DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.016

地塞米松对补体介导的 PMN功能损害的保护实验研究

张克斌* 汪正清 刘启富 周善章 (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:研究地塞米松对活化补体介导的 PMN功能损害的保护作用。方法:用酵母多糖活化人血清(ZAHS)作用于人体外 PMN及小鼠体内 PMN,选择地塞米松(Dex)起显著保护作用的浓度和时间;进行体内、外保护效能试验。结果:① 低剂量 Dex(0.08μg/ml)预处理,对极效量 ZAHS导致正常人、鼠 PMN功能损害无明显保护作用;大剂量 Dex(1.2~1.6μg/ml)在 PMN应激后的第5小时前表现出明显保护作用($P<0.05$),但此后却使 PMN细胞死亡、脱落;中等剂量 Dex(0.4~0.8μg/ml)能使 PMN的 ICBA O_2^-和 SG三项指标水平均显著高于实验组($P<0.05$);② Dex在小鼠体内保护效能同体外实验基本一致;③ Dex的临界保护剂量:0.4μg/ml(体外)或2.5μg/20 g鼠(体内),它对 PMN杀菌力的保护效能分别为25.03%(体外)和19.05%(体内)。结论:中等量 Dex(0.4~0.8μg/ml)对体外 PMN的预处理,能显著而安全地保护 ZAHS所激化的 PMN的胞内杀菌功能。鼠体内的情况基本同体外一致(体内 Dex剂量为2.5μg/20 g小鼠,ZAMS为0.5 ml/20 g小鼠)。

关键词 地塞米松;补体;杀菌力;超氧离子;特殊颗粒
中图法分类号 R392.11

体内外实验研究表明[1],在大、中剂量旁路活化补体碎片持续作用下 PMN胞内氧自由基和溶酶体酶等杀菌致炎物质可大量排放并消耗殆尽,这使胞内杀菌力(Intracellular bactericidal acitvity, ICBA)在吞噬细菌之前已明显降低;抗人 C_3、C_5血清能阻断补体碎片对 PMN有害作用[1]。氧自由基清除剂能减轻补体激活 PMN所产氧自由基对 PMN自身和肺血屏障的损伤[2];而糖皮质激素在这方面的作用尚未见报道。本研究旨在用体外实验证明论题并找到 Dex作用的最佳剂量,在小鼠体内验证上述结果并观察肺内病变。为进一步研究烧(创)伤病人并发感染的防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 指标观测技术

1.1.1 ICBA的观测 参照文献[3]方法进行。

1.1.2 O_2^-(Superoxide ions)的测定 参照文献[1]方法进行。

1.1.3 SG(Specific Granule) 按文献[3]方法进行。

1.1.4 常规病理检验 活杀小鼠,定点采集肺组织样品,常规光镜和电镜病理检查。

1.2 Dex的体外保护实验

1.2.1 ZAHS(Zymosan-activated human serum)损害人 PMN功能的实验模型 按文献[1]方法进行。

1.2.2 Dex(上海第十二制药厂)最佳保护浓度及其作用时间的选择 以 Dex的6个工作浓度(0.00;0.08;0.40;0.80;1.20;1.60μg/ml)及其6个作用时间(1,2,3,4,5,6 h)交叉组成36个保护观测点。先向6组 PMN单层培养小室分别加不同浓度的 Dex 0.02 ml,5 min后各点均再加 ZAHS 0.05 ml;然后按不同时间观测每个室内 PMN细胞的 ICBA、O_2^-和 SG的水平,每个指标重复测10次求平均值。试验结果为0.4μg/ml×6 h。

1.2.3 Dex的体外监界保护效能实验 实验组(每培养小室加1640培养液0.02 ml,ZAHS 0.05 ml);保护组(加工作浓度为0.4μg/ml的 Dex 0.02 ml,5 min后再加 ZAHS 0.05 ml);Dex对照组(加工作浓度为0.4μg/ml的 Dex 0.02 ml,5 min后再加正常人血清0.05 ml);正常 PMN对照组(加1640培养液0.02 ml,5 min后加正常人血清0.05 ml)。每组20例,作用6 h后测定上述三项指标。

1.3 Dex在小鼠体内的监界保护效能实验

BALB/C小鼠(20±3 g,第三军医大学动物中心),随机分为四组,每组20只。实验组:每只小鼠经尾静脉注射 ZAHS 0.5 ml,6 h后取肺组织块洗出细胞并用直接贴片法制成 PMN单层培养;保护组:尾静脉注射 Dex 2.5μg,5 min后再静注 ZAHS 0.5 ml,6 h;均观测上述各指标。Dex对照组,只注射 Dex 2.5μg;正常对照组,不注射任何试剂和药物。

1.4 统计分析

原始数据均换算成归一百分数;然后作 ICBA与 O_2^-/SG相关分析及单因素方差分析,以 $P<0.05$为相差显著标准。

2 结果

2.1 体外试验中,Dex预处理剂量对应激 PMN活性指标动态的影响

图1,2,3所示结果表明:① 当 Dex预处理剂量为0时,后序 ZAHS处理的 PMN的 ICBA和 O_2^-水平均先升(2 h)后降,而

* 张克斌,男,29岁,主治医师,讲师,硕士,现在附属新桥医院呼吸内科研究所 重庆,400037

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

SG的水平则只降无升。② 较大的预处理剂量(1.2~ 1.6μg/ml)对 PMN的 ICBA和 O_2^-和 SG水平的保护作用在4~ 5 h前最为显著($P < 0.05$),但 PMN在第4~ 5 h以后死亡脱落。③ 中等预处理剂量(0.4~ 0.8μg/ml)能把 O_2^-的水平始终保持在次正常的水平(> 0.9, < 1.0),对 ICBA的次之(> 0.7, < 0.9),对 SG的再次之(> 0.5, < 0.7);虽然未能把上述指标提高到正常水平,但仍显著高于实验组的指标测值,而且不会使应激 PMN死亡。0.4和0.8μg/ml的药物浓度保护效能显著且安全。经 Dex保护后,ICBA与 SG和 O_2^-测值相关非常显著。

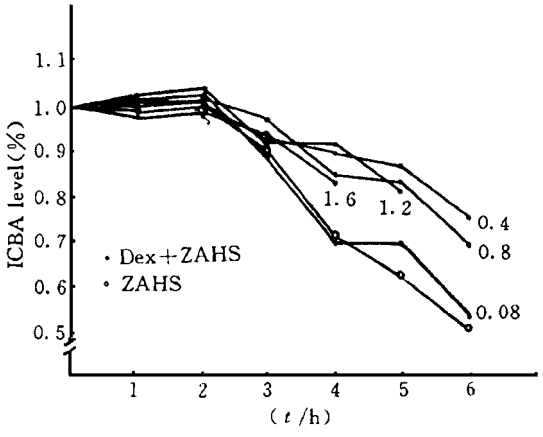


图1 Dex预处理剂量(μg/ml)对经 ZAHS激化 PMN的 ICBA的影响

Fig 1 Effects of different doses of pre-treating dexamethasone(μg/ml) on the ICBA of ZAHS activated PMN

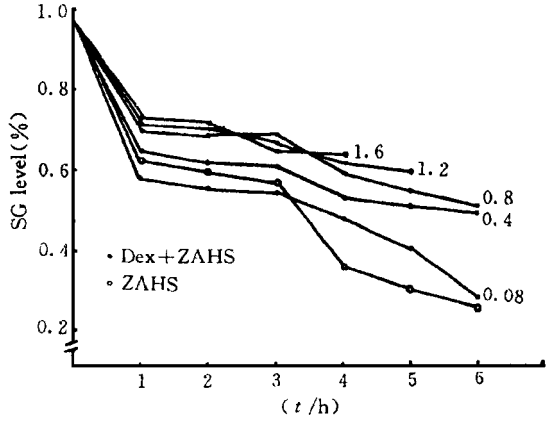


图2 Dex预处理剂量(μg/ml)对经 ZAHS激化 PMN的 SG的影响

Fig 2 Effects of different doses of pre-treating dexamethasone(μg/ml) on the SG of ZAHS activated PMN

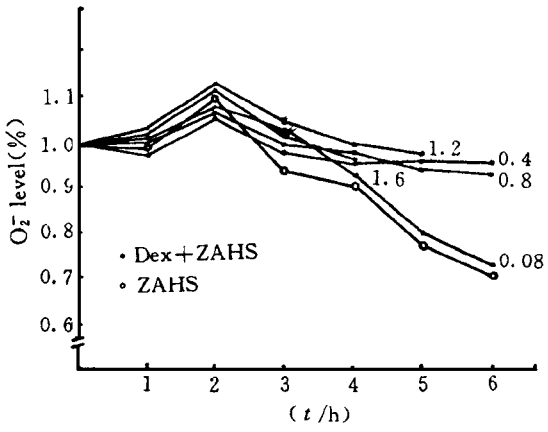


图3 Dex预处理剂量(μg/ml)对经 ZAHS激化 PMN的 O_2^-的影响

Fig 3 Effects of different doses of pre-treating dexamethasone(μg/ml) on the O_2^- of ZAHS activated PMN

2.2 Dex在体内、外的临界保护效能

表1,2的结果表明:① 所用临界剂量的 Dex在体内外对正常 PMN无副作用。② 所用极效剂量 ZAHS(ZAHS),在体内外都能使正常人、鼠 PMN的活性在应激6 h后显著降低($P < 0.05$)。③ 临界剂量 Dex预处理体外人 PMN 5 min,能显著减轻后序 ZAHS极效用量对三个指标的有害作用。④ Dex在鼠体内的临界保护效能结果基本与体外实验相同。

表1 Dex在体外的临界保护效能

Tab 1 The critical protective efficacy of dexamethasone *in vitro*

Group		O_2^- ($\overline{A_{560nm}^{NBT^-}}$)	SG(100 PMN)	ICBA%
Normal	(20)	24.09± 2.96	756.97± 76.33	76.42± 4.51
Dex control	(20)	24.71± 2.76	783.73± 71.02	75.74± 4.69
Experimental	(20)	16.81± 2.93	201.44± 32.01	39.65± 2.64
Protected	(20)	22.84± 2.44*	386.19± 46.82**	58.78± 3.48

* : $P < 0.05$ *vs* experimental group;

** : $P < 0.05$ *vs* normal or dex control group

表2 Dex在小鼠体内的临界保护效能

Tab 2 The critical protective efficacy of dexamethasone *in vivo* in mice

Group		O_2^- ($\overline{A_{560nm}^{NBT^-}}$)	SG(100 PMN)	ICBA%
Normal	(20)	11.42± 1.48	674.91± 64.19	77.76± 3.42
Dex control	(20)	11.89± 1.69	659.27± 61.32	77.46± 4.28
Experimental	(20)	7.28± 0.98	354.61± 30.57	50.1± 3.58
Protected	(20)	9.97± 0.90*	498.03± 51.52**	65.28± 2.83**

* : $P < 0.05$ *vs* experimental group;

** : $P < 0.05$ *vs* normal or dex control group

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

2.3　Dex对小鼠肺组织病变的保护作用

实验组小鼠肺部病变。光镜: 小血管内 PMN聚集;肺间质内 PMN浸润;局灶性肺气肿和肺萎陷;部分肺间质和肺泡有不同程度肺水肿;且有片状出血。电镜: PMN中 SG数目减少且密度降低;肺泡腔有出血,Ⅱ型上皮细胞脱落,表面绒毛减少;血气屏障模糊,Ⅰ型上皮细胞有肿胀现象。保护组鼠肺病变。光电镜下: 上述病变明显减轻。

3　讨论

不同剂量糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)对 PMN杀菌力的影响: 多数作者认为 GC不影响 PMN的完全吞噬功能。但 Takao Nohmi等[4]发现生理剂量的 GC就能削弱 PMN对白色念珠菌生长的抑制能力。本研究预试验结果表明,生理或药用浓度的 Dex(<2μg/ml)对单层培养 PMN的 ICBA O_2^-和 SG均无明显影响; 10~20μg/ml浓度的 Dex持续作用 3 h对 PMN的 ICBA和 O_2^-有轻度抑制作用,而对 SG无明显改变;>10μg/ml的药物浓度作用 7 h后对 PMN的功能有明显抑制作用。Dex剂量与其对应激 PMN杀菌力的保护效能之间存在明显的量效相关:

Dex对补体介导的 PMN功能损害的可能原因有两方面:① Dex对动物细胞内、外膜,特别是溶酶体膜有直接稳定作用,这就减少了由补体刺激的 PMN过度释放杀菌且能致炎的物质。Goldstein等[5]的实验证明, GC预处理能抑制先经细胞松驰素 B处理的人 PMN在受 C_{5a}调理时的溶酶体酶的分泌。本研究的实验结果,见图 2,表 1, 2,证明 Dex保护组 PMN胞内 SG的水平显著高于实验组的水平。此外, GC还可能影响 C_{5a}等与 PMN膜上相应受体的结合[6]。Dex预处理能抑制应激 PMN的呼吸爆发,原因可能是它能阻止葡萄糖继续进入细胞[7]; 它能使 PMN脂皮素-1(Lipocortin-1)的表达增强,再通过脂皮素-1对 PLA_2的调节作用[8,9]削弱花生四烯酸的代谢。以上提示, GC不仅保护非氧依赖性杀菌致炎物质过度释放,而且对氧依赖性杀菌致炎物质的释放也有一定的抑制作用,见表 1, 2

参考文献

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

2 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

3 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): 977

4 Takao Nohmi, Shigeru Abe, Shigeru Tansho *et al*. Suppression of anti-Candida activity of murine and human neutrophils by glucocorticoids. Microbiol. Immunol, 1994, 38(12): 977

5 Goldstein I M, Roos D, Weissmann G *et al*. Influence of corticosteroids on human polymorphonuclear leukocyte function *in vitro*. Reduction of lysosomal enzyme release and superoxide production. Inflammation, 1976, 1: 305

6 Goldstein I M, Perez H D, Chernoff D N. Effects of adrenal corticosteroids on polymorphonuclear leukocytes. Adv Inflammation Res, 1979, 1: 515

7 王广庆,胡复荪,安长荣等.地塞米松抑制巨噬细胞产生氧自由基和一氧化氮.中国药理学通报, 1995, 111(4): 406

8 Barnes P J, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroides: molecular mechanisms. TIPS, 1993, 14: 436

9 Flower R J, Rothwell N J. Lipocortin-1: Cellular mechanisms and clinical relevance. TIPS, 1994, 15: 71

(收稿: 1996-11-11;修回: 1997-09-23)

(编辑　冯崇英)

Protective effects of dexamethosone on complement-induced damage of polymorphonuclear neutrophils

Zhang Kebin, Wang Zhengqing, Liu Qifu, Zhou Shanzhang (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract　Objective: To investigate the protective effects of dexamethosone on damage of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) induced by the activated complement. Methods: The zymosan-activated human serum (ZAHS) was added to monolayer culture of human PMNs and injected into the murine body to determine the optimal protective dose and time of dexamethasone and test its protective efficiency *in vivo* and *in*

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

vitro. **Results**: 1) Pretreatment of low dose of dexamethasone (0.08μg/ml) could not exert significant protective effects on ZAHS-disturbed PMNS while that of high dose of dexamethasone (1.2~1.6μg/ml) could within 5 hours after treatment ($P < 0.05$). However, the latter soon caused the death and falling off of PMNs. Pretreatment of middle dose of dexamethasone (0.4~0.8μg/ml) could preserve ICBA, O_2^- and SG to levels significantly higher than those in the experimental group ($P < 0.05$). 2) The protective effects exerted in the murine body were consistent with those *in vitro*. 3) The critical protective dose of dexamethasone was 0.4 (g/ml *in vitro* or 2.5μg/20g *in vivo* and its protective efficiency to ICBA was 25.03% *in vitro* or 19.05% *in vivo*. **Conclusion**: Pretreatment of PMNs with middle dose of dexamethasone can significantly and safely protect ICBA of PMNs from the disturbance of ZAHS.

Key words dexamethasone; complement; bactericidal; superoxide ion; specific granule

高血压病线粒体基因突变的研究*

Mutation of mitochondrial genes in hypertension

周 林** 张国元 万大方*** 李宏年*** 张萍萍*** 赵新泰*** 顾健人*** (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室)重庆,400042

首先以高血压鼠(SHR)为研究对象,用差别杂交法筛选正常人心脏 cDNA文库的部分 cDNA克隆,得到心钠素基因和多个线粒体基因。Northern Blot证实它们均在 SHR心肌中高表达,线粒体基因中包括编码细胞色素 C氧化酶亚单位 I和 ATPase 6基因的克隆。用 PCR-SSCP方法分别对细胞色素 C氧化酶亚单位 I基因和 ATPase 6基因进行基因突变分析,发现 SHR和正常大鼠心肌线粒体细胞色素 C氧化酶亚单位 I基因无构象差异,而 ATPase 6基因构象有明显差异。通过测序,发现 ATPase 6基因 8701位碱基由 G突变成 A(G8701A),编码的第 59位氨基酸由丙氨酸变成苏氨酸;8708位碱基由 A突变成 G(A8708G),编码的第 61位氨基酸由组氨酸变成精氨酸。同时测序发现 SHR肝脏、脾脏线粒体 ATPase 6基因中只有 G8701A突变,而 8708位正常。由于 ATPase 6基因是 ATP酶复合物的重要组成部分,心脏又是高血压病的靶器官,由此认为 ATPase 6基因突变很可能与高血压病(心肌肥厚)有关,G8701A突变可能发生在血压增高之前,是引起高血压病心肌肥厚的始动因素,而 A8708G突变可能是血压增高后对心脏靶器官的影响而引起的。这些基因突变均导致编码氨基酸的变化,这种变化可能引起 ATPase活性变化,引起心肌肥厚和导致心肌收缩力改变,成为引发高血压的原因之一。而高血压后的心肌高代谢需要更多能量,这可能是引起 ATPase 6基因进一步突变的原因。

在对 SHR检测的基础上,进一步用 PCR-SSCP和 Sequencing方法检测了正常成人、高血压病和冠心病心肌梗塞各 6例患者的外周血白细胞线粒体 ATPase 6基因,同样发现 ATPase 6基因在 4例高血压和 1例冠心病心肌梗塞患者中存在构象改变。测序发现高血压病患者 ATPase 6基因 8584位碱基由 G突变成 A(G8584A),编码的 20位氨基酸由丙氨酸变成苏氨酸。这一变化与 SHR线粒体 ATPase 6基因改变相一致。冠心病心肌梗塞 1例 ATPase 6基因 8575位由 C突变成 T(C8575T),但编码的氨基酸仍为亮氨酸,为同义突变。对高血压鼠与临床高血压病人研究结果的一致性,提示 G8584A突变很可能在高血压病心肌肥厚的发生发展中具有意义,并可能是高血压病的特异性改变。

关键词 高血压;冠心病;线粒体;基因突变;ATPase 6
中图法分类号 R541.3
(收稿:1997-10-05;修回:1997-11-15)
(编辑 冷怀明)

* 国家863基金资助,所有工作均在上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室完成
** 周 林,男,33岁,主治医师,博士
*** 第二军医大学附属长征医院心血管内科 上海,200003

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