

弥漫性脑损伤后大鼠肠黏膜病理变化的动态观察及核转录因子- κ B 的表达

刘刚 付爱军 李建珉 朱军 陈通

【摘要】目的 观察弥漫性脑损伤后大鼠肠黏膜结构的动态病理变化,探讨核转录因子- κ B(NF- κ B) 激活在肠黏膜屏障功能障碍中的作用。**方法** 采用 Marmarou 模型致大鼠重型弥漫性脑损伤。150 只雄性 Wistar 大鼠随机分成对照组和伤后 1、2、4、8、12、24、48、72、168 h 9 个时间点组。在光镜下检测对照组及伤后不同时间点大鼠小肠黏膜厚度及绒毛高度和宽度的变化,利用免疫组化技术检测 NF- κ B 在伤后不同时间点组中的表达。**结果** 各致伤组小肠黏膜厚度及绒毛高度和宽度均明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。免疫组化显示:各致伤组 NF- κ B 表达的积分吸光度值均显著大于对照组(P 均 < 0.01)。**结论** 弥漫性脑损伤后,早期光镜下即有肠黏膜组织结构的受损表现,损伤诱导细胞应激激活 NF- κ B,这一作用可能参与肠道继发性损害的发生。

【关键词】 脑损伤,弥漫性; 组织形态学; 核转录因子- κ B; 肠黏膜

Dynamic observation of pathological changes and expression of nuclear factor - κ B in the intestinal mucosa of rats after diffuse brain injury LIU Gang, FU Ai-jun, LI Jian-min, ZHU Jun, CHEN Tong. Department of Neurosurgery, Coal Medical College of North China, Tangshan 063000, Hebei, China

【Abstract】Objective To investigate the dynamic pathological changes in the intestinal mucosa of rats and the role of activation of nuclear factor - κ B (NF - κ B) in the alteration in intestinal mucosal barrier dysfunction after diffuse brain injury. **Methods** The animal model established by Marmarou was used to produce diffuse brain injury. One hundred and fifty male Wistar rats were randomly divided into nine groups in terms of postinjury time: 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 168 hours after injury, and control group. Mucosal thickness, villous height and width were estimated under light microscope, and expression of NF - κ B was assessed with immunohistochemical staining in control group to compare with those in injury groups. **Results** Mucosal thickness, villous height and width were diminished and the optical density of expression of NF - κ B was much higher in the injury groups than those of control group. **Conclusion** The structure of intestinal mucosa is damaged in the earlier stages after diffuse brain injury. NF - κ B is activated by cellular stress, which may be involved in the pathogenesis of secondary intestinal lesion.

【Key words】 diffuse brain injury; histomorphology; nuclear factor - κ B; intestinal mucosa

重型弥漫性脑损伤(diffuse brain injury, DBI)患者在渡过了颅内高压、手术等危险期后不久,一些患者仍然因为并发内脏功能损害而出现死亡,其中肠道活跃参与了机体的应激反应,肠屏障功能受损所引起的细菌移位已成为全身炎症反应综合征(SIRS)的细菌来源,进而启动 SIRS 乃至多器官功能障碍综合征(MODS)并危及生命,被认为是重要的原因之一^[1]。核转录因子- κ B(NF- κ B)主要参与调节与机体免疫、炎症感染有关的蛋白质基因转录,是细胞应激反应的重要调控分子。本研究中利用大鼠 DBI 模型,观察了伤后小肠黏膜组织形态学和 NF- κ B 的动态变化,旨在探讨这些变化与 DBI 后

肠屏障损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备: NF- κ B P65 免疫组化检测试剂盒(美国 Santa Cruse 公司), 二步法免疫组化检测试剂盒(美国 Power Vision 公司), 彩色病理图像分析系统(北京航空航天大学), Nikon 生物光学摄影显微镜(日本), 其他免疫组化试剂均为即用型(北京中山生物制品公司)。

1.2 动物分组: 健康雄性 Wistar 大鼠 150 只, 平均体重(350±20)g, 由中国协和医科大学实验动物研究所提供。按照 DBI 后 1、2、4、8、12、24、48、72 和 168 h 随机分为 9 个致伤组和 1 个对照组, 每组 15 只。各组动物体重经统计学处理, 差异均无显著性(P 均 > 0.05), 有可比性(表 1, 表 2)。

1.3 大鼠 DBI 模型的制备: 大鼠实验前 12 h 禁食、不禁水。采用 Marmarou 脑损伤方法制备动物模型^[2]: 大鼠麻醉后俯卧位固定于脑落体致伤床垫上,

基金项目:河北省科研计划项目(032761133)

作者单位:063000 河北唐山, 华北煤炭医学院附属医院神经外科

作者简介:刘刚(1972-), 男(汉族), 河北省唐山市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事神经外科脑血管病和危重病的研究。

顶部头皮消毒后沿中线矢状切开,剥离骨膜,显露矢状缝与人字缝,将一直径 10 mm、厚 3 mm 不锈钢垫固定在两缝之间。用重 450 g、直径 18 mm、底部为半球面的铜柱沿垂直玻璃管自 1.5 m 高度自由落下撞击钢垫,致伤冲击力为 0.675 kg,颅骨下陷 0.28 mm,造成大鼠 DBI。对照组只切开头皮,不行落体致伤,然后缝合切口。

表 1 各组动物体重比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 Comparison of body weight of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=15$) g

组别	体重	组别	体重
对照组	336.25±14.06	伤后 12 h 组	335.00±25.35
伤后 1 h 组	338.00±17.45	伤后 24 h 组	335.75±23.97
伤后 2 h 组	334.88±19.42	伤后 48 h 组	336.75±21.10
伤后 4 h 组	331.00±13.94	伤后 72 h 组	332.00±19.32
伤后 8 h 组	337.38±20.76	伤后 168 h 组	333.50±23.21

表 2 各组动物体重的方差分析

Table 2 F test of body weight of rats in each group

变异性	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
组间变异	376.550	9	41.839	0.103	1.00
组内变异	28 557.250	70	407.961		
总变异	28 993.800	79			

1.4 肠黏膜组织取材:严格按照上述时间点再行大鼠麻醉后,常规消毒腹部皮肤打开腹腔,腹主动脉放血后,在距回盲部 5 cm 处取 2 cm 长的小肠组织,常规固定、脱水,垂直定向石蜡包埋,垂直切片,每个时间点每只动物标本均连续切片 20 张,切片厚度为 4 μ m,留作光镜及免疫组化实验用。

1.5 肠黏膜组织形态学观察:经常规苏木素-伊红(HE)染色后,每只动物取上述切片中的 5 张不连续切片,每张切片顺次取奇数视野,在单盲下于彩色病理图像分析系统上随机测 20 个小肠绒毛的高度、宽度及小肠黏膜厚度作为形态学定量指标。

1.6 肠黏膜上皮 NF- κ B 检测:切片经常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。用体积分数为 3%的 H₂O₂ 孵育 10 min,抗原暴露后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 5 min×2 次;组织上滴加 NF- κ B P65 一抗,室温孵育 60 min, PBS 洗 5 min×3 次;滴加 IgG 抗体-辣根过氧化物酶(HRP)多聚体,室温孵育 20 min, PBS 洗 5 min×3 次;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液显色 5 min,切片依次梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。阴性对照以 PBS 替代一抗,其余操作同上。图像分析仪下单盲检测小肠绒毛上皮细胞核 NF- κ B 表达的积分吸光度(A)值,阳性为细胞核呈棕褐色,每个时间点致伤组各张切片高倍镜下随机取 3 个视野,每视野测 10 个值。

1.7 统计学处理:所有资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 10.0 统计软件,单因素方差分析进行统计学检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小肠组织病理改变及形态学的测量结果:对照组小肠黏膜绒毛呈指状突起,较长,中间有一细的中央基质,有散在少量圆形细胞浸润,表面覆以柱状上皮细胞(彩色插页图 1A)。伤后 1 h 镜下结构与对照组无明显差别;自伤后 2 h 开始出现肠黏膜固有层水肿,中性粒细胞及淋巴细胞浸润;伤后 4 h 中央乳糜管及黏膜下小血管扩张加重,与对照组相比绒毛宽度明显增加,但高度缩短呈叶状或锯齿状(彩色插页图 1B);伤后 8、12 和 24 h 黏膜水肿现象逐渐减轻,但固有层逐渐萎缩,绒毛与对照组相比明显变细、变短(彩色插页图 1C)。伤后 48 和 72 h 肠黏膜损伤较前有所恢复,表现为绒毛高度均有所增加,但仍低于对照组,直至伤后 168 h 上述病理改变明显减轻,但仍存在轻度炎细胞浸润(表 3)。

表 3 各组大鼠小肠组织形态学测量结果($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 3 Morphometric assessment of intestinal mucosa of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=15$) mm

组别	绒毛高度	绒毛宽度	黏膜厚度
对照组	269.7±19.9	65.0±11.6	405.5±41.5
伤后 1 h 组	265.6±26.0	72.1±19.6	385.2±39.3
伤后 2 h 组	233.7±36.8**	76.6±16.0	350.3±77.1*
伤后 4 h 组	202.3±22.2**	81.4±13.7**	306.6±33.9**
伤后 8 h 组	214.7±28.0**	70.3±18.9	323.9±51.0**
伤后 12 h 组	220.3±35.3**	62.5±22.1	313.9±63.3**
伤后 24 h 组	208.9±18.3**	49.6±19.1*	319.3±25.6**
伤后 48 h 组	224.9±37.8**	66.6±17.1	332.7±44.9**
伤后 72 h 组	231.6±11.0**	66.3±19.1	337.8±34.8**
伤后 168 h 组	238.2±24.3**	67.6±20.9	344.3±34.0**

注:与对照组比较;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 小肠黏膜上皮细胞中 NF- κ B 表达的 A 值(表 4,彩色插页图 2A~C):对照组小肠黏膜上皮细胞核内无 NF- κ B 阳性表达,自伤后 1 h 起至伤后 72 h 均较对照组有极显著升高(P 均 < 0.01),其中伤后 4 h 和伤后 24 h 升高最为显著,然后其活性逐渐下降,至伤后 168 h 与对照组相比差异已无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

严重创伤后肠黏膜缺血-再灌注引起相应结构和功能损伤是导致 SIRS 和 MODS 的重要原因。肠黏膜因其血管的特殊夹状结构及逆流交换机制,极易受上述病理因素影响。目前,肠黏膜屏障的保护已成为创伤后综合治疗研究的热点^[3]。

表 4 小肠黏膜上皮细胞 NF-κB 表达的 A 值($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 4 Expression of NF-κB (A) in endothelial cells of intestinal mucosa($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	A 值	组别	A 值
对照组	0.078 1±0.017 8	伤后 12 h 组	0.145 3±0.033 7**
伤后 1 h 组	0.127 2±0.027 9**	伤后 24 h 组	0.305 9±0.031 7**
伤后 2 h 组	0.151 9±0.036 5**	伤后 48 h 组	0.265 9±0.035 3**
伤后 4 h 组	0.211 3±0.025 8**	伤后 72 h 组	0.148 4±0.027 9**
伤后 8 h 组	0.161 9±0.025 7**	伤后 168 h 组	0.083 4±0.023 1

注:与对照组比较:** $P<0.01$

NF-κB 是一种诱导型核转录因子,静息状态下以 P50 和 P65 二聚体与其抑制蛋白(I-κB)相结合而存在胞浆,呈无活性状态^[4]。外源性刺激可通过一系列信号转导引起 I-κB 降解,导致二聚体解体, P65 进入细胞核内得到活化,借助于被暴露基因的特异序列结合并启动转录发挥其调控作用。已知多种炎性介质如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等基因的启动子和增强子中存在一个或多个 κB 序列^[5]。离体研究资料表明, NF-κB 的活化是 ICAM-1 等激活的必要条件^[6], ICAM-1 主要功能是介导中性粒细胞与血管内皮细胞及上皮细胞间的黏附,这种黏附作用是白细胞于炎症部位聚集的关键。NF-κB 激活后刺激产生大量上述细胞因子,这些因子的增多又反过来促进 NF-κB 的活化^[7]。上述因子都能直接或间接地参与缺血-再灌注损伤, Hassoun 和 Russell 等^[8,9] 分别发现缺血-再灌注后 NF-κB 的活性显著升高,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 ICAM-1 的表达,引起血管内皮细胞和肠上皮细胞损伤,而抑制 NF-κB 的活化可减轻肠黏膜的损伤程度。Jobin 等^[10] 发现肠黏膜上皮细胞 NF-κB 的活性增强在炎性肠病中起重要作用。综上所述可以认为, NF-κB 在启动、放大和延续炎症反应过程中起着中枢性调节作用。因此,将 NF-κB 作为 DBI 后肠道功能失调的发病机制研究方向有积极意义。

本研究发现,大鼠 DBI 后肠黏膜依次经历了由炎性水肿到基质萎缩,然后逐渐恢复的过程。相应的形态学测量结果显示,黏膜厚度、绒毛高度的变化表现为伤后下降,然后缓慢回升,而绒毛宽度的变化则由于炎性水肿的存在表现为先升后降,再缓慢恢复的态势,较常建星等^[11] 研究的形态学变化晚且恢复慢,可能是因为脑为肠道的远隔器官,相互影响晚但较持久之故。同时, DBI 后极短时间内(2 h)大鼠肠黏膜细胞内 NF-κB 的表达即明显增加,并持续至伤后很长时间(72 h),与 Yeh 等^[12] 研究结果相似。

表明 DBI 后肠道迅速并活跃地参与机体应激反应,可能通过激活 NF-κB 进而调控细胞因子等表达引起一系列的炎症反应而损伤肠黏膜,导致其通透性增加,屏障功能受损。

有理由认为,随着对 NF-κB 的活化和抑制机制的认识,选用 NF-κB 抑制剂阻断其激活途径,减少 ICAM-1 等细胞因子的表达而起到减轻肠黏膜损伤、保护组织结构的作用,是治疗 DBI 后肠黏膜屏障损伤的一条新思路。

参考文献:

- 1 Kombean J L, Takala J. Summary of round table conference: gut dysfunction in critical illness[J]. Intensive Care Med, 1997, 23: 475-480.
- 2 Marmarou A, Foda M A, Brink W D, et al. A new model of diffuse brain injury in rat[J]. J Neurosurg, 1994, 80: 291-313.
- 3 王佩燕. 肠——多器官功能障碍综合征防治的靶器官[J]? 中国危重病急救医学, 2001, 13: 647-648.
- 4 Abraham E. NF-κB Nuclear activation[J]. Crit Care Med, 2000, 28: N100-N104.
- 5 Christman J W, Lancaster L H, Blackwell T S. Nuclear factor kappa-B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy[J]. Intensive Care Med, 1998, 24: 1131-1138.
- 6 顾大勇, 曾祥元, 陈莉, 等. LPS 诱导肺微血管内皮细胞 ICAM-1 的表达及 NF-κB 作用的实验研究[J]. 中国微循环, 2002, 6: 25-29.
- 7 Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa-B activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis[J]. Gut, 1999, 44: 253-258.
- 8 Hassoun H T, Kozar R A, Kone B C, et al. Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress proteins during mesenteric ischemia/reperfusion[J]. Surgery, 2002, 132: 369-376.
- 9 Russell J, Epstein C J, Grisham M B, et al. Regulation of E-selectin expression in postischemic intestinal microvasculature[J]. Am J Physiol, 2000, 278: G878-885.
- 10 Jobin C, Sartor R B. The I-κB/NF-κB system: a key determinant of mucosal inflammation and protection[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278: C451-C462.
- 11 常建星, 陈双, 符玉茹, 等. 大鼠失血性休克复苏早期肠黏膜损伤与修复的形态学观察[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 477-480.
- 12 Yeh K Y, Yeh M, Glass J, et al. Rapid activation of NF-κB and AP-1 and target gene expression in postischemic rat intestine[J]. Gastroenterology, 2000, 118: 525-534.

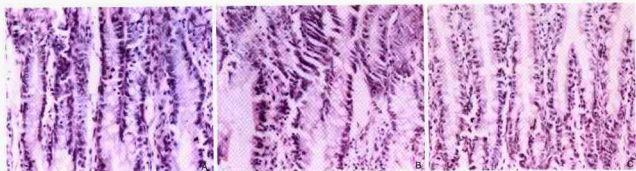
(收稿日期: 2005-06-29 修回日期: 2005-08-04)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ① 珠海丽珠: 丽珠血液灌流器 (封二)
- ② 北京四环医药: 苏诺 (插页)
- ③ 珠海弘升: 血液净化 (封三)
- ④ 索诺声有限公司: 便携式彩超 (封底)

弥漫性脑损伤后大鼠肠黏膜病理变化的动态观察及核转录因子- κ B的表达 (正文见355页)



A: 对照组, B: 伤后4 h, C: 伤后24 h

图1 小肠黏膜病理变化(HE, $\times 200$)

Figure 1 Pathologic changes of intestinal mucosa(HE, $\times 200$)



A: 对照组, B: 伤后4 h, C: 伤后24 h

图2 小肠黏膜上皮细胞NF- κ B表达情况(DAB, $\times 200$)

Figure 2 Expression of NF- κ B in use epithelium in nuclear of intestinal mucosa(DAB, $\times 200$)

双重血浆置换治疗类风湿性关节炎活动期的作用观察

(正文见568页)



图1 DFPP置换出的血浆呈墨绿色
Figure 1 Colour of the plasma filtrate was dark green

图2 DFPP置换出的血浆呈绿色
Figure 2 Colour of the plasma filtrate was green

图3 DFPP置换出的血浆呈黄绿色
Figure 3 Colour of the plasma filtrate was yellow-green



A: 第1次DFPP, B: 第2次DFPP, C: 第3次DFPP

图4 患者连续3次DFPP置换出的血浆颜色逐渐变浅

Figure 4 Colour of plasma filtrate was getting lighter with every DFPP