DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.006

旁路活化补体对枯否细胞吞噬杀菌功能影响的实验研究

熊 杰* 汪正清 周善章 刘启富 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室)重庆,400038

提 要 目的:证明一定条件下,旁路活化补体可使 KC吞噬杀菌功能失常。方法:观测定量培养的 KC在 ZAHS作用下吞噬杀菌及分泌杀菌致炎物质功能的动态水平;观察大鼠肠系膜注射 ZAHS后肝组织的病理改变;以抗人 C_3、C_5血清中和的 ZAHS进行反证。结果:① ZAHS处理组,KC的 PI和 ICBA以及胞内 O_2^-水平先升后降,胞内 ACP水平只降无升;ICBA与 O_2^-和 ACP的水平均显著相关;各指标至 6 h降至最低;② 阻断组 O_2^-、ACP ICBA在 6 h水平保持在正常对照组的 97%、83%和 79%,显著高于 ZAHS处理组;③ 肠系膜静脉注射 ZAHS 12 h后,大鼠肝组织轻度变性,部分 KC线粒体受损,与 KC相邻肝细胞出现凋亡改变,阻断组肝组织无明显病变。结论:ZAHS中过量的 C_3、C_5碎片持续作用能使 KC吞噬杀菌功能下降,对肝组织结构亦有一定间接破坏作用。这些都有利于并发感染发生。

关键词 补体;枯否细胞;胞内杀菌力;酸性磷酸酶;超氧阴离子
中图法分类号 R392.11

近年研究发现[1~4],PMN在创伤早期大量活化补体碎片持续作用下,胞内杀菌力明显降低,自身及邻近肺血屏障受损,机体抗感染能力下降。早在 80年代中期就已发现,外科重症病人血内过敏毒在 3周内持续增高[5],枯否细胞(Kupffer cell, KC)吞噬功能抑制[6],但 KC吞噬杀菌功能的抑制与活化补体之间是否存在类似 PMN样的因果关系,其成立条件如何,尚未见报道。本研究以大鼠 KC单层小室酵母多糖活化人血清(Zymosan-activated human serum, ZAHS)建立 KC单层实验模型,从正反两方面证明活化补体在一定条件下可导致 KC吞噬杀菌功能下降。

1 材料与方法

1.1 ZAHS制备

参照文献[7]制备,-20℃冻存,供全程实验使用。

1.2 抗人 C_3、C_5中和的 ZAHS制备

参照文献[2]进行,下称中和血清。

1.3 大鼠 KC的分离纯化和单层小室培养

参照文献[8]分离配制细胞悬液,检测纯度与活细胞。按文献[2]方法制备 KC单层小室培养,每孔加 0.2 ml KC悬液,培养 18 h后进行实验。

1.4 ZAHS用量及作用时间选择

ZAHS设置 5个剂量组:0.03、0.05、0.07、0.09、0.11 ml/小室,以无抗生素 RPMI 1640补足体积 0.2 ml(对照组不加 ZAHS),分别作为 1、2、3、4、5、6 h后观测下列指标,每个观测点重复 4次。

1.4.1 胞内杀菌力(Intracellular bactericidal activity, ICBA)和吞噬指数(Phagocytic Index, PI) 参照文献[7]进行。

1.4.2 超氧阴离子(Superoxide ions, O_2^-)测定 参照文献[2]制片,显微分光光度计镜下测定单个 KC在 567 nm处的透光度,换算成 567 nm处的吸光度 A_{567}表示该 KC产 O_2^-量。

1.4.3 酸性磷酸酶(ACP)检测(示溶酶体量) 按 Gomori氏常规方法染色[9],显微分光光度计镜下测定单个 KC在 492 nm处的透光度,换算成 492 nm处的吸光度 A_{492}表示该 KC溶酶体量。

1.5 分组实验观测

选择四指标均明显下降,细胞脱落不影响实验的 0.07 ml ZAHS作用 6 h为分组实验用量及时相。处理组和正常血清对照组每小室分别加 ZAHS和正常混和人血清 0.07 ml,阻断组加 0.1 ml中和血清,各孔以 RPMI1640补足 0.2 ml,继续培养 6 h后测上述指标,每组 20例。

1.6 动物实验

① ZAHS作用组:1 ml ZAHS/100 g体重;② 正常血清对照组:1 ml新鲜正常人血清/100 g体重;③ 中和血清组:1.5 ml中和血清/100 g体重,沿大鼠肠系膜静脉注入后关腹;④ 正常对照组不作任何处理。各组动物术后 12 h活杀,定点取肝组织作光、电镜检查。

1.7 统计分析

所得数据按同批对照组均值为 100%换算成归一百分数,作 ICBA与 O_2^-和 ACP的相关分析;其余数据作单因素方差分析(统计程序 PDA-2)。

2 结果

2.1 ZAHS用量和作用时间对体外培养单层 KC吞噬杀菌功能的影响

各剂量组作用相应时间后,镜下可见 KC程度不同地脱落,且量越大,时间越长,脱落越明显,110 μl ZAHS作用 5 h和 6 h,KC脱落 80%~90%,无法进行指标观测。

由图 1~4可看出,各剂量组 PI在 3 h前持续上升,此后除 30 μl和 50 μl组外均逐渐下降;110 μl组作用 1 h后 ICBA急剧上升,其余各剂量组在 2 h前 ICBA均上升,2 h后各组 ICBA

* 熊 杰,女,29岁,主管技师,硕士,现在成都军区总医院检验科 成都,610083

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

进行性下降,至观察的最大时限 6 h达最低点;KC胞内 O_2^- 水平变化规律与 ICBA相似,且二者相关非常显著(r= 0.95);KC胞内 ACP水平各剂量组从开始就逐渐下降,并与 ICBA相关显著(r= 0.87)。各指标变化幅度与 ZAHS呈较明显量效相关。

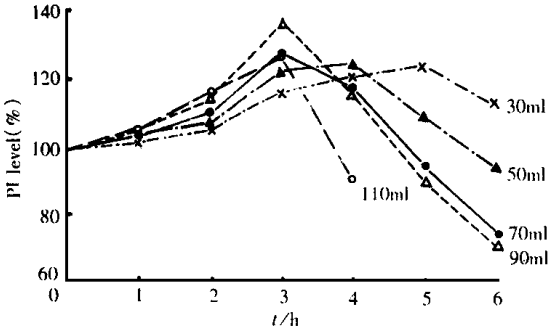


图 1　不同剂量 ZAHS对 KC的 PI影响

Fig 1　Effects of different doses of ZAMS on the PI of KC

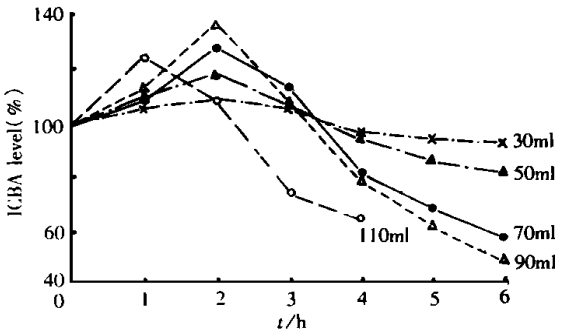


图 2　不同剂量 ZAHS对 KC的 ICBA影响

Fig 2　Effects of different doses of ZAHS on the ICBA of KC

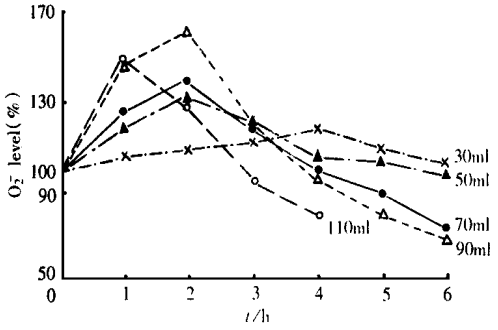


图 3　不同剂量 ZAHS对 KC胞内 O_2^- 影响

Fig 3　Effects of different doses of ZAHS on the intracellular O_2^- of KC

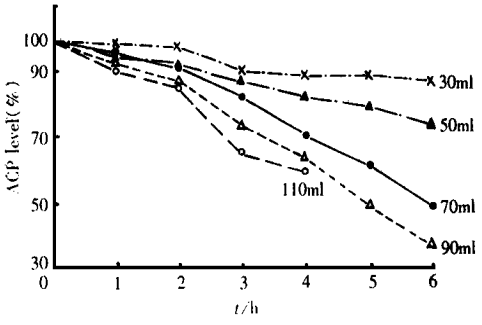


图 4　不同剂量 ZAHS对 KC胞内 ACP影响

Fig 4　Effects of different doses of ZAHS on the intracellular ACP of KC

2.2　分组实验结果

表 1表明,正常血清作用于 KC,对其产生 O_2^-、胞内 ACP量及 ICBA均无明显影响,而 PI则较空白组显著增高;ZAHS处理组 ICBA O_2^-、ACP及 PI显著低于空白组(P < 0.01);阻断组 ICBA ACP测值虽仍低于空白组(P < 0.01),但较 ZAHS处理组有显著提高(P < 0.01),O_2^- 产生接近空白组水平(P > 0.05)。

表 1　ZAHS作用 6 h对各指标的影响($\bar{x}\pm s$,n= 20)

Tab 1　Results of ZAHS on different paramenters at 6 h ($\bar{x}\pm s$,n= 20)

Group	PI	ICBA(%)	O_2^- (A_{567})	ACP(A_{492})
Control	5.14± 0.53	50.34± 4.52	0.0906± 0.0083	0.242± 0.011
Normal serum	6.08± 0.65*	51.52± 5.81	0.0915± 0.0078	0.235± 0.010
ZAHS treated	3.57± 0.36*	26.85± 2.52*	0.0644± 0.0076*	0.102± 0.012*
Anti-C_3, C_5	5.47± 0.49#	40.24± 4.61*#	0.0882± 0.0077#	0.201± 0.013*#

*: P < 0.01 *vs* control; #: P < 0.01 *vs* ZAHS treated

2.3　动物实验 –ZAHS肠系膜静脉注射对肝组织结构的影响

光镜: ZAHS处理组可见肝细胞普遍浊肿,肝组织出现点灶性坏死;正常血清对照组和阻断组未见肝组织异常。

电镜: ZAHS处理组肝细胞内空泡明显增多,个别肝细胞呈凋亡改变,与 KC相邻的肝细胞胞浆内出现灶性坏死,细胞器髓鞘样改变;KC线粒体肿胀空化,嵴断裂。正常血清组和阻断组肝细胞和 KC均无明显变性。

3　讨论

补体激活后可调理吞噬,促进吞噬细胞吞杀菌功能,在抗感染过程中起重要作用。但在本组大剂量 ZAHS持续作用的实验条件下,活化补体则能降低 KC吞噬杀菌功能,同时其炎症病理作用增强。

从结果可看出,ZAHS用量与 O_2^-、ACP、ICBA和 PI四指标的升降存在明显量效关系,而抗人 C_3、C_5 血清能基本消除 ZAHS对上述指标的影响,使 O_2^-、ACP、ICBA在 6 h分别回升至空白对照组的 97%、83%和 79%,PI略高于对照组。以上两点表明 ZAHS中的 C_3、C_5 片断是 KC吞噬杀菌功能下降的主要原因,此结果与 ZAHS作用于 PMN的实验结果相似[2],相同剂量时 KC各指标的下降程度较浅可能与种属特异性有关[10]。

过量活化补体导致 KC杀菌功能下降的可能机制: ZAHS中的补体碎片与 KC膜上相应受体结合,激发细胞内外膜上的 NADPH氧化酶,迅速产生 O_2^-,而

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

后派生 H_2O_2、·OH和次氯酸等强氧化基,同时 KC释放大量 ACP. 这两类杀菌物质的大量排放可使 KC的 ICBA显著下降,并损伤正常组织细胞,使 KC的功能进一步下降。

阻断组虽较处理组测值显著升高,但其 ICBA和 ACP值仍明显低于空白组,可能与 C_3、C_5片断中和不完全以及血清中的 C_{4a}及少量 LTB_4有关。

KC是机体非特异性防御的重要组成部分,由于它的位置特殊,构成了阻止门静脉系统细菌、内毒素和循环免疫复合物进入体循环的重要屏障,KC吞噬杀菌功能的下降,必将导致内源性感染尤其是肠源性感染可能性的上升。在严重创伤等情况下,补体大规模活化,而在肝胆疾病或手术时,补体在肝内高度活化形成活化补体碎片的局部高浓度,这些情况下活化补体都有可能成为 KC吞噬杀菌功能下降和内源性感染增多的主要原因。本研究为严重创伤并发感染和 MOF等的发病机制研究及其防治提供了有一定意义的参考。

参考文献

1 汪正清,周善章.补体激发 PMN产生氧自由基在杀菌和损伤肺血屏障中的作用.中华流行病学杂志, 1993, 14(特 11): 64

2 Wang Zhengqing, Zhou Shanzhang. Study of the loss of bactericidal capacity of PMNs induced by bypass-activated complement. J Med Coll PLA, 1995, 10(3): 232

3 汪正清,周善章,鲜尽红,等.补体在重度烧伤病人 PMN吞杀绿脓杆菌力下降中的作用.中华整形外科杂志, 1995, 11(3): 197

4 汪正清,周善章,刘启富,等.补体在严重骨折病人 PMN吞杀病菌力下降中的作用.第三军医大学学报, 1996, 18(3): 223

5 Heideman M, Hugli T E. Anaphylatoxin generation in mutisystem organ failure. J Trauma, 1984, 24(12): 1038

6 Loegering D J. Kupffer cell complement receptor clearance function and host defense. Circ Shock, 1986, 20(4): 321

7 Pruzanski W, Saito S. Comparative study of phagocytosis and intracellular bactericidal activity of human monocytes and polymorphonuclear cells: Application of fluorochrome and extracellular quenching technique. Inflammation, 1988, 12(1): 87

8 Pranning V D. Quantitative determination of *in vivo* endocytosis by rat liver Kupffer and endothelial cells facilitated by an improved isolation method. FEBS Lett, 1982, 141(2): 229

9 Bancroft J D. Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. Edinburgh: Churchill livingstone, 1982. 385 ~ 386

10 Hespeling U, Puschel G P, Jungermann K, *et al*. Stimulation of glycogen phosphorylase in rat hepatocytes via prostanoid release from Kupffer cells by recombinant rat anaphylatoxin C5a but not native human C5a in hepatocyte/Kupffer cell co-cultures. FEBS Lett, 1995, 372(1): 18

(收稿: 1998-05-11;修回: 1998-11-11)

(编辑 张大春)

Effects of bypass-activated complement on bactericidal capacity of Kuppfer cells

Xiong Jie, Wang Zhengqing, Zhou Shanzhang, Liu Qifu (Department of Microbiology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To determine whether bypass-activated complement can directly influence intracellular bactericidal activity (ICBA) of Kupffer cells (KCs). Methods: ① Cultured KCs were challenged to different doses of ZAHS at different time phases and then 4 parameters were measured. ② *In vivo*, the rats were challenged to ZAHS injection through mesenteric vein. The liver was sampled and examined under LM and EM respectively 12 h later. ③ The same procedures were repeated except that ZAHS had been neutralized by the serum against C3 and C5. Results: ① Phagocytic index (PI), ICBA and intracellular superoxide ions of ZAHS-treated KCs rose significantly and then fell. Acid phosphatase (ACP) decreased monotonously decreased. ICBA was significantly correlated to both intracellular superoxide ions and ACP. ② After the 12th injection of ZAHS, the pathological changes in rat livers included albuminous degeneration of most hepatocytes, injured mitochondria of some KCs and apoptosis of few hepatocytes adjacent to KCs. ③ Block test showed that the anti-serum-treated KCs held 79% ICBA, 83% ACP and 97% intracellular superoxide ions respecting to the normal. No evident pathological changes in the livers of the challenged rats were seen. Conclusion: The fragments of C3 and C5 in ZAHS can directly impair phagocytic and bactericidal function of KCs and indirectly injure the structure of the liver. The mechanism of this might be the great release of bactericidal and inflammatogenic intracellular superoxide ions and ACP.

Key words complement; Kupffer cell; superoxide ion; intracellular bactericidal activity; acid phosphatase

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