DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.04.015

粒细胞NADPH氧化酶在犬烟雾吸入伤中的变化及意义

刘旭盛 黎 鳌 杨宗城 姜坤元 （第三军医大学西南医院 烧伤研究所）630038

提 要 本实验利用犬烟雾吸入伤模型，观察了致伤前后粒细胞NADPH氧化酶活性的变化，显示其伤后活性增加，提示粒细胞及其活性氧代谢产物参与了犬烟雾吸入性肺损伤的发生发展，同时观察了血气、病检、肺含水量等指标，证实动物存在严重吸入性肺损伤。

关 键 词 嗜中性白细胞；NADPH氧化酶；肺/损伤；烧伤，吸入性

近年研究表明中性粒细胞（PMN）及其产生的活性氧自由基是ARDS肺泡毛细血管膜（ACM）通透性增加的重要递质[1][2]。为探讨PMN及其活性氧代谢产物在吸入性肺损伤中的作用，本实验利用犬烟雾吸入伤模型，观察了致伤前后PMN在体外再次受刺激后细胞膜还原型烟酰胺腺嘌呤磷酸二核苷酸（NADPH）氧化酶活性的变化，借以观察犬烟雾吸入伤后PMN活性氧代谢的变化。

1 材 料 与 方 法

1.1 雄性杂种犬20条，体重8.5kg～14kg，麻醉，称重，本室自制发烟装置，致伤10min。

1.2 观测项目、时间和方法：

1.2.1 血气分析和白细胞计数：于伤前和伤后5 min，30min，2 h，6 h，12h 采取股动脉血进行。

1.2.2 肺含水量（干湿称重法）和病理检查：于伤后12h放血活杀后进行。

1.2.3 胸部X线拍片于伤前和伤后6 h，9 h进行。

1.3 粒细胞NADPH氧化酶活性测定：据Iverson等[3]方法加以改进，即改以沉淀红细胞后分层为直接以Percoll将全血离心分层获取PMN，改测量匀浆液中等量蛋白的酶活力为测量等量PMN个数匀浆后的酶活力。

1.3.1 PMN的分离获取：取抗凝血5ml～7ml，置Percoll分层液上，2000rPm，离心20min，收集PMN后以双蒸水溶解RBC，再以平衡盐溶液（HBSS）洗2次，调成2.5×10^6个/ml，台盼兰查活力大于95%。

1.3.2 酵母多糖的调理[4]：取酵母多糖以HBSS调成10mg/ml，煮30min，洗1次，加伤前血清0.1ml/mg，37℃，30min，再洗涤2次以HBSS调成10mg/ml。

1.3.3 标本制备：取1 ml上述细胞悬液，加0.1ml已调理酵母多糖，37℃，30min，离心弃上清，加入0.34mol/L蔗糖液1 ml混悬，置匀浆管匀浆，取出4 ℃，500g离心，取上清4 ℃，27 000g离心30min，收集上清。

1.3.4 底物配制：以0.1mol/L Tris缓冲液（pH＝6.5），称取Sigma产NADPH配成0.2mmol/L的NADPH溶液。

1.3.5 NADPH氧化酶的测定：取两只干燥试管，各加0.1mol/L磷酸钾缓冲液0.6ml及上述底物0.2ml，再各加蔗糖溶液与上清0.2ml分别作对照和标本，25℃ 1h，各加0.4N $HClO_4$ 1 ml，3000rpm，10min，各取上清0.2ml另置两只试管，各加10N NaOH 0.3ml，混匀置38℃，30min，各加双蒸水2.5ml，混匀，立即测荧光（日立MDF-4型荧光分光光度计），发射光波长475nm，激发光波长373nm，以0.5μg/ml的硫酸喹宁调拭灵敏度并作荧光强度对照。

1.3.6 标准曲线：以国产$NADP^+$用pH9.0之0.1mol/L的Tris缓冲液配成不同浓度的溶液，各取0.2ml加入10N NaOH 0.3ml后同上操作测荧光，据各浓度的$NADP^+$量与荧光强度求出线性回归方程。

1.4 统计学处理：各指标以$\bar{x}\pm s$表示，以伤前值为对照，用第三军医大学统计程序行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 呼吸功能：PaO_2和$PaCO_2$伤后均进行性下降，A-aDO_2与Qs/Q_t伤后升高，提示伤后明显缺氧。

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

2.2 COHb含量：伤后5 min迅速升高达伤前5倍以上，此后渐降，至伤后12h已接近伤前。

2.3 血液酸碱平衡变化：HCO_3^-、SBC、BEb与TCO_2伤后进行性下降，结合PCO_2提示伤后出现明显的代谢性酸中毒和呼吸性碱中毒。

2.4 粒细胞NADPH氧化酶活性的变化：该酶活力以转化NADPH为$NADP^+$的量（ng/ 5×10^4PMN/h）来表示，伤前232.85±55.74，伤后30min升高达295.45±67.19，2 h为308.43±67.19（$P<0.05$），6 h达328.21±47.48（$P<0.05$），至伤后12h又降至268.05±44.63。

2.5 肺含水量：正常组10条犬为本所1981年同法所测[6]，为79.594±0.974%，而本组致伤动物为84.34±1.851%，致伤组明显高于正常组（$P<0.01$）。

2.6 病理检查：大体见气管、支气管内大量分泌物，粘膜充血水肿，有黄白色假膜形成，肺水肿、淤血、出血及不张。光镜见小支气管内有聚集的粒细胞、纤维蛋白和红细胞，肺泡有出血、水肿、粒细胞浸润，肺泡间隔结构破坏。

2.7 胸部X线示气管缩窄和肺部片状阴影。

2.8 白细胞计数：伤前值为100，伤后为5 min为39.03±13.61，30min为44.08±20.73，2 h为66.02±34.96，6 h为210，12h为283，与伤前比均$P<0.01$。

3 讨　论

3.1 动物伤后出现明显CO中毒、低氧血症、代谢性酸中毒和呼吸性碱中毒，气道粘膜充血、水肿和出血，肺水肿、不张和出血等。说明本实验造成了犬重度吸入性损伤，适于本实验。

3.2 根据本实验结果，伤后粒细胞活性氧代谢增强，参与了吸入性肺损伤的发生发展：

3.2.1 病理证实，伤后在肺泡、毛细血管及肺内小血管有粒细胞浸润。同时伤后5 min至2h血白细胞计数明显低于伤前，提示伤后早期有大量粒细胞自外周向肺内积聚。造成粒细胞积聚的原因是多方面的，一是吸入烟雾后，直接对组织造成的损伤，受损的肺泡巨噬细胞释放粒细胞趋化物质增加，二是吸入伤刺激血中补体活化[8]，产生C_5a等增加[7]，从而导致粒细胞趋化、聚集于肺毛细血管周围。

3.2.2 粒细胞NADPH氧化酶活性伤后明显增加，提示粒细胞在上述趋化因素作用下发生了“呼吸骤发”[8]，即氧耗量增加，磷酸己糖旁路代谢活性增强，同时细胞膜NADPH氧化酶激活。而作为电子传递链中的NADPH氧化酶，将还原型NADPH的一个电子传给氧分子形成超氧阴离子（O_2^-），所以NADPH氧化酶活性的升高，提示O_2^-的产生增多，O_2^-继而在SOD作用下转变成H_2O_2，同时PMN脱颗粒释放大量的溶酶体酶致组织损伤，且其与氧自由基有协同作用，粒细胞尚可脱颗粒释放MPO进而产生$^1O_2$、HOCl、$OH^\cdot$等继发的氧自由基，它们是比O_2^-、H_2O_2具有更强生物活性的自由基，它们引发肺组织发生组织结构破坏，膜脂质过氧化增强，细胞生物酶系统灭活，DNA损伤，肺间隔组织结构蛋白与糖蛋白破坏等[1,2,8]。同时$OH^\cdot$等可使α_1抗胰蛋白酶失活，从而促进粒细胞溶酶体酶、酶性水解酶和弹性蛋白酶对组织的损伤作用，从而导致肺毛细血管内皮细胞、肺间质和肺泡上皮细胞损伤，使ACM通透性升高，引起肺水肿、出血等急性炎症改变。

总之，粒细胞的活化（包括NADPH氧化酶的激活和大量活性氧自由基的产生等）在烟雾吸入性肺损伤的早期阶段起着一定的作用。

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

参 考 文 献

1. Joseph FC, Ward PA. Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reactions. Am J Pathol 1982; 107:397～418
2. Joseph FC, Ward PA. Polymorphonuclear leukocytes-mediated cell and tissue injury:oxygen metabolites and their relations to human disease. Hum Path 1985; 16 (10) :973
3. David I, Dechatelet LR, Spitznagel JK, et al. Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. J Clin Invest 1977; 59:282～290
4. 董元林 盛志勇 张遵一，等。中性粒细胞功能与调理素活性的化学发光测定研究。解放军医学杂志 1985; 1:17
5. 吴振忠 黎鳌 姜坤元，等。重度呼吸道蒸汽烧伤肺水量变化。第三军医大学学报 1982; 4 (4) :110
6. 黄文华 胡祖祥 黄兴玉，等。烧伤后血清总补体和旁路途径溶血活性及补体的动态变化。第三军医大学学报 1984; 6:61
7. Gerd TO, Beauchamp C, Menapace D. Oxygen radical dependent lung damage following thermal injury of rat skin. J Trauma 1983; 23 (4) :369～377
8. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biological basis of phagocytosis; I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 1959; 234:1355
9. Charles CG, Spragg R, Revak SD. Pathogenesis of the Adult Respiratory Distress Syndrome; evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Invest 1983; 71 (3) :754～761

(收稿：1990.11.05；修回：1991.06.20)

The Changes of Neutrophil NADPH Oxidase after Smoke Inhalation Injury and Their Significance in Dogs

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

Abstract The canine model to study inhalaton injury established in our lab was employed, and neutrophil NADPH oxidase activity, blood gas analysis, lung water volume, chest radiographs, and pulmonary histopathological changes were observed in the dogs after they were exposed to smoke inhalaton.

It was found that carbon monoxide poisoning, hypoxemia, metabolic acidosis, respiratory alkalosis and lung damage developed rapidly and early after smoke inhalation; white blood cells disappeared from the circulation 5 minutes after injury onward; the activity of neutrophil NADPH oxidase increased gradually from the 30th minute to the 6th hour after injury, then decreased and approached to its preinjury level in the 12th hour after injury.

It is postulated on the basis of the above findings that neutrophils would accumulate in the lungs after smoke inhalation and experince a "respiratory burst" characterized by the activation of NADPH oxidase and the production of large amounts of oxygen and other active oxygen radicals, which would play a significant role in the pathogenesis of acute lung damage in the early stage of smoke inhalation injury.

Key words neutrophil; NADPH oxidase; lung/IN; burns, inhalation

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