DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.03.005

活化的补体对清醒山羊肺内液体交换的影响

——白细胞的作用

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

提 要 作者采用抗白细胞抗体和清醒山羊的慢性肺淋巴瘘模型，观察了酵母多糖活化的血浆（ZAP）分别对白细胞数正常（n=7）和白细胞减少（n=7）的山羊肺血管增压反应、肺微血管壁通透性及肺内组织间液形成的影响。ZAP可致肺血管阻力及肺淋巴蛋白清除率升高，肺淋巴流量增加。白细胞减少组的山羊上述指标的增加幅度显著低于白细胞数正常组。结果提示：白细胞参与活化的补体导致的肺内液体交换失衡的过程。

关键词 白细胞减少症；补体成份激活；肺水肿；肺循环

白细胞在肺损伤中的作用日益引人注目，在一些肺损伤模型中，已证明白细胞减少的动物肺损伤程度较轻[1][2][3]。但也有持反对意见者[4]。在以往的研究中，多用化学药物来降低动物的白细胞数，这些药物多同时作用于其它增殖周期短的细胞，有的还是自由基的清除剂[5]，因此难以判断其防止肺损伤的确切机制。麻醉可影响白细胞的聚集和自由基的释放[6]，从而影响对实验结果的分析。

利用慢性肺淋巴瘘收集肺淋巴液，是研究肺微血管壁通透性变化较客观的方法。由于手术难度大，国内开展得不多。将此方法用于白细胞减少的动物肺损伤机制的研究，国内尚未见报道。

为此，作者自制了兔抗山羊白细胞抗体，采用清醒山羊的慢性肺淋巴瘘模型，观察了酵母多糖活化的血浆（Zymosan-activated plasma，ZAP）分别对白细胞数正常和减少的山羊的肺血管增压反应、肺微血管壁通透性及肺组织间液形成的影响，旨在阐明白细胞在活化补体所致的急性肺损伤中的作用。

* 研究生，现在北京304医院中心研究室

材 料 与 方 法

一、兔抗山羊白细胞抗体的制备

根据Herbeck等[7]的Percoll梯度离心法分离羊血中的多形核粒细胞（Polymorphonuclear leukocytes，PMNs）。Percoll原液为Pharmacia Fine Chemicals产品。分得的PMNs活力>95%，纯度>98%。将一定浓度的上述PMNs悬液与Freud's佐剂充分混匀后免疫家兔，经加强免疫后，放血，分离血清，灭活补体，吸附红细胞及血小板抗体。层析精制，过滤除菌，-20℃保存。抗体效价为1:2560，体外与血小板不产生凝集。

二、山羊慢性肺淋巴瘘的建立

采用Stothert改良法[8]，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，动物一般状况良好，方可进行实验。

三、制备ZAP和致伤

健康山羊14只，雌雄不拘，体重15～22kg（18.2±2.5kg），随机分为单纯ZAP组（简称对照组，n=7）和白细胞减少+ZAP组（简称白细胞减少组，n=7）。

局麻下经颈外静脉将热敏心导管（7F，Edwards Laboratories，USA）插至肺动脉，供测肺动脉压（$\overline{Ppa}$）、心输出量（CO）和输入ZAP用。经颈总动脉插塑料管至主动脉，供注射抗体和采血

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

用。实验在动物清醒状态下进行。

采山羊的肝素抗凝血60ml，分离血浆，并与酵母多糖·(上海生物制品所产品) 按5.0mg/ml比例混合，37℃孵育30min，离心，上清液即为ZAP。

1. 对照组：将ZAP30ml以2ml/min的速度经心导管匀速注入上腔静脉。分别观测输入ZAP前和输入ZAP第15，30，60，120和240min末的各项指标。

2. 白细胞减少组：输入ZAP前4h，取抗体2ml用生理盐水稀释后，部分肌注，其余部分经动脉插管缓慢注入主动脉内。4h后输入ZAP，观测指标同对照组。

四、观测指标

用压力换能器（TP-101T）和生理记录仪（OEC-3200，Nihon Kohden）测定和记录$P\overline{pa}$。用心输出量测定仪（EQ-611V，Nihon Kohden）以热稀释法测定CO，计算肺血管阻力（PVR）。收集肺淋巴并记录肺淋巴流量（QL）。用双缩脲法测定血浆和肺淋巴的蛋白浓度，计算淋巴与血浆蛋白比值（L/P）和肺淋巴蛋白清除率（LLPC）。计数动脉血的WBC、PMNs和血小板。

结　果

一、动脉血WBC、PMNs和血小板的变化

输入ZAP第15min末，对照组的WBC、PMNs和血小板分别由5.942±0.479×10⁹/L、2633±20个/mm³和283.2±9.9×10⁹/L降至1.870±0.295×10⁹/L、571±100个/mm³和235.3±13.0×10⁹/L（P<0.001），以后逐渐恢复至对照值水平。在注入抗体第4h末，白细胞和PMNs分别减少47.1%和61.5%，血小板也减少了17.4%。输入ZAP第15min末，白细胞减少组的WBC、PMNs分别由2.834±0.265×10⁹/L和1141±71个/mm³减至1.386±0.14×10⁹/L和563±34个/mm³（P<0.001），血小板数无显著变化（表1）。

表1　ZAP对动脉血WBC、PMNs和血小板数的影响（$\bar{X}$±SE）

组别	指标	ZPA前(min)	ZAP后(min)				
			15	30	60	120	240
对照组 (n=7)	WBC (×10⁹/L)	5.942 ±0.479	1.870*** ±0.295	3.387** ±0.496	4.310** ±0.315	5.552 ±0.360	6.414 ±0.816
	PMNs (个/mm³)	2633 ±200	571*** ±100	1415** ±252	1944* ±294	2697 ±260	3156 ±472
	血小板 (×10⁹/L)	283.2 ±9.9	235.3*** ±13.0	259.2 ±20.5	262.3 ±15.9	250.7** ±7.1	252.1 ±11.6
		注抗体前	注抗体后				
白细胞减少组 (n=7)	WBC (×10⁹/L)	5.354 ±0.275	2.834 ±0.265	1.386*** ±0.140	2.921 ±0.285	3.172 ±0.394	4.615* ±0.781	5.697*** ±0.510
	PMNs (个/mm³)	2924 ±115	1141 ±71	563*** ±34	1809*** ±195	196/*** ±216	2814*** ±338	3815*** ±283
	血小板 (×10⁹/L)	287.5 ±10.3	237.3 ±13.8	234.1 ±16.8	258.1 ±15.1	280.2 ±13.2	281.1** ±9.3	287.1** ±7.6

注：给予ZAP前后比较* P<0.05　** P<0.01　*** P<0.001

二、血流动力学指标的变化

输入ZAP第15min末，对照组的$P\overline{pa}$和PVR分别由2.40±0.133kPa和3.47±0.21L/kPa·min增至5.05±0.400kPa和3.47±0.21L/kPa·min（P<0.001），CO由5.25±0.20L/min降至4.33±0.31L/min（P<0.05）。白细胞减少组的$P\overline{pa}$和PVR也分别由2.80±0.133kPa和4.15±0.35L/kPa·min增至3.20±0.133kPa和5.17±0.35L/kPa min（P<0.05），CO无显著变化。此后，两组的上述各指标逐渐恢复至对照值水平（表2）。

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

表2 ZAP对$\bar{P}pa$、CO和PVR的影响（$\bar{X}\pm SE$）

组别	指标	ZAP前 (min)	ZAP后(min) 15	30	60	120	240
对照组 (n=7)	$\bar{P}pa$ (kPa)	2.40 ±0.133	5.07 ±0.400***	2.67 ±0.133	2.53 ±0.133	2.53 ±0.133	2.53 ±0.133
	CO (L/min)	5.25 ±0.20	4.33* ±0.31	5.32 ±0.35	4.95 ±0.29	5.44 ±0.32	5.52 ±0.22
	PVR (L/kPa·min)	3.47 ±0.21	9.10** ±0.12	3.88 ±0.35	3.82 ±0.23	3.43 ±0.18	3.56 ±0.21
白细胞减少组 (n=7)	$\bar{P}pa$ (kPa)	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 (L/min)	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 (L/kPa·min)	4.15 ±0.35	5.17* ±0.35	4.10 ±0.26	4.07 ±0.45	4.10 ±0.44	3.41 ±0.33

注：给予ZAP前后比较：*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

白细胞减少组的动物在注入抗体第4h末，各项指标均有不同程度的改变。为减轻抗体因素的影响，我们在进行统计学处理时，以各项指标的增加（或减少）幅度（观测值/对照值）进行两组间的比较（图1）。从图1可见，在输入ZAP后，白细胞减少组的$\bar{P}pa$和PVR的增加幅度显著低于对照组（P<0.01）。

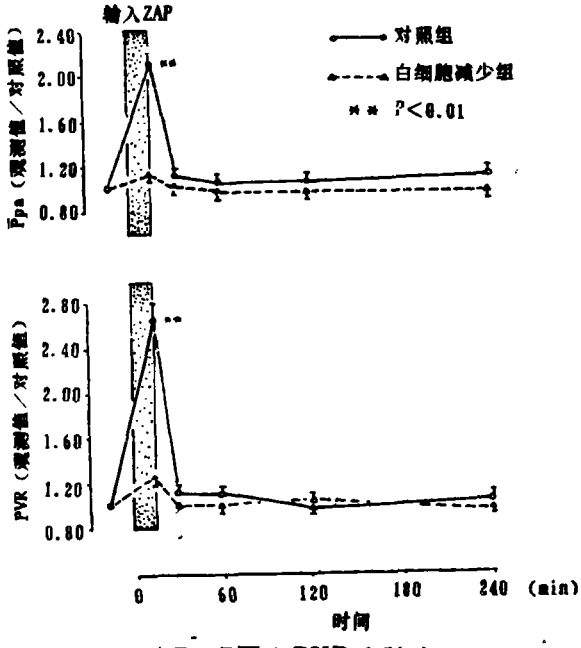


图1 ZAP对$\bar{P}pa$和PVR的影响

三、肺淋巴参数的变化

输入ZAP第15min末，对照组的QL和LLPC均显著增加，第30min末达高峰，分别由3.94±0.15 ml/h和2.20±0.14ml/h增至8.34±0.86ml/h和5.57±0.42ml/h（P<0.001）。L/P也在30min末显著升高（P<0.05）。至第4h末，上述三项指标仍显著高于对照值。白细胞减少组的QL和L/P、LLPC在输入ZAP前后无显著改变（表3）。

输入ZAP后，白细胞减少组的QL、L/P和LLPC的增加幅度均显著低于对照组（图2）。

讨 论

大量的研究工作表明，血浆补体系统的激活及其导致的PMNs的凝集，在肺损伤的发生中起重要作用。为探讨急性肺损伤的共同发病机制，我们选用酵母多糖作为血浆补体系统的激活剂，复制出一种急性肺损伤的模型。

在输入ZAP后，随着外周血WBC和PMNs的急剧减少，动物的PVR显著升高，并伴有QL和LLPC的增多。说明肺内液体交换的增加是肺小血管收缩引起的肺血管压

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

表3 ZAP对QL、Q/P和LLPC的影响（X±SE）

组别	指标	ZAP前 (min)	ZAP后(min) 15	30	60	120	240
对照组 (n=7)	QL (ml/h)	3.94 ±0.15	7.26*** ±0.80	8.34*** ±0.86	6.87*** ±0.56	5.24** ±0.29	5.16 ±0 45
	L/P	0.56 ±0.02	0.55 ±0.02	0.62* ±0.02	0.61* ±0.02	0.62* ±0.02	0.62* ±0.02
	LLPC (ml/h)	2.20 ±0.14	3.69*** ±0.26	5.57*** ±0.42	4.17*** ±0.35	3.14** ±0.30	3.15** ±0.23
白细胞减少组 (n=7)	QL (ml/h)	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	0.54 ±0.02	0.54 ±0.02	0.54 ±0.02	0.54 ±0.02	0.53 ±0.02	0.51 ±0.02
	LLPC (ml/h)	3.11 ±0.14	3.15 ±0.16	3.32 ±0.14	3.15 ±0.20	2.92 ±0.21	2.62 ±0.27

注：给予ZAP前后比较：*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

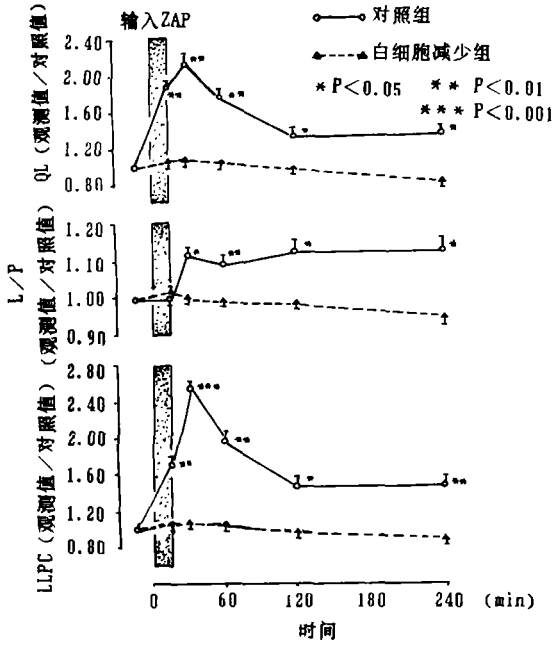


图2 ZAP对QL、L／P和LLPC的影响

力升高和肺微血管壁通透性增高的共同结果，并提示这些改变可能与WBC和PMNs的聚集有关。有人认为外周血WBC和PMNs的减少是由于WBC和PMNs在肺中聚集的结果[9]，聚集的WBC通过释放各种活性物质引起肺损伤[10]。

为了进一步证实WBC和PMNs在急性肺损伤中的作用，我们以单用ZAP组作为对照组，另加一组先用抗体将体内WBC和PMNs减少后再输入ZAP，比较两组的PVR、QL及LLPC的改变程度。结果表明，白细胞减少组的山羊在输入ZAP后，PVR及QL和LLPC的增加幅度均显著低于对照组，说明WBC确实参与ZAP导致的急性肺损伤过程。

在注入抗体后，血中WBC和PMNs减少的同时，也伴有血小板的减少。但体外血小板与抗体凝集试验阴性，说明血小板减少并非抗原抗体反应所致，而可能与聚集的WBC的作用有关。为减轻抗体所致的WBC在肺中的聚集及释放的活性物质的影响，我们从主动脉而非静脉系统输入抗体，两组间比较则以各指标的增加幅度为准。

值得注意的是，在输入ZAP后，白细胞减少组山羊的PVR、QL和LLPC仍有不同程度的变化，是由于体内尚存的WBC被ZAP激活所致，还是WBC以外的因素所致，有待于进一步探讨。

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

参 考 文 献

1. Ward PA, et al. Systemic Complement Activation, Lung Injury, and Products of Lipid Peroxidation. J Clin Invest 1985; 76(2):517
2. Heath CA, et al. J Leukocyte Biology 1986; 39:385
3. 严仪昭，等。病理生理学报 1985；1(4):9
4. Raj U, et al. Oxygen-induced lung microvascular injury in neutropenic rabbits and lambs. J Appl Physiol 1985; 58:921
5. Taylar AE, et al. Physiologist 1983; 25:204
6. Welch WD, et al. Effect of Halothane and N_2O on the Oxidative Activity of Human Neutrophils. Anaesthesiology 1982; 57:172
7. Herbeck RJ, et al. The Isolation and Functional Activity of Polymorphonuclear Leukocytes and Lymphocytes Separated from Whole Blood on a Single Percoll Density Gradient. Clin Immunol Immunopathol 1982; 23(3):682
8. 陈希林，等。缺氧、内毒素对清醒山羊肺动脉增压反应和肺内液体交换的影响。第三军医大学学报 1986；8(1):1
9. Fantone JC, et al. Polymorphonuclear Leukocyte-mediated Cell and Tissue Injury: Oxygen Metabolites and Their Relations to Human Disease. Human Pathol 1985; 16(10):973
10. 谢忠琳，等。激活的补体对清醒山羊肺内液体交换的影响——超氧阴离子的作用。第三军医大学学报 1987；9(1):14

(收稿:1988.9.21; 收回:1989.1.27)

Requirement of Leukocytes in Activated Complement Inducing Pulmonary Hemodynamic Changes in Conscious Goats

Zhao Hong, et al. (Department of Pathophysiology, Third Military Medical College)

The effects of Zymosan-activated plasma (ZAP) on pulmonary pressure response and fluid change across pulmonary microvascular wall are studied (with normal WBC count, n = 7) and leukopenic (n = 7) goats. Following ZAP infusion the mean pulmonary pressure ($P\overline{pa}$), lung lymph flow and clearance rate of lung lymph protein are elevated in control goats, but those changes are less marked in leukopenic goats. The results suggest that leukocytes are involved in the pathogensis of lung dysfunction due to ZAP infusion.

Key words: Leukopenia/PP; Complement activation; Pulmonary edema/PP; Pulmonary circulation

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