DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.01.001



论 著

# 烟雾吸入伤家兔血中性粒细胞游离钙的变化及粉防己碱的作用

张 敏 黎 鳌 杨宗诚 黄钺华* （第三军医大学西南医院 烧伤研究所）630038

**提 要** 本文探讨了血中性粒细胞（PMN）游离钙水平〔$Ca^{2+}$〕$_i$的变化与烟雾吸入性损伤的关系，同时还观察了钙拮抗剂粉防己碱对游离钙水平的影响与减轻吸入伤作用的关系。发现致伤后，血PMN数目有一短暂下降后持续升高，支气管肺泡灌洗液中PMN数目却明显增加，血PMN〔$Ca^{2+}$〕$_i$水平也明显增加。粉防己碱可以减少肺内PMN数目，降低血PMN〔$Ca^{2+}$〕$_i$水平，并且减轻吸入性损伤。提示PMN的活化与吸入伤的病理生理改变密切相关，粉防己碱可能是通过降低PMN〔$Ca^{2+}$〕$_i$水平，调节PMN功能，发挥其治疗作用。

**关键词** 灼伤，吸入性；嗜中性白细胞；钙；粉防己碱；兔

吸入性损伤无论在战时和平时都较常见，其伤情复杂，死亡率高。动物实验和临床研究表明，吸入性损伤的主要死亡原因是肺水肿导致的呼吸功能衰竭；而血中中性粒细胞(PMN)的肺部聚集、激活及释放各种炎症介质、蛋白水解酶等则可能与此种肺水肿的形成有关[1]。$Ca^{2+}$是PMN刺激分泌偶联中不可缺少的物质，一些影响钙代谢的药物都有可能调控PMN的功能，从而可减轻炎症反应和防止肺水肿的发生，有助于吸入伤的治疗。本研究的目的除进一步探讨PMN〔$Ca^{2+}$〕$_i$的变化与吸入伤的关系，同时也探讨了粉防己碱（Tetrandrine，Tet）的作用机制和应用前景，试图为吸入伤的治疗提供一可能的新途径。

## 1 材料与方法

动物分组及致伤：健康雄性家兔30只，体重2.0～2.5kg，随机分成正常对照组、致伤对照组和治疗组。动物致伤采用本所的家兔烟雾吸入伤模型。分别在伤前以及伤后2、6、12、24、48、72h和7 d取耳动脉血，行白细胞计数及分类；分离PMN，测定其〔$Ca^{2+}$〕$_i$水平。伤后24h，活杀一批动物，取气管及肺组织，测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞计数及分类，同时行病理检查。治疗组动物在致伤10min后，从耳缘静脉缓推Tet（7.5mg/kg），此后，每12h一次，共3次。致伤对照组给予5%葡萄糖氯化钠（2 ml/kg）。正常对照组动物，除不致伤，不给药外，其余步骤同致伤动物。

主要药品试剂及仪器：粉防己碱（粉剂，浙江金华制药厂），Fura-2及Fura-2/AM（中国医学科学院药物研究所），Percoll细胞分离液(Percoll液，华美生物工程公司进口分装），其余试剂均为分析纯级。F-3010荧光分光光度计（HITACHI），超纯水器（美国Millipore）。

测定指标及方法：（1）血白细胞计数及分类：常规方法。（2）BALF中白细胞计数及分类：用40ml生理盐水，分3～4次灌洗左肺，收集全部灌洗液，行白细胞计数及分类。（3）PMN〔$Ca^{2+}$〕$_i$水平的测定[2][3]：取不同时相点全血，用Percoll液分离得PMN(比例>90%，活力>95%)；用无钙Tyrode缓冲液冲洗两次，调整细胞数目至$5\times10^6$个/ml；取2 ml细胞悬液，加入Fura-2/AM和牛血清白蛋白，使终浓度分别为2.5μmol/L和0.1%（W/V），37℃

* 第三军医大学药理教研室

21994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缓摇温解30min；1 000rpm×10¹，沉淀用无钙Tyrode缓冲液冲洗一次，重悬在2 ml该缓冲液中，37℃温解10min后即行测定。测定条件：先将发射光波长固定在500nm，激发光光栅和发射光光栅均为10nm，扫描激发光光谱，若最大吸收峰在340nm，说明Fura-2/AM已进入细胞；固定激发光波长为340nm，测定无$Ca^{2+}$、1mmol/L$Ca^{2+}$时的荧光强度加入TritonX-100(0.1%，20μl)破坏细胞膜，测定最大荧光强度(Fmax)，再加入9mmol/LEDTA-$Na_2$（用Tris调pH>8.7）络合全部$Ca^{2+}$以测定最小荧光强度（Fmin）另设空白对照管测定自身荧光强度。计算内钙浓度仍沿用quan-2的计算公式：$[Ca^{2+}]_i = kd\ (F-Fmin)/(Fmax-F)$，kd=224nmol/L。（4）气管及肺组织病理检查：光镜常规。

统计分析：实验数据用微机进行方差分析，结果用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

## 2 结　果

血白细胞数目及分类的动态变化：表1示致伤

表1　烟雾吸入伤家兔血白细胞计数的动态变化及Tet对其的影响（个/ml）

| 时间 | 对照组（$n=6$） | | 治疗组（$n=6$） | |
|---|---|---|---|---|
| | WBC | PMN | WBC | PMN |
| 0 | $9.26\pm1.01\times10^6$ | $5.24\pm0.51\times10^6$ | $8.58\pm1.26\times10^6$ | $4.49\pm0.71\times10^6$ |
| 2h | $6.44\pm1.18\times10^{6**}$ | $4.40\pm0.68\times10^6$ | $6.92\pm1.16\times10^6$ | $4.31\pm0.70\times10^6$ |
| 6h | $1.02\pm0.21\times10^7$ | $7.97\pm1.44\times10^{6**}$ | $9.23\pm1.13\times10^6$ | $6.95\pm0.86\times10^{6**}$ |
| 12h | $1.70\pm0.08\times10^{7**}$ | $1.34\pm0.08\times10^{7**}$ | $1.16\pm0.15\times10^{7**\Delta\Delta}$ | $9.04\pm1.11\times10^{6**\Delta\Delta}$ |
| 24h | $1.43\pm0.21\times10^{7**}$ | $1.01\pm0.18\times10^{7**}$ | $1.05\pm0.15\times10^{7\Delta\Delta}$ | $8.08\pm1.55\times10^{6**}$ |
| 48h | $1.32\pm0.22\times10^{7**}$ | $8.51\pm0.66\times10^{6**}$ | $1.04\pm0.18\times10^7$ | $7.40\pm1.52\times10^{6**}$ |
| 72h | $1.11\pm0.19\times10^7$ | $7.52\pm1.30\times10^{6**}$ | $8.15\pm0.73\times10^{6\Delta}$ | $5.45\pm0.74\times10^{6\Delta}$ |
| 7d | $9.14\pm0.82\times10^6$ | $4.95\pm0.73\times10^6$ | $6.87\pm0.69\times10^{6*\Delta\Delta}$ | $4.10\pm0.25\times10^{6\Delta}$ |

* 与伤前值比较（0时相），* $P<0.05$，**$P<0.01$

$^\Delta$ 与对照组比较，$^\Delta$ $P<0.05$，$^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$

对照组家兔在烟雾吸入后，白细胞数目有一短暂下降（2h），此后明显升高，持续72h后逐渐回复至正常水平；治疗组白细胞数目在伤后2h也有一下降期，但在以后的上升期中增加水平低于致伤对照组。

BALF中白细胞数目的变化：表2示致伤对照

表2　伤后24h支气管肺泡灌洗液中WBC计数的变化（个/ml）

| | 正常对照组 $n=6$ | 致伤对照组 $n=6$ | 治疗组 $n=6$ |
|---|---|---|---|
| WBC | $2.07\pm0.35\times10^5$ | $4.03\pm1.40\times10^{5*}$ | $2.89\pm0.85\times10^5$ |
| PMN | $7.59\pm2.67\times10^3$ | $8.96\pm3.40\times10^{4**}$ | $4.42\pm2.29\times10^{4**\Delta\Delta}$ |

* 与正常对照组比较　* $P<0.05$，** $P<0.01$

$^\Delta$ 与致伤对照组比较　$^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$

组伤后24h，BALF中白细胞总数明显增加，中性粒细胞比例也明显增加；治疗组白细胞总数及中性粒细胞比例增加均低于致伤对照组。

PMN $[Ca^{2+}]_i$水平的动态变化：致伤对照组家兔在吸入烟雾后，血PMN $[Ca^{2+}]_i$水平明显升高，6h达到高峰，72h接近正常水平，给药组PMN $[Ca^{2+}]_i$水平虽有所增加，但低于致伤对照组，并且48h已回复至正常水平（见表3）。

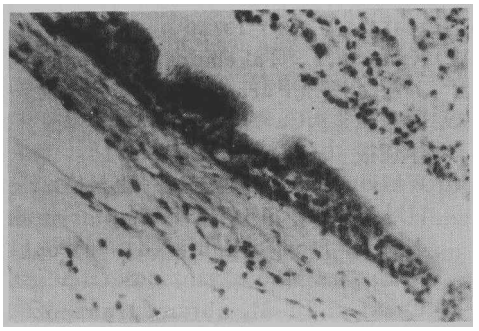
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表3　吸入伤家兔血PMN胞浆游离钙的动态变化及Tet对其的影响（nmol/L）

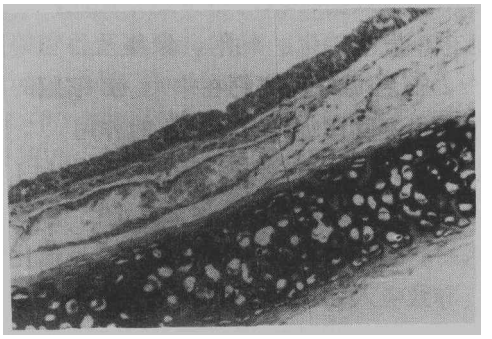
| 时　间 | 对照组 $n=5$ | 治疗组 $n=5$ |
|---|---|---|
| 0 | 183.8±22.3 | 195.0±32.0 |
| 2h | 218.0±89.0 | 199.0±72.0 |
| 6h | 442.6±216.0* | 315.0±132.9 |
| 24h | 356.8±104.7* | 300.9±83.0* |
| 48h | 292.0±78.7* | 179.9±94.2 |
| 72h | 231.9±97.1 | 219.2±112.9 |
| 7d | 278.9±93.0 | 176.3±55.3 |

* 与伤前值比较。　* $P<0.05$

气管及肺组织病理改变：光镜下，见致伤对照组伤后24h的气管及肺呈现不同程度的充血、出血、水肿和PMN浸润（见图1），治疗组的病变相似，但程度较轻（见图2）。



A

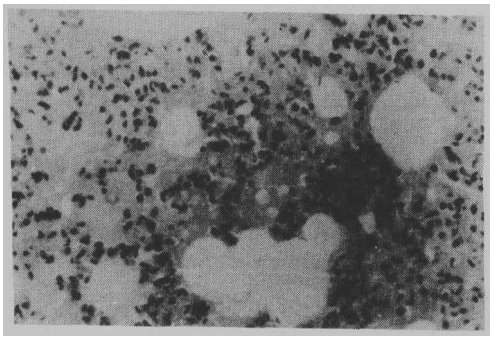


B

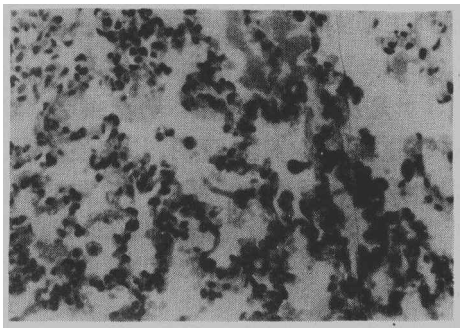
图1　烟雾吸入伤家兔气管病理改变及粉防己碱对其的影响

A．伤后24h，可见气管上皮局灶性坏死及脱落，粘膜下水肿，中性粒细胞浸润和管腔内大量渗出物。HE×200

B．给予Tet治疗后，上皮坏死及脱落，中性粒细胞浸润和渗出等病变明显减轻。HE×100



A



B

图2　烟雾吸入伤兔肺组织病理改变及粉防己碱对其的影响

A．伤后24h，可见明显的肺泡内水肿和大量中性粒细胞浸润。HE×200

B．用Tet治疗后24h，肺水肿及中性粒细胞浸润明显减轻。HE×400

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

## 3 讨 论

本实验发现，致伤对照组家兔在烟雾吸入后，血中白细胞数目先有一暂时性降低，此后3天内维持较高水平；24h活杀的动物，见BALF中白细胞数目及中性粒细胞比例明显增加，病理检查示气管及肺组织充血、出血、水肿和大量中性粒细胞浸润。提示烟雾吸入后可使大量中性粒细胞在肺部滞留，导致了血中白细胞数目的暂时下降，而滞留在肺部的大量中性粒细胞的活化，正如其他学者所指出的那样，可能参与了吸入伤肺部损害的发生和发展过程[1]。

中性粒细胞可以与多种配体反应，导致其活化，发生趋化、粘附、聚集及吞噬等反应[4]，而胞浆内游离钙在中性粒细胞的活化过程中却发挥着第二信使的作用[5]。本实验发现，家兔在致伤后2h，$[Ca^{2+}]_i$已开始上升，6h达高峰，伤后3d已接近伤前水平，提示中性粒细胞在致伤后呈活化状态。导致吸入伤动物PMN内钙水平增加的原因，一方面可能是PMN受到有效刺激(如吞噬活动，炎症介质刺激等)，使细胞膜上钙通道开放，大量细胞外钙进入细胞或者内质网贮钙释放入胞浆；另一方面可能是缺氧引起的能量代谢障碍，钙转运失调引起内钙增加。细胞内钙增加的结果是启动细胞内的一系列生理生化反应，导致肺的进一步损害。

Tet是从防己科植物粉防己根中提取的有效成分[6]。本实验证明，Tet使BALF中白细胞数目明显减少；减轻气管和肺组织的炎症与水肿改变。同时，Tet也抑制血中性粒细胞$[Ca^{2+}]_i$水平的升高（表3）。洪氏等[7]的研究证明，Tet可以抑制白三烯$B_4$、血小板活性因子、$A_{23187}$等引起的中性粒细胞内钙水平增加，提示Tet有抑制中性粒细胞活化的作用，这可能是Tet减轻吸入性损伤的作用机理之一。

## 参 考 文 献


1. 王敦黎 整 杨宗诚，等。粒细胞在犬烟雾吸入性肺损伤中的作用。第三军医大学学报 1990；12（2）：117
2. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of $Ca^{2+}$ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Bio Chem 1985；260（6）：3440
3. Kwan CY, Takemura H, Putney Jr JW. 用荧光Fura-2连续测定大鼠泪腺细胞胞浆内$Ca^{2+}$浓度的变化。中国药理学通报 1989；5:384
4. Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. N Engl J Med 1980；303（1）：27
5. Carafoli E. Membrane transport in the messenger function of calcium. In：Advances in immunopharmacology 3. Proceedings of the third international conference on immunopharmacology. Florence, Italy. 1985：101～107
6. 江纪武 肖庆祥。植物药有效成分手册。北京：人民卫生出版社，1986：1037～1038
7. 洪巨伦 周汉良 卞如源。粉防己碱对大鼠啮中性白细胞胞浆游离钙的影响。中国药理学报 1989；10（6）：533


（收稿：1991-04-25；修回：1991-09-10）

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

# Therapeutic effects of tetrandrine on the changes of cytosolic free calcium of neutrophils after smoke inhalation injury in rabbits

Zhang Min, Li Ao, Yang Zongcheng, et al (Research Institute of Burn, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

**Abstract** The changes of cytosolic free calcium in the peripheral neutrophils after the rabbits were exposed to smoke inhalation were observed and the ptherapeutic effects of tetrandrine—a calcium antagonist— on the level of free calcium and on the injury also studied. It was found that the number of neutrophils increased significantly in the peripheral blood after a transient drop and it also increased in the bronchoalveolar lavage fluid. The level of free calcium in the neutrophils were increased at the same time.

Tetrandrine could reduce the number of neutrophils in the lungs, the calcium level in the neutrophils, and the severity of inhalation injury.

The findings suggest that there is a close relationship between the activation of neutrophils and the pathophysiological manifestations of smoke inhalation injury, and tetrandrine can exert certain therapeutic effects on smoke inhalation injury through reducing the level of cytosolic free calcium in the neutrophils to modulate their functions

**Key words** burns, inhalation; neutrophils; calcium; tetrandrine; rabbits

# 学员检查吞噬细胞吞噬作用实验的改进

艾亿龄 占春雷 何凤田（第三军医大学训练部 微生物学教研室）630038

吞噬细胞（主要包括血液中的嗜中性粒细胞，大单核细胞和组织中的巨噬细胞）吞噬作用的检查是非抗原特异性免疫实验中主要的内容之一，也是微生物学教学中学生需要操作的实验。以往是由学生扎自己的手指尖后挤出血液从而获得嗜中性粒细胞，常因扎血技术不熟练而得到的血液较少或取不到血液，难以获得足够的嗜中性粒细胞，所以大多数学生做不出阳性结果。针对这一情况，经摸索，改用医院检验科做试验后的废血代替由指尖取血，从而获得丰富的具有活性的嗜中性粒细胞，并可减少学生扎手指的痛苦，简化操作程序，既省时又省器材，95%以上的学生都可得到阳性结果。现将方法介绍如下：

## 1 材 料

1.1 肝素抗凝血（收集医院检验科做试验剩下的废血）1000rpm离心8 min，使血浆与血球分离；

1.2 菌液：葡萄球菌菌液50亿/ml，加热100℃15 min，冷却放4～8℃冰箱内备用；

1.3 小试管、毛细滴管、乳头、载玻片等；

1.4 甲醇、快速染色液。

## 2 方 法

用毛细滴管取肝素抗凝血的血浆与红细胞交界处的白细胞层液，放于一小试管内，再加入1/10量的葡萄球菌菌液，摇匀，放37℃水浴孵育15～20 min后，摇匀，用毛细滴管取一小滴放载玻片上，制成血薄膜涂片，自然干后，加两滴甲醇固定，用快速染色液染色，干后，油镜检查。

（下转9页）

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