DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.005

烟雾吸入性损伤血清对 PMN粘附的影响*

罗奇志** 杨宗城 杨天德 罗 勤 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,400038

提 要 目的:通过大鼠烟雾吸入伤血清体外刺激培养的内皮细胞和中性粒细胞(PMN),了解 PMN粘着的变化,以及抗 CD11a、抗 CD11b和抗 ICAM-1对 PMN粘着的影响,探讨粘附因子在烟雾吸入性损伤中的作用。方法:在体外实验中用荧光标记 PMN,测定 PMN与烟雾吸入性损伤血清刺激的内皮细胞的粘着率,并采用抗体阻断技术,测定了粘附因子 CD11a、CD11b和 ICAM-1在 PMN粘着的作用。结果:吸入伤血清能使粘着率增高,12~24 h是正常时的 3倍多,PMN的内皮细胞粘附因子抗体(抗 CD11a、抗 CD11b和抗 ICAM-1)减少 PMN与内皮细胞粘着率(44%、55%和 51%)。结论:烟雾吸入伤血清能增加 PMN的粘着,其可能是 PMN浸润的病理基础,进一步研究证明,粘附因子 CD11a、CD11b和 ICAM-1在 PMN浸润过程中起重要作用,而且浸润的中性粒细胞释放氧自由基和蛋白酶能导致进一步的肺组织损害。

关键词 吸入性损伤;细胞培养;中性粒细胞;粘着率
中图法分类号 R644;R331.142

一侧肺烟雾吸入可造成另一侧肺损伤,说明烟雾吸入只是始动因素,后续的肺组织损伤则是肺功能衰竭的基础。近年来的研究表明宿主自身免疫系统介导的肺泡毛细血管膜的损害是组织损害的中心环节[1],这个环节一定程度上依赖粘附因子介导的激活的白细胞粘着到内皮和迁移入肺间质产生一种微环境,在这一环境中,白细胞释放毒性产物如反应性氧化剂代谢产物和蛋白酶导致组织损害[2]。本实验通过烟雾吸入伤体外刺激培养内皮细胞和中性粒细胞,旨在了解中性粒细胞的粘着变化以及抗 CD11a、CD11b、细胞间粘附因子 1(ICAM-1)单克隆抗体的阻断作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠肺毛细血管内皮细胞的分离与培养

戊巴比妥钠 50 mg/kg(含肝素 4 000 u),腹腔注射麻醉清洁级 Wistar大鼠(第三军医大学动物所),重 180~200 g 在无菌操作条件下,打开腹腔,主动脉放血活杀,然后开胸并钳闭上、下腔静脉,左心室开口,右心室进针插入软导管至肺动脉,用肝素生理盐水(100 u/ml)冲净肺循环瘀血,用青霉素生理盐水灌洗肺脏,每次 10 ml共 8次,直至灌洗液清亮透明。夹闭肺静脉,肺动脉注入预温的 0.5%胰蛋白酶(Sigma)液 10 ml,将心肺完整地取出置无菌小烧杯内,37℃孵育 20 min,取远离肺门的边缘肺组织剪碎(大小约 1~2 mm^3),加小牛血清 3 ml终止反应,7℃恒温 150次/min振荡 10 min,细胞悬液经单层纱布及 50目、200目滤网过滤,用加有 10%小牛血清和 2 mmol谷氨酰胺的 M199培养液(Sigma)洗一次,调整细胞数为 10^6/ml,细胞接种于培养瓶中,37℃ 5% CO_2条件下孵育,4 h后将未贴壁的细胞接种于自制双孔培养板中(1 ml/孔)继续培养,次日换液轻轻吹打,弃去脱落细胞。大约 7~9 d完全融合,实验用融合 2 d的细胞进行。内皮细胞Ⅷ因子相关抗原染色鉴定阳性,纯度大于 90%。

1.2 人脐静脉内皮细胞的分离与培养[3]

无菌条件下将新鲜的脐带,用生理盐水冲净静脉瘀血,注入预温的 0.25%胰蛋白酶液 15 ml,37℃孵育 15 min,收集流出液,M199培养液洗一次,培养同上。

1.3 中性粒细胞(PMN)的分离[4]

用 3 ml含 EDTA-Na(1 mg/ml)和肝素(10 u/ml)的盐水注射器取正常献血者血 5~7 ml,加于密度=1.09及 1.07的 Percoll分层液(Sigma公司)上,2 000 r/min离心 20 min,收集中层的 PMN,加 5 ml的 0.85% NaCl,1 000 r/min离心 8 min,双蒸水溶解残留红细胞,2倍 Hanks液,取 20 μl悬液用 2%冰醋酸计数,调成(1.25~5)×10^6个/ml,2%台盼蓝染色检查细胞活力>95%,HE染色 PMN>98%。

1.4 烟雾吸入性损伤大鼠血清的制备[5]

按第三军医大学烧伤研究所烟雾吸入性损伤模型致伤大鼠,伤后 6 h乙醚麻醉,无菌条件下腹主动脉采血,分离血清 4℃保存。另取正常大鼠血,同上制备正常对照血清。

1.5 荧光标记的粒细胞粘附内皮细胞的测定[6]

粒细胞用无钙镁的 Hanks液洗 2次,调整细胞数为 10^7/ml,离心并重悬于 1 ml的 650 μmol/L的 5-(6)-carboxyfluresecein acetomethy lester(CFDA,Sigma公司)Hanks液,37℃孵育 15 min,加 Hanks液 10 ml终止标记,400×g离心 10 min洗 2次,待用,CFDA只染色活细胞。内皮细胞培养于自制的双孔培养板,该板用细胞培养皿裁成 1.2 cm×2.2 cm板,上粘一双 1.5 ml离心管裁成的 0.5 cm长圆管,略用力可将圆管掰下,待内皮细胞融合 2 d后,每孔加入(5~10)×10^5个 PMN,37℃孵育 1 h,轻轻吹打收集未粘附细胞,用培养液洗一次,一并收集,调整液体量为 2 ml,日立 F-3000型荧光分光光度计测荧光值(F_1),将圆管掰下培养板插入测定杯中,注意细胞面向激发光,加 2 ml盐水,计测荧光值(F_2),激发光波长 485 nm,发射光波长 530 nm。计算粘附的 PMN百分率。

粘着细胞百分率=F_1÷(F_1+F_2)×100%

1.6 抗体的阻断试验

内皮细胞与 1∶1 000稀释的鼠抗 ICAM-1-mAb(宝灵曼公司);PMN分别与 1∶200稀释的鼠抗人 CD11a-mAb或鼠抗人 CD11b-mAb(第四军医大学免疫学教研室)共同孵育 0.5 h,

* 国家自然科学基金重大课题资助项目,No.39290700-03
** 罗奇志,男,35岁,主治医师,博士

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

用 pH7.3 PBS洗 2次,再用作粘附实验。

1.7 统计学处理

采用四川医学院的 PEMS医用统计程序包,进行相关关系和方差分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 PMN与吸入伤鼠血清刺激内皮细胞粘着率的变化

实验显示人和鼠 PMN对大鼠吸入伤血清刺激人脐静脉和鼠肺血管内皮细胞粘着率,见表 1,随血清刺激时间的延长而逐渐增高,刺激 12 h粘着率达高峰,持续至 24 h不降;大鼠的 PMN对肺血管内皮细胞的粘着率与人 PMN对脐静脉内皮细胞的粘着率成正相关 ($r=0.956$, $P<0.01$)。

表 1 内皮细胞与 PMN粘着率的变化

Tab 1 Changes of rate of PMN adhesion to endothelial cell(EC) sheet

Index	Control	Serum irritating time (h)				
		1	3	6	12	24
The adhesion ratio of PMN to rat pulmonary endothelial cell(%)	9.54± 1.81	11.28± 1.78*	13.12± 4.09**	17.41± 1.70**	30.25± 2.83**	32.55± 3.15**
The adhesion ratio of PMN to human umbilical vein endothelial cell(%)	7.60± 1.25	14.0± 0.96**	17.2± 4.59**	24.9± 3.49**	34.0± 4.18	33.66± 3.36**

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* control

2.2 一些抗粘附因子单抗对人 PMN与内皮细胞粘着率的影响

用抗 CD11a抗 CD11b和抗 ICAM-1抗体都能降低粘着率,见表 2,分别达 44%、55%和 51%。

表 2 一些抗粘附因子单抗对人 PMN粘着率的影响

Tab 2 Effects of some monoclonal antibodies against adhesion rate of PMN

Groups	PMN adhesion rate(%)
Control	33.66± 3.36
Mouse anti-human CD11a	18.68± 1.64**
Mouse anti-human CD11b	14.82± 1.15**
Mouse anti-human ICAM-1	16.2± 1.41**

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

以往的研究发现,烟雾吸入性肺损伤肺组织的氧自由基(O_2^-、$HO^\cdot$)产生增多,氧自由基所致的脂质过氧化损害明显,肺组织中蛋白酶增多,是吸入性损伤后肺毛细血管通透性增高的重要原因,肺组织中氧自由基和蛋白酶增多,一方面是因为烟雾所含大量有害物质导致的炎症反应[7],另一方面与 PMN的浸润密切相关[8-10],但是关于烟雾吸入如何促使 PMN浸润的研究甚少。

烟雾吸入损伤后血清中存在众多的炎症因子,如 PAF LTB4 IL-1 TNF C3a C5a等,是继发性炎症过程中的重要因素[11],本实验应用体外细胞培养的方法,检测了烟雾吸入性损伤血清激活的肺血管内皮细胞与 PMN的粘着率,发现吸入伤血清能激活内皮细胞,使粘着率逐渐增高,峰值达正常时的 3倍多,表明吸入伤血清能促进 PMN与内皮细胞粘着。由于无抗大鼠粘附因子的相应抗体,所以改用人脐静脉内皮细胞与人 PMN实验,人 PMN与烟雾吸入伤血清刺激内皮细胞粘着率变化基本一致 ($r=0.956$, $P<0.01$),说明大鼠吸入性损伤血清也能激活人的内皮细胞和 PMN,增加内皮细胞与 PMN的粘着,满足进一步实验的要求。

炎症反应早期血流减慢,有利于 PMN的附壁,PMN沿血管内壁滚动;其表面的整合素(CD11a/CD18, CD11b/CD18)与激活的内皮细胞的粘附因子结合,首先是锚定——PMN与内皮细胞形成一种不牢固的结合,接着是粘着,这一过程是白细胞游走出血管的基础[12]。粘附因子在激活的内皮细胞表达或表达增加,竞争结合白细胞的能力上明显增强,表现在炎症组织中白细胞的量明显高于正常组织。在不同性质的炎症情况下,各种白细胞的整合素的质与量有差异,内皮细胞表达的粘附因子(ICAM-1 ICAM-2 ELAM-1 VCAM-1等)的质与量也不相同,这些差异决定了白细胞间和内皮细胞间竞争的性质,造成不同类型的炎症中所聚积的白细胞的种类的不相同。通过抗体阻断实验,发现抗 CD11a抗 CD11b和抗 ICAM-1分别能阻断 PMN与激活内皮细胞粘着率 44%、55%和 51%,提示粘附因子 CD11a CD11b和 ICAM-1在烟雾吸入性损伤 PMN粘着浸润中起重要作用。

本研究利用体外细胞培养、PMN粘着率和抗体阻断实验,在体外探讨烟雾吸入性损伤继发性炎症反

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

应的机制,表明烟雾吸入性损伤中含大量炎症介质的血清,能增加 PMN与内皮细胞粘附,促进 PMN在肺血管内皮细胞协同下游出血管,在这一过程中粘附因子 CD11a CD11b和 ICAM-1的增加起了重要作用.

参考文献

1 青 春,许伟石.中性粒细胞在成人呼吸窘迫综合征中的作用.国外医学:创伤与外科基本问题分册,1994,15(1):18

2 Kubo S, Matsumoto T, Mochida O, *et al*. Inhibition of chemiluminescence response of human polymorphonuclear leukocytes by three different stimulations in hyperosmotic condition comparable to the renal medulla. Ranal Failure, 1996,18(1):69

3 Bertrand Caix J, Freyburger G, Bordenave L, *et al*. Functional upregulation of granulocytes labeled with technetium-99m-HMPAO and indium-111-oxinate. J Nucl Med, 1996, 37(5):863

4 Chen X, Christou N V. Relative contribution of endothelial cell and polymorphonuclear neutrophil activation in their interactions in systemic inflammatory response syndrome. Arch Surg, 1996,131(11):1148

5 魏 泓,孙敬方,李双良,等.医学实验动物学.成都:四川科学技术出版社,1998.393~396

6 De Clearck L S, Bridts C H, Mertens A M, *et al*. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromeson cellular function. J Immunol Method, 1994, 172(1):115

7 谢尔凡,杨宗城.吸入性损伤国外研究进展.中华整形烧伤外科杂志,1997,13(4):297

8 Liu X S, Li A (Ngao), Yang Z C, *et al*. The role of toxic oxygen metabolites of neutrophil in canine smoke inhalation injury. Ann Medit Burns Club, 1993,6(2):193

9 冯中明,黎 鳌,杨宗城.自由基在大鼠烟雾吸入性损伤发病机制中的作用.中华整形烧伤外科杂志,1989,5(2):130

10 谢尔凡,黎 鳌,杨宗城.家兔烟雾吸入伤早期弹力蛋白酶-抗蛋白酶动态变化的实验研究.中华整形烧伤外科杂志,1989,5(4):289

11 Demling R, Ikegami K, Lalonde C. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant activity correspond with death after smoke exposure in the rat. J Burn Care Rehabil, 1995,16(2 pt1):104

12 Springer T A. Adehsion receptor of immune system. Nature, 1990,346(6 283):425

(收稿:1998-09-15;修回:1999-03-19)

(编辑 张大春)

Effects of smoke inhalation injury serum on the adhesion of polymorphonuclear neutrophils*

Luo Qizhi, Yang Zongcheng, Yang Tiande, Luo Qin, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of smoke inhalation injury serum (SIIS) on the adhesion of polymorphonuclear neutrophils (PMN), and the effects of anti CD11a, anti CD11b and anti ICAM-1 on the adhesion of PMN. Methods: Fluorescent assay and antibody blocking technique were used to determine the adhesion of PMN to cultured endothelial cells (EC) in the presence of the serum from the rats with smoke inhalation injury, and the effects of CD11a, CD11b and ICAM-1 on the adhesion. Results: SIIS promoted PMN adhesion to cultured EC. After being cultured with the serum for 12 to 24 h, PMN adhesion to cultured EC was 3 times more than that in the control. The anti-endothelial adhesion factors (anti CD11a, anti CD11b and anti ICAM-1) might reduce the adhesion rate (44%, 55% and 51%). Conclusion: SIIS can promote PMN adhesion, which might be the pathological basis for PMN infiltration. Futher studies suggested that the anti-endothelial adhesion factor might play an important role in the PMN infiltration and the infiltrated PMN could release oxygen radicals and protease causing damage to lung tissues.

Key words inhalation injury; cell culture; polymorphonuclear neutrophil; adhesion

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39290700-03

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net