DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.016
第18卷第3期 第三军医大学学报 Vol,18,No.3
1996年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun.1996

补体在严重骨折病人中性粒细胞杀菌功能降低中的作用

汪正清 周善章 刘启富 (第三军医大学基础部微生物学教研室)重庆,630038
鲜尽红 (重庆药剂学校微生物学教研室)重庆,630030

提 要 从多处和一处骨折的41例病人随机采集68份静脉血,观测分离的中性粒细胞(PMN)胞内超氧离子(O_2^-)、特殊颗粒(SG)和胞内杀菌力(ICBA)的水平;观察严重骨折病人血浆对正常人PMN胞内O_2^-、SG和ICBA的影响以及抗人C_3C_5血清(AHC_3C_5S)对上述血浆有害作用的特异阻断效能。结果表明:(1)骨折病人PMN的各指标值均低于正常水平,伤后1~4 d ICBA测值最低。(2)ICBA与O_2^-和SG的测值相关显著($P<0.05$)。(3)病人血浆能显著削减正常人PMN胞内ICBA、O_2^-和SG的储存,而AHC_3C_5S能减轻这些储存的丢失,其净保留率排序为:O_2^-(70.71%)、ICBA(53.30%)、SG(41.12%)。结果提示:C_3C_5碎片是PMN ICBA下降的重要直接动因。其机理可能是$C_{3b}C_{5b}$对PMN的持续作用,使胞内杀菌物质O_2^-、SG在吞入病菌前就已消耗殆尽。这对骨折并发全身感染的防治有参考价值。

关键词 补体;胞内杀菌力;超氧离子;特殊颗粒;骨折
中图法分类号 R683.03

严重多处创伤组织能旁路活化补体[1],病人中性粒细胞(PMN)趋化性、吞杀病菌功能明显降低[2],并发全身感染率增高,高效抗生素亦很难防治。多数学者认为,这些结果主要原因是机体的正常防御机能受到抑制和破坏,但其细节不明。作者过去的实验结果表明[3,4]:大面积深度烧伤病人血内C_3、C_5碎片增多,并在一定条件下使PMN胞内杀菌力(ICBA)降低,同时通过PMN释放的杀菌致炎物质损伤正常组织屏障,而且与全身感染的临床表现有关。为了探讨严重骨折病人是否也是如此,本研究观察了严重骨折对PMN功能影响和骨折病人血浆对正常人PMN功能影响,以及和临床感染的关联;并以抗人C_3C_5血清(AHC_3C_5S)中和阻断这些不良结果。

1 材料与方法

1.1 病例选择及标本收集

选择因车祸和工伤严重骨折的病人41例。其中多处骨折21例:男16人,女5人,年龄为18~65岁(平均30.9岁),骨折在2~5(平均3.14)处,其中7例有内脏损伤及并发感染。入院后10 d内随机采血共48份,分离PMN,其中10例重症病人留血浆-20℃冻存备用。1处骨折且无脏器损伤病人20例,男12人,女8人,年龄为17~61岁(36.3岁),随机采血20份。对照组为10例健康男性献血员。

1.2 PMN的分离纯化及PMN单层小室培养

按文献[3]的方法。

1.3 胞内杀菌力(Intracellular Bactericidal Activity,ICBA)测定

吸取小室单层上液,加洗后绿脓杆菌(PA)103株细菌悬液($A_{525\,nm}=0.25$约为10^8 PA/ml)0.2 ml,37℃,15 min,按文献[5]的方法进行。

1.4 O_2^-水平($A_{567\,nm}^{NBT^-}$)

按文献[6]的方法进行,每个PMN培养小室加入0.5% NBT 0.1 ml,2 min后加0.1 ml死的PA,37℃,20 min(避光),福尔马林固定后用西德Leitz-MPV-3型显微分光光度计镜扫描50个PMN。(物镜×63,扫描栏0.05,电流8A,电压950 V,测定阈值low=1,7;mean=20)。

1.5 特殊颗粒(Specific Granule,SG)测定

按文献[7]的方法进行。

1.6 病人血浆补体对正常人PMN杀菌功能影响及其阻断试验

1.6.1 处理组 收集10例严重多处骨折病人早期(1~7 d)血浆,逐份进行试验,加单份上述血浆0.05 ml于正常人PMN培养单层处理6 h,观测前述各指标。

1.6.2 阻断组 仍用处理组的同份血浆,但事先按文献[3]的方法加等体积兔抗人C_3C_5血清(上海生物制品研究所)中和阻断,其后操作与处理组相同。

1.6.3 对照组 取10例健康献血员外周血,分纯PMN,分别培养,以1640培养液代替病人血浆,其它同处理组。

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

2 结果

2.1 严重多处骨折患者PMN测定指标的动态变化(见图1)

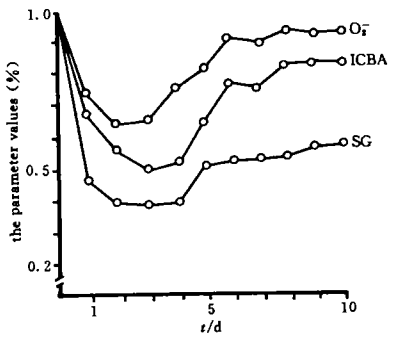


图1 多处骨折患者PMN测定指标的动态

Fig 1 The dynamic of parameters of PMN from multiple fractured patients

All the original value of parameters was transformed into normalized percentage

图1结果显示,伤后1～10 d PMN ICBA(各点)均下降,但1～4 d下降明显,最低点在3～4 d,第5天测值才开始明显上升,但仍低于正常对照测值。PMN胞内SG在3项指标测值中下降坡度最大,一直处于较低水平,第5天开始略有回升趋势。O_2^-水平动态的走势基本上与SG和ICBA的相似,但下降深度显然小些,第4天就开始回升。SG动态较O_2^-更贴近ICBA。3项指标测值之间相关显著($P<0.05$),ICBA与SG之间($r=0.9784$)较O_2^-之间($r=0.8752$)显著一些。

2.2 骨折严重程度与PMN各指标的动态关系(见图2)

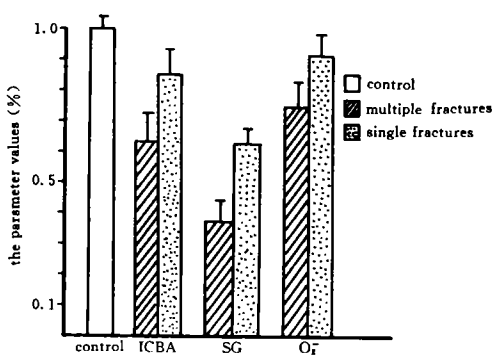


图2 多处骨折与一处骨折各指标比较

Fig 2 Comparison between the parameters of PMN from multiple and single fracture

All the original value of parameters was transformed into normalized percentage

图2结果所示,不论是多处还是一处骨折患者,各指标均有不同程度的下降,多处骨折患者PMN胞内各指标明显低于一处骨折的各指标测值($P<0.05$)。有并发症的重症病人PMN各指标测值显著低于无并发症病人各指标测值(见表1)。这说明PMN功能与骨折程度以及有无并发损伤有关。

表1 有并发症与无并发症的21例严重骨折病人各指标比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison between the parameters of PMN from complication and incomplication of 21 seriously fractured patients ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	ICBA (%)	O_2^- ($A_{630nm}^{NBT^-}$)	SG (%)
Complication	7	36.77±6.12	24.25±2.93	248.13±58.63
Incomplication	14	53.63±7.08	27.07±3.01	306.08±51.16

*: The visceral injury and infections complicated from multiple fractures in 7 patients

2.3 10份严重骨折病人血浆对正常人PMN功能的影响以及抗人C_3C_5血清的阻断作用(见表2)

表2 病人血浆对正常人PMN功能影响和AHC_3C_5S的阻断作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of patients' plasma on normal human PMN and the specifically blocking effect of AHC_3C_5S ($\bar{x}\pm s$)

Groups*	n	ICBA (%)	O_2^- ($A_{630nm}^{NBT^-}$)	SG (%)
Experimental G	10	48.26±4.66	26.94±3.41	236±28.67
Blocking G	10	61.57±4.47	32.47±4.12	398±24.66
Control G	10	73.38±3.30	34.76±3.25	630±42.00

*: refer to materials and methods

表2中结果表明,处理组的3项指标均低于正常($P<0.05$),这说明病人血浆削减了正常人PMN的部分杀菌功能。阻断组的3项指标测值也有所降低,但较处理组的高的多($P<0.05$)。这表明AHC_3C_5S能部分中和阻断病人血浆对PMN的不良影响。本文以净阻断率(阻断组测值的净降幅度/处理组测值的净降幅度)为其测度。此值越高,AHC_3C_5S阻断病人血浆对PMN不良影响的作用越大,被保留下来的O_2^-、SG和ICBA的值也就越高。各指标的净阻断率依次为O_2^-(70.71%)>ICBA(53.30%)>SG(41.12%)。

3 讨论

PMN在急性机会感染中至为重要,它的杀菌功能下降预示着急性全身感染将会发生。本实验结果证明,不论是一处骨折还是多处骨折,PMN胞内杀菌功能均降低,这与以往的资料基本相符[2],而且多处骨折各指标较一处骨折下降的显著(图2),并发内脏损伤和感染病人的各指标较无并发症的下降更多,各指标在伤后1～4 d下降更显著,随着病程延长各指标测值

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

逐渐回升，这说明严重创伤病人 PMN 杀菌功能的水平与创伤的严重程度和病程有一定关系。

导致 PMN ICBA 下降的原因是多方面的，旁路活化补体的作用是一个重要因素[1]。本实验还用了多处严重骨折病人的血浆处理正常人 PMN，使其 O_2^- 水平、SG 数目和 ICBA 均明显下降（表 2），然而 AHC_3C_5S 中和阻断这种血浆的作用，能把三大指标水平从处理组的低测值基础上提高了：ICBA(53.30%)、O_2^-(70.71%)、SG(41.12%)。AHC_3C_5S 的阻断试验从反面说明了严重骨折病人 PMN 杀菌力下降与旁路活化补体关系密切。但是，AHC_3C_5S 阻断作用不完全，其原因是尚有非 C_3C_5 碎片的 PMN 激活因子存在，如血清中的 C_{4a}、PAF、IgG-FC 复合物、LTB_4 和补体 C_{1q} 裂解片段[8]，另外，严重创伤应激反应伴生的多种应激激素[9]，例如其中的肾上腺皮质激素水平伤后明显升高，这对 PMN 功能有明显的抑制作用。

C_3C_5 碎片使 ICBA 下降的可能机理与后果。一般称 C_3C_5 碎片为过敏毒素，认为其生物学活性是引发过敏反应、休克和急性炎症并促进 PMN 胞内杀菌力。它如何降低 ICBA 的呢？旁路活化补体碎片 $C_{5a}C_{3b}$ 可与 PMN 膜上相应受体结合，诱发内传信号，激发膜上 NADPH 氧化酶，产生氧自由基，并能使 PMN 脱颗粒释放溶酶体酶，两者既杀菌又致炎[10]。作者过去的实验表明[3,11]：中等量旁路活化补体持续作用 2～6 h 以上，使 PMN 杀菌力降低，因为被处理的 PMN 在尚未遇上机会病原菌之前，就在内脏组织血管内聚集，胞内的杀菌致炎物质 O_2^- 和 SG 迅速大量排放至胞外，引起肺血屏障损伤；与此同时，胞内这两种杀菌物质消耗殆尽。此后吞入的病菌大多数未被杀灭，使病菌隐蔽下来，免受抗体、补体、抗生素和其它抗菌药物的杀伤，导致机会病原菌在 PMN 内增多。因此，尽早从循环中降低激活的补体碎片（$C_{5a}C_{3b}$ 等），尽早应用极效量氧自由基、溶酶体酶的清除剂，以预防其有害作用是急需进一步研究的课题。

参考文献

1 Gallinaro R, Cheadle WG. The role of the complement system in trauma and infection. Surg Gynecol Obstet, 1992; 174(5): 435

2 Maderazo EG, Albano SG. Polymorphonuclear leukocyte migration abnormalities and their significance in seriously traumatized patients. Ann Surg, 1983; 198(6): 736

3 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

4 汪正清，周善章. 补体在重度烧伤病人 PMN 吞杀绿脓杆菌力中的作用. 中华整形烧伤外科杂志，1995；11(3)：43

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

6 汪正清，胡福泉，周善章. 绿脓杆菌外毒素 A 对 PMN 功能的影响. 中华微生物学和免疫学杂志，1994；14(2)：100

7 Goldner M. Bacterial phagocytosis monitored by fluorescence and extracellular quenching ingestion and intracellular killing. Lab Med, 1988; 14(5): 294

8 Ninnemann JL, Ozkan AN. The immunosuppressive activity of C_{1q} degradation peptides. J Trauma, 1987; 27: 119

9 Deitch EA, Bridges RM. Stress hormones modulate neutrophil and lymphocyte activity in vitro. J Trauma, 1987; 27: 1146

10 汪正清，周善章. PMN 的杀菌机理及其与补体的影响. 国外医学：外伤与外科基本问题分册，1992；3：153

11 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(特别 11 号)：64

（收稿：1995-09-19；修回：1996-04-13）

（编辑　冷怀明、汪勤俭）

The role of complement in the decrease of intracellular bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophils in patients with severe fracture

Wang Zhengqing, Zhou Shanzhang, Liu Qifu (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Xuan Jinghong (Department of Microbiology, Chongqing Pharmaceutical Secondary School, Chongqing, 630030)

Abstract Sixty-eight samples of venous blood were collected from 41 patients with either single or multiple fracture and the level of intracellular bactericidal activity (ICBA), superoxide free ions (O_2^-) and specific granules (SG) in the isolated polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were determined. The effects of the

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

plasma from patients with bone fracture on the ICBA, O_2^- and SG of normal PMNs and the specific blocking efficiency of anti-human C_3C_5 serum (AHC_3C_5S) on the harmful plasma of patients with bone fracture were studied in vitro. The findings were as follows: (1) The level of ICBA, O_2^- and SG was lower in the bone-fracture patients than in the normal ($P<0.05$) on the 1st to 10th day after fracture and the level was the lowest on the 1st to 4th day after fracture. (2) The level of ICBA was significantly correlated to that of O_2^- and SG. (3) The patient's plasma markedly reduced the reserve of ICBA, O_2^- and SG in the normal PMNs while AHC_3C_5S could partially ameliorate the reduction of the reserve of ICBA by 53.30%, O_2^- by 70.71% and SG by 41.12%. These findings suggest that the fragments of C_3 and C_5 are the direct factors to decrease ICBA of PMNs. Persistent action of C_3 and C_5 fragments might result in the escaping of the bactericidal O_2^- and SG from the cells responsible for the phagocytosis of pathogens. Our findings may be useful in the prevention and treatment of the complicating systemic infections in patients with bone fracture.

Key words complement; superoxide ion; specific granule; intracellular bactericidal activity; fracture

实验性肝动脉 Cobra 导管插管简介

Catheterization of hepatic artery in dogs

邹利光 李 江 (第三军医大学附属新桥医院放射科) 重庆,630037

随着肝癌介入性诊断及治疗的广泛开展,因肝动脉插管操作不当而导致诊治受挫亦不少见,进一步提高插管技术,选择适当的导管等亦受到了普遍的关注。利用犬肝动脉插管注入造影剂及其他药物进行有关生理生化及病理学研究也逐渐增多[1,2],本文总结15只正常犬肝动脉插管技术,以利于更好地开展肝脏病变的介入性诊治。

1 材料与方法

杂种犬15只,体重9.5~17 kg,术前禁食8 h,用戊巴比妥钠20 mg/kg静脉麻醉后,选用5F Cobra导管,经股动脉切开或穿刺插入至腹主动脉腹腔动脉开口前方,行非选择性腹主动脉腹腔动脉造影,再超选择性插管至肝总或肝固有动脉,手推造影剂行数字减影动脉造影术(DSA)或摄缩影片,再进行其他药物注射等实验操作,最后拔出导管,伤口加压包扎,用青霉素320万u/d,共3 d,以预防感染。

2 结果与讨论

本组动物均成功地经股动脉插管,超选择性插管至肝总动脉,13只犬观察到实验预定时间,1只犬插管时损伤腹腔动脉干,胰腺周围血肿,另1只犬拔管后股动脉加压包扎止血不成功,右侧髂窝血肿,这两只犬均于手术当天死亡。

腹股沟韧带下方股三角内股动脉较浅表,是常用插管部位。本组15只犬,13只体重10 kg以上的犬均采用Seldinger技术穿刺插管成功,2只体重10 kg以下的犬穿刺不成功而行股动脉切开插管成功。穿刺插管操作简便,拔管后可压迫止血,穿刺侧后肢功能不受影响。切开插管操作较繁,拔管后往往需结扎该动脉,切开侧后肢跛行,站立不稳。所以利用犬行动脉插管实验时,应选用体重较重者(10 kg以上),尤其需反复多次插管,观察时间较长者。

腹腔动脉是犬腹主动脉腹部第一大分支[3],其起始部位在第13胸椎(犬最后一胸椎)水平,本组15只犬腹腔动脉开口最前者为胸13椎体前1/3,最后者为胸13腰1椎间隙,开口位于胸13椎体前1/3者6只,中1/3者3只,后1/3者6只。腹腔动脉干起始后稍向下走行即分为三支:肝总动脉、脾动脉和胃左动脉,肝总动脉向前稍偏右走行,分出胃十二指肠动脉后,肝固有动脉向右下至肝门分为肝左右动脉,肝左动脉往往较右支粗大。

本组肝动脉超选择性插管均采用Cobra导管,由于其尖端双弯塑形,很容易插至腹腔动脉,而肝总动脉是由后向前走行,导管稍加扭力,即可超选择性插管至肝总动脉,甚或进入肝固有动脉及左右分支。超选择性插管过程中应注意,由于犬动脉管壁较薄,导管施加扭力时不能太大,否则易损伤血管壁,导致腹膜后血肿,甚至大出血。RH导管需送至主动脉弓打袢,且超选择性插管较困难,用于犬肝动脉插管不及Cobra导管。

拔管后股动脉有效的止血,对保证实验成功也非常重要。

关键词 肝;动脉插管;犬

中图法分类号 R657.3;R735.7

参考文献

1 石 兰,张克随.碘化油肝动脉造影的实验研究.中华放射学杂志,1992;26:615

2 董 志,刘兴弟,徐兰玮等.顺铂-乙基纤维素微囊犬肝动脉栓塞的实验研究.中华放射学杂志,1993;27:331

3 施新猷.医学动物实验方法.北京:人民卫生出版社,1980:184

(收稿:1995-10-20;修回 1996-04-20)

(编辑 张大春)

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