DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.02.009

粒细胞在犬烟雾吸入性肺损伤中的作用

王 敦 黎 鳌 杨宗城 姜坤元（西南医院 烧伤研究所）

提 要 利用重度犬烟雾吸入伤模型，观察了血中粒细胞的动态变化，及其在烟雾吸入性肺损伤中的作用。伤后血中粒细胞很快向肺内聚集和浸润；多核粒细胞（PMN）对自体细胞的毒性效应显著增强；PMN释放的髓过氧化物酶不断增加；代表氧自由基产生的PMN化学发光显著改变，这些变化均先于肺损伤，与其损伤时相基本一致。提示肺内粒细胞聚集和浸润在吸入性肺损伤中具有重要作用，颗粒酶和氧自由基可能是粒细胞介导肺损伤的效应因素。

关键词 灼伤，吸入性；肺；粒细胞；髓过氧化酶类

吸入性损伤是导致肺水肿和呼吸功能不全的常见原因之一，最初的病理改变是肺微血管弥漫性损伤，肺内粒细胞聚集和浸润是多种急性肺损伤的共同特征[1]。本实验对粒细胞在烟雾吸入性肺损伤中的病因学意义及其可能的毒性效应因素进行了初步研究和探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组及致伤

健康雄犬29只，体重8.5～14.5kg，随机分成对照组（10只）和致伤组（19只）。3%戊巴比妥钠麻醉后，用本所烟雾吸入伤犬模型致伤。对照组不致伤，机械通气后活杀测定肺水量。致伤组动物定时测定血气、X线胸片，活杀后作病理和肺水量检测，以验证伤情。

1.2 血中粒细胞变化的检测

1.2.1 白细胞数 取股动脉血常规计数。

1.2.2 多核粒细胞（PMN）溶血毒性试验 按Weiss等[2]和游离血红蛋白（Hb）测定原理设计而成。主要是：活化的PMN释放某些毒性代谢产物，使作为靶细胞的自体红细胞受损，释放出Hb，Hb具有氧化酶活性，可使4-氨基安替比林（4-AAP）脱氢后生成醌亚胺红色染料，比色测定光密度（OD）值，可代表上清液中Hb的含量，以上清液中Hb含量可反映PMN的溶血毒性。

1.2.2.1 血中PMN的分离 取股动脉血，肝素-EDTA-Na2抗凝，以比重1.090和1.070Percoll梯度离心（2000rpm，20′）。分离PMN后，计数调至5×10^6/ml，活细胞数99%以上，PMN95%以上。

1.2.2.2 酵母多糖调理 经煮沸、洗涤处理先制备成酵母多糖贮备液。用前以自体新鲜血清在37℃水浴调理30min，洗涤后配成悬液10mg/ml。

1.2.2.3 靶细胞制备及加样温育 分离PMN后的红细胞，离心（500rpm，5′）洗3次，配成悬液，计数后调至2×10^8/ml。

表1 血中粒细胞变化检测加样顺序表

	A管	B管	C管	D管	E管
PMN悬液（5×10^6/ml）	0.2ml	—	—	0.2ml	—
RBC悬液（2×10^8/ml）	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
1640培养液	-	0.3ml	—	0.1ml	0.2ml
酵母多糖（10mg/ml）	0.1ml	—	—	—	0.1ml
双蒸水	—	—	0.3ml	—	—

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

试验按表1顺序加样，每次作3个复管。加酵母多糖前37℃水浴预温20min，加酵母多糖后振荡混匀，500rpm离心3min，置37℃水浴8h。取出后1000rpm离心5min，取上清测定。

1.2.2.4 上清液比色测定 取2.5mmol 4-AAP（1.7mmol酚溶解）1.4ml，加1.7mmol H_2O_2 1.5ml，置37℃水浴反应5min，加溶血上清标本0.1ml，37℃水浴反应10min，立即加入0.1molKCN 0.2ml终止反应。751分光光度计505nm测定OD值。按下式计算溶血毒性：

溶血毒性（%）=（X-B）/（C-B）×100%

式中X表示A、D、E管OD，B、C表示B、C管OD。

1.2.3 PMN的髓过氧化物酶（MPO）活性测定 按4-AAP呈色法[3]加以改良[4]。包括非活化的PMN中MPO、活化的PMN中MPO和活化PMN上清液（释放出）中MPO活性测定。

1.2.4 PMN化学发光 鲁米诺放大法。

2 结果

为消除变异，便于比较，对数据进行了变量代换，以伤后与伤前比较的百分数表示结果（见表2）。

表2 血中白细胞的动态变化（$\overline{X}\pm SD$）

	犬数	伤前(%)	伤后(%)				
			5min	30min	2°	6°	12°
白细胞数	14	100	39.03** ±13.61	44.80** ±20.73	66.02** ±34.96	210.39** ±52.66	282.83** ±100.24
PMN溶血毒性	7	100		113.05** ±13.71	91.95 ±14.80	113.91* ±14.89	129.68** ±14.41
PMN化学发光	7	100		49.69** ±11.59	64.00** ±19.96	249.57** ±37.65	240.63** ±95.40
非活化的PMN中MPO活性	19	100		90.93* ±13.40	72.34** ±18.06	71.62** ±22.14	72.42** ±16.98
活化的PMN中MPO活性	9	100		111.67 ±16.04	121.03* ±27.13	122.61** ±17.82	125.96** ±24.62
活化的PMN上清中MPO活性	14	100		112.21** ±13.41	88.54 ±14.83	134.98** ±36.62	215.76** ±44.67

*或**表示与伤前值相差显著（$P<0.05$）或非常显著（$P<0.01$）。

2.1 血中白细胞数 伤后5min减少60%；2h内显著低于伤前，6h后显著增多。

2.2 PMN溶血毒性 除2h外，伤后活化的PMN溶血毒性均显著高于伤前。非活化的PMN（未加酵母多糖）和酵母多糖单独无明显的溶血作用，分别为活化的PMN溶血毒性的7.4±12.1%和2.0±4.7%。

2.3 PMN化学发光 伤后2h内显著低于伤前；6h后显著增强。

2.4 PMN的MPO活性 伤后非活化的PMN中MPO不断减少；活化的PMN中MPO活性逐渐升高；活化的PMN释放到上清中的MPO，除2h外，显著高于伤前。

3 讨论

许多研究发现，肺内粒细胞大量聚集和浸润是多种肺损伤早期的共同特征。关于粒细胞在急性肺损伤中作用，很多推测是基于肺内粒细胞聚集和浸润的形态学观察。本实验观察到，吸入烟雾5min，血中白细胞即减少60%；肺内有大量的粒细胞聚集和浸润，并伴有肺间质及肺泡内明显水肿和出血；伤后6h 胸部X片示肺水肿片影，并逐渐加重。提示肺内粒细胞聚集不仅先于肺损伤，而且在时相上与肺损伤的发生和发展相吻合。

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

虽然肺内粒细胞聚集与肺损伤在时相上有吻合关系，但肺内粒细胞聚集是肺损伤的效应因素还是伴随表现，尚难定论。为此，本次同时作了体外 PMN 溶血毒性试验。结果表明，活化的 PMN 对正常自体红细胞具有明显的毒性，而且伤后毒性效应显著增强，增强的时相也先于肺水肿。同时发现，非活化的PMN和酵母多糖单独无明显溶血作用。上述结果说明，伤后血中粒细胞活性增强；活化的PMN 对自体细胞有明显的破坏作用；PMN 活化后可能释放了某些毒性代谢产物；肺内粒细胞聚集可能是粒细胞活化的表现，聚集的粒细胞在肺损伤中可能具有重要的介导作用。据报道[5][6]，MPO抑制剂和/或氧自由基清除剂对体外PMN引起的靶细胞破坏具有明显的保护作用，证实MPO和氧自由基与PMN的毒性效应有关。

已证实，粒细胞受到活化刺激可释放各种颗粒酶和氧自由基。ARDS病人血中PMN活性和代表氧自由基产生的化学发光增强[7]；支气管肺泡灌洗液中 MPO 活性明显升高，这种灌洗液可使体外培养的靶细胞破坏[8]。本实验观察到，伤后非活化的PMN中 MPO 不断减少，活化的PMN及其上清液中MPO活性逐渐升高；PMN的化学发光也有明显变化，伤后 2 h内化学发光显著减弱，6 h后明显增强。上述结果提示，伤后血中PMN不断被活化，并释放MPO和氧自由基。至于伤后 2 h内PMN 化学发光明显减弱的原因，认为可能是由于大量的粒细胞向肺内聚集，使血中能被活化的 PMN 显著减少，这与血中白细胞减少的高峰时间相吻合。而此时血中大量的粒细胞被活化并聚集于肺内，由于聚集肺内的粒细胞正处于活化状态，活化的粒细胞可释放 MPO 和氧自由基等毒性代谢产物，而这些毒性代谢产物则可引起自体细胞的损害，这可能解释粒细胞在吸入性肺损伤发病机理中的部分作用，是否如此尚待进一步研究。

参 考 文 献

1. Hammerschmidt, DE. Leukocytes in lung injury. Chest(Suppl.)1983; 83(5):16s
2. Weiss SJ, et al. An oxygen-dependent mechanism of neutrophil-mediated cytotoxicity. Blood 1980; 55:1020
3. Matheson NR, et al. Isolating and properties of human neutrophil myeloperoxidase. Biochemistry 1981; 20:325
4. 王敦，等。PMN中MPO 的活性测定。自由基、脂类过氧化技术学习班讲义P_{123}，第三军医大学 1987，11月。
5. Weiss SJ; et al.An oxygen- dependent mechanism of neutrophil- mediated cytotoxicity. Blood 1980; 55(6):1020
6. Slivka A, et al. A potential role for hypochlorous acid in granulocyte-mediated tumor cell cytotoxicity. Blood 1980; 55(2):347
7. Zimmerman,GA, et al. Circulating polymorphonuclear leukocyte activity in patients with the ARDS. Chest(Suppl.)1983; 83(5):87s
8. Weiland JE, et al.Lung neutrophils in the ARDS. AM. Rev, Respir. Dis. 1986; 133(2):218

（收稿：1987.07.30；修回：1989.06.19）

（下转128页）

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

5. Pedrosa CS,et al. Computed tomography in the obstructive jaundice. I. The level of obstruction. Radiology 1981:139:627

6. Pedrosa CS. et al. Computed tomography in the obstructive jaundice. II. The cause of obstruction. Radiology 1981:139:635

7. Baron RL, et al. Computed tomographic feature of biliary obstruction. AJR 1983:140:1173

(收稿: 1988.12.19;修回: 1989.11.21)

CT Diagnosis of the Biliary Duct Stone

You Jian, et al(Department ofRadiology, Southwest Hospital, Third Military Medical College)

The CT findings and diagnosis of 39 operatively verified cases of bile duct stone are analysed. All the cases are studied with CT, part of the cases are studied with ultrasonography, ERCP and PTC. The direct CT findings: the intrahepatic biliary duct stones display high attenuation shadow or soft tissue density(20/23); the extrahepatic biliary duct stones display target sign or high attenuation shadow in the pancreatic head (14/24). The indirect findings show the dilatation of the intrahepatic biliary system. The extrahepatic biliary duct stone also shows dilatation of the distal common bile duct (CBD) with gradually fining away. CT diagnosis of the bile duct stone is considered to base on the direct findings with reference of the indirect findings and synthesized diagnosis. The thin slice scanning technology can press the visible rate of the CBD stone (it should be a routine studying method of the CBD stone). The method of imaging diagnosis of the biliary duct stone is also discussed.

Key words: cholelithiasis/DI; tomography,x-ray computed; bile duct diseases

(上接119页)

Role of Granulocytes in Pulmonary following Smoke Inhalation

Wang Dun,et al. (Burn Institute, Southwest Hospital,Third Military Medical College)

A dog model with serious smoke inhalation injury is used. The dynamic change of granulocytes in blood and its role in inhalation pulmonary injury are studied. Results: a large number of granulocytes in blood immediately gather and infiltrate towards lungs; the effect of polymorphonuclear leukocyte(PMN) mediates self-body red blood cell cytotoxicity markedly rise; myeloperoxidase released from PMN increases continuously and chemiluminescence yielded by PMN releasing oxygen free radicals obviously alters; these changes are found before pulmonary injury and basically identified with the injured time. The aggregation and granulocytes aggregation in lungs play an important role in inhalation pulmonary injury, and the granuler enzymes and oxygen free radicals are probably the effective factors in granulocytes causing innalation pulmonary injury.

Key words: burns, inhalation/ES; lung/IN; granulocytes/PH; myeloperoxidase

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