DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.02.004

白细胞和前列腺素在活化补体导致的急性肺损伤中的作用

郭胜祥* 孙秉庸 赵 洪 李德勒 杨仲强 梁 燕（病理生理学教研室 高原医学研究室）

提 要 用清醒山羊慢性肺淋巴瘘模型，观察了白细胞在酵母多糖活化的血浆（ZAP）导致的急性肺损伤中的作用。输入ZAP后，肺动脉压（$P\bar{p}a$）显著增高，外周血白细胞数减少，肺淋巴流量（QL）增加，淋巴与血浆蛋白比值（L/P）增大。动脉血浆TXB_2含量增加与$P\bar{p}a$升高呈显著相关。而用抗体减少白细胞后再用ZAP致伤，$P\bar{p}a$增高的幅度明显为低，同时QL、L/P及TXB_2含量均无显著改变。结果提示：①ZAP引起的TXA_2合成及释放增多与白细胞有关；②预先减少山羊的白细胞可防止ZAP导致的肺损伤。

关键词 肺疾病；肺；补体成份；白细胞减少症；血凝素类

在急性肺损伤中，白细胞的作用日益受到重视。降低动物的白细胞数，可使肺损伤程度明显减轻，表明白细胞参与急性肺损伤的发生[1]。但是，用于降低白细胞数的药物，其作用并非特异而且还有抗氧化特性，因而对实验结果有一定影响[2]。用化学药物降低白细胞数以观察它在急性肺损伤中的作用各家的实验结果不尽一致[3]。麻醉对肺动脉压的改变和前列腺素的合成都有影响[4]。我们采用兔抗山羊粒细胞的抗体以降低白细胞数，然后观察静脉输入酵母多糖活化的血浆（zymosan-activated plasma，ZAP）对清醒山羊血流动力学、肺血管壁通透性和肺组织间液形成的影响，并通过测定动脉血浆和肺淋巴液中花生四烯酸环氧合酶代谢产物TXB_2和6-keto-$PGF_1\alpha$的含量，进一步探讨ZAP导致急性肺损伤的机制。

1 材料与方法

兔抗山羊中性粒细胞（PMNs）抗体的制备 根据Segal等[5]方法加以改进的Percoll梯度离心法分离PMNs。以1%台盼蓝检查，活细胞>95%，瑞氏染色分类计数，PMNs>98%为适宜。取福氏完全佐剂和PMNs悬液各2.5ml制成匀浆，免疫家兔，3周后插管放血制取血清。血清经饱和硫酸铵盐析，DEAE-Sephadex A50柱层析精制，最后过滤除菌分装，于-20℃保存待用。体外试管法测得此抗血清的血小板聚集试验为阴性。

山羊慢性肺淋巴瘘模型的建立 健康山羊14只，雌雄不拘，体重15～22kg（平均18.2kg）。按照Stothert改良法[6]，经胸导管建立慢性肺淋巴瘘。术后3天，肺淋巴流量稳定无血，方进行实验。

ZAP的制备 实验前从颈总动脉采血60ml，以肝素抗凝并分离血浆。将血浆与酵母多糖（上海生物制品研究所产品）按5 mg/ml的比例混合，在37℃水浴中温育30min后，再次离心。上清液即为ZAP。

观察指标 用压力换能器（TP-101T）和生理记录仪（OEC-3200，Nihon Kohden）测定和记录肺动脉平均压（$P\bar{p}a$）。用心输出量（CO）测定仪（EQ-611V，Nihon Kohden）以热稀释法测CO，计算肺血管阻力（PVR），收集肺淋巴液，记录流量（QL），测定肺淋巴和血浆蛋白浓度，计算二者比值（L/P）和肺淋巴蛋白清除率（LLPC，LLPC=QL×L/P）。在显微镜下计数外周血白细胞数（WBC）和血小板数，分类计数，计算PMNs。

TXB_2和6-keto-$PGF_1\alpha$含量的测定 血浆和淋巴样品的收集、提取按药盒说明书进行。用^{3}H-TXB_2

*青海医学院 病理生理学教研室

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

和^{3}H-6-keto-PGF$_{1\alpha}$放免药盒（解放军总院产）测定。用液体闪烁计数器(Rach-Beta-1217,Automatc, Finland Wallance) 测定其放射活性，经微机处理直接提供样品含量数据。

实验方法和步骤 将14只已建立慢性肺淋巴瘘的山羊随机分为单纯ZAP致伤组（简称对照组，n = 7）和白细胞减少后ZAP致伤组（简称白细胞减少组，n = 7）。实验当天，在局麻下，将一导管经颈总动脉插入主动脉，在X-线下将心导管插入肺动脉。对照组：待$\bar{P}pa$和QL稳定后，在15min内将约30ml ZAP经心导管输入上腔静脉。观察各指标的变化，历时 4 h。白细胞减少组：先肌注抗体2ml，然后将100ml 抗体稀释液输入主动脉，4 h后待$\bar{P}pa$和QL稳定，再输入ZAP，方法同对照组。

在实验过程中，动物处于清醒状态，自然站立或俯卧于观察架上。

2 结果

2.1 肺血流动力学参数的改变

对照组在输入ZAP第15min末，CO 降低17%（$P<0.05$），$\bar{P}pa$增高111%（$P<0.001$），PVR增加162%（$P<0.01$）。第 30min 末，3 项指标均恢复到对照水平。白细胞减少组在输入ZAP 后，$\bar{P}pa$ 增加14%（$P<0.01$），PVR增加25%（$P<0.05$），$\bar{P}pa$增高的幅度显著低于对照组（表 1 、图 1 ）。

表 1 ZAP对肺血流动力学参数的影响（$\bar{X}\pm SE$）

		对 照	输入 ZAP 后				
			0.25h	0.5h	1h	2h	4h
$\bar{P}Pa$	I	2.40±0.133	5.07±0.4***	2.67±0.133	2.53±0.133	2.53±0.133	2.53±0.133
(kPa,n = 7)	II	2.80±0.133	3.20±0.133**	2.80±0.133	2.67±0.133	2.67±0.133	2.53±0.133
CO	I	5.25±0.20	4.33±0.31*	5.32±0.36	4.95±0.29	5.44±0.32	5.52±0.22
(L/min,n = 7)	II	5.31±0.37	4.82±0.32	5.25±0.29	5.14±0.38	4.99±0.33	5.58±0.23
PVR	I	0.46±0.03	1.21±0.14**	0.52±0.05	0.51±0.03	0.46±0.02	0.47±0.03
(kPa/L/ min,n = 7)	II	0.55±0.05	0.69±0.05*	0.55±0.03	0.54±0.06	0.55±0.05	0.46±0.04

与对照值相比*$P<0.05$； **$P<0.01$； ***$P<0.001$

I：对照组 II：白细胞减少组

2.2 白细胞数和血小板数的改变

对照组在输入ZAP第15min末，WBC和PMNs 分别降低69%和78%（$P<0.001$），血小板数下降17%（$P<0.001$）。给山羊输入抗体 4 h后，WBC、PMNs 和血小板数分别下降47%、61%和18%。输入 ZAP 后，WBC和PMNs 又都降低51%（$P<0.001$）（表 2 ）。

2.3 肺淋巴参数的改变

对照组输入ZAP后，QL和LLPC渐增加，第30min末分别增加112%和153%（$P<0.001$）。L/P从第30min 末开始显著高于对照水平。而用抗体减少白细胞后再用 ZAP 致伤，肺淋巴各参数均无显著改变，与对照组相比，其增高幅度也显著为低（表 3 、图 2 ）。

2.4 TXB_2和 6 -keto-$PGF_{1\alpha}$ 含量改变

对照组在输入ZAP第15min 末，血浆和淋巴液中TXB_2 含量分别增加354%和538%（$P<0.001$）。此

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

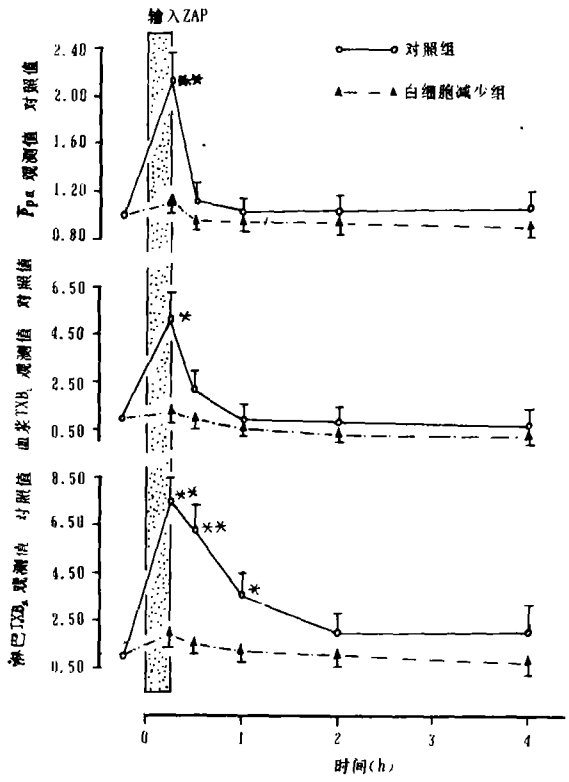


图1 ZAP对$\bar{P}pa$和TXB_2含量的影响
与白细胞减少组相比：***P<0.001，**P<0.01，*P<0.05

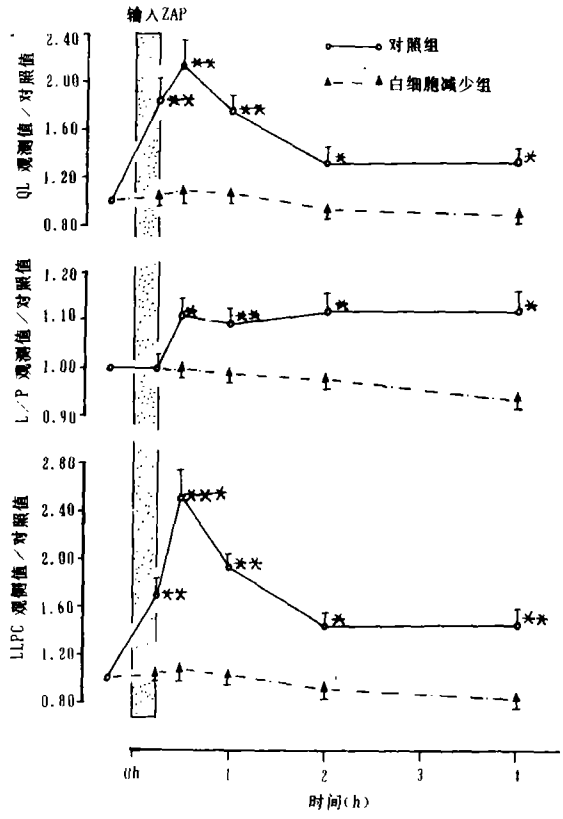


图2 ZAP对QL、L/P和LLPC的影响
与白细胞减少组相比：***P<0.001，**P<0.01，*P<0.05

表2 ZAP对动脉血WBC、PMNs和血小板数的影响（$\bar{X}\pm SE$）

	抗体对照	输入ZAP后 0.25h	0.5h	1h	2h	4h
Ⅰ WBC(×10⁹/L)	5.942 ±0.479	1.870 ±0.479***	3.387 ±0.496**	4.310 ±0.315**	5.552 ±0.360	6.414 ±0.861
PMNs(/mm³)	2633 ±200	0.571 ±100***	1414 ±252**	1944 ±294	2697 ±260	3156 ±472
(n=7) 血小板(×10⁹/L)	283.2 ± 9.9	235.3 ± 13.0	259.2 ±20.5	262.3 ±1 5.9	250.7 ±7.1*	252.1 ±11.6
Ⅱ WBC(×10⁹/L)	5.354 ±0.275	2.834 ±0.265	1.386 ±0.140***	2.921 ±0.285	3.172 ±0.294	4.615 ±0.781*	5.697 ±0.510**
PMNs(/mm³)	2924 ±115	1141 ±71	563 ±34***	1809 ±195***	1967 ±216***	2814 ±338***	3815 ±283***
(n=7) 血小板(×10⁹/L)	287.5 ± 10.3	23[illegible] ± 13.8	234.1 ± 16.8	258.1 ±15.1	280.2 ±13.2	281.1 ± 9.3**	287.1 ± 7.6**

与对照值相比 *P<0.05； **P<0.01 ***P<0.001

Ⅰ：对照组 Ⅱ：白细胞减少组

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

表3 ZAP对QL、L/P和LLPC的影响（$\bar{X}\pm SE$）

		对照	输入ZAP后				
			0.25h	0.5h	1h	2h	4h
QL	I	3.94 ±0.15	7.26 ±0.80***	8.34 ±0.86***	6.87 ±0.56***	5.24 ±0.49**	5.16 ±0.45**
(ml/h,n=7)	II	5.74 ±0.26	5.80 ±0.22	6.11 ±0.22	5.84 ±0.29	5.47 ±0.29	5.10 ±0.37
L/P	I	0.56 ±0.02	0.55 ±0.02	0.62 ±0.02*	0.61 ±0.02*	0.62 ±0.02*	0.62 ±0.02*
	II	0.54 ±0.01	0.54 ±0.02	0.54 ±0.02	0.54 ±0.02	0.53 ±0.02	0.51 ±0.02
LLPC	I	2.20 ±0.14	3.69 ±0.26***	5.57 ±0.42***	4.17 ±0.35***	3.14 ±0.30**	3.15 ±0.23**
(ml/h)	II	3.11 ±0.14	3.15 ±0.16	3.32 ±0.14	3.15 ±0.20	2.92 ±0.21	2.62 ±0.27

与对照值相比 *P<0.05； **P<0.01； ***P<0.001

I：对照组 II：白细胞减少组

表4 ZAP对动脉血浆及肺淋巴液中TXB_2和6-keto-$PGF_1\alpha$含量的影响（$\bar{X}\pm SE$）

			对照	输入ZAP后				
				0.25h	0.5h	1h	2h	4h
TXB_2	血浆	I	550.5 ±69.1	2498.2 ±297.2***	1041.2 ±288.9	477.7 ±73.6	403.1 ±45.9	341.6 ±65.4*
		II	745.3 ±82.1	988.7 ±110.7	774.7 ±91.9	584.4 ±108.3	373.9 ±42.9	316.0 ±44.9
(Pg/ml,n=7)	淋巴	I	442.1 ±105.2	2818.4 ±431.5***	2346.1 ±336.6**	1195.2 ±177.0**	647.0 ±114.8	631.2 ±116.3
		II	843.4 ±122.2	1329.7 ±234.4	1227.1 ±212.6	1045.6 ±154.7	922.7 ±192.3	690.1 ±145.6

与对照组相比 *P<0.05； **P<0.01； ***P<0.001

I：对照组 II：白细胞减少组

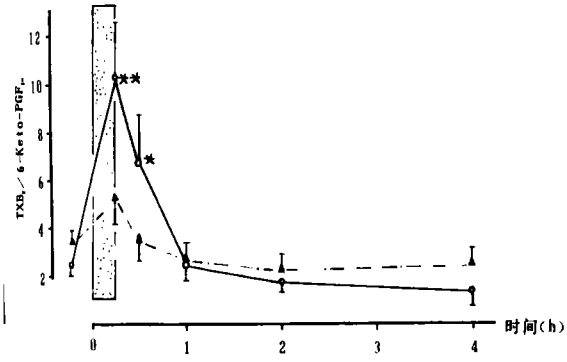


图3 血浆TXB_2/6-keto-PGF1α比值

与对照值相比：**P<0.01，*P<0.05

后，血浆TXB_2含量迅速下降到对照水平，而淋巴液中TXB_2含量下降较缓慢。血浆TXB_2含量与$\bar{P}^2$呈显著正相关（r=0.726，P<0.001），WBC与血浆TXB_2含量呈显著负相关（r=-0.644，P<0.001）。降低白细胞数后再用ZAP致伤。血浆和淋巴液中TXB_2含量分别增加32%和81%。其增高的幅度显著低于对照组（表4、图1）。6-keto $PGF_1\alpha$含量在两组均无显著改变（数据略）。

在对照组输入ZAP第15min末，血浆TXB_2/6-keto-$PGF_1\alpha$比值显著增大（P<0.01），此后降低，第60min末恢复到对照值水平。而在白细胞减少组，此比值改变不明显（图3）。

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

3 讨 论

经肺静脉输入ZAP后，在$\bar{P}pa$显著升高的同时QL和LLPC增加，L/P逐渐增大。提示早期QL和LLPC增加是由于肺微血管壁通透性增高，并在此基础上，由肺微血管压升高，予以促进的结果。后期，肺动脉压恢复到对照水平，QL和L/P仍显著高于相应对照值，表明肺微血管壁通透性仍有增高。这与Meyrick[7]报道的结果一致。

QL增加，同时L/P不变或增大是肺血管壁通透性增高的标志。本实验结果表明，ZAP可以引起QL和L/P的显著增高，而用抗体降低白细胞后再用ZAP致伤，上述各淋巴参数改变均不明显。说明白细胞与ZAP引起的血管壁通透性增高有直接关系。

酵母多糖是常用而有效的补体系统激活剂。其活化的血浆（ZAP）中含有活化的补体成份，在体外可引起明显的白细胞聚集与脱颗粒。已证实，ZAP聚集白细胞的主要有效成份是C_5a。粒细胞的颗粒中含有大量蛋白酶，在C_5a等适宜刺激作用下可以脱颗粒释放，直接损伤血管壁而导致其通透性升高。我们在同一实验模型中也发现，ZAP损伤肺的同时，血浆与淋巴液中组织蛋白酶-D的含量明显增加，并与肺损伤的程度显著相关。此外，激活的粒细胞发生“呼吸爆发”时，释出的氧自由基也可直接损伤血管壁。

本实验在$\bar{P}pa$增高的同时，动脉血浆TXB_2含量也显著增加，两者在时间上一致，并呈显著正相关。于此同时，QL增加显著，L/P逐渐增大。降低白细胞后再用ZAP致伤，血浆TXB_2增加不明显，同时$\bar{P}pa$升高幅度明显为低，QL和LLPC也无显著改变，表明在肺微血管壁通透性增高的基础上，肺动脉压的改变可进一步促进肺血管内外液体和蛋白质交换，而这种改变又可能与白细胞直接或间接引起的TXA_2合成释放增多有关。已有实验证实，人的中性粒细胞与ZAP温育时可产生TXA_2[8]。说明白细胞参与ZAP引起的肺血流动力学改变。

我们在实验中发现，用ZAP致伤时，血浆6-keto-$PGF_1\alpha$含量增加不明显。这与油酸、内毒素等引起的肺损伤不同，其原因可能与两者致肺损伤的机制不尽相同，以及后者肺损伤程度往往较重有关。TXA_2具有很强的缩血管作用，而PGI_2是一种很强的舒血管介质。有人认为肺血管的基础状态取决于TXA_2/PGI_2之间的平衡。本实验在用ZAP致伤时，6-keto-$PGF_1\alpha$仅有轻微增加，而TXB_2显著增加，结果其比值明显增大，使血管处于收缩状态。

本实验在用ZAP致伤时，外周血小板数也显著降低。但有文献报道[9]，用抗血清降低血小板并不能防止ZAP引起的肺损伤，说明血小板在其中不起主要作用。

用ZAP致伤后，肺淋巴液中TXB_2含量升高的幅度比动脉血浆的高，而且持续的时间也比后者长。表明肺组织也是TXA_2的重要来源。有人认为，粒细胞产生的氧自由基在损伤血管壁时，可激活膜中的磷脂酶A_2，使花生四烯酸代谢产物进一步增多[10]。在本实验中，肺淋巴液中TXB_2浓度持续增高可能是持续性肺损伤的结果。

参 考 文 献

1. Brigham KL. Endotoxin and lung injury. Am Rev Respir Dis 1986; 133:913
2. Calabrei P. Alkylating agents, antimetabolites, hormones, and other antiproliferative agents. In the Pharmacological Basis of Therapeutics. New York. The Macmillan Publishing Co, 1980:1256
3. Dyer EL. Role of circulating granulocytes in sheep lung injury produced by phorbol myristate acetate. J Appl Physiol 1986; 60(2):576

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

4. Terragno NA. Contribution of prostaglandins to the renal circulation in conscious, anesthetized, and laparotomized dogs. Circ Res 1977; 40:590
5. Segal AM. A rapid single centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continuous density gradients of percoll. J Immunol Methods 1980; 32:209
6. Stothert JC. Modified chronic lung lymph fistula in goats via thoracic wall. J Aappl Physiol 1981; 51:226
7. Meyrick BO. The effect of a single infusion of zymosan -activated plasma on the pulmonary microcirculation of sheep structure-function relationships. Am J Pathol 1984; 114(1):32
8. Goldstein IM. Thromboxanegeneration by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med 1978; 148:787
9. McDonald JWD. Thromboxane synthesis by sources other than platelets in association with complement-inducd pulmonary leukostasis and pulmonary hypertension in sheep. Circ Res 1983; 52:1
10. Maestro RED. Free radicals as mediators of tissure injury. Acta Physiol Scand Suppl 1980; 492:43

(收稿: 1988.11.17; 修回: 1989.11.21)

An Experimental Study of Pathogenesis of Acute Lung Injury Induced by Complement Activation in Conscious Goat, Roles of Leukocytes and Prostaglandins

Guo Shengxiang, et al (Department of Pathophysiology and Institute of Hypoxia, Third Military Medical College)

The roles of leukocytes and prostaglandins in mediating alterations of pulmonary hemodynamics and lung fluid exchange after intravenous autologous zymosan-activated plasma (ZAP) challenge is investigated in 14 conscious goats with chronic lung-lymph-fistula. In the control group, ZAP infusion causes the mean pulmonary arterial pressure ($\bar{P}pa$) markedly elevate, lung lymph flow (QI) and the lymph-to-plasma protein concentration ratio (L/P) increase. There is a significant correlation between $\bar{P}pa$ and the content of plasma TXB_2. In antiPMNs serum-induced leukopenia group, the extent of increment in $\bar{P}pa$ is not as obvious as the normal goats, and no marked change is observed in QI, L/P and content of TXB_2. These results indicate: 1. TXA_2 releases from leukocytes may affect lung fluid exchange during ZAP infusion; 2. leukocytes may play an important role in ZAP-induced lung injury.

Key words: lung diseases/PP; lung/IN; complement/PH; leukopenia; thromboxanes

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