DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.05.013

猪钢珠弹伤后血浆及肺组织的脂质过氧化与粒细胞活性氧产生量

周继红 朱佩芳 周宝桐 杨军民 周元国 邹用志 王永刚 （第三军医大学 野战外科研究所）630042

提 要 本实验观测了猪双后肢高速钢珠弹伤后外周血多形核粒细胞（Polymorphonuclear Leukocytes, PMNs）活性氧产生量、血浆和肺组织匀浆及支气管肺泡灌洗液（Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF)中脂质过氧化物（Lipid Peroxides, LPO）代谢产物丙二醛(Malonyldialdehyde, MDA)含量的变化。结果提示，外周血PMNs自发和在酵母多糖刺激下产生的活性氧均增加，分别在伤后4h、8h达峰值，然后逐渐减少；血浆MDA变化也经历了相似的过程，并与PMNs自发活性氧产生量的变化密切相关；肺组织匀浆和BALF中MDA在伤后24h时较正常的明显增加。文章对实验结果，特别是PMNs的功能与脂质过氧化损伤间的关系进行了讨论。

关键词 创伤，枪弹；嗜中性白细胞；游离基类；过氧化脂质类；丙二醛

创伤可通过多种途径激活外周血PMNs[1]，激活的PMNs产生和释放的活性氧可通过氧化不饱和脂肪酸生成LPO而造成组织器官的损伤[2]。目前尚未看到关于高速钢珠弹伤后PMNs活性氧与血浆LPO变化关系的报道。本实验目的在于了解高速钢珠弹伤后PMNs释放活性氧与血浆LPO变化间的关系以及肺组织脂质过氧化损伤的情况。

1 材料与方法

1.1 动物模型

体重25kg～41kg幼猪，随机分成对照组（4只）和致伤组（9只）。致伤前一天行右侧颈动脉和肺动脉插管。致伤组动物在戊巴比妥钠麻醉后用53式滑膛枪、1.03g钢珠弹致猪双大腿股骨骨折和严重软组织伤，射距2m，碰击速度1644±22m/s，碰击能量1395±38J，能量传递率87.4%。伤后静脉输注生理需水量。分别在伤前、伤后1h、2h、4h、8h和24h取动脉血检查。对照组除不致伤外，其它均同致伤组。

1.2 肺泡支气管灌洗

取右肺中叶，按每克肺重5ml的总量分3次以含0.6mmol EDTA的冷0.01mol pH7.2的PBS灌洗。回收BALF，离心，留上清测MDA及蛋白含量。

1.3 PMNs活性氧产生量测定

肝素抗凝全血3ml，用梯度离心法分离得PMNs后用Hank's液调成4×10^{10}细胞/L的PMNs悬液，台盼蓝查细胞活力大于95%，纯度大于93%。活性氧量测定参照Stossel[3]的四氮唑蓝(Nitroblue Tetrazolium, NBT）分光光度法稍加修改。刺激管加入0.1ml伤前血清和0.2ml 1.5g/L的酵母多糖，自发管以Hank's液代替酵母多糖，各管用Hank's液补至0.6ml，37℃水浴调理15min后分别加入0.75g/L NBT0.2ml和PMNs悬液0.2ml，摇匀，37℃水浴30min后各管加1ml 1mol HCl终止反应，1400g离心10min，生理盐水洗涤一次后各管加二氧六环1ml，85℃水浴15min，1400g离心10min，取上清以二氧六环作空白测580nmOD值。做复管。

计算：

$$\text{NBT 还原量}=\frac{OD_{580}\times 2580\times 2}{0.8}\ (\text{nmol NBT}/10^7\text{PMNs})$$

其中，0.8为PMNs总数0.8×10^7，2580为1cm光径一个OD值1ml二氧六环中还原NBT的纳摩尔数，2是实际光径0.5cm转换为1cm光径的常数。

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

1.4 LPO的测定

用Yagi法[4]测定血浆和BALF中的LPO，用Ohkawa[5]法测定肺组织匀浆的LPO，蛋白质测定采用Lowry法。

1.5 统计

用t检验及秩相关进行统计分析，数据以均值加减标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2 结 果

2.1 PMNs活性氧产生量

循环PMNs伤前自发还原NBT的量为21.5±2.3nmol NBT/10^7PMNs，致伤后逐渐升高，4h达峰值为伤前的273%（$P<0.05$），然后逐渐下降，24h回复伤前水平。酵母多糖刺激下NBT还原量伤前为146.6±15.3nmol NBT/10^7 PMNs，伤后逐渐增加，8h达峰值为伤前的173%（$P<0.05$），然后逐渐下降，24h回复伤前水平（图1）。

2.2 血浆LPO及其与PMNs活性氧产生量的关系

血浆LPO伤前为44.9±25.9nmol MDA/g血浆蛋白，伤后逐渐增加，4h达峰值为伤前的147.7%（$P<0.05$），然后逐渐下降，24h时接近伤前水平（图2）。血浆LPO变化与PMNs自发活性氧产生量变化间的相关系数为0.57（$P<0.01$），与PMNs刺激下活性氧产生量变化间的相关系数为0.33（$P>0.05$）。

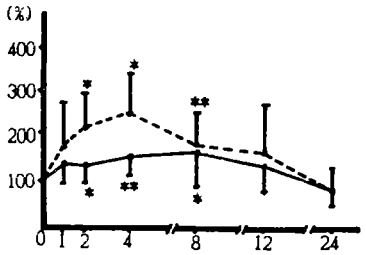


图1 PMNs活性氧产量变化（%）

Fig.1 Changes of the amount of superoxide anions of PMNs (%)

* Compared with before injury $P<0.05$
** Compared with before injury $P<0.01$

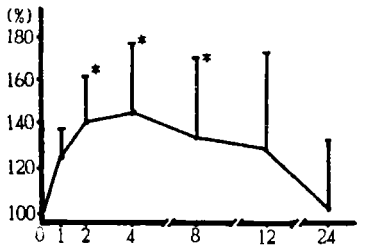


图2 血浆LPO的变化（%）

Fig.2 Changes of LPO in plasma (%)

* Compared with before injury $P<0.05$

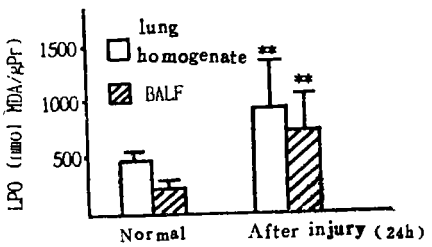


图3 肺组织匀浆和BALF中的LPO

Fig.3 LPO in lung homogenate and BALF

** Compared with before injury $P<0.01$

2.3 肺组织匀浆和BALF的LPO

正常肺组织匀浆LPO为516±52 nmol MDA/g Pr，致伤24h后为982±488nmol MDA/g Pr（$P<0.01$），正常BALF中的LPO量为269±42 nmol MDA/g Pr，致伤24h后为731±408 nmol MDA/g Pr（$P<0.01$）（图3）。

3 讨 论

3.1 创伤后PMNs的功能

创伤可通过补体及内毒素等途径激活PMNs[1]，PMNs细胞膜上的NADPH氧化酶

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

被活化，PMNs发生呼吸爆发，产生并释放大量活性氧，它是PMNs防御机制中的一部分，也是导致组织损伤的重要因素之一，而且活性氧产生量也反映了PMNs的功能状况[6]。本实验用NBT分光光度法检测活性氧产生量的结果提示高速钢珠弹致伤后PMNs活性氧产生量明显增加，4h达峰值后又逐渐下降，24h降至伤前水平；酵母多糖刺激PMNs产生活性氧的量也经历了类似的过程，但峰值在8h。这一系列变化提示高速钢珠弹伤后循环PMNs很快被激活，由于PMNs功能活性增加，从而增强了机体防御功能；同时因活性氧等释放增加，也增强了自身组织的损伤作用。经一定时间后PMNs功能活性逐渐下降，PMNs储备反应力降低致使机体防御功能减弱，这可能是严重创伤后易继发严重感染的重要原因之一。引起这些变化的原因可能是严重创伤刺激了PMNs的代谢爆发潜力，使PMNs吞噬功能、活性氧产生和释放均增强；但每个细胞的吞噬和呼吸爆发能力是有限的，经一定时间后由于过度耗竭、自身氧化损伤以及未成熟PMNs释放入血等原因使循环PMNs功能活性减弱，产生和释放活性氧的能力也下降[6][7]。

3.2 血浆LPO与PMNs

血浆中的LPO有多种来源，但在创伤模型中主要有两个：（1）组织源性：组织中生成的LPO释放转移至血，如缺血再灌流组织中黄嘌呤氧化酶系统[8]和吞噬细胞系统[9]产生的活性氧与不饱和脂肪酸作用生成LPO，再转移入血；（2）血源性：血液中具有呼吸爆发功能的吞噬细胞（主要是PMNs）释放的活性氧与不饱和脂肪酸作用生成LPO[10]。目前就创伤后血浆中LPO来源的讨论不多，有的文章认为血中LPO主要来自组织，但组织和血浆中LPO的变化常不一致，即组织中LPO向血中转移的速率是有限的；Ward PA[11]等曾注意到血浆LPO的变化可反映补体致肺损伤模型血中PMNs激活释放活性氧的情况。本实验结果可见，在本模型中血浆LPO和PMNs自发活性氧产生量的变化过程非常相似，而且明显相关，提示在此模型中LPO的变化可能主要受PMNs释放活性氧量的影响，并可反映创伤早期PMNs被激活，向周围组织释放活性氧而造成组织脂质过氧化损伤的变化过程。在本实验中用每克蛋白质中MDA的纳摩尔数计算血浆LPO，有效地减少了因创伤失血等因素造成的血液浓缩和稀释的影响。

3.3 肺组织的脂质过氧化

在严重创伤后，ARDS是其主要致死性并发症之一。资料表明，PMNs在肺内聚集并释放大量的活性氧及其它介质与ARDS的发生发展有密切关系[2]。在枪伤模型中也发现肺微血管内有大量PMNs聚集和扣押，并推测与继发性肺损伤有关[11]。本实验结果显示，致伤组动物伤后24h的肺组织匀浆和BALF中的LPO量均较非致伤组动物明显增加，提示枪伤后肺组织受自由基作用，加重了脂质过氧化损伤，这可能与PMNs激活及肺内的聚集和扣押等有关。虽然这时外周血PMNs活性和释放的活性氧已开始下降，但形态学证实，高速钢珠弹伤后24h时，肺血管内聚集扣押了大量的PMNs，PMNs处于激活脱颗粒状态[11]，可释放出大量活性氧等造成组织损伤。另外，肺泡巨噬细胞被激活释放活性氧可能也是重要原因之一[12]。

参考文献

1. Davis CF, Moor FD, Rodrick ML, et al. Neutrophil activation after burn injury: contribution of classic complement pathway and endotoxin. Surgery 1987;102(3):

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

477～484

2. Barbior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. Blood 1984;64:959～966
3. Stossel TP. Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. Blood 1973; 42 (1):121～130
4. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In:Methods in Enzymology 1984; 105: 328～331
5. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351～358
6. Sheng ZY, Tung YL. Neutrophil chemiluminescence in burned patients. J Trauma 1987;27(6):585～595
7. Andesen OK, Revhaug A, Lundgren TI, et al. Metabolic burst and motility in granulocytes following trauma and endotoxinaemia in the anaesthetized pig. Act Chir Scand 1986;152:641～645
8. 陈修。抗心肌缺血药研究的新思路与方法。药学学报 1987;22:150～155
9. Rossi F. The O_2^--forming NADPH oxidase of the phagocytes:nature, mechanisms of activation and function. Biochim Biophys Acta 1986;853:65～89
10. Ward PA, Till GO, Halherill JR, et al. Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. J Clin Invest 1985;76:517～527
11. 刘国建 王正国 朱佩芳，等。高速钢珠弹致股骨骨折及软组织创伤后肺病理形态变化的动物学实验。第三军医大学学报 1988;10(5):371～374
12. Johnson KJ, Ward PA. Acute and progressive lung injury after contact with phorbol myristate acetate. Am J Pathol 1982;1072:29～35

(收稿：1990.10.18；修回：1991.06.07)

Effects of gunshot wound on lipid peroxidation in plasma and pulmonary tissues and amount of superoxide anions released by PMNs in pigs

Zhou Jihong, Zhu Peifang, Zhou Baotong, et al (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The amount of superoxide anions released by polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and malonyldialdehyde (MDA) level in plasma, lung homogenate and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined in pigs after they were inflicted with gunshot wounds of steel-ball pellets. It was found that the amount of superoxide anions released spontaneously and after the stimulation of zymosa was increased and reached the peak in the 4th and 8th hour after injury respectively, and then returned to the preinjury level gradually. The changes of plasma MDA level was similar to those of superoxide anions released by PMNs. MDA level of lung homogenate and BALF was also significantly increased in the 24th hour postinjury. In addition, the relationship between PMNs function and lipid peroxidation in the plasma and the lungs was discussed.

Key words wounds, gunshot; neutrophile; free radicals; lipid peroxides; malonyldialdehyde

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