DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.004
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
1026 2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1026-03

大鼠创伤-失血性休克后腹腔巨噬细胞功能受损与百日咳毒素敏感的G蛋白的关系

刘靖华[1],陈惠孙[2],胡德耀[2],刘良明[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院麻醉科,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨创伤-失血性休克后巨噬细胞功能受损的机制。方法 以大鼠创伤(右后肢骨折)-失血性休克[(35±5)mmHg(4.67±0.667 kPa),维持60 min]为模型,分别在创伤-失血性休克后1、3 d收集腹腔巨噬细胞,用不同浓度(10 ng/ml,100 ng/ml)的百日咳毒素(Pertussis toxin,PTX)或霍乱毒素(Cholera toxin,CTX)预处理后,测定巨噬细胞的MHC-Ⅱ类抗原表达能力及TNF-α的释放水平。结果 创伤-失血性休克后巨噬细胞MHC-Ⅱ类抗原表达降低,TNF-α的释放减少;PTX预处理后,巨噬细胞的MHC-Ⅱ类抗原表达及TNF-α释放均增加;CTX预处理对巨噬细胞的功能无明显影响。结论 PTX敏感的G蛋白可能参与了对创伤-失血性休克后巨噬细胞抗原提呈能力及TNF-α释放的抑制作用。

关键词:创伤;失血性休克;巨噬细胞;G蛋白
中图法分类号:R392.2;R605.971;R641 文献标识码:A

The relationship of functional damage of peritoneal macrophages after traumatic-hemorrhagic shock and pertussis toxin-sensitive G-protein

LIU Jing-hua, CHEN Hui-sun, HU De-yao, LIU Liang-ming (Department of Anesthesia, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of the damage of peritoneal macrophage function following traumatic-hemorrhagic shock. Methods Peritoneal macrophages were harvested at the first and third day after the establishment of rat model with closed bone fracture and hemorrhagic shock (arterial blood pressure (35±5) mmHg for 60 min). The macrophages were pretreated with pertussis toxin (PTX) or cholera toxin (CTX) at the concentration of 10, 100 ng/ml respectively. The expression of major histocompatibility complex class Ⅱ (MHC Ⅱ) antigen in the cells and the release of TNF-α from the cells were determined. Results The expression of MHC Ⅱ antigen was decreased in the peritoneal macrophages, and TNF-α had a declined release from them following traumatic-hemorrhagic shock. The PTX pretreatment enhanced the expression of MHC-Ⅱ antigen and TNF-α release while the CTX pretreatment had no effect on these two subjects. Conclusion PTX-sensitive guanine-nucleotide-binding protein (G-protein) might participate in the presentation of macrophage antigen and the inhibition of TNF-α release following traumatic-hemorrhagic shock.

Key words: trauma; hemorrhagic shock; macrophage; guanine-nucleotide-binding protein

巨噬细胞是体内主要的免疫调节细胞之一,在细胞和体液免疫反应的诱发、调节与表达过程中起重要的作用,其中抗原提呈和免疫活性因子的释放是巨噬细胞参与免疫调节的主要环节。研究表明,创伤-失血性休克后机体的免疫功能处于紊乱状态,巨噬细胞的免疫功能受损[1],机体的防御能力下降,使机体倾向于脓毒症和感染的发生。目前关于创伤-失血性休克后

作者简介:刘靖华(1965—),女,陕西省富平县人,博士,主治医师,主要从事休克与免疫方面的研究,发表论文11篇,现在第一军医大学病理生理学教研室工作,广州 510515。电话:(022)86648232

收稿日期:2000-01-26;修回日期:2000-08-29

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

巨噬细胞功能受损的原因尚不清楚。鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(Guanine-nucleotide-binding protein, G-protein), 简称 G 蛋白, 是偶联于细胞表面受体和细胞内效应器的桥梁, 是细胞外信息进入细胞内的门户, G 蛋白的水平及活性变化对维持和控制细胞正常状态都是非常重要的。本实验通过体外干预的方法探讨了 G 蛋白在创伤-失血性休克后巨噬细胞功能变化中的作用, 对深入了解创伤-失血性休克后免疫功能紊乱的发生机制具有极其重要的意义。

1　材料与方法

1.1　动物

Wistar 雄性大鼠, 体重 200~280 g, 由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2　模型

乙醚麻醉大鼠后, 分别经颈内动脉和颈外静脉插管。前者用于放血及监测血压, 后者用于复苏。插管完毕并待动物清醒后, 钳夹折断其右后肢(局部无明显出血), 然后经颈内动脉放血, 10 min 内使血压下降到(35±5)mmHg[(4.67±0.667)kPa]。维持 60 min 后复苏, 复苏液为失血及 2 倍于失血的林格氏液。

1.3　试剂

PTX 和 CTX 购自 Sigma 公司, ConA 和 LPS(*Escherichia coli*, 0111:B4)购自 Sigma 公司, OX_6 和 OX_{17}(分别为 FITC 和 PE 标记的小鼠抗大鼠 I-A 和 I-E 抗原的单克隆抗体)购自英国 Serotec 公司, TNF-α 检测试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室。

1.4　实验设计

将动物随机分为正常对照、伤后 1、3 d 3 个组, 每组 8 只。将动物以过量乙醚处死后, 无菌条件下分离并纯化腹腔巨噬细胞。将纯化的细胞分别用不同浓度(10 ng/ml、100 ng/ml)的百日咳毒素(PTX)或霍乱毒素(CTX)预处理 4 h, 然后按下述方法步骤测定各指标。

1.5　腹腔巨噬细胞的分离

过量乙醚处死大鼠, 腹腔内注入无菌预冷的 PBS 30~50 ml, 按摩腹部 1 min, 吸出腹腔液, 离心 1 000 r/min× 10 min, 用 RPMI-1640 培养液悬浮细胞, 于 37°C、5%CO_2 培养箱中培养 2 h, 洗去未贴壁细胞, 轻轻刮下贴壁的巨噬细胞, 调细胞浓度为 1×10^6/ml 备用。经瑞氏染色法鉴定 MΦ 细胞纯度> 90%; 台盼蓝染色, 细胞存活率> 95%。

1.6　腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ类抗原表达的测定[2]

取腹腔巨噬细胞悬液 3 ml, 分装在 3 支试管中, 1 ml/支, 加入 OX_6、OX_{17}(荧光素标记)各 10 μl/支, 4°C 避光放置 30 min, 其间混悬细胞 1 次。用 PBS 洗涤细胞 2 次, 上流式细胞仪进行测定。最后取 3 支平行管的平均值。

1.7　TNF-α 的测定

按试剂盒说明书操作。

1.8　统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 分别用 t 检验进行统计学处理。

2　结果

2.1　创伤-失血性休克对大鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响

与正常对照组相比, 创伤-失血性休克后 1 d 腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ类抗原表达减少, LPS 刺激引起的 TNF-α 释放减少($P<0.01$); 创伤-失血性休克后 3 d 巨噬细胞 MHC-Ⅱ类抗原表达及 TNF-α 释放有所增加, 但仍未恢复到正常对照水平, 见表 1。

表 1　PTX 对大鼠腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ类抗原表达及 TNF-α 释放的影响

Tab 1　Effect of PTX on the expression of MHC-Ⅱ antigen and release of TNF-α in rat

Group	PTX(ρ_B/ng·ml^{-1})	I-A(%)	I-E(%)	TNF-α(ρ_B/pg·ml^{-1})
Control	0	68.8±1.57	71.3±1.22	281.2±25.6
	10	71.5±2.09	74.5±2.87	332.0±27.1
	100	73.8±3.47	77.9±2.65$^{\&}$	372.2±21.4$^{\&}$
THS 1 d	0	38.3±5.99**	35.6±5.96**	130.7±10.2**
	10	45.9±7.30**	41.5±7.02**	144.8±9.6**
	100	56.2±4.06$^{**\&\&}$	51.6±3.93$^{**\&\&}$	163.0±5.7$^{**\&\&}$
THS 3 d	0	58.7±3.15	55.7±3.14	170.3±22.3
	10	62.38±2.39**	60.48±1.71**	190.0±25.8**
	100	67.13±2.88$^{**\&}$	65.30±1.82$^{**\&}$	244.2±36.6$^{**\&}$

THS: Trauma-hemorrhagic shock; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; &: $P<0.05$, &&: $P<0.01$ *vs* PTX 10 ng/ml group

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

2.2 百日咳毒素(PTX)体外预处理对大鼠创伤-失血性休克腹腔巨噬细胞免疫功能的影响

用不同浓度的 PTX 预处理巨噬细胞 4 h 后发现,PTX 可使正常和创伤大鼠巨噬细胞的 MHC-Ⅱ类抗原表达增强,TNF-α 释放增加,并呈剂量效应,见表 1。

2.3 霍乱毒素(CTX)体外预处理对创伤-失血性休克大鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响

CTX 体外预处理对巨噬细胞功能无明显影响(数据未列出)。

3 讨论

研究业已表明,创伤-失血性休克后机体的特异性和非特异性免疫功能均处于紊乱状态,使机体对感染的易感性和因感染而发生的死亡大为增加。但是目前对创伤-失血性休克后机体免疫功能紊乱的发生机制尚不清楚,因而缺乏有效的防治措施。巨噬细胞是体内主要的免疫调节细胞之一,在特异性和非特异性免疫功能中均发挥重要的作用。其中抗原提呈和免疫活性因子的释放是巨噬细胞参与免疫调节的主要环节。本研究发现,创伤-失血性休克后巨噬细胞的抗原提呈能力下降,腹腔巨噬细胞 TNF-α 分泌减少。目前研究认为,影响创伤和/或失血性休克后巨噬细胞抗原提呈能力及其活性因子分泌的主要因素除缺血、缺氧外,与一些前炎性介质如 PGE2、PAF、IL-8、IL-10 等释放增加有关[3];与应激状态下产生的一些具有免疫抑制作用的激素和神经肽如糖皮质激素、ACTH、雄激素、β-内啡肽等的释放增加有关[4~6]。但是何者为始动或关键因子很难判断。随着分子生物学和免疫学的飞速发展,人们了解到尽管参与免疫功能紊乱的介质繁多,但这些介质需要通过与膜受体结合后发挥作用,而大多数膜受体是与 G 蛋白相偶联。G 蛋白作用于其效应器如腺苷酸环化酶或离子通道引起第二信使如 cAMP、IP_3/DAG 和 Ca^{2+} 等变化,最终导致细胞功能的改变。因此 G 蛋白的活性和水平对维持细胞功能正常有重要作用,在创伤-失血性休克后 G 蛋白在巨噬细胞功能调控中的地位尚未见报道。

基于上述认识,本实验用 CTX 和 PTX 体外干预研究了 G 蛋白在巨噬细胞功能调节中的作用。CTX 和 PTX 均可与 G 蛋白亚基相结合并能催化其发生 ADP-核糖基化。所不同的是 CTX 可催化 NAD^+ 分子 ADP-核糖基转移到 Gsα 亚基的精氨酸残基上,使修饰后的 Gsα 失去 GTP 酶活性,而不能催化 GTP 水解为 GDP,结果 Gsα 被持续活化,使腺苷酸环化酶(AC)被长久刺激,细胞内 cAMP 水平大大升高。百日咳毒素可催化 Giα 进行核糖基化,使 G 蛋白与受体和效应器脱偶联,从而使 Gi 蛋白介导的抑制信息传递中断。本实验发现,无论是正常巨噬细胞还是创伤后的巨噬细胞均对 PTX 敏感,表现在巨噬细胞经 PTX 预处理后其 I-A、I-E 阳性细胞数明显增加,TNF-α 释放增多,并呈剂量效应;而 CTX 预处理对巨噬细胞的功能无明显影响。上述结果提示 PTX 敏感蛋白的 G 蛋白对巨噬细胞 MHC-Ⅱ类抗原分子表达、TNF-α 释放在生理和病理状态下均有调节作用(下调作用)。

Schwacha 等[7]发现,将烧伤小鼠的腹腔巨噬细胞用 PTX 预处理后 TNF-α 的释放增加,与本实验结果一致。但 PTX 敏感的 G 蛋白如何调节巨噬细胞对 TNF-α 的释放尚不清楚。关于 PTX 敏感的 G 蛋白参与对巨噬细胞 MHC-Ⅱ类分子表达的调节作用尚未见报道,有待于进一步的研究明确。

本实验结果为阐明创伤-失血性休克后免疫功能紊乱提供了新思路,同时也提示通过控制 G 蛋白的活性和水平有可能纠正免疫细胞的功能紊乱。

参考文献:

[1] 刘靖华, 陈惠孙, 胡德耀, 等. 创伤-失血性休克对机体免疫功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 81—84.

[2] Ayala A, Perrin M M, Chaudry I H. Defective macrophage antigen presentation following hemorrhage is associated with the loss of MHC class II(Ia) antigens[J]. Immunology, 1990, 70(1): 33—38.

[3] Ayala A, Ertel W, Chaudry I H. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocomptibility class II antigen complex in leukocytes[J]. Shock, 1996, 5(2): 79—90.

[4] Celada A, Mckercher S, Maki R A, *et al*. Repression of major histocompatibility complex I-A expression by glucocorticoids: The glucocorticoid receptor inhibits the DNA binding of the X box DNA binding protein[J]. J Exp Med, 1993, 177(3): 691—698.

[5] Khansari D N, Murgo A J, Faith R E. Effect of stress on the immune system[J]. Immunol Today. 1990, 11(2): 170—175.

[6] Angele M K, Ayala A, Monfils B A, *et al*. Testosterone and/or low estradiol: Normally requried but harmful immunologically for males after trauma-hemorrhage[J]. J Trauma, 1998, 44(1): 78—85.

[7] Schwacha M G, Somers S D. Thermal injury induces macrophage hyperactivity through pertussus toxin-sensitive and insensitive pathways[J]. Shock, 1998, 9(4): 249—255.

(编辑 潘式文)

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