

## 肠黏膜肥大细胞脱颗粒对大鼠肠缺血/再灌注后长期生存的影响

黄品婕, 庞红宇, 罗刚健, 关健强, 位 静, 黑子清\*

(中山大学附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

**摘要:** 【目的】观察大鼠肠缺血/再灌注后肠黏膜肥大细胞脱颗粒对SD大鼠生存的影响。【方法】采用肠系膜上动脉夹毕75 min建立小肠缺血/再灌注模型,将96只SD大鼠随机分为4组( $n = 24$ ):S组(假手术组)、M组(模型组)、C组(缺血再灌注 + 色甘酸钠  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组),CP组(缺血再灌注 + compound 48/80  $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组)。C及CP组分别在再灌注前5 min和再灌注后3 d静脉注射药物,S、M组给予等量生理盐水。观察各组大鼠7 d的生存率、存活状态,光镜观察存活动物肠黏膜病理学变化,进行Chiu's评分,电镜观察肠黏膜微绒毛和IMMC的超微结构及类胰蛋白酶表达比较进行IMMC计数。【结果】M组、CP组第7天生存率明显低于S组( $P < 0.01$ );C组第7天存活率高于M组( $P < 0.05$ ),与S组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。CP组第7天生存率低于M组( $P < 0.05$ )。存活动物光镜下M、CP组肠黏膜绒毛损伤轻微,电镜显示M、CP组微绒毛肿胀、有脱落,S组、C组基本正常,各组间肠黏膜Chiu's评分无统计学差异( $P > 0.05$ )。电镜下CP组IMMC脱颗粒最明显,M组次之,S组、C组未见IMMC脱颗粒,各组间IMMC计数无统计学差异( $P > 0.05$ )。【结论】肥大细胞活化脱颗粒影响肠缺血/再灌注损伤大鼠的长期生存率。

**关键词:** 肥大细胞; 脱颗粒; 肠缺血再灌注; 存活率

中图分类号: R602

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0165-05

### Effects of Intestinal Mucosal Mast Cell Degranulation on Survival Rate in a Rat Intestinal Ischemia Reperfusion Model

HUANG Pin-jie, PANG Hong-yu, LUO Gang-jiang, GUAN Jian-qiang, WEI Jing, HEI Zi-qing\*

(Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effect of intestinal mucosal mast cell (IMMC) degranulation on the survival rate in a SD rat intestinal ischemia reperfusion (I/R) model. 【Methods】The intestinal I/R model of SD rat was established with clamping the superior mesenteric artery for 75 min. Ninety-six SD rats were divided into 4 groups: group S for sham group, group M for model group, group C for cromolyn sodium group (model + cromolyn sodium  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and group CP for compound 48/80 group (model + compound 48/80  $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) ( $n = 24$  per group). The drugs were administered via caudal vein 5 min before reperfusion and after reperfusion once daily for 3 d in group C and group CP; while normal saline was administered in group S and group M. All the rats were bred for 7 d for observing the survival state. The histopathologic changes of intestinal mucosal mast cells were observed under light microscope in the survival rats. The intestinal mucosa microvilli and the ultramicrostructure of IMMC were observed under electron microscope, and tryptase expression was compared for IMMC counting. Chiu's score was carried out as well. 【Results】The survival rates on the seventh day of group M and group CP were lower than those of group S ( $P < 0.05$ ), and the survival rate of group C was higher than that of group M ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the survival rates of group C and group S ( $P > 0.05$ ). The survival rate of group CP was lower than that of group M ( $P < 0.05$ ). Light and electron microscope examinations showed slight damage of intestinal mucosal in group M and group CP in the survival rats, while group S and group C were almost normal. Mast cell degranulation was obvious in group CP, less obvious in group M while

收稿日期:2008-08-05

基金项目:广东省科技计划项目(2007B060401070);广东省医学科研基金(B2006049)

作者简介:黄品婕,博士生,住院医师, E-mail:hpjie@126.com; \* 通讯作者:黑子清,博士生导师, E-mail:heiziqing0530@hotmail.com

none was found in group S and group C. The Chiu's score and mast cell number had no significant difference among four groups ( $P > 0.05$ ). 【Conclusion】 Mucosal mast cell degranulation may be adverse to the prognosis of intestinal ischemia reperfusion injury in SD rats.

**Key words:** mast cells; degranulation; intestinal ischemia reperfusion; survival rate

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 165-169]

肠缺血/再灌注损伤 (intestinal ischemia reperfusion injury, IIRI) 是临床中常见的病理生理过程。肠黏膜肥大细胞 (intestinal mucosal mast cell, IMMC) 是肥大细胞的一种亚型, 位于肠道黏膜固有层, 在维持肠道生理功能起着重要作用<sup>[1]</sup>。我们以往研究<sup>[2]</sup>证实, 肠缺血/再灌注后, IMMC 活化脱颗粒, 释放大炎症介质, 参与了 IIRI 损伤过程。色甘酸钠是肥大细胞膜稳定剂<sup>[3]</sup>, Compound 48/80 是促肥大细胞脱颗粒剂<sup>[4]</sup>。本研究拟在肠缺血再灌注后静脉给予色甘酸钠或 compound 48/80, 观察抑制或促进 IMMC 脱颗粒对 SD 大鼠长期生存的影响及存活动物肠黏膜损伤及 IMMC 的变化, 为提高肠缺血/再灌注损伤后长期生存的药物治疗提供实验证据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及分组

健康清洁级 SD 大鼠 96 只 (中山大学中山医学院实验动物中心提供, 合格证号: 0011014), 体重 200 ~ 250 g, 雌雄不限。按基础饲料饲养 1 周, 适应环境后随机分为 4 组 ( $n = 24$ ): S 组 (假手术组)、M 组 (缺血再灌注组)、C 组 (缺血再灌注 + 色甘酸钠 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组), CP 组 (缺血再灌注 + compound 48/80 0.75 mg·kg<sup>-1</sup> 组), 每组 24 只。

### 1.2 动物模型复制方法

4 组大鼠均于术前 16 h 禁食, 自由饮水。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 45 mg·kg<sup>-1</sup> 麻醉后, 仰卧位固定, 消毒铺巾, 腹部正中切口进腹, 分离肠系膜上动脉。S 组只分离肠系膜上动脉, 不阻断; M、C、CP 组用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉根部, 75 min 后松开动脉夹 (我们在前期实验中发现肠系膜上动脉阻断 75 min 术后 7 d 的死亡率为 41.6%<sup>[5]</sup>)。模型复制成功的标准为缺血处肠系膜微动脉搏动消失; 且再灌注前肠道瘀黑、肿胀; 动脉夹松开后缺血处肠系膜微动脉恢复搏动。C、CP 组分别在再灌注前 5 min 经尾静脉注射色甘酸钠 25 mg·kg<sup>-1</sup>

(ICN; 美国) 和 compound 48/80 0.75 mg·kg<sup>-1</sup> (Sigma; 美国), S、M 组分别给予等量生理盐水。实验动物在动脉夹松开后, 腹腔内给予 5% 头孢哌酮注射液 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 预防伤口感染, 然后缝合腹膜、肌肉和皮肤。用 3% 苦味酸在各组动物毛发不同部位进行标记, 用金属网笼进行独笼饲养, 给予颗粒饲料饲养, 自由饮水。术后 24 h 将存活大鼠置于特制鼠笼, 无菌操作, 穿刺尾静脉, C、CP 组每天清晨分别静脉注射色甘酸钠 25 mg·kg<sup>-1</sup> 或 compound 48/80 0.75 mg·kg<sup>-1</sup>, S、M 组分别给予等量生理盐水, 连续 3 d。

### 1.3 观察指标与标本的采集及检测

1.3.1 动物观察 观察各组动物 7 d 生存率, 并记录各组存活动物的存活状态, 毛发、活动、饮食、反应等。

1.3.2 病理学观察 在术后第 7 天断头处死各组存活大鼠, 取小肠 (距回肠末端 5 cm) 标本, 一部分用 40 mL/L 的甲醛固定, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肠黏膜病理变化, 肠黏膜病理变化采用改良 Chiu's 评分法<sup>[6]</sup>: 黏膜损伤程度绒毛的变化分为 0 ~ 5 分, 腺体的变化分成 0 ~ 4 分, 两者相加为积分值。另一部分用质量分数为 4% 戊二醛固定 2 h, 1% 锇酸后固定 1 h, 包埋, 超薄切片, 双重染色, 透射电镜观察肠黏膜微绒毛超微结构。

1.3.3 肥大细胞观察 小肠组织用 4% 戊二醛固定 2 h, 1% 锇酸后固定 1 h, 包埋, 超薄切片, 双重染色, 透射电镜观察 IMMC 的超微结构, 分析其脱颗粒情况。

1.3.4 肥大细胞计数 采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 染色法, 石蜡切片脱蜡水化后蒸馏水清洗, 用 pH 9.0 EDTA 高压修复 2 min 后自然冷却, 蒸馏水清洗后, 30 mL/L 双氧水浸泡 10 min 后再用蒸馏水清洗, PBS 清洗 5 min × 3 次, 加一抗 (大鼠抗人类胰蛋白酶多克隆抗体; 福州迈新生物工程有限公司) 37 °C 水浴 1 h, 再用 PBS 清洗 5 min × 3 次, 加二抗 (山羊抗鼠 IgG 抗体) 37 °C 水浴 30 min, PBS 清洗 5 min × 3 次, 1:

1:1 3,3'-二甲基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染2 min,0.1%盐酸酒精分化,用水冲洗10 min后用95%酒精脱水;烤箱烤干后中性树胶封片。以胞浆显棕黄色为阳性细胞,于每张切片中用400倍光镜随机选取5个肠黏膜部位进行观察,通过显微摄像系统将选取的视野输入BI-2000彩色图像分析系统(四川泰盟电子制造),观察类胰蛋白酶染色阳性细胞计算IMMC数量。

#### 1.4 统计学方法

用SPSS 12.0软件系统进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料采用卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 动物存活率及存活状态比较

M组、CP组第7天生存率明显低于S组( $P < 0.01$ )。C组第7天生存率高于M组( $P < 0.05$ ),与S组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。CP组第7天生存率低于M组( $P < 0.05$ )。S组大鼠毛发有光泽,反应灵敏,活动、饮食等无明显变化。M组大鼠毛发尚有光泽,反应下降,活动、饮食等减少。C组大鼠毛发尚有光泽,反应稍下降,活动、饮食无明显改变。CP组大鼠毛发无光泽,低头、躬背,反应

表1 动物7d存活率

Table 1 The survival rate on the seventh day of the animals

Group(n)	Survival	Death
Group S(24)	22	2
Group M(24)	10 <sup>1)</sup>	14
Group C(24)	18 <sup>2)</sup>	6
Group CP(24)	3 <sup>1), 2)</sup>	21

Compared with group S, 1)  $P < 0.01$ ; compared with group M, 2)  $P < 0.05$

迟钝,活动明显减少(表1)。

### 2.2 肠黏膜病理学变化

通过光镜显示:S组、C组绒毛和腺体大致正常。M组绒毛顶端上皮下间隙扩大,腺体轻度受损。CP组绒毛轻度水肿,尖端上皮抬高脱离,腺体轻度受损。肠黏膜损伤 Chiu's 评分高低依次为CP、M、C和S组,但各组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ ,表2、图1)。肠黏膜电镜下改变:S组微绒

毛细长丰富,排列整齐。M组微绒毛肿胀,短而粗,排列不齐,部分脱落。C组微绒毛变短,排列尚整齐,无脱落缺失。CP组微绒毛肿胀,明显变短、脱落稀疏(图2)。

### 2.3 IMMC脱颗粒情况

电镜可见,S组IMMC包膜完整,胞浆内含大量颗粒。M组IMMC包膜不完整,可见部分脱颗粒后空泡现象。C组IMMC包膜完整,未见明显脱颗粒现象。CP组IMMC包膜不完整,可见明显脱颗粒后空泡现象(图3)。

### 2.4 IMMC数量

IMMC计数组间比较均无统计学差异( $P > 0.05$ ,表2)。

表2 各组肠黏膜 Chiu's 评分及肠组织 IMMC 计数

Table 2 Chiu's score of intestinal mucosa and counts of IMMC in the survived rats ( $\bar{x}\pm s$ )

Group(n)	Chiu's score	Counts of IMMC
Group S(22)	0.17 $\pm$ 0.41	21 $\pm$ 5
Group M(10)	1.00 $\pm$ 1.27	26 $\pm$ 11
Group C(18)	0.50 $\pm$ 0.84	27 $\pm$ 16
Group CP(3)	1.33 $\pm$ 1.21	28 $\pm$ 4

## 3 讨论

肠缺血/再灌注损伤(IIRI)是严重创伤、烧伤、休克后治疗过程中可能发生的常见病理生理过程,严重时可引起多器官功能不全及死亡<sup>[7]</sup>。我们研究<sup>[2]</sup>证实肠缺血再灌注后可见肥大细胞大量脱颗粒,显示肥大细胞脱颗粒参与了肠缺血再灌注损伤过程。国外学者研究发现肠缺血前通过药物减少肥大细胞脱颗粒,可提高动物短期生存率<sup>[8, 9]</sup>。在肠缺血/再灌注后用药是否能提高动物的长期生存率目前仍不明确。创伤后7d仍能存活的动物可认为是长期存活<sup>[10]</sup>。本研究通过应用促进或抑制肥大细胞脱颗粒药物,在肠缺血/再灌注后持续应用3d,观察了肥大细胞脱颗粒对大鼠生存率的影响和存活动物肠道的病理学表现。

我们在通过前期研究发现SD大鼠肠缺血75 min再灌注动物的7d存活率约42%,适合作为研究长期生存的模式<sup>[5]</sup>。应用此模型,我们选择Compound 48/80和色甘酸钠作为肥大细胞脱颗粒

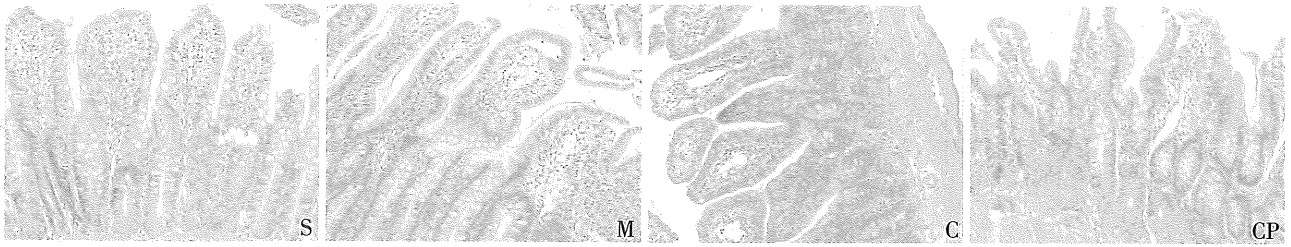


图 1 肠粘膜病理形态改变比较

Fig.1 Morphological changes of intestinal mucosa under light microscope in the survived rats

Groups S and C: The villus and glands were normal and no inflammatory cell infiltration was observed in mucosal epithelial layer; Group M: Slight edema of mucosa gland and enlarged subepithelial space on the villus tip were found in mucosa epithelial layer; Group CP: The intensity of mucosal damage was severer than in group M; Epithelial raised and separated from the tip; HE  $\times 200$

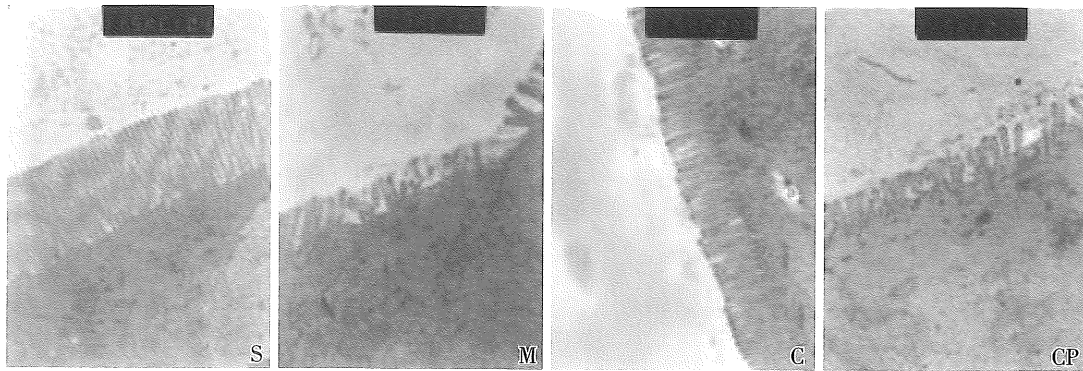


图 2 肠粘膜绒毛电镜比较

Fig.2 Changes of ultrastructure of small intestine in the survived rats under electron microscope

Group S: The ultrastructure of small intestinal was normal; Group M: The swelling microvillus became shorter and irregular obviously, some of the microvilli were shedding; Group C: The microvilli became shorter but still regular and integrity; Group CP: The microvilli were short and swelling obviously, most of the microvilli were shedding;  $\times 11\ 500$

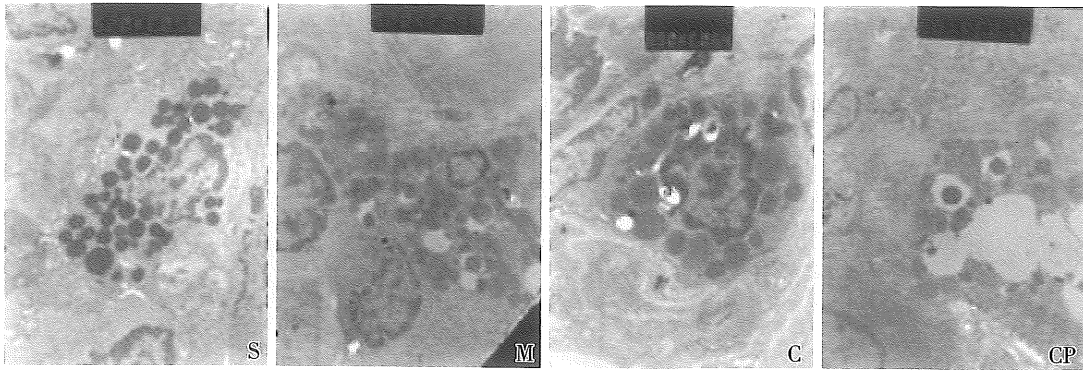


图 3 IMMC 电镜比较

Fig.3 Changes of ultrastructure of IMMC in the survival rats

Group S: The ultrastructure of IMMC was normal, and the cytolemma was integrity with abundant granules in the endochylema,  $\times 5\ 200$ ; Group M: There were some vacuoles with decreased number of granules in their endochylema,  $\times 5\ 200$ ; Group C: The cytolemma was integrity with fewer vacuoles than group M,  $\times 8\ 900$ ; Group CP: There were abundant vacuoles with seldom granules in their endochylema,  $\times 6\ 600$

的干预药物。色甘酸钠能稳定肥大细胞的细胞膜,抑制肥大细胞脱颗粒<sup>[3]</sup>;Compound 48/80 是肥大细胞脱颗粒剂,能刺激肥大细胞脱颗粒<sup>[4]</sup>。根据文

献报道<sup>[11-12]</sup>,我们选择色甘酸钠剂量为  $25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 compound 48/80 剂量为  $0.75\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;发现色甘酸钠使 SD 大鼠第 7 天存活率明显增加,接近假

手术组,存活状态显著改善,而 compound 48/80 使动物第7天存活率明显减少,存活状态差;研究结果证实,在肠缺血再灌注后抑制肥大细胞脱颗粒能提高动物长期存活率,而激发 IMMC 活化脱颗粒药物促使动物死亡,临床药物选择应注意这一问题。

类胰蛋白酶是肥大细胞的特异标志物,在肥大细胞鉴别和计数比甲苯蓝染色更敏感、阳性率更高<sup>[13]</sup>。以往研究我们发现肠缺血 60 min/再灌注 90 min 肠组织肥大细胞增加,脱颗粒明显,证实肥大细胞脱颗粒参与肠缺血再灌注损伤<sup>[2]</sup>。我们应用肠缺血 75 min 模型<sup>[5]</sup>,观察到再灌注恢复期第7天,各组肠组织 IMMC 计数相近,这些结果提示肠缺血/再灌注恢复期肥大细胞数量基本恢复正常,与再灌注早期结果不相同<sup>[2]</sup>,原因有待进一步研究。电镜下观察到单纯模型组 IMMC 部分脱颗粒现象,compound 48/80 组 IMMC 大量脱颗粒及形成大量空泡,色甘酸钠组和正常组 IMMC 脱颗粒不明显,显示再灌注恢复期肠黏膜肥大细胞功能状况仍受到药物的影响。

前期研究我们发现肠缺血 60 min/再灌注 90 min 模型组肠组织损伤十分严重,Chiu's 评分高<sup>[2]</sup>。本次研究中,于肠缺血再灌注恢复期 7 d 后光镜下观察存活动物肠组织结构,显示各组大鼠肠道病理学损伤均不明显,各组肠黏膜损伤 Chiu's 评分均未超过 2 分,无统计学差异,提示肠道在再灌注 7 d 后恢复较好;电镜显示模型组和 compound 48/80 组肠道微绒毛肿胀、脱落紊乱,而假手术组和色甘酸钠组基本正常,提示色甘酸钠有利于肠道超微结构修复,而 compound 48/80 的应用导致超微结构恢复较慢。

综上所述,肥大细胞活化脱颗粒影响肠缺血/再灌注损伤大鼠的长期生存率,临床上药物选择应注意这一问题。有关肠缺血再灌注 7 d 内肠黏膜肥大细胞的动态变化及与生存的关系仍有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Alicia BP, Maria LR, Ramon SP. Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense [J]. *Biocell*, 2003, 27 (2):163-172.
- [2] Gan XL, Hei ZQ, Huang HQ, et al. Effect of *Astragalus membranaceus* injection on the activity of the intestinal mucosal mast cells after hemorrhagic shock-reperfusion in rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(22):1892-1898.
- [3] Hemmati A, Nazari Z, Motlagh ME, et al. The role of sodium cromolyn in treatment of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rat [J]. *Pharmacol Res*, 2002, 46 (3):229-234.
- [4] 唐雅玲,王双,杨永宗. Compound 48/80 对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠颈总动脉套环诱导斑块的影响? [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(2):103-106.
- [5] 黄品婕,蔡珺,甘小亮,等. SD 大鼠不同肠缺血时间观察长期存活率模型的筛选 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(19):2983-2984.
- [6] Chiu CJ, Mcardle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low flow states [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(9):478-483.
- [7] Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, et al. Acute mesenteric ischemia: a clinical review [J]. *Arch Intern Med*, 2004, 164(10):1054-1062.
- [8] Szabo A, Boros M, Kaszaki J, et al. The role of mast cells in mucosal permeability changes during ischemia-reperfusion injury of the small intestine [J]. *Shock*, 1997, 8(4):284-291.
- [9] Kalia N, Brown NJ, Wood RF, et al. Ketotifen abrogates local and systemic consequences of rat intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(7):1032-1038.
- [10] 郝光荣. 实验动物学[M]. 2 版. 上海:第二军医大学出版社, 2004.137-138.
- [11] Kaszaki J, Boros M, Szabo A, et al. Role of histamine in the intestinal flow response following mesenteric ischemia [J]. *Shock*, 1994, 2(6):413-420.
- [12] Boros M, Ordogh B, Kaszaki J, et al. The role of mast cell degranulation in ischemia-reperfusion-induced mucosal injury in the small intestine [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 1999, 28(1):79-84.
- [13] Walla AF. Roles of the mast cell and basophil in asthma [J]. *Chin Experiment Allergy*, 2001, 7(1):68-72.

(编辑 徐杰)

[1] Alicia BP, Maria LR, Ramon SP. Role of mast cells in