DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.002
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
378 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0378-04

# 大鼠单核/巨噬细胞功能异质性及其在创伤-失血后免疫紊乱中的意义

尹华华[1],朱京慈[1],顾长国[2],马 铮[3],胡承香[2],李 磊[2] (第三军医大学:[1]护理系,重庆 400038,大坪医院野战外科研究所:[2]第一研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,[3]全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨单核/巨噬细胞功能异质性与创伤后免疫紊乱的关系。方法 健康Wistar大鼠48只,分为正常对照组、创伤-失血后1,4,7 d组,以无色孔雀绿比色法及流式细胞仪分别测定不同部位单核/巨噬细胞非特异性吞噬功能及I-A抗原的表达。结果 ① 生理状态下,肺泡巨噬细胞(AM)非特异性吞噬功能最强,腹腔巨噬细胞(PM)次之,单核细胞(Mo)最弱。PM高表达I-A,而AM及Mo表达量较低。②创伤-失血后大鼠单核/巨噬细胞非特异性吞噬功能均下降,但各部位变化具有差异性。AM降低最为显著,且持续时间长,而PM受影响较小。创伤-失血后大鼠单核/巨噬细胞I-A抗原表达变化各异,PM伤后持续处于较低水平,而AM在伤后4、7 d出现升高。结论 生理状态下单核/巨噬细胞功能及表型存在异质性,创伤-失血后这种异质性表现更为明显,并很可能为导致创伤后免疫功能紊乱的重要原因。

关键词:单核/巨噬细胞;异质性;吞噬功能;I-A;免疫紊乱
中图法分类号:R392.12;R442.7;R641.02 文献标识码:A

## Functional heterogeneity of monocytes/macrophages and its significance in immune dysfunction after trauma-hemorrhage in rats

YIN Hua-hua[1], ZHU Jing-ci[1], GU Chang-guo[2], MA Zheng[3], HU Cheng-xiang[2], LI Lei[2] ([1]Department of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research; [3]Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital, 400042, China)

**Abstract**: Objective To investigate the relationship between the functional heterogeneity of monocytes/macrophages and the immune dysfunction after severe trauma. Methods A total of 48 healthy Wistar rats were divided into control group and post-trauma-hemorrhage group. The non-specific phagocytotic abilities and the expression of I-A of differently distributed monocytes/macrophages were evaluated by benzaldehyde green assay and flow cytometry, respectively. Results (1) In the control group, alveolar macrophages (AM), peritoneal macrophages (PM), monocytes (Mo) showed a great functional difference in phagocytosis and expression of I-A; (2) After trauma-hemorrhage, the nonspecific phagocytotic ability of AM, PM, and Mo isolated from the injured rats declined significantly, but that of AM decreased most significantly and lasted longer. The changes of I-A antigen expression of monocytes/macrophages after trauma-hemorrhage varied. The nonspecific phagocytotic ability of PM remained at a very low level after trauma, but that of AM began to increase at 4 and 7 d after trauma. Conclusion There is phenotypic and functional heterogeneity of monocytes/macrophages under normal condition. The heterogeneity is more obvious after trauma-hemorrhage, which may play an important role in the immune dysfunction and the development of complications after trauma.

**Key words**: monocyte/macrophage; heterogeneity; phagocytosis; I-A; immune dysfunction

严重创伤后机体抗感染免疫防御机能降低或过度炎症反应都可能导致创伤并发症的发生。现有的研究证实,无论是采用提高免疫功能的手段或抗炎措施,对创伤后继发性损伤的防治都没有显著的效果,表明目前对机体创伤后免疫系统调控机制的认识还不完善。

单核/巨噬细胞在启动天然免疫和获得性免疫中具有关键作用,是调控免疫反应的主要细胞成分之一。大量的研究表明,即使在生理状态下不同部位来源的单核/巨噬细胞在表型和功能上都呈现明显的异质性[1,2]。这种异质性在创伤后免疫紊乱的发生发展中

作者简介:尹华华(1974-),女,重庆市人,硕士,护师,主要从事创伤免疫及创伤护理方面的研究 电话:(023)68753940
通信作者:李 磊,电话:(023)68757431,E-mail:leili@cta.cq.cn
收稿日期:2003-10-23;修回日期:2004-01-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

具有怎样的地位,目前尚不清楚。本实验采用大鼠创伤-失血模型,探讨了创伤后单核/巨噬细胞功能异质性与机体免疫功能紊乱的关系及其意义。

## 1　材料和方法

### 1.1　大鼠单核/巨噬细胞的分离、纯化及鉴定

1.1.1　大鼠单核/巨噬细胞的分离及纯化　　参照文献[3]的方法分离外周血单核细胞;参照 Debra 等[4]的方法,分离腹腔巨噬细胞;参照 Sebring 等[5]的方法,分离肺泡巨噬细胞。贴壁法纯化分离的单核/巨噬细胞。

1.1.2　单核/巨噬细胞鉴定　　台盼蓝染色鉴定细胞活力;瑞氏染色进行形态学鉴定;免疫细胞化学进行特异性表型 ED-1 表达的鉴定。

### 1.2　动物分组及创伤-失血模型的制作

参照 McCarter[6]的方法,略有改进。简述如下:

健康 Wistar 大鼠 48 只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量(200±20) g,雄性。随机分为正常对照组、创伤-失血后 1、4、7 d 组,每组 6 只(分别测定两个功能,每个功能用大鼠 24 只)。

采用乙醚加 10% 氯胺酮复合麻醉状态下双后肢闭合性砸伤、双后肢粉碎性骨折及股静脉失血模型。即将鼠后肢固定于撞击模型架撞击筒下(撞击筒为 20 cm 高度),200 g 砝码自由垂直落下,双后肢分别砸击 10 次;咬钳致双后肢粉碎性骨折(X 线片证实);无菌状态下暴露左股静脉,头皮针穿刺抽血。按大鼠血容量占体质量的 7.4% 计算,抽血量为体质量的 25%,抽血时间控制在 2 min 左右;加压止血,消毒后缝合皮肤;放鼠回笼,常规予水及食物;未采取特殊的复苏措施。大体观察见砸击及咬钳致骨折后大鼠双后肢肿胀、淤血,皮肤无破损。伤后即刻存活率为 100%,伤后 7 d 死亡率约为 31%。

### 1.3　吞噬功能的测定

采用无色孔雀绿比色法[7],略有改进。

### 1.4　I-A 抗原表达测定

参照文献[3]的方法。

### 1.5　统计学处理

所得实验数据采用单因素方差分析及重复测量试验的方差分析。

## 2　结果

### 2.1　单核/巨噬细胞鉴定

2.1.1　细胞活性检测　　台盼蓝染色显示细胞活力> 95%。

2.1.2　细胞形态观察　　初步分离出的单核细胞、肺泡及腹腔巨噬细胞贴片 120 min 后,在倒置显微镜下观察,细胞透明度高,折光性强。经瑞氏染色后观察,各种贴壁细胞大小不一,其中以肺泡巨噬细胞体积最大,并且伸出明显突起,腹腔巨噬细胞次之,外周血单核细胞体积较小。

2.1.3　免疫细胞化学鉴定　　贴壁细胞经大鼠单核/巨噬细胞特异性 ED-1 单抗进行免疫细胞化学染色,染色阳性的细胞呈棕黄色,通过计数,得出经纯化后的外周血单核细胞、腹腔及肺泡巨噬细胞纯度> 90%。

### 2.2　大鼠各部位单核/巨噬细胞吞噬功能及 I-A 表达差异

生理状态下,AM 非特异性吞噬功能最强,与 PM 及 Mo 比较有非常显著差异($P<0.01$);而 PM 与 Mo 并无显著性差异($P=0.065$)。PM 高表达 I-A,与 AM 及 Mo 相比有非常显著差异($P<0.01$),而 AM 及 Mo 表达量较低,无显著性差异,见表 1。

表 1　大鼠 AM、PM、Mo 吞噬功能及 I-A 表达差异($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Different abilities in phagocytosis and expression of I-A on AM, PM, and Mo in rats ($\bar{x}\pm s$)

| | Phagocytosis (OD) | I-A (%, $\bar{x}\pm s$) |
|---|---|---|
| AM | 0.225 3±0.028 7 | 25.6±5.2 ** |
| PM | 0.096 7±0.029 2 ** | 72.6±11.9 |
| Mo | 0.067 8±0.014 6 △△ | 31.4±9.4 ▲▲ |

**: $P<0.01$, *vs* PM; △△: $P<0.01$, *vs* Mo; ▲▲: $P<0.01$, *vs* Mo

### 2.3　创伤-失血后大鼠 AM、PM、Mo 非特异性吞噬功能的变化

创伤-失血后大鼠 AM、PM、Mo 非特异性吞噬功能均下降,AM 伤后变化与 PM 及 Mo 有非常显著差异($P<0.01$),PM 及 Mo 伤后变化也有非常显著差异($P<0.01$)。

AM 下降最明显,创伤-失血后 1、4、7 d 与对照组比较均有非常显著差异($P<0.01$),分别下降了 67.8%、74.4%、35.6%;PM 在创伤-失血后 1 天降低非常显著($P<0.01$),下降了 60.2%,第 4 天开始恢复,仅下降了 15.9%,第 7 天恢复至正常水平;Mo 在创伤-失血后 1、4 d 明显降低($P<0.01$),分别下降了 41.4%、58.7%,第 7 天恢复至对照组以上水平,上升 9.1%。但与对照组相比无统计学差异($P>0.05$),见表 2。

表 2　创伤-失血后大鼠 AM、PM、Mo 非特异性吞噬功能的变化(OD 值, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of nonspecific phagocytotic abilities of AM, PM, and Mo after trauma-hemorrhage (OD, $\bar{x}\pm s$)

| Group | AM | PM | Mo |
|---|---|---|---|
| Control | 0.225 3±0.028 7 | 0.096 7±0.029 2 | 0.067 8±0.014 6 |
| TH 1 d | 0.074 7±0.011 8 ** | 0.038 5±0.013 8 ** | 0.039 7±0.008 9 ** |
| TH 4 d | 0.057 7±0.009 3 ** | 0.081 3±0.018 4 | 0.028 0±0.010 9 ** |
| TH 7 d | 0.145 0±0.033 4 ** | 0.096 8±0.018 1 | 0.074 0±0.010 3 |

TH: Trauma-hemorrhage; **: $P<0.01$ *vs* control

### 2.4　创伤-失血后大鼠 AM、PM、Mo I-A 抗原表达变化

AM、PM 及 Mo I-A 抗原表达在创伤-失血后的变化有非常显著差异($P<0.01$)。

创伤-失血后 1 天,AM、PM、Mo I-A 抗原表达均显著下降($P<0.01$),分别下降了 68.4%、76.3%、77.4%;伤后 4 d PM、Mo 仍处于低水平,与各自对照组比较有非常显著差异($P<0.01$),分别下降了 43.1%、60.2%,而 AM 较对照组上升了 28.9%;伤后 7 d PM 仍未恢复正常,与对照组相比有非常显著差异($P<0.01$),下降了 26.6%,Mo 基本恢复正常,AM 显著上升($P<0.01$),上升了 103.9%,见表 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 创伤-失血后大鼠 AM、PM、Mo I-A 抗原表达的变化（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Changes of expression of I-A on AM, PM, and Mo after trauma-hemorrhage（%，$\bar{x}\pm s$）

| Group | AM | PM | Mo |
|---|---|---|---|
| Control | 25.6±5.2 | 72.6±11.9 | 31.4±9.4 |
| TH 1 d | 8.1±3.4** | 17.2±3.1** | 7.1±3.4 |
| TH 4 d | 33.0±6.4 | 41.3±7.9** | 12.5±3.2** |
| TH 7 d | 52.2±9.2** | 53.3±10.5** | 30.6±9.5 |

TH: Trauma-hemorrhage; **: $P<0.01$ *vs* control

## 3 讨论

目前有关创伤后免疫功能紊乱发生机制的研究大多集中于淋巴细胞，有关单核/巨噬细胞在创伤后天然免疫和获得性免疫功能抑制中的作用则重视不够。此外，虽国外学者早在 20 世纪 70 年代就开始了不同部位来源的单核/巨噬细胞功能异质性的研究，近年来还发现多种疾病与不同亚群的巨噬细胞相关[8]，但这种异质性在创伤后免疫功能紊乱中的地位并不十分明确，国内也无相关报道。

单核/巨噬细胞对外来抗原及自身异常成分的吞噬、消化和清除对维持机体内环境相对稳定具有重要作用，吞噬功能是巨噬细胞发挥天然免疫防御机能的重要保证。此外，单核/巨噬细胞还可作为抗原递呈细胞参与获得性免疫反应。单核/巨噬细胞的抗原呈递能力与其表面分子 MHC-Ⅱ、B7-1 和 B7-2 表达量呈正相关[9]。而创伤后降低的抗原递呈能力与 MHC-Ⅱ类分子表达的下降相一致[10]。因此，本研究采用无色孔雀绿比色法及流式细胞仪分别测定了单核/巨噬细胞非特异性吞噬功能及 I-A 抗原表达，反映了单核/巨噬细胞吞噬及抗原递呈能力的差异及变化。

本研究结果显示，生理状态下，AM 显示出最强的非特异性吞噬功能，PM 次之，Mo 最弱。而 PM 高表达 I-A，AM 及 Mo 表达量较低。说明不同部位单核/巨噬细胞吞噬能力及 I-A 表达各异，可能与它们所暴露的微环境、不同的细胞结构、接受的不同刺激信号及所处的不同分化发育阶段有关。最近研究[11]提示，基因的选择性表达可能是不同部位单核/巨噬细胞表现出功能异质性的重要原因。

我们还发现，创伤-失血后大鼠 AM、PM、Mo 的非特异性吞噬功能均下降，但程度不一，持续时间与恢复情况也不一致。AM 降低最为显著，且持续时间长，而 PM 受影响较小。同时，I-A 抗原表达变化各异，PM 伤后持续处于较低水平，而 AM 在伤后 4、7 d 出现升高。

肺泡巨噬细胞是对呼吸道吸入物质、微生物进行处理的第一道防线，因此，其吞噬活性的严重受损很容易导致肺局部免疫防御机能下降，伤后肺部易于罹患感染可能与之有关。腹腔巨噬细胞吞噬功能虽在伤后早期有所下降，但程度较轻，恢复较快，说明伤后腹腔巨噬细胞天然免疫反应受影响较小。单核细胞吞噬活性在伤后也明显减弱，至第 7 天才开始恢复。说明创伤后机体整体的天然免疫防御机能创伤早期也受到严重影响，并持续至少达 4 d。

伤后早期，各部位单核/巨噬细胞 I-A 抗原表达均显著下降，说明创伤早期即出现单核/巨噬细胞抗原递呈功能严重受损。PM 伤后 1～7 d 均处于较低水平，并持续达 7 d 以上，较单核及肺泡巨噬细胞受到更为严重的影响，因此很可能创伤-失血后腹腔巨噬细胞抗原递呈受抑更为明显。而大多数研究表明在创伤、失血性休克、烧伤等情形下 AM I-A 抗原表达下降，与本研究结果有一定差异。

创伤-失血早期，各部位单核/巨噬细胞吞噬功能及 I-A 表达均下降，与创伤打击有关[12]。后期出现不同变化则可能源于其不同的细胞类型、不同信号通路的激活及不同功能亚群的转换[13]。肺泡巨噬细胞 I-A 抗原在伤后 4 d 及 7 d 表达的上升则很可能是机体对过低的吞噬功能一种代偿及反馈调节。

综上所述，在生理状态下，肺泡巨噬细胞、腹腔巨噬细胞及单核细胞功能异质，创伤后肺泡巨噬细胞吞噬活性降低最为明显，腹腔巨噬细胞则以抗原呈递能力减弱为主要表现，而外周血单核细胞则可见吞噬活性及抗原呈递功能均减弱。表明，不同部位巨噬细胞对创伤所产生的反应性是不相同的，由此提示巨噬细胞存在着不同的功能亚群，其在创伤后的反应性存在明显差异，单纯以某一部位所获取的巨噬细胞并不能反映机体单核/巨噬细胞所表现出的功能状况。不同的巨噬细胞功能亚群对创伤产生的反应差异性很可能就是诱导创伤后免疫功能出现双向性紊乱的主要原因，有待于进一步研究。

（致谢：感谢大坪医院野战外科研究所第一研究室吕凤林副研究员、第七研究室周萍实验师及脑外科邹咏文教授、许民辉主任、朱万莉护士长在实验过程中的大力支持！）

参考文献：

[1] Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, *et al*. Phenotypic and functional characterization of normal rat pleural macrophages in comparison with autologous peritoneal and alveolar macrophages[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20(1): 135－142.

[2] Laskin D L, Weinberger B, Laskin J D, *et al*. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(2): 163－170.

[3] 沈关心. 现代免疫学实验技术[M]. 第 2 版. 武汉：湖北科学技术出版社，2002. 234－235, 377－379.

[4] Debra L, Laskin, Andrea A. *et al*. Functional and biochemical properties of rat kuffer cells and peritoneal macrophages[J]. J Leukoc Biol, 1988, 44

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(2): 71－78.
[5] Sebring R J, Lehnert B E. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes[J]. Exp Lung Res, 1992, 18(4): 479－496.
[6] McCarter M D, Mack V E, Daly J M, *et al*. Trauma-induced alterations in macrophage function[J]. Surgery, 1998, 123(1): 96－101.
[7] 李　磊, 王正国, 胡承香, 等. 创伤血清异常蛋白对巨噬细胞功能作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(8)492－494.
[8] Kapinsky M, Torzewski M, Buchler C, *et al*. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(＋) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(6): 1004－1010.
[9] Henry F, Bretaudeau L, Barbieux I, *et al*. Induction of antigen presentation by macrophages after phagocytosis of tumour apoptotic cells[J]. Res Immunol, 1998, 149(7-8): 673－679.
[10] Ayala A, Perrin M M, Chaudry I H. Defective macrophage antigen presentation following haemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens[J]. Immunology, 1990, 70(1): 33－39.
[11] Hashimoto S, Suzuki T, Dong H Y, *et al*. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages[J]. Blood, 1999, 94(3): 837－844.
[12] Kelly C J, Gallagher H, Wolf B A, *et al*. Alterations in macrophage signal transduction pathways mediate post-traumatic changes in macrophage function[J]. J Surg Res, 1994, 57(1): 221－226.
[13] Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, *et al*. $CD14^+CD16^+$ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies[J]. Scand J Immunol, 2002, 55(6): 629－638.

(编辑　栾　嘉)

文章编号: 1000-5404(2004)05-0381-01

# 个案与短篇

# 血清乙型肝炎病毒核酸定量与肝损伤及干扰素应答的关系

# Relationship of hepatitis B virus DNA level with liver damage and the response to interferon

和振坤　(河南大学淮河医院感染科, 洛阳 475000)

作者应用干扰素治疗慢性乙型肝炎44例, 并于治疗前后采用聚合酶联免疫实验方法, 检测HBV-DNA 拷贝数, 探讨血清乙型肝炎病毒核酸定量与肝损伤及干扰素应答的关系, 现报告如下。

## 1　对象与方法

### 1.1　对象

44 例均 HBV-DNA 阳性, 丙氨酸转氨酶(alanine amnotransferase, ALT)升高, 病史 6 个月以上, 排除其他已知原因的慢性肝病患者, 其中男 32 例, 女 12 例, 年龄 18～50 岁。按照 1995 年第 5 次全国传染病和寄生虫病会议修订的诊断标准。

### 1.2　方法

①HBV-DNA 定量检测: 血清样本提取核酸模板, 然后以定量 PCR 检测 HBV-DNA 拷贝数。②治疗方法: 给予干扰素 α-2 b (安达芬) 300 万 U 肌肉注射, 每周 3 次, 治疗 6 个月为 1 个疗程。停药后随访 6 个月。③应答反应: 生化应答, 血清 ALT 恢复到正常水平; 病毒应答, 血清 HBV-DNA 滴度$< 1\times 10^4$ 拷贝/ml; 完全应答, 同时表现为生化和病毒应答。

### 1.3　统计学方法

采用 $\chi^2$ 检验、$t$ 检验。

## 2　结果

44 例患者治疗前后 HBV-DNA 含量检测结果见表 1。

表 1　44 例患者治疗前后 HBV-DNA 含量的变化

| | HBV-DNA 含量(拷贝/ml) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $<1\times 10^5$ | $\geqslant 1\times 10^6$ | $\geqslant 1\times 10^7$ | $1\times 10^8$ | 均值($1\times 10^5$) |
| 治疗前 | 0 | 15 | 20 | 9 | 88.42±12.34 |
| 治疗后 | 23 | 11 | 6 | 4 | 5.40±1.59 |

治疗后血清 HBV-DNA 水平与干扰素应答的关系见表 2。

表 2　血清 HBV-DNA 水平与干扰素应答的关系

| 病毒含量(拷贝/ml) | 例数 | 治疗前 6 个月 | | | 治疗后 6 个月 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 生化应答 $n$ (%) | 病毒应答 $n$ (%) | 完全应答 $n$ (%) | 生化应答 $n$ (%) | 病毒应答 $n$ (%) | 完全应答 $n$ (%) |
| $<1\times 10^5$ | 23 | 23(100.0) | 18(78.2) | 18(78.2 | 18(78.2) | 14(60.8) | 14(60.8) |
| $>1\times 10^5$ | 21 | 16(76.2) | 14(66.2) | 13(61.9) | 12(59.6)△ | 8(38.1)△ | 7(33.3)△ |
| 合计 | 44 | 39(88.6) | 32(72.7) | 31(70.4) | 30(68.2) | 22(50.0) | 21(47.7) |

△: 与治疗前 6 个月比较, $P<0.01$

作者简介: 和振坤(1964－), 男, 河南省开封市人, 副主任医师, 发表论文 16 篇。电话: (0378)3154860

收稿日期: 2004-01-09; 修回日期: 2004-02-20

(下转 385 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net