论著

文章编号:1000-5404(2008)01-0046-03

缺氧对大鼠白细胞粘弹性的影响

张 钢,高钰琪,刘福玉 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原生理与高原病研究重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究急、慢性缺氧对中性粒细胞粘弹性的影响。方法 低压舱模拟高原复制缺氧模型,成年Wistar大鼠15只,随机分为常氧组、急性缺氧组(5 000 m减压3 d)和慢性缺氧组(5 000 m减压30 d)。微管吸吮技术分析粒细胞粘弹性变化,标准线性固体模型拟合结果。结果 常氧组粒细胞弹性模量K_1为(39.52±16.06)Pa,K_2为(148.85±9.06)Pa,粘性系数μ为(2.28±1.11)Pa·s;急、慢性缺氧组各参数均显著增大($P<0.05$),K_1为(86.66±26.84) Pa和(179.61±26.31)Pa,K_2为(399.89±22.03) Pa和(472.12±30.36)Pa,μ为(4.23±1.82)Pa·s和(9.21±2.65)Pa·s;急性缺氧初始变形长度、最大变形长度和时间常数较对照组显著减小($P<0.05$),但慢性缺氧组时间常数较对照组已无明显差异($P>0.05$)。结论 急、慢性缺氧对粒细胞生物力学特性有明显影响,表现为细胞膜刚性增大,细胞变形性下降。

关键词:缺氧;白细胞;粘弹性
中图法分类号:R331.142;R361.3;R364.4 文献标识码:A

Effects of hypoxia on viscoelastic properties of polymorphonuclear leukocyte of rats

ZHANG Gang, GAO Yu-qi, LIU Fu-yu ([1]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical university, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of acute or chronic hypoxia on the viscoelastic properties of polymorphonuclear leukocyte (PMN) of rats. Methods Hypobaric chamber was used to simulate high altitude condition. Fifteen adult Wistar rats were randomized into 3 groups: control, acute hypoxia (5 000 m for 3 d) and chronic hypoxia (5 000 m for 30 d). Micropipette aspiration technique was used to evaluate the biomechanical properties of PMNs of rats and the experimental results were fitted with a three-element standard linear solid model. Results The viscoelastic coefficients of PMNs in acute hypoxic condition [K_1 = (86.66 ± 26.84) Pa, K_2 = (399.89 ± 22.03) Pa, μ = (4.23 ± 1.82) Pa·s] or those values in chronic hypoxic condition [K_1 = (179.61 ± 26.31) Pa, K_2 = (472.12 ± 30.36) Pa, μ = (9.21 ± 2.65) Pa·s] were significantly higher than the corresponding value of PMNs in control ($P<0.05$) [K_1 = (39.52 ± 16.06) Pa, K_2 = (148.85 ± 9.06) Pa, μ = (2.28 ± 1.11) Pa·s]. Compared with the control, the initial strain, maximum strain and the time constant in acute hypoxia was obviously decreased ($P<0.05$), but the time constant in chronic hypoxia had no difference. Conclusion These results suggest that acute or chronic hypoxia has strong impact on the biomechanical properties of PMN, involving the increased rigidity of cell membrane and the decreased deformation of cell.

Key words: hypoxia; leukocyte; viscoelasticity

中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte,PMN)占外周血循环白细胞总数的50%~60%,是组成机体免疫系统的内在功能部分,是防御外来感染媒质的重要防线[1]。PMN功能的发挥与其在血液循环中的生物力学特性(粘弹性)密切相关[2],对不同状态下PMN生物力学特性的研究,对于分析PMN的生理功能是十分必要的。

缺氧可对机体产生一系列影响,但有关缺氧对PMN粘弹性的影响研究较少。本研究应用细胞微管吸吮实验技术,研究了急、慢性缺氧对大鼠PMN生物力学特性(粘弹性)的影响,探讨了其中的影响机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型复制

参照文献[3]方法:成年健康Wistar大鼠15只(由本校实

作者简介:张 钢,男,湖南省湘潭市人,博士研究生,副教授,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752335转8213,E-mail:zglxb@mail.tmmu.com.cn
通信作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gyq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-03-21;修回日期:2007-07-15

验动物中心提供),体质量 180 ~ 210 g,雌雄不拘,按简单完全随机分组法随机分为 3 组:常氧对照组(5 只),平原喂养;急性缺氧组(5 只),低压舱模拟海拔 5 000 m 连续减压 3 d;慢性缺氧组(5 只),5 000 m 连续减压 30 d,急性缺氧和慢性缺氧组每天开舱 30 min 补充水和饲料。低压舱内温度 24 ~ 25 ℃,湿度 58% ~ 60%,新风量 200 m^3,垂直风速 0.02 m/s。

1.2　中性粒细胞的分离

参照文献[4]方法:大鼠腹腔注射 10% 乌拉坦(1 ml/100 g)麻醉。肝素钠抗凝,一侧颈动脉插管监测血压及采血,颈外静脉插管输液(5% 葡萄糖/生理盐水,2 ml/h)。气管插管,动物呼吸机(DH-140,浙江医科大学医学仪器实验厂生产)机械通气,按文献报道分离中性粒细胞。

急性缺氧组和慢性缺氧组大鼠在低压舱内分离中性粒细胞,舱内实验环境条件与动物减压一致,常氧组在常氧状态下分离粒细胞。分离出的 PMN 悬浮于自体血浆中,细胞浓度 2×10^6 个/ml。

1.3　细胞微管吸吮实验系统及方法

微管吸吮实验系统的结构和实验方法见文献[5]。微管由普通国产毛细玻管在微管拉制器(P87,Sutter Instrument Co)上拉制而成,内径(1.50 ± 0.25) μm。

取 PMN 细胞悬液约 0.5 ml 放入特制圆形小室内,置于倒置显微镜载物台上,利用显微操作器引导微管尖端靠近细胞的表面,通过压力控制系统产生一阶跃负压以吸吮细胞,使细胞表面一小部份被吸入微管内。电视摄像记录细胞变形全过程,图像处理仪进行时间-位移参数测量,每个大鼠样本吸吮 20 个细胞,每个实验组统计 5 个大鼠共计 100 个细胞左右。

1.4　数据拟合方法

数据拟合采用标准固体弹性模型(Kelvin 模型)拟合实验结果,该模型由二条平行的"臂"组成,其中一"臂"为弹性模量 K_1 的弹性元件,另一"臂"由弹性模量 K_2 的弹性元件和粘性系数为 μ 的粘性元件串联而成,以 K_1、K_2 和 μ 作为标证细胞粘弹性的客观物理量。弹性模量 K_1 和 K_2 反映细胞刚性,粘性系数 μ 反映细胞粘性,$[1/(K_1 + K_2)]$ 正比于细胞在吸吮负压作用下被吸入微吸管初始变形长度,$(1/K_1)$ 正比于最大变形长度,时间常数 $[(K_1 + K_2) \times \mu/(K_1 \times K_2)]$ 反映细胞蠕变程度。

1.5　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,Excel 2003 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　数据拟合情况

大鼠 PMN 对阶跃负压 $\triangle P(t)$ 的响应包括一个初始的快速弹性响应和其后的一个缓慢蠕变过程。$K_1 = 59.02$ Pa,$K_2 = 331.53$ Pa,$\mu = 3.66$ Pa·s。在 $\triangle P(t)$ 作用下细胞表面进入微吸管的距离 $d(t)$ 随时间 t 的变化过程如图 1 所示,kelvin 模型拟合实验结果。

2.2　粘弹性结果

对照组 PMN 粘弹性系数 K_1 为(39.52 ± 16.06) Pa,K_2 为(148.85 ± 9.06) Pa,μ 为(2.28 ± 1.11) Pa·s;急、慢性缺氧组 K_1,K_2 和 μ 均显著性增大($P < 0.05$)见表 1。

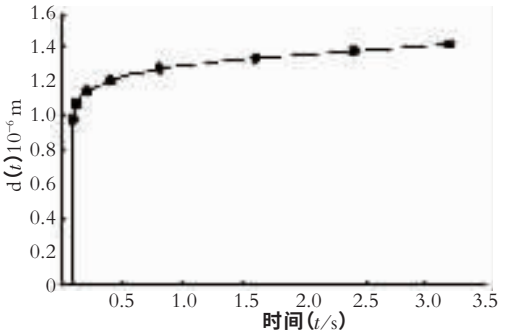


图 1　PMN 对阶跃负压响应的位移-时间过程

表 1　各实验组粘弹性系数的变化($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	弹性模量 K_1(Pa)	弹性模量 K_2(Pa)	粘性系数 (Pa·s)
常氧对照组	39.52 ± 16.06	148.85 ± 9.06	2.28 ± 1.11
急性缺氧组	86.66 ± 26.84[a]	399.89 ± 22.03[a]	4.23 ± 1.82[a]
慢性缺氧组	179.61 ± 26.31[ab]	472.12 ± 30.36[ab]	9.21 ± 2.65[ab]

a:$P < 0.05$ 与常氧对照组比较;b:$P < 0.05$ 与急性缺氧组比较

2.3　初始变形长度,最大变形长度和时间常数结果

对照组 PMN 初始变形长度 $1/(K_1 + K_2)$ 为(0.72 ± 0.40) Pa^{-1},最大变形长度 $1/K_1$ 为(2.94 ± 1.08) Pa^{-1},时间常数 $[(K_1 + K_2) \times \mu/(K_1 \times K_2)]$ 为(8.00 ± 3.62) s,与之相比,急性缺氧组初始变形长度、最大变形长度和时间常数均显著减小($P < 0.05$),慢性缺氧组除时间常数无显著变化外($P > 0.05$),初始变形长度和最大变形长度均显著降低($P < 0.05$),见表 2。

表 2　初始变形长度,最大变形长度和时间常数的变化($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	初始变形指数(Pa^{-1})	最大变形指数(Pa^{-1})	时间常数(s)
常氧对照组	0.72 ± 0.40	2.94 ± 1.08	8.00 ± 3.62
急性缺氧组	0.25 ± 0.12[a]	1.29 ± 0.47[a]	6.14 ± 1.87[a]
慢性缺氧组	0.19 ± 0.09[ab]	0.57 ± 0.08[ab]	8.74 ± 3.97[b]

a:$P < 0.05$,与常氧对照组比较;b:$P < 0.05$,与急性缺氧组比较

3　讨论

PMN 生物力学行为是其生物化学和分子组成的功能表现,研究 PMN 生物力学和生物化学之间的相互关系,有助于深入认识 PMN 生物学结构和其功能的关系,粘弹性是与细胞运动和变形能力有关的重要生物力学特性。本实验采用细胞微管吸吮技术,从单细胞角度研究了缺氧对 PMN 粘弹性的影响。

缺氧后血液生理生化环境发生明显改变[6],为模拟大鼠自身的内环境,本研究将分离出的 PMN 悬浮于自体血浆中。研究结果表明,急性缺氧时大鼠 PMN 的弹性模量 K_1、K_2 和粘性系数 μ 均显著性增大,初始变形长度、最大变形长度和蠕变时间常数均显著减小,表明急性缺氧时 PMN 刚性增大,被动变形性降低。PMN 被动变形性下降,使其不易在血流冲击下通过比其自

身尺寸小的毛细血管，易造成 PMN 在毛细血管中的堵塞，且可使 PMN 与血管内皮细胞粘附增强，从而引起红细胞流动状态和血浆层的变化，使血流阻力增加，血流缓慢，血粘度增加，加重组织缺氧，并可能导致微血栓形成和血管内皮下组织的损伤，最终引起血管通透性增加。血流的减少还可使微血管内灌注压下降，进一步促进 PMN 和血管内皮细胞的粘附，形成恶性循环。

由于微管吸吮实验中微吸管半径限制在 1.0 ~ 1.5 μm 范围内，在小变形条件下，吸入微吸管内的是 PMN 细胞质及膜的小部分，不涉及 PMN 细胞核，因此细胞核对变形行为的影响可忽略 大鼠 PMN 膜表面有许多褶皱，当吸入长度小于微管半径时，PMN 膜对变形行为的影响很小。由此推断，小变形微吸管吸吮实验结果主要反映了 PMN 细胞质的生物力学特性，尤其是 PMN 细胞骨架网络结构[7,8]。

本实验结果显示急性缺氧时大鼠 PMN 粘弹性系数明显增大，可能预示着大鼠 PMN 骨架蛋白的某种变化。由于缺氧引起机体一系列生理生化改变，大量生物活性物质的释放会直接活化 PMN，使 PMN 细胞质中微丝聚合，微管组装，Chien 等[9] 的研究发现，用秋水仙素和细胞松弛素 B 分别处理 PMN，以破坏细胞质中的微丝和微管结构的完整性，结果使 PMN 粘弹性系数 K_1、K_2 和 μ 均显著性减小，这些结果表明微丝和微管在 PMN 生物力学特性方面，起着重要作用。有理由相信，缺氧时 PMN 细胞骨架结构的改变可能是 PMN 粘弹性发生改变的根本原因。

研究结果提示，慢性缺氧时大鼠 PMN 的粘弹性系数 K_1、K_2 和 μ 进一步显著增大，最大变形长度和初始变形长度进一步减小，可能是慢性缺氧时机体改变的血浆环境继续对 PMN 活化的结果，使 PMN 进一步被激活所致。但我们同时发现，慢性缺氧时 PMN 的时间蠕变常数有了明显的增大，与对照组已无显著性差异，这是否是 PMN 适应缺氧环境的表现，是否意味着急、慢性缺氧 PMN 细胞骨架系统存在结构的差异，这些问题还有待进一步分析。我们相信对此机制的深入研究有助于深入理解 PMN 在机体习服适应缺氧环境的过程中所起的作用。

参考文献：

[1] Nagatomi R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function [J]. Exerc Immunol Rev, 2006, 12:54 - 71.

[2] Goldenberg D T, Holland G N, Cumberland W G, *et al*. An assessment of polymorphonuclear leukocyte rigidity in HIV-infected individuals after immune recovery [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(6):1857 - 1861.

[3] Zhang G, Gao Y Q, Liu F Y. Efects of acute and chronic hypoxia on the rheological properties of leukocytes in rat microcirculation [J]. 中国临床康复杂志, 2004, 8(21):4361 - 4363.

[4] 李 鹏,邢 杰. 中性粒细胞的分离与纯化[J]. 医学理论与实践, 2005, 18(3):272 - 275.

[5] 张 钢,龙 勉,吴泽志. 肝细胞和肝癌细胞粘弹性的对比研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(6):751.

[6] 张 钢,高钰琪,张 璐. 缺氧对大鼠血液流变学特性的影响[J]. 重庆医学,2006,35(17):1574 - 1576.

[7] Zhang G, Long M, Wu Z Z, *et al*. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(2):243 - 246.

[8] Wu Z Z, Zhang G, Long M, *et al*. Comparison of the viscoelastic properties of normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells under cytoskeletal perturbation [J]. Biorheology, 2000, 37(4):279 - 290.

[9] Chien S, Sung K L. Effect of colchicine on viscoelastic properties of neutrophils [J]. Biophys J, 1984, 46(3):383 - 386.

（编辑 薛国文）

（上接 45 页）

2 讨论

汗斑原名花斑癣，是由糠秕孢子菌侵犯皮肤角质层所致的一种慢性、无症状或症状轻微的浅部真菌病，典型的临床原发损害为斑疹，小如针尖，大如黄豆，圆形或不规则，常有色素异常性改变，可呈肤色、浅白色、灰色、褐色等，上覆少量极细的糠状鳞屑。皮疹好发躯干皮脂腺丰富部位，主要分布于胸、背、颈部、逐渐蔓延至肩部、上臂、腋窝，腹部、会阴、臀部也可受累。一般无自觉症状，部分患者微痒，出汗后加重[1]。

不同于多数汗斑的典型表现，本例患者皮疹以丘疹为主，且大小均匀，分布均匀，由于皮损表现特殊，临床少见，因此极易误诊。但根据患者病史，发病部位、真菌直接镜检及组织病理结果，汗斑诊断成立。给予外用复方间苯二酚、酮康唑洗剂等治疗，1 周后患者复诊，皮损明显消退。因此，临床中遇到此类皮损，应该想到这种特殊表现的汗斑[3]。

关键词：花斑癣；真菌
中图法分类号：R758.24 文献标识码：B

参考文献：

[1] Bouassida S, Boudays S, Ghorbel R, *et al*. Pityriasis versicolor in children: a retrospective study of 164 cases[J]. Ann Dermatol Venereol, 1998, 125(9):518.

[2] 秦启贤. 临床真菌学[M]. 第 3 版. 上海：上海医科大学出版社, 2001:58 - 61.

[3] 王天祥,刘桂峰,王小崇. 酮康唑搽剂治疗花斑癣 82 例疗效观察[J]. 郑州大学学报(医学版),39(2):340 - 341.

（编辑 郭建秀）