DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.05.012

NO及 PGE_2在烧伤后巨噬细胞抑制脾淋巴细胞增殖反应中的作用*

罗高兴** 彭代智 黄文华 黎 鳌 刘 敬 周 新 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,400038

提 要 目的:探讨巨噬细胞在烧伤后免疫功能紊乱中的作用机制。方法:通过比色法及放免法分别测定体外小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中 NO及 PGE_2的含量,并通过在培养体系中加入消炎痛、L-精氨酸、NMMA等影响 PGE_2及 NO的产生,以同位素掺入法观察它们在烧伤后 PM抑制 Con A刺激的 SPL增殖反应中的作用。结果:烧伤早期巨噬细胞就具有产生大量 NO和 PGE_2的能力。在 PMΦ与 SPL共同培养中发现,烧伤后巨噬细胞能明显抑制 SPL的增殖,其抑制率高达 82.3%。消炎痛使抑制率下降到 62.3%,但 L-精氨酸能明显增强此抑制作用,而 NMMA能减弱此抑制作用,并且消炎痛与 NMMA有相互叠加的作用。结论:烧伤后巨噬细胞能通过产生 NO及 PGE_2而抑制机体的细胞免疫功能。

关键词 烧伤;巨噬细胞;NO;PGE_2;免疫紊乱
中图法分类号 R392.1;R644

烧伤后机体出现免疫功能紊乱,并最终表现为免疫抑制,特别是细胞介导免疫功能的下降,是严重烧伤后并发全身性感染,多器官功能紊乱乃至死亡的主要原因之一。但烧伤后免疫紊乱机制并不十分清楚。研究认为,烧伤活化的巨噬细胞(MΦ)可能在此过程中起着重要作用[1,2]。活化的 MΦ主要通过产生的多种生物活性介质如 PGE_2及 NO等而影响着机体的免疫功能[3,4]。本研究以严重烧伤小鼠为模型,探讨了烧伤后腹腔 MΦ(PMΦ)产生 PGE_2和 NO的情况以及它们对 Con A刺激的脾淋巴细胞增殖反应的影响。

1 材料与方法

1.1 致伤与分组

按本室已建立的方法[1],将体重约 25 g的昆明种小鼠致成背部 18% TBSAⅢ度烫伤。实验分烧伤后 PMΦ产生 NO及 PGE_2的变化及 PMΦ对 Con A刺激的淋巴细胞增殖反应的影响两部分。前者按伤后不同时相点分为伤后 0(正常对照)、2、6、12、24、48 h共 6组。根据预实验结果,以伤后 24 h PMΦ进行第二部分的实验。

1.2 PMΦ的纯化及培养

在伤后各时相点,经腋下放血活杀小鼠。常规无菌获取腹腔细胞,去除红细胞后,在 24孔细胞培养板中以贴壁粘附法纯化巨噬细胞。洗除非粘附细胞后,每孔加入 1 ml含 10%灭活小牛血清、16 mmol/L HEPES、2 mmol/L谷氨酰胺、10 μg/ml LPS等的 RPMI 1640培养液(其中 L-精氨酸浓度为 1.14 mmol/L)。并保证最终每孔含有 PMΦ 1.0×10⁶。一式三孔,将细胞在 37℃ 5% CO_2的细胞培养箱中培养 24 h,取上清以备 NO及 PGE_2浓度的测定。

1.3 NO的测定

NO因含有一个未成对电子,化学性质极其活跃,半衰期极短,直接测定十分困难。它能与氧分子迅速反应生成较稳定的 NO和 NO_2,故多采用测定 NO_2来间接反映 NO生成的量。我们参照 Ding等[5]的方法,用 Greiss液测定细胞上清中的 NO_2^-的含量以示细胞产生 NO的量。

1.4 细胞培养上清中 PGE_2的检测

由解放军总医院提供的 PGE_2放免法试验药剂盒测定。

1.5 PMΦ通过 NO对 Con A刺激的脾淋巴细胞增殖的抑制作用

常规制备正常小鼠脾细胞悬液,去除红细胞及粘附细胞,即为正常小鼠脾淋巴细胞(SPL)。以含 10%小牛血清的 RPMI 1640细胞培养液调细胞浓度为 2×10⁶/ml,其中含有 Con A 5 μg/ml,16 mmol/L HEPES及某些特定浓度的阻断剂。每孔 250 μl加入按步骤 2所纯化的 PMΦ(每孔含细胞 2×10⁵)24孔细胞培养板中。根据预实验结果,以正常 PMΦ及烧伤后 24 h PMΦ做此实验,并根据实验设计加入相应的阻断剂致相应浓度:NOS特异性阻断剂单甲基精氨酸(NMMA)0.2或 0.4 mmol/L,L精氨酸(Arg)5或 10 mmol/L。将细胞在 37℃ 5% CO_2的细胞培养箱中培养 24 h后,加入 0.1 μCi ^{3}H-TdR,继续培养至 72 h。通过液相测定法,测定每个样本中的放射活性 Bq,算出各组的 Bq值。根据下式计算 PMΦ的抑制活性(抑制率):

$$\text{抑制率} = \frac{\text{正常对照组 Bq} - \text{实验组 Bq}}{\text{正常对照组 Bq}} \times 100\%$$

1.6 统计学处理

以华西医大 PEMS程序行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$表示,

* 国家自然科学基金资助项目,No.39290700-01
** 罗高兴,男,30岁,主治医师,博士研究生

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

并以 q检验(Newman-Keuls法)作差异显著性分析。

2 结果

烧伤对 PMΦ 产生 NO及 PGE2的影响,见表 1 烧伤后 PMΦ 对脾淋巴细胞增殖反应的影响,见表 2 NO及 PGE_2在烧伤后 PMΦ 抑制 SPL增殖反应中的作用,见表 3

表 1 烧伤后小鼠 PMΦ 中产生 NO及 PGE_2量的变化

Tab 1 Dynamic changes of NO and PGE_2 production by murine PMΦ after burn injury

Group	n	NO(nmol/10^6 PMΦ)	PGE_2(pg/10^6 PMΦ)
Control	9	10.49± 3.17	42.01± 16.61
PB 2h	8	18.28± 4.37	28.03± 6.00
PB 6h	8	55.15± 25.18**	60.99± 22.28
PB 12h	8	78.39± 13.98**	73.48± 14.56
PB 24h	8	88.31± 6.86**	87.95± 19.40**
PB 48h	8	53.79± 8.90**	123.55± 54.73**

PB: Postburn; * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$ *vs* control

表 2 烧伤后腹腔巨噬细胞对脾淋巴细胞增殖反应的影响

Tab 2 Effects of PMΦ on SPL proliferation after burn injury

Group	Bq value	Suppressive rate(%)
SPL+ NMΦ	527.30± 178.00	
SPL+ BMΦ	90.95± 33.96**	82.3

NMΦ: Normal macrophages; BMΦ: Burnt macrophages; * : $P<0.01$ *vs* control

表 3 NO及 PGE_2在 PB 24h PMΦ 抑制 SPL增殖反应中的作用

Tab 3 Effects of NO and PGE_2 on the inhibition of SPL proliferation by PB 24h PMΦ

Group	Bq value	Suppressive rate(%)
SPL+ BMΦ+ Arg(5)	49.30± 10.46**	90.6
SPL+ BMΦ+ Arg(10)	35.65± 7.48**	93.2
SPL+ BMΦ+ NMMA(0.2)	237.09± 50.84##	55.0
SPL+ BMΦ+ NMMA(0.4)	295.19± 22.35##	44.0
SPL+ BMΦ+ INDO(0.5)	198.91± 20.91##	62.3
SPL+ BMΦ+ NMMA(0.4) + INDO(0.5)	58.70± 10.67##	37.7

BMΦ: Burnt macrophages;
** : $P<0.01$ *vs* control; ## : $P<0.01$ *vs* PB 24 h

3 讨论

烧伤后出现的免疫功能紊乱,是近年来困挠严重烧伤治愈率及治愈质量提高的主要原因之一。巨噬细胞通过合成及分泌多种生物活性物质影响并调节着机体的免疫功能。烧伤早期巨噬细胞就被活化,具有产生 IL-2 PGE_2 TNF-α H_2O_2 精氨酸酶等多种生物活性物质的能力[1,2]。

我们的实验表明烧伤早期巨噬细胞就具有产生 NO PGE2的能力。从表 1可知,在烧伤后 6 h, NO的产生就明显高于正常,在烧伤后 24 h达高峰,并在我们所检测的最后一个时相点仍显著高于正常。而产生的 PGE_2在伤后 24 h才明显高于正常。NO是近年来发现的一种具有多种生物化学作用的小分子物质,它影响着多种疾病的发生发展[6]。活化的巨噬细胞可先通过启动基因转录合成 NO合成酶(NOS),再通过 NOS催化 L-Arg产生 NO。研究认为,巨噬细胞产生的 NO主要影响机体的免疫功能[7]。NO一方面通过非特异性杀伤包括细菌、病毒、真菌、寄生虫等在内的各种病原体及肿瘤细胞等而促进机体的非特异性免疫。它另一方面通过多种途径能抑制 Con A LPS等刺激的淋巴细胞的增殖反应等而抑制机体的免疫功能[4-7]。PGE_2由环氧酶催化花生四烯酸而产生,具有调节机体免疫功能在内的多种生物学活性。由此推测,烧伤早期活化的巨噬细胞,可能通过产生 NO PGE2等而调节机体的免疫功能。

我们在 SPL与 PMΦ 共同培养实验中发现,烧伤后小鼠 PMΦ 能显著抑制 Con A刺激的正常 SPL的增殖。与正常 PMΦ 相比较,其抑制率高达 82.3%。提示烧伤后巨噬细胞在机体的免疫抑制中起着重要作用。这与以前的实验结果是相似的。烧伤后巨噬细胞抑制机体免疫功能的机制并不十分清楚。研究认为这可能与 PGE_2 H_2O_2 精氨酸酶等有关。在我们的实验中发现, 0.5 μg/ml的消炎痛(Indomecine, INDO)明显降低了烧伤后 PMΦ 对 Con A刺激的 SPL增殖的抑制作用。消炎痛是一种环氧酶抑制剂,它能抑制巨噬细胞 PGE2的合成。提示巨噬细胞通过产生 PGE2而抑制 Con A刺激的 SPL增殖。但与正常 PMΦ 相比较,消炎痛应用后,其抑制率仍高达 62.3% ,提示除 PGE_2外,巨噬细胞还通过其它途径抑制淋巴细胞的增殖。我们在细胞培养体系中加入 5 mmol/L的 L-Arg后,烧伤 PMΦ 进一步抑制淋巴细胞的增殖,当将 L-Arg的浓度增至 10 mmol/L时,其抑制程度加剧(两组与烧伤组比较 P均小于 0.05)。而当我们在细胞培养体系中

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

加入 0.2 mmol/L的 NMMA,则使烧伤后 PMΦ 的抑制率下降至 55.0% (与正常组比较, $P < 0.01$)。且当增加 NMMA浓度至 0.4 mmol/L时,其抑制率进一步降低。L-精氨酸是机体内产生 NO的天然底物,细胞培养液中其浓度的增加使 NO的产生增加。NMMA结构上与 L-Arg相似,它通过竞争性与 NOS结合而抑制 NO的产生[6,8]。由此提示,烧伤活化的 PMΦ 可通过分泌 NO而对 Con A刺激的 SPL增殖起抑制作用。我们的实验还发现,当细胞培养液中同时加入 0.4 mmol/L的 NMMA及 0.5μg/ml的消炎痛时,烧伤后 PMΦ 的抑制作用显著下降,其与对应的仅加入 NMMA组比较差异显著($P < 0.05$);与仅加入消炎痛组比较差异非常显著($P < 0.01$)。说明 NO和 PGE_2在巨噬细胞对淋巴细胞增殖的抑制作用中有相互叠加的作用。但当它们同时应用时,与正常组比较,仍有 37.7%的抑制率,表明烧伤后巨噬细胞除通过 NO、PGE_2外,还通过其它途径抑制着 Con A刺激的 SPL增殖。

参考文献

1 彭代智,黄文华,黎　鳌,等.巨噬细胞在烧伤后免疫紊乱中的作用.中华外科杂志, 1993, 31(4): 501

2 Sparkes B G. Immunological responses to thermal injury. Burn, 1997, 23(1): 106

3 Schleifer K W, Mandfield J M. Suppressor macrophages in African Trypanosomiasis inhibit T cell proliferative response by nitric oxide and prostaglandins. J Immunol, 1993, 151(10): 5429

4 罗高兴,彭代智,黄文华.一氧化氮的免疫调节作用.上海免疫学杂志, 1996, 16(4): 245

5 Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reaction oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. J Immunol, 1988, 141(4): 2407

6 Moncada S, Higg S A. The L-arginine-nitric oxide pathway. The New Engl J Med, 1993, 329(5): 2002

7 Xie Q W, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Immunol Rev, 1997, 15(1): 323

8 罗高兴,黄文华,彭代智,等.内源性一氧化氮合成的调节.国外医学: 临床检验与生物化学分册, 1996, 17(1): 10

(收稿: 1998-08-10;修回: 1999-01-29)

(编辑　张大春)

Role of NO and PGE_2 in suppression of Con A-stimulated splenic lymphocyte proliferation by peritoneal macrophages after burns in mice*

Luo Gaoxing, Peng Daizhi, Huang Wenhua, Li Ao, Liu Jin, Zhou Xin (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the mechanism of immune dysfunction after burn injury. **Methods**: NO and PGE_2 in the supernatant of the cultured peritoneal macrophages (PMΦ) were determined with colorimetric and RIA method respectively. The proliferation of stimulated splenic lymphocytes (SPL) cocultured with PMΦ was detected by ^{3}H-TdR incorporation. **Results**: NO production form PMΦ was increased rapidly after the burns, which began to reach a significantly higher level since PB 6 h and persisted at a high level till PB 48 h. PGE_2 production was markedly increased from PB 24 h. The coculture of the two kinds of cells showed that PMΦ from PB 24 h mice could remarkably inhibit the proliferation of normal SPL stimulated by Con A. L-arginine and NMMA could upregulate and down-regulate this suppression respectively. Indomecine, a specific blocker of cyclooxygenase, also markedly attenuated the Con A-stimulated SPL proliferation. **Conclusion**: NO and PGE_2 derived from PMΦ play an important role in the immune dysfunction after burns.

Key words burns; macrophage; nitric oxide; immune dysfunction; mouse

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39290700-01

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