DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.04.006



# 旁路活化补体降低 PMN 吞杀绿脓杆菌力的实验研究

汪正清 周善章 (第三军医大学训练部微生物学教研室) 630038

**提 要** 为证明论题,本文做了 3 项实验:(1)人血 PMN 培养单层加上酵母多糖活化人血清(ZAHS)。PMN 的超氧离子($O_2^-$)、特殊颗粒(SG)与胞内杀菌力(ICBA)明显平行下降,于 6 h 最低,0.05 ml 的作用最强。(2)经小鼠尾静脉注射 0.5ml ZAHS/鼠,6 h 后活杀。肺和血内 PMN 的上述指标均明显降低;肺内病变明显:急性间质炎,灶性水肿出血和萎陷,肺血屏障亚微结构损伤。(3)经抗人 $C_3$、$C_5$ 血清($AHC_{3,5}S$)体外中和的 ZAHS,在体内外实验中均失去其有害作用。提示:ZAHS 的有害作用与 $C_3$、$C_5$ 碎片有关,在剂量适中且吞菌前作用时间较长的条件下方显极效。有害作用的可能机制:杀菌且能致炎的 $O_2^-$ 与 SG 大多已于吞菌前排放在胞外,所以 PMN 的 ICBA 下降;累积于组织内的则损害 PMN 自身及其邻近的肺血屏障。这便于 MOF 与感染发生。

**关键词** 酵母多糖;补体成分;超氧离子;免疫血清;杀菌力

一般重视补体调理病菌、促进 PMN 胞内杀菌的防卫功能。但有时它也起促退作用,如在严重烧伤[1][2]和一些外科重症[3]:早期血内 $C_3$ 下降而过敏毒素增多;稍后,血内 PMN 数目、氧耗和吞杀病菌的能力也降低;MOF 生化指标上升;周后血培养阳性。又如重度呼吸道烧伤犬[4],左心血内过敏毒素于伤后 1 h 超过正常,4 h 到高峰,同时出现急性间质肺炎;6 h 肺内菌量增多[5]。上述现象的内在因果联系、发生条件与机制未见报道。本文用体外实验证明论题并找出 ZAHS 的极效剂量与作用时间。然后在小鼠体内验证上述结果并观察肺内病变。最后用 $AHC_{3,5}S$ 做中和阻断试验反证。

## 1 材料与方法

### 1.1 指标观测技术

1.1.1 ICBA(Intracellular Bactericidal Activity)[6]:绿脓杆菌(PA)103 株肉汤培养,用 PBS 洗净后调浓度至 $10^8$PA/ml($OD_{525}=0.25$)。每个 PMN 单层培养小室($2\times10^6$PMN/ml)加 PA0.2ml,37℃×15min,用吖啶橙和龙胆紫复染,荧光镜下观测 100 个 PMN 内的死/活菌比值(活菌为绿色,死菌为亮红色)。

1.1.2 $O_2^-$(superoxid)[7]:每个 PMN 培养小室加入 0.1ml NBT(0.5%,DMF 助溶),2min 后加 0.1ml 死 PA,37℃×20min(避光),甲醇固定后在显微分光光度计镜(Letiz-MPV-3 型)扫 50 个 PMN 的 $\overline{OD}^{NBT}_{567nm}$(物镜 63×,扫描栏 0.05,电流 8A,电压 950V,测定阈值 Low=1,7,mean=20)。

1.1.3 SG(Specific Granule)[8]:培养小室内 PMN 用吖啶橙活染,置荧光镜下数 100 个 PMN 内的 SG 总数(以≥葡萄球菌大小的橙红色颗粒计数统计)。

1.1.4 常规病检:活杀小鼠,右肺定点采样,做光镜和电镜检查。

### 1.2 人 PMN 单层体外实验

1.2.1 ZAHS 极效剂量与作用时间的选择:按文献方法分离健康人 PMN[9]并建立单层培养[10],制备 ZAHS[11]。以 ZAHS 的 6 种剂量(0.000,0.006,0.01,0.05,0.09,0.12ml)与 8 个作用时间(1,2,3,4,5,6,7,8 h)交叉组成 40 个实验点和 8 个对照点,每个点上分别观测 3 种指标,每种重复测 9 次求平均。把对照点的原始均值当作 100%,将各实验点的原始均值换算成归一化的百分数,据此绘制 ICBA、$O_2^-$ 和 SG 的三维动态示意图[12]。根据各图上的测值最低点找出了 ZAHS 的极效剂量与作用时间,所幸 3 张图上都在 0.05ml ZAHS×6 h 附近。

1.2.2 分组实验:实验、阻断和对照组各 30 例(不同人 PMN)。实验组每室加 0.05ml ZAHS,6 h 看结果;阻断组所加 ZAHS 须先在试管内中和(等体积 $AHC_{3,5}S$,37℃×15min,20 000rpm×40min)用量为

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

0.1ml，时间也是 6 h；对照组不加 ZAHS，其余同上。

### 1.3 小鼠体内实验

经尾静脉分别给 6 组 BALB/C 小鼠(20 g)注射不同量 ZAHS，每组为 10 只，6 h 后活杀。采全血和肺组织洗出的细胞悬液，分别用直接贴片法分离 PMN 并制备培养小室。按体外试验方法找出鼠体内 ZAHS 的 6 h 极效剂量为 0.5ml。分组实验也分 3 组，每组 20 只。实验组给 ZAHS 0.5ml/鼠，阻断组给已中和的 ZAHS 1.0ml，6 h 观测肺、血 PMN 指标和肺内病变。

### 1.4 统计分析

为缩小各批试验的误差和便于做各指标(3 种)动态之间的比较，原始数据都换算成归一百分数 。做 ICBA 与 $O_2^-$/SG 相关分析。原始数据还做了方差分析和 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 ZAHS 用量与作用时间对体外 PMN 的影响

2.1.1 ICBA 所受影响见图 A(归-化的百分数)所示的结果：小剂量(0.006ml)6 h 后 ICBA 才低于正常。中剂量(0.01～0.05ml)的指标先轻度上升，然后下降，0.05ml ZAHS 的影响最典型：动态曲线呈"S"形，全图的最低点在 6 h 处，之后略有回升。大剂量(0.09～0.12ml)测值开始就下降，6 h 以后下降反而不如 0.05ml 的深。

2.1.2 $O_2^-$ 所受影响的规式近似 ICBA，但不尽相同(图 B)：下降面显然浅些，最低点回升较快。

2.1.3 SG 的动态特点(图 C)：只降无升，下降面特深，大剂量域内也出现 ICBA 动态那样的反常现象，而且出现的早并显著。3 项指标测值之间也相关显著。ICBA 与 SG 之间较与 $O_2^-$ 间显著一些。

### 2.2 体内外分组实验结果(见附表)

**附表 物种、体内外环境和抗补体血清对 ZAHS 的影响**

| 组 别 | PMN 来源* | | $O_2^-(OD_{570nm}^{NBT})$ | SG % | ICBA % |
|---|---|---|---|---|---|
| 实验组△ | 人血源 | (30) | 20.90±4.06 | 37.00±3.08 | 19.18±1.27 |
| | 鼠血源 | (20) | 21.52±4.00 | 45.40±9.59 | 18.94±2.29 |
| | 鼠肺源 | (20) | 30.27±5.84 | 47.25±7.13 | 21.69±3.97 |
| 阻断组· | 人血源 | (30) | 32.14±5.79 | 571.00±36.38 | 63.50±5.03 |
| | 鼠血源 | (20) | 32.88±4.92 | 461.50±47.87 | 58.82±6.03 |
| | 鼠肺源 | (20) | 45.83±6.48 | 432.00±34.61 | 60.13±3.09 |
| 对照组 | 人血源 | (30) | 35.94±2.50 | 771.00±64.23 | 76.19±8.07 |
| | 鼠血源 | (20) | 36.53±5.29 | 653.60±63.02 | 69.10±4.26 |
| | 鼠肺源 | (20) | 50.96±14.76 | 615.00±45.01 | 71.33±3.58 |

*,△,·：见材料与方法

不同来源的 PMN 3 种指标测值，经纵横比较后表明：(1)实验组：尽管 PMN 的来源不同，但是它们的 ICBA 测值彼此接近，都明显低于对照组。提示在体内外、肺组织和外周血的环境中，极效量的 ZAHS 同样在起不良作用。$O_2^-$ 与 SG 测值的分布与上述相似，但 3 种指标测值的下降水平有高低之分，SG 平均下降 94%，ICBA 为 74%，$O_2^-$ 为 51%。这提示 ICBA 的下降与 SG 下降的关系较 $O_2^-$ 更密切(图 D)。(2)阻断组的测值分布也较接近，而且都高于实验组的相应水平($P<0.05$)，SG 最显著，ICBA 次之，但 3 项指标仍然低于对照组相应水平。这提示 $AHC_{3,5}S$ 是起了中和阻断作用，但尚不完全，SG 回升到正常对照的 65%，ICBA 回升 56%，$O_2^-$ 回升 30%。

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

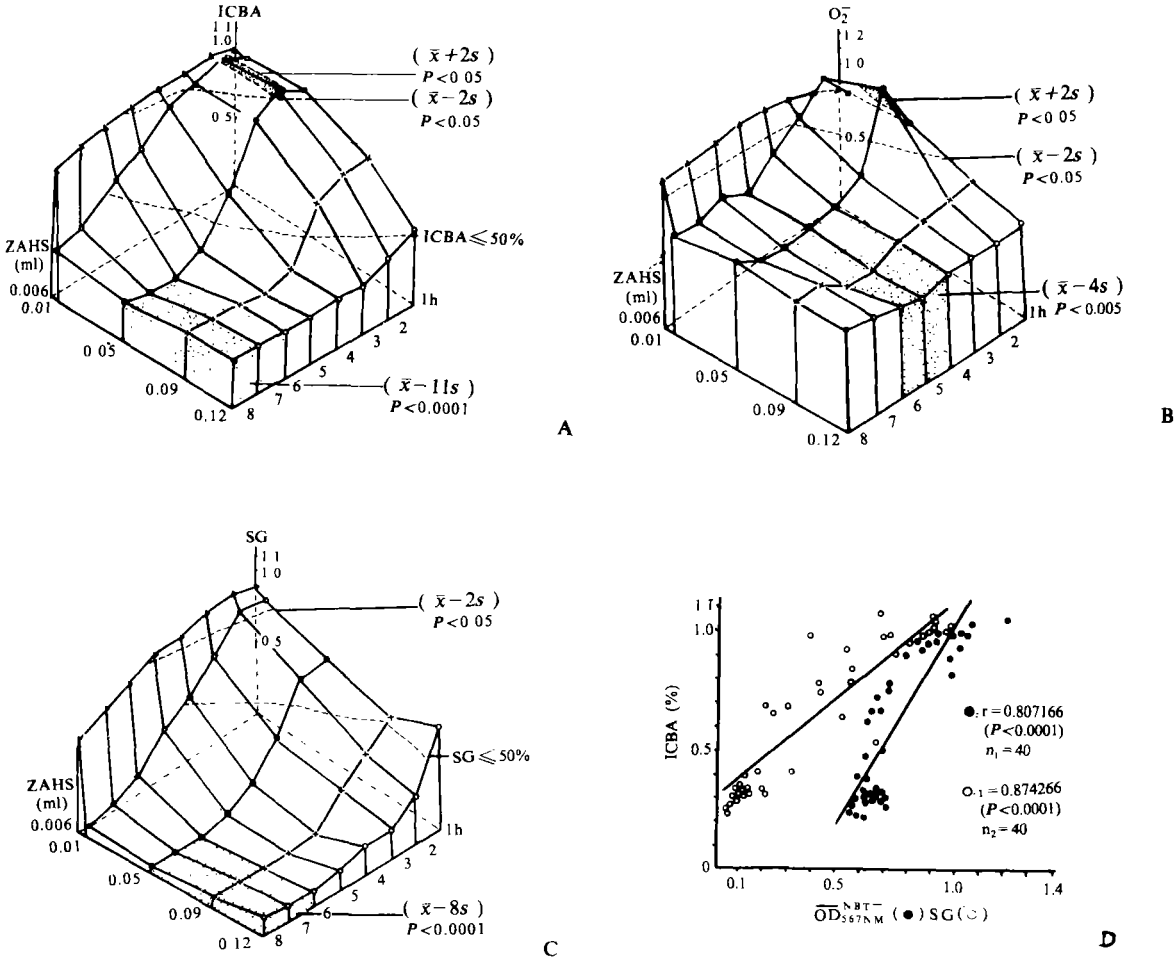



图 A (ICBA)、B ($O_2^-$) 和 C (SG) 动态及 D (ICBA 与 $O_2^-$ 和 SG)相关示意图

实验组的小鼠肺部病变：光镜：小血管内 PMN 聚集，肺间质内 PMN 浸润。不同部位出现不等程度的肺水肿和萎陷，部分有片状出血并浸入小支气管中。电镜：PMN 内 SG 数目减少而且密度降低；毛细血管基底膜宽松；Ⅰ型肺泡上皮细胞变性，板层体减少。阻断组的鼠肺病变较轻。

## 3 讨论

补体与 PMN 吞杀绿脓杆菌力下降的因果关系与条件：根据一般的因果判定方法和本文结果，初步认为它们之间有因果关系。(1)时序关系：一次加入 ZAHS，2 h 后 PMN 的杀菌力才随时间分级下降，形成典型的 S 形时间应答曲线。尾段似有回升趋势，这可以解释为活化补体已消耗殆尽而未得到补充。(2)量效共变：随 ZAHS 用量的增加，PMN 的胞内杀菌力也普遍下降。至于大剂量域内杀菌力的下降反而不如中剂量域内的下降深，这可用过敏毒素脱敏现象来解释[13][14]。(3)特异消因阻断：$AHC_{3,5}S$ 能消除 ZAHS 的大部分有害作用，未能完全消除的原因是 ZAHS 中尚有与 $C_3$ $C_5$ 无关的 PMN 激活物质，如 $C_{4a}$，IgG-Fc，PAF 和 $LTB_4$ 等，它们不被阻断，但是在本文所论

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

情况中占次要地位。

上述因果关系成立的条件是 ZAHS 的剂量大小和吞菌前持续作用时间的长短，体外实验最能说明。0.05ml 显极效，使杀菌力下降的最低；0.09～0.12ml 则因脱敏现象反而较差（图 A，C）。可见极效量不是极大量。至于时间，极效时间多在 6 h 以后；杀菌力早期虽曾短时（2 h）高于对照，但随即下降而且持续在低水平，早期的升高只占 40 个点上测值的 5%。可见适中的剂量和吞菌前的足够作用时间都很重要。体外剂量应为 0.05ml，体内为 0.5ml；作用时间为 6 h 以上。本文不排除常路活化补体也有不良作用，但它们不会在吞菌前得到足够的作用时间，PMN 胞内杀菌力也不会长时明显的下降。就本文而言，旁路较重要。

ZAHS 的有害作用机制与后果：按一般理论，活化补体使 PMN 先放出的 $O_2^-$ 和 SG 既杀菌又致炎。本文结果表明：激活 PMN 的杀菌力早期与 $O_2^-$ 同升而后又与 $O_2^-$ 及 SG 同降（图 A、B、C），三者测值相关密切（图 D），尤其是抗 $C_3$ $C_5$ 血清能使三者同时回升（附表），并且减轻因 ZAHS 而发生的鼠肺部病变。实验结合理论，可从正反两方面说明补体使 PMN 杀菌力下降的机制。胞内 $O_2^-$ 和 SG 于吞菌前已排放殆尽；而累积在肺组织内的则损害 PMN 自身及其邻近的肺血屏障。这些都有利于 MOF 和感染的发生。

## 参考文献


1. Gelfand JA. Preferential ativation and depletion of the alternative complement pathway by burn injury. Ann Surg，1983；198：58～62
2. Yamada Y. An in vitro model of the wound microenvironment：Local phagocytic cell abhormalities associated with in situ complement activation. J Infect Dis，1987；155(5)：998～1004
3. Heideman M. Anaphylatoxin generation in multisystem organ failure. J Trauma，1984；24(12)：1038～1043
4. 周善章。呼吸道烧伤犬早期的优势病原菌。第三军医大学学报，1980；4：42～48
5. 周善章。重度呼吸道蒸汽烧伤犬左心室血浆过敏毒素（AT）动态的初步观察。第三军医大学学报，1982；4(4)：66～72
6. 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)：87～97
7. Chieco P. Improvement in soluble dehydrogenase histochemistry by nitroblue tetrazolium preuptake in sections：A qualitative and quantitative study. Stain Technology，1984；59(4)：201～211
8. Goldner M. Bacterial phagocytosis monitored by fluorescence and extracellular quenching ingestion and intracellular killing. Lab Med，1983；14(5)：291～294
9. Hjorth R. A rapid method for purification of human granulocytes using percoll：A comparison with dextran sedimentation. J Immunol Methods，1981；43：95～101
10. Catterall JR. Nonoxidative microbicidal activity in normal human alveolar and peritoneal macrophages. Infect Immunol，1987；55：1635～1640
11. Goldstein IM. Enhancement of nitroblue tetrazolium dye reduction by leukocytes exposed to a component of complement in the absence of phagocytosis. J Immunol，1975；114：516～518
12. Setdek JK. QSAR and strategios in the design of bioactive compounds. VCH pub，1985：195
13. Moore FD. Neutrophil activation in thermal injury as assessed by increased expression of complement receptors. N Engl J Med，1986；314：948
14. Mrowietz U. $C_5a$-specific modulation of phagocyte function in patients with localized bacterial infections. Immunobiol，1987；174：460～472


（收稿：1991-10-30；修回：1992-02-26）

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

# Experimental study on the loss of PMN's bactericidal capacity induced by bypass-activated complement

Wang Zhengqing, Zhou Shanzhang (Department of Microbiology, Third Military Medeical College, Chongqing, 630038)

**Abstract** In order to verify that bypass-activated complement can enable polymorphonuclear neutrophils (PMN) to lose their bactericidal capacity, 3 experiments were performed as follows:

(1) A monolayer culture of human PMN was added with zymosan-activated human serum (ZAHS), then the superoxide ion ($O_2^-$·), the specific granules, and the intracellular bactericidal activity of the cultured PMNs were signigicantly decreased and reached the lowest point in the 6th hour after the adding of ZAHS. 0.05 ml of ZAHS showed the maximal effects on the PMNs.

(2) Mice were injected intravenously with 0.5 ml of ZAHS and were killed 6 hours later. All the 3 parameters mentioned above dropped markedly in the PMNs isolated from the blood and the lungs of the mice.

Pathologically, the lungs of the rats showed acute interstitial inflammation, focal edema, hemorrhage and atelectasis, and subcellular damages on the pulmonary blood-barrier.

(3) ZAHS, after neutralization in vitro with antiserum against human $C_3$ and $C_5$, lost most of its harmful effects mentioned above.

The findings suggest that the harmful effects of ZAHS originate from the fragments of $C_3$ and $C_5$ and they are most effective when its dosage is suitable and there must be a sufficient length of time to react before the phagocytosis of PMNs. The possible mechanism of the origination of the harmful effects of ZAHS is as follows: Before PMNs undertake phagocytosis, they releas the bactericidal and inflamnagenic ($O_2^-$· and specific granules extra-cellularly. So the intracellular bactericidal activity of PMNs is decreased. The accumulation of PMNs in the pulmonary tissues can damage the PMNs themselves and the adjacent pulmonary blood-barrier, which will leads to the occurrence of infection and multiple organ failure.

**Key words** zymosan; complement; superoxide ions; immune sera; bactericidal activity

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