FN 表达强度的分布：将实验所得数据输入 SPSS10.0 软件包，采用 Wilcoxon 秩和检验进行统计学分析，各组心、肺、肾、肝和脑组织 VEC 的 FN 表达强度分布均存在显著性差异（P 均＜0.05），MODSE 和 MODS 组 FN 在各组织 VEC 的表达强度主要是阴性和弱阳性，而 SOGE 组主要是弱阳性和阳性，SOG 组和正常对照组是以阳性和强阳性为主（见表 1）。各处死时间的 FN 表达强度在各组中的变化无显著性差异（P＞0.05）。

3 讨 论

FN 是一种细胞外非胶原的大分子糖蛋白，广泛分布于细胞表面、血浆、细胞外液、结缔组织及大部分的基底膜，几乎所有组织和体液都含有 FN，根据其在体内分布的区别，一般分为血浆型及组织型两大类。血浆型 FN（PFN）主要以溶解状态存在于血浆中，故称可溶性 FN，每个二聚体分子上有一个自由巯基，如果将其封闭，就可阻碍 FN 与细胞表面结合；组织型 FN 存在于细胞表面，呈丝状或网状。有生物学作用的主要是 PFN，两者可互相转换，PFN 减少时，组织型 FN 大量释放入血以维持动态平衡[2]。因此，通过检测组织型 FN 含量可大致反映 PFN 水平。动物实验和临床研究证实，FN 下降与内

维普资讯 http://www.cqvip.com

皮细胞损伤有关，FN 下降越明显，VEC 损伤越严重，两者之间互为因果，形成恶性循环[3,4]。但是有学者认为，内毒素休克模型的 FN 早期对循环胶样物质的调理过程并没有作用[5]。FN 减少与循环内皮细胞（circulating endothelial cell，CEC）成正比关系，而 CEC 是一种可以直接而特异地反映血管损伤的标记物，因此 FN 可作为反映 VEC 损伤的间接标志物之一[6]。

表 1 各组心、肺、肾、肝和脑 FN 表达分布分析

Tab. 1 FN expressions on VEC in hearts, lungs, kidneys, livers and brains in each group

器官	组别	FN 表达情况			
		-	±	+	++
心	MODSE 组	10	5	4	0
	MODS 组	4	7	7	2
	SOGE 组	1	4	2	2
	SOG 组	2	1	6	7
肺	MODSE 组	6	9	4	0
	MODS 组	2	5	11	2
	SOGE 组	0	0	6	3
	SOG 组	1	2	6	7
肾	MODSE 组	10	8	1	0
	MODS 组	4	4	5	7
	SOGE 组	0	4	4	1
	SOG 组	0	1	6	9
肝	MODSE 组	5	12	1	0
	MODS 组	1	10	8	1
	SOGE 组	0	1	4	4
	SOG 组	0	3	5	7
脑	MODSE 组	3	9	7	0
	MODS 组	3	6	10	1
	SOGE 组	0	3	5	1
	SOG 组	0	3	6	7

本实验中用免疫组织化学技术检测 MODSE 组、MODS 组和相应假手术组心、肺、肾、肝和脑组织内血管内皮细胞 FN 的表达强度，发现 MODSE 和 MODS 组 FN 表达强度主要是阴性和弱阳性，MODSE 组比 MODS 组 FN 降低得快而且早，而 SOGE 组也比正常对照组的 FN 表达强度要弱一些，各组织一般在 0.5～48.0 h 降低得比较显著。黄志红等[7]的研究动态观测了 17 例已发生多器官功能衰竭的患者在发病后 1～20 d 血浆 FN 水平的变化，结果显示全部患者在病程各时间点的 PFN 均值均低于正常值。有作者认为[8,9]，严重创伤和烧伤时血浆 FN 的含量会明显下降，并与创伤和烧伤后病情变化关系密切，并起着十分重要的作用。我们的研究也观察到与之相似的结果，且这一结果表明 MODSE、MODS 和老年假手术组的各组织均存在着不同程度的 VEC 的损伤，同时也存在不同程度的血管内凝血功能失调，甚至出现不同程度的弥散性血管内凝血（DIC），其中以 MODSE 出现 VEC 损伤和血管内凝血功能失调最早而且严重。但是在 Nagelschmidt 等[10]的猪内毒素休克模型中，通过检测血浆 FN 和黏附在胶样物质的 FN，发现总 FN 水平和血浆 FN 持续下降，在 5 h 后就分别降到原来手术前 FN 水平的 57% 和 50%，但是在微循环和大循环中发生内毒素休克的变化之前，FN 水平没有显著性变化。由于组织型 FN 稍增加但是增加得不显著，因此，他们提出 FN 介导的循环胶样物质的调理作用在循环休克早期中并不是很重要。

本研究中所见各重要器官 FN 减少的原因分析如下：①在感染过程中血浆 FN 的消耗增多，因为在感染发生时，血浆 FN 要清除血循环中的变性蛋白、脱落细胞、补体、凝血因子激活物和免疫复合物等，而使得血浆中的 FN 减少，组织型 FN 释放到血浆中会增多，已达到 PFN 与组织型 FN 之间的平衡状态。②在组织形态学研究中，已发现各器官均存在了一定的损伤，受损细胞膜的通透性增加，FN 能通过细胞膜进入受损的细胞内，可发现受损细胞内 FN 表达强度增加。③FN 参与止血和血液凝固的过程中的消耗增多。④血管内皮细胞受损使得维持细胞形态稳定性的组织型 FN 释放到血浆中，而使组织型 FN 减少。

综上所述：本研究结果提示，老年人在发生了 MODS 时，较易发生血管内皮细胞的损伤和凝血功能障碍，所以更应注意早期器官功能的支持治疗和对血管内皮细胞的保护作用，及时纠正凝血功能障碍。同时也提示，可以应用 FN 来治疗器官功能障碍、血管内皮细胞受损和凝血功能失调。

参考文献：

1 竞花兰，李艳容，姜富学，等. MODSE 模型的生理生化学及组织形态学研究[J]. 中国法医学杂志，2003，18(5)：262－265.

2 Enao F J, Daes J E, Dennis R J. Risk factors for multi－organ failure: a case control study[J]. J Trauma, 1991, 31(1): 74－80.

3 Naus W A. Progress in acute organ－system failure[J]. Ann Surg, 1995, 202: 685.

4 Bertleff M J, Bruining H A. How should multiple organ dysfunction syndrome be assessed? a review of the variation in current scoring systems[J]. Eur J Surg, 1997, 163: 405－410.

5 Nagelschmidt M, Rink A D, Neugebauer E. Plasma concentration of biologically active fibronectin and fibronectin bound to gelatin－like material in a porcine model of hyperdynamic endotoxic shock[J]. Shock, 2000, 14(4): 484－489.

6 成军，主编. 细胞外基质的分子生物学与临床疾病(M). 第 1 版. 北京：北京医科大学出版社，1999. 123－127.

7 黄志红，徐世豪，董德耀，等. 多器官衰竭患者血中肿瘤坏死因子与纤维连结蛋白的动态观测及临床意义[J]. 中国危重病急救医学，1994，6(4)：205－207.

8 洪兴金，杨长仁，周华友，等. 烧伤后血浆纤维连接蛋白的动态观

维普资讯 http://www.cqvip.com

察[J]. 中国实验诊断学, 1998, 2(6): 305 - 306.
9 Liu X S, Luo Z H, Yang Z C, *et al*. Clinical significance of the changes in serum fibronectin in severely burned patients [J]. Burns, 1996, 22(4): 295 - 297.
10 Nagelschmidt M, Rink A D, Neugebauer E. Plasma concentration of biologically active fibronectin and fibronectin bound to gelatin - like material in a porcine model of hyperdynamic endotoxic shock[J]. Shock, 2000, 14(4): 484 - 489.

(收稿日期: 2003 - 10 - 19 修回日期: 2004 - 01 - 15)
(本文编辑: 李银平)

· 研究报告 ·

闭合性颅脑损伤患者血清白细胞介素-2、6 和 16 的变化及意义

罗显荣 罗旭坚 张永

【关键词】 颅脑损伤; 白细胞介素-2; 白细胞介素-6; 白细胞介素-16
中图分类号: R651.15 **文献标识码**: B **文章编号**: 1003 - 0603(2004)04 - 0205 - 01

急性颅脑损伤后继发脑组织缺血、缺氧及炎症反应, 可导致脑组织进一步损伤。白细胞介素(IL)-2、6 和 16, 具有重要的免疫调节作用, 与许多疾病的发生有关。本研究中拟观察急性颅脑损伤后血清 IL - 2、6 及 16 的动态变化, 旨在探讨其在颅脑损伤中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象:

1.1.1 颅脑损伤组: 选择本院住院的急性闭合性颅脑损伤患者 20 例。其中男 15 例, 女 5 例; 年龄 19 ~ 70 岁, 平均(39.5±16.7)岁; 均经头颅 CT 扫描明确诊断, 其中脑内血肿 13 例, 明显脑挫裂伤 14 例, 颅骨骨折 10 例; 除 3 例因血肿扩大而手术外, 患者都予以保守治疗, 并且符合下列条件: ①格拉斯哥昏迷评分(GCS)在 12 分以下的中、重型; ②无其他部位外伤及感染; ③抽血前未使用激素; ④近 2 周内无上呼吸道感染病史; ⑤无心、肝、肾疾病, 免疫疾病及哮喘等疾病。

1.1.2 正常对照组: 30 例, 均为同期体检健康者, 其中男 20 例, 女 10 例; 年龄 20 ~ 65 岁, 平均(41.3±10.6)岁。

1.2 标本采集: 颅脑损伤组于住院后第 1 和 3 d 清晨空腹抽取肘静脉血 6 ml, 4 ℃离心(4 000 r/min)10 min, 留血清 -40 ℃冻存。正常对照组空腹抽肘静脉血 6 ml, 血清留取方法同颅脑损伤组。

1.3 IL 测定方法: IL - 2、6 及 16 用酶联免疫吸附法测定; IL - 2、6 试剂为法国迪龙公司试剂盒, IL - 16 试剂盒为加拿大 Yes 公司产品; 按说明书操作, 反应完后即刻在 450 nm 处测吸光度 A 值; 酶标仪为 Wellscan MK35 型(芬兰产)。

1.4 统计学方法: 数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 用 SPSS8.0 统计软件包进行统计分析, 行 t 检验和 U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

颅脑损伤组患者第 1 d 血清 IL - 2 和 IL - 6 明显高于正常对照组, 且第 3 d IL - 6 进一步升高, 明显高于第 1 d; 第 3 d IL - 16 明显高于第 1 d 和对照组(见表 1)。

3 讨 论

在脑组织中 IL - 6 主要由星形细胞和小胶质细胞产生[1]。本组结果表明, 中、重型颅脑损伤后第 1 d 血清 IL - 6 明显高于对照组, 第 3 d 进一步升高, 提示 IL - 6 参与颅脑损伤后发病过程。IL - 6 一方面引起炎症反应, 使颅脑损伤患者处于前炎症状态; 另一方面对中枢神经系统有重要营养支持作用, 如促进 PC12 细胞突起生长、分化等[2]。

IL - 2 在人体细胞、体液免疫及免疫调节中起重要作用。本组结果表明, 急性颅脑损伤后第 1 d IL - 2 明显升高, 但第 3 d 血清 IL - 2 明显降低, 提示 IL - 2 参与了颅脑损伤后早期病理生理过程, 颅脑损伤患者存在免疫功能紊乱。

IL - 16 为淋巴细胞的趋化素, 是一种重要的促炎细胞因子, 它可能广泛参与了体内的炎症反应过程[3]。本组结果表明中、重型颅脑损伤在第 3 d IL - 16 明显高于第 1 d 和对照组, 提示 IL - 16 也参与了颅脑损伤后的炎症反应, 但较 IL - 2 和 IL - 6 反应稍后。

参考文献:

1 Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrnd C, *et al*. Early mtrathecal production interleukin - 6 predicts the size of brain lesion in stroke[J]. Stroke, 1996, 27: 1553.
2 魏佼, 庞智玲, 孝兰英. 细胞因子在脑发育与脑损伤修复中的作用[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1998, 18(4): 374 - 375.
3 Bellini A, Yoshimura H, Votori E, *et al*. Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes [J]. J Allergy Clin Immunol, 1993, 92: 412.

表 1 颅脑损伤患者血清 IL - 2、6 及 16 变化($\bar{x}\pm s$) ng/L

组别	例数(例)	IL - 2		IL - 6		IL - 16	
		第 1 d	第 3 d	第 1 d	第 3 d	第 1 d	第 3 d
颅脑损伤组	20	2.107±0.202	1.974±0.448	11.894±8.942	29.070±34.016△	1.722±0.190	2.198±0.235☆
正常对照组	30	1.894±0.253		2.464±1.185		1.882±0.448	
检验值		$t=3.146$	$t=0.803$	$t=5.731$	$U=0.000$	$t=1.499$	$t=2.895$
P 值		0.030	0.426	0.000	0.000	0.140	0.000

注: 与第 1 d 比较: △$U=111.900$, $P=0.028$; ☆$t=7.396$, $P=0.000$

作者单位: 510602 广州, 解放军第四五八医院
作者简介: 罗显荣(1961 -), 男(汉族), 湖南省莱阳市人, 主任医师。

(收稿日期: 2004 - 02 - 13)
(本文编辑: 李银平)

维普资讯 http://www.cqvip.com

MODSE各脏器纤维连接蛋白免疫组织化学表达的研究

（正文见202页）

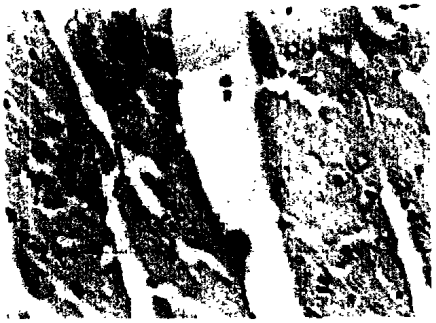

图1 MODSE组24 h心肌FN染色弱阳性(SP,×200)
Fig.1 FN expression was weakly positive in 24 hours in myocardium with MODSE(SP,×200)

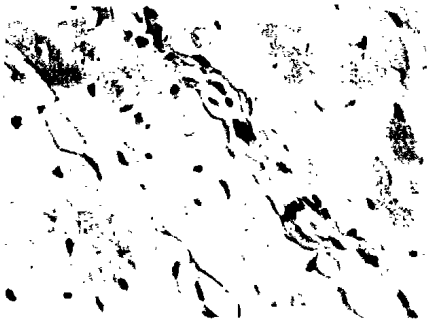

图2 SOG组24 h心肌FN染色强阳性(SP,×200)
Fig.2 FN expression was strongly positive in 24 hours in myocardium with SOG(SP,×200)

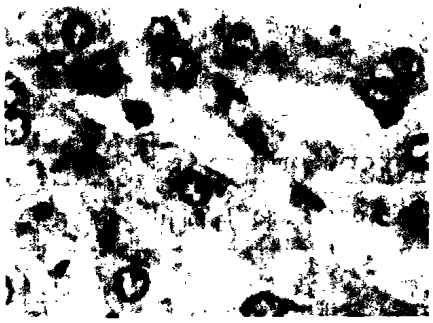

图3 MODSE组24 h肝组织FN染色弱阳性(SP,×400)
Fig.3 FN expression was weakly positive in 24 hours in livers with MODSE(SP,×400)

图4 SOG组24 h肝组织FN染色强阳性(SP,×400)
Fig.4 FN expression was strongly positive in 24 hours in livers with SOG(SP,×400)

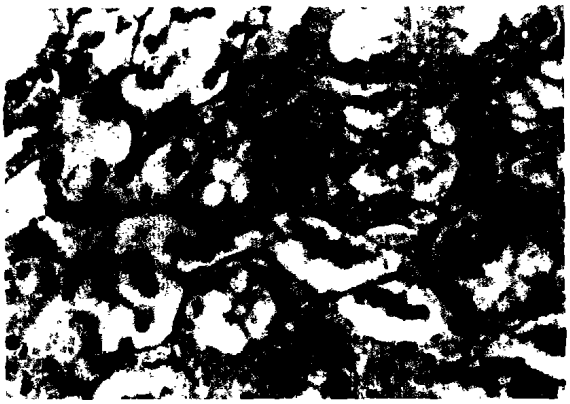

图5 MODSE组24 h肾组织FN染色阴性(SP,×200)
Fig.5 FN expression was negative in 24 hours in kidneys with MODSE(SP,×200)

图6 SOG组24 h肾组织FN染色强阳性(SP,×200)
Fig.6 FN expression was strongly positive in 24 hours in kidneys with SOG(SP,×200)

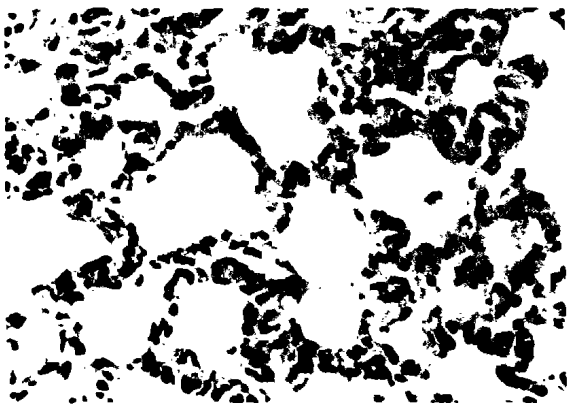

图7 MODSE组24 h肺组织FN染色弱阳性(SP,×200)
Fig.7 FN expression was weakly positive in 24 hours in lungs with MODSE(SP,×200)

图8 SOG组24 h肺组织FN染色强阳性(SP,×200)
Fig.8 FN expression was strongly positive in 24 hours in lungs with SOG(SP,×200)

图9 MODSE组24 h脑组织FN染色弱阳性(SP,×200)
Fig.9 FN expression was weakly positive in 24 hours in brains with MODSE(SP,×200)

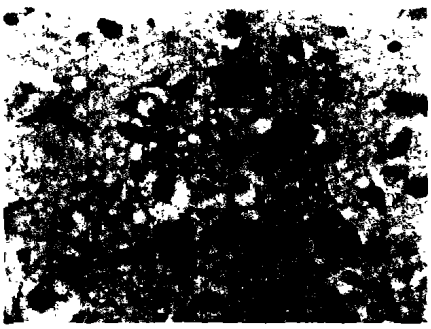

图10 SOG组24 h脑组织FN染色强阳性(SP,×200)
Fig.10 FN expression was strongly positive in 24 hours in brains with SOG(SP,×200)