DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.011

大鼠5 Gy照射复合15%Ⅲ度烧伤后中性粒细胞吞噬功能变化及其机理研究

舒崇湘 陈宗荣 王松宝 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室) 630038

提 要 大鼠5 Gy ^{60}Co γ射线全身照射复合15%TBSAⅡ度光辐射烧伤后:(1)对外周血中性粒细胞(PMN)数量和血清C_3调理活性抑制作用较小,而对PMN本身的吞噬功能抑制作用较大;(2)PMN吞噬功能降低可能是由于PMN C_3受体表达减少,还原型辅酶Ⅰ(NADPH)氧化酶和髓过氧化物酶(MPO)活性降低及SOD活性增高等因素所致;(3)PMN MDA含量显著增高,并与PMN-CL降低显著相关,提示PMN功能损伤与脂质过氧化的损伤作用有关;(4)两伤复合后第14天对PMN吞噬功能的抑制作用具有加重效应;而伤后第21天,复合伤组PMN吞噬功能显著高于放射损伤组,提示两伤复合后,烧伤对复合伤PMN功能恢复有刺激作用。

关键词 放烧复合伤;嗜中性白细胞;受体,补体;过氧化脂质类

中图法分类号 R818

以往研究表明,放射损伤复合烧伤后比单伤的死亡率显著增高,其主要原因之一是复合后机体对微生物的易感性增高、感染提早、加重。然而,目前对放烧复合伤后的机体免疫状态的文献报道较少,且少深入其机理研究。中性粒细胞(PMN)在机体的抗感染免疫过程中占重要地位。本文以大鼠5 Gy ^{60}Co γ线全身照射复合15%TBSAⅢ度光辐射烧伤为模型,探讨了放烧复合伤后大鼠外周血PMN数量、吞噬功能以及血清补体C_3调理功能的变化,并从PMN C_3受体、还原型辅酶Ⅰ(NADPH)氧化酶、铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)、髓过氧化物酶(MPO)及脂质过氧化效应等方面初步探讨PMN功能变化的机制,并与单纯放射损伤和单纯烧伤进行比较,讨论了两伤复合后的特点。

1 材料与方法

1.1 动物及致伤方法

实验采用健康雄性wistar种大白鼠,体重200~300 g,由四川中药研究所动物室提供。放射组用^{60}Co γ源行一次性全射照射,距离2.8 m,照射量率0.1517 Gy/min,总剂量为5 Gy。烧伤组将动物背部剪毛,乙醚轻度麻醉后用5 kW溴钨灯,距离50 cm,预热40 s后光辐射28 s造成背部皮肤15%TBSAⅡ度烧伤(病理切片证实)。放烧复合伤组先照射后烧伤,间隔时间不超过40 min,方法同上。

1.2 试剂与仪器

Percoll (d=1.130,Sigma)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP,Fluca,AG)、酵母多糖(Zymosan,Serva)、还原型辅酶Ⅰ(NADPH,Sigma)、超氧化物歧化酶(SOD,Sigma)、其它试剂均为国产分析纯。主要仪器有荧光分光光度计(MPF-4型,日立)、生物化学发光测量仪(SHG-Ⅰ型,上海标准计量局实验工厂)。

1.3 观察指标及方法

实验以大鼠尾静脉血作白细胞计数分类,分别用正常对照组和各伤组大鼠血清调理酵母多糖,用Percoll液按Giudialli氏法[1]分离大鼠外周血PMN,用化学发光法[2]测定PMN吞噬活性和血清C_3调理活性,荧光法[3]测定PMN丙二醛(MDA)含量,酵母-补体C_3复合物(YC)花环形成法[4]测PMN C_3受体的表达,Iverson氏法[5]测定PMN NADPH氧化酶活性,化学发光法[6]测定PMN SOD活性,Matheson氏法[7]测定PMN髓过氧化物酶(MPO)活性。

1.4 统计分析

采用本校数理统计教研室提供的医学统计程序包中的单因素方差分析(PDA-2),相关系数和显著性检验(PDA-3)程序,用Apple-Ⅱ微机处理数据资料。

2 结果

2.1 PMN计数变化

正常对照值为$4.93\pm1.05\times10^3/mm^3$,各伤组变化见图1。组间比较:伤后第1、28天复合伤组显著高于单放组和单烧组;伤后第7、14天,复合伤组显著高于单放组但显著低于单烧组($P<0.01$),伤后第21天组间无显著差异。

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

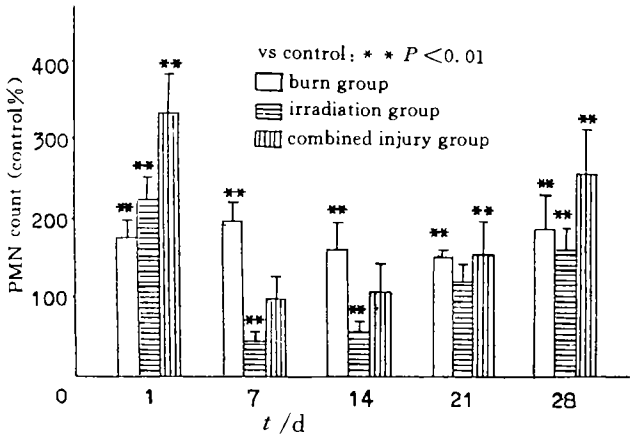


图 1　三种伤类伤后 PMN 计数变化

Fig 1　Dyamic changes of PMN count in three kinds of injury groups

2.2　PMN 吞噬化学发光(CL)峰值变化

正常对照值为 $3.86\pm0.26\times10^{-2}$ cpm/PMN·S^{-1}。各伤组变化见图 2。复合伤组于伤后第 1 天显著高于两单伤组、第 14 天显著低于两单伤组，第 21 天显著低于单烧组，但显著高于单放组（$P<0.01$），第 7 天与两单伤组相比无显著差异。

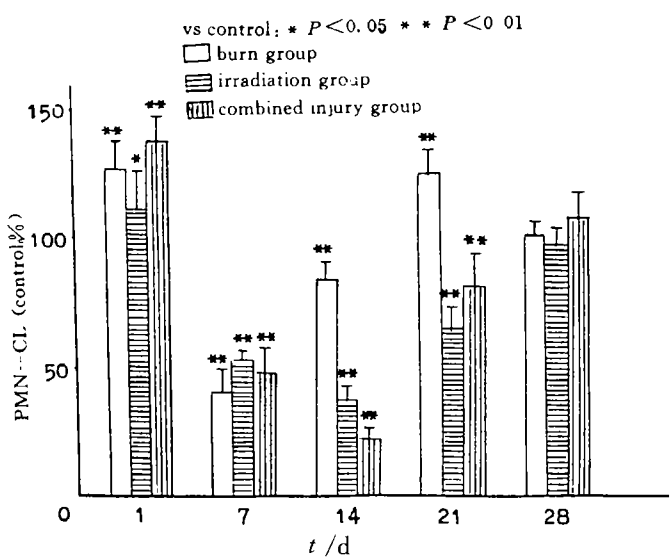


图 2　三种伤类伤后 PMN-CL 峰值变化

Fig 2　Dynamic changes of PMN-CL in three kinds of injury groups

2.3　血清 C_3 调理 CL 峰值变化

正常对照值为 $3.84\pm0.27\times10^{-2}$ cpm/PMN·S^{-1}。各伤组变化见图 3。复合伤组于伤后第 1 天显著低于单烧组、第 14 天显著高于单烧组（$P<0.01$）；但与单放组相比无显著性差异；其余时相点与两单伤组无显著差异。

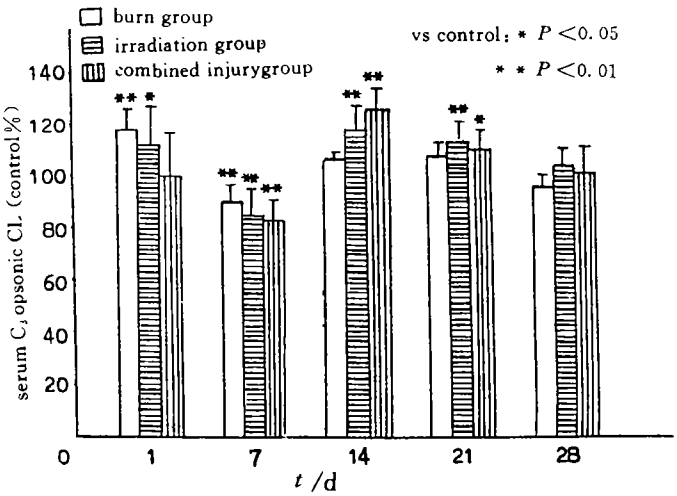


图 3　三种伤类伤后血清 C_3 调理 CL 峰值变化

Fig 3　Dyamic changes of serum C_3 opsonic CL in three kinds of injury groups

2.4　YC 花环形成率的变化

正常对照值为 60.2%±5.2%。各伤组变化见图 4。复合伤组于伤后第 7 天显著低于两个单伤组（$P<0.05\sim0.01$），第 14 天高于单放组低于单烧组（$P<0.01$），第 21 天显著高于单放组（$P<0.01$）。

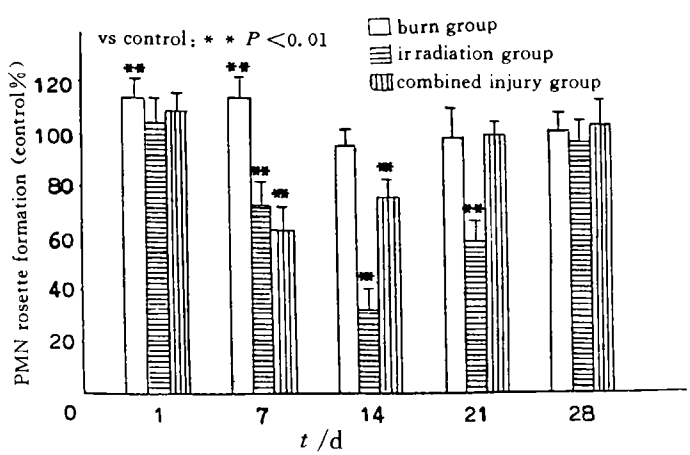


图 4　三种伤类伤后 PMN YC 花环形成率变化

Fig 4　Dynamic changes of PMN YC rosette formation in three kinds of injury groups

2.5　PMN NADPH 氧化酶活性变化

正常对照值为 $1.51\pm0.14\times10^{-5}$ nmol/L $NADP^-$/PMN·h^{-1}。各伤组变化见图5。复合伤组于伤后第7天显著高于单烧组、第14天显著低于两单伤组，第21天低于烧伤组但高于单放组（$P<0.01$）。

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

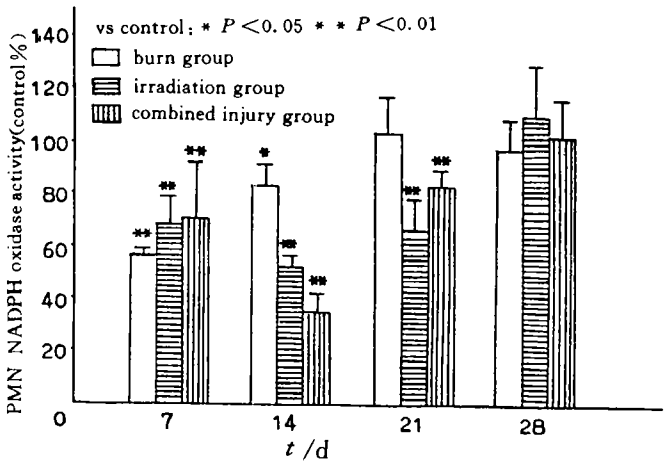


图5 三种伤类伤后 PMN NADPH 氧化酶活性变化

Fig 5 Dynamic changes of PMN NADPH oxidase in three kinds of injury groups

2.6 SOD 活性变化

正常对照值为25.2±3.3 U/mg 蛋白。伤后各伤组变化见图6。复合伤组于伤后第7天高于单放组($P<0.01$),第14天显著高于两单伤组($P<0.01$),第21天显著低于单放组($P<0.01$)。

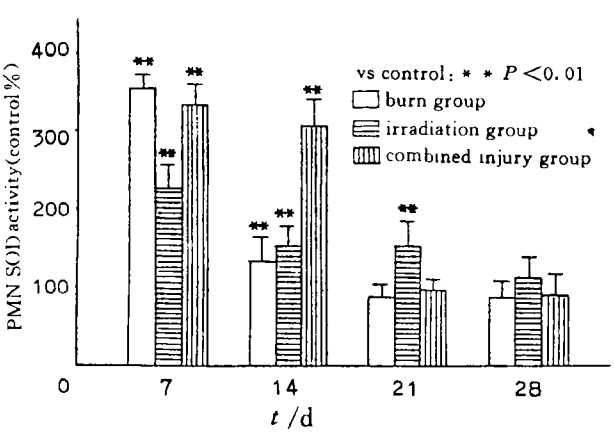


图6 三种伤类伤后 PMN SOD 活性变化

Fig 6 Dynamic changes of PMN SOD activity in three kinds of injury groups

2.7 PMN MPO 活性变化

正常对照值为37.7±3.2×10^{-5}相对活性单位/PMN·min^{-1}。各伤组变化见图7。复合伤组于伤后第7天低于单放组,第14天低于两单伤组($P<0.01$),第21天高于单烧组($P<0.01$)。

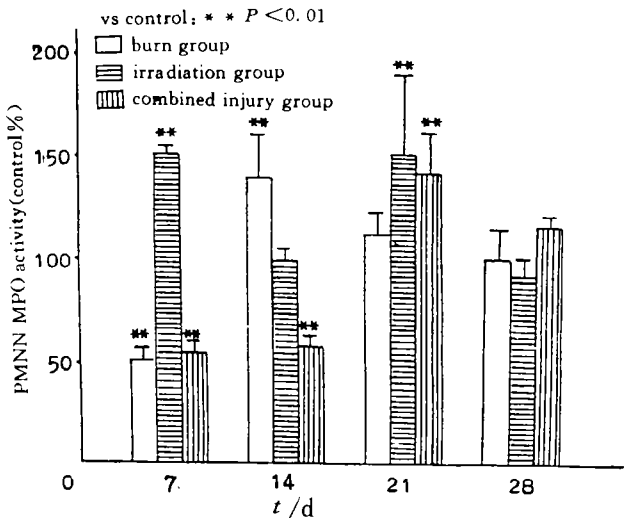


图7 三种伤类伤后 PMN MPO 活性变化

Fig 7 Dynamic changes of PMN MPO activity in three kinds of injury groups

2.8 PMN MDA 含量变化

正常对照值为0.370±0.032 nmol/L MDA/PMN,各伤组变化见图8。复合伤组于伤后第1、14、21天高于单烧组,第7天高于两单伤组($P<0.05\sim0.01$)。

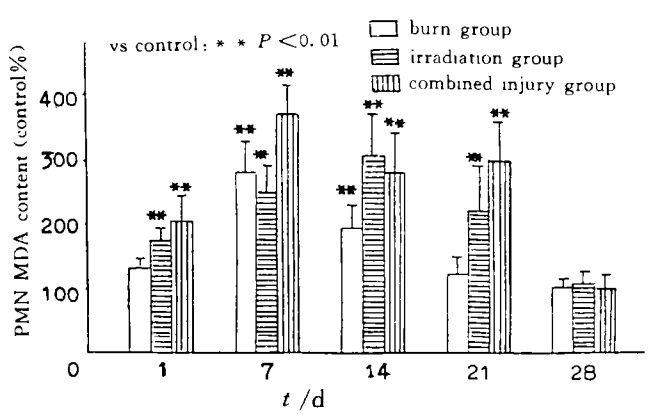


图8 三种伤类伤后 PMN MDA 含量变化

Fig 8 Dynamic changes of PMN MDA content in three kinds of injury groups

2.9 PMN 有关指标间的相关性分析

烧伤组 PMN-CL 变化与 NADPH 氧化酶、MPO、SOD 活性变化显著相关($r=0.8657$、0.5688、-0.8986,$P<0.0001$)。单放组 PMN-CL 变化与 C_3受体表达、NADPH 氧化酶、SOD活性变化显著相关($r=0.8811$、0.8307、-0.6573,$P<0.0001$)。复合伤组 PMN-CL 变化与 C_3受体表达、NADPH 氧化酶、MPO、SOD活性变化显著相关($r=0.7426$、0.8361、

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

0.7194、−0.8602，$P<0.0001$）。此外三种伤组PMN-CL降低均与PMN MDA含量增高相关（$r=-0.8136$、-0.8893、-0.6981，$P<0.0001$）。

3 讨论

3.1 PMN数量与质量变化规律及其相互关系

关于烧伤后PMN功能变化文献报道较多[8]，单纯照射后PMN吞噬功能变化也已有文献报道[9]；但复合伤后PMN吞噬功能变化尚未见文献报道。本文实验结果表明：5 Gy γ线照射复合15%TBSAⅢ度烧伤后，大鼠外周血PMN数量变化趋势与放射组相似，但在伤后第7、14天低于烧伤组、高于放射组。可见复合伤后PMN数量变化是以放射效应为主同时表现了两伤的复合效应。这种复合效应可能是放射复合烧伤后，虽然照射抑制造血，但烧伤则促进边缘池细胞释放到循环池，并使骨髓粒系细胞增生加速，释放入血增多[10]。

PMN-CL既反映了PMN的氧化代谢能力，也反映了其吞噬杀菌的能力。复合伤后PMN-CL值升降变化趋势与单放组大致相同，伤后第14天显著低于两单伤组，第21天则低于对照组和单烧组，但高于单放组；提示两组复合后，PMN功能主要受放射因素的影响；并在伤后第14天表现出两伤相互加重的特点；复合伤组在伤后第21天PMN功能恢复较放射组快，提示烧伤因素对放烧复合伤后PMN功能恢复具有刺激作用。

复合伤后PMN数量变化趋势是与单放组相似，但在所设时相点内并不显著低于正常对照组，而PMN-CL从伤后第7天下降至第28天才恢复到正常对照值水平，说明5 Gy γ线照射复合15%TBSA烧伤后，对大鼠外周血PMN吞噬功能的抑制效应大于数量效应。因而对于临床评估放烧复合伤患者的机体免疫杀菌功能不仅要观察PMN数量变化，更重要的是要注意PMN功能的变化。

3.2 血清C_3调理CL与PMN-CL变化的关系

实验结果表明：伤后第7天、放烧复合伤组血清C_3调理CL活性受到抑制，从整体看，血清C_3调理功能降低势必影响PMN吞噬功能，但比较复合伤对血清调理功能和对PMN本身吞噬杀菌能力的影响，可见复合伤对血清C_3调理活性抑制作用较小，持续时间较短，而对PMN本身吞噬功能的抑制作用较强，持续时间较长。因而复合伤后PMN吞噬功能降低主要是由于PMN本身的变化所致。至于复合伤后第14、21天血清C_3调理活性增高，其机制尚待阐明。

3.3 PMN吞噬杀菌功能变化的可能机制

PMN的有氧依赖的杀菌过程包括了一系列的信息传递和酶反应的过程[11]，而对于膜受体依赖的激活因子而言，配体（C_3或IgG等抗体所包绕的微生物等）与PMN膜受体（如C_3或IgG受体）结合是细胞内外信息传递的关键的第一步。PMN膜受体识别相应配体并与之结合后，通过细胞内信息传递激活NADPH氧化酶，催化分子氧（O_2）生成超氧阴离子（O_2^-）；O_2^-经SOD催化生成H_2O_2；H_2O_2可经MPO催化生成·OH、$HClO^-$、$^1O_2$等活性氧自由基，也可经过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶代谢生成H_2O_2；所生成的O_2^-和这些自由基具有杀菌作用，并释放光子产生PMN-CL。上述任一环节障碍均可导致PMN吞噬杀菌功能障碍，并伴随PMN-CL值变化。5 Gy γ线照射复合15% TBSA烧伤后第7、14天PMN C_3受体表达减少，NADPH氧化酶活性和MPO活性降低，PMN CuZn-SOD活性增高，伤后第21天NADPH氧化酶活性仍显著低于正常对照值，且这4项指标的变化均与PMN-CL峰值降低显著相关。由于伤后PMN C_3受体表达减少使PMN识别和结合相应配体的能力降低，影响了PMN细胞内外信息传递，间接使PMN产生O_2^-等自由基能力降低；PMN NADPH氧化酶是PMN呼吸爆发的关键酶，此酶活性下降直接使PMN产生和释放O_2^-减少，PMN CuZn-SOD活性升高使PMN释放O_2^-减少，而MPO活性降低使·OH、$HClO^-$、$^1O_2$等活性氧自由基产量减少；总之伤后C_3受体表达减少、NADPH氧化酶活性和MPO活性降低、SOD活性升高等使PMN产生和释放O_2^-等自由基减少，这不仅表现出PMN-CL下降，同时也反映了PMN吞噬杀菌功能下降。因而上述四项指标变化是放烧复合伤后PMN吞噬杀菌功能降低的重要原因。

相关性分析结果提示：PMN NADPH氧化酶活性降低和SOD活性增高是三个伤类组伤后PMN吞噬杀菌功能降低的共同原因；C_3受体表达下降是单放伤和复合伤伤后PMN功能降低的共同因素；而MPO活性降低则是烧伤和复合伤伤后PMN功能降低的共同因素。可见放烧复合伤后，PMN吞噬杀菌功能变化的机制是既有烧伤的特点，也具有放射损伤的特征。

放烧复合伤组NADPH氧化酶和SOD活性酶伤后第14天分别显著低于和高于两单伤组，提示两伤复合伤第14天对PMN功能的加重抑制效应可能是由于加重了对NADPH氧化酶活性的抑制和对SOD活性的促进所致。伤后第21天复合伤组C_3受体表达和

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

NADPH 氧化酶活性显著高于单放组，SOD 活性显著低于单放组，提示放烧复合伤后烧伤对复合后的 PMN 功能恢复的刺激作用可能是通过促进 C_3 受体的表达、提高 NADPH 氧化酶活性及降低 SOD 活性等途径实现的。

3.4 PMN 脂质过氧化效应

放射损伤和烧伤均会导致机体内产生大量自由基，从而引起机体内的一系列病理变化。本文结果显示：5 Gy γ 线照射复合15%TBSA 烧伤后第1、7、14、21天，大鼠 PMN MDA 含量显著增加，提示放烧复合伤后 PMN 脂类发生了过氧化损伤。PMN MDA 含量升高与 PMN-CL 峰值降低呈显著负相关，提示复合伤后 PMN 脂质过氧化作用对 PMN 功能有损害作用。其机理尚不明了，从本实验结果看，可能与放烧复合伤的脂质过氧化效应影响了 PMN C_3 受体表达，使 NADPH 氧化酶和 MPO 活性降低，SOD 活性增高等因素有关。

（本文课题设计承蒙张邦燮教授和黄文华教授的指导，程天民教授审阅了本文，实验承楼淑芳、熊业等同志大力协助，谨致谢意！）

参考文献

1 Giudicelli J. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of percoll. J Immunol Methods，1982，54：43～46

2 Easmon CSF，Cole PJ，Williams AJ. The measuremet of opsonic and phagocytic function by luminol-dependent. Chemiluminescence Immunology，1980，41：67～74

3 Yagi K. Oxygen radicals in biological systems. Methods in Enzymology. Vol 105 Lester Pocker and Acad Mic Press NY，1984：P328～331

4 朱云风，郭寿延. 小鼠腹腔巨噬细胞表面 C_3b 受体观察. 上海免疫学杂志，1989，3(5)：262～265

5 Iverson D. Comparison of NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. J Clin Invest，1977，59(2)：282～290

6 李雪林. 培养细胞超氧化物歧化酶的化学发光测定法. 海军医学，1989，9(2)：15～16

7 Matheson NR，Wong PS，Travis J. Isolating and properties of human neutrophil myeleperoxidase. Biochemistry，1981，20：325～332

8 Bjerkues R，Vindennes H，Laerum OD. Altered neutrophil functions with large burns. Blood Cells，1990，16(1)：127～143

9 D' Alesandro MM. Canine neutrophil dysfunction following sublethal irradiation. Cytometry，1987，1(Suppl)：76

10 Euzenius K. Granulocyte kinnetios after thermal injury. Am J Clin Pathol，1973，60：377～342

11 Hurst HP. Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burns. Ann Rheum Dis，1987，46：265～396

（收稿：1994-04-18；修回：1994-12-28）

Studies of the changes of the phagocytic function of polymorphonuclear leucocytes and the mechaism after combined radiation-burn injury in rats

Shu Chongxiang，Chen Zongrong，Wang Shongbao（Department of Radiation Medicine，Third Military Medical University，Chongqing，630038）

Abstract After a combined injury of 5 Gy gamma-ray whole body irradiation and 15% TNSA full thickness burns，the inhibition on the number of peripheral polymorphonuclear leucytes (PMN) and serum C_3 opsoic capacity was not so large as that on the phagocytic function of PMN. The decrease of the phagocytic function of PPMNs might be due to the decrease of PMN C_3 receptor expressio，decrease of the activity of NADPH oxidase and MPO and increased after injury and there was a negative correlation of the increase of MDA content with the decrease of phagocytic function of PMNs，which implies that the decrease of phagocytic function might relate to lipid peroxidation damage on PMNs. The inhibition on phgocytosis of PMNs was aggravated on the 14th day after combied injury. Phagocytosis was more active on the 21st day after combined ijury than after simple radiation injury，which idicates that some factors of burn injury might be able to stimulate phagocytosis of PMNs.

Key words combined radiation-burn injury；recptor，complement；lipid peroxides；rats

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